



Monitoraggio delle avversità biotiche della vite

FORTE INTERAZIONE TRA I DUE MODULI

Modulo Malattie sistemiche vanda Prota Modulo Avversità animali
Arturo Cocc Malattia <u>INFETTIVA O PARASSITARIA</u>: indotta da un organismo che vive completamente a discapito della pianta ospite (parassita)

BIOTROFI: parassiti obbligati che possono vivere e riprodursi solo su un altro organismo vivente il quale anche se lentamente può arrivare alla morte

Fitoplasmosi e Virosi sono malattie indotte da patogeni biotrofi che si distribuiscono a tutti gli organi della pianta, sono cioè SISTEMICI

VIROSI della vite

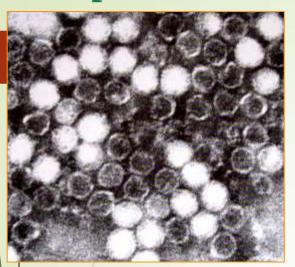




Complesso dell' Arricciamento

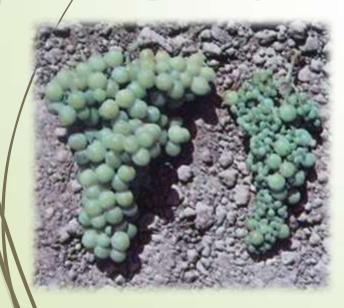
dell' Accartocciamento
del Legno riccio
Malattia delle enazioni
Virosi di nuova introduzione (GPGV)

Complesso dell'arricciamento fogliare



Malattia chiamata "Grapevine fanleaf disease", è un'affezione "complessa" comprende diversi nepovirus isometrici dai sintomi molto simili, per distinguere la loro presenza è quindi necessario applicare specifici saggi di laboratorio.

Il più diffuso e dannoso presente anche in Sardegna, il GFLV o Grapevine fanleaf virus, è presente solo in vite.





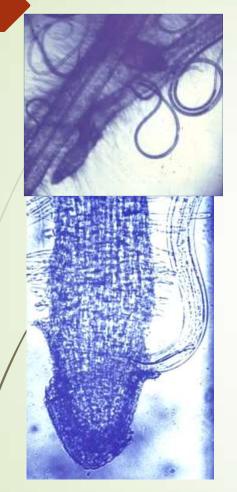
GFLV: sintomo caratteristico

In tarda primavera compaiono a carico delle foglie tipiche malformazioni accompagnate da asimmetrie, frastagliature, dentellature accentuate e arricciamento.

Le nervature principali molto ravvicinate ed il seno peziolare molto aperto fanno assumere agli organi fogliari una forma che ricorda quella di un ventaglio parzialmente aperto da cui il termine inglese Fanleaf (fan = ventaglio, leaf = foglia). Le piante infette assumono un aspetto cespuglioso e sofferente.



VETTORI trasmissione per nematodi



Apice radicale e nematode durante l'attività trofica

Tipica sintomatologia di campo prodotta dal nematode vettore del virus dall' arricciamento fogliare della vite (GFLV)



GPGV

Emergenza sanitarie esplosa, in forma epidemica, in viti del Veneto, Friuli e Trentino, territori del Prosecco su Glera. responsabile è stato individuato in un agente eziologico di naturale infettiva il Grapevine Pinot gris virus (GPGV).

In continua espansione è presente anche in Sardegna dove induce danni soprattutto su Vermentino







Le viti colpite sono in continuo aumento numerico come pure l'intensità dei sintomi; questi ultimi compaiono soprattutto in vigneti giovani e sono molto variabili: deformazioni fogliari (somiglianti alle enazioni), sbiancamento delle nervature e degli spazi perinervali, germogli affastellati (tipo i scopazzi), danni alle infiorescenze per colature fiorali, ridotto accrescimento delle bacche con poco succo.

Aspetto rachitico e ritardo di crescita in Vermentino colpito da GPGV







DIAGNOSI termine che indica il processo di identificazione degli agenti causali delle malattie, importante sia per lo studio delle malattie che per programmare le azioni di lotta

Lavoro pratico seguendo un percorso diagnostico: dal vigneto al laboratorio

- 1. Fase di campo o diagnosi macroscopica: osservazione dei sintomi a partire dalla ripresa vegetativa
- 2. Prelievo di campioni specifici da saggiare
- 3. Fase di laboratorio: scelta delle metodiche più adatte
- a) metodo sierologico ELISA (riconoscimento antigene anticorpo)
- b) metodi molecolari (PCR ed RT-PCR)

Diagnosi di campo

Informazioni dal vigneto con intervista al viticoltore:

- Mappatura della zona d'indagine con la posoizione delle piante sottoposte al lavoro di diagnosi;
- Ambiente (clima, tipo di terreno e di specie spontanee e coltivate)
- Operazioni agronomiche
- Coltivazioni precedenti

Il prelievo del campione (foglie/piccioli/tralci) va eseguito da più parti della pianta, a causa della distribuzione non uniforme dei patogeni sotto indagine

DIAGNOSI DI LABORATORIO: test sierologico ELISA

Preparazione del campione

La prima fase di lavorazione dopo preventiva catalogazione dei campioni (foglie, piccioli, legno) prevede una triturazione fine con apposito strumento. Tale pratica serve per rompere le pareti cellulari ed ottenere un succo dove sia presente il patogeno se presente



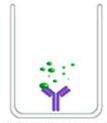




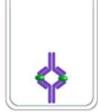
Sandwich ELISA



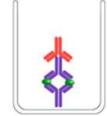
 Plate is coated with a capture antibody



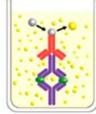
2. Sample is added, and any antigen present binds to capture antibody



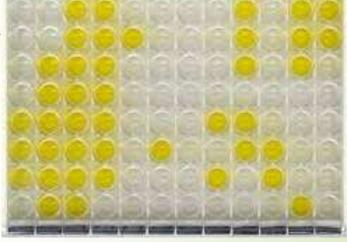
3. Detecting antibody is added and binds to antigen



4. Enzyme-linked secondary antibody is added and binds to detecting antibody



5. Substrate is added and converted by enzyme resulting in color change dependent upon target concentration.



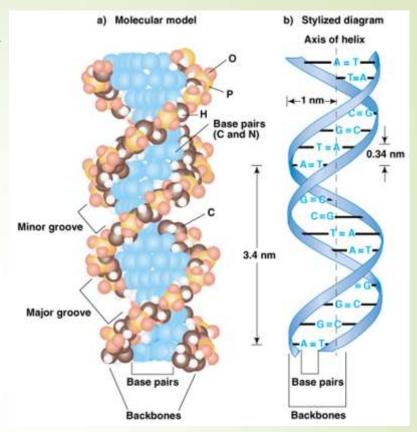


Risultato di un test ELISA in piastra di plastica. La comparsa della colorazione gialla sviluppata dall'enzima, mediante digestione del substrato, in alcuni pozzetti della piastra indica la positività del campione. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione.

Test molecolare: la PCR

La réazione a catena della polimerasi o Polymerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica molecolare che consente la sintesi esponenziale, "in vitro", di un frammento di DNA, a partire da uno stampo noto di sequenza nucleotidica.

La reazione praticamente riproduce, in modo artificiale, ciò che avviene nel nucleo delle cellule, ossia la replicazione del DNA.



DIAGNOSI DI LABORATORIO: metodi molecolari

ESTRAZIONE DNA

Lisi cellulare

- Deproteinizzazione del campione lisato
- Precipitazione dell'acido nucleico



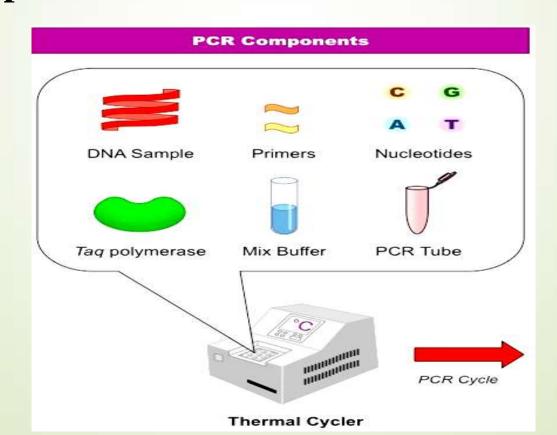
L'estrazione del campione, tecnica il cui protocollo viene scelto a seconda dello specifico patogeno, serve per "liberare" dalle cellule l'acido nucleico sottoposto al test utilizzando il tessuto preferenziale a seconda del patogeno sottoposto ad indagine. La preventiva omogeneizzazione può essere aiutata dall'uso di azoto liquido.

Una serie differenziata di centrifugate in apposito tampone, portano alla separazione dell'acido nucleico totale contenuto nei tessuti vegetali da altri componenti



Il prodotto finale deve essere sempre conservato in congelatore (-20°C o – 80°C) fino all'applicazione della fase successiva di amplificazione

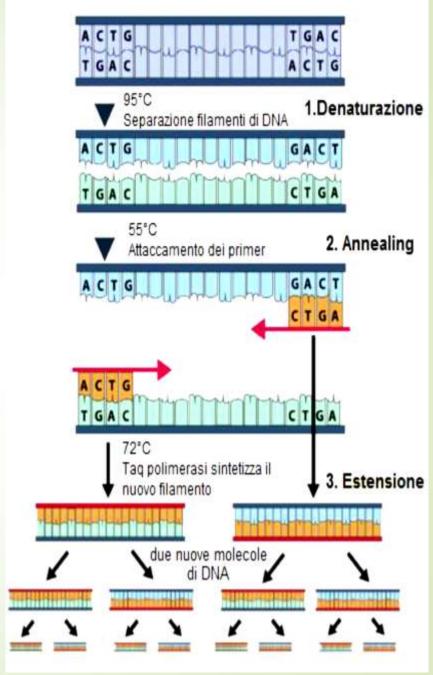
La reazione avviene in appositi termociclatori provvisti di software che consentono di impostare i programma secondo le specifiche esigenze termiche ai quale devono essere sottoposti i reagenti per l'amplificazione dei campioni estratti



ESEMPIO DI CICLO:

- 1. DENATURAZIONE dell'acido nucleico ad es: (94°C x 1-2')
- 2. APPAIAMENTO dei primers sull'acido nucleico bersaglio ad es. (50-65°C x 1-2')
- 3. ESTENSIONE mediante sintesi polinucleotidica secondo il principio della complementarietà delle basi ad es. (72°C x 2') Le fasi si ripetono per un numero di cicli variabili, in genere 35.

Le molecole di DNA si visualizzano in corsa ELETTROFORETICA

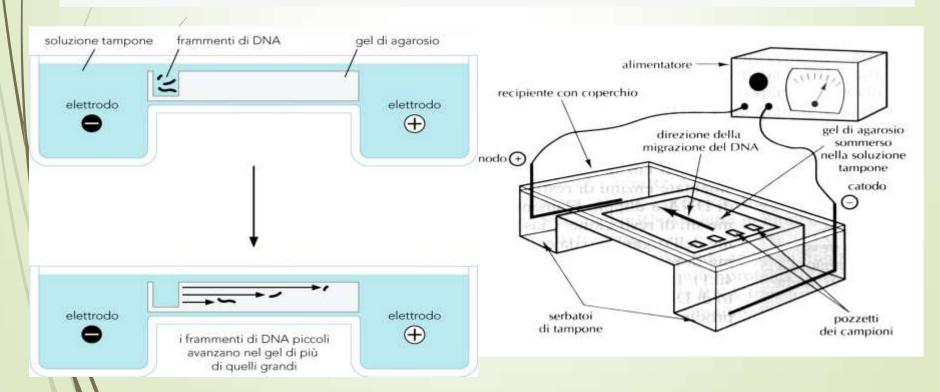


CORSA ELETTROFORETICA

Separazione di molecole cariche in soluzione

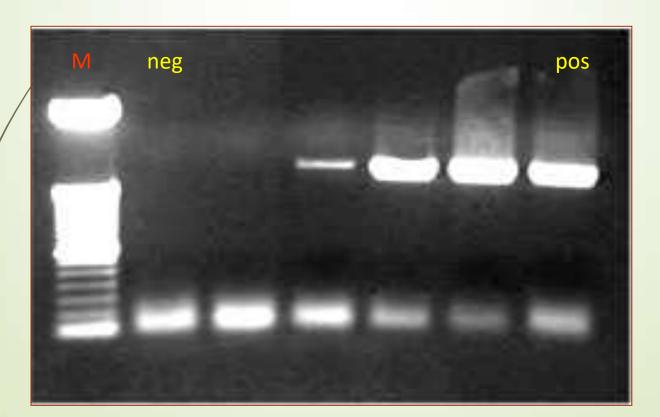
Principio

migrazione differenziale in un campo elettrico in base al rapporto carica/massa ed alla forma.



Gli amplificati alla fine dei cicli vengono sottoposti alla corsa elettoforetica per evidenziare eventuali bande indicanti la presenza di campioni positivi in esame. L'elettroforesi viene effettuata in gel di agarose ad una certa percentuale come da protocollo.

Nella prova diagnostica devono essere presenti sempre due controlli sicuri, uno positivo l'altro negativo



· Integrare nozioni teoriche di Entomologia viticola



Approfondire in campo i temi trattati in aula

Fitofagi della vite: insetti (Entomologia viticola)

acari

nematodi

(Avversità animali)

Forte integrazione pratica tra i moduli

(Avversità animali)



(Malattie sistemiche)

Acari e nematodi della vite



Ordine

Teoria

- Generalità
- Morfologia
- Biologia
- Sintomi
- Lotta

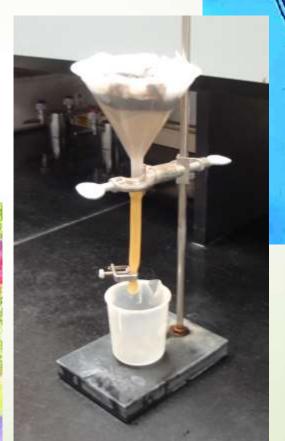


Acari e nematodi della vite

Laboratorio

- Estrazione
- Identificazione





Acari e nematodi della vite

Campo

- Sintomi
- Danni





Riconoscimento in campo dei principali insetti



Riconoscimento in campo dei sintomi



Monitoraggio e campionamento in campo



Lezioni teorico-pratiche



Combinazione aula-campo (Azienda Fenosu)



Avversità biotiche della vite



Escursione interdisciplinare

S. Antioco-Calasetta-Santadi



Serdiana - Dolianova

Badesi

Monitoraggio delle avversità biotiche della vite

Lezioni pratiche

Coinvolgimento diretto

Imparare facendo

Le cose ascoltate si dimenticano le cose viste si ricordano le cose fatte si imparano

Monitoraggio delle avversità biotiche della vite

Contatti

Arturo Cocco

acocco@uniss.it

079 229245

