



IL VIRUS DEL PINOT GRIGIO SEMBRA ESSERE COMPARSO NEI VIGNETI DEL VENETO SOLO RECENTEMENTE

Il virus del Pinot grigio (GPGV) è stato da poco tempo scoperto in Italia; successivamente è stato segnalato anche in altri Paesi europei ed in Corea. In questo studio è stata analizzata la presenza di GPGV in 441 campioni di vite raccolti in Europa nel periodo 2002-2014. I risultati suggeriscono che il virus sia comparso in Veneto solo di recente, mentre sembra essere stato presente in alcuni Paesi dell'est Europa già da almeno 10 anni. La caratterizzazione genetica di diversi isolati di GPGV raccolti in Italia e in altri Paesi europei mostra un basso polimorfismo, con una divergenza nucleotidica massima del 3,2% nella regione genomica 5'.



Di
Nadia Bertazzon
Luisa Filippin
Vally Forte
Elisa Angelini
 CREA Centro di Ricerca per la Viticoltura
 Conegliano (TV)

(Da sinistra nella foto)

INTRODUZIONE

■ Il virus del Pinot grigio (GPGV) è un membro del genere *Trichovirus* nella famiglia *Betaflexiviridae*, recentemente identificato in viti della cv. Pinot grigio provenienti dal Trentino Alto Adige (1). Il suo parente più stretto a livello molecolare è il *Berry inner necrosis virus* (GINV), un altro trichovirus che è stato ritrovato in Giappone (2). GPGV è stato individuato in diverse varietà di vite provenienti da varie regioni italiane (3-6). In aggiunta, la presenza di GPGV è stata riportata in Slovenia (7), Corea (8), Slovacchia e Repubblica Ceca (9), Francia (10) e Grecia (11). I principali

sintomi associati alla presenza di GPGV, visibili soprattutto all'inizio della stagione vegetativa, sono ritardo nel germogliamento, foglie piccole e deformate, con maculature clorotiche e decolorazioni nervali, internodi corti, rese ridotte e scarsa qualità delle bacche, spesso associati ad arresto della crescita e deperimento della pianta (**Figg. 1, 2, 3**) (1, 12).

■ Diversi lavori hanno però mostrato un'associazione poco chiara tra i sintomi ed il virus, dato che è presente anche in molte viti asintomatiche (1, 7, 13). Studi recenti hanno inoltre rivelato l'esistenza di isolati

di GPGV geneticamente distinti che potrebbero influenzare la manifestazione della malattia (14).

MATERIALI E METODI

■ La presenza di GPGV è stata valutata prima in vigneti del Veneto e poi di altri Paesi europei su campioni raccolti sia nel periodo 2002-2005 sia nel 2013-2014, conservati nella collezione del CREA a -80 °C come estratti di RNA totale.



DOCUMENTO TECNICO

Fig. 1 - Sintomi della virosi del Pinot grigio: deformazioni e decolorazioni fogliari su varietà Glera.



Fig. 2 - Sintomi della virosi del Pinot grigio: cascola dei fiori e dei grappolini su varietà Pinot grigio.



Fig. 3 - Sintomi della virosi del Pinot grigio: ritardo nel germogliamento, foglie di dimensione ridotta, internodi corti, e deperimento generale della pianta su varietà Traminer aromatico.



■ L'RNA totale è stato estratto dal tessuto floematico di tralci legnosi o foglie secondo il protocollo di Mackenzie et al. (15), e i cDNA sono stati preparati secondo quanto descritto in Angelini et al. (16). La diagnosi di GPGV è stata eseguita con una coppia di *primer*, disegnata in questo studio, specifica per l'amplificazione di un frammento di 430 pb del gene per la proteina di rivestimento del capsido (CP-F2 5'-ATAGCAGTTGAAGGGACCTC-3'; CP-R2 5'-AAGCCGTGATAGCATTAGTC-3'). La PCR è stata eseguita usando l'enzima Taq DNA polimerasi con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min; 35 cicli di 94 °C per 20 s, 52 °C per 30 s e 72 °C per 45 s; e allungamento finale a 72 °C per 5 min.

■ *Primer* per l'amplificazione dell'rRNA 18S di *Vitis* spp. sono stati usati come controllo interno per verificare la qualità dell'RNA e la riuscita del saggio molecolare RT-PCR (17). Tale verifica è stata molto importante nella valutazione degli estratti di RNA archiviati che sono stati conservati a -80 °C per diversi anni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

■ In totale sono state analizzate 225 viti provenienti dal Veneto, scelte a prescindere dal loro stato sanitario. I campioni, raccolti da vigneti commerciali o da collezioni ampelografiche di età variabile dai 2 ai 50 anni, corrispondevano a 28 diverse varietà, rappresentative delle principali varietà di vite coltivate in Veneto. Erano inclusi 75 campioni raccolti nel 2002-2005 e 150 campioni raccolti nel 2013-2014. Un controllo preliminare per verificare la qualità dell'RNA totale è stato eseguito con i *primer* per l'rRNA 18S di vite, in modo da scartare i campioni che non venivano bene amplificati (meno dell'1%). L'analisi per GPGV dei campioni raccolti nel 2002-2005 ha rivelato la presenza del virus solo in una pianta della cv. Cabernet franc; al contrario, è risultato positivo il 78% delle viti raccolte più recentemente (2013-2014), con infezione estesa a quasi tutte le varietà analizzate (21 su 25). Un'analisi comparativa condotta sulle stesse 34 viti, corrispondenti a 15 varietà, coltivate in due collezioni ampelografiche del Veneto, ha mostrato la presenza di GPGV sul 79% dei campioni saggiati nel 2014, mentre gli stessi risultano negativi



DOCUMENTO TECNICO

negli estratti del 2002 (Tab. 1).

■ Questi risultati suggeriscono quindi che GPGV sia comparso recentemente in Veneto e che si sia poi diffuso rapidamente, anche a vecchi vigneti di collezioni ampelografiche. Un'alta incidenza del virus è stata da poco riportata anche in vigneti delle regioni Trentino (82%) (14) e Friuli Venezia Giulia (18).

■ La presenza di GPGV è stata quindi valutata in 216 viti provenienti da diversi Paesi europei. I campioni erano stati raccolti da collezioni di germoplasma locale durante due distinti periodi: 104 campioni prima del 2005, altri 114 campioni dopo il 2010. Anche in questo caso il controllo preliminare ha confermato l'ottima qualità degli estratti di RNA totale che erano stati conservati per lungo tempo. I dati dei campioni raccolti prima del 2005 hanno mostrato la presenza di GPGV in quasi tutte le piante provenienti dalla Repubblica Ceca e dall'Ucraina e in circa la metà dei campioni provenienti da Macedonia e Montenegro (Tab. 2).

■ Gli altri campioni provenienti da Croazia, Francia, Grecia, Portogallo e Serbia erano negativi (57), mentre 3 viti spagnole, appartenenti alla stessa varietà, sono risultate infette da GPGV. Nei campioni raccolti dopo il 2010 il virus è stato trovato in metà delle viti provenienti da tutti i Paesi considerati (Tab. 2).

■ Sebbene la dimensione del campionamento sia limitata, i risultati mostrano per la prima volta la presenza di GPGV in Romania, Ucraina, Bosnia, Montenegro, Serbia, Croazia, Macedonia, Portogallo e Spagna, sottolineando come il virus sia ampiamente presente in Europa. I nostri risultati sembrano suggerire che GPGV fosse limitato ad alcuni Paesi dell'Europa orientale prima del 2005, e che si sia largamente diffuso in Europa dopo il 2010.

■ In effetti nei primi anni del 2000, molti Paesi produttori di vino avevano mostrato grande interesse per il germoplasma viticolo dell'est Europa. Diversi Istituti di Ricerca, nonché costitutori pubblici e privati e vivaisti, hanno importato genotipi interessanti per scopi sia scientifici che commerciali. Il virus in questo modo potrebbe aver raggiunto l'Italia ed altri Paesi dell'Europa, anche a causa del fatto che allora non era possibile diagnosticarlo. Una volta introdotto, il virus potrebbe essersi diffuso attraverso due vie: insetti

Tab. 1 - Risultati delle analisi di GPGV nelle stesse viti provenienti da due collezioni ampelografiche localizzate in Veneto e campionate in due periodi: nel 2002 e nel 2014.

Varietà di vite	2002	2014
Cabernet franc	0/2	2/2
Cabernet Sauvignon	0/1	1/1
Cardinal	0/1	1/1
Carmenere	0/1	1/1
Glera	0/6	6/6
Incrocio Manzoni 2-15	0/1	1/1
Malvasia istriana	0/2	2/2
Merlot	0/4	3/4
Negro amaro	0/2	2/2
Pinot nero	0/1	1/1
Raboso piave	0/1	0/1
Raboso veronese	0/1	0/1
Refosco dal peduncolo rosso	0/1	0/1
Regina	0/2	2/2
Rossignola	0/1	1/1
Syrah	0/1	1/1
Tocai friulano	0/2	1/2
Tocai rosso	0/2	2/2
Verduzzo friulano	0/2	0/2
Infette/totale	0/34	27/34

Per ciascuna varietà viene riportato il numero di piante infette con GPGV sul numero totale di piante testate.

Tab. 2 - Risultati delle analisi di GPGV in 216 campioni di vite saggiati prima del 2005 e/o dopo il 2010 provenienti da diversi Paesi europei.

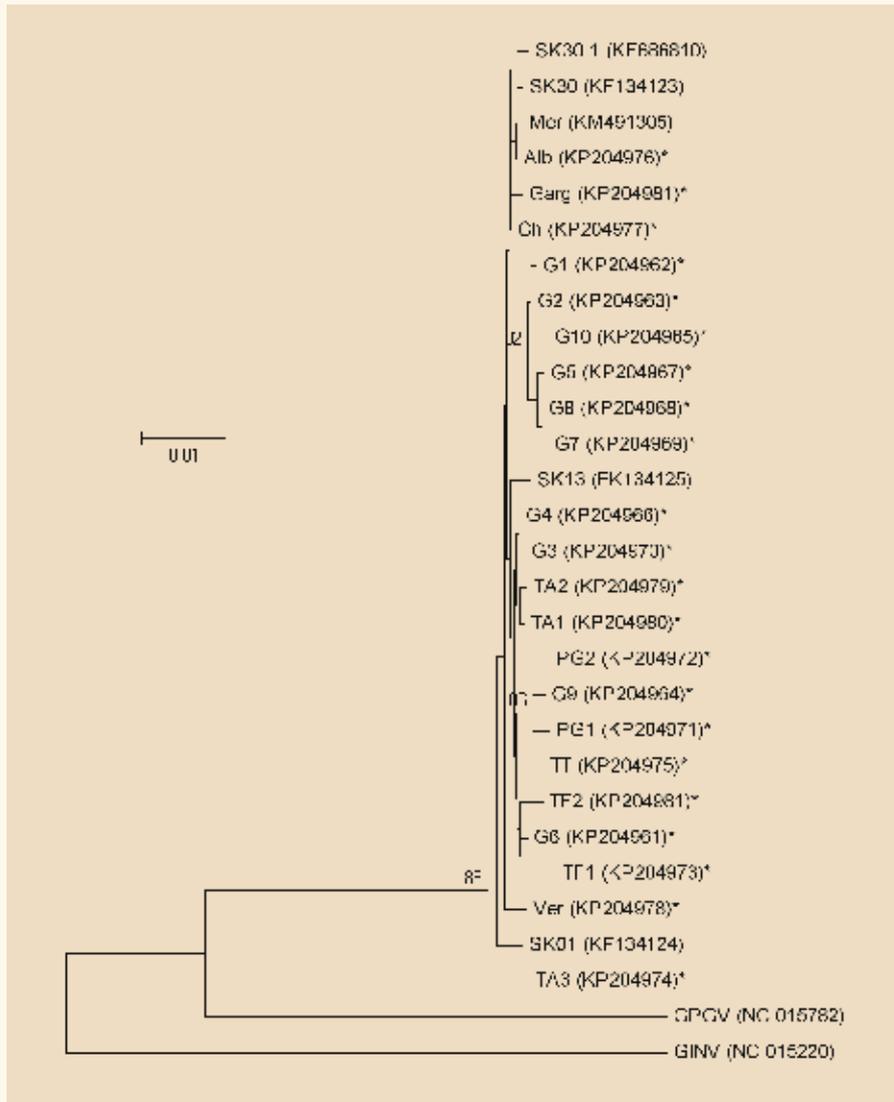
Paese	Prima 2005	Dopo 2010
Bosnia	-	1/15
Croazia	0/14	10/16
Rep. Ceca	16/17	-
Francia	0/8	2/2
Grecia	0/11	1/15
Macedonia	7/12	-
Montenegro	6/13	-
Portogallo	0/2	7/16
Romania	-	16/16
Serbia	0/5	1/3
Spagna	3/18	8/15
Ucraina	2/2	16/16
Infette/totale	34/102	62/114

Per ciascun Paese viene riportato il numero di piante infette da GPGV sul totale delle piante testate.



DOCUMENTO TECNICO

Fig. 4 - Relazioni evolutive tra isolati di GPGV nella regione genomica 5' (533 pb). L'albero NJ non radicato è stato ottenuto con il programma MEGA usando le 21 sequenze ottenute in questo articolo (indicate con asterischi), le sequenze pubblicate di altri 6 isolati di GPGV e la sequenza del GINV. Valori di *bootstrap* (>75) sono riportati ai nodi.



vettori o materiale di propagazione infetto. A questo riguardo, è stato recentemente dimostrato che l'acaro dell'erinoso *Colomerus vitis* può trasmettere GPGV in condizioni sperimentali (19). È noto che *C. vitis* è specie molto comune nei vigneti europei ed anche nel nord-est d'Italia, tanto da essere presente in tutti gli areali viticoli.

■ Alcuni isolati di GPGV sono poi stati caratterizzati tramite sequenziamento nucleotidico. L'analisi *in silico* della sequenza del genoma

completo di tre isolati di GPGV slovacchi (numeri di accessione di GenBank: FK134123-FK134125) e la loro comparazione con il primo isolato italiano caratterizzato proveniente dal Trentino (NC_015782) avevano mostrato un'alta divergenza nella regione terminale 5' del genoma del virus (230 nt) (9), portandoci quindi a caratterizzare l'estremità 5' anche sui nostri isolati di GPGV. L'analisi molecolare è stata eseguita su 21 viti provenienti dall'Italia (Veneto, Trentino

Alto Adige, Friuli Venezia Giulia e Puglia), oltre che da Portogallo, Spagna e Francia. Il sequenziamento nucleotidico è stato eseguito su frammenti di DNA ottenuti con la coppia di primer GPG 14F-632R, disegnata da Glasa *et al.* (9), e le sequenze sono state depositate in GenBank con i numeri di accessione KP204961-KP204981. È stato eseguito un allineamento multiplo e l'albero filogenetico (*neighbor-joining*, NJ) ha mostrato che tutti gli isolati di GPGV si raggruppano insieme, a prescindere dalla loro origine geografica (ad es. Italia, Francia, Slovacchia), formando un raggruppamento distinto dall'isolato originale trentino (NC_015782) (Fig. 4). Questi dati mostrano quindi una bassa variabilità genetica del virus (3,2% nella regione genomica del 5'), che è in accordo con l'ipotesi di una recente introduzione del patogeno.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

■ In conclusione, abbiamo analizzato la presenza di GPGV in vari campioni di vite raccolti tra il 2002 e il 2014. I risultati suggeriscono che GPGV sia stato introdotto in Veneto e probabilmente anche in varie altre aree viticole europee solo di recente, presumibilmente da Paesi dell'est Europa dove il virus era già presente da più di dieci anni. Ulteriori indagini più ampie sarebbero necessarie per validare i nostri risultati in relazione alla presenza del virus nel resto dell'Europa. È sicuramente necessario uno sforzo comune della comunità scientifica e dei diversi operatori del settore vitivinicolo per affrontare questa nuova emergenza sanitaria, non solo a livello italiano ma europeo. ■

BIBLIOGRAFIA

1. Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv Pinot gris. *Virus Res* 163:262-268.
2. Yoshikawa N., Iida H., Goto S., Magome H., Takahashi T., Terai Y. (1997). Grapevine berry inner necrosis, a new trichovirus: comparative studies with several known trichoviruses. *Arch Virol* 142:1351-1363.
3. Beber R., Babini A.R., Terlizzi F., Poggi Pollini C., Credi R., Ratti C. (2013). First report of Grapevine Pinot gris virus (GPGV) in grapevine in Emilia-Romagna and Veneto regions. *J. Plant Pathol* 95:54-36.



DOCUMENTO TECNICO

- 4. Raiola A., Scopel C., Ferrigo D., Taglietti F., Duso C., Causin R. (2013). First report of Grapevine Pinot gris virus infecting cultivar Glera in the Conegliano Valdobbiadene D.O.C.G. area. *J. Plant Pathol* 95:54-58.
- 5. Casati P., Durante G., Quaglino F., Zacchi E., Bianco P.A. (2014). Preliminary data on the presence of Grapevine Pinot gris virus in Lombardy. Proceedings of the XX Congress of the Italian Phytopathological Society, Pisa, Italy, 62-63.
- 6. Morelli M., de Moraes Catarino A., Susca L., Saldarelli P., Gualandri V., Martelli G.P. (2014). First report of Grapevine Pinot gris virus from table grapes in southern Italy. *J. Plant Pathol* 96:439.
- 7. Plesko M.I., Marn V.K., Seljak G., Zezlina I. (2014). First report of Grapevine Pinot gris virus in grapevine in Slovenia. *Plant Dis* 98(7):1014.
- 8. Cho I.S., Jung S.M., Cho J.D., Choi G.S., Lim H.S. (2013). First report of Grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in Korea. *New Dis Rep* 27:10.
- 9. Glasa M., Predajňa L., Komínek P., Nagyová A., Candresse T., Olmos A. (2014). Molecular characterization of divergent Grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch Virol* 159:2103-2107.
- 10. Beuve M., Candresse T., Tannières M., Lemaire O. (2015). First report of Grapevine Pinot gris virus (GPGV) in grapevine in France. *Dis Notes* 99(2):293.
- 11. Martelli G.P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol* 96:S105-S120.
- 12. Bertazzon N., Forte V., Bazzo I., Filippin L., Angelini E. (2015). Nuova malattia del Pinot grigio, diffusione in Veneto *L'Informatore Agrario* 9, 66-70.
- 13. Saldarelli P., Beber R., Covelli L., Bianchedi P., Credi R., Giampetruzzi A., Malossini U., Pirolo C., Poggi Pollini C., Ratti C., Terlizzi F., Gualandri V. (2013). Studies on a new grapevine disease in Trentino vineyards. *J. Plant Pathol* 95:54-60.
- 14. Saldarelli P., Giampetruzzi A., Morelli M., Malossini U., Pirolo C., Bianchedi P., Gualandri V. (2014). Genetic variability of Grapevine Pinot gris virus and its association with grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO-09-14-0241-R.
- 15. MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., Green M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis* 81:222-226.
- 16. Angelini E., Bertazzon N., Borgo M. (2004). Diversity among Grapevine leafroll-associated virus 2 isolates detected by Heteroduplex Mobility Assay. *J. Phytopathol* 152:416-422.
- 17. Gambino G., Gribaudo I. (2006). Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* 96:1223-1229.
- 18. ERSA - Phytosanitary service of Friuli Venezia Giulia (2014). Il monitoraggio del Grapevine Pinot gris virus (GPGV) in Friuli Venezia Giulia. Notiziario ERSA, 3:7-12. <http://www.ersa.fvg.it/informativa/notiziario-ersa/anno/2014/3-2014/il-monitoraggio-del-grapevine-pinot-gris-virus-gpgv-in-friuli-venezia-giulia>. Accessed 14 May 2015.
- 19. Malagnini V., De Lillo E., Saldarelli P., Beber R., Duso C., Raiola A., Zanotelli L., Valenzano D., Giampetruzzi A., Morelli M., Ratti C., Causin R., Gualandri V. (2015). Preliminary data on the transmission of Grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis*. Proceedings of the 18° Congress of ICVG, Ankara, Turkey, 217-218.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato parzialmente finanziato da una borsa di studio OIV (Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino) per l'anno 2014 vinta dalla Dr.ssa Luisa Filippin. Gli autori sono molto grati al Dr. Michele Borgo (OIV) per l'utile discussione.

Il contenuto di questo articolo è stato pubblicato ad inizio 2016 su Archives of Virology n. 161, pag 711-714, con il titolo: Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy.