

RED BLOTCH

UNA NUOVA MALATTIA DA VIRUS NEI VIGNETI DEL NORD AMERICA

LE PRIME SCOPERTE

La prima segnalazione di un problema si verificò circa sei anni fa, quando chiazze rosse insolite cominciarono ad apparire sulle foglie basali di Cabernet Sauvignon nella zona di Oakville, in Napa Valley. Le macchie, che apparivano prima e durante la maturazione della bacca, in alcuni casi erano diffuse anche sulla parte superiore della chioma (**Foto 1**). Nel corso degli anni seguenti gli arrossamenti furono rilevati sulle foglie di un certo numero di altre varietà di uve da vino nere.

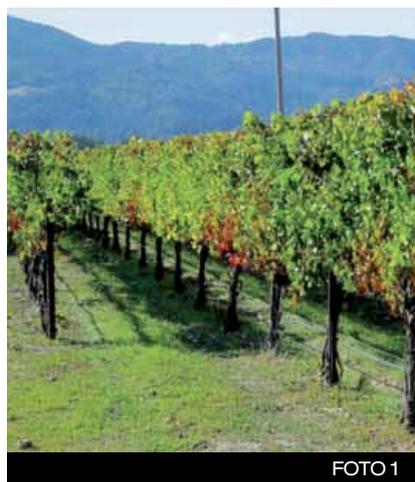
I coltivatori notarono che le uve delle viti colpite presentavano i livelli di zucchero significativamente ridotti e alti livelli di acidità titolabile. Questi sintomi erano tipicamente associati all'infezione GLRaV, notoriamente presente in alcune aree della Valle e, pertanto, si era ipotizzato che le vigne fossero affette da virus dell'accartocciamento. L'entità del problema all'interno della Valle divenne più evidente quando la maggioranza dei coltivatori, nel corso di una riunione della Napa Valley Grape Growers Association, comunicarono di aver visto le macchie rosse nei loro vigneti per diversi anni. Per verificare se i virus dell'accartocciamento fossero responsabili per le chiazze rosse campioni di tessuto furono inviati a laboratori di prova regionali per la reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando specifiche sonde di DNA per GLRaV, ma i risultati furono inaspettati: tutti negativi. Nessuna delle viti sintomatiche o viti di controllo asintomatiche risultò infettata da GLRaV.

La causa della malattia rimase un mistero fino a quando ricercatori viticoli della Stazione Sperimentale di Oakville (Università della California) osservarono che le viti con foglie macchiate di rosso avevano sintomi fogliari distinti da quelli delle viti infette da GLRaV. Tali indicatori distinti sono:

- l'assenza di arrotolamento dei margini fogliari;
- la colorazione rosso-rosa insolita di nervature secondarie e terziarie sulle lame a foglia (**Foto 2**).

SINTOMI

Oltre alla alterazione della morfologia fogliare, gli effetti sulla bacca sono sostanziali. I sintomi non fogliari includono ridotto accrescimento dei germogli, peso del legno di potatura ridotto, dimensioni dei grappoli più piccole. Inoltre, le bacche al momento della raccolta in genere mostrano una sostanziale riduzione (3-7 Brix) nei livelli di zucchero e sono spesso di dimensioni eterogenee, con scalarità di maturazione degli acini. Le conseguenze sono perdite di produzione dal 5 al 15% e, per le varietà a bacca nera, la riduzione delle concentrazioni di antocianine e bassi livelli di estraibilità del colore.



GRBD è stata quindi considerata ufficialmente una malattia diversa da GLD ed è stata chiamata Grapevine Red Blotch Disease come indicato in precedenza (malattia delle macchie rosse). La conferma di ciò è avvenuta con l'isolamento di un genoma DNA geminivirus da tessuti sintomatici con macchie rosse. In seguito l'uso di test specifici per questo virus ne ha rilevata

la presenza in oltre 30 diverse varietà di uva da vino bianco e rosso in tutte le principali aree vitivinicole del Nord America.

UN NUOVO VIRUS

Dopo la constatazione delle differenze nei sintomi, i ricercatori viticoli hanno chiesto aiuto ai patologi vegetali presso i laboratori della Università di Davis e della Plant Services Foundation (FPS) per identificare l'agente infettivo. Un lavoro indipendente fu poi messo in opera dai ricercatori della Cornell University di Geneva, New York e più tardi dai patologi vegetali presso la Washington State University di Pullman.

Applicando metodi avanzati di genetica molecolare, i ricercatori hanno rilevato e caratterizzato una molecola di DNA circolare della dimensione di 3.2kb. Questa forma di DNA ha somiglianza con i genomi dei geminivirus, una famiglia di virus delle piante. Tale risultato, confermato da ricercatori della Washington State University, è stato piuttosto sorprendente in quanto, sebbene tra i geminivirus si trovino ben noti agenti patogeni delle piante, una simile piccola molecola di DNA circolare del tipo geminivirus non era stata trovata prima in tessuti di vite.

L'isolamento e la caratterizzazione del virus è stato possibile grazie all'applicazione di una nuova tecnologia di genetica molecolare chiamato Next Generation Sequencing (NGS). Poiché la tecnologia utilizzata sarà ampiamente utilizzata in futuro, proponiamo una breve e altamente semplificata panoramica dei principali passaggi utilizzati dai patologi vegetali per identificare il putativo genoma DNA GRBaV.

La ricerca di un genoma virale occulto è iniziato con l'estrazione di tutti gli acidi ribonucleici (RNA) da tessuti malati. Tutte le sequenze di RNA vengono poi trascritte in sequenze com-

plementari di DNA. Successivamente, la tecnologia NGS permette la rapida determinazione delle sequenze nucleotidiche DNA di ciascuno dei milioni di segmenti di DNA. Utilizzando uno strumento computazionale chiamato BLAST, le sequenze nucleotidiche di tutti i filamenti di DNA sono allineate a generare sequenze di DNA più lunghe.

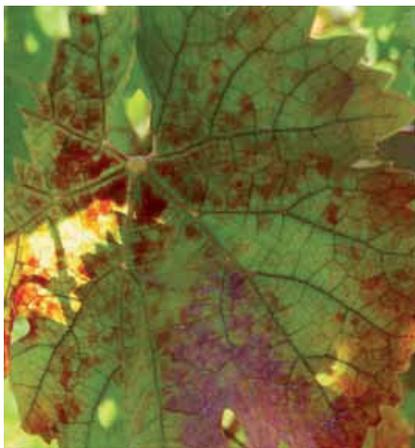


FOTO 2. NOTARE LE VENATURE

A questo punto viene fatto un confronto computerizzato tra le sequenze di DNA estese e una "libreria" di sequenze contenute in banche dati genetiche, pubblicamente disponibili attraverso il National Institutes of Health.

E' possibile ora abbinare sequenze sperimentali con sequenze nucleotidiche virali specifiche note utilizzando un programma di scansione computerizzata e collocare i frammenti di DNA GRBD a formare un genoma virale GRBD putativo.

Sebbene le proprietà generali del "genoma" GRBD siano simili a quelle di geminivirus conosciuti, le caratteristiche molecolari specifiche del DNA GRBD non corrispondono strettamente a quelli dei genomi virali di geminivirus. Il gruppo di Washington ha suggerito che il genoma GRBD possa rappresentare un nuovo genere all'interno della famiglia geminivirus. Tuttavia, dal punto di vista di un virologo, non sarà possibile affermare per certo che il DNA GRBD sia il genoma di virus GRBD infettivo fino a quando non vengano ottenuti virioni intatti e siano soddisfatti i postulati di Koch. Detto questo, è da considerare più che probabile che l'agente che causa le macchie rosse in vite sia un virus a DNA che contiene il 3.2 kb genoma DNA circolare.

APPLICAZIONI PCR DI SONDE GRBD SPECIFICHE

Finora, test PCR che utilizzano la sonda specifica per GRBD, DNA circolare 3.2 kb hanno trovato riscontri positivi in estratti tissutali positivi solo in vigneti situati in Nord America. Ampia analisi ha dimostrato che non esiste una reattività incrociata con genomi di altri virus della vite. Eppure analisi PCR di un gran numero di viti GRBD - positive mostrano chiaramente che le viti possono essere co-infettate da un numero di altri virus come GLRaV, GVAV, GVBv, ecc. Ciò suggerisce la possibilità che infezioni multiple possano contribuire ad un quadro patologico più grave.

Studi fatti usando saggi PCR quantitativi mostrano che la gravità della malattia è direttamente correlata alla quantità di DNA GRBaV rilevato nei tessuti delle piante infette.

Ad esempio, all'interno di foglie fortemente arrossate il numero di copie GRBaV può superare i 70.000, mentre in foglie con arrossamento lieve il numero di copie è limitato ad alcune centinaia. Foglie senza sintomi di Red Blotch o con sintomi GLRD non contengono DNA GRBaV rilevabile.

Anche se saggi congiunti per GRBaV e GLRaV possono rivelare entrambi gli agenti presenti, non vi è alcuna indicazione che la presenza di DNA GLRaV possa influenzare o alterare la patogenicità di Red Blotch. Tuttavia, gli effetti fisiologici della co-infezione della vite non sono ancora stati studiati adeguatamente a causa del campione ancora limitato.

TRASMISSIONE E DISTRIBUZIONE DI GRBD

Tutti i vigneti accademici commerciali e molti produttori utilizzano i test PCR GRBD - specifici su materiale vite per la presenza di GRBD. Si raccomanda che nei vigneti aventi infezione superiore al 10 % di viti positive si rimuovano e

distruggano tutte le viti. Poiché la malattia è stata dimostrata trasmissibile per innesto, e può interessare sia la marza che il portainnesto, entrambe le porzioni delle piante sintomatiche dovrebbero essere eliminate.

La diffusione di Red Blotch in tutto il Nord America indica che l'agente è probabilmente stato presente, ma inosservato, per un considerevole periodo di tempo e sottolinea l'importanza di effettuare test PCR di laboratorio di tutti gli stock di materiali di moltiplicazione che potrebbero ospitare l'agente.

Il rilevamento in campo di GRBD su vitigni bianchi come Chardonnay, Riesling e Sauvignon Blanc è difficile. In generale, i sintomi sui vitigni a uve bianche imitano quelli di infezione da accartocciamento GLRaV. Ad esempio, le foglie su Chardonnay mostrano ingiallimento significativo e arrotolamento dei margini fogliari, il che rende indispensabili test specifici sia per GRBaV che per GLRaV. Il numero di vitigni a bacca bianca GRBD - positivi con infezione da GRBD aumenterà indubbiamente mano a mano che specifici saggi PCR saranno effettuati.

Anche se GRBD è trasmissibile tramite innesto a gemma o legnoso, la malattia non sembra essere trasmissibile attraverso cocciniglie o nematodi.

Tuttavia, la possibile relazione tra GRBD e geminivirus solleva la possibilità di trasmissione via cicaline, visto che i geminivirus con singolo filamento di DNA sono trasmissibili da cicaline saltatrici (leafhoppers). Recentemente, la ricerca presso la Washington State University ha rivelato che cicalina della Virginia (*Erythroneura ziczac*) è stata infettata da virus GRB nutrendosi su tessuti infetti. DNA GRBD è stato prontamente isolato da cicaline così come da viti di Cabernet franc ospiti, dopo aver lasciato le cicaline alimentarsi su viti indice infette.

NOTA

JaRue (Jim) Manning; Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of California, Davis

James Wolpert; Department of Viticulture and Enology, University of California Cooperative Extension Specialist, University of California, Davis

FOTO: Jim Wolpert, Mysore R. Sudarshana, Stazione sperimentale di Oakville, Napa Valley