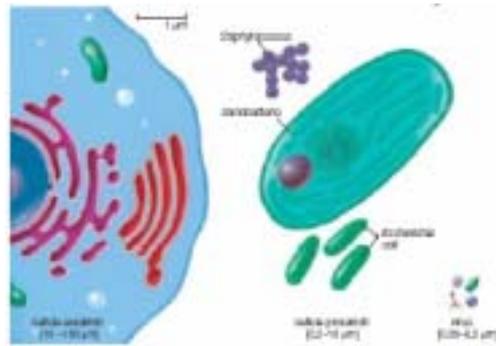


VIROSI DELLA VITE

Antonio Carapelli
Dip. Biologia Evolutiva
Università di Siena
carapelli@unisi.it
0577/234417

Principali agenti virali che inducono malattie nella vite

- 1) Accartocciamento fogliare (GLRaV,1-8=grapevine leafroll associated virus)**
- 2) Butteratura del Legno o complesso del legno riccio (GRSPaV= Grapevine Rupestris Stem Pitting Associated Virus)**
 - 2a) Butteratura del legno (Rupestris stem pitting)
 - 2b) Suberosi corticale (Corky bark)
 - 2c) Scanalatura del legno da Kober 5BB (Kober stem grooving)
 - 2d) Scanalatura del legno da LN 33 (LN 33 stem grooving)
- 3) Arricciamento fogliare (GFLV=Grapevine fanleaf virus)**
- 4) Virus della maculatura infettiva (GFLV=Grapevine fleck virus)**
- 5) Arabis Mosaic Virus (ArMV)**
- 6) Enazioni**



- Un **virus** rappresenta una entità submicroscopica, strettamente unicellulare, potenzialmente patogena e costituita da un solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA) e da un complesso di proteine (questi due componenti assieme vengono detti virioni)

Generalità sui virus

- Lo studio dei virus e degli agenti di malattie similvirali costituiscono assieme alle malattie che questi patogeni provocano l'oggetto della **virologia vegetale**
- Per ragioni storiche, prima che venissero inseriti in una categoria separata, anche i fitoplasmi facevano parte delle malattie virali
- I virus non posseggono metabolismo autonomo, in quanto, la replica del materiale genetico e la sintesi di proteine virali avviene sfruttando gli apparati di replica e di sintesi dell'organismo ospite

Generalità sui fitovirus proprietà comuni

- ☞ I **fitovirus** possono moltiplicarsi solamente all'interno di cellule viventi
- ☞ Generalmente si moltiplicano solamente all'interno delle cellule vegetali
- ☞ In alcuni casi possono replicarsi anche in specifici vettori (afidi e nematodi)
- ☞ Alcuni virus colpiscono una sola specie vegetale, mentre altre si adattano ad altri ospiti vegetali, nei quali si possono riconoscere fasi virali attive e latenti

fitovirus

- Un **viroide** è una piccola molecola di RNA circolare a singola elica (circa 300 nucleotidi) patogena solo dei vegetali
- Virus e viroidi sono insensibili ai comuni antibiotici
- I viroidi si distinguono dai virus perché sono molto più piccoli e perché il loro genoma non codifica per nessuna proteina di rivestimento, nemmeno per una polimerasi specifica per la loro replica
- Gli agenti di **malattie similvirali** non meglio identificati sono patogeni intracellulari di forma e costituzione ignote
 - Trasmissibili per innesto
 - Prediligono alcune specie dette cvs o indicatrici
 - Talvolta si conosce il vettore

I viroidi sono i più piccoli agenti infettivi delle piante (ssRNA di 300 nucleotidi)

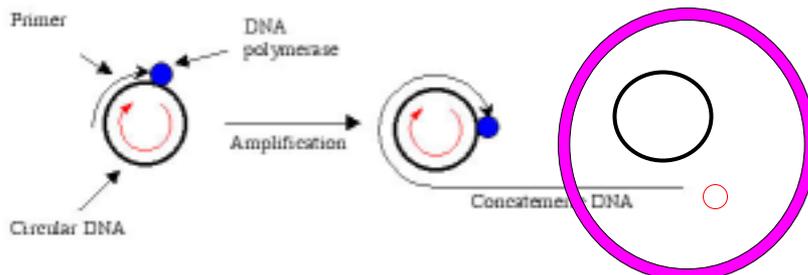
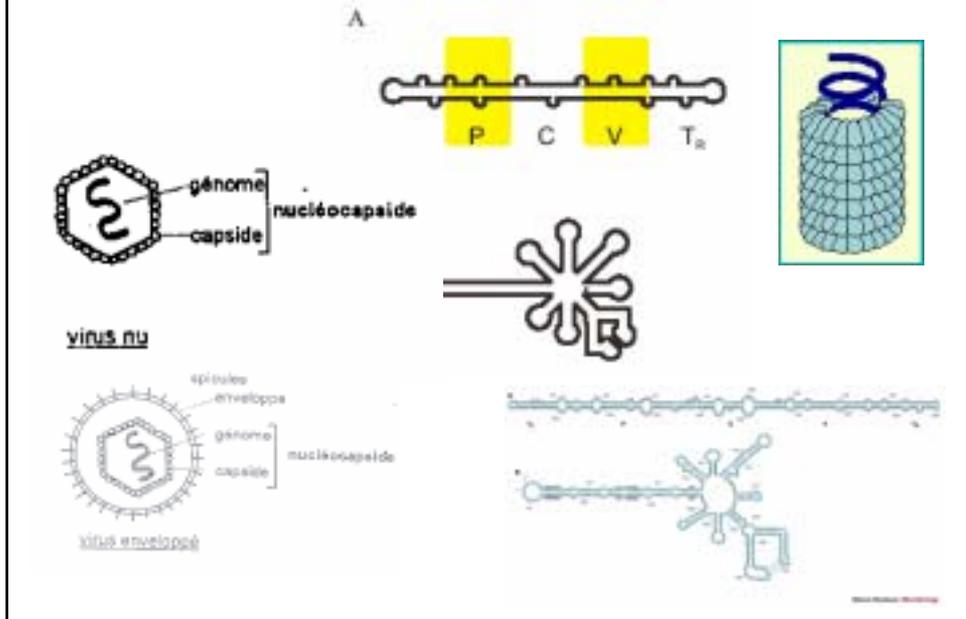


Figure showing the principle of linear rolling circle amplification.

[The DNA primer hybridises with the circular DNA template and is copied many times using DNA polymerase. This results in a single stranded concatemeric product].

- Alcuni virus a ssRNA possono avere un piccolo segmento di RNA aggiuntivo, detto **RNA satellite**, che si replica con quest'ultimo o secondo una modalità di rolling circle
- Gli RNA satelliti sono incapsidati nel virus ausiliario (helper) e ne sfruttano la polimerasi per la replica

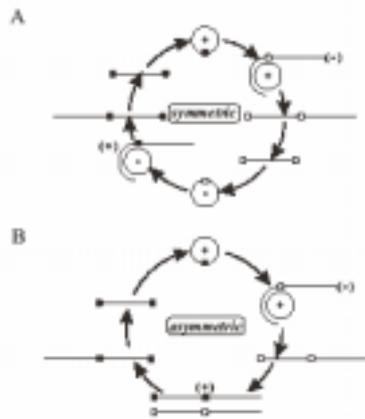


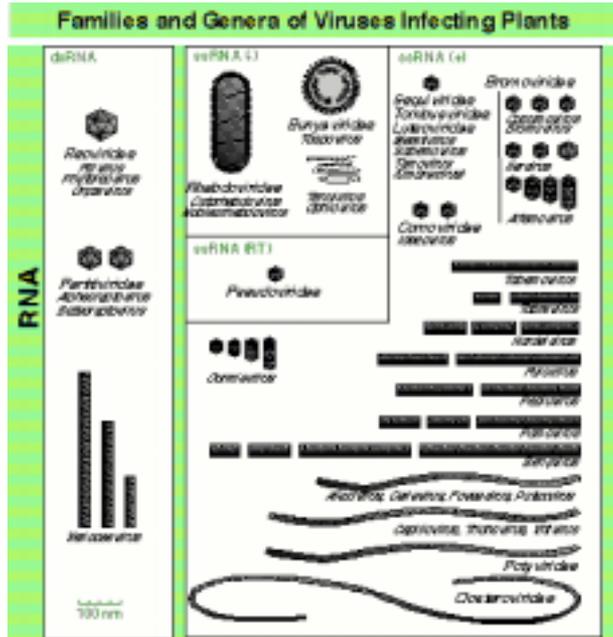
Figure 3: Rolling circle replication of circular pathogenic RNAs.

The screenshot shows the ICTVdB Index of Viruses website. The browser window title is "Virus databases online - ICTVdB Index of Viruses". The address bar shows "http://www.ictvdb.org/ICTVdb/ictvdb/ICTVIndex.htm". The page content includes:

- ICTVdB: The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses
- ICTVdB Index of Viruses
- Detail of virus taxonomy and nomenclature approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses
- Copyright © 2002 International Committee on Taxonomy of Viruses. All rights reserved.
- Contact: [Contact ICTVdB Contact](#) Web Page last updated: 11 August 2002

The RNA Viruses
The dsRNA Viruses

DsRNA				
Family	Subfamily	Genus	Type Species	Host
Cytorviridae	Cytorvirinae		<i>Pendemonax phage 14</i>	Bacteria
Reoviridae				
	Orthoreovirus		Reovirus 1	Vertebrates
	Orbivirus		Bluetongue virus 1	Vertebrates
	Rotavirus		Simian rotavirus SA11	Vertebrates
	Colicivirus		Colorado tick fever virus	Vertebrates
	Spinovirus		Golden shiner virus	Vertebrates
	Cypovirus		Bushy stem cypovirus 1	Insectivores
	Ephraim		Ephraim virus	Plants
	Polyovirus		Mound thistle virus	Plants
	Degenerovirus		Blue sugarcane stunt virus	Plants
Besnoitviridae				
	Apodemusvirus		Infectious pancreatic necrosis virus	Vertebrates
	Archevirus		Infectious larval disease virus	Vertebrates
	Entomobesnoitvirus		Drosophila X virus	Insectivores
Tetrahoviridae				
	Tetrahovirus		Scythianmyxozoon coccidiosis virus 1-4	Fungi
	Glandulovirus		Glandula facialis virus	Fish
	Lentivirulavirus		Lentivirus RNA virus 1-4	Fish
Partitiviridae				
	Partitivirus		Germanmyxozoon granulosis virus B29-A	Fungi
	Clasovirus		Parasitum clasovirus virus	Fungi
	Alphapartivirus		White clover cryptic virus 1	Plants
	Betapartivirus		White clover cryptic virus 2	Plants
Hypoviridae				
	Hypovirus		Cryphonectria hypovirus 1-EPV13	Fungi
	Yersinivirus		Lettau hypovirus virus	Plants



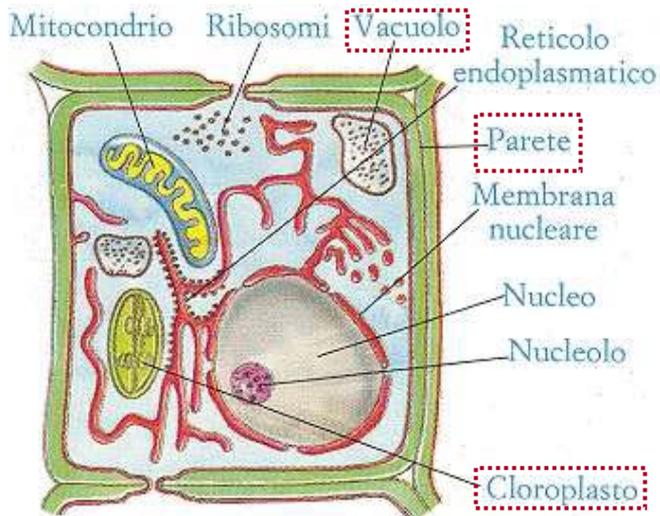
- Gli RNA satelliti interferiscono sull'attività patogena di un determinato virus aumentando o diminuendo la sua virulenza (in genere competono con la sua replicazione)
- I satelliti non possono replicarsi senza virus ausiliario
- Il **capside virale** è un composto proteico la cui funzione principale è quella di proteggere il genoma del virus dagli enzimi litici (nucleasi)



- Alcune specie virali sono costituite da particelle uguali (**monocompetenti**) ognuna organizzata con un proprio genoma (identico) provviste di un rivestimento autonomo e singolarmente capaci di provocare l'infezione
- Altre (**multicompetenti**) sono organizzate in genomi diversi, ognuno contenuto in una particella di rivestimento autonoma, ma che svolgono l'azione patogena solamente quando contemporaneamente sono capaci di infettare una cellula ospite
- In altre specie il genoma virale è suddiviso ma contenuto nel medesimo capside di rivestimento (**monocompetenti a genoma diviso**)

- L'acido nucleico è la parte più caratteristica di un virus. In media il suo peso molecolare varia da 1 a 3 milioni di Da
- I diversi virus possono esistere a singola (ssDNA o ssRNA) oppure a doppia (dsDNA o dsRNA) elica
- Il ssRNA virale è quasi sempre positivo (ssRNA+) cioè può funzionare da messaggero

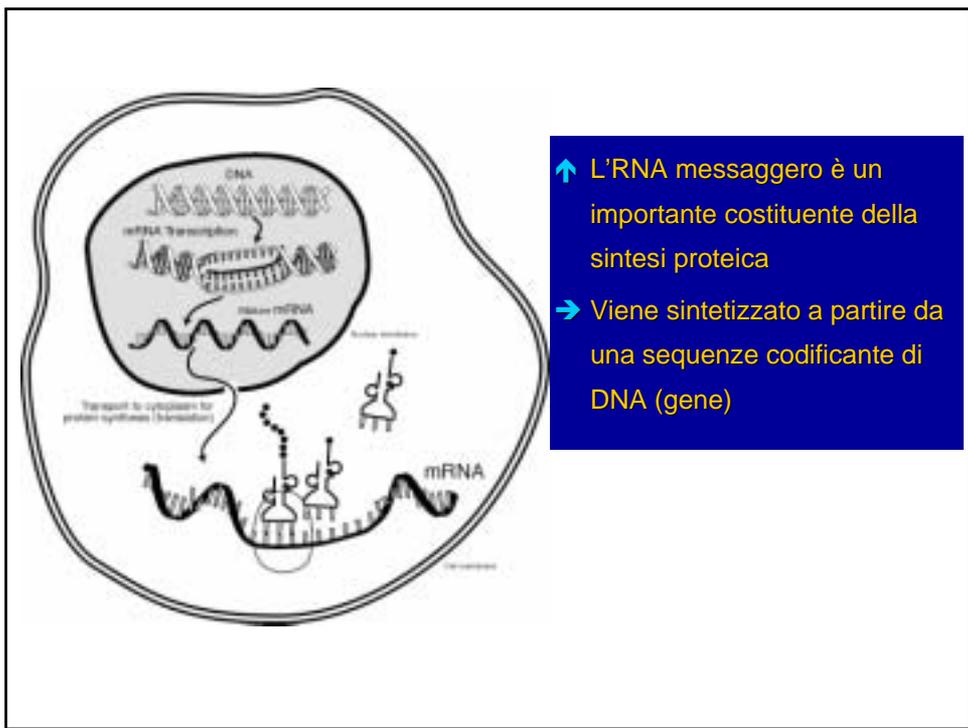
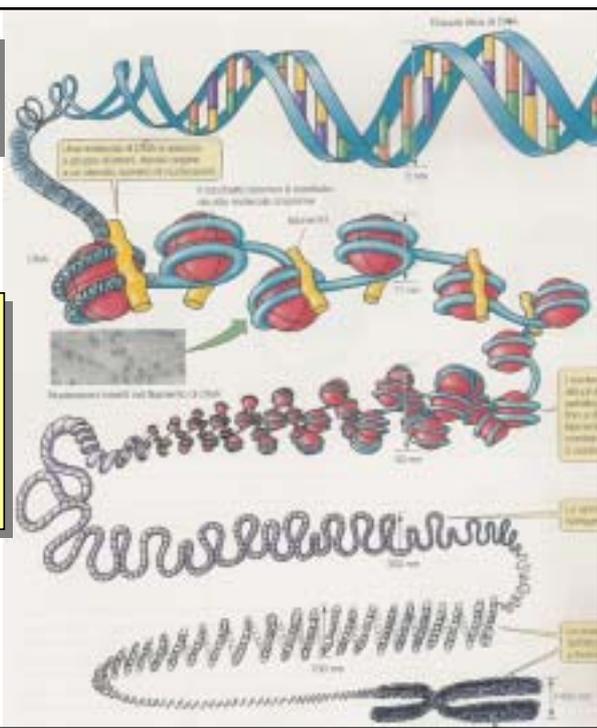
Cellula Vegetale



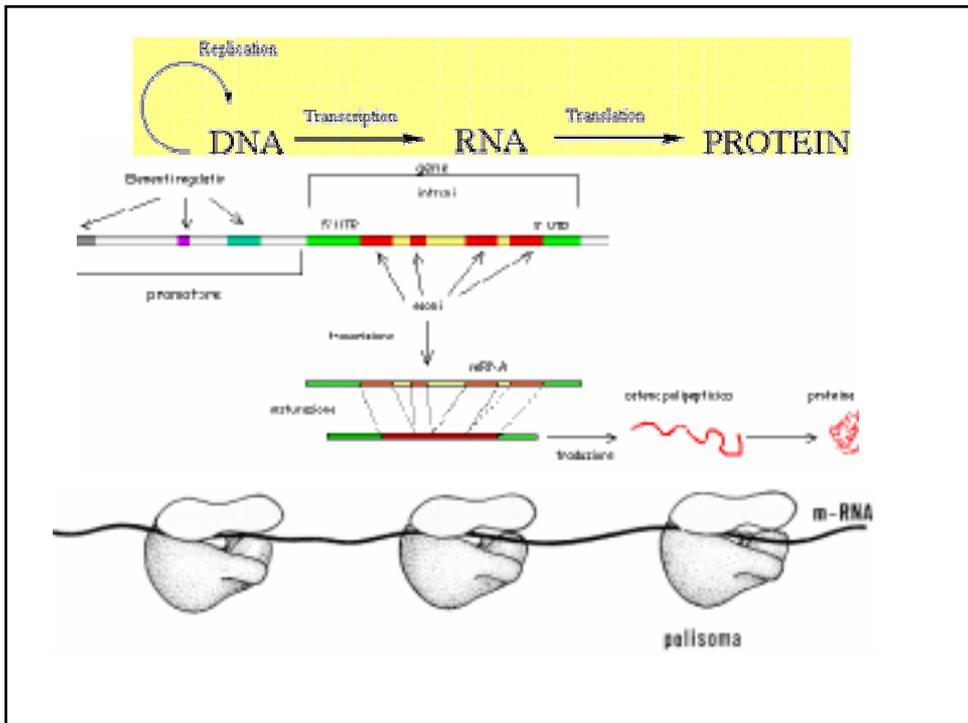
cellula vegetale eucariota

Prima della mitosi la cromatina si condensa a formare i cromosomi

Poiché a questo stadio il DNA si è già duplicato ogni cromosoma contiene due molecole di DNA identiche, i **Cromatidi** che rimangono uniti a livello del **centromero**



- ↑ L'RNA messaggero è un importante costituente della sintesi proteica
- Viene sintetizzato a partire da una sequenze codificante di DNA (gene)



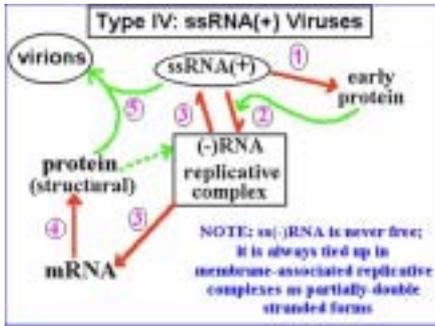
Ribosomi

Labels in the illustration: **rRNA**, **Subunità maggiore**, **Regione di sintesi dei peptidi**, **Subunità minore**, **Sito di cui emerge il polipeptido nascenti**.

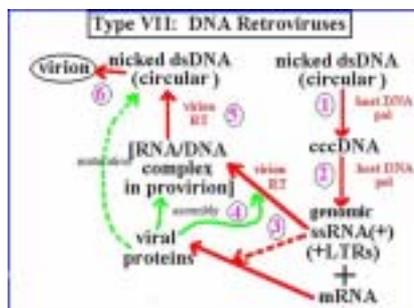
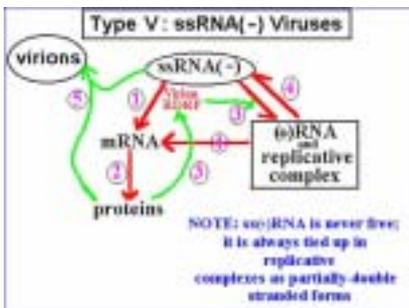
Particelle ribonucleoproteiche: rRNA+proteine
Sintesi proteica: traduzione

The diagram details the composition of the ribosome subunits:

- Proteine:** L1, L2, L3 (Numero totale: 31) and S1, S2, S3 (Numero totale: 21)
- rRNA:** 23S (2900 basi), 16S (1540 basi), and 5S (120 basi)
- Subunità:** 50S and 30S
- Ribosoma assemblato:** 70S

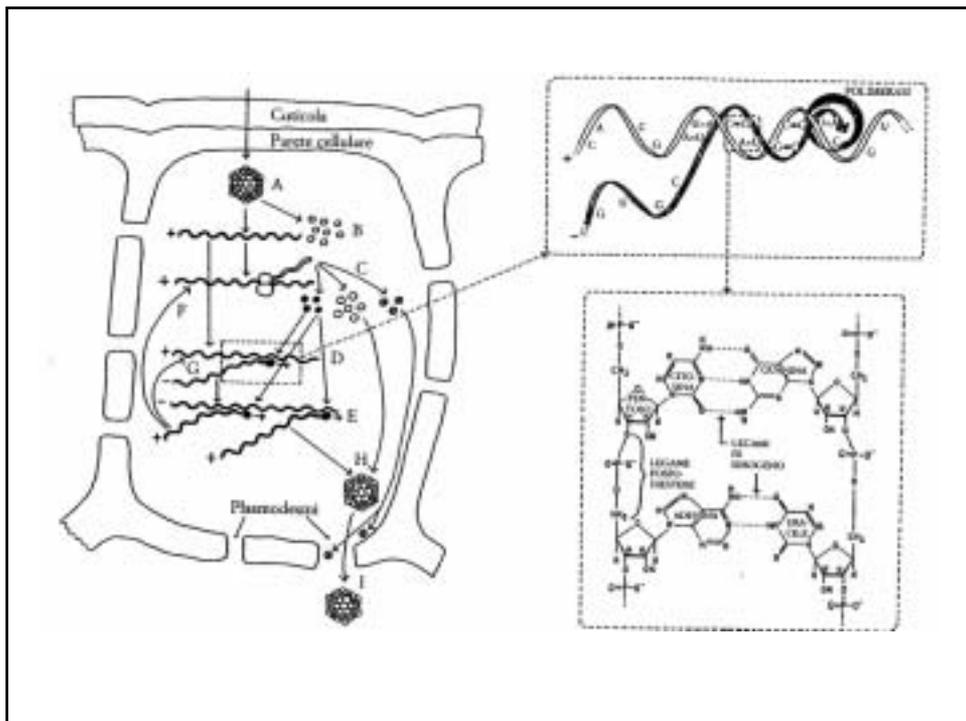


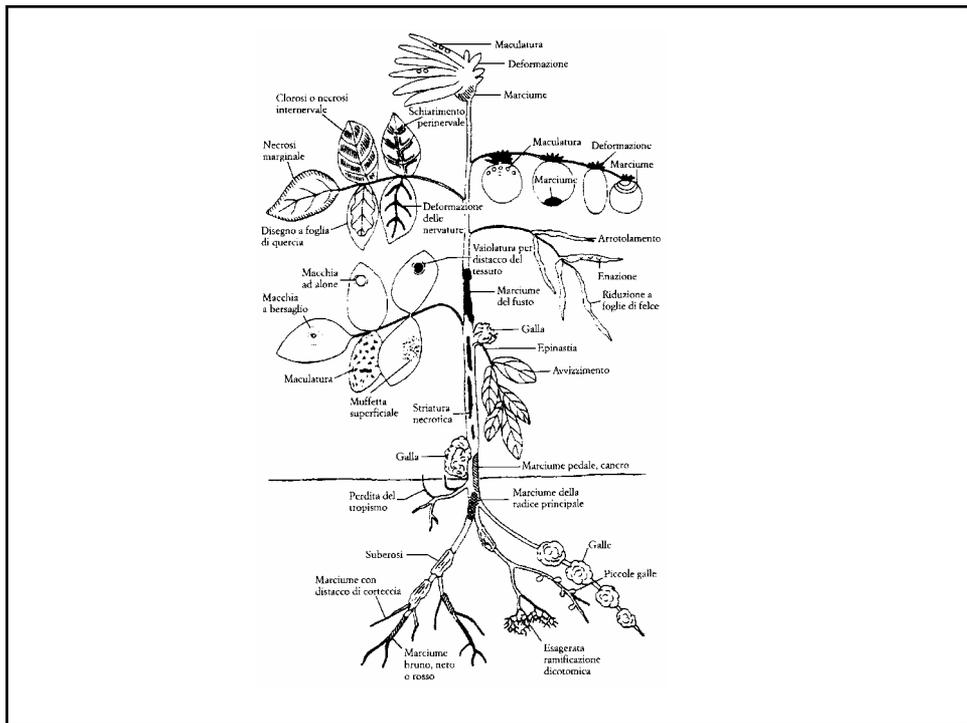
- L'acido nucleico del virus a ssRNA+, liberato del capsid proteico, è in grado di funzionare da messaggero, cioè di collegarsi con i ribosomi e di dare inizio alla codificazione delle proteine di sua competenza
- Capside
- Polimerasi RNA polimerasi RNA dipendente



Trasporto dei virus nella pianta

- ▶ Nel caso del TMV e di altri virus che si muovono come acido nucleico e non come virione maturo, proteine virali non strutturali (proteine di movimento, MP) fungono da chaperon molecolari per gli acidi nucleici del virus, legandosi ad essi e formando così lunghi complessi nucleoproteici di trasporto.
- ▶ Le MP agiscono inoltre sulle componenti strutturali dei plasmodesmi aumentandone il limite di esclusione molecolare e consentendo il passaggio degli acidi nucleici virali linearizzati attraverso il canale plasmodesmico, senza alterarne profondamente e permanentemente la struttura.
- ▶ I virus che vengono trasferiti come particelle mature codificano proteine di movimento che vanno invece a costituire formazioni tubulari attraverso i plasmodesmi, devastandone la struttura, e permettendo il movimento delle particelle virali nel proprio interno.





Trasmissione indiretta

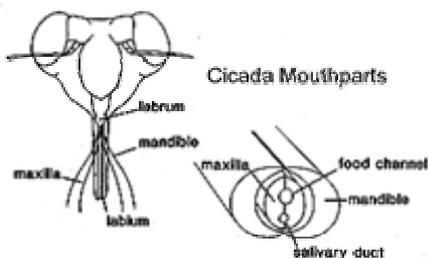
- Quella per insetti è la più importante
- Gli animali vettori sono insetti, acari e nematodi
- Il vettore si nutre su una pianta virosata, acquisisce il virus e, nutrendosi successivamente su una pianta sana la infetta
- Gli insetti vettori, ad eccezione dei coleotteri, hanno tutti apparato boccale pungente-succhiatore

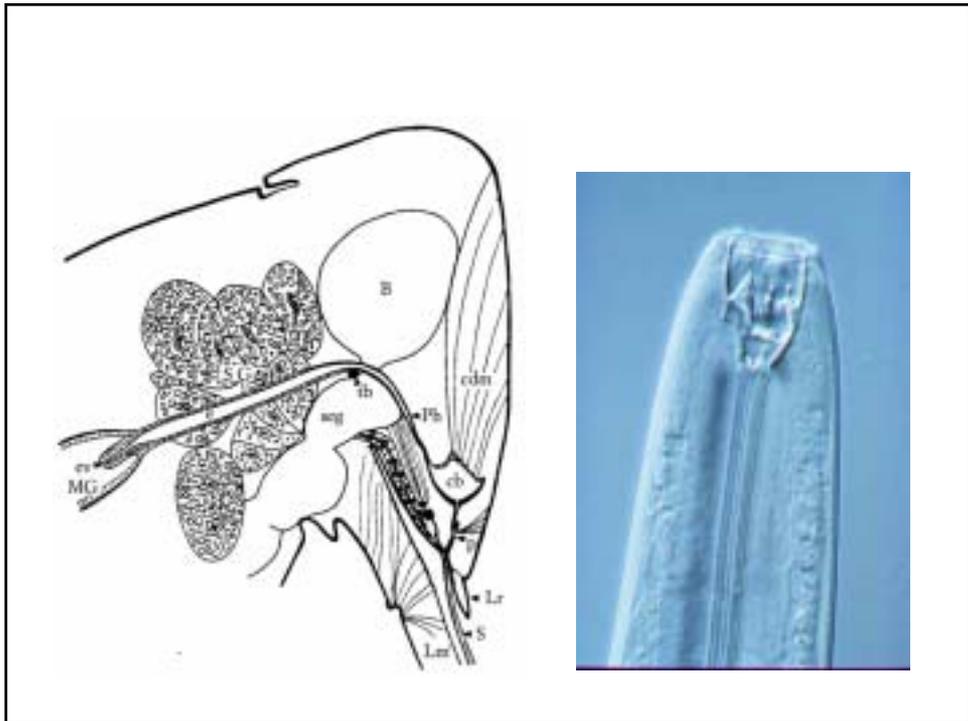


- **Emitteri o Rincoti**, quest'ordine racchiude insetti prevalentemente terrestri anche se vi sono specie acquatiche, sono di dimensioni generalmente piccole o medie tranne qualche eccezione riscontrabile nei paesi caldi o tropicali. Il nome deriva dal fatto che alcuni di loro hanno il primo paio di ali chitinizzate per metà dette emielitre, altri hanno quattro ali completamente membranose. Posseggono apparato boccale pungente e succhiatore, con produzione di molta saliva, sono emimetaboli con metamorfosi incompleta. Quest'ordine comprende molte specie dannose sia fitofaghe che zoofaghe. Le forme fitofaghe si rendono dannose alle piante per sottrazione di linfa e per alterazione dei tessuti sotto l'azione della saliva emessa, **nonché per la diffusione di malattie per la presenza ed il trasporto di vari agenti patogeni sempre nella saliva**. L'ordine degli Emitteri o Rincoti è diviso in due sottordini che alcuni sistematici li considerano addirittura due ordini distinti gli Eterotteri e Omotteri.

Modelli di trasmissione

- Il processo di trasmissione associato all'alimentazione
- si compone di diverse fasi: periodo di acquisizione, periodo di latenza, periodo di inoculazione, periodo di digiuno
 - ✓ Non-persistente
 - ✓ Persistente
 - ✓ Semi-persistente
 - ✓ dipendente
- Il virus aderisce al canale alimentare dello stiletto durante la suzione e se ne stacca durante i rigurgiti





Trasmissione non persistente

- Acquisizione ed inoculazione avvengono in pochi secondi e non vi è latenza. La ritenzione di infettività (periodo in cui un vettore conserva la capacità di trasmettere un virus dopo una acquisizione) è di una o poche ore. Un periodo di digiuno post- e pre-acquisizione allunga il tempo di trasmissione di fino ad un giorno
- Viene favorita da rapidi passaggi (periodo di acquisizione) a scapito di una lunga suzione che sembra essere dannosa per il virus

Trasmissione persistente

- ✎ Acquisizione e inoculazione sono generalmente molto lunghe, l'infettività aumenta con l'aumentare di questi periodi
- ✎ Esiste sempre un periodo di latenza
- ✎ La ritenzione dell'infettività può variare da diversi giorni ad alcuni mesi
- ✎ Il digiuno non ha alcun effetto

Può essere distinta in:

- ✎ **Circolativa** il virus penetra nel corpo dell'insetto fino alle ghiandole salivari
- ✎ **Propagativa** il virus si moltiplica nel corpo dell'insetto che diventerà così infettivo ed infetto

Trasmissione semi-persistente

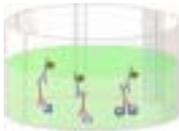
- Ha caratteristiche intermedie tra le due precedenti:
- Non c'è latenza né presenza del virus nell'emocele o nel sistema salivare (come nella non-persistente)
- Il digiuno non ha effetto sull'infettività e prolungando la durata di acquisizione aumenta anche la ritenzione di infettività
- I virus si accumulano extracellularmente nella parte anteriore del canale alimentare, senza replicarsi



Identificazione dei virus
test ELISA = Enzyme Linked
Immunosorbent Assay),

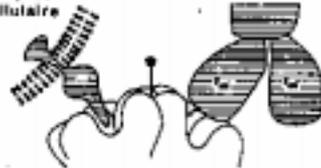


Si tratta di un test immunologico basato sul
principio dell'interazione antigene-anticorpo



récepteur
cellulaire

anticorps



capside



Accartocciamento fogliare
(GLRaV,1-8=grapevine leafroll associated virus)

█ L'accartocciamento fogliare (leafroll, LR) è una delle più importanti virosi della vite, sia per la sua notevole diffusione (è presente in tutte le aree viticole mondiali), sia per la sua incidenza economica.

█ Le prime notizie relative a questa malattia risalgono alla seconda metà del XIX secolo, quando venne osservata e descritta da studiosi francesi.

█ In Italia la prima indagine approfondita su LR è stata condotta nel 1965 in Lombardia



↑ L'Accartocciamento fogliare è una malattia della vite diffusa in tutto il mondo

- Nel 1936 l'80% dei vitigni tedeschi era afflitto dal virus
- Negli ultimi 50 anni vitigni di Pinot Nero, Europei, Australiani e Neozelandesi, presentavano i sintomi della malattia
- La fitovirosi in Francia raggiunge in alcuni vitigni una elevata incidenza (80%)

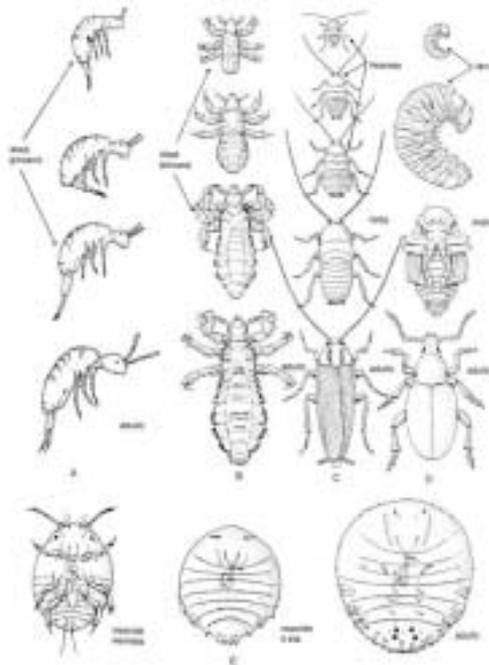
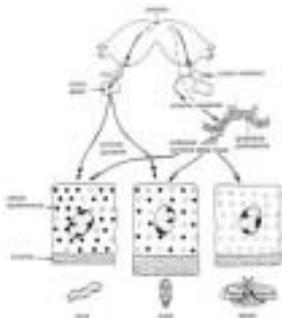
↑ L'accartocciamento fogliare della vite è determinato da virus floematici tubuliformi, lunghi fino a 2000 nm, chiamati *Closterovirus*. Questi virus sono stati denominati "Grapevine Leaf Roll associated Virus" (GLRaV). Ne sono stati identificati otto tipi diversi, ai quali è stata assegnata una numerazione progressiva man mano che venivano scoperti: GLRaV-1, -2, ..., -8.

↑ Il virus dell'accartocciamento fogliare viene trasmesso tramite l'utilizzo di materiale di propagazione infetto negli impianti viticoli. In natura, invece, viene trasmesso da vettori **catametaboli** quali coccidi (*Pulvinaria vitis*) e pseudococcidi (*Planococcus ficus*, *P. citri*, *P. longispinus*, *P. viburni*, *P. calceolarie* e *P. maritimus*)

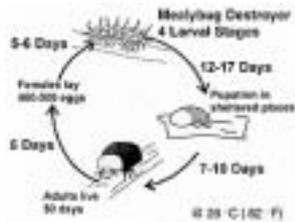


La metamorfosi

- Transizione tra gli stadi giovanili e quelli adulti;
- Generalmente, comporta profonde trasformazioni morfologiche tra gli stadi immaturi e quelli adulti;
- Viene controllata da un complesso sistema di regolazione neuro ormonale.



Ordine: Homoptera
Famiglia: Coccoidae



Identificazione e danno

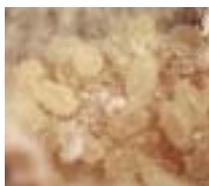
- ↑ La Pulvinaria della Vite è un Coccide con corpo a “scudetto” brunastro, ovoidale e visibile soprattutto sui tralci, sui rami e sui frutti. Le femmine producono un evidente ovisacco, ceroso e fioccoso di colore biancastro, posto tra il corpo e l’organo attaccato; ne consegue che lo “scudetto”, aumentando di volume l’ovisacco, si solleva nella parte anteriore evidenziando il sacco di uova sotto di sé.
- ↑ Il danno determinato da questi Coccidi è limitato e consiste essenzialmente nelle conseguenze delle punture trofiche effettuate sugli organi colpiti: nei rari casi di comparsa di colonie in forma massiccia si può avere asfissia per lo strato di colonie fiocose che avvolgono gli organi colpiti e per l’emissione di melata.

Ciclo biologico

- L'insetto sverna allo stadio giovanile, sui tralci o sul fusto delle piante colpite; completa lo sviluppo nella primavera successiva. Le femmine producono l'ovisacco sotto il corpo; da queste uova nascono, a fine estate, le neanidi che si portano sulle foglie e quindi, ben presto, sui rametti dove svernano. La *Pulvinaria vitis* compie, pertanto, una generazione all'anno.

Lotta

- La lotta chimica contro la Pulvinaria non viene generalmente effettuata per la scarsa rilevanza dei danni prodotti; in caso di particolari infestazioni si può fare a fine inverno un trattamento a base di Polisolfuri, bagnando bene tronchi e tralci con l'insetticida.



La *Pulvinaria* (coccide) vive principalmente sulla vite ma colonizza anche *Olmo*, *Acero*, *Acacia*, *Biancospino*, *Betulla* e su altre numerose latifoglie. Compie una sola generazione l'anno e sverna come femmina fecondata sui rami; In primavera, da maggio a luglio, formato un ovisacco bianco, vi depone al suo interno circa 1500-2000 uova in diverse volte.

Le **neanidi** nate in giugno-luglio si portano sulla pagina inferiore della foglie. Le neanidi femminili compiono due mute e vengono fecondate (circa metà novembre); Alla caduta delle foglie si portano sui rametti per svernare compiendo così il ciclo. I danni che arrecano non sono rilevanti per cui solo in casi molto gravi si deve intervenire sulle neanidi con *Clthorpiriphos-metile* o *Fenitrothion* attivato con olio bianco.



© Photo courtesy: Ed H. Snodden, IRI



Controllo Biologico **Predatori delle mealybugs**

- Lacewings (Neuroptera)
Sympherobius barberi
- La coccinella
Cryptolaemus montrouzieri
- La vespa *Anagyrus fusciventris*

Controllo meccanico

Utilizzando dei getti d'acqua nel tentativo di staccare le mealybugs dalle foglie

☞ I sintomi di LR sono evidenti sulla maggior parte delle coltivazioni di vite europea, rimangono invece latenti su quasi tutti i portainnesti americani.

☞ Le varietà europee più sensibili all'accartocciamento fogliare sono:

- bacca nera: Pinot nero, Cabernet franc, Cabernet sauvignon, Barbera.

- bacca bianca: Riesling, Cortese, Chardonnay.



☞ I primi sintomi esterni dell'accartocciamento fogliare sono visibili all'inizio dell'estate; col procedere della stagione si intensificano fino a raggiungere la massima espressione in autunno.

☞ Essi interessano inizialmente la parte basale dei tralci, poi progrediscono verso le zone apicali. Foglie: incurvamento verso il basso dei margini fogliari (a iniziare dalle foglie basali)

- Alterazioni di colore (nervature escluse); ingiallimenti nelle cultivar a bacca bianca e arrossamenti in quelle a bacca nera. Grappoli: maturano in ritardo e in modo non uniforme; inoltre, sono meno numerosi ed hanno bacche più piccole con ridotto tenore zuccherino.
- Ne consegue una riduzione della produzione in termini sia quantitativi che qualitativi; il calo di produzione può addirittura superare il 50%. In Italia abbiamo avuto casi di perdite di produzione del 25-30% in viti cultivar Barbera e Merlot, e cali di zucchero nel mosto superiori al 30% con aumento dell'acidità fissa.

La difesa dall'accartocciamento fogliare della vite viene effettuata prevalentemente tramite pratiche preventive:

- produzione e uso di materiale di propagazione "sano" certificato, attraverso una selezione clonale-sanitaria nelle serre
- mantenimento in sanità dei vivai mediante trattamenti insetticidi mirati contro i vettori della malattia. E' possibile risanare da LR le piante infette mediante coltura in vitro di apici meristemati e termoterapia, da soli o in combinazione tra loro. La termoterapia in vivo si è dimostrata efficace in misura variabile dal 20 al 50% verso GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3, mentre risultati più favorevoli, con percentuali di risanamento fino al 100%, sono stati ottenuti con trattamenti su materiale in vitro. Anche con la sola coltura in vitro di apici meristemati si sono ottenuti risultati confortanti, con percentuali di piante risanate talvolta prossime al 100%.

termoterapia

- tecnica che consente il risanamento di piante (es. vite) dalle malattie infettive di origine virale. Tale tecnica consiste nel mantenere le piante in un ambiente con temperature di 37-38°C per un prolungato periodo di tempo. Alla fine di questo periodo si preleva un apice vegetativo dalle medesime e lo si fa radicare, con il risultato di ottenere una nuova pianta che dovrebbe essere virus esente.
- Le virosi come l'arricciamento fogliare (causato dal GFLV o Grapevine Fanleaf Virus) o anche il "legno riccio" (da GVA e GVB), fanno precipitare sia la resa in termini di qualità dell'uva (meno zuccheri e più acidità fissa), come anche il rendimento quantitativo della stessa. Per ottenere dei buoni risultati "in vigna", bisogna dunque procedere ad un risanamento preventivo delle piante con termoterapia. Dopo vari confronti a livello di coltivazione, tra vigneti infetti e vigneti risanati, si è riscontrato che, anche i prodotti finali, cioè i vini erano più ricchi di polifenoli e antociani, se prodotti con uve provenienti da piante sane. All'atto della degustazione (o analisi sensoriale), sempre questi vini, risultavano più strutturati e colorati, rispetto ai vini provenienti da vigneti infetti.

Closterovirus 1-8 ssRNA+ no-DNA



Grapevine rootstock stem lesion associated virus, complete genome



- *S. SOLANUM NIGRUM*
- Human calicivirus strain A141
- **Closteroviridae**
 - **Ampelivirus**
 - Grapevine leafroll-associated virus 1
 - Grapevine leafroll-associated virus 3
 - Grapevine leafroll-associated virus 4
 - Grapevine leafroll-associated virus 5
 - Grapevine leafroll-associated virus 6
 - Grapevine leafroll-associated virus 8
 - Grapevine leafroll-associated virus 9
 - Little cherry virus 2
 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 1
 - Pineapple mealybug wilt-associated virus 2
 - Plum bark necrosis stem pitting virus
 - **Closterovirus**
 - Apricot stem pitting associated virus
 - Beet yellow stunt virus
 - Beet yellow virus
 - Citrus tristeza virus
 - Grapevine leafroll-associated virus 2
 - Grapevine rootstock stem lesion associated virus
 - Olive leaf yellowing associated virus
 - **Crinivirus**

- ISHS Acta Horticulturae 528: VII International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding
- **CLONAL SELECTION OF 'VERMENTINO' GRAPEVINE IN TUSCANY**

- **Authors:** M. Borgo, G. Ferroni, G. Salvi, G. Scalabrelli
- **Keywords:** *Vitis vinifera*, genetic improvement, white wine
- **Abstract:**
 - The increasing interest in the 'Vermentino' grapevine variety for production of white wine in the Tuscan coastal region resulted in the initiation of a research project that studied the effect of various agricultural practices and techniques on several parameters of this variety. Clonal selection constituted the first phase of the study. The effect of 'Vermentino' clones on cluster and berry size, bud fertility, plant vigour and disease incidence was visually studied over 3 years (1991-1993). Seventeen vineyards located in the Tuscan coastal area were used. Each vineyard consisted of plants derived from grafts of local scions which ensured extensive variation in cultivar population. ELISA tests were performed on 114 mother plants to test for the most important virus diseases. These tests revealed a low percentage of infection of arabic mosaic virus (ArMV), grapevine fanleaf virus (GFLFV) and grapevine leafroll virus, a midrange presence of grapevine virus A and grapevine fleck virus and a **high percentage of infection by grapevine leafroll virus 3**. Biological tests using indexing indicators performed after the ELISA test showed that all the plants were free from fanleaf virus, grapevine corky bark (GCB) and LN stem grooving (LN33 SG), while 22 and 35%, of the plants were infected with grapevine leafroll virus (GLRV) and grapevine fleck virus (GFkV) respectively.

Identificazione dei GLRaV1-8 "indexaggio"

- Il metodo tradizionale di identificazione del virus su un campione di vite sospetto viene realizzato con la tecnica del "green-grafting"
- Due "butti" infettati da un virus sconosciuto vengono messi a contatto attraverso il sistema vascolare con una vite indicatore (generalmente Cabernet franc o comunque ceppi GLRaV-free) e l'espressione dei sintomi viene controllata in questo indicatore particolarmente vulnerabile al virus, nel periodo di 3 anni
- Il metodo, a causa del lungo periodo di analisi e della sua scarsa efficacia, è stato recentemente sostituito dai test ELISA (2-3 giorni) e dalla PCR

✓ Stato sanitario

Il clone è stato sottoposto, da parte dell'Istituto Sperimentale per la Patologia vegetale di Roma, per cinque anni, alle seguenti verifiche:

- Saggio sierologico ELISA;
- Saggio biologico erbaceo;
- Saggio biologico legnoso.

E' stato accertato che il clone Aglianico AV 02 è esente dalle seguenti malattie da virus e virus-simili:

- complesso dell'arricciamento;
- complesso dell'accartocciamento;
- complesso del legno riccio (*rapestris stem pitting e Kober stem growing*);
- enazioni;
- suberosi corticale;
- necrosi delle nervature.

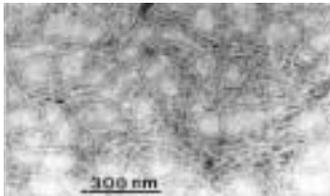
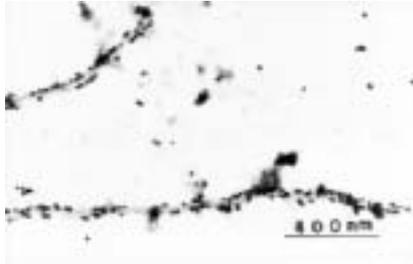
Inoltre, sul clone Aglianico AV 02 non si sono evidenziati sintomi di "giallumi" ascrivibili alla presenza di fitoplasmi.

Controindicazioni al test ELISA

- ← L'identificazione del virus da un campione di *Vitis vinicola*, realizzata seguendo i comuni esami immuno sierologici (test ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay), vengono ostacolati dalla notevole concentrazione di sostanze naturalmente prodotte dalla vite (fenoli, tannine) capaci di reagire attivamente con le proteine e di conseguenza rendendo vano l'approccio sierologico.
- ← La bassa quantità di particelle virali presenti in determinati tessuti rappresenta un'altro ostacolo all'identificazione del virus
- ← Inoltre, esistono diverse varietà virali (GLRaV1-8) rendendo necessario l'utilizzo di diversi preparati sierologici



The Chinese herb grinder



Anticorpi monoclonali Ig Gold vengono usati in microscopia elettronica per identificare le particelle virali

Laboratory testing for grapevine diseases

PCR testing is available for the following pathogens:

- Aerial mosaic virus
- Grapevine fanleaf virus
- Grapevine flink virus
- Grapevine leafroll-associated virus 1
- Grapevine leafroll-associated virus 2
- Grapevine leafroll-associated virus 3
- Grapevine leafroll-associated virus 4
- Grapevine leafroll-associated virus 5
- Grapevine rootstock virus lesion-associated virus
- Grapevine virus A
- Grapevine virus B
- Grapevine virus D
- Phytoplasma
- Pierce's disease (Xylella fastidiosa)
- Rupicola stem pitting-associated virus
- Tobacco mosaic virus
- Tomato ringpot virus

Pathogen	Substrate	ELISA	PCR	Plants	Media/soil/leaves
Aerial Mosaic	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Fanleaf	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Flink	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Leafroll-associated Virus 1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Leafroll-associated Virus 2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Leafroll-associated Virus 3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Leafroll-associated Virus 4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Leafroll-associated Virus 5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Rootstock Virus	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Virus A	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Virus B	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Grapevine Virus D	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Phytoplasma	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Pierce's Disease	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Rupicola Stem Pitting	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tobacco Mosaic	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Tomato Ringpot	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Pathogen	Why to test	How to sample	ELISA	PCR
Aerial mosaic virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine fanleaf virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine flink virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine leafroll-associated virus 1	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine leafroll-associated virus 2	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine leafroll-associated virus 3	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine leafroll-associated virus 4	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine leafroll-associated virus 5	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine rootstock virus lesion-associated virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine virus A	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine virus B	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Grapevine virus D	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Phytoplasma	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Pierce's disease	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Rupicola stem pitting-associated virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Tobacco mosaic virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes
Tomato ringpot virus	Spring to late summer	Upper canopy, young shoots, leafroll symptoms	Yes	Yes

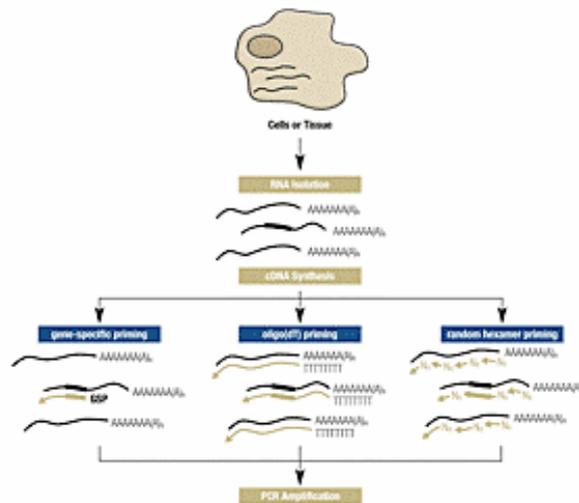


To prevent a grapevine sample for testing, sample material and buffer solution are sealed in plastic bags and loaded onto a scale that holds them in place for grinding.

Le possibili soluzioni sono rappresentate dall'allestimento di indagini di PCR attraverso l'utilizzo dell'enzima trascrittasi inversa (RT-PCR), oppure grazie all'impiego dei "callus tissues" meno ricchi di fenoli e potenzialmente utili per l'allestimento di una coltura cellulare di tessuti infetti



Schematic of RT-PCR



**Butteratura del Legno o complesso del legno riccio
(GRSPaV= Grapevine Rupestris Stem Pitting
Associated Virus)**

Il complesso del legno riccio comprende 4 sindromi a carico dei tessuti conduttori

- 1) Butteratura del legno (Rupestris stem pitting)
- 2) Suberosi corticale (Corky bark)
- 3) Scanalatura del legno da Kober 5BB (Kober stem grooving)
- 4) Scanalatura del legno da LN 33 (LN 33 stem grooving)

Le entità virali responsabili di questa malattia sono almeno 3:

- ← *Grapevine virus A (GVA)* e *B (GVB)* (genere *Vitivirus*)
- ← *Grapevine rupestris stem pitting associated virus (RSPaV)* (genere *Foveavirus*)
- ← Generalmente trasmesse attraverso innesti con materiale infetto o tramite trasferimento mediante insetto vettore (cocciniglia)

Butteratura del legno (Rupestris stem pitting)

- I sintomi della virosi si manifestano in alterazioni del tronco la cui corteccia si presenta ingrossata e rugosa.
- La superficie del sottostante cilindro legnoso manifesta caratteristiche butterature ed infossature longitudinali
- Queste alterazioni possono interessare entrambi i bionti (innesto e portainnesto)





- *RSPaV*
- *Foveavirus*
- Virus a ssRNA di circa 7.3 Kb
- Con una proteina associata Mr
- Distribuzione mondiale
- Il virus è patogeno per la vite è propagato attraverso le pratiche di innesto e raramente da insetti fitofagi



RSPaV has a single-stranded 8,726-nt RNA genome, belongs to the genus *Foveavirus*, and is often associated with *Rupestris stem pitting* (RSP) disease (2). In 1995, a grapevine sanitary selection program was implemented in Mendoza to investigate this and other grapevine viral diseases. **RSP can be diagnosed when *V. rupestris* cv. St. George is used as a woody indicator for biological indexing.** Chip-bud inoculated St. George plants developed a row of small pits and grooves on the wood cylinder below the graft or around and below the inoculated point. After three seasons in the field, 15 accessions with RSP wood markings were observed. Mature leaves and bark shavings were extracted, partially purified, and analyzed by a one-step reverse transcription polymerase chain reaction method. The expected 339-bp band was found in only six of the positively indexed samples using the specific 13/14 primer pair. Other viruses associated with RWC have been detected in Argentina, but to our knowledge, this is the first report of RSPaV.

Based on PCR assays of over 500 grapevine samples from various locations in Australia, **grapevine B virus (GBV) appears to be widely distributed in the country**, so the outbreak at Bunbury is not surprising. None of the vines that tested positive for GBV in Australia exhibited symptoms of corky bark disease which is consistently associated with the presence of GBV in other countries, and no corky bark disease has ever been observed in Australia. GBV has not been shown to induce corky bark disease. According to the National Office of Animal and Plant Health in Australia, **the Australian strain is likely different from the Italian strain**. It is likely that a symptomless GBV strain is common in Australia. The voluntary moratorium on movement of the cultivar 'Jade Seedless' adopted in June 1999 has been lifted because it is no longer justified.



Faculty of Sciences School of Agriculture & Wine

Price per single sample¹: (for example: The price for testing one sample for one virus is \$ 677 + \$600 x GST).

No. of samples	One Virus (SAU)	Viruses in list A1 (SAU)	Complete test (list A1 + A2) (SAU)	List A2 (phytoplasmas) (SAU) ²
1-9	77	148	165	63
10-19	72	138	160	77
20-49	60	129	136	68
50-99	55	105	120	68
100-199	50	95	105	58

¹ Where applicable, a 10% GST will be added to these prices.

² The same price applies for testing for Agrobacterium spp. crown gall and Xylella fastidiosa (Pestal's Disease).

[View our Price for DNA testing \(plant viruses\) PDF \\$120 including GST.](#)



List A1

1. Grapevine leafroll-associated virusess (detecting leafroll virus types 1-5, and 6)
7. Grapevine virus A (GVA)
8. Grapevine virus B (GVB, using two-step nested PCR)
9. Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV-1)
10. Grapevine rootstock stem lesion associated virus (Red Globe leafroll, **New**) Please note vines positive for this virus should not be grafted on 5 BB, 5C, 3309C and 1103P rootstocks.
11. Grapevine fleck virus (strain A)
12. Grapevine fleck virus (strain B)
13. Grapevine fanleaf virus (GFLV)

Virus della maculatura infettiva Grapevine fleck virus GFLV

Tabella 1 - Risultati dei saggi virologici ELISA su viti provenienti da diverse località delle Marche

Vigna	Provincia	Vigneti campionati (n.)	Viti saggiate/infette	Infezioni virali				
				GFLV	GVA-1	GVA-2	GVA	GFRV
Bianchetto del Metauro	PU	2	20/13	1	4	8	3	10
Sangiovese	AP	4	70/51	19	11	30	10	33
Trebbiano Toscano	AP	2	17/6	2	1	1	3	2
Verdicchio	AN	7	119/95	14	49	35	42	48
Verdicchio	MC	3	40/30	1	12	9	17	22
Totali		18	253/196	37	77	83	75	116
			(76%)	(14%)	(30%)	(32%)	(29%)	(45%)

Scanalatura del legno di Kober 5BB Kober stem grooving (GVA)



- Vitivirus (ssRNA+)
- In Italia il virus è responsabile della perdita annuale nella produzione di vino dal 5 al 22%
- Viene trasmesso dagli pseudococcidi

Arricciamento fogliare (GFLV) (Grapevine fanleaf virus)

Grapevine fanleaf virus
virus dell'arricciamento fogliare

- Virus GFLV (*Nepovirus*)
- La malattia varia a seconda del ceppo virale coinvolto:
 - Malformazioni infettive
 - Giallumi infettivi



Factsheet
No. 104, 2006
2nd edn

Grapevine fanleaf virus *Nepovirus*
Eukali-thearia flexilis Australia
by Christopher Ross, University of Queensland, Australia

Introduction
Grapevine fanleaf virus occurs in Asia, Africa, Canada, Europe, New Zealand, North America and South America. It has also been recorded in South Australia.

Prevalence/impact
Grapevine fanleaf virus is the most common virus disease of grapes. The disease has been reported in the USA and Europe and has spread widely with different varieties of grapevine across North America to 1970s and beyond. The virus causes first plant to plant by a species of dagger nematode that has been reported across the world. Long distance spread is mainly by means of infected propagative material.

Plants affected
The primary host of Grapevine fanleaf virus is the vitifera (*Vitis* spp.).
Wild hosts include *Ampelodesmosmos* (wildberry) and *Cornus* (cornelian cherry) (*Cornus canadensis*).

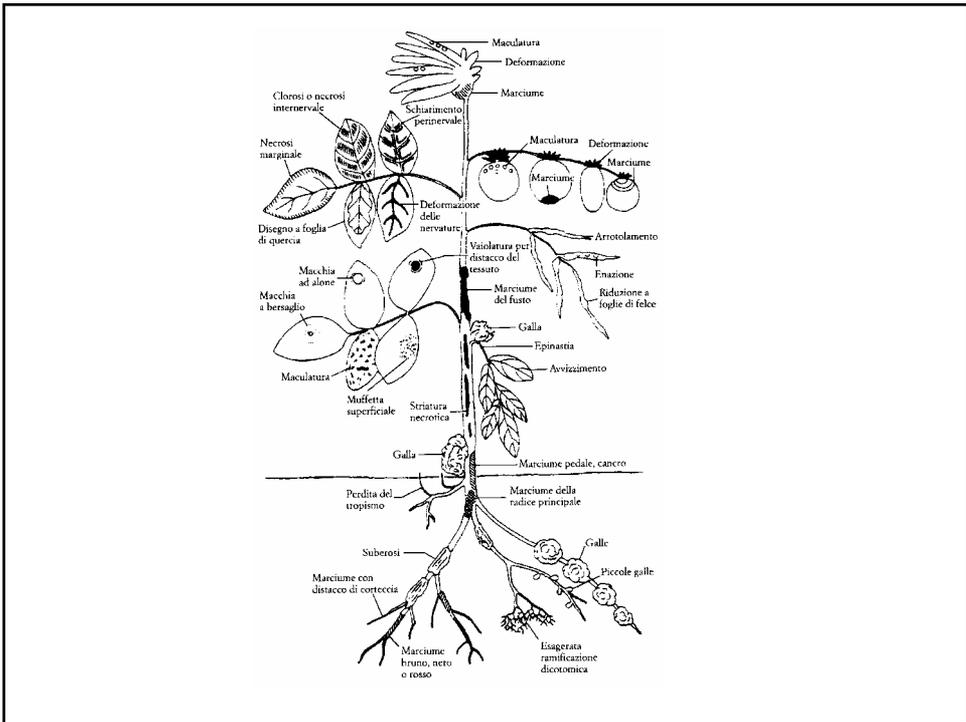
Means of vector transmission
Grapevine fanleaf virus persists all year round. Although nematodes are also vectors that transmit fanleaf virus to new plants through a reproductive cycle, the most common mode of transmission is through the feeding of the grapevine fanleaf virus by the grapevine fanleaf virus vector nematode, *Xiphinema index*. However, other soil-dwelling nematodes have been reported to transmit propagative material.

Symptoms
In this country, if symptoms and signs arise after infection and are particularly typical, the general symptoms include systemic growth and yellowing, stunted and yellowish leaves, and leaf and vein malformation. Leaflet changes include leaf deformations that are symmetrical with respect to the midrib and marginal veins. Commonly, severely affected leaves exhibit Grapevine fanleaf virus. Yellow mosaic virus and leafroll virus often occur in combination. In young vine systems complete control of virus and leafroll virus and all other viruses is particularly important in the southern regions of the USA and 1970-80s. These symptoms are followed by virus dieback in the southern regions. Symptoms that include chlorotic mottling, yellowing, stunted growth, necrosis or the death and necrosis of the leaves, infection by the virus is not fatal. Distortion of the leaves and veins may also occur in leaves and smaller leaves with distorted veins. Longitudinal or the short necrotic and yellowing may also be observed by more than 10%.

Control
2006-2007
2006-2007

2006-2007
2006-2007

2006-2007
2006-2007



SCANALATURA DEL LEGNO DA LN 33 (LN 33 stem grooving)

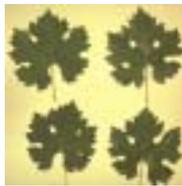
Trasmesso da nematodi della specie *Xiphinema index*

In base al ceppo di virus implicato ed al tipo di vite colpito, possono manifestarsi due diversi quadri sintomatologici:

1. Arricciamento propriamente detto

2. *Mosaico giallo*

Nell'arricciamento le foglie si presentano malformate "a ventaglio", asimmetriche, frastagliate e con dentature accentuate. I tralci sono irregolari (troppo corti e/o troppo lunghi), con internodi a zig-zag, nodi doppi ed appiattiti ("fasciazioni"). La produzione vinicola è ridotta.



- *2. Mosaico giallo*: evidente in primavera, poi tende a scomparire in estate; le foglie sono interessate da aree ingiallite (lamina e nervature comprese) di varie dimensioni ed estensione. I grappoli presentano fenomeni di acinellatura

Controllo

- ⬅ Non esistono prodotti in grado di curare questa malattia. In laboratorio è possibile eradicare il virus tramite coltura di apici meristematici in vitro, o tramite termoterapia. L'unica via di difesa consigliabile è la prevenzione.
- ⬅ Per questo è importante utilizzare materiale di propagazione sano ed effettuare nuovi impianti in terreni dove il nematode sia assente.



Enazioni

L'agente causale di questa alterazione di presunta origine infettiva non è stato ancora determinato. La malattia può comparire sporadicamente ed è stata segnalata un po' ovunque nel mondo dove si coltiva la vite



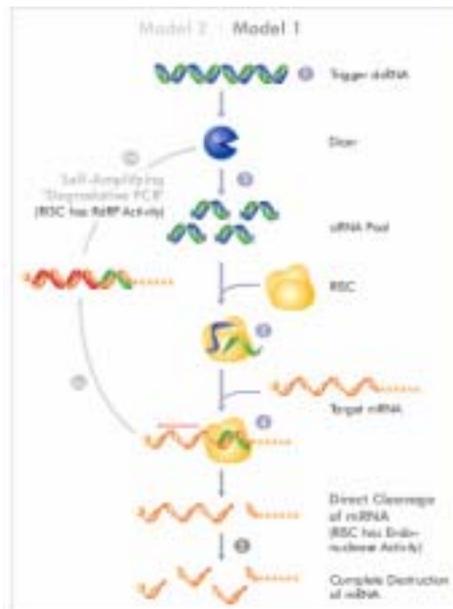
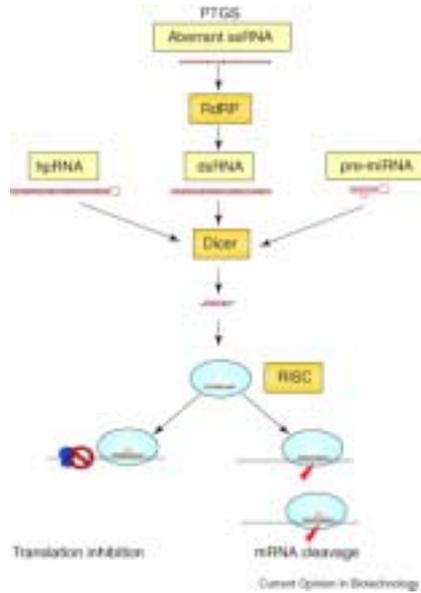
- ← Le piante colpite presentano in primavera un forte ritardo della ripresa vegetativa e a volte la mancata schiusura di un certo numero di gemme. I sintomi caratteristici compaiono però sulle foglie che, in particolare quelle posizionate alla base dei germogli, in primavera si presentano piccole, malformate e con le nervature principali ravvicinate. Queste foglie presentano, sulla pagina inferiore, delle proliferazioni lamellari, lunghe qualche millimetro, decorrenti lungo le nervature, che sono appunto le caratteristiche enazioni o omeoplasie crestiformi. Raramente tali proliferazioni possono comparire sulla pagina superiore. I tralci che presentano foglie così malformate portano una fruttificazione molto scarsa o pressoché nulla.
- ← Questi sintomi tendono a scomparire con l'avanzare dell'estate, ripresentandosi in modo molto incostante nel corso degli anni.
- ← La trasmissione avviene presumibilmente per via vegetativa, con l'uso di parti di piante che sono state interessate dall'affezione

**RNA interference (RNAi) o
postranscriptional gene silencing
(PTGS)**

- Meccanismo naturale scoperto in funghi, piante ed animali
- RNAi è un metodo che interferisce con la trascrizione di geni costitutivi del virus

Virus	Genus	Suppression	Protein
ACMV (Voiznet et al., 1999)	Begomovirus	Complete	AC2
BSMV (Velins et al., 2002)	Hordeivirus	Complete	gb
BWYV (Pfeffer et al., 2002)	Polemovirus	Complete	P0
CMV (Brigneti et al., 1998)	Cucumovirus	Partial/systemic	2b
CPMV (Voiznet et al., 1999)	Conovirus	Partial	?
PCV (Dunoyer et al., 2002)	Potivirus	Complete	P15
PVX (Voiznet et al., 2000)	Potexvirus	Partial/systemic	P25
PVY (Brigneti et al., 1998)	Potyvirus	Complete	HcPro
RHHV (Bucher et al., 2003)	Tenuivirus	Complete	NS3
RYMV (Voiznet et al., 1999)	Sobemovirus	Complete	P1
TBSV (Voiznet et al., 1999)	Tombusvirus	Complete	P19
TSWV (Bucher et al., 2003)	Tospovirus	Complete	NSs





 **Winetech**
 Wine Industry Network of Expertise and Technology
 Netwerk van Kundigheid en Technologie vir die Wynbedryf

Year	Wine Industry Network of Expertise and Technology	Target	Impact
2002	The introduction of multiple virus resistance in grapevines through virus-induced gene silencing	100%	100%
2003	The construction of an infectious clone of grapevine virus A	100%	100%

- ISHS Acta Horticulturae 603: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding
- EVALUATION OF DIFFERENT GENE CONSTRUCTS FOR PRODUCTION OF RESISTANT GRAPEVINES AGAINST GRAPEVINE FANLEAF AND ARABIS MOSAIC VIRUSES
- **Authors:** R. Jardak-Jamoussi, B. Bouamama, T. Wetzal, A. Mliki, G.M. Reustle, A. Ghorbel
- **Keywords:** *Vitis*, nepovirus, virus resistance, mouvement protein, inverted repeat, somatic embryogenesis, Tunisian grapevines.
- **Abstract:**
- Grapevine fanleaf virus (GFLV) and arabis mosaic virus (ArMV) are two nepoviruses causing Fanleaf degeneration, the major disease of grapevines. With the aim to obtain a protection against this viruses, **we developed four constructs, containing non-translatable sequences of the movement protein (MP) and the coat protein (CP) of GFLV** from a Tunisian isolate and of the movement protein of ArMV from a German isolate. This **constructs** including sense, antisense and inverted repeat sequences **have been first introduced into the herbaceous host *Nicotiana bethamiana* by *Agrobacterium tumefaciens***. Transformed tissues were selected by continued proliferation on Kanamycin or Phosphinotricin containing media. Integration of transgenes in tobacco vitroplants was verified by PCR. Homozygous transgenic tobacco lines were obtained by selection of the T2 seeds in corresponding selection medium. **Challenge inoculation of T2 progeny tobacco lines with GFLV and ArMV yielded plants showing immunity**, delayed infection, recovery and susceptibility. Molecular analysis are in process to investigate possible gene silencing events in the resistant plants. Another derived embryogenic calli from Tunisian autochthonous varieties were co-cultured with LBA 4404 harboring the construct carrying a GFLV movement protein sequence in inverted repeat orientation. Putative transformed plantlets were regenerated under Kanamycin selection.

Arabis Mosaic Virus (ArMV)



- Nepovirus
- Arabis mosaic virus (ArMv)
- Simile al Grapevine fanleaf virus
- Colpisce molte piante erbacee e da frutto, tra le quali anche la vite, il ciliegio ed il pesco
- Induce riduzione del vigore della pianta, formazione di enazioni e rosette.
- Oltre che con l'innesto la malattia viene trasmessa da alcuni Nematodi ed in particolare dalla specie *Xiphinema diversicaudatum*
- Distribuzione mondiale a parte Nord America e Australia

↓ Come altre specie di interesse agrario, la vite può essere infettata da virus che, pur raramente provocando la morte della pianta, ne alterano la morfologia e ne disturbano la fisiologia con effetti spesso gravi su aspetti quantitativi e qualitativi dello sviluppo e della produzione. **Non essendo le malattie virali curabili con trattamenti in campo, l'unico modo per controllarle rimane la prevenzione, ovvero l'impianto con materiale di propagazione sano**

↓ Per questo la **selezione clonale** è condotta con particolare rigore anche per quanto attiene agli aspetti sanitari: attualmente sono nove le malattie e gli agenti virali da cui un clone non deve essere affetto per poter essere omologato. Ciò comporta che in alcuni casi, pur esaminando molti genotipi, non sia possibile reperirne alcuno esente da tutte queste malattie, situazione particolarmente frequente in aree viticole dove l'incidenza delle virosi è elevata o in vitigni di modesta diffusione, spesso caratterizzati da popolazioni ristrette.

↳ Si procede pertanto al risanamento dei cloni infetti essenzialmente mediante due tecniche: la termoterapia e la coltura di meristemi - spiega Ivana Gribaudo del Centro Miglioramento genetico della Vite del CNR di Grugliasco (TO), dove queste tecniche si applicano da alcuni anni. La prima consiste nel sottoporre il materiale ad una temperatura sufficiente ad eradicare gli agenti virali, sensibili al calore, senza provocare la morte della pianta, raggiungendo i 35-38 °C per alcune settimane

- La seconda, applicata alla vite da una decina di anni, si basa sul fatto che le particelle virali sono assai rare o disturbate nel loro metabolismo nelle porzioni apicali di germogli e radici, i meristemi appunto: la piantina che si sviluppa dal meristema della gemma apicale è molto probabilmente sana (ovviamente la sua condizione dovrà essere confermata dai saggi virologici). Sia per il prelievo dei meristemi che per la crescita e la moltiplicazione delle piantine si utilizzano naturalmente tecniche di coltura in vitro e la stessa termoterapia può avvenire con successo su piantine allevate in vitro. Poiché le due tecniche hanno diversa efficacia a seconda del tipo di virus, si potrà scegliere quale applicare in base alle condizioni del materiale da risanare.



Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures

M. Valero^a, A. Itarte^a, A. Morio^b

^aDepartamento de Producción Agrícola y Biotecnología, Escuela Politécnica Agraria de Oñate, Universidad Miguel Servet, Campus de Oñate, Ctra. de Berriz, Km. 0,2, 48911 Oñate, Álava, Spain

^bDepartamento de Producción Agrícola, Escuela de Ingeniería y Biotecnología, Universidad del País Vasco, E-48940 Leizor, Álava, Spain

^cDepartamento de Biotecnología Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Accepted 11 October 2002

Abstract

In vitro culture of shoot tips and axillary buds was used for virus elimination from the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon which was infected by Grapevine leafroll associated virus-3 (GLRaV-3) and Grapevine fanleaf virus (GFLV). High percentages of GLRaV-3 free plants (51–80%) were obtained by establishing shoot tip cultures from selected mother plants of the 29-228, 74-06 and 77-266 clones. Low percentages of virus-free plants (1–47%) were obtained in vitro cultures of the first, the second and the third axillary buds of the growing shoot apical meristem. Percentages of virus-free plants obtained with both shoot tips and axillary buds varied according to the time of the year when the explants were collected and the bud position on the shoot. A increased efficiency of in vitro tissue culture methods was observed when cultures were established in summer and it was due in part to the high vineyard temperatures reached in the southeast of Spain during the hot season. GFLV and GLRaV-3 free plants were only obtained by thermotherapy in combination with tissue culture methods from selected plants of the clone 77-26.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Vitis vinifera* L.; Grapevine viruses; Plant tissue cultures; Shoot tips; Axillary buds

3.2. Eradication of GLRaV-3 by heat treatment in combination with tissue culture

For the three clones assayed, the survival rate of shoot tip cultures after thermotherapy was about 61% (Table 3), which is substantially lower than the rate obtained in the previous

Table 2

Survival and GLRaV-3-free plant percentages obtained by in vitro culture of shoot tips and axillary buds from infected mother plants of cv. Napoleon

Type of explant	Clone	Initial explants	Viable explants	Survival %	Subclones obtained	ELISA(-) subclones	Sanitation %
Tips	29-228	65	53	81.5 ± 4.8 ^a	53	53	100
	74-06	18	13	72.2 ± 10.5	12	11	91.7 ± 9.9 ^b
	77-266	22	16	72.7 ± 9.5	16	16	100
Total		105	82	78.1 ± 4.0	81	80	98.8 ± 1.9
1st buds	29-228	52	31	59.6 ± 6.8	31	27	87.1 ± 6.0
2nd buds		57	47	82.5 ± 5.1	47	39	83 ± 5.6
3rd buds		46	43	93.5 ± 3.7	42	30	71.4 ± 7.0

^a The results are expressed as frequencies (%) ± standard error (S.E.) which is calculated as $[p(1-p)/n]^{1/2} \times 100$, where $p = no.$ of live explants and the total number of shoot tips for each clone.

^b The results are expressed in a similar way, only the concepts changing.

A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Filoviridae and Flaviviridae genera in grapevines*

C. J. Dennis, N. J. Raeb*

The Phytopathology Group, Department of Plant Science, University of Cambridge, UK
*Corresponding author: N. J. Raeb, n.j.raeb@cam.ac.uk

Abstract

A novel nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Filoviridae and Flaviviridae genera in grapevines is described. The method is based on the use of a single primer pair for both genera, which allows for the detection of both genera in a single RT-PCR reaction. The method is highly sensitive and specific, and allows for the detection of both genera in a single RT-PCR reaction. The method is highly sensitive and specific, and allows for the detection of both genera in a single RT-PCR reaction.

© 2007 Blackwell Publishing Ltd, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 100-106

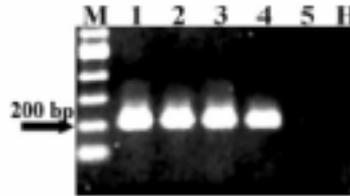


Fig. 4. Agarose gel electrophoretic analysis of nested PCR products obtained from spotted petiole extracts of RSPaV-1-infected grapevine, after serial dilutions of leaf extracts in leaf extract from healthy grapevine. (Numbers 1-5 indicate ten fold dilutions of the sample, starting from 10^6 dilution; H: healthy control; M: 100 bp DNA ladder).

Table 1

Degenerate primer pairs used for the detection of sitonavirus and flavonavirus

Primer	Sequence	Corresponding amino acid sequence	Assay/product size	Degeneracy
dRW- <i>sp1</i>	5'-WGCTAARGCGGGICARAC-3'	AKAGQT	One step RT-PCR	8
dRW- <i>ds2</i>	5'-RMYTCGCCISWLAAIKCAT-3'	MRHSTKGLAT	565bp	128
dRW- <i>nest1</i>	5'-GGGGCARACBHDGCTTGTT-3'	GGT (E)LACT	Nested-PCR	12
dRW- <i>nest2</i>	5'-AAGGCTTCRTARICGGAICNGE-3'	TLDSDYEAF	188bp	32

W = A+T; R = A+G; M = A+C; Y = C+T; S = G+C; K = G+T; H = A+T+C; N = A+T+C+G; I = Inosine

Virosi in italia

Selezione clonale della vite



Nelle Marche



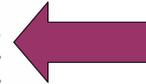


2.1.1.3 Virosi

Il quadro sanitario dei vigneti rispetto alla presenza di *virus* è abbastanza preoccupante e riflette la scarsa attenzione rivolta sinora ai problemi virologici di questa specie. Infatti risultano ancora numerosi i casi di virosi, soprattutto appartenenti al complesso dell'*accartocciamento fogliare*, GLRaVI e GLRaV3 (*Grapevine leaf roll virus*) e della *maculatura infettiva*, GFkV, *Grapevine fleck virus*. Meno frequente, ma altrettanto diffusi i virus appartenenti alla degenerazione infettiva o complesso dell'*arricciamento* GFLV (*Grapevine fan leaf virus*) e del *legno riccio* GVA (*Grapevine virus A*).

Non è da escludere che la recrudescenza osservata negli ultimi anni rispetto ad alcune malattie fungine, come il mal dell'esca, e virali sia proprio da attribuire al materiale di propagazione non sano, fatto che, da solo, dovrebbe scoraggiare gli operatori a prelevare gemme per gli innesti da campi commerciali senza che sia stato effettuato alcun controllo fitosanitario.

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali



Prossimo argomento:

Insetti-Nematodi fitofagi

Montalcino

17 Marzo

ore 14:00-18:00