

METODI DI DIAGNOSI DELLE MALATTIE DA VIRUS, VIROIDI E MICOPLASMI DELLA VITE.

A. BERTACCINI¹, D. BOSCIA², F. FAORO³ e A. MINAFRA²

¹Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Bologna; ²Dipartimento di Protezione delle Piante, Università degli Studi e Centro di Studio del CNR sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, Bari; ³Centro di Studio del CNR per il Miglioramento Sanitario delle Colture Agrarie, Milano.

RIASSUNTO

Vengono descritte le tecniche sierologiche, di microscopia elettronica e molecolari attualmente utilizzate nella diagnosi delle malattie da virus, viroidi e micoplasmi della vite indicandone l'applicabilità ed i limiti nell'individuazione dei patogeni più diffusi.

SUMMARY

Diagnostic methods for the detection of viruses, viroids and mycoplasma-like organisms in grapevines, encompassing serological, electron microscopical and molecular techniques are reviewed. Their reliability and limitations for the identification of the most common pathogens are also discussed.

Se le virosi e le malattie simili della vite sono in buona misura diagnosticabili in campo su base sintomatologica, assai meno agevole è l'identificazione degli agenti che le provocano. Per questi si ricorre a specifici saggi biologici (indexaggio e trasmissioni meccaniche) ai quali si sono affiancate, in funzione sempre più sostitutiva, metodiche diagnostiche che utilizzano la sierologia, la microscopia elettronica e la biologia molecolare. Di queste si dà qui di seguito un breve resoconto rimandando per parte della bibliografia a Bovey e Martelli (1992) e per le sigle dei virus alla nota di Martelli (1994) che introduce questa sessione.

SIEROLOGIA

Da quando, circa 35 anni fa, la sierologia fu per la prima volta applicata ai virus della vite, sono stati compiuti enormi progressi, tra i quali vale ricordare l'applicazione della tecnica immunoenzimatica ELISA (Walter *et al.*, 1979) e, più recentemente, la preparazione di anticorpi monoclonali (Huss *et al.*, 1986). L'ELISA ha fornito la concreta possibilità di effettuare diagnosi sierologica massale a basso costo e con corredi commerciali in programmi di selezione sanitaria, mentre gli anticorpi monoclonali hanno consentito di superare i

problemi originati dai virus scarsamente immunogeni o purificabili con difficoltà. E' ora possibile effettuare diagnosi sierologica affidabile per la maggior parte dei virus noti della vite, quali i nepovirus, il virus della maculatura infettiva (GFkV), i closterovirus e i trichovirus associati all'accartocciamento fogliare (LR) ed al complesso del legno riccio (RW) (GLRaV, GVA, GVB, GCBaV), nonché il micoplasma associato alla flavescenza dorata (FD).

Virus - Negli ultimi tempi, gli sforzi sono stati mirati a migliorare la sensibilità e la specificità dei reagenti utilizzati, ad armonizzare le condizioni di campionamento e ad allargare la gamma di anticorpi disponibili. Rowhani (1992) e Salati *et al.* (1993) hanno dimostrato che l'uso dei frammenti di anticorpi F(ab')₂ per la diagnosi di GFLV, GLRaV II, III, IV e GCBaV in succo di vite permette di sfruttare i vantaggi dell'ELISA indiretta (elevata sensibilità e background ridotto). La mancanza di reazioni incrociate tra i diversi GLRaV ha indotto Zimmermann (1990) e Hu *et al.* (1991) a ricorrere all'uso di un cocktail di anticorpi per individuarne la presenza con un unico saggio. Poggi Pollini *et al.* (1993) hanno messo a punto una tecnica immunoenzimatica chemiluminescente con sensibilità 16 volte maggiore di quella di altre metodiche che utilizzano substrati colorimetrici. Il sistema di amplificazione avidina-biotina, che aumenta la sensibilità dell'ELISA, ha reso possibile il riconoscimento dei diversi GLRaV in periodi in cui essi non sono rilevabili mediante DAS-ELISA (Zimmermann, 1990).

Rowhani *et al.* (1992) hanno studiato l'importanza delle variazioni stagionali nella identificazione di GFLV e ToRSV, accertando che la concentrazione di ToRSV è costante tutto l'anno, mentre quella di GFLV è massima a maggio, per poi decrescere rapidamente sino a raggiungere il minimo a settembre. Un'analoga ricerca effettuata in Francia (Walter, 1993) su ArMV e GFLV ha mostrato che l'identificazione non è sempre positiva nei campioni fogliari di *Vitis vinifera* raccolti durante il periodo più caldo, mentre è possibile per l'intero periodo vegetativo da foglie di portinnesti. Al contrario, i closterovirus (GLRaV III in particolare) sono difficilmente individuabili nelle foglie di *Vitis* americane (*V. rupestris*) e loro ibridi, mentre lo sono, senza apparente difficoltà, nei tessuti corticali (Boscia *et al.*, 1991; Credi e Santucci, 1991).

Catalano *et al.* (1991) hanno dimostrato che l'ELISA individua GFLV nel vettore *Xiphinema index*, anche in campioni di due soli individui (Walter *et al.*, 1993).

Relativamente agli anticorpi monoclonali (Mabs), Frison e Stace-Smith (1992) usando ArMV come immunogeno, hanno preparato Mabs in grado di dare reazioni incrociate ed eterospecifiche con vari nepovirus (RRV, GFLV, TBRV, CLRV), mentre Boscia *et al.* (1992) hanno prodotto Mabs per la diagnosi di GVA in campioni di pieno campo. I migliori risultati sono stati ottenuti presensibilizzando le piastre con proteina A, poi utilizzando anticorpi policlonali per la cattura e Mabs per la rilevazione del virus. Mabs sono stati

inoltre preparati contro GFkV (Boscia *et al.*, 1993; Ramel *et al.*, 1993) mentre Walter e Cornuet (1993) hanno prodotto un siero policlonale allo stesso virus con cui hanno confermato la sua associazione con la maculatura infettiva ed hanno individuato in giugno-luglio il periodo migliore per la sua diagnosi in Alsazia.

Micoplasmi - Ai sieri policlonali contro l'agente della FD prodotti con purificati parziali da piante di fava o da adulti di *Euscelidius variegatus*, è seguita la preparazione di Mabs, sia per lo stesso patogeno che per quello associato ad un altro giallume della vite (Schwartz *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1993). Ciò ha permesso l'uso dell'ELISA per l'individuazione dell'agente della FD sia nel vettore naturale (*Scaphoideus titanus*) che in quello sperimentale (*E. variegatus*). Per l'impiego degli stessi antisieri direttamente su vite si è però dovuta mettere a punto una metodica particolare di estrazione dei micoplasmi dai tessuti infetti (Caudwell e Kuszala, 1992). Questi saggi hanno confermato quanto già emerso dai primi dati molecolari, cioè che MLO differenti sono associati alle sindromi di giallume nelle diverse aree viticole (Davis *et al.*, 1993a). In particolare il micoplasma della FD è risultato presente solamente nelle viti del sud della Francia ed in alcune aree dell'Italia settentrionale (Osler *et al.*, 1992).

MICROSCOPIA ELETTRONICA

Benchè la microscopia elettronica stia progressivamente cedendo il passo alle tecniche diagnostiche immunoenzimatiche e molecolari, è innegabile l'importanza del suo contributo sia nella fase di "orientamento" sul tipo di patogeno (mediante osservazione diretta in colorazione negativa di estratti grezzi o parzialmente purificati), sia nel successivo vaglio con vari antisieri per l'individuazione del virus. A questo scopo si utilizza soprattutto l'ISEM ("Immunosorbent Electron Microscopy"), che è altrettanto sensibile dell'ELISA, ma impiega minime quantità di antisiero, ed è pertanto particolarmente utile se la disponibilità di quest'ultimo è limitata. Infine la microscopia elettronica è insostituibile nei casi in cui non si abbiano a disposizione antisieri o sonde molecolari, o il patogeno non sia trasmissibile a piante da saggio, come spesso accade con i virus della vite. In tali occasioni si ricorre all'indagine citopatologica su sezioni ultrasottili, tecnica laboriosa che richiede lunga esperienza e che non è sempre coronata da successo se il patogeno è poco concentrato o non facilmente distinguibile dagli organuli cellulari o, soprattutto, se non produce corpi d'inclusione caratteristici. Non va tuttavia dimenticato che sono state le indagini citopatologiche che hanno permesso di scoprire virus e micoplasmi "inseguiti" per decenni, come ad esempio i closterovirus responsabili del LR, l'agente della maculatura infettiva (GFkV) e i micoplasmi della FD.

ISEM. La tecnica consiste nel far aderire gli anticorpi al film plastico delle griglie per microscopia le quali, incubate su estratti grezzi o purificati di tessuti infetti, trattengono le particelle virali o i micoplasmi eventualmente presenti. I tessuti e gli organi della vite che più si prestano ad essere indagati nei vari stadi di vegetazione sono gli stessi utilizzati per l'ELISA. Per una successiva verifica del sierotipo dei patogeni rimasti intrappolati sulle griglie si può effettuare una seconda incubazione con lo stesso o altri anticorpi e controllare se avviene la "decorazione", ossia il rivestimento delle particelle intrappolate da parte dell'anticorpo stesso (Milne e Luisoni, 1977). E' possibile agevolare il controllo dell'avvenuta decorazione usando anticorpi coniugati con oro colloidale di 5-25 nm di diametro (Pares e Whitecross, 1982).

L'ISEM è particolarmente usata nella diagnosi dei virus non trasmissibili per succo quali i closterovirus associati al LR ed al RW, a proposito dei quali va ricordato che il primo indizio sulla presenza di più tipi virali nelle piante affette da LR si è avuto proprio con la tecnica di decorazione (Milne *et al.*, 1984). Poichè differenti tipi di closterovirus e trichovirus sono spesso presenti in varie associazioni nelle viti con LR o RW, è possibile effettuare l'ISEM con griglie su cui sono stati fatti adsorbire antisieri contro diversi virus (Pietersen e Kasdorf, 1993). Il riconoscimento delle particelle virali intrappolate da questo "cocktail" di anticorpi può essere effettuato con la decorazione usando un anticorpo alla volta. In questo modo con piccole quantità di anticorpi si possono saggiare molte combinazioni di virus. Sempre a riguardo della diagnosi dei closterovirus associati al LR, in una recente indagine comparativa tra ELISA ed ISEM è stato dimostrato che se la prima tecnica è più adatta per vasti programmi di selezione, la seconda meglio si presta per il controllo dei campioni che hanno dato risposte dubbie (Hu *et al.*, 1991). L'ISEM è stata utilizzata anche per rilevare la presenza di patogeni nei rispettivi vettori come, ad esempio, i micoplasmi della FD nei cicadellidi (Caudwell *et al.*, 1982), diversi nepovirus agenti dell'ariccimento nei nematodi (Brown e Roberts, 1980), closterovirus e trichovirus nelle cocciniglie pseudococcidi (Engelbrecht e Kasdorf, 1990). In tutti questi casi, data l'esiguità del materiale di partenza, la tecnica si è rivelata particolarmente adatta rispetto agli altri approcci sierologici. Con la sempre maggior diffusione degli anticorpi monoclonali l'ISEM seguita da decorazione con oro colloidale, ha trovato impiego molto utile nella localizzazione degli epitopi riconosciuti dalle singole linee di anticorpi, con innegabili vantaggi nella scelta degli ibridomi più adatti.

Citopatologia. Gli studi ultrastrutturali fin qui effettuati direttamente su tessuti di viti hanno messo in evidenza come nella quasi totalità dei casi il numero di cellule infette sia piuttosto esiguo, sia che si tratti di virus non tessuto-specifici quali i nepovirus sia, e ancor più, nel caso dei virus floema-dipendenti quali closterovirus, trichovirus e GFkV. Per non parlare poi dei micoplasmi che si sono potuti osservare solo in poche occasioni. Questo ha reso le indagini citopatologiche ancora più laboriose. Ciononostante, le conoscenze acquisite

sono tali da poter essere usate a scopo diagnostico per alcuni dei virus più diffusi almeno per individuarne il genere.

Le principali alterazioni ultrastrutturali, o corpi d'inclusione, con valenza diagnostica sono:

Nepovirus - Aggregati più o meno vasti di particelle isometriche nel mesofillo e nel parenchima radicale con possibili formazioni cristalline e paracristalline; virioni allineati in tubuli spesso connessi ai plasmodesmi; protrusioni della parete cellulare; ammassi di vescicole miste a membrane del reticolo endoplasmico ed a ribosomi nel citoplasma di cellule parenchimatiche (Russo, 1985). Poichè queste alterazioni sono state osservate nelle infezioni da tutti i principali nepovirus (GFLV, ArMV, TRSV, GBLV, ToRSV, SLRV), il loro utilizzo come parametro diagnostico può essere fatto solo a livello di genere.

Closterovirus - Fasci di filamenti nei cribri e cellule parenchimatiche del floema e mitocondri vescicolati (Faoro *et al.*, 1991). Con un attento esame del processo di vescicolazione dei mitocondri è possibile distinguere se l'infezione è dovuta a GLRaV I ovvero a GLRaV III (Faoro *et al.*, 1992a). Le particelle virali però sono confondibili con i filamenti delle normali proteine floematiche se non si usano particolari tipi di fissazione (Faoro e Tornaghi, 1991).

Trichovirus - Fasci ed ammassi di filamenti che spesso riempiono completamente il lume dei cribri, assenza di tipiche vescicolazioni (Faoro *et al.*, 1991) anche se GVA e GVB inducono evaginazioni vescicolari del tonoplasto (Castellano *et al.*, 1983). Le particelle di GVA e GVB sono talora riscontrabili in cellule parenchimatiche non strettamente floematiche (F. Faoro, dati inediti).

GFkV - Aggregati di particelle virali isometriche talvolta formanti larghi cristalli nelle cellule parenchimatiche del floema e corpi multivescicolari derivanti dalla degenerazione di mitocondri e plastidi (Castellano e Martelli, 1984). La vescicolazione dei mitocondri provocata da GFkV è distinguibile da quella indotta dai closterovirus perchè le vescicole sono racchiuse da doppia membrana nel primo caso e da singola nel secondo (Faoro *et al.*, 1992b).

Le indagini citopatologiche di cui sopra possono essere integrate con immunomarcature con oro colloidale direttamente sulle sezioni ultrasottili. Con questa tecnica, oltre a confermare se le particelle virali osservate sono quelle cercate, è anche possibile, nel caso di infezioni miste, individuare i vari virus nel tessuto in esame (Faoro *et al.*, 1991).

Micoplasmi - Dato l'esiguo numero di microrganismi rinvenuti nei tessuti delle viti infette da FD o da giallumi (GY) (Granata e Grimaldi, 1991; Credi, 1994) nonostante gli innumerevoli sforzi, questa tecnica non risulta adatta a scopi diagnostici. Nelle viti infette comunque, sono stati frequentemente osservati con la microscopia elettronica a scansione ammassi di corpuscoli delle stesse dimensioni dei micoplasmi (Quaroni *et al.*, 1988) la cui comparsa precede i sintomi e può essere quindi utile alla diagnosi.

TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

La biologia molecolare ha trovato negli ultimi anni larga applicazione nello studio dei virus, viroidi e micoplasmi della vite (Martelli, 1993; Walter, 1993; Caudwell, 1993). Grazie al perfezionarsi dei metodi di purificazione e di estrazione di acidi nucleici da piante infette sono stati prodotti cloni di cDNA di nepo-, clostero- e trichovirus, di viroidi e micoplasmi. Le tecniche impiegate, diverse a seconda del patogeno da individuare, sono l'estrazione del dsRNA, l'ibridazione con sonde molecolari clonate e l'amplificazione genica (polymerase chain reaction, PCR).

dsRNA - RNA bicatenari virali sono stati studiati soprattutto in piante affette da LR e RW. Mossop *et al.* (1985) hanno estratto bande ad alto peso molecolare (8 kb) da floema di viti affette da LR. Rezaian *et al.* (1992) hanno dimostrato che da fonti differenti di piante con LR si isolano diversi dsRNA tra loro non omologhi. Nel caso invece di "Rupestris stem pitting" sono state individuate una o due bande di circa 5 kb (Azzam *et al.*, 1991; Walter e Cameron, 1991) ed una banda di circa 15 kb da viti infette da GCBaV (Namba *et al.*, 1991). Da dsRNA purificato da floema di vite è stato possibile ottenere cloni di cDNA per GLRaV III (Ling *et al.*, 1993; Saldarelli *et al.*, 1994) e GCBaV (Maningas *et al.*, 1993). L'assenza di dsRNA è stata considerata probatoria per l'avvenuto risanamento tramite coltura di meristemi di viti affette da LR (Habibi *et al.*, 1992). Tuttavia una diagnosi basata sui profili di dsRNA non è affidabile, soprattutto perchè la diffusa presenza di infezioni miste produce spettri elettroforetici complessi di difficile interpretazione. Quindi, in mancanza di ibridazione con sonde specifiche, la presenza di dsRNA testimonia solo lo stato di infezione e trova applicazione negli schemi di certificazione e quarantena.

Ibridazione con sonde molecolari clonate - Queste tecniche sono basate sulla produzione di DNA ricombinante mediante purificazione di DNA specifici (micoplasmi) o ottenimento di cDNA (virus e viroidi) che vengono poi inseriti in plasmidi vettori e clonati in appositi batteri o amplificati con PCR. Queste sonde, marcate con biotina o digossigenina, o con isotopi radioattivi, vengono impiegate per riconoscere la presenza di sequenze complementari dei rispettivi patogeni.

Virus - Con sonde radioattive di DNA Fuchs *et al.* (1991) hanno identificato e differenziato gli RNA genomici da quello satellite di GFLV dopo frazionamento elettroforetico da estratti di foglie e radichette. Con la medesima tecnica l'RNA satellite di GFLV è stato anche identificato sia in *Chenopodium quinoa* che in viti (Saldarelli *et al.*, 1993b).

L'ibridazione a macchia con sonde radioattive per la ricerca di RNA di clostero- e trichovirus in vite ha dimostrato una ridotta sensibilità dovuta alla bassa concentrazione virale. Per GVA (Minafra *et al.*, 1992a) e GVB (Saldarelli *et al.*, 1992a) le ibridazioni da viti infette sono risultate appena differenziabili

dai controlli sani mentre per GLRaV III sono state ottenute ibridazioni dei dsRNA subgenomici e convincenti reazioni con estratti di acidi nucleici totali da vite (Saldarelli *et al.*, 1994). L'applicazione di sonde di DNA marcate con digossigenina ed individuate con chemiluminescenza (Saldarelli *et al.*, 1993c) ha permesso di stimare una soglia minima di sensibilità per RNA purificati di GVA e GVB intorno a 30-60 pg e per dsRNA di GLRaV III di 125 pg. In questi saggi il segnale è stato incrementato da un trattamento cromatografico degli estratti con cellulosa CF11. La chemiluminescenza sembra pertanto proporsi come saggio di grande utilità per applicazioni diagnostiche massali perchè elimina gli inconvenienti della radioattività senza ridurre la sensibilità.

V i r o i d i - L'identificazione molecolare dei viroidi della vite ha trovato definitiva risposta grazie alla ibridazione con oligonucleotidi specifici (Koltunow *et al.*, 1989) ed alla amplificazione con PCR (Rezaian *et al.*, 1991).

M i c o p l a s m i - Con ibridazioni a macchia impiegando sonde contenenti DNA di micoplasmi associati a FD o a GY ottenuto da piante inoculate artificialmente (Daire *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993) od esposte alla infezione in vigneti colpiti (Davis *et al.*, 1992) è stato possibile dimostrare la presenza di micoplasmi direttamente in viti infette e in individui di *S. titanus* allevati sia su vitigni infetti che su piante di cv. Nebbiolo ed Erbaluce apparentemente resistenti alla malattia (Bertaccini *et al.*, 1993a).

Uno studio comparativo basato sull'ibridazione dei frammenti di DNA ottenuti dopo trattamento con enzimi di restrizione (restriction fragment length polymorphism, RFLP) di due isolati di GY provenienti dal Friuli-Venezia Giulia e dalla Puglia (Davis *et al.*, 1993a) ha permesso di differenziare i micoplasmi dal punto di vista genetico e di avanzare l'ipotesi della presenza di almeno due MLO associati a GY in Italia.

Amplificazione genica - La PCR è stata applicata con successo data la sua estrema specificità e sensibilità che permette di individuare molecole di acido nucleico presenti alla concentrazione di pochi femtogrammi (10^{-15} g). Essa consiste nell'impiego di oligonucleotidi ("primers"), cioè corte sequenze di DNA che servono a "copiare" un numero teoricamente illimitato di volte frammenti specifici di acido nucleico in modo da renderne visibile la presenza dopo separazione elettroforetica.

V i r u s - Ipach *et al.* (1992) e Minafra *et al.* (1992b) hanno applicato la PCR alla diagnosi di ArMV e GVA direttamente in vite. Per semplificare la preparazione dei campioni, evitando l'estrazione fenolica degli acidi nucleici, si è proceduto alla immunocattura del virus seguita dalla trascrizione inversa dell'RNA e dalla sua amplificazione (IC/PCR). Con questa tecnica è stato anche possibile individuare RNA di GVA in singole cocciniglie virulifere (Minafra e Hadidi, 1994) e GFLV (Nolasco e De Sequeira, 1993a; Brandt e Himmler, 1993) e GVA (Chevalier *et al.*, 1993) in viti infette. Minafra e Hadidi (1994) hanno inoltre amplificato da succo grezzo di viti infette contemporaneamente da GVB e GLRaV III, bande specifiche di entrambi i virus nella stessa reazione

(PCR multiplo). Sempre con IC/PCR, Nolasco e De Sequeira (1993b) hanno evidenziato un diverso polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) e della conformazione della singola elica (SSCP) di isolati virali presenti in piante di uno stesso vigneto con infezione naturale di GFLV. Ciò fa prevedere che, così come per i micoplasmi, con questa tecnica si potrà in futuro individuare provenienza e distribuzione geografica anche dei ceppi virali.

Viroidi - La PCR ha consentito l'ottenimento di una grande quantità di informazioni sulla genetica dei viroidi che infettano la vite. La loro sequenza, ottenuta da prodotti amplificati, rispecchia con alta fedeltà le sequenze più diffuse in popolazioni di RNA con discreta variabilità come quelle dei viroidi. Infatti Puchta *et al.* (1989) hanno usato PCR per amplificare e sequenziare ridotte quantità di HSV dal portinnesto Kober 5BB e Rezaian *et al.* (1992) hanno amplificato e paragonato le sequenze di quattro viroidi da viti australiane e californiane (AGVd, GYSVd1, GYSVd2 e HSVd). Inoltre è stato dimostrato che AGVd è un viroide chimerico appartenente al gruppo di ASSVd (Rezaian, 1990) e che due viroidi distinti, con omologia di sequenza del 73%, causano la pichettatura gialla della vite (Koltunow *et al.*, 1989).

Micoplasmi - La PCR è stata applicata con successo su viti colpite da FD o GY in diverse aree geografiche (Daire *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1993b; Bianco *et al.*, 1993a; Chen *et al.*, 1993). L'amplificazione di una sequenza specifica dei micoplasmi altamente conservata in tutto il genere (16S rDNA) ha permesso di verificare, una volta analizzata con RFLP, che un isolato piemontese è differenziabile dagli isolati dell'Emilia-Romagna e della Germania, ed appartiene al gruppo del giallume dell'astro (AY), sottogruppo IB (Arzone *et al.*, 1993). Il medesimo tipo di indagine su frammenti di DNA di MLO amplificati direttamente da cv. Chardonnay, Caveccia e Sangiovese dell'Emilia-Romagna hanno permesso di verificare la presenza di un micoplasma indistinguibile da quello presente nelle vinche infettate con cuscuto nella medesima regione (Bertaccini *et al.*, 1993b); esso appartiene però ad un nuovo sottogruppo di AY (R.E. Davis e A. Bertaccini, dati inediti). Indagini in corso rivelano che questo micoplasma è diffuso nell'Italia centro-settentrionale anche in altre colture. In Italia, Francia e Stati Uniti si è di recente dimostrato che il micoplasma agente della FD appartiene al gruppo genetico dei micoplasmi del giallume dell'olmo (elm yellows, EY) (Daire *et al.*, 1993; Prince *et al.*, 1993) e risulta presente in alcune aree dell'Italia settentrionale in infezione mista con un micoplasma del tipo AY (Bianco *et al.*, 1993b). Alcuni dei giallumi descritti in Friuli-Venezia Giulia sono inoltre stati riconosciuti appartenere al gruppo delle malattie denominate "X-disease" (Prince *et al.*, 1993).

LAVORI CITATI

- Arzone A., A. Bertaccini, R.E. Davis, A. Alma, D. Bosco, M. Vibio e J.P. Prince, 1993. Molecular detection of MLOs associated with grapevine yellows disease in Piemonte, Italy. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 86-87.
- Azzam O.I., D. Gonsalves e D. Golino, 1991. Detection of dsRNA in grapevine showing symptoms of rupestris stem pitting disease and the variability encountered. *Plant Disease*, **75**, 960-964.
- Bertaccini A., A. Arzone, A. Alma, D. Bosco e M. Vibio, 1993a. Detection of micoplasmalike organisms in *Scaphoideus titanus* Ball. reared on Flavescence dorée-infected grapevines by dot hybridizations using DNA probes. *Phytopathologia Mediterranea*, **32**, 20-24.
- Bertaccini A., R.E. Davis, M. Vibio, J.P. Prince e R. Credi, 1993b. Detection and characterization of mycoplasmalike organism (MLO) DNA in naturally infected grapevine cultivars in Emilia-Romagna, Italy: polymerase chain reaction and restriction analyses. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 88-89.
- Bianco P.A., R.E. Davis, J.P. Prince, I.-M. Lee, B.D. Mogen e G. Belli, 1993a. PCR detection of a mycoplasma-like organism (MLO) in flavescence dorée diseased grapevines from Lombardia, Italy. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 90-91.
- Bianco P.A., R.E. Davis, J.P. Prince, I.-M. Lee, D.E. Gundersen, A. Fortusini e G. Belli, 1993b. Double and single infections by aster yellows and elm yellows MLOs in grapevines with symptoms characteristic of flavescence dorée. *Rivista di Patologia Vegetale*, **SV**, **3**, 69-82.
- 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.
- Boscia D., E. Asloui, V. Elicio, V. Savino, M.A. Castellano e G.P. Martelli, 1992. Production, characterization and use of monoclonal antibodies to grapevine virus A. *Archives of Virology*, **127**, 185-194.
- Boscia D., V. Elicio, V. Savino e G.P. Martelli, 1993. Monoclonal antibodies to grapevine fleck virus. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 133.
- Bovey R. e G.P. Martelli, 1992. Directory of major virus and virus-like diseases of grapevines. ICVG-MFCIC, Bari, 111 pp.
- Brandt S. e G. Himmler, 1993. Detection of grapevine fanleaf virus from woody material by using immunocapture polymerase chain reaction. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 150.
- Brown D.J.F. e I.M. Roberts, 1980. Detection of nepoviruses in their nematode vectors by immunosorbent electron microscopy. *XV International Nematology Symposium, Bari, Italy*, 36-37.

- Castellano M.A., G.P. Martelli e V. Savino, 1983. Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines. *Vitis*, **22**, 23-39.
- Castellano M.A. e G.P. Martelli, 1984. Ultrastructure and nature of vesiculated bodies associated with isometric virus-like particles in diseased grapevines. *Journal of Ultrastructure Research*, **89**, 56-64.
- Catalano L., V. Savino e F. Lamberti, 1991. ELISA for detection of grapevine fanleaf nepovirus in *Xiphinema index*. *Proceedings 10th Meeting ICVG, Volos 1990*, 243-246.
- Caudwell A., 1993. Advances of grapevine yellows research since 1990. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 79-83.
- Caudwell A. e C. Kuszala, 1992. Mise au point d'un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de Flavescence dorée. *Research in Microbiology*, **143**, 791-806.
- Chen K.H., J.R. Guo, X.J. Wu, N. Loi, L. Carraro, H.J. Guo, Y.D. Chen, R. Osler, R. Pearson e T.A. Chen, 1993. Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology*, **83**, 915-922.
- Chevalier S., C. Greif, P. Bass e B. Walter, 1993. Development of the Immunocapture-reverse transcription-PCR procedure for detection of GVA in grapevine tissues. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 151.
- Credi R., 1994. Mycoplasma-like organisms associated with a grapevine yellows disease occurring in Italy. *Journal of Phytopathology* (in stampa).
- 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 ICVG, Volos 1990*, 71-80.
- Daire X., E. Boudon-Padieu, A. Berville, B. Schneider ed A. Caudwell, 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organisms (MLO). *Annals of Applied Biology*, **121**, 95-103.
- Daire X., D. Clair, J. Larrue, E. Boudon-Padieu, A. Alma, A. Arzone, L. Carraro, R. Osler, R. Refatti, G. Granata, R. Credi, E. Tanne e A. Caudwell, 1993. MLO detection by hybridization and PCR in grapevine yellows. Investigation on samples from various areas in different countries. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 92.
- Davis R.E., E.L. Dally, A. Bertaccini, R. Credi, I.-M Lee, R. Osler, L. Carraro e M. Barba, 1992. Cloned DNA probes for specific detection of Italian perwinkle virescence mycoplasma-like organism (MLO) and investigation of genetic relatedness with other MLOs. *Phytopathologia Mediterranea*, **31**, 5-12.

- Davis R.E., E.L. Dally, A. Bertaccini, I.-M. Lee, R. Credi, R. Osler, V. Savino, L. Carraro, B. Di Terlizzi e M. Barba, 1993a. Restriction fragment length polymorphism analysis and dot hybridizations distinguish mycoplasma-like organism (MLOs) associated with flavescentia dorée and Southern European Grapevine Yellows disease in Italy. *Phytopathology*, **83**, 772-776.
- Davis R.E., A. Bertaccini, J.P. Prince e M. Vibio, 1993b. Infection of grapevines in Emilia-Romagna, by mycoplasma-like organisms (MLOs) related to Italian periwinkle virescence MLO: evidence from enzymatic amplification of MLO DNA. *Phytopathologia Mediterranea*, **32**, 149-152.
- Engelbrecht D.J. e G.G.F. Kadorf, 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*, **22**, 341-346.
- Faoro F. e R. Tornaghi, 1991. Closteroviruses and P-proteins in *Vitis vinifera*: Means of discrimination. *Giornale Botanico Italiano*, **125**, 998-999.
- Faoro F., R. Tornaghi e G. Belli, 1991. Localization of closterovirus in grapevine thin sections and their identification by immunogold labelling. *Journal of Phytopathology*, **123**, 297-306.
- Faoro F., R. Tornaghi e G. Belli, 1992a. Vesiculation of mitochondria associated with grapevine phloem-limited viruses. *Proceedings EUREM 92, Granada 1992*, 431-432.
- Faoro F., R. Tornaghi, R. Cinquanta e G. Belli, 1992b. Cytopathology of grapevine leafroll-associated virus III (GLRaV III). *Rivista di Patologia Vegetale*, S.V, 67-83.
- Frison E.A. e R. Stace-Smith, 1992. Cross-reacting and heterospecific monoclonal antibodies produced against arabis mosaic nepovirus. *Journal of General Virology*, **73**, 2525-2530.
- Fuchs M., M. Pinck, L. Etienne, L. Pinck e B. Walter, 1991. Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology*, **81**, 559-565.
- Granata G. e V. Grimaldi, 1991. Electron microscopic detection of mycoplasma-like organisms in epidemic yellows affected grapevines. *Petria*, **1**, 171-175.
- Habili N., L.R. Krake, M. Barlass e M.A. Rezaian, 1992. Evaluation of biological indexing and dsRNA analysis in grapevine virus elimination. *Annals of Applied Biology*, **121**, 277-287.
- Hu J.S., D. Gonsalves, D. Boscia, M. Maixner e D. Golino, 1991. Comparison of rapid detection assays for leafroll disease associated closteroviruses. *Vitis*, **30**, 87-95.
- Huss B., B. Walter, L. Etienne e M.H.V. Van Regenmortel, 1986. Grapevine fanleaf virus detection in various organs using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vitis*, **25**, 178-188.

- Koltunow A.M., L.R. Krake, S.D. Johnson e M.A. Rezaian, 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *Journal of General Virology*, **70**, 3411-3419.
- Ipach U., B. Altmayer e K.W. Eichorn, 1992. Detection of arabis mosaic virus using the polymerase chain reaction (PCR). *Vitis*, **31**, 213-219.
- Ling K., H.F. Alvizo-Villasana, J. Hu e D. Gonsalves, 1993. Molecular cloning of dsRNA isolated from tissue infected with grapevine leafroll virus type III. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 21.
- Maningas M.A., D.A. Golino, D. Kirkpatrick, A. Rowhani e D. Gonsalves, 1993. The development of a nucleic acid-based probe for the rapid detection of grapevine corky bark disease. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 154.
- Martelli G.P., 1993. Advances in grapevine virology: 1991-93. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 13-18.
- Martelli G.P., 1994. Inquadramento sistematico dei virus della vite. *Atti Giornate Fitopatologiche 1994*.
- Milne R.G. ed E. Luisoni, 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Methods in Virology*, **8**, 265-281.
- Milne R.G., M. Conti, D.-E. Lesemann, G. Stellmach, E. Tanne e J. Choen, 1984. Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. *Phytopathologische Zeitschrift*, **110**, 360-368.
- Minafra A., M. Russo e G.P. Martelli, 1992a. Further studies on the use of molecular probes to grapevine closterovirus A. *Vitis*, **31**, 87-93.
- Minafra A., A. Hadidi e G.P. Martelli, 1992b. Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vitis*, **31**, 221-227.
- Minafra A. ed A. Hadidi, 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B and leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* (in stampa).
- Mossop D.W., D.R. Elliott e K.D. Richards, 1988. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double-stranded RNA with grapevines affected leafroll disease. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **28**, 419-425.
- Namba S., D. Boscia, O. Azzam, M. Maixner, J.S. Hu, D. Golino e D. Gonsalves, 1991. Purification and properties of closterovirus-like particles associated with grapevine corky bark disease. *Phytopathology*, **81**, 964-970.
- Nolasco G. e O. A. De Sequeira, 1993a. Immunocapture polymerase chain reaction in the diagnosis of grapevine fanleaf virus in grapevine field samples. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 158.

- Nolasco G. e O. A. De Sequeira, 1993b. Genome diversity of field isolates of grapevine fanleaf virus analyzed by single stranded conformation (SSCP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 31.
- Osler R., E. Boudon-Padieu, L. Carraro, A. Caudwell ed E. Refatti, 1992. First results on the trial in progress to identify the vector of the agent of a grapevine yellows in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **31**, 175-181.
- Pares R.D. e M.I. Whitecross, 1982. Gold-labelled antibody decoration (GLAD) in the diagnosis of plant viruses by immuno-electron microscopy. *Journal of Immunological Methods*, **51**, 23.
- Pietersen G. e G.G.F. Kasdorf, 1993. Use of IEM for the detection of the viruses of the grapevine leafroll complex in South Africa. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 140-141.
- Poggi Pollini C., L. Giunchedi e R. Credi, 1993. A chemiluminescent immuno-assay for the diagnosis of grapevine closteroviruses on nitro-cellulose membrane. *Journal of Virological Methods*, **42**, 107-116.
- Prince J.P., R.E. Davis, T.K. Wolf, I.-M. Lee, B.D. Mogen, E.L. Dally, A. Bertaccini, R. Credi e M. Barba, 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, **83**, 1130-1137.
- Puchta H., K. Ramm, R. Luckinger, K. Freimuller e H.L. Sanger, 1989. Nucleotide sequence of a op stunt viroid isolate from the German grapevine rootstock 5BB as determined by PC-mediated sequence analysis. *Nucleic Acid Research*, **17**, 5841.
- Quaroni S., M. Saracchi, A. Fortusini e G. Belli, 1988. Osservazioni mediante microscopia elettronica a scansione su viti affette da flavescenza dorata. *Rivista di Patologia Vegetale*, **24**, 71-79.
- Ramel M.E., P. Serrant, P. Kulling e P. Gugerli, 1993. Monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of grapevine fleck associated virus. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 161-162.
- Rezaian M.A., 1990. Australian grapevine viroid. Evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acid Research*, **18**, 1813-1818.
- Rezaian M.A., L.R. Krake, Q. Cunying e C.A. Hazzalin, 1991. Detection of virus-associated dsRNA from leafroll infected grapevines. *Journal of Virological Methods*, **31**, 325-334.
- Rezaian M.A., L.R. Krake e D. Golino, 1992. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. *Intervirology*, **34**, 38-43.
- Rowhani A., 1992. Use of F(ab')₂ antibody fragments in ELISA for detection of grapevine viruses. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**, 38-40.

- Rowhani A., M.A. Walker e S. Rokni, 1992. Sampling strategies for detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. *Vitis*, **31**, 35-44.
- Russo M., 1985. Electron microscopy of grapevine virus infections. *Phytopathologia Mediterranea*, **24**, 144-147.
- Salati R., D. Golino, A. Rowhani, N. Willits e D. Gonsalves, 1993. Detection of grapevine closterovirus associated with leafroll and corky bark *in vitro* using F(ab')₂ ELISA. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 142-143.
- Saldarelli P., A. Minafra, R. Garau e G.P. Martelli, 1993a. A cloned probe to grapevine virus B. *Rivista di Patologia Vegetale*, S.V., **3**, 15-22.
- Saldarelli P., A. Minafra e B. Walter, 1993b. A survey of grapevine fanleaf nepovirus isolates for the presence of satellite RNA. *Vitis*, **32**, 99-102.
- Saldarelli P., H. Guglielmi-Montano e G.P. Martelli, 1993c. Detection of three grapevine closterolike viruses by non radioactive molecular probes. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 136.
- Saldarelli P., A. Minafra, G.P. Martelli e B. Walter, 1994. Detection of grapevine leafroll associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant Pathology* (in stampa).
- Schwartz Y., E. Boudon-Padieu, J. Grange, R. Meignoz ed A. Caudwell, 1989. Obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'agent pathogene de type mycoplasme de la Flavescence dorée de la vigne. *Research in Microbiology*, **140**, 311-324.
- Walter B., 1993. Advances in grapevine virus disease diagnosis since 1990. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 127-130.
- Walter M.H. e H.R. Cameron, 1991. Double-stranded RNA isolated from grapevines affected by rupestris stem pitting disease. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**, 175-179.
- Walter B., J. Kuszala ed A. Vuittenez, 1979. Diagnostic sérologique par les tests PALLAS et ELISA. Application aux virus de la rhizomanie de la betterave et du court-noué de la vigne. *Annales de Phytopathologie*, **11**, 568-569.
- Walter B. e P. Cornuet, 1993. ELISA detection of grapevine fleck virus (GFkV). *Agronomie*, **13**, 651-657.
- Walter B., S. Grenan, D. Esmanjaud, P. Cornuet, R. Boidron e M. Leguay, 1993. Use and limits of ELISA for routine detection of ArMV and GFLV in grapevine and *Xiphinema index*. *Extended Abstracts 11th Meeting ICVG, Montreux 1993*, 146-147.
- Zimmermann D., 1990. La maladie de l'enroulement de la Vigne: caractérisation de quatre particules virales de type clostérovirus à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux. *Thèse, Université L. Pasteur, Strasbourg*, 256 pp.