

## Impiego di viti micropropagate in prove di trasmissione di fitoplasmi e virus

Ivana Gribaudo<sup>1\*</sup>, Domenico Bosco<sup>2</sup>, Sabrina Bertin<sup>1,2</sup>, Deborah Santini<sup>1</sup>, Mattia Pegoraro<sup>1</sup>, Danila Cuzzo<sup>1,2</sup>, Cristina Marzachi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Torino

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università di Torino, Grugliasco (TO)

### Use of micropropagated grapevine plants in transmission assays for phytoplasmas and viruses

**Abstract.** Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is exposed to the attacks of a variety of pathogens including viruses and bacteria. Among the diseases caused by phytoplasmas, Flavescence dorée (FD) can reach epidemic levels of infection and is subject to quarantine restrictions in Europe, where it represents a major threat for the wine industry. The FD phytoplasmas are transmitted by the leafhopper *Scaphoideus titanus*. An efficient and reliable protocol for transmission assay under controlled experimental conditions was established and would greatly help in studying various aspects of the disease. Grapevine plantlets issued from micropropagation provided a good transmission efficiency (70%). Plants from *in vitro* propagation are uniform, easy to handle and have tender tissues favourable to insect feeding. The same features are shared by grapevine plantlets derived from somatic embryogenesis, which can add the benefit to be virus- and viroid-free.

**Key words:** Flavescence dorée, *Scaphoideus titanus*, *Vitis vinifera*.

### Introduzione

La vite è ospite di numerosi agenti patogeni endocellulari tra cui virus e fitoplasmi. Tra le malattie causate da questi ultimi, particolare importanza ha assunto la flavescenza dorata (FD), malattia da quarantena che provoca danni gravissimi alla vite europea. Il fitoplasma che causa FD è trasmesso dalla cicalina *Scaphoideus titanus*. Le strategie di contenimento prevedono la lotta obbligatoria contro l'insetto vettore

e l'espanto delle piante infette, ma non hanno dato ad oggi risultati soddisfacenti, almeno in alcune importanti realtà viticole italiane. Al fine di indagare vari aspetti biologici, epidemiologici ed ambientali della FD, risulta estremamente utile poter disporre di un protocollo efficiente per prove di trasmissione del fitoplasma in condizioni controllate. Scopo del lavoro è stato quindi mettere a punto un sistema sperimentale basato sull'ottenimento di piantine da micropropagazione, il loro ambientamento in serra e la trasmissione del fitoplasma tramite l'insetto vettore (*S. titanus*).

### Materiali e metodi

Il materiale vegetale utilizzato proveniva dalle piante madri di cloni omologati di *Vitis vinifera*, conservate dal Centro Premoltiplicazione Materiale Viticolo della Regione Piemonte in *screen-house* a Guarene (CN). Le viti oggetto delle prove di inoculo sono state ottenute per micropropagazione come descritto da Gribaudo *et al.* (2015). Tralci lignificati, prelevati durante l'inverno dalle piante madri e stoccati a 4°C, sono stati indotti a germogliare in acqua. I germogli sono stati sterilizzati con una soluzione al 30% di candeggina commerciale; da essi sono state prelevate le gemme ascellari poste in coltura su un substrato senza fitoregolatori (Murashige e Skoog, 1962, modificato). La moltiplicazione è stata ottenuta prelevando e subcoltivando sullo stesso substrato talee apicali di 3-4 cm. Per il trasferimento *in vivo*, le talee apicali sono state poste a radicare direttamente in compresse di torba, quindi trasferite in vaso e gradualmente abituate alle condizioni ambientali di serra per un ultimo periodo di crescita di circa 1 mese.

Neanidi della cicalina *S. titanus* sono state ottenute da tralci di vite con uova, mantenute su viti sane e poi trasferite, allo stadio di IV-V età, su fave infette con FD per un periodo di acquisizione di una settimana.

\* ivana.gribaudo@ipsp.cnr.it

Dopo un periodo di latenza complessivo di un mese le cicaline sono state trasferite sulle viti da micropropagazione. Dopo l'inoculazione le piante sono state conservate in *screen-house* protetta da rete escludi-insetti (T: 20°C-25°C, l:d=16:8) e successivamente sottoposte a diagnosi per il rilevamento di FD mediante reverse-transcription-PCR (RT-PCR), come descritto da Margaria *et al.* (2007).

## Risultati e discussione

Le prove di trasmissione tramite *S. titanus* eseguite su piante di *V. vinifera* cv Barbera da micropropagazione hanno portato ad ottenere una percentuale di infezione a 8 settimane di circa 70% (19 piante infettate su 27 inoculate). Analoghe inoculazioni effettuate su barbatelle innestate della stessa cultivar (Miliordos *et al.*, 2016) avevano fatto registrare un'efficienza di trasmissione del 17,8% (18 piante infettate su 101 inoculate).

Un recente progetto si propone di caratterizzare la suscettibilità alla FD di 10 diverse cultivar Piemontesi di *V. vinifera* a parità di condizione infettante. Il primo anno di sperimentazione ha fornito risultati molto interessanti, confermando la possibilità di trasmettere efficacemente il fitoplasma a viti micropropagate, e il secondo anno di prove, attualmente in corso, potrà permettere di ottenere dati statisticamente significativi sulla suscettibilità all'infezione delle diverse cultivar.

Viti da micropropagazione sono state anche utilizzate in prove di trasmissione dei virus GVA, GLRaV 1 e 3 (Bertin *et al.*, 2016) e GRSPaV, tramite cocciniglie, con percentuali di successo variabili a seconda del tipo e della combinazione di virus presenti.

Le piante di vite in vaso derivanti da micropropagazione si sono dimostrate adatte ad essere utilizzate per prove di trasmissione di fitoplasmi e di virus in ambiente controllato. La tecnica è stata utilizzata nell'ambito di prove di inoculo volte a valutare l'attività di un elicitore di resistenza nella prevenzione della trasmissione di FD e le piante da micropropagazione si sono rivelate molto adatte allo scopo sperimentale. Queste piante, infatti, presentano numerosi vantaggi quali uniformità, maggiore maneggevolezza e tessuti erbacei favorevoli alla nutrizione dell'insetto (Jarausch *et al.*, 2013; Miliordos *et al.*, 2016). Le stesse caratteristiche sono presenti anche in viti originate da embriogenesi somatica e successivamente micropropagate, che possono presentare l'ulteriore vantag-

gio di essere esenti da virus e viroidi anche asintomatici (Gribaudo *et al.*, 2017).

## Riassunto

Tra le malattie della vite ha assunto importanza la Flavescenza dorata, causata da un fitoplasma trasmesso dalla cicalina *Scaphoideus titanus*. Per indagare vari aspetti biologici, epidemiologici ed ambientali della Flavescenza risulta estremamente utile poter disporre di un protocollo efficiente per prove di trasmissione del fitoplasma in condizioni controllate. A tal fine sono state eseguite prove di inoculo impiegando viti in vaso, ottenute mediante micropropagazione, con efficienza di trasmissione del 70%. Le piante derivanti da micropropagazione presentano numerosi vantaggi quali uniformità, maggiore maneggevolezza, tessuti erbacei favorevoli alla nutrizione dell'insetto.

**Parole chiave:** Flavescenza dorata, *Scaphoideus titanus*, *Vitis vinifera*.

## Ringraziamenti

Le ricerche sono state finanziate dalla Regione Piemonte – Progetti «VIPLASMI», «MEDVI» e «VirusVite».

## Bibliografia

- BERTIN S., CAVALIERI V., GRIBAUDDO I., SACCO D., MARZACHI' C., BOSCO D., 2016. *Transmission of Grapevine virus A and Grapevine leafroll-associated virus 1 and 3 by Helicoverpa bohemica* (Hemiptera: Pseudococcidae) nymphs from plants with mixed infections. *J. Econ. Entomol.*, 109(4): 1504–1511.
- GRIBAUDDO I., CUOZZO D., MANNINI F., 2015. *Risanamento da virus e micropropagazione di Vitis vinifera*. In: M. Micheli, E. Caboni, M. Lambardi, S. Monticelli (eds.), *Culture in vitro: note di laboratorio*, SOI (Sesto Fiorentino, FI): 87-89.
- GRIBAUDDO I., GAMBINO G., BOCCACCI P., PERRONE I., CUOZZO D., 2017. *A multi-years study on the regenerative potential of several Vitis genotypes*. *Acta Hort.*, 1155: 45-50.
- JARAUSCH W., ANGELINI E., EVEILLARD S., MALEMBIC-MAHER S., 2013. *Management of fruit tree and grapevine phytoplasma diseases through genetic resistance*. COST Action FA0807 Workshop, Barcelona (E), 22/03/2013: 56-63.
- MARGARIA P., ROSA C., MARZACHI' C., TURINA M., PALMANO S., 2007. *Detection of Flavescence dorée phytoplasma in grapevine by RT-PCR*. *Plant Disease*, 91: 1496-1501.
- MILIORDOS D.E., GALETTO L., FERRARI E., PEGORARO M., MARZACHI' C., BOSCO D., 2017. *Acibenzolar-S-methyl may prevent vector-mediated flavescence dorée phytoplasma transmission, but is ineffective in inducing recovery of infected grapevines*. *Pest Manag. Sci.*, 73: 534–540.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.