

## Risanamento da virus di due ecotipi campani di vite (*Vitis vinifera* L.) tramite termoterapia e coltura d'apice

Anna Taglienti\*, Francesco Faggioli, Andrea Gentili e Marina Barba

CREA-DC Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, Roma

### Virus eradication by thermotherapy and meristem culture on two grapevine (*Vitis vinifera* L.) ecotypes from Campania, Italy

**Abstract.** Local grapevine ecotypes represent a wide resource of biodiversity in Campania (more than 100 ecotypes) and characterize the distinctive traits of a typical oenology. After centuries of severe decline due to genetic erosion and several phytosanitary issues, in the last twenty years these resources have been recovered and improved, achieving a high-quality production that is now granted with 4 D.O.C.G. and 15 D.O.C. trademark wines. Virus infection is one of the most critical issues in grapevine cropping: it causes a significant decrease in agronomic and oenological performances, which in turn brings about serious quality and economic losses. Moreover, virus-infected grapevines are excluded from the official registration of approved clones according to Italian regulation, nor can be commercialized as healthy propagation material. Finally, viruses often coexist in grapevine host, occurring in multiple infections, hence diagnosis, evaluation of damage thresholds, protection and eradication happen to be even more difficult. This work aims at eradicating a complex of viruses in two ecotypes 'Biancolella' and 'Forastera' from Ischia island (Campania); these are very important resources for the island's oenology, since they account for more than 90% of grapevine cropped in Ischia. The eradication procedure was required since no virus-free individuals of these ecotypes have ever been found in fields, hence they cannot be officially registered as approved clones, despite their extreme prominence; eradication was performed using thermotherapy *in vivo* both on rooted plants and on cuttings, and *in vitro* on micropropagated plantlets, associated with meristem culture. Woody material from 2 supposed clones of 'Biancolella' and 3 supposed clones of 'Forastera'

was sampled in the collection field of Campania grapevine germplasm. Samples were tested by multiplex RT-PCR for the diagnosis of the 8 viruses defined by national regulation for the official registration of grapevine clones. 'Biancolella' ecotype was found infected by GFLV, GfKV and GVA, while in 'Forastera' ecotype GFLV, GfKV, GLRaV1 and 2 and GVA were assayed. The material was then used for rooting and for establishing an *in vitro* culture; thermotherapy was then performed *in vivo* on rooted plants and cuttings and *in vitro* on micropropagated plantlets. Apical meristems of ca. 1 mm were excised from the hot-treated material (up to 105 days at 37°C) and cultured for regeneration; different rates of regeneration were obtained according to the type of material (hot-treated rooted plants and cuttings and micropropagated plantlets). Plantlets of regular morphology and acceptable multiplication and elongation rates were obtained for both ecotypes at each treatment time point. The results of virological diagnosis on treated samples show that virus-free clones of both ecotypes were obtained.

**Key words:** local grapevines, multiple infection, *in vitro* culture.

### Introduzione

La viticoltura in Campania è una risorsa estremamente importante. A livello di biodiversità, i vitigni autoctoni campani sono un enorme patrimonio varietale; il territorio è uno dei più antichi nuclei di insediamento della vite e conta oltre 100 ecotipi diversi, con una tradizione enologica di spiccata tipicità, rivestendo un ruolo primario nell'economia della regione. Durante il '900 tale patrimonio è stato messo a rischio dall'erosione genetica e da diverse avversità fitosanitarie (es. fillossera); negli ultimi vent'anni, programmi di recupero e valorizzazione dei vitigni autoctoni campani hanno riguadagnato alla filiera una buona

\*anna.taglienti@crea.gov.it

qualità, apprezzata in Italia e all'estero, vantando a oggi 4 vini D.O.C.G. e 15 D.O.C.

L'infezione da virus è una delle problematiche più gravi in viticoltura, a causa della particolare suscettibilità della coltura e delle sue modalità di propagazione (Martelli *et al.*, 1993); infatti, la vite è ospite di un consistente numero di virus (58 entità virali attualmente accertate). Inoltre, le progenie clonali mantengono l'infezione del materiale di partenza, ove questo non sia stato preliminarmente oggetto di selezione sanitaria, e la propagano di generazione in generazione. Tale infezione causa uno scadimento della performance agronomica ed enologica, con perdite in termini di resa, qualità e guadagno economico; inoltre determina l'impossibilità di omologare i cloni e commercializzare materiale di propagazione vivaistico sano. La situazione è aggravata dal fatto che spesso i virus coesistono in infezioni multiple, rendendo più complessa la diagnosi, la valutazione delle soglie dannose, il contenimento e il risanamento.

Dato l'elevato numero di agenti infettivi che attaccano la vite, non è possibile considerare materiale sanitariamente valido solo quello esente da tutti questi agenti. Quindi, nella normativa di omologazione dei cloni di vite, dal punto di vista sanitario si è scelto di selezionare soltanto gli 8 virus più dannosi che debbano essere assenti dal materiale di propagazione certificato; tali virus sono: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3* (GLRaV-1, -2, -3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Arabis mosaic virus* (ArMV).

È noto che contro i virus non sono disponibili trattamenti in campo, pertanto in assenza di materiale di propagazione sano l'unica via percorribile resta quella del risanamento con tecniche *in vitro* (Martelli, 2014). Questo lavoro nasce dall'esigenza di risanare due varietà campane 'Biancolella' e 'Forastera', tipiche di Ischia: su di esse di basa più del 90% della viticoltura ischitana. Nonostante la loro estrema importanza, tali ecotipi non possono essere iscritti al registro varietale, poiché non ne sono mai stati trovati individui naturalmente sani da virus; di qui la necessità di operare un risanamento (Faggioli *et al.*, 1997). La tecnica utilizzata è la termoterapia *in vivo* e *in vitro* associata alla coltura di meristema (Milkus *et al.*, 2000). L'associazione delle due tecniche è stata scelta al fine di ampliare al massimo lo spettro dei patogeni eliminati, poiché il materiale risultava infetto sia da nepovirus (GFLV), che da virus floematici (es. GLRaV-1, GLRaV-3, GVA); la termoterapia risulta generalmente più efficace contro i primi, mentre la coltura di meristema è diretta all'eliminazione dei secondi.

## Materiali e metodi

### *Materiale vegetale*

Il materiale vegetale utilizzato è stato ottenuto dal campo collezione di germoplasma viticolo campano nell'azienda "Torrette" dell'Istituto Tecnico Agrario Francesco De Sanctis (Avellino). Campioni legnosi sono stati prelevati da 2 presunti cloni di 'Biancolella' e 3 di 'Forastera' originariamente selezionati in vigneti di Ischia. Il materiale è stato utilizzato per la radicazione di talee e per la termoterapia *in vivo* su talee, nonché per le analisi di diagnosi virologica.

### *Diagnosi virologica pre e post- trattamento*

Dal tessuto floematico di tali campioni è stato estratto l'RNA totale mediante kit commerciale RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc. Valencia, CA); dopo trattamento con DNAsi e sintesi di cDNA, la diagnosi è stata effettuata tramite multiplex RT-PCR (Faggioli *et al.*, 2013) per i summenzionati 8 virus previsti dalla normativa nazionale per l'omologazione di cloni di vite.

### *Allestimento coltura in vitro*

Dalle piante autoradicate sono stati prelevati germogli apicali dai quali è stata allestita una coltura *in vitro*: i germogli sono stati sterilizzati e posti su terreno di allestimento RC (Murashige & Skoog medium + vitamine (MS) 4,4 g/l; saccarosio 30 g/l; acido indolbutirrico (IBA) 100 µg/l; 6-benzilamminopurina (BAP) 500 µg/l; 6-( $\gamma,\gamma$ -dimetilallilamino)purina (2ip) 10 µg/l; agar 8/l g; pH = 5,8) in cella di crescita a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con fotoperiodo di 16 ore luce e luminosità  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Dopo lo sviluppo delle gemme, le piantine ottenute sono state trasferite per la stabilizzazione della coltura su terreno contenente MS 4,4 g/l; acido 1-naftalenacetico (NAA) 100 µg/l; acido indol-3-acetico (IAA) 100 µg/l; saccarosio 30 g/l; agar 5 g/l (Křizán *et al.*, 2009).

### *Termoterapia*

Le piante autoradicate sono state poste in cella fredda a  $4^\circ\text{C}$  per 15 giorni di "cold hardening" dopodiché, assieme alle talee e le piante *in vitro*, sono state sottoposte a termoterapia (15 giorni in rampa di temperatura da  $30^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ , e poi 105 giorni a  $37^\circ\text{C}$ ); le nuove gemme sono state prelevate dopo 45, 60, 75 e 90 giorni di trattamento e da esse sono stati espianati meristemi lunghi circa 1 mm con l'ausilio di uno stereomicroscopio. L'ultimo prelievo di gemme è stato effettuato a 105 giorni di trattamento e, non essendo operativamente possibile l'espianamento del meristema per l'estrema fragilità del tessuto termotrattato, sono stati

prelevati segmenti nodali lunghi circa 5 mm. Gli espianti sono stati posti in coltura su terreno RC in cella di crescita nelle medesime condizioni sopra descritte; le nuove piantine sviluppatasi sono state poste, per l'allungamento, sul terreno di stabilizzazione. Le foglie delle nuove piantine sono state analizzate tramite multiplex RT-PCR secondo il protocollo indicato per le analisi pre-trattamento.

## Risultati

Le analisi diagnostiche pre-trattamento hanno rilevato la presenza di GFLV, GFkV e GVA in entrambi i cloni di 'Biancolella' e GFLV, GFkV, GLRaV-1 e 2 e GVA nei 3 cloni di 'Forastera'.

La termoterapia *in vivo* su piante autoradicate ha dato i risultati riassunti in tabella 1. Sono stati ottenuti espianti fino a oltre 100 giorni di trattamento; in particolare, tre cloni di 'Forastera' hanno mostrato una buona resistenza al trattamento a caldo, continuando tutti a produrre germogli fino a oltre 100 giorni di termoterapia. Il tasso di rigenerazione dei meristemi espantati è risultato abbastanza variegato e non si sono osservati cali sistematici in tutti i cloni in funzione del tempo di trattamento. Le piantine *in vitro* sviluppatasi dopo rigenerazione dei meristemi hanno presentato caratteri morfologici stabili e la moltiplicazione e radicazione è avvenuta nello stesso terreno di stabilizzazione. Le piantine rigenerate dopo trattamento di 45 giorni sono state analizzate per la presenza di virus (fig. 1): l'amplificato relativo ai cloni 2 e 3 di 'Biancolella' e 2 e 4 di 'Forastera' presenta solo la banda a 844 bp tipica dell'RNA ribosomiale della vite (controllo interno) e pertanto i cloni risultano completamente sani.

Per quanto riguarda le talee termotrattate *in vivo*, esse hanno mostrato un basso tasso di germogliamento e il materiale prelevato non è stato sufficiente ad allestire una serie di prelievi di meristemi statisticamente significativa.

La termoterapia *in vitro* ha dato anch'essa risultati

Tab. 1 - Numero di germogli espantati (n. E) e numero di germogli rigenerati (n. R) ottenuti durante il trattamento di termoterapia *in vivo* associata alla coltura di meristema su piantine autoradicate di cloni di Biancolella (B2, B3) e Forastera (F2, F3, F4).

Tab. 1 - Results of excised shoots (n. E) and re-growing meristems (n. R) from *in vivo* thermotherapy of Biancolella (B2, B3) and Forastera (F2, F3, F4) clones.

time	45 days		60 days		75 days		90 days		105 days	
	n. E	n. R	n. E	n. R	n. E	n. R	n. E	n. R	n. E	n. R
B 2	19	4 (21%)	18	7 (39%)	2	1 (50%)	3	1 (33%)	-	-
B 3	19	9 (47%)	27	5 (18%)	8	5 (62%)	5	-	-	-
F 2	26	10 (38%)	44	13 (29%)	7	1 (14%)	2	-	14	14(100%)
F 3	6	1 (17%)	14	2 (14%)	9	2 (22%)	6	1 (17%)	-	-
F 4	12	-	24	3 (12%)	34	9 (26%)	21	3 (14%)	30	19 (63%)

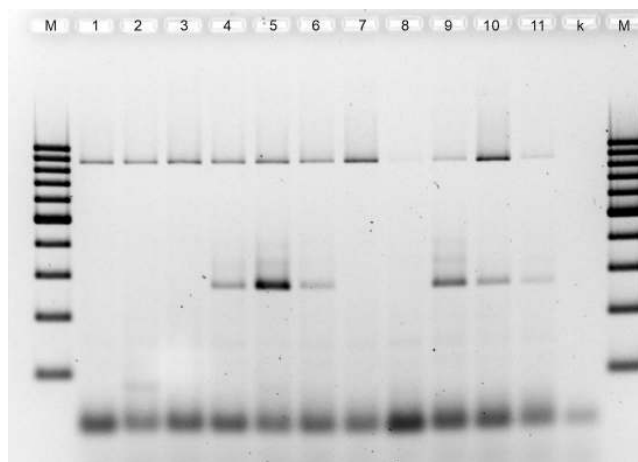


Fig. 1 - Visualizzazione su gel elettroforesi dei prodotti di RT-PCR ottenuti su alcune delle piantine rigenerate da termoterapia *in vivo* + coltura di meristema: 1 = clone F2 termoterapia 60 gg, 2 = F4 75 gg, 3 = B2 75 gg, 4 = F4/1 105 gg, 5 = F4 60 gg, 6 = F2 75 gg, 7 = B3 45 gg, 8 = F2 75 gg, 9 = B2/1 45 gg, 10 = B2/2 75 gg, 11 = F4/3 105 gg, M = marker 100 bp, k = H<sub>2</sub>O. I campioni 1, 2, 3, 7 e 8 presentano solo la banda relativa all'amplificazione del controllo ribosomiale interno (844 bp) risultando pertanto risanati dai virus che erano presenti sul materiale pre-trattamento. I campioni 4, 5, 6, 9, 10 e 11 risultano ancora infetti, in post trattamento, dal virus GVA (272 bp).

Fig. 1 - Gel electrophoresis of RT-PCR amplicons on some sample plantlets after *in vivo* thermotherapy + meristem culture: 1 = clone F2 thermotherapy 60 days, 2 = F4 75 d, 3 = B2 75 d; 4 = F4 105 d, 5 = F4 60 d; 6 = F2 75 d; 7 = B3 45 d; 8 = F2 75 d; 9 = B2/1 45 d; 10 = B2/2 75 d, 11 = F4/3 105 d, M = marker 100 bp, k = H<sub>2</sub>O. Samples 1, 2, 3, 7 and 8 show only the amplification band of the internal ribosomal control (844 bp), hence they are free from the viruses detected in the material before treatment. Samples 4, 5, 6, 9, 10 and 11 are still infected by GVA (272 bp).

non soddisfacenti, poiché dopo rigenerazione i meristemi prelevati non hanno dato luogo a piantine stabili per i caratteri morfologici, l'allungamento era insoddisfacente e non è stato ottenuto materiale fogliare sufficiente per la diagnosi post-trattamento.

## Discussione e conclusioni

Delle tre tecniche utilizzate per il risanamento, l'unica che ha fornito risultati soddisfacenti è stata la termoterapia *in vivo* su piantine autoradicate. Nonostante

un fisiologico calo del numero di germogli espiantabili con il passare del tempo di trattamento, dai germogli era possibile il prelievo di meristemi che restavano vitali e il cui tasso di rigenerazione non variava in modo proporzionale al tempo di termotrattamento. L'eliminazione di GFLV già a 45 giorni di trattamento depone per una estrema efficacia della termoterapia *in vivo* su questi ecotipi nell'eradicazione di nepovirus, mentre la coltura di meristema, che influisce sulla presenza di virus floematici, si è mostrata efficace contro GFkV, GLRaV-1 e GVA nel caso di 'Forastera' e contro GFkV e GVA nel caso di 'Biancolella'.

### Riassunto

I vitigni autoctoni campani costituiscono un enorme patrimonio varietale. L'infezione da virus rappresenta però una grave problematica: essa determina uno scadimento della performance agronomica e l'impossibilità di omologare vitigni e cloni; le infezioni multiple complicano la diagnosi, il contenimento e il risanamento. Questo lavoro mirava al risanamento tramite termoterapia *in vivo* e *in vitro*, associata alla coltura di meristema di ecotipi di due varietà campane 'Biancolella' e 'Forastera', di cui non sono stati trovati individui sani. Da piante autoradicate e termotrattate sono stati espantati meristemi poi rigenerati *in vitro*. Risultati preliminari hanno evidenziato il risanamento di presunti cloni di entrambe le varietà da tutti i virus inizialmente presenti.

**Parole chiave:** vitigni autoctoni, infezione multipla, coltura *in vitro*.

### Bibliografia

- FAGGIOLI F., ANACLERIO F., ANGELINI E., ANTONELLI M.G., BERTAZZON N., 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., SILDARELLI P., TERLIZZI F., TRIOLO E., TRISCIUZZI N., BARBA M., 2013. *Harmonization and validation of diagnostic protocols for the detection of grapevine viruses covered by phytosanitary rules*. *Advances in Horticultural Science* 27(3): 19-20.
- FAGGIOLI F., MANZO M., DI LERNIA G., SPIEZIA A., BARBA M., 1997. *La selezione clonale della vite in Campania: aspetti sanitari*. *Vignevini* 6: 53-59.
- KŘIŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E., HOLLEINOVÁ V., MORAVCOVÁ K., BLÁHOVÁ L., 2009. *Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by in vivo and in vitro thermotherapy*. *Horticultural Science* 36 (3): 105-108.
- MARTELLI G.P., DE SEQUEIRA O.A., KASSEMAYER H.H., PADILLA V., PROTA U., QUACQUARELLI A., REFATTI E. RUDEL M., RUMBOS I.C., SAVINO V., WALTER B., 1993. *A scheme for grapevine certification in the European Economic Community*. *BCPC Monograph* 54: 279-284.
- MARTELLI G.P., 2014. *Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents*. *Journal of Plant Pathology* 96 (1sup): 1-4.
- MILKUS, B.N., AVERY, J.D., PINSKA, V.N., 2000. *Elimination of grapevine viruses by heat treatment and meristem shoot tip culture*. In: *Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine* (Adelaide): 174.