ATTI *Giornate Fitopatologiche,* 2008, 2, 615-620

RISANAMENTO DA VIRUS SU VITIGNI AD UVA DA TAVOLA TRAMITE COLTURA *IN VITRO* DI APICI VEGETATIVI

M. BORGO, I. BAZZO, N. BERTAZZON, M. GARDIMAN, E. ANGELINI
CRA Centro di Ricerca per la Viticoltura - Viale 28 aprile, 26, 31015 Conegliano (TV)
michele.borgo@entecra.it

RIASSUNTO

Vengono riportati i risultati di prove di risanamento effettuate tramite coltura *in vitro* di apici vegetativi su circa 60 varietà di vite ad uva da tavola. Vengono messi a confronto i risultati dei saggi fitosanitari per le principali e più diffuse malattie da virus, eseguiti sulle piante madri e sulle viti ottenute da micropropagazione. Sono stati utilizzati saggi sierologici e molecolari, effettuati anche a distanza di molti anni. In media il risanamento é stato efficace in circa il 70% dei casi, anche se il successo del trattamento varia in funzione dei virus e delle loro associazioni. I virus fleck e GRSPaV sono stati i più difficili da eliminare, ma la percentuale di risanamento si è attestata comunque su valori intorno al 50%. La cultura *in vitro* di apici vegetativi appare utile per il ricupero di biotipi virosati, ma che vengono scelti per le loro peculiari caratteristiche qualitative ed agronomiche.
Parole chiave: coltura *in vitro*, micropropagazione, risanamento, virus, vite

SUMMARY

ELIMINATION OF VIRUSES FROM TABLE GRAPE VARIETIES BY MEANS OF *IN VITRO* CULTURE OF SHOOT TIPS

The results of the trials for elimination of viruses by means of *in vitro* culture of shoot tips from about 60 table grape varieties are reported. Immunoenzymatic and biomolecular tests were used for the identification of the most important viruses. Results of the sanitary tests carried out in the mother plants and in the micropropagated grapevine plants are compared. On the average, elimination of viruses was consistent in roughly 70% of the cases, even if the yield depended on the type of virus. Fleck and GRSPaV viruses were the most difficult to eliminate, thought the sanitation was effective on about 50% of the samples. The *in vitro* culture of shoot tips revealed to be useful for the recovery of virus-infected biotypes, which were previously chosen for their good qualitative and agronomic quality traits.
Keywords:, *in vitro* culture, micropropagation, sanitation, virus, grapevine

INTRODUZIONE

L'avanzare delle conoscenze sulle patologie vegetali porta sempre a scoprire ed a meglio caratterizzare nuove entità virali, tanto che a tutt'oggi sono stati individuati su vite più di 50 virus (Martelli e Boudon-Padieu, 2006). Solo alcuni di questi sono però considerati importanti in Europa, sia per i danni che causano alla viticoltura sia per la loro ampia diffusione.

Le varietà, i cloni ed i biotipi di vite individuati e selezionati nel corso degli anni, e quindi dotati di particolari caratteristiche qualitative ed agronomiche, non sempre soddisfano i criteri di sanità richiesti dalle normative comunitarie e nazionali (Direttiva 68/193 CEE, DPR 1164/1969 e DM 7.7.06), le quale richiedono che i cloni, per essere certificati, debbono essere necessariamente esenti dalle virosi ritenute più dannose. In particolare, nella Comunità Europea per i cloni di *Vitis vinifera* è richiesta, al momento attuale, l'esenzione dai virus agenti del complesso della degenerazione infettiva quali ArMV (*Arabis mosaic virus*) e GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), dell'accartocciamento fogliare quale GLRaV-1 e -3 (*Grapevine leafroll-associated viruses*-1,-2), di GVA (*Grapevine virus A*), agente del legno riccio su KoberBB. Per i portinnesti è prevista l'ulteriore esenzione da GFkV (*Grapevine fleck virus*),

agente della maculatura infettiva. Altri virus che risultano molto diffusi, ma per i quali ad oggi non è richiesta l'esenzione sulla base delle norme comunitarie, sono GLRaV-2 (*Grapevine leafroll-associated virus 2*), che concorre a formare il complesso dell'accartocciamento fogliare, e GRSPaV (*Grapevine rupestris stem pittino-associated virus*) che, sulla base di studi recenti, comprende 3 gruppi di isolati virali, associati sia al legno riccio nella forma di punteggiature e lievi butterature sul legno di portinnesti di *Vitis rupestris,* sia alle necrosi delle nervature su 110 Richter.

Negli ultimi anni, il crescente interesse per la salvaguardia della biodiversità viticola e per la valorizzazione di vitigni locali ha stimolato lo sviluppo di tecniche di risanamento dai virus, che vengono applicate su biotipi di interesse storico e colturale o su biotipi per i quali non sono reperibili accessioni che rispettino i requisiti per la certificazione. I metodi più utilizzati per il risanamento delle viti da malattie virali sono la termoterapia e la coltura di apici *in vitro*. Il successo di tali procedure è legato alla tecnica adottata, al numero e al tipo di virus presenti e al vitigno.

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di esperienze di risanamento tramite tecniche di coltura *in vitro* di apici, attuate nel giro di un decennio su alcune varietà ad uva da tavola presenti nella collezione ampelografica del Centro per la Viticoltura del CRA (CRA-VIT) al fine di ottenere l'eliminazione di agenti virali, che erano stati precedentemente identificati con saggi biologici, immunoenzimatici e biomolecolari.

MATERIALI E METODI

Piante madri (PM)

Nelle prove di risanamento sono state utilizzate 61 piante di vite, ciascuna appartenente ad una diversa varietà di uva da tavola, di provenienza italiana e straniera, da tempi remoti coltivate nella collezione ampelografica del CRA-VIT di Susegana (TV). Quasi tutte le accessioni erano inizialmente infette da uno o più fra i virus testati: GFkV, ArMV, GFLV, GLRaV-1, -2 e -3, GVA, GRSPaV (varianti 1, 2 e 3).

Interventi di risanamento e piante micropropagate

Gli espianti sono stati effettuati prelevando la parte apicale (dimensioni intorno ad 1 mm) da germogli in rapida crescita, ottenuti da tralci messi in forzatura a fine inverno. Essi sono stati micropropagati *in vitro*, adottando la metodica comunemente in uso presso il CRA-VIT di Conegliano (Borgo *et al.*, 1992). Tutto il materiale vegetale non utilizzabile nelle fasi di trasferimento colturale veniva utilizzato per i saggi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), allo scopo di verificare il livello di sanità raggiunto dai nuovi ottenimenti.

Dopo un periodo di ambientamento in condizioni protette in vasetto, le plantule ottenute e franche di piede sono state messe a dimora in pieno campo. Una volte adulte ed in piena produzione, le piante sono state sottoposte ad ulteriori saggi sanitari ELISA e PCR (Polymerase Chain Reaction), per confermare e verificare il mantenimento dello stato sanitario.

Saggi sierologici e molecolari

Le PM, le plantule *in vitro* e le viti adulte derivate da micropropagazione sono state sottoposte, in tempi diversi, a saggi sanitari sierologici ELISA per GFkV, ArMV, GFLV, GLRaV-1, -2 e -3 e GVA, con *kit* sierologici delle Ditte Agritest e/o Bioreba, seguendo le istruzioni dei produttori.

Nel periodo 2006-2007 le stesse piante sono state sottoposte anche a saggi molecolari PCR, per avere una conferma dei dati del saggio ELISA nel caso di GLRaV-1, -2 e -3 e GVA. Inoltre tramite PCR specifica é stata messa in evidenza la presenza delle varianti del virus GRSPaV (1, 2 e 3), per il quale ad oggi non esistono saggi immunoenzimatici.

L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita seguendo il protocollo descritto da Mackenzie *et al.*, (1997). I *primer* usati per l'amplificazione sono stati i seguenti: per GLRaV-1 la coppia CPf1/r2 (Bertazzon, dati non pubblicati), per GLRaV-2 la coppia CPUf/r (Bertazzon, dati non pubblicati), per GLRaV-3 la coppia C547/H229 (Minafra e Hadidi, 1994), per GVA la coppia C995/H587 (Minafra e Hadidi, 1994), per GRSPaV le coppie di *primer* specifiche per riconoscere i 3 gruppi di varianti (Rowhani, comunicazione personale).

Nuovi saggi ELISA e PCR sono stati eseguiti anche sui campioni di viti delle PM, dalle quali era stato originariamente prelevato il materiale per il risanamento. In considerazione del fatto che le piante coltivate in pieno campo possono correre il rischio di infettarsi con agenti virali trasmessi a vettori quali nematodi e cocciniglie, i dati utilizzati per il presente lavoro e relativi alle PM sono riferiti a campioni di vite infetti dagli stessi virus che erano stati identificati al momento del prelievo iniziale, prima degli interventi di risanamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'esame complessivo dei dati ottenuti, sia sierologici che molecolari, si evince che la percentuale di risanamento conseguito è variata fortemente in funzione delle affezioni virali (figura 1). I virus che è stato possibile eliminare più facilmente sono stati GLRaV-3 e GVA, per i quali si sono ottenute percentuali di risanamento rispettivamente del 91% e 87%. I virus per i quali è stato invece più difficoltoso il risanamento sono stati GRSPaV e fleck: GRSPaV-1, -2 e GFkV si sono attestati a valori intorno al 55%, mentre l'eliminazione di GRSPaV (variante 3) é avvenuta solo nel 37% delle accessioni. Gli altri virus hanno mostrato un comportamento intermedio. I virus GLRaV-1 e GLRaV-2, associati all'accartocciamento fogliare, sono stati eliminati dagli espianti analizzati rispettivamente con un'incidenza del 71 e 77%.

Figura 1. Incidenza dei diversi virus sulle accessioni di uva da tavola prima del risanamento (piante madri) e dopo il risanamento (piante micropropagate)

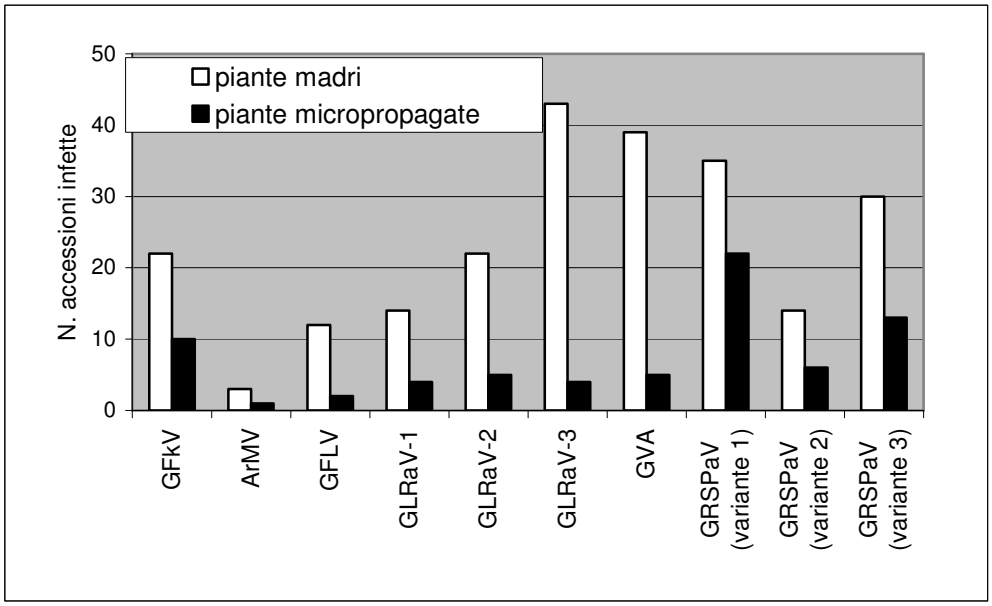


Figura 2. Ripartizione delle accessioni di vite in funzione del numero di virus presenti (da 0 a 8) sulle piante madri prima del risanamento (a sinistra) e su viti micropropagate tramite coltura *in vitro* di apici (a destra)

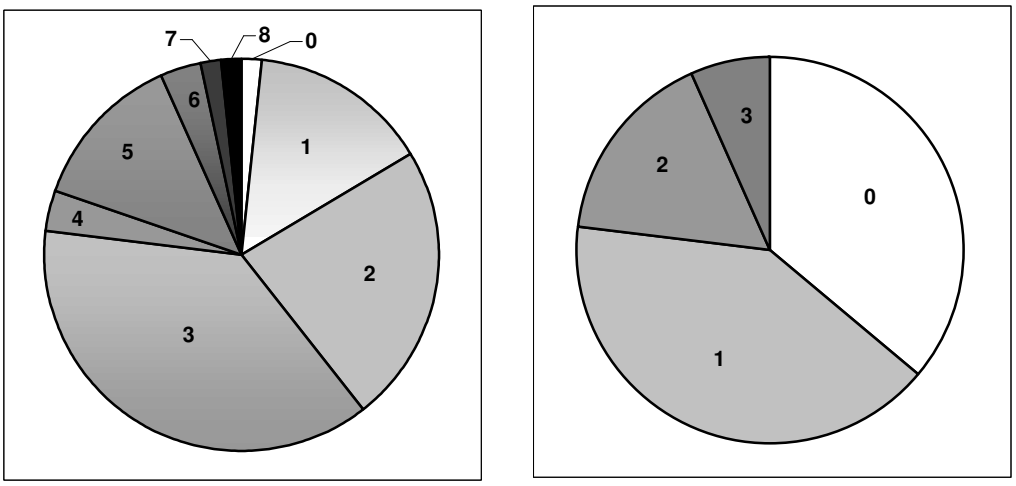
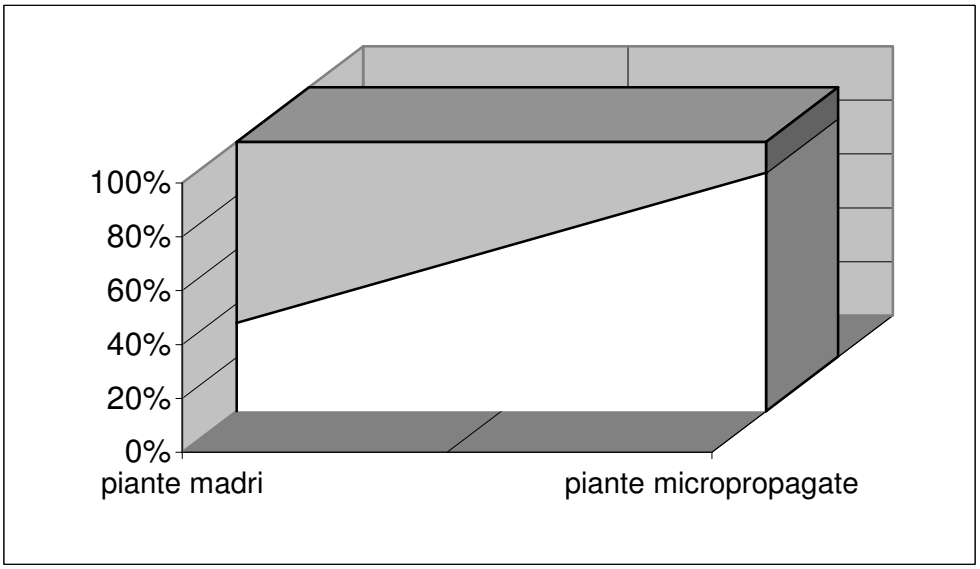


Figura 3. Percentuale di accessioni di vitigni ad uva da tavola che soddisfano i requisiti del DM 7.7.06 per la certificazione: confronto fra la situazione prima (piante madri) e dopo (piante micropropagate) gli interventi di micropropagazione



Anche nei confronti dei due virus coinvolti nella sindrome della degenerazione infettiva si sono ottenuti buoni livelli di risanamento, intorno all'83% per GFLV; nel caso di ArMV, virus molto poco diffuso, sono state risanate 2 accessioni su 3. Il risanamento da tutti i virus analizzati e presenti all'origine è stata ottenuta su 21 espianti, pari al 35% delle accessioni trattate.

Il confronto tra il numero dei virus presenti in ciascuna accessione prima e dopo la coltura in vitro mostra chiaramente l'efficacia della tecnica della micropropagazione tramite coltura *in vitro* di apici vegetativi. Il quadro sanitario iniziale (figura 2, sinistra) evidenzia che una sola accessione varietale era esente da tutti i virus saggiati, mentre la maggioranza delle varietà sottoposte a risanamento erano infette da 2 o 3 virus. Inoltre, diverse accessioni presentavano infezioni con 1 o 5 virus, mentre pochissime erano colpite da 4, 6, 7 o anche 8 virus in infezione mista. La situazione appare notevolmente migliorata dopo la coltura in vitro (figura 2, destra). Infatti la maggior parte delle piante micropropagate sono risultate completamente esenti dai virus saggiati o sono rimaste infette con una sola entità virale. Alcune accessioni, nonostante il procedimento di risanamento, hanno presentato ancora infezioni con 2 o 3 virus, ma nessuna di esse è rimasta infetta da più di 3 virus.

Tenendo conto delle attuali norme che regolamentano la certificazione di qualità della vite (DM 7 luglio 2006), il confronto dello stato sanitario delle PM prima delle prove di risanamento rispetto a quello delle piante ottenute dalla micropropagazione evidenzia che il numero di accessioni, che possano soddisfare i requisiti per la certificazione, è salito da poco più del 30% fino al 90% (figura 3).

CONCLUSIONI

Gli interventi di micropropagazione con tecniche di coltura *in vitro* di apici vegetativi di dimensioni inferiori a 1 mm si è confermata essere una tecnica utile ed efficace, che consente di eliminare gran parte dei virus che colpiscono i vitigni presenti nelle vecchie collezioni ampelografiche e che, dal momento che costituiscono un importante patrimonio genetico, meritano di essere conservati e migliorati sanitariamente. Attraverso questa tecnica è infatti possibile disporre di germoplasma viticolo migliorato, pregevole per il livello di sanità raggiunto e utile per qualificare le produzioni vitivinicole, spesso inficiate dallo stato sanitario rispetto alle virosi, i cui effetti negativi sono evidenziati in letteratura (Walter e Martelli, 1996; Guidoni *et al*., 1997; Borgo *et al*., 2003).

Le percentuali di risanamento ottenute sui vitigno ad uva da tavola presi in esame in questo lavoro per i virus GLRaV, GFLV e GVA sono comparabili con quelli in letteratura (Anaclerio *et al.*, 1999; Bottalico *et al*., 2003; Buciumeanu e Visoiu, 2000; Staudt e Kassemeyer, 1994). Solo la percentuale di piante risanate da GFkV è inferiore a quella generalmente riscontrata per questo virus (Bottalico *et al*., 2003; Buciumeanu e Visoiu, 2000), ma è in linea con i dati ottenuti nel caso di altre prove condotte presso il Centro di viticoltura di Conegliano (Borgo *et al*., 2004). Comunque, anche nel caso dei virus che hanno mostrato maggior difficoltà di eradicazione, quali GRSPaV e GFkV, i livelli di risanamento raggiunti si possono considerare molto buoni.

Lo stato sanitario del materiale che era stato scelto per il lavoro di risanamento appariva molto compromesso, vista la presenza di infezioni multiple nella maggioranza delle varietà. Ciononostante, la micropropagazione ha permesso di ridurre in maniera drastica il livello di infezione su ciascuna varietà, specialmente per quanto riguarda i virus ritenuti più dannosi e contemplati dalle normative europee e nazionali, quali i virus della degenerazione infettiva e dell'accartocciamento. Ciò dimostra che nel caso in cui vengano individuati varietà e biotipi molto interessanti dal punto di vista genetico, ma che presentino sintomi di virosi e che risultino contaminati da una o più entità virali, vale la pena di affidarsi ad interventi di risanamento attraverso la coltura *in vitro* di apici vegetativi. E' comunque da sottolineare che questa tecnica richiede tempi molto lunghi di lavoro e comporta oneri economici molto elevati, per cui é consigliabile solo qualora non ci siano altre possibilità di disporre di accessioni di buon livello sanitario per i vitigni di interesse.

Le applicazioni pratiche del ricorso alla coltura in vitro a scopo di risanamento virologico possono essere estese al ricupero e alla salvaguardia di vecchi vitigni, che oggi trovano rinnovato interesse colturale in considerazione delle crescenti esigenze della valorizzazione dei vitigni minori ed autoctoni. Per la tradizione viticola italiana e regionale, infatti, questi ultimi costituiscono un patrimonio viticolo ampio ed eterogeneo e sono sempre più richiesti dai vitivinicoltori al fine di diversificare e qualificare ulteriormente le produzioni enologiche del territorio di appartenenza.

LAVORI CITATI

Anaclerio F., Borgo M., Cosmi T., 1999. Prove di risanamento virale su biotipi di *Vitis vinifera. Vignevini*, 26 (4), 100-103.

Borgo M., Bonas U., Brescacin S., 1992. Micropropagazione in viticoltura. *L'Informatore Agrario*, 48 (12), 47-52.

Borgo M., Angelini E., Flamini R., 2003. Effetti del virus GLRaV-3 dell'accartocciamento fogliare sulle produzioni di tre vitigni. *L'Enologo*, 3, 99-110.

Borgo M., Angelini E., Gardiman M., D'Onofrio C., Scalabrelli G., 2004. Tecniche di risanamento nella selezione sanitaria della vite. *Atti VII Congresso SOI*, CD, 1-3.

Bottalico G., Campanale A., La Notte P., Pirolo C., Savino V., 2003. Sanitation of wine grape selections from Central and Southern Italy. *Atti XIV ICVG Meeting*, 256.

Buciumeanu E., Visoiu E., 2000. Elimination of grapevine viruses in *Vitis vinifera* L. cultivars. *Atti XIII ICVG Meeting*, 165-166.

Guidoni S., Mannini F., Ferrandino A., Argamante N., Di Stefano R., 1997. The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.*). American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 438-442.

MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81 (2), 222-226.

Minafra A., Hadidi A., 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 47, 175-188.

Martelli G.P., Boudon-Padieu E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and viruses-like diseases of the grapevine. Bibliographic report 1998-2004. *Options Méditerranéens*, ser. B, No 55.

Staudt G., Kassemeyer H.H., 1994. Elimination of leafroll associated virus type I in *Vitis vinifera* L. cv Lemberger. *Vitis*, 33, 179-180.

Walter B., Martelli G.P., 1996. Sélection clonale de la vigne: sélection sanitaire et sélection pomologique. Influence des viroses et qualité. 1ère partie: Effets des viroses sur la culture de la vigne et ses produits. *Bulletin de l'OIV*, 69, 945-971.