

IL PUNTO SULLA LOTTA AI VIRUS E LA CERTIFICAZIONE DELLA VITE

G.P. MARTELLI¹, U. PROTA², A. QUACQUARELLI³ e E. REFATTI⁴

¹Dipartimento di Difesa delle Piante, Università degli Studi e Centro di Studio del CNR sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, Bari; ²Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Sassari; ³Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Roma; ⁴Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante, Università degli Studi, Udine.

RIASSUNTO

Vengono passati in rassegna e discussi criticamente i principali metodi disponibili per il miglioramento sanitario della vite. Questo sembra perseguibile, con possibilità di successo, sia attraverso la produzione di piante sane mediante selezione sanitaria, risanamento ed embriogenesi somatica, sia con l'uso di piante preimmunizzate o resistenti, ottenute con metodi tradizionali o biotecnologici (transgenosi). Viene infine fatto breve cenno alla definizione e messa in opera degli schemi di certificazione.

SUMMARY

The main procedures currently available for the sanitary improvement of grapevines are critically reviewed. Healthy plants can be obtained through sanitary selection, sanitation (heat therapy and meristem tip culture) or somatic embryogenesis. Resistant plants can be produced either through pre-immunization with mild virus strains, or genetically, by conventional (crossing) or biotechnological (genetic engineering) methods. The establishment and implementation of certification schemes is also discussed.

Il generalizzato degrado sanitario della viticoltura mondiale, che la più approfondita conoscenza degli agenti infettivi che lo provocano e l'aumentata efficienza delle tecniche diagnostiche fa apparire sempre più preoccupante, impegna da anni virologi e viticoltori in interventi che valgano a contenerlo nell'immediato e, possibilmente, a ridurlo nel medio-lungo termine. La strategia messa a punto a tal fine utilizza approcci metodologici diversificati per l'ottenimento di materiale che garantisca un'accettabile sanità di partenza degli impianti (piante certificate), ovvero sia dotato di caratteristiche intrinseche che gli permettano di opporsi, per quanto possibile, alle infezioni (piante pre-immunizzate o resistenti).

Di queste metodiche, e della loro efficacia, si cercherà di dare qui di seguito un breve cenno descrittivo ed una valutazione critica.

OTTENIMENTO DI PIANTE SANITARIAMENTE MIGLIORATE

Nella presente accezione, per "piante sanitariamente migliorate" si intendono quelle il cui stato sanitario accertato sia compatibile con i requisiti minimi di uno schema ufficiale di certificazione. Esse pertanto non devono essere necessariamente libere da **tutti** i possibili agenti infettivi segnalati su *Vitis*, siano essi virus, viroidi o micoplasmi, ma possedere il livello di sanità prescritto dallo schema di riferimento.

1. Selezione sanitaria.

Consiste nella individuazione in campo di piante per quanto possibile asintomatiche e, comunque, le meno visibilmente affette dalle sindromi virali predominanti nel comprensorio in cui la selezione é effettuata. Di solito, nella scelta si tiene conto delle caratteristiche morfologiche, produttive e tecnologiche delle piante (selezione clonale), sì da assicurare che gli individui selezionati siano anche pomologicamente validi ed utilizzabili come potenziali capostipiti clonali.

I principi e la metodologia della selezione clonale e sanitaria sono stati descritti in una quantità di articoli tecnici (si vedano tra gli altri Bovey *et al.*, 1967; Bovey, 1981; Rives, 1981; Martelli, 1982) e rendiconti di incontri scientifici [Atti del Seminario sulla utilizzazione dei risultati ottenuti con la selezione clonale e sanitaria della vite in Italia, Bari (1977); Atti dei cinque Congressi Internazionali sulla selezione clonale della vite tenutisi negli ultimi venti anni] cui si rimanda per ogni possibile dettaglio.

Per la semplicità operativa e la brevità dei tempi di esecuzione, la selezione sanitaria appare sulla carta come un formidabile e rapido mezzo di recupero sanitario. E lo sarebbe anche nella pratica, se le condizioni di diffuso degrado che affliggono l'industria viticola, abbondantemente documentate negli Atti degli undici Congressi Internazionali dell'ICVG tenutisi tra il 1964 ed il 1993, non fossero di ostacolo al reperimento, se non occasionale, di possibili cloni con caratteristiche sanitarie compatibili con i requisiti della certificazione. A ciò si aggiunga, e anche di questo vi é la prova documentata, che l'estrinsecazione dei sintomi, anche di malattie dalle inconfondibili manifestazioni esteriori come il "legno riccio", non é costante in tutti gli ambienti climatici e su tutte le combinazioni d'innesto. Si ritiene pertanto di non essere in errore affermando che ormai sono ben pochi coloro che continuano a credere, con ingiustificata ostinazione, alla possibilità di risolutivi interventi sanitari con la sola selezione di campo seguita da indexaggio. Questa, peraltro, rimane il punto di partenza e tappa essenziale di una qualsivoglia attività miglioratrice.

2. Termoterapia.

La termoterapia, l'esposizione cioè di piante vegetanti a temperature moderatamente alte (35-38 °C) per periodi variabili, é la più antica e collaudata

tecnica di risanamento. Nel tempo essa si é diversificata in una serie di applicazioni metodologiche le principali delle quali, passate in rassegna da Bovey (1981), sono rappresentate da: (a) il metodo classico o californiano, che consiste nell'esporre piante in vaso a 38°C per 1-3 mesi o più, prelevare gli apici vegetativi (0.8-1 cm) e farli radicare sotto nebulizzazione; (b) il metodo Galzy, nel quale talee ebacee sono coltivate asetticamente in mezzo liquido o agarizzato, termotrattate in tubo, poi trasferite in vaso e forzate in serra; (c) il metodo dello scudetto, col quale si preleva una gemma della pianta da risanare, la si innesta su una barbatella invasata di un indicatore sano (LN 33) che, dopo una settimana circa, viene posta a 39°C per non meno di due mesi, poi trasferita in serra e capitozzata per favorire lo sviluppo della gemma innestata.

L'esperienza accumulata in trent'anni e passa di termoterapia ha dimostrato le notevoli potenzialità di questa tecnica che non danneggia le piante, né tantomeno ne altera i caratteri, ed é in grado di ripulirle efficientemente dai nepovirus. Questi, in particolare, possono essere eliminati anche attraverso la forzatura di piante madri, il prelievo e la propagazione di getti erbacei fino a 10 cm di lunghezza, alla temperatura costante di 30°C (Stellmach, 1993).

Non altrettanto affidabile é la termoterapia nei riguardi dei closterovirus e trichovirus associati all'accartocciamento fogliare e al legno riccio, pur se esempi di incoraggianti successi non mancano. E' soprattutto l'efficienza della tecnica che in questo, come nel caso di altre malattie (necrosi delle nervature, mosaico delle nervature, maculatura infettiva, ad esempio) lascia a desiderare (Martelli e Savino, 1992). Essa poi sembra del tutto inefficace contro i viroidi (Duran Vila *et al.*, 1988).

Malgrado ciò, la termoterapia non ha fatto il suo tempo. Anzi, come appresso specificato, essa appare sempre più un utilissimo complemento dei metodi di risanamento *in vitro* (coltura di apici meristematici, embriogenesi somatica).

3. Coltura di tessuti.

La svolta nell'utilizzazione della coltura di tessuti per il risanamento della vite si é avuta con gli studi di Barlass *et al.* (1982) i quali per primi hanno dimostrato che l'allevamento *in vitro* di apici vegetativi costituiti dalla cupola meristematica ed un paio di abbozzi fogliari a 27°C per 15 h e 20°C per 9 h, ovvero alla temperatura costante di 35°C , produceva plantule esenti dagli agenti di varie malattie da virus (arricciamento, accartocciamento fogliare, maculatura infettiva) e da viroidi (picchettatura gialla). Da allora questa tecnica, accompagnata o meno da termoterapia, ha costituito la base degli interventi risanatori in vari laboratori del mondo (si vedano al proposito Faoro e Marani, 1990 e gli Atti dei Congressi dell'ICVG).

Poiché le cellule degli apici meristematici vegetativi sono dotate di grande stabilità genetica, la loro coltura *in vitro* nelle normali condizioni di allevamento, non provoca alterazioni permanenti se non di rado. Nel caso della vite é stata segnalata la comparsa transitoria di caratteri giovanili (Monette,

1988), evento peraltro eccezionale che non inficia l'affidabilità del metodo che rimane, per opinione diffusa, il più efficace attualmente disponibile per il risanamento.

4. *Microinnesto*

Il risanamento col microinnesto *in vitro* è stato sperimentato con successo anche per la vite innestando singoli apici meristematici su semenzali capitozzati di cv. Vialla o altra cultivar, allevati asetticamente in provetta su substrati che richiedono poche o punte sostanze di crescita. Pertanto, al contrario della coltivazione *in vitro* tradizionale, il meristema non è a diretto contatto col mezzo di coltura e non ne può essere influenzato negativamente. Gli svantaggi del metodo risiedono nella sua macchinosità e nella bassa percentuale di attecchimento degli innesti (S. Grenan, comunicazione personale). Buona invece appare l'efficacia nell'eliminazione dei virus.

Il microinnesto, le cui prime esperienze sono state fatte nella seconda metà dagli anni 70 in Francia e Spagna (Bovey, 1981), è stato più di recente ripreso, ancora in Francia (Benin e Grenan, 1984), e messo a punto secondo un protocollo che, in tempi ancor più recenti, ha subito ulteriori miglioramenti in Italia (Cupidi e Barba, 1993).

5. *Embriogenesi somatica.*

E' questo un tipo di coltura *in vitro* che si differenzia dall'allevamento dei singoli apici meristematici, sia per il materiale di partenza, costituito da tessuti differenziati, che per il prodotto finale, rappresentato da embrioni ottenuti da callo per induzione con sostanze di crescita (Mullins e Srinivasan, 1976).

L'applicazione dell'embriogenesi somatica al risanamento della vite è stata tentata per la prima volta in Sud Africa (Goussard *et al.*, 1991a, 1991b). Allo scopo, sono state forzate in serra talee di viti affette da accartocciamento fogliare ed arricciamento dalle cui infiorescenze sono stati prelevati espianti di antere ed ovari, poi allevati *in vitro* a 25 °C su substrati atti alla induzione di embrioni. Le plantule ottenute erano prive dei closterovirus presenti nelle piante madri (Goussard *et al.*, 1991a), ma non del virus dell'arricciamento della vite (GFLV) (Goussard *et al.*, 1991b). Infatti, l'assenza di vasi nel callo e di connessioni vascolari tra gli embrioidi ed il tessuto materno ha escluso dal callo stesso i closterovirus, che hanno localizzazione floematica, ma non GFLV che, essendo in grado di invadere parenchimi e tessuti meristematici, è presumibilmente capace di sopravvivere nelle masse pre-embriogeniche per poi trasferirsi negli embrioidi rigenerati. L'eliminazione di GFLV è stata peraltro ottenuta effettuando il processo embriogenico a 35 °C (Goussard e Wiid, 1993).

Uno dei pericoli dell'embriogenesi somatica è che il passaggio attraverso callo e la pesante utilizzazione di sostanze ormonali per favorire la crescita delle masse pre-embriogeniche e la differenziazione degli embrioidi, possa causare modificazioni genotipiche che alterino permanentemente le caratteristiche varietali. Fenomeni di questo tipo non sarebbero stati riscontrati nelle

esperienze sud africane. Le viti ottenute da embrioni somatici in tre anni di coltura e di osservazioni in campo non hanno mostrato segni di variazioni somaclonali né di infezioni virali, e la produzione é risultata di ottima qualità (Goussard e Wiid, 1993).

Ancorché sia prematuro trarre conclusioni definitive sulla validità ed efficacia dell'embrigenesi somatica quale mezzo di risanamento, e sulla sua sicurezza per la stabilità varietale, non vi é dubbio che gli studi finora condotti sembrano avere aperto una nuova, rapida ed assai interessante via al miglioramento sanitario.

LA CERTIFICAZIONE

La certificazione può essere definita come il riconoscimento formale da parte di un organismo pubblico a ciò abilitato, della rispondenza di piante di una qualsivoglia coltura e/o loro parti (materiale di propagazione), alle condizioni di sanità previste da uno specifico protocollo operativo, le cui norme siano contenute in un provvedimento promulgato da un'autorità competente di livello sovranazionale, nazionale o regionale.

Nell'interpretazione letterale gli schemi di certificazione dovrebbero pertanto garantire il solo stato sanitario della specie considerata e del suo materiale di propagazione. Tuttavia é norma comune che essi assicurino anche la conformità varietale.

1. *La certificazione in Italia*

Ancorché già nei primi anni 60 in Italia fosse iniziata la ricerca di materiale viticolo "sano", uno schema di certificazione autonomo non é mai stato elaborato. Ci si é in effetti limitati ad applicare, non senza resistenze e difficoltà, il dettato di una Direttiva Comunitaria (68/93 del 9 Aprile 1968) sulla "*Commercializzazione del Materiale di Propagazione Viticolo*", che conteneva anche vaghe indicazioni sulle caratteristiche sanitarie di cui il materiale stesso doveva essere in possesso. La Direttiva CEE, recepita nella legislazione nazionale col DPR 1164 del 24 Dicembre 1969, ha rappresentato lo stimolo per la messa in opera di programmi di ricerca coordinati che hanno visto virologi, viticoltori e tecnologi lavorare fianco a fianco per l'ottenimento di cloni sanitariamente migliorati. A tal fine sono stati adottati di comune accordo criteri conformi alle norme Comunitarie che regolano la selezione clonale, ma più restrittivi del dettato CEE sullo stato sanitario, che non faceva menzione di malattie di rilevante portata quali il legno riccio, la maculatura infettiva (fleck) e le micoplasmosi (Savino, 1992).

Il risultato di questo lavoro, che é ancora in pieno svolgimento, é documentato dalle molte decine di cloni di vite europea e portinnesti americani iscritti negli ultimi anni nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite, dopo aver

passato il vaglio del Comitato Nazionale per l'Esame delle Varietà di Vite, istituito presso il già Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste. Di quanto fatto è stato di recente fornito un esauriente resoconto (Stramaglia e Martelli, 1993) cui si rimanda per i dettagli.

2. La certificazione all'estero

Se si eccettuano Francia e Germania che insieme all'Italia si richiamano alla Direttiva Comunitaria 68/93 come base per la certificazione, non parrebbe che altri paesi viticoli applichino schemi certificativi sanzionati da specifici disposti legislativi se non, quando ci sono, a livello locale. Esistono peraltro, e operano da lungo tempo, programmi per la produzione di materiale virus-esente (clean stock programs), in numerosi paesi, anche extraeuropei, quali Svizzera, ex Cecoslovacchia, USA, Australia, Nuova Zelanda e Sud Africa (Bovey, 1981). Più di recente, programmi analoghi, di cui è stata data notizia alla 73a Assemblea Generale dell'OIV (S. Francisco, Agosto 1993) e all'11mo Congresso dell'ICVG (Montreux, Settembre 1993), sono stati messi a punto in altri paesi extracomunitari (Ungheria, Romania, ex Jugoslavia, Moldavia, Israele, Cipro), mentre nei paesi del Mediterraneo del sud e del Medio Oriente è in atto un progetto UNDP/FAO per il miglioramento sanitario delle colture frutticole, vite inclusa (Cherif *et al.*, 1993).

Un'importante funzione nel campo del miglioramento sanitario è svolta dall'Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante (OEPP), che ha elaborato con l'ausilio di esperti internazionali una serie di schemi di certificazione. Questi, tra cui anche quello viticolo di prossima pubblicazione, vengono sottoposti all'approvazionee dagli Stati membri dell'OEPP, che possono all'occorrenza avvalersene.

Molti dei programmi di certificazione attualmente operativi sono ispirati a criteri che prediligono gli aspetti sanitari, ma non tengono sempre in dovuto conto quelli genetici (selezione clonale). E' emblematico il caso degli Stati Uniti dove la certificazione non garantisce le caratteristiche qualitative e tecnologiche tipiche del clone ma solo la conformità varietale e lo stato sanitario (Meredith and Walker, 1993; Golino *et al.*, 1993). Quest'ultimo peraltro non è soddisfacentemente coperto perché lo schema non prevede l'esenza da "Rupestris stem pitting", la cui importanza non è stata forse valutata appieno, e non prescrive saggi per l'accertamento della presenza di "Kober stem grooving" e "LN33 stem grooving". Pertanto, anche sulla scorta di quanto è in gestazione nell'Unione Europea, è in corso negli USA un processo di revisione ed armonizzazione dei programmi statali esistenti (Golino *et al.*, 1993).

3. La certificazione nell'Unione Europea

In ambito CEE, come si è accennato, i programmi di certificazione in atto derivano da una Direttiva comunitaria non specificamente rivolta alla certificazione stessa, che è inoltre assai vaga ed insoddisfacente nei riguardi dei

requisiti sanitari del materiale da certificare. Ne é conseguito che alcuni Stati membri (Portogallo, Spagna e Grecia) hanno tardato nel regolamentare la qualità del materiale viticolo prodotto, mentre altri (Francia, Germania ed Italia) che avevano già da tempo affrontato il problema, si sono mossi in maniera sconsiderata, dando peso diverso alle varie malattie. In Germania, ad esempio, al contrario che in Italia, il legno riccio non é incluso nello schema di selezione sanitaria, e sempre in Germania e Francia il saggio per l'esenza dalla maculatura infettiva é limitato ai portinnesti. Queste discrepanze, e le preoccupazioni espresse dai vivaisti in vista del mercato unico conseguente alla costituzione dell'Unione Europea con l'entrata in vigore degli accordi di Maastricht, ha consigliato un gruppo di virologi dei sei principali paesi viticoli della CEE (Portogallo, Spagna, Francia, Germania, Italia e Grecia) di discutere comparativamente gli schemi di certificazione in atto o in preparazione nei diversi Stati, farne una revisione critica e tentarne l'armonizzazione. Un incontro, tenutosi a Valenzano (Bari) nella primavera 1991 (Martelli, 1992), ha sortito una proposta di schema di certificazione europeo che é stato sottoposto all'attenzione delle Autorità Comunitarie.

Questo schema (Martelli *et al.*, 1993) é in linea con quello elaborato dagli esperti OEPP e prevede: (a) la conferma della suddivisione del materiale viticolo di propagazione nelle categorie di "base" (etichetta bianca), "certificato" (etichetta azzurra) e "standard" (etichetta arancione); (b) che il materiale di base e certificato sia esente, con tolleranza zero, dal complesso della degenerazione infettiva (GFLV ed altri nepovirus europei), complesso dell'accartocciamento fogliare, complesso del legno riccio, maculatura infettiva e micoplasmosi; (c) l'utilizzazione dei saggi biologici, sierologici e molecolari per la diagnosi; (d) l'uso della termoterapia, coltura di apici meristematici e microinnesto per il risanamento.

Si é ora in attesa che l'Unione Europea promulghi un provvedimento (Direttiva o Regolamento) specificamente mirato alla certificazione della vite che affianchi la recente Direttiva sulla commercializzazione e certificazione dei fruttiferi (Ebbels, 1993).

OTTENIMENTO DI PIANTE RESISTENTI

1. Preimmunizzazione

L'utilizzazione pratica dell'interferenza protettiva tra un ceppo virale attenuato e ceppi virulenti dello stesso patogeno, nota anche come "protezione incrociata" o "preimmunizzazione", fu ipotizzata circa trent'anni addietro da Stubbs (1965) come possibile difesa contro GFLV. L'idea non trovò immediata applicazione e si dovette attendere una dozzina d'anni perché ne venisse esplorata la praticabilità (Vuittenez *et al.*, 1978). Gli studi francesi, che trovavano conforto in osservazioni condotte in Germania sull'interferenza in vite tra GFLV ed il sierologicamente correlato virus del mosaico dell'arabis (ArMV)

(Stellmach, 1979), si svilupparono nel tempo, approdando a risultati di sicuro interesse. Infatti, isolati ipovirulenti di GFLV e ArMV furono reperiti nelle popolazioni naturali di entrambi i virus e di essi, più di recente è stata studiata la capacità di interferenza reciproca in *Chenopodium quinoa*, ospite erbaceo di entrambi (Huss *et al.*, 1989).

Dei quattro isolati ipovirulenti individuati (due di GFLV e due di ArMV) (Legin *et al.*, 1993), uno di ArMV si è dimostrato assai promettente in prove di campo ancora in corso in Borgogna. Le viti pre-inoculate con l'isolato in questione (ArMV-A1), piantate in terreni fortemente infestati da popolazioni vbrulifere di *Xiphinema index*, dopo due anni di permanenza in campo non hanno ancora contratto infezioni, al contrario dei testimoni non preimmunizzati che si sono infettati tra il 21 ed il 47% (Walter *et al.*, 1993).

La protezione incrociata, per quanto interessante e, se ben condotta, innocua per l'ambiente (environmentally friendly), non è priva di inconvenienti. Così, ad esempio, essa: (a) non funziona se non tra ceppi di uno stesso virus o tra virus strettamente correlati; (b) richiede una completa protezione dell'ospite preimmunizzato attraverso la generalizzata diffusione nei suoi organi del ceppo virale proteggente; (c) richiede l'uso di ceppi virali stabili e che mantengano le condizioni di ipovirulenza indipendentemente dalla cultivar dell'ospite in cui sono inoculati e dalle condizioni ambientali di coltivazione. Nelle esperienze francesi, ad esempio, uno dei ceppi attenuati di ArMV si è dimostrato all'atto pratico sufficientemente patogeno per la cv. Pinot noir (ma non per Chardonnay) da sconsigliarne l'utilizzazione.

Come gli stessi autori ammettono (Walter *et al.*, 1993), è presto per stabilire se e quanto la preimmunizzazione sia efficace come mezzo di lotta contro l'arricciamento delle viti. Ma le premesse per il raggiungimento di un risultato pratico ci sono, e paiono confortate dalle positive esperienze già maturate con altri virus di colture arboree ed ortive (si veda in proposito Martelli, 1990).

2. Resistenza convenzionale

La possibilità di ottenere viti resistenti alle virosi è un'antica aspirazione degli studiosi del settore, che, però, forse non l'hanno perseguita in passato con la costanza e la determinazione necessarie. Eppure, era da tempo noto che comportamenti di diffusa tolleranza o resistenza alle infezioni virali fossero riscontrabili in *Vitis* e nel vicino genere *Muscadinia*.

Così ad esempio, circa 60 anni addietro Petri (1937) osservava interessanti tolleranze a GFLV in vitigni del Mezzogiorno d'Italia (Malvasia bianca, Somarello rosso e Pagadebito) e più di recente, apparente immunità allo stesso virus è stata trovata in accessioni di *Vitis vinifera* di origine iraniana negli USA (Walker and Meredith, 1990) ed in Francia (Lahogue *et al.*, 1993). Gli autori statunitensi (Walker *et al.*, 1985), in ciò confortati dai reperti francesi, hanno ipotizzato che la tolleranza e/o resistenza più o meno spinta a GFLV

provenza dalle selezioni di *V. vinifera* dell'Asia centro-orientale che é sia l'areale di differenziazione della specie, che la probabile zona d'origine del virus.

V. vinifera sembra possedere anche alti livelli di resistenza ad ArMV. Questa é risultata tanto diffusa nelle cultivar saggiate, da mettere in sospetto gli stessi autori dello studio (Lahogue *et al.*, 1993) che stanno ora cercando conferme e riscontri probatori nella ripetizione dei saggi.

Tra le *Vitis* americane, come riportato qualche anno addietro (Martelli, 1978), *V. rupestris* e *V. labrusca*, ma non *V. riparia*, sono ipersensibili ai virus della maculatura anulare del pomodoro (TomRSV) e del tabacco (TRSV) che pertanto non sono in grado di invaderle sistemicamente, né di esservi inoculati dal nematode vettore *X. americanum*. Inoltre, alti livelli di resistenza al ceppo californiano di TomRSV sono stati riscontrati in *V. berlandieri* x *V. riparia* Kober 5BB, mentre Couderc 3309 (*V. riparia* x *V. rupestris*) é risultato immune a TomRSV, malgrado la presenza di plasma suscettibile di *V. riparia*. Diffuse resistenze al nepovirus del mosaico con rosettamento del pesco (PRMV) sono state riscontrate in alcuni ibridi produttori diretti (Couderc 1616, ad esempio) ma non in *V. labrusca* e *V. riparia* (Ramsdell e Gillet, 1985).

Le viti americane ed i loro ibridi sono notoriamente insensibili all'accartoccimento fogliare, che non vi provoca alterazioni apparenti. L'assenza di manifestazioni sintomatologiche non sembra però dovuta a mancanza d'infezione, ma potrebbe essere conseguente a fenomeni di resistenza (Boscia *et al.*, 1988) che ostacolano la moltiplicazione dei closterovirus agenti della malattia (GLRaV I e GLRaV III, soprattutto) o che ne impediscono la traslocazione dai tessuti corticali alle foglie (Boscia *et al.*, 1991; Credi e Santucci, 1991).

Muscadinia (= *Vitis*) *rotundifolia*, definita da Rives (1974): "la specie (pressoché) perfetta per la sua resistenza ai parassiti", ha mostrato in effetti ottimi comportamenti nei riguardi sia di *X. index* che di GFLV, candidandosi come utile sorgente di geni resistenti (Bouquet 1981; Raski *et al.*, 1983; Walker *et al.*, 1985).

Malgrado le varietà di risorse genetiche apparentemente disponibili per programmi tradizionali di miglioramento, questi non hanno avuto quell'impulso che ci si poteva attendere e che la gravità della condizione sanitaria della vite richiedeva. A tutt'oggi, sembrano disponibili solo quattro portinnesti ottenuti presso l'Università della California a Davis (Fraschini, 1990) e dotati di resistenza multipla e/o immunità a fillossera, *X. index* e GFLV. Di due di essi (VR 039-16 e VR 043-43) é in corso di valutazione anche in Italia il comportamento in campo (V. Savino, comunicazione personale).

3. Resistenza non convenzionale

Le conoscenze molecolari sui virus della vite acquisite negli ultimi anni, hanno propiziato l'ingresso in campo viticolo dell'ingegneria genetica come mezzo per l'induzione di resistenza. Tra le varie strategie oggi disponibili (Martelli, 1991), quella privilegiata dai laboratori europei impegnati in questo

tipo di ricerche, punta alla trasformazione di viti con la proteina del capsido (CP) di tre importanti nepovirus: GFLV, ArMV e virus del mosaico giallo cromo (GCMV). Nelle ricerche condotte in Francia é già stata ottenuta la rigenerazione di plantule di 110R e di Kober 5BB trasformate rispettivamente con la CP di GCMV (Torregrossa *et al.*, 1993) e di GFLV (B. Walter, comunicazione personale), mentre in Svizzera ed Austria sono state per il momento trasformate solo piante di *Nicotiana* con costrutti contenenti vari tipi di CP di GFLV (Spielmann *et al.*, 1993) o di GFLV e di ArMV (Steinkellner *et al.*, 1993). L'individuazione e sequenziamento di due cistroni dei trichovirus A e B della vite (Minafra *et al.*, 1994), uno dei quali codifica la proteina di movimento da cellula a cellula, apre in prospettiva anche alla possibilità di esplorare la validità dell'approccio molecolare con patogeni e geni differenti dai nepovirus e dalla CP.

E' evidente che le ricerche in questo settore sono in una fase talmente iniziale che sfuggono ad ogni possibile previsione sulla loro portata pratica e i tempi di ricaduta. L'utilizzazione della resistenza non convenzionale in *Vitis* sarà infatti soggetta al superamento alla stessa impegnativa serie di verifiche attualmente in corso per le piante transgeniche di altre specie coltivate che non hanno ancora terminato l'iter per l'immissione nel circuito agricolo.

LAVORI CITATI

- Barlass M., K.G.M. Skene, R.C. Woodham e L.R. Krake, 1982. Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro*- apical culture. *Annals of Applied Biology*, **101**, 291-295.
- Benin M. e S. Grenan, 1984. Le micrograffage: nouvelle technique d'élimination des virus de la vigne. *Progres Agricole et Viticole*, **101**, 33-36.
- Boscia D., V. Savino, M.A. Castellano e G.P. Martelli, 1991. Portinnesti della vite e closterovirus. *Atti III Convegno sui portinnesti della Vite, Potenza 1988*, 35-42.
- Boscia D., V. Savino, V. Elicio, S.D. Jebahi e G.P. Martelli, 1991. Detection of closteroviruses in grapevine tissues. *Proceedings 10th Meeting ICVG, Volos 1990*, 52-57.
- Bouquet A., 1981. Resistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease*, **65**, 791-793.
- Boyey R., 1981. Aspects de la sélection sanitaire de la vigne. *Atti del 3° Simposio Internazionale sulla Selezione Clonale della Vite, Venezia 1981*, 293-301.
- Boyey R., H. Leyvraz, F. Pelet, J. Pitton e J.L. Simon, 1967. Possibilités et limites de la selection visuelle dans la lutte contre les viroses de la vigne: une experience avec quelques cépages rouges en Suisse Romande. *Vitis*, **6**, 366-374.

- Cherif C., F. Askri e N. Chabbouh, 1993. The Tunisian programme for clonal and sanitary selection of grapevine. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 163-164.
- Credi R. e A. Santucci, 1991. Serological detection of grapevine leafroll-associated closterovirus-like particles: apparent absence of viral antigens in leaves of graft-inoculated American rootstocks. *Proceedings 10th Meeting IGVC, Volos 1990*, 71-80.
- Cupidi A e M. Barba, 1993. Ottimizzazione del microinnesto *in vitro* per il risanamento delle vite. *Vignevini*, **20**(4), 43-46.
- Duran Vila N., J. Juarez e J.M. Arregui, 1988. Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**, 217-220.
- Ebbels D.L., 1993. Development of the European Community marketing schemes for plant and propagating material of ornamentals, fruit and vegetables. In: Plant health and the European Single Market (D.L. Ebbels, ed.), *BCPC Monograph*, **54**, 53-59.
- Faoro F. e F. Marani, 1990. Coltura di tessuti e protoplasti in virologia vegetale. *Atti Giornate Fitopatologiche 1990*, **3**, 25-102.
- Fraschini P., 1990. Nuovi portinnesti americani di vite resistenti ai nematodi. *Vignevini*, **17**(4), 30-32.
- Golino D.A., R. Pool e D. Gonsalves, 1993. Clean stock and quarantine programs in the United States of America. *Viticulture. 73eme Assemblée Generale OIV, S. Francisco 1993*, 11 pp.
- Goussard P.G. e J. Wiid, 1993. The use of *in vitro* somatic embryogenesis to eliminate phloem limited virus and nepoviruses from grapevines. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 165-166.
- Goussard P.G., J. Wiid, G.G.F. Kasdorf e D.J. Newton, 1991a. The elimination of leafroll-associated viruses from grapevines (*Vitis*) using *in vitro* somatic embryogenesis. *Proceedings 10th Meeting ICVG, Volos 1990*, 344-352.
- Goussard P.G., J. Wiid e G.G.F. Kasdorf, 1991b. The effectiveness of *in vitro* somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll-associated viruses from grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **12**, 77-81.
- Huss B., B. Walter e M. Fuchs, 1989. Cross-protection between arabis mosaic and grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Applied Biology*, **114**, 45-60.
- Lahogue F., G. Boulard, C. Schneider e B. Walter, 1993. Search for resistance genes to grapevine viruses in *Vitis* species. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 171.
- Legin R., P. Bass, L. Etienne e M. Fuchs, 1993. Selection of mild virus strains of fanleaf degeneration by comparative field performance of infected grapevines. *Vitis*, **32**, 103-110.
- Martelli G.P., 1978. Nematode-borne viruses of grapevine, their epidemiology and control. *Nematologia Mediterranea*, **6**, 1-27.

- Martelli G.P., 1982. Recent studies on virus diseases of grapevine in Europe with special reference to Italy. *Proceedings Symposium of Grape and Wine Centennial, University of California, Davis 1980*, 28-35.
- Martelli G.P., 1990. Biotecnologie nella produzione di piante resistenti ai virus. *Atti Giornate Fitopatologiche 1990*, **3**, 3-24.
- Martelli G.P., 1991. Trasformazione genetica per la resistenza in piante coltivate. *Atti Accademia dei Georgofili*, **37**, S.7, 349-368.
- Martelli G.P. (ed.), 1992. Grapevine viruses and certification in EEC countries: state of the art. *Quaderno Istituto Agronomico Mediterraneo, Bari*, **3**, 130 pp.
- Martelli G.P. e V. Savino, 1992. Selezione sanitaria e risanamento della vite in Puglia: stato dell'arte. *Atti Accademia Italiana delle Vite e del Vino* (in stampa)
- Martelli G.P., O.A. De Sequeira, H.H. Kassemayer, V. Padilla, U. Prota, A. Quacquarelli, E. Refatti, M. Rüdel, I.C. Rumbos, V. Savino e B. Walter, 1993. A scheme for grapevine certification in the European Economic Community. In: *Plant Health and the European Single Market* (D.L.Ebbels, ed.), *BCPC Monograph*, **54**, 279-284.
- Meredith C.P. e M.A. Walker, 1993. Clone certification in the United States. *Viticulture. 73eme Assemblée Generale OIV, S. Francisco*, 4 pp.
- Minafra A., P. Saldarelli, F. Grieco e G.P. Martelli, 1994. Nucleotide sequence of the the 3' terminal region of two filamentous grapevine viruses. *Archives of Virology* (in stampa).
- Monette P.L., 1988. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Y.P.S Bajaj, ed.), **6**, 3-37, Springer Verlag, Berlino.
- Mullins M.G. e C. Srinivasan, 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of grapevine (cv. Cabernet Sauvignon) by apomixis *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, **27**, 1022-1030.
- Petri L., 1937. Trasmissione del "virus" dell'arriciamento della vite attraverso i tessuti di una varietà resistente. *Rendiconti Accademia Nazionale dei Lincei, Roma*, S. 6, **25**, 413-416.
- Ramsdell D.C. e J.M. Gillet, 1985. Relative susceptibility of American, French hybrids and European grape cultivars to infection by peach rosette mosaic virus. *Phytopathologia Mediterranea*, **24**, 41-43.
- Raski D.J., A.C. Goheen, L.A. Lider e C.P. Meredith, 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease*, **67**, 335-339.
- Rives M., 1974. Les vignes sauvages comme sources de gènes pour l'amélioration. *Vitis*, **13**, 186-197.
- Rives M., 1981. Scientific bases for clonal selection. *Atti 3° Simposio Internazionale sulla selezione clonale della vite, Venezia 1981*, 7-12.
- Savino V., 1992. Certification of grapevine in Italy. In: *Grapevine Viruses and Certification in EEC Countries: State of the Art* (G.P. Martelli ed.). *Quaderni Istituto Agronomico Mediterraneo Bari*, **3**, 55-65.

- Spielmann A., S. Marc-Martin, M.E. Ramel e P. Gugerli, 1993. Expression of several modified grapevine fanleaf nepovirus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 173-174.
- Steinkellner H., A. da Camara Machado, M. Laimer da Camara Machado, M. Gölles e H. Katinger, 1993. Studies on coat protein mediated cross protection of nepoviruses. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 175.
- Stellmach G., 1979. Beobachtungen an Mischinfektionen von grapevine fanleaf und arabis mosaik virus in Reben. *Weinberg und Keller*, **26**, 326-332.
- Stellmach G., 1993. Lush growth combined with continued green cutting propagation. An effective means for eliminating viruses from grapevine shoot tips. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 176-177.
- Stramaglia L. e G.P. Martelli, 1993. Legislative measures and procedures for selection and certification of the grapevine in Italy. *Viticulture. 73eme Assemblée Generale OIV, S. Francisco 1993*, 1-21
- Stubbs L.L., 1965. Effect of multiple viruses on host plants, immunity and synergistic reactions. *Proceedings International Conference on Virus and vector on Perennial Hosts with Special Reference to Vitis, Davis 1965*, 55-71
- Torregrossa L., Y. Danglot, A. Bouquet, V. Brault, O. Le Gall, T. Candresse e J. Dunez, 1993. Le premier porte-greffe de vigne transgénique 100% INRA. *In litteris*, 1993.
- Vuittenez A., J. Kuszala, R. Legin, G. Stoky, P. Pejcinowski e C. Heyd, 1978. Phénomènes d'interaction entre souches de virus nepo infectant la vigne. *Proceedings 6th Meeting ICVG, Madrid 1976, Monografias INIA*, **18**, 59-68.
- Walker M.A. e C.P. Meredith, 1990. The genetics of resistance to grapevine fanleaf virus in *Vitis vinifera*. *Proceedings 5th International Symposium Grape Breeding, St Martin/Pfalz 1989*, 228-238.
- Walker M.A., C.P. Meredith e A.C. Goheen, 1985. Sources of resistance to grapevine fanleaf virus (GFV) in *Vitis* species. *Vitis*, **24**, 218-228.
- Walter B., P. Bass, P. Cornuet, R. Legin e M. Fuchs, 1991. Interactions between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates. *Proceedings 10th Meeting IGVG, Volos 1990*, 120-128.
- Walter B., P. Bass, P. Cornuet e P.M Guillaume, 1993. Preliminary results of cross-protection experiments against grapevine fanleaf virus (GFLV) in the vineyards. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 1676-168.