

RISULTATI PLURIENNALI DI PROVE DI TRASMISSIONE IN CAMPO CON VITI INDICATRICI INNESTATE SU VITI INFETTE TESTATE SIEROLOGICAMENTE PER I VIRUS ARMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFKV

U. MALOSSINI, P. BIANCHEDI, P. BRAGAGNA, V. GUALANDRI
 Centro Trasferimento Tecnologico Fondazione E. Mach, via E. Mach, 1
 38010 S. Michele all'Adige (TN)
 umberto.malossini@fmach.it

RIASSUNTO

Nell'ambito delle attività di selezione clonale sanitaria svolte presso Fondazione E. Mach, l'esperienza pluriennale condotta con metodi di saggio tradizionali *in vivo* per innesto legnoso conferma l'importanza che tali metodi hanno ancor oggi per valutare e comprendere l'effetto della presenza di alcuni tra i più importanti virus della vite normati a livello internazionale. Questo contributo si aggiunge a quanto già pubblicato con colleghi italiani referenti per la validazione di protocolli diagnostici, in particolare con tecniche sierologiche (ELISA) su matrici legnose. L'esperienza effettuata dal 2010 al 2016 ha verificato la possibile trasmissione *in vivo* (su un numero adeguato di repliche biologiche, di viti coltivate in campo) dei virus ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA e GfKv. Talee di 8 cloni da 6 varietà di *V. vinifera* L (risultate infette da 1 o più virus mediante test ELISA) sono state impiegate come fonti di inoculo per innesti con gemme di viti indicatrici (*V. rupestris* St. George e Kober 5BB) esenti dai suddetti virus. La coltivazione in campo ha permesso il controllo sierologico ripetuto nel tempo su tutte le viti e ha confermato la trasmissione per innesto di cinque dei virus considerati con l'unica eccezione del virus GLRaV-1, presente in tre differenti materiali originari anche in infezione mista con GVA.

Parole chiave: indexaggio, legno, malattie, test ELISA

SUMMARY

RESULTS OF FIELD TRANSMISSION ASSAYS WITH INDICATOR VINES GRAFTED ONTO INFECTED ELISA TESTED VINES FOR ARMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFKV

Within the programs carried out at the E. Mach Foundation, the experience conducted during many years with *in vivo* traditional assay methods for wood grafting confirms the importance that these methods still have today for evaluating and understanding the effect of the presence of some of main internationally regulated grapevine viruses. This contribution adds to what has already been published with Italian colleagues referring to the validation of diagnostic protocols, particularly with serological techniques (ELISA) on woody matrices. The experience carried out from 2010 to 2016 qualified the possible *in vivo* transmission (on an adequate number of biological replicates, grown in the field vines) of the ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA and GfKv viruses; cuttings of 8 clones from 6 varieties of *V. vinifera* L (infected and ELISA tested for 1 or more viruses) were used as *inoculum* sources for grafts with buds of indicator vines (*V. rupestris* St. George and Kober 5BB) free from the aforementioned viruses. Cultivation in the field allowed serological control repeated over time individually on all the vines and it confirmed the transmission by grafting of five of the viruses considered with the unique exception of the GLRaV-1 virus alone, present in three different original materials even in mixed infection with GVA.

Keywords: indexing, wood, diseases, screening, ELISA test

INTRODUZIONE

La selezione sanitaria dei materiali di moltiplicazione è l'attività internazionalmente riconosciuta per approfondire le conoscenze sugli organismi nocivi alla salute delle piante, così come per contenere le malattie ad essi associate. Con riferimento al gen. *Vitis*, oltre 70 endoparassiti obbligati quali virus, "virus-like" e fitoplasmi sono segnalati o associati a malattie, come risulta dall'ampia bibliografia aggiornata dai gruppi internazionali che se ne occupano stabilmente (Martelli, 2017). La variabilità genetica degli organismi patogeni segnalati e gli effetti indotti dai virus sulle caratteristiche fisiologiche e vegeto-produttive della vite sono così ampiamente studiati anche grazie ai riscontri sul comportamento di cloni infetti e risanati mediante varie tecniche (Bertamini et al., 2005; Ciccotti et al., 2000; Credi e Babini, 1997; Guidoni et al., 1997; Malossini et al., 2003; 2006; 2007; 2009).

Le esperienze qui descritte si aggiungono a quelle "ordinariamente" legate ai programmi di selezione clonale sanitaria della Fondazione E. Mach (Malossini et al., 1997; 2002; Vindimian et al., 1998), avviate a partire dal 1967 presso l'allora Stazione Sperimentale Agraria a San Michele all'Adige (Trento). In particolare, le prove sono state condotte *in vivo* su vite su più repliche biologiche mediante inoculo per innesto legnoso da materiali infetti (utilizzati quali talee) a materiali sani (gemme di viti indicatrici, conservate *in situ* in strutture protette). Le varie combinazioni coltivate in campo sono state controllate per più annate agrarie anche mediante analisi sierologiche (test ELISA) con l'obiettivo di verificare l'esito della trasmissione di sei agenti infettivi coperti da norme fitosanitarie, elencati qui di seguito e presenti in infezione singola oppure mista: arabis mosaic virus (ArMV), grapevine fanleaf virus (GFLV), grapevine leafroll associated virus 1 e grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-1 e GLRaV-3), grapevine virus A (GVA), grapevine fleck virus (GFkV).

MATERIALI E METODI

Materiali utilizzati per innesti legnosi e coltivazione dei saggi biologici in campo

I materiali di moltiplicazione legnosi utilizzati e riferiti al programma pluriennale di selezione clonale sanitaria della vite condotto presso la Fondazione Edmund Mach (FEM), qui opportunamente siglati per illustrare la prova di trasmissione, sono dettagliati in tabella 1.

Tabella 1. Piano sperimentale della prova di trasmissione per innesto legnoso da cloni a indicatori (Kober 5BB e *V. rupestris* St. George)

Virus confermati su clone originario	Varietà _sigla- clone utilizzato come talea	Combinazione Kober 5BB (N° viti in campo)	Combinazione <i>V. rupestris</i> St. G. (N° viti in campo)
ArMV	Muller Thurgau _MT	Kob/MT (4)	Nessuna
GFLV	Traminer _Tr	Kob/Tr (3)	Rup/Tr (3)
GFLV	Goldtraminer _GT-1	Kob/GT-1 (4)	Rup/GT (3)
GFkV	Teroldego _Te	Kob/Te (4)	Nessuna
GLRaV-1	Pinot nero _Pn	Kob/ Pn (5)	Nessuna
GLRaV-1	Marzemino _Mz-1	Kob/Mz-1 (6)	Rup/Mz-1 (3)
GLRaV-1 e GVA	Marzemino _Mz-2	Kob/Mz-2 (7)	Rup/Mz-2 (6)
GLRaV-3	Goldtraminer _GT-2	Kob/GT-2 (4)	Nessuna

In dettaglio si sono utilizzati materiali legnosi (talee) di alcuni potenziali cloni selezionati nel corso del tempo da varietà diverse, quali Müller-Thurgau, Traminer aromatico, Pinot nero, Teroldego, Marzemino e Goldtraminer. Quest'ultimo, Incrocio Rigotti n° 84-11 ottenuto nel 1948 a S.Michele all'Adige (TN), è stato così nominato ed iscritto al Registro nazionale nel 2002 dopo averne recuperato le poche piante originali, selezionate a partire dal 1997 e con materiali risultati per lo più infetti da uno o più virus. Per verificare la possibile trasmissione per innesto sono stati impiegati i materiali legnosi (gemme) di due indicatori (*Vitis rupestris* St.George. e Kober 5BB) verificati esenti da tutti i virus indicati. Gran parte dei materiali infetti sono stati precedentemente condivisi in un progetto nazionale (2009-2011), coordinato da CRA-PAV (ora CREA-DC) per l'allora Ministero (MiPAAF), finalizzato alla armonizzazione di procedure diagnostiche e validazione di test diagnostici, utilizzando metodi sierologici e biomolecolari proposti specificamente su materiali legnosi di vite (progetto definito ARON-ARNADIA Virus vite). Gli autori risultano referenti per l'ente FEM, quale Laboratorio di riferimento per l'amministrazione provinciale (Faggioli et al., 2013).

Sui materiali vivaistici adeguatamente predisposti, nel corso della primavera 2010 sono stati effettuati gli innesti talea presso il Centro Sperimentale di Laimburg (BZ). Gemme dei due indicatori (esenti dai virus considerati e coltivati *in situ* c/o FEM) sono state innestate secondo il piano sperimentale riportato in tabella 1 che ha previsto 8 innesti/combinazione su talee legnose, lavorate a 2-3 gemme (25-30 cm), provenienti da viti caratterizzate da infezioni singole o miste per uno o più dei 6 virus citati. In caso di limitata disponibilità di talee innestabili dai cloni infetti è stato previsto l'innesto su almeno una delle due indicatrici, privilegiando Kober 5BB. Dopo la forzatura in vivaio/serra, le diverse combinazioni – con una numerosità compresa fra 3 e 7 repliche – sono state coltivate in campo come viti in cartonaggio messe a dimora a distanze di circa 40 cm sulla fila e 2 metri tra le file. La coltivazione a filare con tralci rinnovati ha compreso i trattamenti antiparassitari previsti dai protocolli per la difesa integrata da funghi e insetti vettori, con particolare riguardo alle prescrizioni imposte alle ditte vivaistiche e/o ai centri di saggio per i trattamenti insetticidi. Nell'appezzamento dedicato all'indexaggio appositamente realizzato c/o FEM a San Michele all'Adige è stato inoltre confermata l'assenza di nematodi potenziali vettori, quali quelli appartenenti al gen. *Xiphinema* (*X. index* e/o *X. diversicaudatum*), dai campioni di terreno saggiati nel 2009 e 2010 presso il laboratorio dell'ente. La coltivazione è iniziata a partire dal 2010 e così i rilievi e/o prelievi di materiali da sottoporre a test per tutto il periodo 2010 – 2016.

Test sierologici su legno e metodi di estrazione dei virus dai campioni da analizzare

La matrice impiegata per la determinazione della presenza dei sei virus della vite è il tessuto floematico ottenuto da materiale legnoso raccolto nel periodo invernale da tralci lignificati dell'anno; ogni campione è costituito da due porzioni prelevate dalla parte basale dei tralci. L'utilizzo di una fresa (tipo GRANEX) per macinare/polverizzare il campione corrisponde alla fase 2 del prelievo del floema, che viene così estratto congiuntamente agli altri tessuti del tralcio legnoso, raccogliendo il materiale campionato in contenitori di plastica. I riferimenti per tutti i protocolli citati sono stati pubblicati per il progetto finalizzato ARON-ARNADIA Virus Vite; le successive fasi previste dai protocolli di diagnosi per i singoli test hanno previsto l'impiego, per tutte le annate, di antisieri (Kit sierologici) commercializzati dalla ditta Agritest (Bari).

Tutte le viti presenti in tutte le combinazioni di innesto sono state analizzate eseguendo i test ELISA per gli anni 2011, 2012, 2013, 2015 e 2016 su materiale legnoso (52 campioni totali) per tutti i sei virus singolarmente, come specificato in bibliografia (Faggioli et al, 2013).

RISULTATI, DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Per semplificare l'esposizione, i risultati ottenuti dalle analisi sierologiche per singolo anno su tutte le viti presenti sono suddivisi in due tabelle. Rispettando la classificazione tassonomica riportata in Faggioli et al., 2013, la tabella 2 si riferisce alle prove dei generi *Nepovirus* (ArMV e GFLV) e *Maculavirus* (GFkV), mentre le prove sui generi *Ampelovirus* (GLRaV-1,-3) e *Vitivirus* (GVA) sono riportati in tabella 3.

Tabella 2. Risultati dei test ELISA effettuati su campioni legnosi da singole viti delle combinazioni d'innesto descritte in tabella 1. Sono indicati i numeri dei campioni infetti (+) sul totale analizzato per ogni anno per le prove di trasmissione di ArMV, GFLV e GFkV

Virus	Combinazione /(N°viti) 2010	Test 2011 (n+/Ntot)	Test 2012 (n+/Ntot)	Test 2013 (n+/Ntot)	Test 2015 (n+/Ntot)	Test 2016 (n+/Ntot)
ArMv	Kob/MT (4)	4+/4tot	4+/4tot	3+/3tot	3+/3tot	3+/3tot
GFLV	Kob/Tr (3)	1+/2tot	2+/2tot	2+/2tot	2+/2tot	2+/2tot
GFLV	Rup/Tr (3)	3+/3tot	3+/3tot	2+/2tot	2+/2tot	2+/2tot
GFLV	Kob/GT-1 (4)	2+/4tot	0/3tot	Manca	Manca	Manca
GFLV	Rup/GT-1(3)	2+/3tot	0/3tot	Manca	Manca	Manca
GFkV	Kob/Te (4)	3+/3tot	3+/3tot	3+/3tot	3+/3tot	0+/3tot

Legenda: l'indicazione "Manca" significa assenza delle viti nelle combinazioni, causa morte delle stesse; le numerosità inferiori (/Ntot) indicate in colonna seguenti all'anno 2010 si riferiscono alla stessa causa.

Tabella 3. Risultati dei test ELISA effettuati su campioni legnosi da singole viti delle combinazioni d'innesto descritte in tabella 1. Sono indicati i numeri dei campioni infetti (+) sul totale analizzato per ogni anno per le prove di trasmissione di GLRaV-1, GLRaV-3 e GVA

Virus	Combinazione /(N°viti) 2010	Test 2011 (n+/Ntot)	Test 2012 (n+/Ntot)	Test 2013 (n+/Ntot)	Test 2015 (n+/Ntot)	Test 2016 (n+/Ntot)
GLRaV-1	Kob/Pn (5)	0/4tot	0+/4tot	0+/3tot	0+/3tot	0+/3tot
GLRaV-1	Kob/Mz-1 (6)	0/5tot	0+/10tot	0+/5tot	0+/5tot	0+/5tot
GLRaV-1	Rup/Mz-1 (3)	0/3tot	0+/6tot	0+/1tot	0+/1tot	0+/1tot
GLRaV-1 + GVA	Kob/Mz-2 (7)	0/14tot 0/14tot	0/7tot 5+/7tot	0/6tot 2+/6tot	0/6tot 2+/6tot	0/6tot 2+/6tot
GLRaV-1 + GVA	Rup/Mz-2 (6)	0/8tot 3+/8tot	0/5tot 5+/5tot	0/4tot 4+/4tot	0/4tot 4+/4tot	0/4tot 3+/4tot
GLRaV-3	Kob/GT-2 (4)	4+/4tot	4+/4tot	4+/4tot	4+/4tot	4+/4tot

Legenda: le numerosità inferiori (/Ntot) indicate in colonna seguenti all'anno 2010 significano diminuzione causa morte delle stesse viti. Le numerosità superiori (/Ntot) significano invece ripetizione dei test sui virus per le stesse viti e lo stesso anno.

In conclusione i risultati inediti qui riportati evidenziano che i virus ArMV, GFLV, GLRaV-3, GVA e GFkV, potenzialmente trasmessi da talee infette di diversi cloni da varietà di vite europea, si ritrovano effettivamente nei materiali legnosi della marza impiegata come indicatrice (sia *V. rupestris* St. G. sia l'ibrido K5BB) in % diverse, a partire dal primo anno successivo all'innesto-inocolo.

GLRaV-1, invece, non viene rilevato nelle stesse condizioni pur considerando la presenza del virus nei materiali originali in infezione mista con GVA oppure in infezione singola.

La prova pluriennale ha previsto la particolarità tecnica di utilizzare le frese per il metodo estrattivo del floema, in conformità a quanto validato e consolidato presso il nostro laboratorio. In conclusione, alcune delle combinazioni qui presentate sono coltivate ancora oggi nel campo dedicato ai saggi biologici a fianco di altri indexing, eseguiti nei periodi 2010-2012 e successivamente fino al 2015, con le finalità di supporto ai programmi di selezione clonale sanitaria da varietà autoctone o per conto terzi o per altre malattie associate a virus.

Ringraziamenti

Si ringrazia il personale e i responsabili tecnici dell'azienda agricola FEM, e in particolare, i colleghi R. Moscon e M. Ferrazza, per l'attività di coltivazione, difesa fitosanitaria e raccolta/lavorazione dei campioni legnosi utilizzati; il collega J. Terleth del Centro sperimentale di Laimburg (BZ) per il supporto tecnico operativo della fase vivaistica; non ultimo il collega R. Credi per la corresponsabilità tecnico-scientifica nelle attività su convenzioni annuali specialistiche e/o altre collaborazioni legate al programma di selezione clonale sanitaria dell'ente (varie attività annuali, dal 2004 al 2010 e dal 2011 al 2016).

LAVORI CITATI

- Bertamini M., Malossini U., Muthuchelian K., Nedunchezian N., 2005. Physiological response of field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Marzemino) to grapevine leafroll-associated virus (GLRaV-1). *Phytopathologia Mediterranea*, 44, 3, 256-265.
- Ciccotti A.M., Vindimian M.E., Roncador I., Malossini U., 2000. Tecniche di risanamento per un materiale viticolo di qualità. *Terra Trentina*, 46, 3, 28-31.
- Credi R., Babini A.R., 1997. Effects of virus and viruslike infections on growth, yield, and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. *American Journal of Enological Viticulture*, 48, 7-12.
- Faggioli F., Anaclerio F., Angelini E., Antonelli M.G., Bertazzon E., Bianchi G., Bianchedi P., Bianco P.A., Botti S., Bragagna P., Cardoni M., Casati P., Credi R., De Luca E., Durante G., Gianinazzi C., Gambino G., Gualandri V., Luison D., Luvisi A., Malossini U., Mannini F., Saldarelli P., Terlizzi F., Triolo E., Trisciuzzi N., Barba M., 2013. Protocollo diagnostico per i virus della vite coperti da norme fitosanitarie: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, ArMV, GFLV, GFkV. *Petria*, 23, 3, 567-616.
- 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 phenolic content of Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enological Viticulture*, 48, 438-442.
- Malossini U., Mattivi F., Monetti A., Nicolini G., Roncador I., Vindimian M.E., 1997. Pinot nero: caratterizzazione comparativa dei biotipi selezionati all'Istituto Agrario di S.Michele all'Adige (TN). *Riv. Vit. Enol.*, 4, 11-27.

- Malossini U., Nicolini G., Versini G., Roncador I., Vindimian M.E., Carlin S., 2002. Aggiornamenti e nuove omologazioni di Traminer aromatico. *L'Informatore Agrario*, 17, 51-55.
- Malossini U., Roncador I., Ciccotti A.M., Bertamini M., Nedunchezian N., 2003. Grapevine viruses (GLRAV-1+GVA) inhibits pigments, RuBPC and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L.cv. Marzemino) leaves. In: 14th Meeting of the International council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine: extended abstracts, Locorotondo (Ba), Italy, September 12-17, 2003: 254-255.
- Malossini U., Zulini L., Moser S., Versini G., Carlin S., Nicolini G., Bianchedi P., Dalla Serra A., 2006. Agronomical and enological performances of heat-treated vs. GFLV-infected Gewürztraminer clones in Trentino (N-East Italy). In: 15th Meeting of the international council for the study of virus and virus-like diseases of the grapevine (ICVG). Stellenbosch: South African society for enology and viticulture: 226-227. ISBN: 1-86849-318-0.
- Malossini U., Zulini L., Nicolini G., Vecchione A., Decarli E., Bianchedi P., Moscon R., 2009. Effects of GLRaV-1 elimination on physiological, agronomic and oenological characteristics of two cv. Marzemino clones. In: Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France, 31 Aug-4 Sept 2009: 256-257. Ed. E. Boudon-Padieu, Publ. Le Progrès Agricole et Viticole. ISSN 0369-8173.
- Malossini U., Zulini L., Rubinigg M., Mattivi F., Nicolini G., Bragagna P., Ciccotti A.M., 2007. Primi riscontri sugli effetti del risanamento da accartocciamento fogliare e legno riccio (GLRaV-1 e GVA) della vite su un clone di Marzemino. *Italus Hortus*, 14, 3, 208-211.
- Martelli G.P., 2017. An overview of grapevine viruses, viroids and the diseases they cause. In: Meng B., Martelli G.P., Golino D.A., Fuchs M. (eds), *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*: 31-46. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland
- Vindimian M.E., Ciccotti A.M., Malossini U., Roncador I., 1998. Risultati preliminari di un metodo di saggio biologico in serra con l'utilizzo di materiale micropropagato di vite. *Vignevisini*, 4, 73-75.