



UNIVERSITÀ DI PISA



**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZA DELLE PRODUZIONI VEGETALI
ECO-COMPATIBILI
(2005-2007)**

**Trasmissione di *Grapevine Leafroll associated
Ampelovirus 1 (GLRaV-1)* mediante *Planococcus
citri* (Risso) (Hemiptera Pseudococcidae)**

Tutor

Prof. Enrico Triolo

Dottoranda

Dott.ssa Cristina Scotto

Indice

Introduzione.....	4
Capitolo 1- Il “Complesso dell’Accartocciamento fogliare” della vite (GL).....	6
1.1 Eziologia.....	6
1.2 Sintomatologia.....	10
1.3 Diagnosi.....	13
1.4 Epidemiologia e lotta	14
Capitolo 2- I vettori di GL.....	17
2.1 Generalità.....	17
2.2 La trasmissione di GLRaVs mediante vettori.....	20
2.3 Modalità di trasmissione.....	29
Capitolo 3- <i>Planococcus citri</i> (Risso) e GLRaV- 1.....	33
3.1 <i>Planococcus citri</i> (Risso).....	33
3.2 GLRaV-1 virus associato all’Accartocciamento fogliare della vite.....	40
Capitolo 4- Scopi della ricerca.....	42
Capitolo 5- Materiali e metodi.....	43
5.1 Allevamento di <i>Vitis vinifera</i>	43
5.2 Allestimento della coltura di vite <i>in vitro</i>	44
5.3 Allevamento di <i>Planococcus citri</i> (Risso) (Hemiptera Pseudococcidae).....	44
5.4 Indagini sulla biologia di <i>Planococcus citri</i>	45
5.4.1. Individuazione dell’ <i>optimum</i> termico.....	45
5.4.2. Determinazione della durata minima di ogni stadio giovanile.....	47
a) Durata minima <i>in vivo</i> per l’acquisizione.....	47
b) Durata minima <i>in vitro</i> per la trasmissione.....	47
5.5 Indagini di acquisizione e trasmissione	48
5.5.1 Acquisizione.....	48

5.5.2 Trasmissione.....	48
5.6 Indagini sulle modalità di trasmissione.....	49
5.7 Indagini diagnostiche.....	50
5.7.1 Saggio immunoenzimatico ELISA.....	50
5.7.2 Saggio molecolare.....	50
a) Estrazione di acidi nucleici totali con “Spot”.....	50
b) One-Step RT-PCR.....	53
Capitolo 6-Risultati.....	55
6.1 Indagini sulla biologia di <i>Planococcus citri</i>	55
6.1.1 Individuazione dell' <i>optimum termico</i>	55
6.1.2 Determinazione della durata minima di ogni stadio giovanile.....	56
a) Durata minima <i>in vivo</i> per l'acquisizione.....	56
b) Durata minima <i>in vitro</i> per la trasmissione.....	58
6.2 Indagini di acquisizione e trasmissione.....	59
6.2.1 Determinazione della soglia di sensibilità del saggio molecolare.....	59
6.2.2 Acquisizione.....	60
6.2.3 Trasmissione.....	61
6.3 Modalità di trasmissione.....	61
Conclusioni.....	63
Bibliografia.....	65
Allegati.....	79

INTRODUZIONE

La vite europea (*Vitis vinifera* L.) è una pianta di origine asiatica che ha trovato nel bacino del Mediterraneo le condizioni pedo-climatiche favorevoli per la propria diffusione. Già conosciuta e coltivata dai Fenici e dai Greci, all'epoca dei Romani raggiunse la massima diffusione in Europa.

Oggi, la vite rappresenta una delle più importanti colture da frutto a livello mondiale; tale rilevanza è determinata dalla varietà dei prodotti da essa derivati, primo fra tutti il vino, ma anche la frutta fresca, i succhi, i frutti essiccati, composti organici e l'alcool. Quasi 8 milioni di ettari di terre coltivate, sono destinate alla vite, rappresentando circa il 13% di quelle destinate globalmente alle coltivazioni arboree da frutto (Orecchia *et al.*, 2008).

Purtroppo, numerosi patogeni, compresi i virus e gli agenti di malattie simil-virali, possono causare una diminuzione della produzione, un peggioramento della qualità dei frutti, un minore vigore e una riduzione della longevità delle piante. Tali danni determinano notevoli perdite economiche quantificabili in milioni di euro ogni anno. Prendendo in considerazione soltanto le malattie indotte da virus, fino ad oggi ne sono state segnalate 53, causate da 20 generi virali diversi; spesso, purtroppo questi quadri presenti in infezioni miste (Komar *et al.*, 2007).

Tra le malattie virali, una delle più importanti è sicuramente l'Accartocciamento fogliare (Grapevine Leafroll, GL) che è in grado di causare perdite di produzione che possono superare anche il 40% (Tsai *et al.*, 2008). Proprio per le rilevanti perdite economiche che arreca e per la sua notevole diffusione, questa malattia desta grande interesse e preoccupazione in tutte le aree viticole mondiali. Nonostante l'importanza di GL, le conoscenze dei fattori biologici ed ecologici che influenzano la diffusione e la trasmissione della malattia, sono ancora scarse. Infatti, per molto tempo, si è pensato che la diffusione della malattia fosse determinata, unicamente, dall'uso di materiale infetto ma, dalla fine degli anni '80, è stato rilevato il ruolo svolto da insetti vettori. Proprio quest'ultimo aspetto è stato oggetto di nuove ricerche sull'argomento che hanno portato all'identificazione di nove specie di vettori appartenenti all'ordine Hemiptera famiglia Pseudococcidae e di tre specie appartenenti allo stesso ordine, ma alla famiglia Coccidae, in grado di trasmettere alcuni virus associati a GL. Nonostante il notevole interesse, ci sono poche pubblicazioni che hanno preso in considerazione i parametri della trasmissione di GL mediante Pseudococcidi e Coccidi. Tra questi parametri, in particolare, non sono sempre ben chiariti i tempi di acquisizione e di trasmissione, la definizione del ruolo svolto dalle differenti età

preimaginali e dell'adulto nella diffusione della virosi e le condizioni che ne influenzano la trasmissione.

La complessa e non ancora completamente chiarita eziologia della malattia, il numero dei vettori probabilmente destinato a crescere, le sempre più frequenti segnalazioni della presenza di vettori nel vigneto, rendono il problema di primaria importanza. Questo anche perché il controllo delle ampelopatie virali è un problema di non facile gestione e, in modo particolare per quelle trasmesse da insetti, è fortemente influenzato dalla conoscenza della biologia del vettore e, soprattutto, dei rapporti virus/vettore. Per questi motivi, si rendono necessari ulteriori approfondimenti sia dal punto di vista virologico che entomologico finalizzati all'individuazione sia degli interventi preventivi che di una strategia di intervento per limitare la diffusione della malattia in campo.

CAPITOLO 1

Il “Complesso dell’Accartocciamento fogliare” della vite (GL)

Le prime osservazioni sul complesso dell’Accartocciamento fogliare della vite su piante di vite risalgono al XIX secolo ad opera di studiosi francesi che lo segnalavano con il nome di “rougeau” (Fabre, 1853) o di “brunissure” (Pastre, 1891), denominazioni che crearono confusione con alterazioni che inducevano sintomi macroscopici simili, ma in realtà derivati da cause diverse come, ad esempio, fenomeni di potassio-carenza.

L’origine infettiva di questa malattia fu dimostrata da Scheu nel 1935 in Germania e poi confermata alla fine degli anni '50, quando furono isolate particelle virali allungate nel tessuto floematico di piante infette (Vuittenez *et al.*, 1958; Goheen *et al.*, 1959).

Le molteplici segnalazioni sulla presenza di questo complesso in vigneti di moltissimi paesi fa sì che, oggi, questa ampelopatia sia ritenuta una delle virosi più diffuse nel mondo.

1.1 Eziologia

La vite (*Vitis vinifera* L.), una delle più importanti colture perenni moltiplicate vegetativamente, ha accumulato molteplici patogeni nel corso dei secoli di coltivazione. Durante gli ultimi dieci anni, molti nuovi virus sono stati isolati e caratterizzati. In particolare, nuovi probabili virus associati a GL, una delle più importanti malattie della vite, sono stati segnalati in diversi Paesi (Maliogka, *et al.*, 2008).

Proprio per le continue segnalazioni di nuovi virus o di distinte varianti di virus già conosciuti e associati a GL, l’eziologia della malattia è decisamente articolata e non ancora completamente definita, tanto che, ad oggi, il complesso vede coinvolti ben nove diverse entità virali denominate *Grapevine Leafroll associated viruses* 1-9 (GLRaV-1,-9) appartenenti alla famiglia *Closteroviridae* capaci, singolarmente o in associazione tra loro, di indurre i sintomi della malattia. Recentemente, è stata isolata e parzialmente caratterizzata un’altra entità virale in Francia (Cornuet *et al.*, 2003), proposta come GLRaV-10 che potrebbe essere associata al genere *Ampelovirus*. Un’ulteriore segnalazione

nel 2004, riporta l'identificazione del potenziale undicesimo virus su viti della cv. Carnelian in California (Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2004).

Sulla base della revisione tassonomica proposta da Karasev (2000), che centrava la classificazione principalmente su caratteristiche molecolari e biologiche (tipo di insetto-vettore) e non più sul numero di particelle di RNA genomico (Martelli *et al.*, 2000), la famiglia *Closteroviridae* è stata distinta in tre generi (Martelli *et al.*, 2002): *Ampelovirus* (dal greco *ampelos* = vite) trasmessi da Pseudococcidi e Coccidi, *Closterovirus* (il cui nome deriva dal greco *kloster* e significa "filo") trasmessi da Afidi e *Crinivirus* (dal latino *crinis* = capello) trasmessi da Aleurodidi.

La specie virale tipo del genere *Ampelovirus* è GLRaV-3 e, in questo stesso genere, sono inclusi anche GLRaV-1, -4, -5, -6, -8 e -9.

GLRaV-2 appartiene al genere *Closterovirus* il cui membro tipo è il *Virus del giallume della barbabietola* (*Beet yellows virus* = BYV).

I membri del genere *Crinivirus* non vedono incluso alcun virus associato al GL e sono caratterizzati da un genoma bipartito, diversamente da quello monopartito di *Ampelo-* e *Closterovirus*, e la specie virale tipo è il *Virus del giallume infettivo della lattuga* (*Lettuce infectious yellows virus* = LIYV).

GLRaV-7 non è stato ancora assegnato ad alcun genere, anche se le prime evidenze di trasmissione hanno identificato gli aleurodidi come suoi possibili vettori (Martelli, 2002).

In Tabella 1 sono riportati i nove virus fino ad oggi accertati come associati a GL, il Paese e l'anno della loro prima segnalazione:

Genere	Virus	Prima segnalazione
<i>Ampelovirus</i>	GLRaV -1	Svizzera, (Gugerli <i>et al.</i> , 1984)
	GLRaV -3	Svizzera, (Roscioglione e Gugerli, 1986)
	GLRaV -4	USA, (Hu <i>et al.</i> , 1990)
	GLRaV -5	Francia, (Walter e Zimmermann, 1991)
	GLRaV -6	Svizzera, (Gugerli <i>et al.</i> , 1984)

	GLRaV -8	USA, (Monis, 2000)
	GLRaV -9	USA, (Alkowni <i>et al.</i> , 2002)
<i>Closterovir us</i>	GLRaV -2	Francia, (Zimmermann <i>et al.</i> , 1990)
?	GLRaV -7	Italia, (Choueiri <i>et al.</i> , 1996)

Tabella 1- Agenti di Accartocciamento fogliare della vite e loro prima segnalazione (da Martelli, 2004 modificata).

I GLRaVs, distinguibili sierologicamente e molecolarmente, posseggono particelle filamentose e flessuose, lunghe 1400-2000 nm che contengono un RNA monopartito a singola elica (ssRNA) positiva, non poliadenilato di 15,5-17,9 Kb, incapsidato in uno o due tipi di subunità proteiche il cui peso molecolare è compreso tra 24 e 34 KDa (Dolja *et al.*, 1994; Martelli *et al.*, 1997; Karasev, 2000; Martelli *et al.*, 2002; Rowhani *et al.*, 2003).

La caratterizzazione sierologica e molecolare dei virus associati a GL, è stata notevolmente rallentata dall'impossibilità di trasmetterli meccanicamente su ospiti erbacei, ad eccezione di GLRaV-2 che è stato trasmesso su *Nicotiana benthamiana* (Domin) (Castellano *et al.*, 1995). Ulteriori difficoltà di purificazione connesse con la bassa concentrazione delle particelle virali, la loro fragilità e la elevata concentrazione di composti fenolici nei tessuti vegetali, hanno reso ancora più complesse le indagini.

L'uso di tecniche molecolari ha permesso la determinazione delle sequenze e dell'organizzazione genomica di GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 evidenziando, rispettivamente, 10, 9 e 13 griglie di lettura (Open Reading Frames, ORF). L'analisi delle sequenze dei virus associati a GL ha identificato due grossi blocchi genici, altamente conservati, costituenti la tipica organizzazione modulare proposta per la famiglia *Closteroviridae* (Dolja *et al.*, 1994) che vede all'estremità 5' il "modulo della replicazione" seguito da quello del "movimento cellula-cellula" (Quintuple Gene Block, QGB).

L'estremità 5' del genoma contiene il dominio per una proteinasi papaina-simile (L-Pro) a cui seguono i domini della metiltransferasi (MET), elicasi (HEL) e della RNA-polimerasi RNA-dipendente (POL).

La differente posizione genomica di L-Pro nei *Closterovirus*, a monte di quella di MET anziché a valle, ed alcune evidenze sperimentali riportate da Peng e Dolja, (2000) hanno

individuato un meccanismo di rilascio autocatalitico di questa poliproteina con un ruolo preminente nel processo di amplificazione del genoma virale (Dolja *et al.*, 2006).

Recenti indagini volte ad una più approfondita conoscenza di questa porzione nucleotidica hanno individuato, in alcuni *Ampelovirus* tra cui GLRaV-3, un dominio indicato con AlkB, localizzato tra quelli della MET e della HEL la cui funzione nel processo infettivo rimane al momento sconosciuta, ma ugualmente ritenuta assai significativa (Dolja *et al.*, 2006).

Procedendo verso l'estremità 3' del genoma, si osserva il QGB con: una proteina idrofobica a basso peso molecolare (di circa 6 kDa) e indicata come proteina 6 (p6), annessa al reticolo endoplasmatico e direttamente implicata nel movimento cellula-cellula e non coinvolta nella replicazione ed assemblaggio virale.

Proseguendo in direzione 3'seguono i geni delle proteine simili all'heat shock protein 70 (Hsp 70) e una proteina di circa 60 kDa (p60) che, insieme, cooperano nel processo di assemblaggio del virione insieme alle proteine capsidiche.

A completare il QGB si trovano le due proteine del capsido: CP e la sua forma "minore" (CPm). L'ordine con cui sono disposti i geni CP e CPm distingue i due generi: i *Closterovirus* sono caratterizzati dalla posizione di CPm a valle di quella della CP, negli *Ampelovirus* e *Crinivirus* l'ordine è invertito (v. Fig. 1).

La CP è responsabile della formazione di virioni filamentosi e flessuosi che racchiudono l'RNA per circa il 95%. La CPm partecipa alla formazione di una piccola porzione terminale che genera una corta coda del virione (Tian *et al.*, 1999). Come già ricordato, l'assemblaggio prevede la cooperazione delle proteine del QGB ad eccezione della p6.

Ulteriori indagini volte ad una più approfondita conoscenza della composizione genomica dei *Closterovirus* hanno evidenziato la presenza di una terza componente nucleotidica in posizione 3', connessa con la funzione di soppressori virali del silenziamento di RNA operato dalla pianta. I soppressori virali, sono una piccola famiglia di proteine che non hanno alcuna analogia con proteine virali o dell'ospite. La dimostrazione di questa funzione è fornita dalle due proteine (rispettivamente di 20 e 21 kDa), indicate con p20 e p21, proprie di *Ampelovirus* e *Closterovirus* che nel corso delle esperienze riportate da Chapman *et al.*, (2004) hanno dimostrato agire come blocco di silenziamento impedendo la formazione del complesso di silenziamento indotto da RNA (RNA Induced Silencing Complex, RISC), analogamente a quanto verificato per la proteina di 19 kDa (p19) del *Virus del rachitismo cespuglioso del pomodoro (Tomato bushy stunt virus TBSV)* (Silhavy e Burgyan, 2004).

In riferimento alla proteina p20, è utile ricordare la sua duplice funzione che la vede coinvolta anche nel meccanismo di trasmissione mediante afidi del *Virus del giallume della barbabietola* (*Beet yellows virus* BYV) (Dolja *et al.*, 2006).

Il genoma di GLRaV-4 e GLRaV-9 non è stato ancora completamente sequenziato, ma l'organizzazione strutturale modulare è compatibile con quella del genere *Ampelovirus* (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

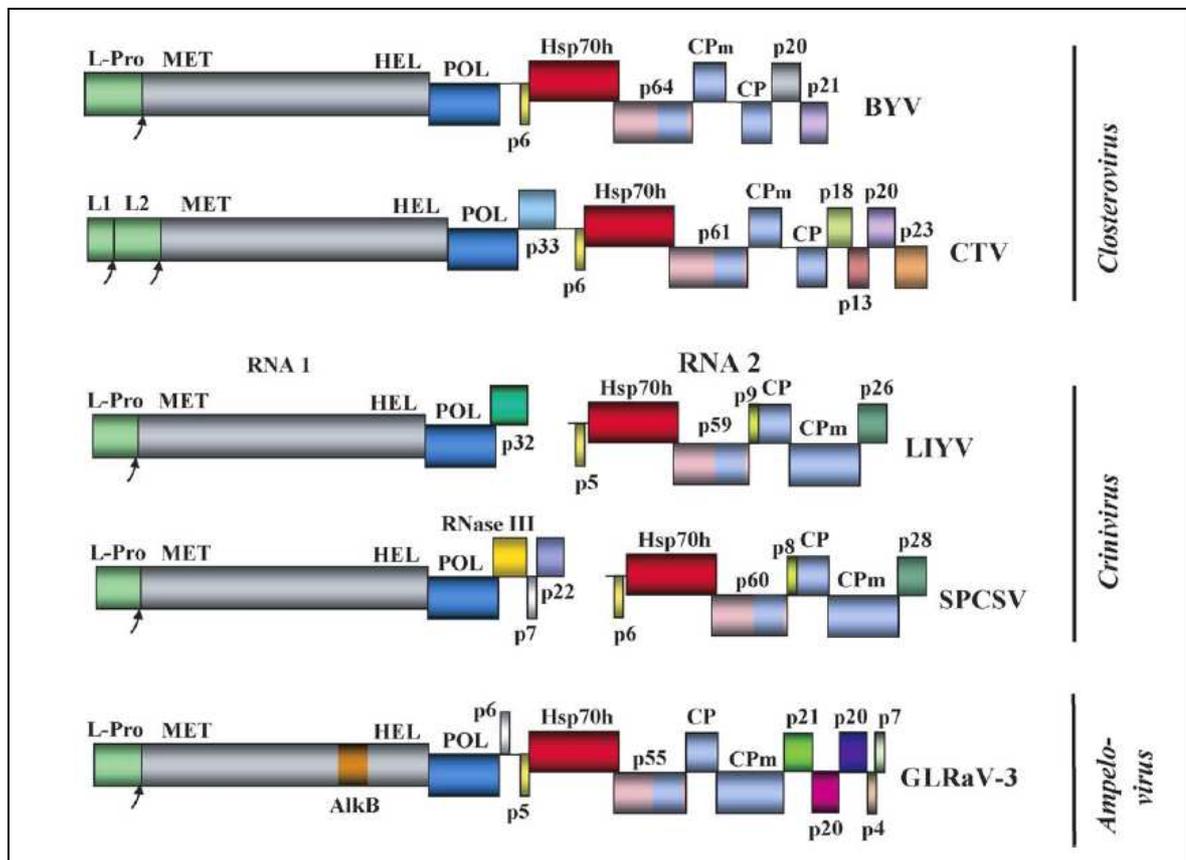


Figura 1- Mappe genomiche dei virus più rappresentativi della famiglia *Closteroviridae*: BYV; *Citrus tristeza virus* (CTV); *Citrus tristeza virus* (CTV); LIYV; *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV); GLRaV-3. Le uniche proteine di ogni genoma, sono indicate con un colore diverso. I generi sono riportati sulla destra (da Dolja *et al.*, 2006).

1.2 Sintomatologia

Il sintomo caratteristico del GL, consiste nell'alterazione del lembo fogliare che presenta i margini ripiegati a coppa verso il basso. L'arrotolamento dei margini e la rigidità dei tessuti fogliari che manifestano frattura vitrea, sono determinati da un accumulo di amido e zuccheri nelle foglie; l'accumulo delle sostanze sintetizzate nelle foglie, compresi i pigmenti, è causato dalla degenerazione della funzione di trasporto per l'occlusione dei tubi cribrosi e la necrosi delle cellule compagne e parenchimatiche del floema (Martelli e Prota, 1985).

Tale sintomatologia comincia a manifestarsi in tarda estate sulle foglie più vecchie situate alla base dei tralci per poi diffondersi, in senso acropeto, con l'avanzare della stagione. Sulle foglie delle varietà ad uva rossa compaiono inizialmente lievi arrossamenti internervali che in seguito si accentuano, interessando tutta la lamina fogliare, ad eccezione delle nervature principali che mantengono il colore verde (v. Fig. 2). Nel caso di attacchi molto forti, l'intera lamina fogliare può diventare di colore rosso-violaceo. Alcune varietà rosse come Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Mission e Barbera sono definiti gli indicatori biologici più efficienti nelle prove di indexaggio, per la forte reazione sintomatologica espressa all'infezione.

Nelle varietà ad uva bianca il sintomo cromatico è meno evidente. Sulle foglie compaiono decolorazioni internervali, senza mai presentare alterazioni cromatiche di colore rosso.

I sintomi sono soggetti a variazioni in rapporto alla cultivar, alle condizioni climatiche, al ceppo virale ed alle associazioni tra virus diversi (Martelli, 2002). Differenti espressioni sintomatologiche sono state considerate la base per la discriminazione eziologica in funzione dell'epoca della loro comparsa, della disposizione delle antocianosi sulla lamina e della loro intensità (Martelli, 2004).



Figura 2- Sintomi di Accartocciamento fogliare su varietà a bacca rossa (a sinistra) e varietà a bacca bianca (a destra).

Pur non determinando la morte delle piante, l'accartocciamento fogliare causa gravi danni produttivi sia quantitativi che qualitativi.

Sui tralci non sono visibili sintomi di rilievo, sebbene la presenza della malattia possa provocare ritardi durante la ripresa vegetativa, un lento accrescimento dei germogli, ritardi nella fioritura e, infine, una riduzione dello sviluppo della parte aerea e dell'apparato radicale. Tutto ciò comporta una diminuzione quantitativa della produzione che, nei casi di maggiore virulenza, può superare anche il 60%. Tale ampelopatia può creare problemi nella maturazione degli acini, provocando una minore intensità nella colorazione degli stessi, a causa della riduzione fino al 50% della concentrazione dei pigmenti.

Una difficile maturazione comporta una diminuzione del contenuto zuccherino, che causa un aumento dei valori di acidità fissa, un peggioramento qualitativo del prodotto, soprattutto per quei vini che già costituzionalmente tendono ad avere un'acidità elevata (Mannini, 2003).

Indagini ultrastrutturali sulla citopatologia indotta da tutti i GLRaVs, hanno evidenziato una specifica localizzazione dei virus nel tessuto floematico, con la formazione di inclusioni intracellulari costituite da aggregati di particelle virali associate ad una proliferazione di vescicole derivate dalla distruzione dei mitocondri (GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-5), o dalla proliferazione delle vescicole del reticolo endoplasmatico (GLRaV-2 e GLRaV-7) (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

Le alterazioni cromatiche osservate macroscopicamente sono la conseguenza di profondi cambiamenti cellulari causati dalle particelle virali stesse. Indagini anatomico-patologiche

condotte da Bertamini *et al.* (2004), su viti della cv. Lagrein infette da GLRaV-3, hanno evidenziato un ridotto contenuto in clorofilla e carotenoidi nelle foglie infette. Il decremento dell'attività fotosintetica, una minore conduttanza stomatica ed una riduzione del tasso di traspirazione, sono risultati strettamente correlati alla presenza di particelle virali nei tessuti, che inducono una marcata inibizione dei processi fisiologici relativi alla fissazione della CO₂. Oltre a ciò, è stata riscontrata una riduzione delle proteine estrinseche (cioè le proteine posizionate sulla superficie della membrana citoplasmatica), dei polipeptidi contenuti nelle membrane dei tilacoidi e delle proteine solubili, probabilmente correlate alla ridotta attività della RuBP (ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi), così come è risultata alterata negativamente anche l'attività della nitrato riduttasi. Un'analisi più dettagliata sulla struttura dei tilacoidi ha evidenziato che l'infezione virale causa una marcata inibizione dell'intero sistema di trasporto degli elettroni, specialmente per l'attività del fotosistema II (PSII) mentre, l'inibizione dell'attività del fotosistema I (PSI), è soltanto marginale. La marcata perdita di attività del PSII, nelle foglie infette, potrebbe essere dovuta alla riduzione dei polipeptidi. Gli Autori concludono che l'infezione virale inattiva il sito donatore degli elettroni del PSII (Bertamini *et al.*, 2004).

La malattia risulta essere latente nei portinnesti americani e loro ibridi che, però, possono ugualmente infettarsi e quindi comportarsi da “portatori sani”, facilitando così la diffusione della malattia (Goheen, 1970; Martelli 1975; Walter e Legin, 1986). Peraltro, nei tessuti dei portinnesti americani, gli agenti virali della malattia mostrano una minore attività replicativa e, secondo studi condotti a Cipro (Ioannou e Hadjinicolis, 2001), vengono infettati in percentuali ridotte rispetto a quelle della vite europea (in media il 7-8% contro il 90%). Questa differenza è stata interpretata come un'effettiva resistenza del germoplasma americano ai virus associati a GL (Martelli *et al.*, 1997), e come un substrato meno favorevole per le cocciniglie, che si moltiplicano meno bene sui portinnesti (Ioannou e Hadjinicolis, 2001).

1.3 Diagnosi

I diversi metodi diagnostici capaci di accertare l'eventuale presenza degli agenti virali responsabili del GL possono essere suddivisi in tre gruppi: 1) saggi biologici; 2) saggi sierologici; 3) saggi molecolari.

1) Saggi biologici. L'indexaggio si basa sulla trasmissione per innesto su varietà indicatrici di *V. vinifera* a bacca rossa, quali Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Pinot Noir, Merlot Mission e l'ibrido LN 33. La procedura prevede un periodo di attesa delle manifestazioni sintomatologiche di circa 18 mesi e non permette la discriminazione tra i vari GLRaVs (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

2) Saggi sierologici. DAS-ELISA e TAS-ELISA sono le tecniche maggiormente utilizzate nella diagnosi sierologica di GL. Anticorpi mono- e policlonali sono stati ottenuti per tutti i GLRaVs.

IEM (Immunoelectron microscopic) ed ISEM (Immunosorbent electron microscopy) sono stati ampiamente utilizzati per l'identificazione specifica degli agenti eziologici del GL. Entrambe le tecniche hanno il vantaggio di dare una risposta netta e definitiva (Martelli *et al.*, 1997), sia in infezione singola che mista. Pur essendo la tecnica dell'IEM sensibile ed affidabile, tuttavia non è indicata per la diagnosi su larga scala (Hu *et al.*, 1991)

3) Saggi molecolari. Entrata sulla scena alla metà degli anni'80, la diagnosi molecolare ha avuto un notevole sviluppo che, sulla base dell'amplificazione genica, ha dato origine a tecniche di analisi molecolare sempre più dettagliate che hanno permesso un notevole aggiornamento delle conoscenze sulla genetica e biologia dei virus. Questi protocolli hanno non solo migliorato il livello di specificità e sensibilità per la identificazione di virus, ma hanno fornito lo strumento necessario alla scoperta di nuovi isolati, nonché di nuove varianti virali.

Il saggio mediante RT-PCR costituisce il metodo elettivo di diagnosi dei virus associati a GL per la sua affidabilità, riproducibilità e sensibilità (Martelli, 2002). La conoscenza della sequenza parziale o totale dei genomi virali, ha permesso di selezionare oligonucleotidi specifici utilizzati nella loro diagnosi utilizzando sia acidi nucleici totali che dsRNA.

Una recente ottimizzazione di questa tecnica ha permesso lo sviluppo di un protocollo definito "spot multiplex nested PCR" idoneo all'accertamento di infezioni multiple. Con l'ausilio di oligonucleotidi degenerati, contenenti inosina, consente una rapida e simultanea diagnosi di tutti i virus associati a GL eventualmente presenti in uno stesso ospite (Dovas e Katis, 2003).

Il costante problema riscontrato nella esigua disponibilità di particelle virali da individuare nei tessuti infetti è stato recentemente superato con il perfezionamento di un protocollo che prevede direttamente lo "spot" (deposito di una goccia di estratto grezzo) su membrana di Nylon dei campioni da sottoporre a PCR. Tale metodo permette di ridurre notevolmente i tempi di trattamento dei campioni e riduce il rischio della contaminazione

incrociata. Inoltre, si è rivelato particolarmente idoneo per individuare sia l'RNA virale che quello di batteri e fitoplasmi, nei tessuti di piante ospiti legnose (Osman e Rowhani, 2006). Nell'indagine sperimentale da noi descritta, questa procedura è stata ulteriormente modificata al fine di consentire la diagnosi virologica nei tessuti degli insetti vettori garantendo affidabilità e rapidità dei risultati conseguiti (cfr. Materiali e Metodi).

1.4 Epidemiologia e lotta

Per lungo tempo si è creduto che i virus associati a GL fossero trasmessi soltanto attraverso il materiale vegetale ma, nonostante la malattia fosse già conosciuta dalla metà del 1800, mancano informazioni sulla sua trasmissione in campo fino al 1973, quando Dimitrijevic pubblicò i primi risultati sulla diffusione naturale della malattia, in un vigneto situato vicino a Belgrado (Dimitrijevic, 1973).

Tra tutti i GLRaVs, i più frequentemente segnalati sono GLRaV-1 e GLRaV-3, ed in misura appena minore GLRaV-2. Ciò fa sì che questi virus si possano a ben ragione definire ubiquitari. Gli altri sono meno citati in bibliografia e potrebbero avere una distribuzione più limitata. È questo il caso di GLRaV-7 che sembra più presente nel sud-est europeo e mediterraneo che altrove.

Sulla media e lunga distanza, GL viene disseminato col materiale di propagazione. In ciò i portinnesti americani, che vengono infettati asintomaticamente, hanno avuto un ruolo di primaria importanza. Ma ruoli analoghi sono anche svolti da cultivars di *V. vinifera*. È emblematica al proposito, la stretta relazione accertata tra GLRaV-6 e la cv. Cardinal, per mezzo della quale il virus si è diffuso in alcune regioni del Mezzogiorno d'Italia e della Grecia (Martelli, 2004).

La diffusione sulle brevi distanze avviene, invece, mediante gli insetti vettori quali Pseudococcidi e Coccidi, il cui numero è aumentato in maniera considerevole in conseguenza delle indagini svolte negli ultimi dieci anni, anche se restano ancora sconosciuti i vettori di alcuni GLRaVs (Cabaleiro *et al.*, 2008).

La consapevolezza della presenza di alcuni GLRaVs nella maggior parte dei paesi a vocazione viticola del mondo, ha messo in evidenza il problema della sanità del materiale di propagazione. L'esigenza di regolamentare la commercializzazione del materiale di propagazione, ha reso necessario lo sviluppo di normative idonee. La legislazione comunitaria ha sancito, nella Direttiva 2005/43/CE della Commissione Europea,

l'esclusione di GLRaV-1 e GLRaV-3 dal materiale di moltiplicazione vegetativo della vite destinato alla commercializzazione. La legislazione italiana ha recepito tale Direttiva CE con il D.M. del 7 Luglio 2006. Ad integrazione di quest'ultimo, è stato emanato il Decreto del 24 Giugno 2008 "Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite" (le cui norme entreranno in vigore a partire dal 1° Gennaio 2009), che prevede per quanto riguarda GL, l'esclusione di GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 sia dai nesti che dai portinnesti.

L'uso di materiale certificato è l'unico metodo efficace di prevenzione e controllo disponibile. Non si conoscono fonti di resistenza naturale in *V. vinifera*, né sono state ancora messe a punto strategie per proteggere le piante sane dalle infezioni in campo mediate dai vettori. Indagini sperimentali sullo sviluppo di piante transgeniche sono in corso, con particolare riferimento all'introduzione di geni per la resistenza a GLRaV-2 e GLRaV-3 nei portinnesti e nelle cultivars europee di *V. vinifera* (Martelli e Boudon-Padieu, 2006).

I pochi risultati di risanamento del materiale viticolo infetto da GLRaVs riportati in letteratura sono stati ottenuti con metodi convenzionali, come termoterapia e coltura *in vitro* di apici meristemati (Clingeffer *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Valero *et al.*, 2003; Panattoni *et al.*, 2004) e con tecniche più sofisticate come microinnesto (Cupidi e Barba, 1993), embriogenesi somatica (Krastanova *et al.*, 2000; Gribaudo *et al.*, 2003; Gambino *et al.*, 2006) e chemioterapia (Panattoni e Triolo, 2003; Panattoni *et al.*, 2006).

CAPITOLO 2

I vettori di GL

I vettori svolgono un ruolo fondamentale per la diffusione dell'Accartocciamento fogliare nel vigneto. Le conoscenze sui vettori di GL sono tutt'altro che complete infatti, fino ad oggi, solo alcune cocciniglie appartenenti alla famiglia degli Pseudococcidae, ed in misura minore a quella dei Coccidae, sono state accertate come responsabili della trasmissione di alcuni GLRaVs.

2.1 Generalità

Gli insetti comunemente chiamati “cocciniglie” appartengono, dal punto di vista sistematico, all'ordine Hemiptera, superfamiglia Coccoidea. Tale superfamiglia comprende 28 famiglie morfologicamente ben differenziate e 7355 specie. Tra le famiglie sono incluse quella dei Coccidae che comprende 1129 tra specie e sottospecie, suddivise in 163 generi e la famiglia degli Pseudococcidae (=mealybugs) che comprende 1989 tra specie e sottospecie, ripartite in 271 generi.

Le cocciniglie hanno dimensioni piuttosto ridotte (per lo più al di sotto del centimetro) e sono caratterizzate da un dimorfismo sessuale molto marcato. I maschi, generalmente muniti di un paio di ali, risultano minuscoli e fragili, con capo, torace e addome ben distinti e apparato boccale atrofizzato, ridotto ad una fessura non funzionale. Le femmine sono attere, il loro tegumento è ricoperto da secrezioni protettive o da follicoli. La forma del corpo è variabile (ovalare, tondeggianti, appiattite, subglobosa o globosa) e le diverse regioni morfologiche sono spesso indistinte e fuse insieme. L'apparato boccale, di tipo pungente-succhiante, è formato da un rostro breve, con 4 stiletti lunghi, sottili e appuntiti all'estremità, che servono a perforare i tessuti della pianta (v. Fig. 3). Le cocciniglie sono insetti fitomizi e come tali si nutrono di linfa. Solo quelle specie, tuttavia, che presentano una particolare conformazione della parte anteriore dell'intestino medio, la cosiddetta camera filtrante, sono forti produttrici di melata. Tale produzione consente rapporti di simbiosi mutualistica con le formiche, sia alle popolazioni che vivono sulle parti epigee, che a quelle che vivono su quelle ipogee (Tremblay, 1981). Le forme giovanili (neanidi dalla seconda età in poi) sono simili alle femmine, ma di dimensioni più ridotte e solo

quelle di prima età assicurano la dispersione della specie. Oltre alla riproduzione sessuale, è frequente la partenogenesi. Le principali differenze che caratterizzano le due famiglie, vengono di seguito elencate.

Pseudococcidae: le femmine di questa famiglia si caratterizzano per il corpo ovale, alquanto appiattito dal tegumento poco rigido e ricoperto di cera farinosa, onde la definizione di “Cocciniglie farinose o mealybugs”. Molte specie di Pseudococcidi producono un ovisacco ceroso dall’aspetto fioccoso o cotonoso di varia estensione, che aumenta la copertura cerosa delle colonie di queste Cocciniglie, da cui anche il nome di “Cocciniglie cotonose”. Lo sviluppo postembrionale è diverso nei due sessi. La femmina è neotenica (raggiunge cioè la maturità sessuale prima di aver completato lo sviluppo somatico che peraltro non raggiunge mai), presenta sviluppo pseudoametabolico e raggiunge quindi la forma adulta neotenica attraverso tre stadi neanidali. Il maschio, al contrario, presenta sviluppo neometabolico e completa lo sviluppo passando da due stadi neanidali e due pupali (prepupa e pupa), questi ultimi afaghi e quiescenti. Gli Pseudococcidi sono mobili in tutti gli stadi. Essi perciò si spostano sulla pianta e possono passare anche da una pianta all’altra se queste sono contigue.

Coccidae: femmine di aspetto variabile, ma caratterizzate da uno scudetto membranoso o sclerificato. La deposizione delle uova avviene generalmente sotto il corpo materno. La femmina poi muore e lo scudetto svuotandosi progressivamente, fornisce protezione alle neanidi neosgusciate. Lo sviluppo decorre per i maschi come negli Pseudococcidi, mentre le femmine sono invece catametaboliche. La catametabolia o metamorfosi involutiva è un tipo di metamorfosi nella quale si ha la regressione delle appendici (zampe, antenne) mano a mano che si procede verso lo stadio adulto. I Coccidi (a differenza degli Pseudococcidi), una volta fissatisi sul substrato, si spostano solo in occasione di migrazioni legate alla ricerca di un sito più favorevole alla nutrizione o allo svernamento (Tremblay, 1981).

Sono almeno 21 le specie di cocciniglie in grado di trasmettere virus dei generi *Ampelovirus*, *Badnavirus* (da “bacilliform DNA virus) e *Vitivirus* (dal latino *vitis*= vite) (Cid *et al.*, 2007).

Alcune specie di Pseudococcidi appartenenti ai generi *Pseudococcus*, *Planococcus*, *Heliococcus*, *Phenacoccus*, *Saccharicoccus*, *Dysmicoccus* e Coccidi dei generi *Parthenolecanium*, *Pulvinaria*, *Neopulvinaria* trasmettono in maniera semipersistente i virus appartenenti al genere *Ampelovirus*. I virus appartenenti a questo genere sono: GLRaV-1,-3,-5,-9; *Pineapple mealybug wilt-associated viruses*, PMWaV-1,-2; *Little*

cherry virus 2, LChV-2; *Virus del mosaico lieve della canna da zucchero* (*Sugarcane mild mosaic virus*, SMMV) (Martelli *et al.*, 2002). La trasmissione è aspecifica. Ne è prova il fatto che diversi vettori, di areali geografici diversi, trasmettono efficacemente più di una specie virale (Martelli, 2004).

Gli Pseudococcidi trasmettono anche i seguenti virus: *Virus del rigonfiamento dei germogli del cacao* (*Cacao swollen shoot virus*, CSSV) (Dufour, 1988; 1991); *Virus della maculatura gialla del pepe* (*Piper yellow mottle virus*, PYMV) (Lockhart *et al.*, 1997; Bath *et al.*, 2003) e *Virus della striatura della banana cv. Mysore* (*Banana streak Mysore virus*, BSMysV) (Geering *et al.*, 2005), appartenenti al genere *Badnavirus*.

Invece, Coccidi e Pseudococcidi, sono in grado di trasmettere *Grapevine virus A* GVA e *Grapevine virus B* GVB, che appartengono al genere *Vitivirus* (Martelli, 2004). Di seguito verranno presi in considerazione soltanto i vettori di GL.

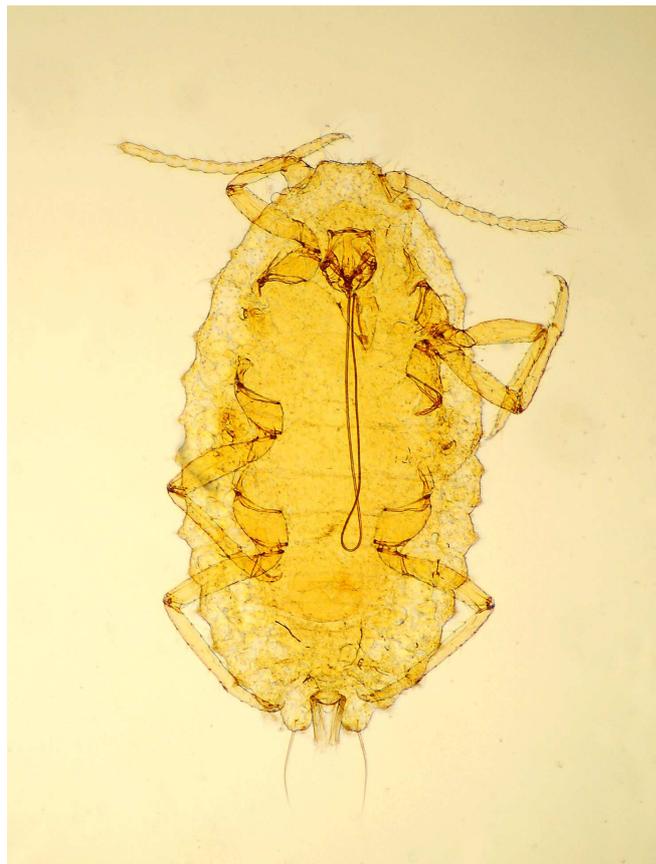


Figura 3- Forma giovanile di *Planococcus citri* (Risso). Preparato microscopico dal quale si evidenzia il lungo fascio di stilette boccali ripiegati a “cappio”.

2.2 La trasmissione di GLRaVs mediante vettori

Le prime indagini sulla trasmissione di GL risalgono alla fine degli anni '80 quando Tanne *et al.*, (1987) e Rosciglione & Gugerli (1989) ottennero la trasmissione di particelle virali associate all'Accartocciamento fogliare, i primi, mediante neanidi di prima e seconda età di *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti) e i secondi di *Planococcus ficus* (Signoret).

Nel 1990 in Sud-Africa, vengono svolte prove di trasmissione utilizzando come vettore *Planococcus ficus*, Pseudococcide molto diffuso nei vigneti del distretto di Città del Capo. Così Engelbrecht e Kasdorf (1990a), dopo aver lasciato gli insetti ad acquisire per 15 giorni su piante infette e, successivamente, averli trasferiti su piante sane, riuscirono ad ottenere la trasmissione di GLRaV-3 ma non di GLRaV-1 e GLRaV-2. Inoltre, nello stesso lavoro, vennero riscontrati sintomi della malattia lievemente più marcati nelle viti con infezione mista (GLRaV-3+GLRaV-1+GLRaV-2), venne quindi ipotizzata un'azione sinergica di GLRaV-1 e GLRaV-2 per la reazione sintomatologica all'infezione. Gli stessi Autori, nello stesso anno (Engelbrecht e Kasdorf, 1990b) hanno svolto un'ulteriore indagine di campo per valutare la diffusione di alcune malattie della vite tra cui anche GL. I risultati dell'indagine evidenziarono la presenza di GLRaV-3 ma non di GLRaV-1. L'assenza di quest'ultimo virus nei vigneti di Durbanville (sobborgo di Città del Capo), è stata messa in relazione con l'impossibilità di essere trasmesso da *Planococcus ficus*.

La trasmissione di GLRaV-3 viene però confermata da Pedroso *et al.*, nel 1991 in Portogallo, utilizzando *Planococcus citri* (Risso) come vettore. Nella citata ricerca, sono state utilizzate piante infette delle cv. Pinot Nero e Cabernet Sauvignon, su cui sono stati posti gli insetti per la fase di acquisizione. In seguito, sono stati trasferiti su piante sane, su cui sono rimasti per 1 mese.

Nel 1994 Belli *et al.*, per la prima volta, utilizzano due specie di Coccidi: *Parthenolecanium corni* (Bouché) e *Pulvinaria vitis* (L.) per prove di acquisizione e trasmissione. Infatti, impiegando un periodo di acquisizione pari a 5 giorni ed un periodo di trasmissione di 10 giorni, dimostrano la trasmissibilità di GLRaV-3 mediante neanidi del Coccidae *Pulvinaria vitis*.

A partire dalla metà degli anni '90, c'è stato un aumento dell'interesse sulla trasmissione di GL mediante vettori, che ha portato alla creazione di gruppi di ricerca sull'argomento in diverse parti del mondo. Così nel 1995, Golino e collaboratori in California, hanno utilizzato *Pseudococcus affinis* (Maskell) e *Pseudococcus longispinus*, per studiare la

trasmissione di GLRaV-3 e GLRaV-2. I fitomizi sono stati lasciati ad acquisire su piante infette per 20 giorni e, poi, trasferiti su piante sane per la trasmissione per 14 giorni. Le piante sono state saggiate mediante test ELISA. Le prove condotte hanno evidenziato un tasso di trasmissione pari al 30%. Entrambe le specie erano in grado di trasmettere GLRaV-3, ma non GLRaV-2.

Nello stesso anno, in Italia, Garau *et al.* (1995), hanno effettuato una serie di prove di trasmissione utilizzando piante infette da GVA e GVB ed altri virus della vite, tra cui GLRaV-3. È stata indagata la trasmissione a piante erbacee del genere *Nicotiana* e *Gomphrena globosa* (*Amaranthaceae*), mediante neanidi di prima e seconda età di *Pseudococcus affinis*. Il periodo di acquisizione era pari a 30 o 40 giorni. Il vettore si è dimostrato in grado di acquisire GVA e GVB e trasmetterli a piante erbacee; invece non sono stati ottenuti gli stessi risultati con gli altri virus testati.

In Spagna, nel 1997, Cabaleiro e Segura hanno valutato la trasmissione di GLRaV-3 con neanidi di *Planococcus citri*. Per la determinazione del periodo di acquisizione, i vettori sono stati lasciati su viti infette 1 ora, 1 giorno, 3 giorni e 1 settimana. Il periodo minimo per l'acquisizione è risultato 3 giorni. Per la trasmissione venivano invece lasciati sulle viti per 15 giorni. È stato definito un periodo di ritenzione pari a 48h. La determinazione del virus su piante infette e vettori, è stata effettuata mediante ELISA. Le piante sono risultate infette dopo 13 mesi dall'inoculazione.

Sempre nel 1997, gli stessi Autori (Cabaleiro e Segura, 1997b) hanno condotto un'ulteriore ricerca in Spagna e, precisamente, in vigneti della Galizia dove sono presenti sia GLRaV-1 che GLRaV-3, anche se solo quest'ultimo è ampiamente diffuso. Scopo del lavoro è stato quello di valutare la diffusione di GLRaV-3 sulla base della distribuzione spaziale dei possibili vettori del virus. Sono state effettuate anche prove di trasmissione in condizioni controllate, utilizzando le neanidi allevate su piante infette. Gruppi di 20-30 neanidi erano trasferite su piante sane per la trasmissione e, dopo 1 mese, eliminate. *Planococcus citri* è risultato un vettore di GLRaV-3 sia in pieno campo che in prove di laboratorio anche se, la diffusione della malattia in campo, non è risultata correlata con la presenza del vettore.

Ancora nel 1997, Petersen e Charles hanno svolto un'indagine in Nuova Zelanda, dove GLRaV-3 è più diffuso di GLRaV-1 (ricorre nel 96,5% dei vigneti infetti testati, contro il 4% circa di GLRaV-1) e *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni* (= *affinis*) e *Pseudococcus calceolariae* (Maskell). Queste specie possono essere considerate cosmopolite e molto diffuse in Nuova Zelanda, soprattutto nei vigneti delle zone

settentrionali. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se *Pseudococcus longispinus* e *Pseudococcus calceolariae* erano vettori di GLRaV-1 e GLRaV-3 nei vigneti neozelandesi. Sono state prese in considerazione neanidi di prima e terza età. Per valutare se la concentrazione virale poteva influenzare la trasmissione mediante vettori, le prove sono state condotte prendendo in considerazione due stadi fenologici della vite: la fioritura a cui corrisponde un basso titolo virale e la maturazione quando, invece, il titolo virale è alto. Sono stati utilizzati un periodo di acquisizione e di trasmissione pari a 7 giorni in entrambi i casi. Dalle prove che sono state condotte risulta che solo le neanidi di prima età di entrambe le specie trasmettono GLRaV-3 ma non GLRaV-1. Inoltre, *Pseudococcus longispinus* è risultato essere un vettore più efficace di *Pseudococcus calceolariae*. Le conclusioni degli Autori, sono le seguenti: (a) GLRaV-1 è presente, ma non è trasmesso; (b) per la prima volta viene citato *Pseudococcus calceolariae* come vettore di GLRaV-3; (c) entrambe le specie sono in grado di trasmettere il virus anche durante la fioritura, quando la sua concentrazione è bassa.

Non sono stati però individuati, i meccanismi e l'ecologia della trasmissione di GLRaV-3 mediante i due vettori.

Un'ulteriore indagine è stata condotta sempre nel 1997 per valutare la trasmissione di GVA e GLRaV-1 mediante i Coccidi *Parthenolecanium corni* e *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon). I risultati ottenuti hanno evidenziato un'azione sinergica di GVA per la trasmissione di GLRaV-1, infatti, quest'ultimo era trasmesso da *Neopulvinaria innumerabilis*, soltanto in presenza di GVA. Invece, *Parthenolecanium corni* è risultato un vettore di GLRaV-1 ma non di GVA. Per la prima volta, viene accertata la trasmissione di GLRaV-1 mediante Coccidi (Fortusini *et al.*, 1997).

I lavori pubblicati nell'ultimo decennio, riportano le informazioni più interessanti circa la trasmissione di GL mediante Pseudococcidi e Coccidi.

Nel 2000 Golino *et al.* in California, hanno utilizzato adulti e neanidi di *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni* (Signoret), *Pseudococcus maritimus* (Ehrhorn) e *Planococcus citri* per studiare la trasmissione di GLRaV-1, -2, -3, -4. Per l'acquisizione, gli insetti sono stati lasciati sulle piante infette per 15 giorni e, per la trasmissione, gruppi di 10/20 insetti sono stati trasferiti su piante sane sempre per 15 giorni. Tutte e quattro le specie sono risultate in grado di trasmettere GLRaV-3, ma non gli altri virus testati. La determinazione del virus su piante infette è stata effettuata mediante ELISA. Gli stessi Autori, due anni dopo, (Golino *et al.*, 2002), hanno eseguito ulteriori prove di trasmissione utilizzando neanidi di prima età appartenenti alle stesse 4 specie per valutare, oltre la

capacità di trasmissione dei virus indicati precedentemente, anche quella di GLRaV-5. È stato preso in considerazione il periodo di acquisizione e trasmissione in entrambi i casi pari a 15 giorni ma, più specificamente, è stato determinato il periodo minimo sia di acquisizione che di trasmissione: meno di 1 giorno in entrambi i casi. Viene confermata la capacità di tutte le specie utilizzate, di trasmettere GLRaV-3. Inoltre, per la prima volta, è stata ottenuta la trasmissione di GLRaV-5 mediante *Pseudococcus longispinus*. Con ulteriori prove, nel 2003 gli stessi Autori, riescono ad ottenere anche la trasmissione di GLRaV-9, utilizzando sempre *Pseudococcus longispinus* (Sim *et al.*, 2003).

Sempre nel 2000, ma in Francia, Sforza e Greif hanno utilizzato 4 specie di vettori per le prove di trasmissione e, precisamente *Parthenolecanium corni* e *Pulvinaria vitis* (Coccidi), *Heliococcus bohemicus* Sulč e *Phenacoccus aceris* (Signoret) (Pseudococcidi). Le neanidi sono state prelevate in campo su piante infette singolarmente da GLRaV-1 e GLRaV-3, oppure allevate in laboratorio su germogli di patate e fatte poi acquisire su piante infette. Sono state eseguite prove di trasmissione ed è stato valutato il tempo di acquisizione (7-14 giorni) e quello di trasmissione (30 giorni). La comparsa dei sintomi si è verificata dopo 3 mesi dall'inoculo. Per la prima volta è stato ottenuto un dato sperimentale che dimostra che *Heliococcus bohemicus* è un vettore di GLRaV-1.

Tre anni dopo, Sforza *et al.* (2003), effettuano una ricerca nel Nord-Est della Francia (Borgogna, Alsazia e Champagne). Gli esperimenti avevano lo scopo di testare l'efficacia di *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris* e *Parthenolecanium corni* come vettori di GLRaV-1 e GLRaV-3. Gli insetti raccolti in campo, sono stati allevati su germogli di patate o su viti e poi fatti acquisire su piante infette. *Parthenolecanium corni* è stato invece raccolto direttamente su viti infette. Neanidi e adulti infetti, venivano lasciati sulle piante di vite sane, per circa un mese per la trasmissione. Sono stati ottenuti bassi tassi di trasmissione con tutti e tre i vettori, anche se *Heliococcus bohemicus* e *Phenacoccus aceris* risultano in grado di trasmettere entrambi i virus. Inoltre, viene confermato che *Parthenolecanium corni* è in grado di trasmettere GLRaV-1 ma non GLRaV-3.

Sempre in Italia, (Zorloni *et al.*, 2003) hanno condotto un'indagine nei vigneti dell'Oltrepò Pavese, in cui era stata frequentemente riscontrata la presenza di *Heliococcus bohemicus*. Anche in questo caso, sono state eseguite indagini per valutare la capacità del vettore di trasmettere GLRaV-3. Gli insetti, raccolti direttamente nei vigneti, sono stati lasciati ad acquisire (su piante della cv. Schiava lombarda), per 15 giorni. Per la trasmissione, sono stati utilizzati gruppi di 15-20 insetti/pianta e lasciati sulle piante sane per 15 giorni. I test ELISA condotti sulle viti dopo 3, 6 e 9 mesi dalla fine del periodo di

trasmissione, hanno confermato la capacità del vettore di trasmettere il virus. Ulteriori indagini condotte nell'anno successivo (Zorloni *et al.*, 2004), hanno avuto invece lo scopo di valutare la trasmissione di GLRaV-1, GLRaV-3 e GVA mediante *Heliococcus bohemicus* e *Planococcus ficus*. Gli insetti sono stati lasciati ad acquisire su piante infette per periodi variabili da 1 a 15 giorni. Trascorso tale periodo, sono stati trasferiti su piante sane delle cv. Barbera e Pinot Nero per un periodo di trasmissione variabile tra 3 e 21 giorni. I risultati ottenuti utilizzando il test ELISA quale metodo diagnostico hanno dimostrato, per la prima volta, che *Heliococcus bohemicus* era in grado di trasmettere GVA e hanno confermato la capacità di entrambi i vettori di trasmettere GLRaV-3.

Ancora nel 2003, GLRaV-3 e GVA sono stati oggetto di indagine in Giappone. Nakano *et al.* (2003), hanno infatti utilizzato neanidi di prima età di *Pseudococcus comstocki* (Kuwana), per eseguire prove di trasmissione. È stato valutato il periodo di acquisizione (4-11 giorni) e quello di inoculazione (7 giorni). Per l'individuazione del virus sono stati utilizzati ELISA e RT-PCR. Il vettore si è dimostrato in grado di trasmettere GLRaV-3 da viti infette a viti sane e, GVA, da viti a piante erbacee (*Nicotiana benthamiana*).

In Sud Africa, Krüger *et al.* (2006), hanno valutato la trasmissione di GLRaV-3 utilizzando neanidi di prima e seconda età di *Planococcus ficus* e *Pseudococcus longispinus*. Per la determinazione del periodo di acquisizione, i vettori sono stati lasciati su viti infette per 1-7 giorni, ma sono stati verificati anche periodi di acquisizione inferiori alle 24 ore. Il periodo minimo per l'acquisizione è risultato 1 ora. Per la trasmissione le neanidi venivano invece lasciate sulle viti sane per 1-7 giorni. La determinazione del virus su piante infette e sui vettori, è stata effettuata mediante RT-nested-spot-PCR. La prova ha messo in evidenza che, di entrambe le specie, anche un solo individuo, è in grado di trasmettere il virus. Tali risultati sono stati confermati dal lavoro di Douglas e Krüger (2006), utilizzando gli stessi vettori e lo stesso virus, ma con un periodo di acquisizione pari a 5 giorni.

Cid *et al.* (2006), hanno condotto una ricerca in vigneti della Galizia. Il lavoro aveva lo scopo di valutare l'effetto dei fattori ambientali sulla dinamica della popolazione di *Planococcus citri*. Da tale indagine è emerso che la pioggia è il fattore ambientale che influisce maggiormente sull'entità della popolazione, sia per l'effetto diretto dell'acqua sugli insetti e sia per la proliferazione di funghi parassiti. Nel corso della stessa ricerca, sono state tuttavia effettuate anche prove di trasmissione in condizioni controllate. A tale scopo, neanidi ed adulti sono stati allevati in laboratorio, su germogli di patate e fatti acquisire su piante della cv. Albariño infette da GLRaV-3, per più di 3 giorni. Per valutare

la perdita di infettività, le neanidi di prima età sono state messe su piante infette fino al raggiungimento dello stadio adulto e, poi, trasferite su piante sane per periodi variabili di 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 ore. La determinazione del virus su piante e sui vettori, è stata effettuata con IC- RT-PCR. Il lavoro ha dimostrato che la perdita dell'infettività avviene in maniera graduale.

Sempre nel 2006, Zorloni *et al.*, hanno utilizzato per prove di trasmissione virale, piante di vite delle cv. Moradella, Lambrusco viadanese e Schiava lombarda, infette da GLRaV-1, GLRaV-3 e GVA, in infezione singola o mista. Il vettore utilizzato per le prove è stato *Heliococcus bohemicus*. Sono stati valutati diversi periodi di acquisizione (4 giorni, 1, 2 e 3 settimane) e due periodi per l'inoculazione (1 e 2 settimane). L'infezione delle piante è stata valutata mediante test ELISA. Vengono confermati i risultati ottenuti nel precedente lavoro (Zorloni *et al.*, 2004), per quanto riguarda la trasmissione di GLRaV-3 e GVA mentre, GLRaV-1, non è mai stato trasmesso. Sempre nel 2006, gli stessi Autori, (Zorloni *et al.*, 2006) sono riusciti ad ottenere, per la prima volta, la trasmissione di GLRaV-3 mediante il Coccide *Neopulvinaria innumerabilis*. L'anno dopo, (Zorloni *et al.*, 2007) in una ricerca condotta per studiare l'acquisizione di GLRaV-1, hanno utilizzato *Planococcus ficus* come vettore. Sono stati valutati diversi periodi di acquisizione: 1, 2, 4, 6 ore e 1, 4, 7, 10, 15 e 21 giorni. Il periodo minimo per l'acquisizione è risultato 2 ore. Piante e insetti sono stati sottoposti a DAS-ELISA, per la determinazione del virus. Il vettore si è dimostrato in grado di acquisire GLRaV-1.

Di nuovo in Sud Africa, Douglas e Krüger (2008), hanno nuovamente impiegato *Planococcus ficus* e *Pseudococcus longispinus* come vettori di GLRaV-3. La durata del periodo di acquisizione era pari a 5 giorni, così come la durata della trasmissione e sono stati adoperati gruppi di 1, 5, 10, 20 e 40 neanidi dalla prima alla seconda età. Entrambe le specie si sono dimostrate efficaci vettori di GLRaV-3, inoltre, viene confermato che un singolo individuo infetto di entrambe le specie, è in grado di trasmettere il virus.

Sempre nello stesso anno Hommay *et al.* (2008), hanno utilizzato neanidi di prima e seconda età di *Parthenolecanium corni* per effettuare varie indagini di trasmissione che prevedevano l'uso di piante infette da GVA in infezione mista con GLRaV-1 e/o GLRaV-3. Le neanidi di prima età sono state lasciate ad acquisire su piante infette per 12 giorni e, poi, trasferite su piante sane per 8 giorni. Con le neanidi di seconda età, sono stati utilizzati gli stessi periodi di acquisizione e trasmissione ma, l'inoculazione, è stata condotta sia su piante sane di vite, che su piante di *Nicotiana benthamiana*. Entrambi gli stadi considerati, si sono dimostrati in grado di trasmettere GVA sia da vite a vite, che a *Nicotiana*

benthamiana. Inoltre, viene confermato che il vettore è in grado di trasmettere anche GLRaV-1 (sia in infezione singola, che mista con GVA), ma non GLRaV-3. Viene anche evidenziato che in tutti i casi di trasmissione da vite a vite, GVA, era sempre associato a GLRaV-1. Gli Autori ipotizzano, quindi, un'azione sinergica di GLRaV-1, durante la trasmissione.

Ancora nello stesso anno, Cabaleiro *et al.* (2008), hanno condotto un'indagine in quattro vigneti della Galizia per valutare la diffusione spaziale di GL, utilizzando diversi metodi di analisi statistica. Le piante sintomatiche sono state sottoposte a test ELISA. I risultati hanno evidenziato sia la presenza di GLRaV-1, GLRaV-2 e GLRaV-3 (quest'ultimo in percentuali più elevate), che di *Pl. citri*. Gli Autori affermano che Pseudococcidi e Coccidi sono abitualmente presenti nei vigneti indagati ma che vengono tenuti sotto controllo efficacemente sia dagli antagonisti naturali che dagli insetticidi utilizzati contro altri fitofagi. Malgrado questo, quando i vettori sono presenti, seppure in numero esiguo, la malattia si diffonde progressivamente, con incremento dal 4 al 12% ogni anno.

Infine, sempre nel 2008, in California sono state condotte indagini che avevano lo scopo di valutare alcuni parametri della trasmissione di GLRaV-3 mediante *Planococcus ficus*. Per condurre i test, sono state utilizzate neanidi di prima età ed adulti che sono stati lasciati ad acquisire su piante infette per 24 ore e, poi trasferiti su piante sane per la trasmissione. Sono stati valutati diversi periodi di acquisizione e di trasmissione: 1, 2, 4, 8, 24 e 48 ore in entrambi i casi. Inoltre, sono stati presi in considerazione anche altri parametri come il periodo di latenza, periodo di ritenzione ed il passaggio transovarico del virus nel vettore. I risultati ottenuti mediante RT-PCR hanno indicato che entrambi gli stadi considerati erano in grado di trasmettere il virus e che l'efficienza di trasmissione aumentava, con l'aumentare del periodo di acquisizione. Viene anche evidenziato che non esiste periodo di latenza e il virus viene trasmesso in maniera semipersistente, non si è verificato il passaggio transovarico del virus e, infine, i vettori perdono l'infettività dopo 4 ore dal termine del periodo di acquisizione (Tsai *et al.*, 2008).

Dalla bibliografia sopra riportata, si possono trarre le seguenti conclusioni: i vettori di GL fino ad oggi conosciuti, sono soltanto nove specie di Pseudococcidi e tre specie di Coccidi (riportati in Tabella 2). Per alcuni virus come GLRaV-2,-4,-6,-7,-8, i vettori risultano tuttavia ancora sconosciuti. Il virus più indagato è GLRaV-3 che presenta il numero più elevato di vettori. Sia le forme giovanili che gli adulti di alcune specie di Pseudococcidi e Coccidi sono in grado di trasmettere il virus. Il periodo minimo per l'acquisizione e la trasmissione è stato individuato intorno a 1 ora e, anche un solo insetto infetto, è in grado

di trasmettere il virus. Il metodo diagnostico più utilizzato è il test ELISA anche se sono necessari alcuni mesi di attesa, dopo la trasmissione, perché l'esecuzione del test sulle piante risulti attendibile. Negli ultimi anni, si è andato affermando l'uso della RT-PCR come metodo di diagnosi.

Virus	Vettore
GLRaV-1	Pseudococcidi: <i>Heliococcus bohemicus</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> . Coccidi: <i>Parthenolecanium corni</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i>
GLRaV-2	Sconosciuto
GLRaV-3	Pseudococcidi: <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Ps. affinis</i> (= <i>viburni</i>), <i>Ps. calceolariae</i> , <i>Ps. maritimus</i> , <i>Ps. comstocki</i> , <i>Planococcus ficus</i> , <i>Pl. citri</i> , <i>Heliococcus bohemicus</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> . Coccidi: <i>Pulvinaria vitis</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i>
GLRaV-4	Sconosciuto
GLRaV-5	Pseudococcide: <i>Ps. longispinus</i>
GLRaV-6	Sconosciuto
GLRaV-7	Sconosciuto
GLRaV-8	Sconosciuto
GLRaV-9	Pseudococcide: <i>Ps. longispinus</i>

Tabella 2- Virus associati all'Accartoccimento fogliare della vite e loro vettori (da Martelli, 2004 modificata).



Figura 4- Femmina di *Planococcus ficus* (Signoret).



Figura 5- Femmina di *Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti).



Figura 6- Adulti e neanidi di *Parthenolecanium corni* (Bouché)

2.3 Modalità di trasmissione

Per quanto concerne il rapporto con l'insetto vettore, i virus vengono distinti in persistenti, non persistenti e semipersistenti a seconda della loro capacità di mantenersi infettivi per un periodo di tempo più o meno lungo nel corpo o sull'apparato boccale del vettore.

I **virus persistenti (VP)**: necessitano di tempi di acquisizione piuttosto lunghi (parecchi minuti o alcune ore). Una volta acquisiti, i VP necessitano di un periodo di latenza nell'insetto che può essere di alcune ore o anche di qualche giorno (ossia il tempo occorrente per il passaggio dall'intestino all'emolinfa, fino a raggiungere le ghiandole salivari), prima di poter essere trasmessi. Trascorso tale periodo, essi possono essere trasmessi per settimane, a volte anche per l'intera vita del vettore. Anche il tempo di inoculazione è abbastanza lungo, per lo più superiore ad un'ora. Tali virus rimangono infettivi nel corpo del vettore anche dopo la muta. Sono indicati anche con il termine "circolativi" e, alcuni di essi, che sono pure in grado di moltiplicarsi nel corpo del vettore ed essere trasmessi dalla femmina infetta alla progenie sono denominati "propagativi" (Ng e Falk, 2006). Un esempio di virus persistente propagativo è rappresentato da *Tomato*

Spotted Wilt Virus (TSWV) trasmesso da *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Conti et al., 1994; Wijkamp et al., 1996).

I **virus non persistenti (VNP)**: hanno tempi di acquisizione e di inoculazione brevissimi (di secondi o alcuni minuti), non presentano un periodo di latenza nel vettore il quale è in grado di trasmetterli solamente per non più di pochi minuti o, al massimo, alcune ore. Anche la muta determina la perdita di infettività da parte del vettore. I VNP sono generalmente virus che infettano i tessuti superficiali della pianta ospite (epidermide, palizzata, parenchima). La trasmissione avviene grazie alle particelle virali che restano aderenti all'apparato boccale del vettore nel corso della nutrizione. Se tali particelle, non giungono rapidamente all'interno di una cellula vegetale suscettibile all'infezione, perdono la loro infettività. Ecco perché i VNP mancano di periodo di latenza e sono stati indicati anche con il termine di "stylet-borne" (Ng e Falk, 2006).

I **virus semipersistenti (VSP)**: presentano, nei riguardi delle modalità di trasmissione, caratteristiche intermedie fra quelle dei VP e quelle dei VNP. Infatti hanno tempi ottimali di acquisizione e di inoculazione di minuti o alcune ore. Non hanno periodo di latenza e la ritenzione di infettività dura abbastanza a lungo (da alcune ore a 1-2 giorni); il VSP però, viene perso con la muta. Tali virus sono stati indicati anche con il termine "foregut-borne" (Ng e Falk, 2006).

Il tipo di trasmissione semipersistente risulta compatibile con il meccanismo di trasmissione indicato come ingestione-rigurgito (Harris, 1981). Tale meccanismo proposto da Harris (1977) per gli Afidi, prevede che il virus sia acquisito nel corso della nutrizione e, successivamente inoculato su piante sane con il rigurgito intracellulare (che si realizza nella fase iniziale della successiva alimentazione), di una parte del succo cellulare contenente le entità infettive. Gli Afidi vengono così definiti "flying syringes" (=siringhe volanti) per distinguerli dagli Afidi che trasmettono i virus in maniera non persistente e definiti come "flying needles" (=aghi volanti).

La modalità di trasmissione di GL mediante Pseudococcidi non è stata ancora completamente chiarita. Tali insetti vengono indicati come vettori in grado di trasmettere questi virus in maniera semipersistente (Harris, 1981; Belli, 1994; Cabaleiro e Segura, 1997; Nault, 1997; Lopez-Moya, 2001; Martelli, 2002; Martelli, 2004; Andret-Link e Fuchs, 2005; Martelli e Boudon-Padieu, 2006; Ng e Falk, 2006). La modalità di trasmissione dei Coccidi viene assimilata da Martelli (2004) a quella semipersistente degli Pseudococcidi anche se, in realtà, non esistono evidenze sperimentali in merito.

Per la prima volta, nel 2007, Cid *et al.*, prospettano un diverso meccanismo di trasmissione per GLRaV-3. Le indagini sono state condotte utilizzando piante delle cv. Cabernet franc e Albariño infette da GLRaV-3 e piante della cv. Albariño infette da GLRaV-1, su cui sono state poste ad acquisire per 7 o 10 giorni, neanidi di *Planococcus citri*. Trascorso il periodo di acquisizione, gli insetti sono stati sezionati e sottoposti a IC-RT-PCR. I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza di particelle virali di GLRaV-3, nelle ghiandole salivari, mesentero, proctodeo e tubi Malpighiani. Il virus non è mai stato trovato al contrario a livello dell'apparato boccale del vettore. Tale localizzazione delle particelle virali, fa ipotizzare agli Autori un meccanismo di trasmissione di tipo circolativo per GLRaV-3. Le stesse indagini condotte con GLRaV-1, non hanno prodotto gli stessi risultati.

Interazioni virus-vettore. Come riportato nel Cap.1, la revisione tassonomica della famiglia *Closteroviridae* proposta da Karasev (2000), centrava la classificazione proprio sul tipo di insetto-vettore. I GLRaVs sono virus floematici e sono acquisiti e trasmessi dai rispettivi vettori, soltanto quando questi ultimi riescono a raggiungere il floema durante la nutrizione. Studi condotti verso la fine degli anni'90, hanno fornito importanti informazioni riguardo specifiche interazioni virus-vettore, le quali facilitano la trasmissione di molti virus (persistenti, non persistenti e semi-persistenti). In tutti i casi, le proteine del capsido o le proteine di membrana, erano implicate nella trasmissione virale mediata da insetti e, ad esempio per i *Potyvirus*, una seconda proteina HC-Pro (Helper Component proteinasi), è risultata essenziale per la trasmissione. I fattori associati con il tipo di trasmissione semi-persistente non erano conosciuti, benché fosse ragionevole credere che le proteine capsidiche avessero sicuramente un ruolo. Partendo da questi presupposti e, con lo scopo di individuare i determinanti della trasmissione semi-persistente, Tian *et al.* (1999), hanno condotto un'indagine utilizzando *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) ed il vettore *Bemisia tabaci* (aleurodide). I risultati hanno indicato che le proteine minori del capsido (CPm) risultavano fondamentali per la trasmissione del virus indagato. Gli Autori ipotizzano che le CPm possano avere un'analogia funzione per altri virus del genere *Crinivirus* e per i *Closterovirus*.

Callaway *et al.*, (2001) ipotizzano che i virus trasmessi mediante insetti possano aver adattato le loro CPs per il trasporto e per la propagazione nelle piante. Non deve quindi sorprendere che le CPs siano fattori importanti per la specificità del rapporto virus-vettore, per poter garantire la trasmissione da pianta a pianta.

È quindi ormai accertato che, nel processo di trasmissione di tipo semi-persistente, siano coinvolte le proteine del capsido ed i fattori di aiuto (Helper Component HC), come dimostrato ad esempio, per il *Virus del mosaico del cavolfiore* (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) e *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) (Andret-Link e Fuchs, 2005; Ng e Falk, 2006). Mancano, tuttavia indagini specifiche sui GLRaVs e la loro trasmissione mediante Pseudococchi e Cocchi, in grado di fornire indicazioni precise sui fattori molecolari coinvolti nel processo di trasmissione.

CAPITOLO 3

Planococcus citri (Risso) e GLRaV-1

Tra gli Pseudococcidi vettori di GL, la specie che risulta più rappresentativa e diffusa è *Planococcus citri* (Risso) (Tremblay, 1981); analogamente, tra i virus associati a GL GLRaV-1 è il virus più diffuso dopo GLRaV-3. Di seguito vengono riportate alcune delle caratteristiche principali dello Pseudococcide *Pl.citri* e di GLRaV-1.

3.1 *Planococcus citri* (Risso)

Generalità. Il genere *Planococcus* Ferris, come già indicato, appartiene alla famiglia Pseudococcidae, superfamiglia Coccoidea, ordine Hemiptera. Gli insetti appartenenti a questo genere presentano antenne di 8 articoli, 18 paia di raggi cerosi, assenza di dotti tubulari ad anello (=oral rim ducts), lobi anali con sclerotizzazione allungata e, setole dei cerari, generalmente in numero di due (le principali) (v. Fig. 7) (Tremblay, 1981).

Planococcus citri è sicuramente lo pseudococcide più dannoso e polifago presente in Italia. La prima segnalazione venne fatta da Targioni-Tozzetti nel 1881 che lo indicò come *Dactylopius brevispinus* (Marotta, 1990). Volgarmente viene detto “Cotonello degli agrumi” o “Cocciniglia farinosa o cotonosa”, a causa delle formazioni cerose che ne ricoprono il corpo. L’identificazione specifica degli Pseudococcidi è notoriamente molto difficile, richiede molto tempo ed una notevole esperienza tassonomica, non a caso, per molti anni *Pl. citri* è stato scambiato con *Planococcus ficus* (specie vicinissima a *Pl. citri* e distinguibile da esso per alcuni microcaratteri del capo e del torace) (Tremblay, 1981). L’affinità tra le due specie è comunque confermata da Rotundo e Tremblay (1976) che, utilizzando metodi sierologici (immunodiffusione e immunoelettroforesi), evidenziarono che le differenze immunologiche tra le due specie, coinvolgevano pochi componenti proteici. Nonostante la somiglianza, è comunque possibile distinguere le due specie in base agli elementi discriminanti indicati da Ezzat e McConnell (1956), attraverso le già citate differenze morfologiche microscopiche (De Lotto, 1975; Tranfaglia 1976, 1978) e, in periodi recenti, attraverso l’uso di tecniche biomolecolari (Demontis *et al.*, 2007; Saccaggi *et al.*, 2008; Cavalieri *et al.*, 2007a, b; Buonocore *et al.*, 2008).

Caratteri morfologici. La femmina si presenta con corpo ovale (lungo 1,6-3,2 mm e largo 1-2 mm), ricoperto di cera polverulenta di consistenza granulosa ai margini che lascia intravedere il colore giallo paglierino, rosa tenue o grigiastro dell'emolinfa. Sul dorso si evidenzia, dal mesotorace all'apertura anale, una banda mediana ove la cera è quasi assente. Lungo i margini del corpo si contano 18 paia di brevi raggi cerosi, conici e uguali tra loro mentre, quelli anali sono leggermente più lunghi (circa 1/6 del corpo) (Marotta, 1990).

Ventralmente sono evidenti pori multiloculari ordinati in file semplici o doppie incomplete dal V al X urite, mentre sul IV, poco sopra il circulus e sulla linea della coxa, è presente un gruppetto di 4 pori multiloculari disposti su un'unica fila. I lobi anali presentano una sclerotizzazione lineare-allungata (Pollini, 1998). I pori triloculari sono numerosi e distribuiti uniformemente; i dotti tubulari con collare sono di diversa misura in relazione al loro inserimento nelle regioni del corpo. Al dorso mancano i pori multiloculari; i dotti tubulari sono più grandi di quelli ventrali e i pori triloculari sono distribuiti uniformemente (Cox, 1989) (v. Fig. 8).

Le neanidi di prima età hanno forma ellissoidale, sono ricoperte da pochissima cera e non presentano filamenti cerosi. Le neanidi di seconda età femminile già evidenziano i raggi e la banda dorsale, oltre a due filamenti molto corti presenti all'estremità addominale. Le neanidi di terza età presentano da 4 a 8 corti filamenti verso l'estremità addominale, con i due filamenti apicali circa due volte più lunghi degli altri. Una zona tegumentale, più o meno sprovvista di cera, appare lungo la linea medio-dorsale del corpo; essa è sempre distinta sui primi tergiti addominali e si estende, talvolta, davanti e dietro questi ultimi. Il corpo è leggermente più appiattito dorso-ventralmente di quello della femmina adulta (Panis, 1969) (v. Fig. 9).

Quando il numero delle Cocciniglie è limitato o, quando le osservazioni sono fatte su specie o organi vegetali differenti, è possibile l'identificazione dello stadio di sviluppo con l'aiuto di caratteri macroscopici. Questi ultimi, sono tuttavia inutilizzabili per le neanidi appena nate o che hanno mutato da meno di 24 ore (Panis, 1969).

Il maschio è alato con corpo sottile, più robusto al torace che è di colore giallo oca, mentre l'addome è decisamente più chiaro, le appendici sono brune; distalmente vi sono due raggi cerosi, lunghi poco meno del corpo stesso (Marotta, 1990).

Biologia. Nei nostri ambienti *Pl. citri* si moltiplica attraverso un numero variabile di generazioni in funzione delle condizioni ambientali. Nelle regioni meridionali ne svolge in genere 4-6 all'anno, con popolazioni che raggiungono la massima densità in autunno. In

quelle settentrionali le generazioni si riducono a 2-3, mentre nelle serre riscaldate la cocciniglia si moltiplica ininterrottamente ed è contemporaneamente presente con diversi stadi di sviluppo. All'aperto e nelle zone agrumicole lo svernamento avviene in qualsiasi stadio di sviluppo, con prevalenza di neanidi della seconda età annidate nei punti più riparati della corteccia dei rami e del tronco e, in taluni casi, addirittura interrate al colletto della pianta (Pollini, 1998). Al Sud, nelle viti in pieno campo, l'ovideposizione inizia in Febbraio-Marzo, ma soltanto in primavera inoltrata si ha la migrazione delle neanidi sui tralci e, in Luglio-Settembre, sui grappoli. In caso di forti infestazioni e andamento climatico favorevole, si ha lo sviluppo di popolazioni sulle foglie in tardo autunno (Longo *et al.*, 1991). Le pullulazioni sono favorite dai fattori microclimatici (poca luce, scarsa aerazione, elevata umidità), dalla tecnica colturale (concimazioni azotate elevate, sistema di allevamento espanso, vegetazione lussureggiante) e anche dall'azione esercitata dagli insetticidi sulle popolazioni degli antagonisti naturali (Buonocore *et al.*, 2008).

La specie è anfigonica ma può, occasionalmente, riprodursi per partenogenesi telitoca. Le femmine, al momento della ovideposizione, formano un ovisacco lasso di candida cera fioccosa entro il quale depongono fino a 600 uova di colore giallastro. Le neanidi nascono dopo un periodo d'incubazione di pochi giorni e vanno ad aumentare la densità delle colonie preesistenti oppure colonizzano nuove parti vegetative (Pollini, 1998). In particolare, le neanidi della linea femminile attraversano dei periodi di attività trofica alternati a periodi in cui l'alimentazione viene sospesa per 3-4 giorni, dopo i quali compiono la muta. Nella linea maschile, la neanide di seconda età cessa di nutrirsi e completa il ciclo biologico all'interno di un bozzolo ceroso. Il maschio vive in media 1-5 giorni e può fecondare diverse femmine (Panis, 1969).

Distribuzione geografica. Questo pseudococcide, è diffuso in quasi tutte le aree temperate e calde del pianeta, mentre in quelle più fredde si trova all'interno delle serre riscaldate. In Italia è comunissimo nelle zone agrumicole, ma è presente anche nelle regioni settentrionali (Pollini, 1998).

Piante ospiti. La cocciniglia infesta soprattutto gli agrumi, ma attacca anche la vite, il kaki (*Diospyros kaki* L.) e il fico (*Ficus carica* L.). Sovente essa vive associata a *Pseudococcus longispinus*, su svariate piante ornamentali (Pollini, 1998).

Parti attaccate e danni. I danni provocati da *Pl. citri* sono distinguibili in diretti e indiretti. I danni diretti sono legati alla suzione della linfa della pianta ospite, con conseguente ingiallimento e disseccamento delle parti aeree. I danni indiretti consistono nella produzione di abbondante melata, come conseguenza dell'attività trofica, sulla quale

si insediano funghi microscopici (fumaggini) che ostacolano le funzioni fisiologiche della pianta. Particolare importanza, tra i danni indiretti, assume la trasmissione di virus come ad esempio, GLRaV-3 (Buonocore *et al.*, 2008).

Sugli agrumi la cocciniglia infesta le foglie dei germogli e si localizza preferibilmente intorno al peduncolo dei frutti o sotto la rosetta, nonché nei punti di contatto di questi con altri organi, soprattutto nelle parti più ombreggiate della chioma. Sulle viti infesta i germogli e soprattutto i grappoli, mentre sul kaki si localizza sotto le brattee calicine del frutto. Sulle piante ornamentali attacca invece foglie, guaine, germogli e ramificazioni.

Sugli agrumi le colonie presenti intorno al peduncolo provocano l'ingiallimento e la caduta dei frutti, soprattutto quando la stagione decorre siccitosa e intervengono venti caldi e asciutti. Sulla vite la cocciniglia imbratta con le sue secrezioni ceroso-zuccherine i grappoli, favorisce lo sviluppo della fumaggine e ostacola il processo di maturazione dell'uva. Sulle piante ornamentali le infestazioni provocano ingiallimenti e deperimenti vegetativi, la caduta delle foglie e, nei casi più gravi, anche la morte della pianta (Pollini, 1998).

Difesa. Le infestazioni del “cotonello” possono essere ostacolate effettuando adeguate potature di sfoltimento, al fine di favorire la circolazione della luce e dell'aria, e riducendo le concimazioni azotate. Per contenere lo sviluppo delle popolazioni di cocciniglia può essere sfruttata l'attività dei predatori eventualmente presenti o introdotti con lanci come accade per *Leptomastix dactylopii* Howard (Imenottero Calcidoideo) e *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleottero Coccinellide), utilizzati entrambi in programmi di lotta biologica. Eventuali interventi con olio bianco attivato con dosi ridotte di fosfororganici possono essere realizzati in primavera-estate, o meglio a fine estate quando ha inizio il passaggio delle cocciniglie sui frutti, avendo cura di bagnare bene la parte interna della chioma dove sono maggiormente presenti i centri d'infestazione. Quando la popolazione è già elevata i trattamenti sono meno efficaci poiché le uova e parte delle neanidi riparate negli ovisacchi riescono a sfuggire ai trattamenti. Tra i preparati impiegabili per attivare gli oli bianchi, sono da citare piretroidi e alcuni fosfororganici a bassa tossicità (Pollini, 1998).

Ruolo dell'insetto come vettore. Il meccanismo della trasmissione dei GLRaVs risulta a tutt'oggi non chiaro. Nonostante la mancanza di evidenze sperimentali conclusive, è stato generalmente assunto che la trasmissione di GLRaV-3 e di altri membri del genere *Ampelovirus* è di tipo semipersistente (Martelli *et al.*, 2002). Benché GLRaV-1 sia filogeneticamente correlato con GLRaV-3 (Martelli *et al.*, 2002), ha differenti vettori. Soltanto due pseudococcidi, *Phenacoccus aceris* e *Helicococcus bohemicus*, e il coccide

Phartenolecanium corni (Sforza *et al.*, 2003) è stato accertato che siano in grado di trasmettere GLRaV-1 mentre, secondo Golino *et al.*, (2000; 2002) il virus non sembrerebbe trasmesso da *Pl. citri*.

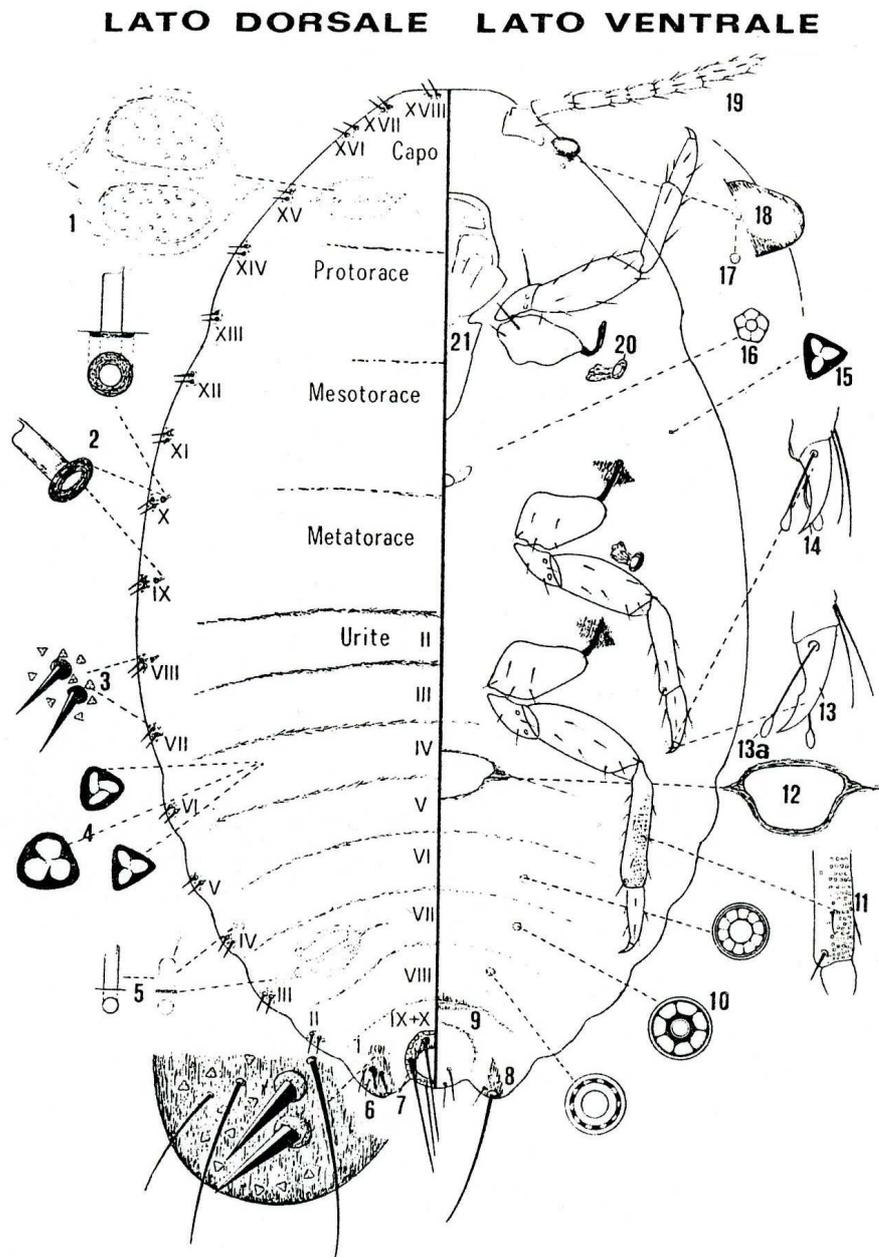


Figura 7- Schema della struttura di uno Pseudococcide. 1, ostiolo. 2, dotto a margine ispessito (oral rim duct). 3, cerario. 4, pori triloculari. 5, dotti tubulari. 6, sclerotizzazione dorsale del lobo anale. 7, anello anale. 8, sclerotizzazione ventrale del lobo anale. 9, vulva. 10, pori multiloculari. 11, pori traslucidi. 12, circulus. 13, unghia con denticolo. 13a, digitulo. 14, unghia senza denticolo. 15, poro triloculare. 16, poro quinqueloculare. 17, poro perioculare. 18, occhio. 19, antenna. 20, stigma toracico anteriore. 21, rostro (da Tremblay, 1981).



Figura 9- *Planococcus citri* (Risso). A. Neanide di prima età (N1), B. neanide di seconda età (N2), C. neanide di terza età (N3), D. femmine neoteniche.

3.2 GLRaV-1 virus associato all'Accartocciamento fogliare della vite

Come già indicato, GLRaV-1 appartiene alla famiglia *Closteroviridae* genere *Ampelovirus*. In particolare, il virus possiede un genoma ad RNA incapsidato in particelle filamentose, monopartito a singola elica positiva (ssRNA) di 19,5 kb, contiene 10 griglie di lettura (ORF) e una regione non trascritta (NCR) all'estremità 3'. Il primo ORF (ORF 1a) di 1196 nt codifica per una elicasi (HEL) con una notevole similarità delle sequenze con le HEL di altri *Closterovirus*. Il secondo ORF di 1580 nt (ORF 1b) perde un codone iniziale e si sovrappone per almeno 50 nt sull'ORF 1a, ed il suo prodotto di traduzione è una proteina che presenta sequenze simili alle RNA polimerasi RNA-dipendenti (POL) di altri *Closterovirus*. L'ORF 2, seguito da una larga regione non tradotta (NCR) di 793 nt, codifica per una piccola proteina idrofobica, indicata come proteina 7 (p7). L'ORF 3, invece, codifica per una proteina omologa alla famiglia heat shock proteins 70 (HSP70). L'ORF 4, che si sovrappone all'ORF 3 con 1 nt, codifica per la proteina simile all'heat shock proteins 90 (HSP90). L'ORF 5 codifica per la proteina capsidica (CP) e gli ORF 6 e 7 forniscono dei prodotti di traduzione di 500 e 440 aminoacidi rispettivamente, la cui sequenza aminoacidica è indicata con p56 (ORF 6) e p50 (ORF 7). L'allineamento delle sequenze rivela una similitudine con il prodotto ORF 5 individuando la duplicazione in due forme minori (CPm1 e CPm2) della proteina del capsido. Infine, gli ultimi ORF 8 e 9 codificano per proteine costituite, rispettivamente, da 189 e 210 aminoacidi, la cui funzione nella moltiplicazione virale o nella patogenesi rimane ancora sconosciuta. Il genoma di GLRaV-1, contiene infine una NCR di 363 nt all'estremità 3', terminante con ATT. Analisi filogenetiche dei geni di GLRaV-1 hanno evidenziato una maggiore correlazione tra GLRaV-1 e GLRaV-3 piuttosto che con altri *Closterovirus* (Fazeli e Rezaian, 2000).

Il sequenziamento del genoma di GLRaV-1 si è rivelato estremamente difficile in rapporto alla presenza di un insolito elevato grado di variazione riscontrato nelle sequenze a livello degli ORF 3, 6 e 7. Per altro, le variazioni osservate non alteravano in maniera significativa la sequenza aminoacidica la cui funzionalità nella replicazione virale, non veniva compromessa (nessuna delezione o addizione) per la conservazione delle proprietà fisico-chimiche simili. Studi sulla variabilità molecolare dell'ORF 4 (HSP70) di GLRaV-1 hanno rivelato la presenza di due gruppi di isolati virali distinti, identificati come gruppo A (americano) e gruppo E (europeo) (Komínek *et al.*, 2005; Little *et al.*, 2001). Ulteriori

indagini sulla variabilità genetica della CP di GLRaV-1 sono stati riportati anche da Gugerli (2003).

Nel caso dei *Closteroviridae*, l'esistenza di infezioni miste nello stesso ospite è stata più volte descritta (Roy e Brlansky, 2004; Ayllon *et al.*, 2001), così come frequentemente osservato, più in generale, per i virus infettanti colture perenni. La propagazione vegetativa degli ospiti fornisce nel tempo un'elevata potenzialità per l'induzione di mutazioni genetiche dei virus la cui eterogeneità di popolazione garantisce un importante requisito per la loro competitività e sopravvivenza ai cambiamenti ambientali. D'altra parte, le scarse informazioni disponibili sulla presenza di vettori di GLRaV-1 hanno fatto ritenere la propagazione vegetativa come il mezzo di diffusione più efficace per questo virus (Little *et al.*, 2001) riducendo notevolmente la selezione genetica operata, invece, dalla trasmissione per insetti.

Le evidenze sperimentali sopra riportate hanno suggerito, quindi, l'esistenza di popolazioni eterogenee di GLRaV-1, probabilmente risultanti sia dalla mancanza di una pressione selettiva sia dalla coesistenza di una miscela di ceppi virali connessa alle pratiche viticole di propagazione vegetativa che sono state effettuate nel corso dei secoli (Gugerli, 2003).

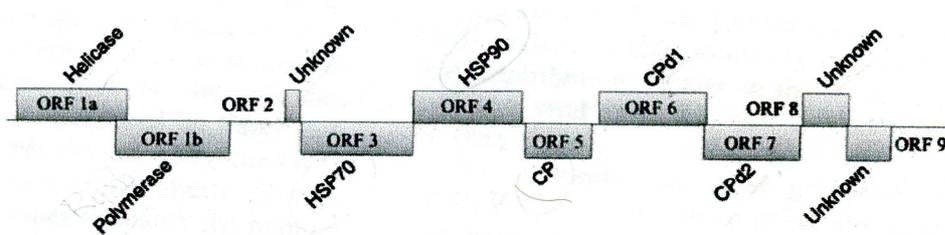


Figura 10- Rappresentazione schematica del genoma di GLRaV-1, in cui è riportata la sequenza degli ORF e la funzione dei geni (da Little, 2001).

CAPITOLO 4

Scopi della ricerca

Nonostante siano state condotte numerose ricerche, che avevano lo scopo di valutare la possibilità di trasmissione dei GLRaVs mediante Pseudococcidi e Coccidi, molti aspetti restano ancora da chiarire. Tra questi, in particolare, risultano ancora molto scarse le notizie sul possibile ruolo svolto da *Planococcus citri* nella trasmissione di GLRaV-1 che, pur essendo il virus più diffuso dopo GLRaV-3 è, al momento, ancora poco indagato.

E, proprio l'insolita diffusione di GLRaV-1 in vigneti della cv. Sagrantino situati nella zona di Montefalco (PG) e le ripetute segnalazioni della presenza di *Planococcus citri* in tale zona, hanno fatto ritenere utile un'indagine su questo particolare binomio.

Quindi, l'obiettivo della presente ricerca, è stato quello di valutare la capacità di ogni singolo stadio preimaginale e della femmina di *Planococcus citri* di acquisire e trasmettere GLRaV-1.

CAPITOLO 5

Materiali e metodi

5.1 Allevamento di *Vitis vinifera*

Le indagini sono state condotte su materiale derivato da piante di *V. vinifera* cv. Sagrantino, individuate nel corso di indagini di selezione sanitaria in vigneti situati a Montefalco (PG) e effettuate dalla Sezione di Patologia Vegetale del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose “G. Scaramuzzi”.

I tralci legnosi sono stati raccolti durante il riposo vegetativo e mantenuti in cella climatica a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, per circa un mese. Successivamente, dopo aver ricavato talee di circa 20 centimetri, si è proceduto al loro trattamento con Benomyl utilizzando il prodotto commerciale Benlate alla concentrazione di 1g l^{-1} per 20 minuti e, quindi, ad immergere la porzione basale di ciascuna talea in una soluzione di acido 3-indol-butirrico (IBA), alla concentrazione di $0,25\text{ g l}^{-1}$ per 15 secondi, al fine di promuovere un migliore sviluppo radicale. Le talee, quindi, sono state poste a radicare in perlite su appositi bancali riscaldati all'interno di una serra. Dopo circa 40 giorni, le talee radicate sono state trapiantate in vaso, utilizzando una miscela sterile di terriccio e torba (1:1) e, quindi, collocate all'interno di uno screen-house al fine di impedire eventuali infezioni virali accidentali. Tutte le piante così ottenute sono state sottoposte a saggi di controllo sanitario mediante test ELISA, per l'eventuale accertamento della presenza di *Virus associati all'Accartocciamento fogliare della vite* (*Grapevine leafroll associated viruses* GLRaV-1,-2,-3,-7), *Virus della maculatura infettiva della vite* (*Grapevine fleck maculavirus* GFkV), *Virus dell'ariccamento della vite* (*Grapevine fanleaf nepovirus* GFLV), *Virus A della vite* (*Grapevine vitivirus A* GVA), *Virus B della vite* (*Grapevine vitivirus B* GVB), *Virus del mosaico dell'arabis* (*Arabic mosaic nepovirus* ArMV). I saggi condotti hanno permesso di identificare i ceppi di Sagrantino infetti singolarmente da GLRaV-1 e quelli esenti da tutte le infezioni considerate. Questi materiali, allevati nelle stesse condizioni ambientali in apposito screen-house, sono stati utilizzati in questo studio per la verifica delle possibilità di acquisizione e trasmissione del virus tramite *Planococcus citri* (Risso).

5.2 Allestimento della coltura di vite *in vitro*

La collezione *in vitro* è stata ottenuta utilizzando il materiale di potatura delle piante allevate in screen-house. Le talee legnose trattate con Benlate in ragione di 1gl^{-1} per 20 minuti, sono state mantenute in cella climatica a $25\pm 0.5^\circ\text{C}$, UR 100% per circa 4 settimane. Dai giovani germogli che avevano raggiunto una lunghezza di circa 15-20 cm, sono state ottenute talee uninodali di circa 1 cm che erano sterilizzate inizialmente con alcool assoluto al 70% per 40 secondi e, quindi, in una soluzione di ipoclorito di sodio al 16% a cui erano stati aggiunti $0,05\text{ ml l}^{-1}$ di Tween 20, per circa 15 minuti.

Al termine della disinfezione le talee sono state sciacquate 3 volte con acqua distillata sterile, poste nei tubi da saggio contenenti 10 ml di substrato agarizzato.

Il mezzo di crescita utilizzato era quello indicato da Quorin e Lepoivre (1977) (vedi Allegato A), autoclavato alla temperatura di 120°C per 20 minuti, prima di essere utilizzato.

Le colture *in vitro* sono state mantenute in una camera di crescita alla temperatura di $23\pm 0.5^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo di 16 ore, assicurato da tubi fluorescenti (Philips TLD 18 W33) che mantenevano un'intensità luminosa di $50\ \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e trasferite con subculture di 40 giorni.

Dopo la fase di acclimatazione, la condizione sanitaria di ciascuna plantula è stata controllata mediante test ELISA.

5.3 Allevamento di *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera Pseudococcidae)

Planococcus citri (Risso), viene allevato da alcuni anni presso il laboratorio di lotta biologica della Sezione di Entomologia del Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi". Lo Pseudococcide, è stato inviato ad uno specialista per la conferma della determinazione specifica.¹

Per l'allevamento di questo Pseudococcide, vengono utilizzati tuberi di patata (*Solanum tuberosum* L. cv. Almera). Questa specie, dai tuberi a buccia gialla, produce getti robusti e duraturi sui quali la cocciniglia è in grado di proliferare. Si è preferito utilizzare questo ospite vegetale rispetto a piante di *Phaseolus vulgaris* L. (Nakano *et al.*, 2003), oppure *Cucurbita moschata* Duchesne (*Cucurbitaceae*) e *Alocasia macrorrhizos* L. (*Araceae*)

¹ Ringrazio sentitamente il Prof. A. Tranfaglia del Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali dell'Università degli Studi della Basilicata, per la conferma della determinazione specifica.

(Douglas e Krüger, 2006), per la maggiore facilità con cui la patata può essere reperita in commercio nell'arco dell'intero anno.

Le patate da seme erano poste a germogliare in termostato a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e mantenute al buio. L'interno del termostato era organizzato con ripiani estraibili e fondo in rete metallica, su cui poggiavano i tuberi. Nelle condizioni sopra indicate, nell'arco di 30 giorni si sviluppavano germogli eziolati di 10-15 cm di lunghezza idonei per la successiva infestazione (v. Fig. 11). Periodicamente, la gestione dell'allevamento di *Pl. citri* prevedeva il rinnovo del substrato di allevamento cioè, la sostituzione delle patate esauste con altre neo-germogliate in un termostato analogo al precedente, dove era mantenuto l'allevamento massale della cocciniglia.



Figura 11– Allevamento di *Planococcus citri* su germogli eziolati di patate.

5.4 Indagini sulla biologia di *Planococcus citri*

Le indagini, riguardanti la biologia dell'insetto, sono state suddivise in tre fasi principali:

5.4.1 Individuazione dell'*optimum* termico

Per individuare la temperatura più idonea a cui svolgere le prove di acquisizione e trasmissione del virus, sono stati condotti saggi termici preliminari sugli stadi preimaginali e sulle femmine di *Pl. citri*. Le singole neanidi di prima età (N1) sono state ottenute da uova prelevate con l'ovisacco dall'allevamento massale, al fine di evitare danni durante le

manipolazioni e per impedirne la disidratazione. Gli ovisacchi sono poi stati posti in piastre Petri e, le uova, fatte schiudere in cella climatica ad una temperatura di $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, ed a una UR > 70%. Quindi, le neanidi neo-sgusciate da 2- 4h, sono state poste in celle di Huffaker (Huffaker, 1948) fino al raggiungimento dello stadio adulto. La cella di Huffaker (v. Fig. 12) ha dimensioni di 10 cm x 4,5 cm x 2 mm e presenta una struttura “a sandwich” così costituita (a partire dal basso verso l’alto): una lastra di vetro, uno strato di carta assorbente, il supporto vegetale, un’anima centrale di plexiglass di spessore pari a 1 cm e recante un foro circolare nella zona centrale che crea una camera entro cui sono poste le neanidi ed una lamina di vetro superiore che chiude la cella. La struttura così formata è mantenuta ferma da due spessi elastici laterali. Nel caso specifico, il supporto vegetale è costituito da una foglia di vite intera con il picciolo che pesca in una provetta Eppendorf piena di acqua, con la funzione di mantenere fresca la foglia.



Figura 12- Cella di Huffaker

Le indagini sono state condotte alle seguenti condizioni sperimentali: $15\pm 1^{\circ}\text{C}$, $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo L:D =16:8, UR > 70%. I dati ottenuti hanno riguardato la valutazione della mortalità percentuale dei vari stadi di sviluppo a quattro diverse temperature, con la finalità dell’individuazione dell’*optimum* termico a cui eseguire le prove.

5.4.2 Determinazione della durata minima di ogni stadio giovanile

Una volta individuata la temperatura ottimale a cui condurre i test e, al fine di stabilire se un determinato stadio giovanile era in grado di acquisire e trasmettere il virus, risultava determinante la definizione della durata minima di tale stadio preimarginale alla temperatura individuata, in modo da effettuare i test nell'ambito dell'intervallo temporale individuato. A tale scopo, sono state svolte indagini di laboratorio tese alla determinazione della durata minima di tutti gli stadi preimarginali del vettore.

a) Durata minima *in vivo* per l'acquisizione

Per lo svolgimento delle prove, sono state utilizzate le stesse celle di Huffaker con il medesimo supporto vegetale precedentemente indicato, mantenute alla temperatura individuata, fotoperiodo L:D=16:8 ed a una UR > 70%.

La durata del singolo stadio è stata considerata quella che intercorre tra la schiusura delle uova e la muta per le N1 e, come intervallo tra una muta e la seguente, per le altre età (neanidi di seconda età N2 e neanidi di terza età N3). I controlli venivano effettuati ogni 24h. La certezza del passaggio da una età preimarginale alla successiva, veniva fornita dal ritrovamento dell'esuvia neanidale abbandonata sulla foglia e individuabile al microscopio.

b) Durata minima *in vitro* per la trasmissione

Parallelamente alle prove di durata preimarginale *in vivo*, sono state condotte indagini che avevano lo scopo di verificare:

- a) la capacità dell'insetto di svilupparsi su espianti *in vitro*;
- b) la compatibilità del binomio *Pl. citri/V. vinifera in vitro*;
- c) la verifica della durata minima di ogni stadio giovanile *in vitro*.

Per l'allestimento delle prove *in vitro*, in cabina a flusso laminare, sono state prelevate le uova con l'ovisacco da femmine ovigere, poste in piastre Petri sterili e fatte schiudere in cella climatica a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo L:D 16:8 e UR > 70%. Le N1 neo-sgusciate sono state prelevate con un pennellino, precedentemente sterilizzato con raggi UV e trasferite su espianti sani di vite.

Le plantule di circa 3 cm, erano caratterizzate da almeno due palchi di foglioline espanse sulle quali erano appoggiate le N1 (non più di 3 neanidi per espianto). Le neanidi sono state controllate ogni 24h fino al raggiungimento dell'età adulta registrando la durata di ogni singolo stadio di sviluppo. Le condizioni sperimentali nelle quali si sono svolte le indagini sono le medesime riportate per l'allevamento della coltura *in vitro*.

5.5 Indagini di acquisizione e trasmissione

Le ricerche si sono svolte in due fasi: in una prima fase è stata valutata la capacità di acquisizione del virus da parte del vettore e, nella seconda, è stata determinata l'eventuale trasmissione dell'infezione virale da parte del vettore su un ospite sano.

5.5.1 Acquisizione

Le prove sono state condotte impiegando sia gli stadi giovanili neo-mutati (neanidi di prima, seconda e terza età) sia femmine neo-sfarfallate, ed utilizzando un periodo di acquisizione (Acquisition Access Period AAP) pari a 5 giorni.

Gli individui di ogni stadio considerato (N1 sgusciate dall'uovo da 0-4 h o N2 e N3 neo-mutate da 0-4 h) sono stati trasferiti dal substrato di allevamento (costituito da foglie recise di vite sane), su quelle infette da GLRaV-1, precedentemente saggiate. Su ogni foglia, in cella di Huffaker, sono stati posti 5 esemplari. Ogni singola prova è stata replicata 10 volte. Le celle di Huffaker sono state mantenute a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con fotoperiodo L:D = 16:8 e UR > 70%. Il testimone di controllo era costituito da insetti posti nelle medesime condizioni su foglie di vite non infette.

Al termine del periodo di acquisizione, sono state effettuate analisi biomolecolari (Spot-OneStep RT-PCR), per la verifica della presenza del virus nell'insetto.

5.5.2 Trasmissione

La metodologia utilizzata per le indagini inerenti la trasmissione di GLRaV-1, ha previsto l'allevamento *in vitro* dell'ospite. I saggi virologici condotti sui tessuti degli espianti, mediante Spot-OneStep RT-PCR, hanno permesso il riscontro immediato dei risultati conseguiti al termine di ogni prova di inoculazione di *Pl. citri*, diversamente da quanto previsto dalle procedure condotte sulle piante allevate *in vivo* che prevedono periodi di latenza molto più lunghi (Golino *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2003; Sforza *et al.*, 2003; Zorloni *et al.*, 2006; Hommay *et al.*, 2007; Douglas e Krüger, 2008).

Le indagini hanno previsto un AAP *in vivo* alle medesime condizioni sperimentali sopra riportate, con la riduzione a soli 2 giorni, poiché il periodo di acquisizione più quello di trasmissione non doveva superare il periodo fissato pari a 5 giorni, relativo alla durata dello stadio preimaginale.

Dal punto di vista operativo, dopo che gli insetti avevano trascorso l'AAP *in vivo*, venivano prelevati con il pennellino e, in condizioni di sterilità, trasferiti su espianti sani di

vite *in vitro*, sui quali rimanevano per un periodo di trasmissione (Inoculation Access Period IAP) di 3 giorni.

Al termine di tale periodo, sia gli espianti che i relativi vettori potenzialmente infetti, sono stati sottoposti alle analisi biomolecolari precedentemente indicate.

5.6 Indagini sulle modalità di trasmissione

Per valutare se la trasmissione di GLRaV-1 è di tipo circolativo o non circolativo sono state utilizzate N3 neo-mutate su foglie di vite sane. Queste sono state poste ad acquisire su foglie infette per AAP pari a 2 giorni e mantenute nelle medesime condizioni indicate in precedenza. Trascorso tale periodo, una parte della popolazione è stata utilizzata per la verifica dell'avvenuta acquisizione, mentre la restante parte, è stata posta su patate neo-germogliate e mantenute nelle consuete condizioni sperimentali, fino al raggiungimento dell'età adulta. Infatti, come è noto, con la muta dell'insetto il tegumento del primo tratto dell'apparato digerente che comprende anche le appendici boccali viene rinnovato e le eventuali particelle virali presenti conseguentemente perse. Dopo l'avvenuta muta su patata, alcuni individui sono stati quindi saggiati per verificare la presenza del virus, i restanti sono stati trasferiti su espianti sani di vite per 3 giorni. Al termine di tale periodo, sia gli insetti che gli espianti sono stati sottoposti ad analisi mediante test biomolecolare (Spot-OneStep RT-PCR).

Dato che i virus non circolativi di tipo semi-persistente permangono nel vettore per un periodo compreso tra alcune ore e 1-2 giorni, diversamente dai virus non persistenti che vi rimangono solo per pochi minuti (Ng e Falk, 2006), sono state condotte indagini volte alla verifica del mantenimento dell'infettività da parte del vettore.

A questo scopo, le N3 sono state poste ad acquisire su foglie infette ed al termine del AAP collocate all'interno di camere umide per assicurare al vettore un periodo di digiuno di almeno 3 ore. Trascorso questo periodo, sono state trasferite su espianti sani di vite per l'IAP e successivamente, espianti ed insetti sono stati sottoposti a Spot-OneStep RT-PCR.

5.7 Indagini diagnostiche

5.7.1 Saggio immunoenzimatico ELISA

Con lo scopo di accertare lo stato sanitario delle piante in vaso, da cui sono state prelevate le foglie da utilizzare per le prove di acquisizione e degli espianti da utilizzare per le prove di trasmissione, sono stati condotti saggi DAS-ELISA, seguendo la procedura messa a punto da Clark e Adams (1977), utilizzando gli anticorpi specifici per GLRaV-1 (Agritest Bari, Italia).

La composizione dei diversi tamponi adoperati, è riportata nell'Allegato B.

Il saggio ELISA è stato condotto in piastre da 96 pozzetti sensibilizzate per 3 h a 37°C con le IgG purificate di un anticorpo policlonale (Pab) specifico per GLRaV-1, diluite 1:500 in tampone di sensibilizzazione, utilizzandone 150 µl/pozzetto. Gli anticorpi non adsorbiti, sono stati eliminati attraverso 3 lavaggi intervallati da 3 minuti, con tampone di lavaggio. Porzioni di tessuto vegetale sono stati omogeneizzati in tampone di estrazione in rapporto 1:10 (w/v). 150 µl di estratto, sono stati trasferiti nei pozzetti sensibilizzati (3 pozzetti per ogni campione), ed incubati per 12 h a 4°C. Il campione è stato rimosso mediante 3 lavaggi intervallati da 3 minuti con tampone di lavaggio. Successivamente, sono stati aggiunti 150 µl/pozzetto di IgG coniugate alla fosfatasi alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), diluite 1:500 in tampone di coniugazione e, poi, incubati per 3 h a 37°C. Al termine, le piastre sono state nuovamente lavate, come indicato precedentemente, ed incubate con il substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) dissolto, ad una concentrazione di 1mg/ml, in tampone substrato. Le piastre sono state incubate per circa 2 ore a temperatura ambiente per lo sviluppo della reazione colorimetrica, quantificata mediante lettura fotometrica a 405 nm con un lettore ELISA (Titertek Multiskan Plus).

5.7.2 Saggio molecolare

Questo test diagnostico è suddiviso in due fasi: estrazione dell'acido nucleico mediante "Spot" seguita dall'amplificazione genica (PCR), mediante la procedura Qiagen (One-Step RT-PCR).

a) Estrazione di acidi nucleici totali con "Spot"

Per l'estrazione degli acidi nucleici totali, è stato adoperato un protocollo che prevedeva lo "spot" su membrana (Osman e Rowhani, 2006), poiché tale metodo si è rivelato

particolarmente utile e adatto per saggiare dischi fogliari lasciando inalterato il restante lembo fogliare, così disponibile a successive indagini. Inoltre, risulta un metodo particolarmente sensibile anche con quantitativi ridotti di materiale (es. insetti).

Nel caso specifico, il test ha permesso di verificare la presenza dell'infezione sulla stessa foglia su cui sono state condotte le successive prove di acquisizione.

La composizione dei tamponi utilizzati è riportata nell'Allegato C.

Foglie di vite *in vivo*: sono stati prelevati due dischi di tessuto di 15 mm di diametro (v. Fig. 13) e macinati in tampone di estrazione in rapporto 1:20 (w/v). 10 µl di estratto, sono stati posti su membrane Nylon N⁺ (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland), precedentemente tagliate in quadratini delle dimensioni di 5x5 mm. Le membrane sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente per 30-60 minuti. Per il rilascio dell'acido nucleico, le membrane sono state poste in microtubi da 1,5 ml, sono stati aggiunti 100 µl di tampone GES, lasciate a 95°C per 10 minuti, agitate vigorosamente e messe in ghiaccio per 5 minuti. Successivamente, sono stati recuperati i 100 µl, posti in nuovi microtubi e conservati a -20°C.



Figura 13- Foglia da cui sono stati prelevati i due dischi di tessuto da utilizzare per l'estrazione.

Espianti *in vitro*: porzioni di espianto sono stati processati seguendo la stessa procedura sopraindicata.

Insetti: la differente tipologia di tessuto di partenza, ha reso necessario modificare il protocollo di estrazione dell'RNA per ottimizzare la resa di acido nucleico utilizzabile per la successiva fase di amplificazione genica.

In particolare, agli insetti posti in Eppendorf sono stati aggiunti 10 μ l di “tampone di estrazione” e macinati con un omogeneizzatore a batteria (Sigma Z35.997-1EA) (Velasco *et al.*, 2006), dotato di micropestelli (v. Fig. 14). Quando era raggiunto un buon livello di omogenato, sono stati aggiunti ulteriori 10 μ l di “tampone di estrazione” per recuperare il campione rimasto sul micropestello e centrifugati per alcuni secondi. Da ogni microtubo sono stati prelevati 10 μ l da porre su membrana e procedendo secondo la modalità indicata precedentemente per il materiale vegetale (v. Fig. 15).

Al fine di individuare la soglia minima di rilevabilità del titolo virale da parte di questa metodologia sugli insetti, sono stati costituiti gruppi di individui di numero variabile da 1 a 8 per ogni stadio considerato, per l'estrazione degli acidi nucleici totali.



Figura 14– Omogeneizzatore a batteria dotato di micropestello utilizzato per macinare gli insetti.

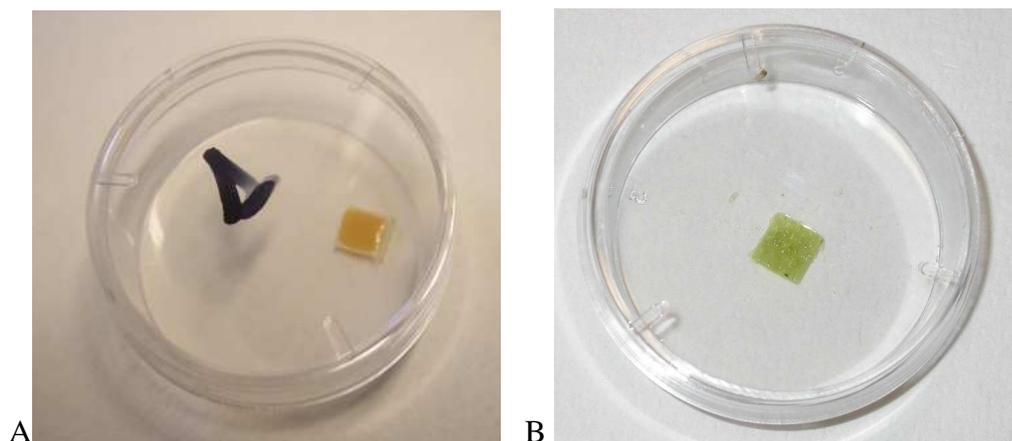


Figura 15– Spot su membrana: A. insetti; B. foglie.

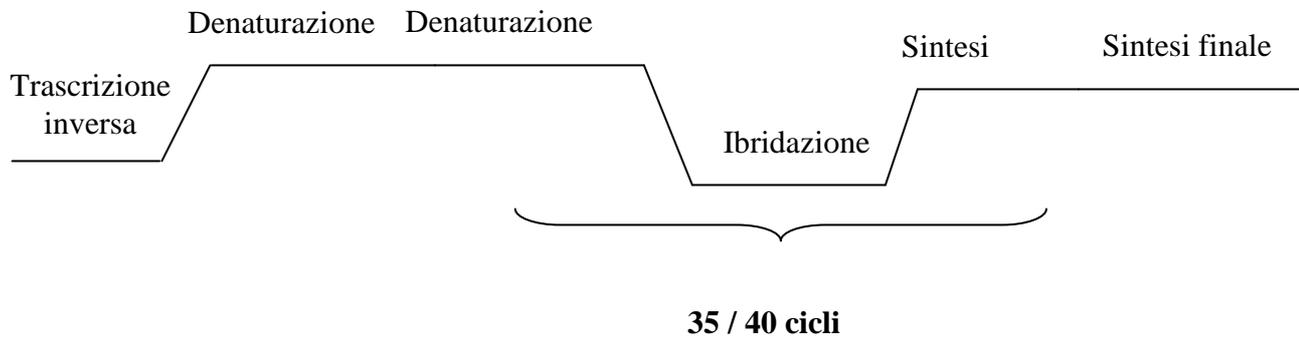
b) One-Step RT-PCR

L'amplificazione genica è stata condotta utilizzando il kit One-Step RT-PCR (Qiagen, Hilden, Germany). La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 50 μ l, contenente 6 μ l di RNA estratto da foglie (10 μ l di RNA da insetti) e 44 μ l di Master mix (per il materiale vegetale o, 40 μ l di Master mix nel caso di insetti) (vedi Allegato D).

Gli oligonucleotidi di innesco (primers) utilizzati sono stati quelli di Nakaune e Nakano (2006) forniti da Invitrogen Life Technologies (USA) con la seguente composizione nucleotidica: LR1- 9727U (5'TCGTAACGGCCGCTTCAGTA3') e LR1- 10019D (5'GTTCGTAACGTGCACGGAAG3') che individuano un amplicone di 293 bp, disegnati sulla proteina capsidica di GLRaV-1.

Il ciclo di amplificazione adottato è il seguente e prevede 35 cicli di amplificazione per le foglie e 40 cicli per gli insetti, in considerazione della minore quantità di particelle virali:

50°C X 30' _ 95 °C X 15' 94°C X 30" _ 56°C X 45" _ 72°C X 45" 72°C X 7'



La reazione è stata condotta in un DNA termociclatore (GenAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystem).

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati tramite elettroforesi caricando 16 µl di amplificato addizionato con 4 µl di colorante per DNA, su gel di agarosio 1,2% in tampone TBE 1X (Allegato E), colorati con bromuro di etidio (5 µl) ed infine fotografati su transilluminatore ad UV (v. Fig. 16).

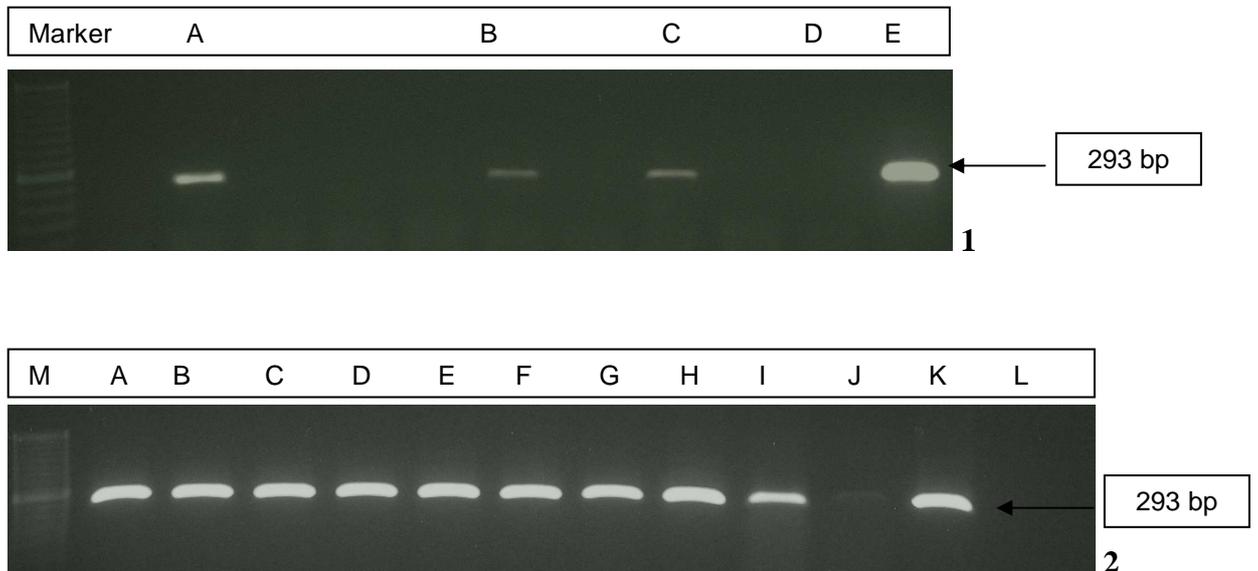


Figura 16- Prodotti RT-PCR. Gel 1. A, B, C: campioni infetti (N1 dopo AAP pari a 5 giorni); D: controllo sano; E: controllo infetto. Gel 2. A-I: campioni infetti (foglie); J: campione sano (foglia); K: controllo infetto; L: controllo sano.

CAPITOLO 6

Risultati

6.1 Indagini sulla biologia di *Planococcus citri*

6.1.1 Individuazione dell'*optimum* termico

Scopo di questa indagine preliminare era di individuare la temperatura più idonea a cui svolgere le prove di acquisizione e trasmissione secondo le modalità descritte in Materiali e Metodi (paragrafo 5.4.1).

I risultati relativi alla mortalità percentuale ottenuta alle varie temperature sperimentali, sono riportati in Tabella 3.

Temp °C	Totale insetti	% mortalità N1	% mortalità N2	% mortalità N3	% mortalità totale
9	100	100	-	-	100
15	382	60,73	61,59	15,52	87,17
20	249	46,19	17,91	3,64	57,43
23	220	20,46	16,57	2,74	35,46
26	400	44,5	18,02	10,44	59,25
29	100	100	-	-	100

Tabella 3- *Planococcus citri* (Risso). Sono riportate da sinistra: le temperature sperimentali a cui sono state condotte le prove ad eccezione di 9°C e 29°C dedotti dalla bibliografia (Laflin e Parrella, 2004), il numero totale di insetti sottoposti a test, le percentuali di mortalità di N1, N2 e N3 ed infine, la mortalità totale percentuale valutata sull'intero ciclo dell'insetto.

Dall'esame di Tabella 3 si può notare che la mortalità percentuale più elevata si riscontra per le N1, a tutte le temperature considerate, a dimostrazione che questo stadio è sicuramente il più delicato da manipolare e il più sensibile agli estremi termici. Alla temperatura di 15°C, tuttavia, anche la N2 mostra mortalità simile alla N1 (62%) e questo dato lascia supporre che anche questo stadio sia sfavorito dalle basse temperature. Lo stadio nel quale a tutte le temperature si è avuta la mortalità percentuale più bassa è la N3 che risulta lo stadio più resistente. Complessivamente, per tutti gli stadi di sviluppo, la mortalità minore è stata registrata a 23°C e per questo motivo questa temperatura è stata scelta per eseguire le prove di acquisizione e trasmissione.

6.1.2 Determinazione della durata minima di ogni stadio giovanile

Per stabilire se un determinato stadio giovanile è in grado di acquisire e trasmettere il virus, risultava di fondamentale importanza la definizione della durata minima di tale stadio preimaginale alla temperatura scelta, in modo da effettuare i test nell'ambito dell'intervallo temporale individuato.

a) Durata minima *in vivo* per l'acquisizione

Alla temperatura di 23°C ed alle condizioni di laboratorio a suo tempo riportate, è stata quindi individuata la durata dei vari stadi preimaginali.

Nei grafici di Figura 17, 18 e 19 sono rispettivamente rappresentate le durate della N1, N2 e N3. Dai grafici il dato importante che si evince è la durata minima delle varie età neanidali pari rispettivamente a 7 giorni per la N1, 6 giorni per la N2 e 7 giorni per la N3.

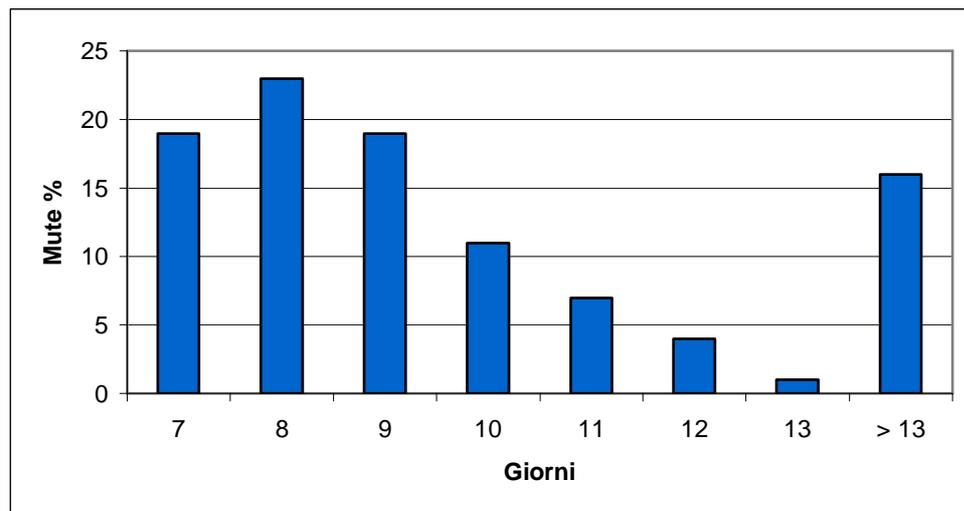


Figura 17- *Planococcus citri* (Risso). Durata dello sviluppo della prima età neanidale a 23°C. È riportata in ascisse la durata in giorni della prima età neanidale e in ordinate il numero percentuale di neanidi che hanno effettuato la muta

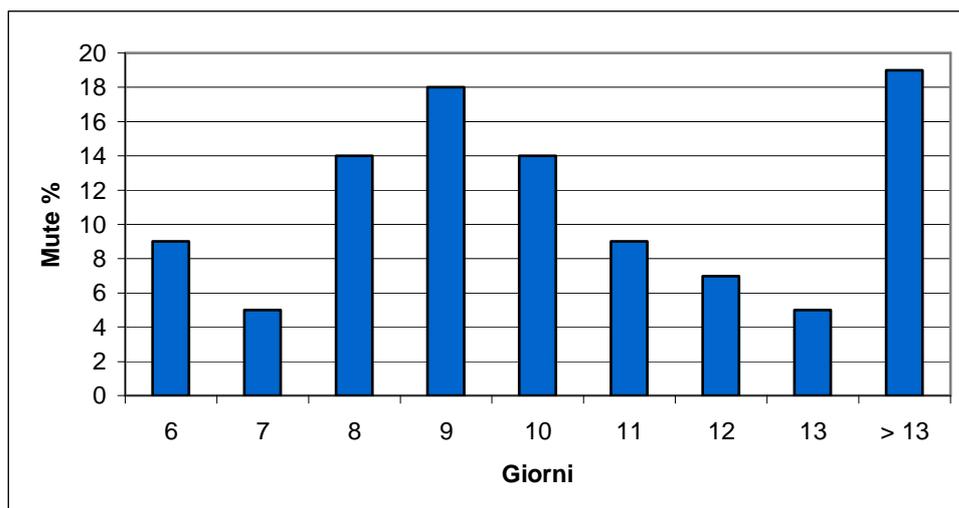


Figura 18- *Planococcus citri* (Risso). Durata dello sviluppo della seconda età neanidale a 23°C. È riportata in ascisse la durata in giorni della seconda età neanidale e in ordinate il numero percentuale di neanidi che hanno effettuato la muta

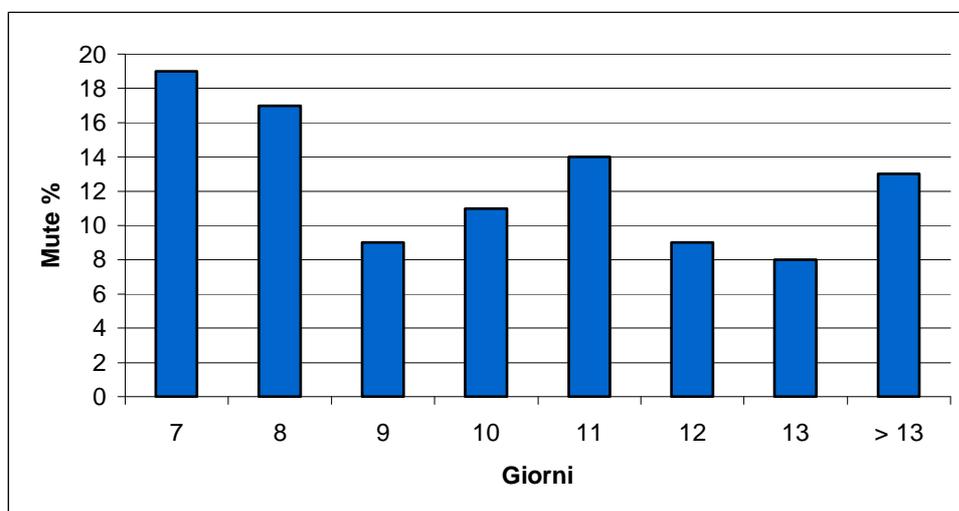


Figura 19- *Planococcus citri* (Risso). Durata dello sviluppo della terza età neanidale a 23°C. È riportata in ascisse la durata in giorni della terza età neanidale e in ordinate il numero percentuale di neanidi che hanno effettuato la muta

Considerando globalmente i dati sopra riportati, si può concludere che la durata minima registrata fra le diverse età è pari a 6 giorni. Per avere quindi la certezza di effettuare l'acquisizione nell'ambito di ogni singolo stadio, abbiamo decurtato ulteriormente di 24 h il AAP riducendolo a 5 giorni per i test.

b) Durata minima *in vitro* per la trasmissione

Lo scopo di questa indagine è stato quello di valutare la capacità di sviluppo del vettore su espianti di vite allevati *in vitro*, al fine di poter verificare la trasmissibilità del virus da parte dell'insetto in questa condizione.

Partendo quindi dalle neanidi di prima età, si è potuto verificare che l'insetto è in grado di svilupparsi su espianti *in vitro* e completare il ciclo biologico, fino allo stadio adulto di entrambi i sessi (v. Fig. 20). Inoltre, come riportato in Tabella 4, è stata riscontrata una durata minima delle varie fasi neanidali analoga a quella ottenuta nella prova di durata degli stadi preimaginali *in vivo*.



Figura 20- Pupario del maschio di *Planococcus citri* (Risso) su espianto di vite.

Stadio neanidale	Durata minima di sviluppo (gg)	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
N1	7	7
N2	7	6
N3	7	7

Tabella 4-Durata minima di sviluppo degli stadi preimmaginali *in vitro* ed *in vivo* espressa in giorni.

Per quanto concerne le condizioni di sterilità imposte dalla coltura *in vitro*, sono stati riscontrati solo sporadici episodi di inquinamento del substrato di crescita insorti in conseguenza dell'introduzione degli insetti. Più in particolare, l'inserimento di N1 neogusciate in un ambiente di crescita sterile non ha provocato alcun inquinamento del mezzo colturale dell'espianto, permettendo il completo sviluppo degli insetti fino all'età adulta. Diversamente, l'introduzione *in vitro* di femmine, ed in percentuale minore anche di N2 ed N3, ha comportato saltuariamente lo sviluppo sulla superficie dell'agar di un feltro miceliare. I campioni inquinati, quindi, sono stati scartati dal prosieguo della sperimentazione.

La buona compatibilità tra lo sviluppo dell'insetto e la coltura *in vitro* della vite, ha quindi permesso di utilizzare questa tecnica, per la fase di trasmissione del virus mediante *Pl. citri*.

6.2 Indagini di acquisizione e trasmissione

6.2.1 Determinazione della soglia di sensibilità del saggio molecolare

In Tabella 5 sono riportati i risultati relativi alle indagini di determinazione della soglia minima di rilevabilità del titolo virale negli insetti, per ogni loro fase di sviluppo, mediante Spot-OneStep RT-PCR.

E' stata rilevata una diversa sensibilità del saggio biomolecolare nel rilevamento del virus nei diversi casi considerati. L'analisi è sempre stata in grado di rilevare l'infezione virale nelle singole femmine infette. Diversamente, per le N1 infette non è stato possibile evidenziare la presenza di GLRaV-1 dai singoli individui né da gruppi inferiori a 5

individui. Per le N2 ed N3 infette è stato possibile osservare i prodotti di amplificazione rispettivamente per gruppi di 3 e 2 individui rispettivamente.

Stadio	Numero di insetti per estrazione							
	1	2	3	4	5	6	7	8
N1	-	-	-	-	+	+	+	+
N2	-	-	+	+	+	+	+	+
N3	-	+	+	+	+	+	+	+
Femmine	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabella 5- Numero di insetti utilizzati per l'estrazione degli acidi nucleici totali in ogni stadio di sviluppo.

6.2.2 Acquisizione

In Tabella 6 sono riportati i risultati relativi alle indagini di acquisizione di GLRaV-1 da parte di *Pl. citri*. Nella prima colonna sono riportati gli stadi di sviluppo dell'insetto che sono stati posti ad acquisire su foglie infette (AAP pari a 5 giorni) e nella seconda il rapporto tra il numero dei gruppi o singoli individui risultati infetti sul totale saggiato.

I risultati indicano come tutti gli stadi neanidali e le femmine di *Pl. citri* siano in grado di acquisire GLRaV-1.

Stadio	gruppi o insetti infetti/totale (\pm dev. St.)	%
N1	6 gruppi/10 (\pm 1,8)	60,0
N2	9 gruppi/16 (\pm 1,2)	56,2
N3	18 gruppi/25 (\pm 1,9)	72,0
femmine	32 insetti/50 (\pm 1,03)	64,0

Tabella 6- Risultati dei saggi biomolecolari condotti su *Pl. citri* in ogni stadio di sviluppo, dopo AAP di 5 giorni su foglie infette, a 23°C.

6.2.3 Trasmissione

Dopo aver rilevata la capacità di acquisizione del virus da parte del vettore, è stata valutata anche la sua capacità di trasmissione di GLRaV-1.

Con le stesse procedure già descritte, dopo un periodo di AAP pari a 2 giorni trascorsi sulle foglie infette, 30 neanidi di ciascuna età e 30 femmine di *Pl. citri* sono stati trasferiti nei tubi di coltura su espianti sani per un IAP pari a 3 giorni, per consentire la trasmissione dell'infezione (Tabella 7). La scelta di 2 giorni di AAP e 3 giorni di IAP è stata determinata dalla necessità di eseguire le indagini di acquisizione e quelle di trasmissione avendo la certezza di rimanere nell'intervallo temporale individuato pari a 5 giorni.

Su un numero ridotto di insetti, per ogni fase di sviluppo, è stata confermata l'acquisizione dello stato infettivo idoneo alla successiva fase di trasmissione.

Numerosi espianti saggiati con Spot OneStep RT-PCR sono risultati infetti, evidenziando che *Pl. citri* è in grado di trasmettere GLRaV-1 ad espianti sani.

Stadio	espianti infetti/totale (\pmdev. St.)	%
N1	20/30 (\pm 2,1)	66,7
N2	18/30 (\pm 2,0)	60,0
N3	16/30 (\pm 2,8)	53,3
femmine	22/30 (\pm 2,2)	73,3

Tabella 7- Risultati dei saggi biomolecolari condotti sugli espianti dopo IAP di 3 giorni con insetti infetti (AAP pari a 2 giorni).

6.3 Modalità di trasmissione

Dopo aver osservato la possibilità di acquisizione e trasmissione di GLRaV-1 da parte del vettore, sono state condotte delle indagini per una migliore comprensione dei rapporti vettore/virus, con particolare riferimento alla permanenza delle particelle virali nell'insetto. N3 infette sono state trasferite su patata fino al momento successivo alla muta. I risultati diagnostici condotti sulle femmine così ottenute hanno permesso di identificare soltanto individui virus-esenti, nella totalità dei campioni saggiati. A conferma di questo dato, le

successive indagini biomolecolari condotte sugli espianti utilizzati per la trasmissione virale da femmine neo-mutate, non hanno evidenziato, in alcun caso, prodotto di RT-PCR nei tessuti vegetali escludendo la presenza di RNA virale anche negli espianti (Tabella 8). Si può affermare, quindi, che le N3 infette hanno perso l'infettività conseguentemente alla muta e, ciò fa supporre, che GLRaV-1 sia un virus non circolativo.

	infetti/totale	%
femmine	0/30	0
espianti	0/30	0

Tabella 8- Risultati dei saggi biomolecolari condotti su femmine che hanno mutato su patata dopo un AAP di 5 giorni.

In riferimento alla persistenza di GLRaV-1 in *Pl. citri*, è stata condotta un'ulteriore indagine su N3 infette.

Dopo un periodo di AAP pari a 2 giorni, le N3 sono state poste in camere umide per assicurare un periodo di digiuno di 3 ore, periodo di ritenzione sufficiente ad escludere o accertare la semipersistenza, alla fine del quale sono state condotte le indagini diagnostiche.

Tutti gli insetti saggiati sono risultati negativi al virus così come gli espianti su cui sono stati successivamente posti (Tabella 9). I test effettuati hanno permesso quindi di affermare che, la trasmissione di GLRaV-1 mediante *Pl. citri*, è di tipo non persistente.

	infetti/totale	%
N3	0/30	0
Espianti	0/30	0

Tabella 9- Risultati dei saggi biomolecolari condotti su N3 dopo un periodo di digiuno di 3 ore ed un IAP di 3 giorni

CONCLUSIONI

Nel presente studio è stata analizzata la capacità di *Planococcus citri*, in ogni sua fase di sviluppo, di acquisire e trasmettere GLRaV-1.

Lo Pseudococcide *Planococcus citri*, è stato più volte indicato come vettore di GLRaV-3 (Pedroso *et al.*, 1991; Cabaleiro e Segura, 1997a, 1997b; Golino *et al.*, 2000, 2002; Cid *et al.*, 2006; Cabaleiro *et al.*, 2008) mentre, risultano insufficienti le notizie sul possibile ruolo svolto dall'insetto nella trasmissione di GLRaV-1. Tale virus viene generalmente segnalato nelle zone in cui è presente anche GLRaV-3 ma, quest'ultimo risulta più diffuso (Cabaleiro e Segura, 1997; Petersen e Charles, 1997; Sforza *et al.*, 2003; Cabaleiro *et al.*, 2008). Anche in Italia centrale è stata riscontrata una situazione analoga a quella appena indicata (Materazzi *et al.*, 2006), ad eccezione di quanto verificato in Umbria sulla cv. Sagrantino, nella quale è stata accertata una netta prevalenza di GLRaV-1 su GLRaV-3 (Materazzi *et al.*, 2004) e nei cui vigneti è stata segnalata la presenza di *Pl. citri*.

Dai risultati ottenuti si è potuto osservare che *Planococcus citri* è in grado di acquisire il virus da foglie infette e, più precisamente, ogni singolo stadio neanidale e la femmina di *Pl. citri* sono stati in grado di acquisire GLRaV-1 anche quando l'AAP è stato ridotto a 2 giorni (periodo minimo considerato). Analogamente, per quanto riguarda la trasmissione, tutti gli stadi neanidali e la femmina sono stati in grado di trasmettere il virus a espianti sani. In particolare, l'uso della coltura *in vitro* si è rivelato particolarmente utile per le indagini di trasmissione perché ha permesso il riscontro immediato dei risultati conseguiti al termine di ogni prova di inoculazione, diversamente da quanto previsto dalle procedure condotte su piante allevate *in vivo* che prevedono tempi di attesa per le analisi diagnostiche di alcuni mesi (Golino *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2003; Sforza *et al.*, 2003; Zorloni *et al.*, 2006; Hommay *et al.*, 2007; Douglas e Krüger, 2008). L'efficacia del sistema sperimentale della coltura *in vitro* adottato in questa esperienza è una conferma di quanto indicato da Askani e Beiderbeck (1991) e Winterhagen *et al.*, (2007), che hanno utilizzato il sistema *in vitro* per indagini sui vettori diversi da *Pl. citri* per il quale questa ricerca rappresenta la prima esperienza positiva di trasmissione di GLRaV-1.

Nelle indagini preliminari tese alla determinazione della durata minima degli stadi preimaginali *in vitro*, l'insetto ha dimostrato di essere compatibile con la coltura *in vitro* e completare il proprio ciclo biologico fino al raggiungimento dello stadio adulto in entrambi i sessi con la stessa tempistica di quella osservata *in vivo*.

Per quanto riguarda la modalità di trasmissione, i risultati ottenuti permettono di affermare che l'insetto perde l'infettività con la muta nel passaggio da N3 ad adulto e che, sempre le N3, perdono la capacità di trasmettere il virus dopo 3 ore di digiuno.

Da quanto appena indicato si deduce che *Pl. citri* può essere indicato come un nuovo vettore di GLRaV-1 e che tale virus sembrerebbe trasmesso in maniera non persistente. La probabile non persistenza di GLRaV-1 è però in contrasto con quanto noto fino ad oggi, che indica gli Pseudococcidi come vettori in grado di trasmettere i virus in maniera semi-persistente (Harris, 1981; Belli, 1994; Cabaleiro e Segura, 1997; Nault, 1997; Lopez-Moya, 2001; Martelli, 2002; Martelli, 2004; Andret-Link e Fuchs, 2005; Martelli e Boudon-Padieu, 2006; Ng e Falk, 2006). Anche se, recentemente, la modalità di trasmissione semi-persistente è stata messa in discussione, ipotizzando un meccanismo di tipo circolativo per GLRaV-3 (Cid *et al.*, 2007).

In conclusione, le indagini svolte hanno permesso di ottenere alcune informazioni sui vettori in grado di trasmettere GL. In particolare, *Pl. citri*, già indicato come vettore di GLRaV-3, GVA e GVB (Martelli, 2004), BSMysV (Geering *et al.*, 2005), CSSV (Dufour, 1989; 1991) e PYMV (Lockhart *et al.*, 1997), sembrerebbe in grado di trasmettere anche GLRaV-1. Questo conferma che la trasmissione mediante Pseudococcidi e Coccidi è, purtroppo, aspecifica (Martelli, 2004) e che il numero dei vettori in grado di trasmettere i GLRaVs è sicuramente destinato ad aumentare. Il ruolo fondamentale svolto dai vettori nella diffusione di GL sottolinea la necessità di una tempestiva e attenta verifica delle popolazioni presenti in campo, al fine di allestire interventi mirati ad un loro controllo ed evitare nuovi contagi rallentando la diffusione di questo complesso già notoriamente presente nelle maggiori aree viticole del mondo. In particolare, per i vivai di piante madri, una più approfondita conoscenza dei vettori permette l'allestimento di sistemi di protezione per poter garantire il mantenimento della idonea condizione sanitaria di tale importantissimo germoplasma.

BIBLIOGRAFIA

- Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Rowhani A., 2004-** Preliminary molecular data on a putative new grapevine leafroll-associated virus. *Phytopathology*, 94 (Supplement to n°6):S2.
- Alkowni R., Rowhani A., Golino D.A., 2002-** Partial nucleotide sequence and molecular detection of a putative new grapevine leafroll associated virus. *Phytopathology*, 92 (Supplement to n°6):S3.
- Andret-Link P., Fuchs M., 2005-** Transmission specificity of plant viruses by vectors. *Journal of Plant Pathology*, 87 (3): 153-165.
- Askani A., Beiderbeck R., 1991-** *In vitro* propagation of *Dactylosphaera vitifolii* Shimer (Homoptera: Phylloxeridae) on shoot and root cultures of a *Vitis* hybrid. *Vitis* 30, 223-232.
- Ayllón M.A., Lopez C., Navas-Castillo J., Garnsey S.M., Guerri J., Flores R., Moreno P., 2001-** Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: Incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology*, 146 (1): 27-40.
- Bath A.I., Devasahayam S., Sarma Y.R., Pant R.P., 2003-** Association of a badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealybug (*Ferrisia virgata*) in India. *Current Science*, 84 (12): 1547-1550.
- Belli G., 1992-** Virus e virosi delle piante. Edagricole, 66-74.
- Belli G., Fortusini A., Casati P., Belli L., Bianco P.A., Prati S., 1994-** Transmission of a Grapevine Leafroll associated Closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale* 4: 105-108.
- Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N., 2004-** Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology* 152: 145-152.

Buonocore E., Tropea Garzia G., Cavalieri V., Mazzeo G., 2008- Come distinguere le cocciniglie farinose. *L'Informatore Agrario*, 16: 62-63.

Cabaleiro C., Couceiro C., Pereira S., Cid M., Barrasa M., Segura A., 2008- Spatial analysis of epidemics of *Grapevine leafroll associated virus-3*. *European Journal of Plant Pathology* 121 (2): 121-130.

Cabaleiro C., Segura A., 1997a- Some characteristics of the transmission of grapevine leafroll associated virus 3 by *Planococcus citri* Risso. *European Journal of Plant Pathology* 103: 373-378.

Cabaleiro C., Segura A., 1997b- Field Transmission of Grapevine Leafroll Associated Virus 3 (GLRaV-3) by the Mealybug *Planococcus citri*. *Plant Disease* 81: 283-287.

Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E.T., Sit T.L., Lommel S.A., 2001- The Multifunctional Capsid Proteins of Plant RNA Viruses. *Annual Reviews of Phytopathology* 39: 419-460.

Castellano M.A., Abou-Ghanem N., Martelli G.P., Boscia D., Savino V., 1995- Cytopathology of two filamentous grapevine viruses and their intracellular identification by gold immunolabelling. *Journal of Plant Diseases and Protection* 102: 23-33.

Cavalieri V., Mazzeo G., Buonocore E., Russo A., 2007a- Discriminazione specifica di *Planococcus citri* e *Planococcus ficus* con tecniche biomolecolari. *Proceedings 21° Congresso nazionale italiano di Entomologia, Campobasso, 11-16 Giugno 2007*, 184.

Cavalieri V., Mazzeo G., Buonocore E., Russo A., 2007b- Discrimination of *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* populations by PCR-RFLP of cytochrome oxidase subunit I gene. *IOBC/WPRS Working Group "Integrated protection in viticulture", European meeting "Biological and integrated control in a modern viticulture", Marsala 25-27 Ottobre 2007*, 40.

Chapman E.J., Prokhnevsky A.I., Gopinath K., Dolja V.V., Carrington J.C., 2004- Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development* 18: 1179-1186.

Choueiri E., Boscia D., Digiario M., Castellano M.A., Martelli G.P., 1996- Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis* 35: 91-93.

Cid M., Pereira S., Cabaleiro C., Faoro F., Segura A., 2007- Presence of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in primary salivary glands of the mealybug vector *Planococcus citri* suggests a circulative transmission mechanism. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (1): 23-30.

Cid M., Pereira S., Gago P., Couceiro C., Cabaleiro C., Segura A., 2006- *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) as GLRaV-3 vector. *Extended Abstracts of 15th ICVG Conference, Stellenbosch, 3rd -7th April, 252-254.*

Clark M.F., Adams A.N., 1977- Characteristics of the microplate method Enzyme-Linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.

Clingeffer P.R., Krake L.R., 2002- Light (minimal) pruning enhances expression of higher yield from clones of *Vitis vinifera* L. cv. Sultana following thermotherapy for virus attenuation. *Australia Journal of Grape and Wine Research*, 8(2): 95-100.

Conti B., Triolo E., Materazzi A., Bazzichi L., 1996- Effetti della temperatura sulla trasmissione di Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) da parte di neanidi di *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Atti XVII Congresso nazionale italiano di Entomologia, Udine 13-18 Giugno 1996*, 509-513.

Cornuet P., Andret P., Vigne E., Fuchs M., 2003- Identification and characterization of a putative new Ampelovirus species associated to grapevine leafroll. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 34.

Cox J.M., 1989- The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)*, 58 (1): 1-78.

Cupidi A., Barba M., 1993- Ottimizzazione del microinnesto *in vitro* per il risanamento della vite. *Vignevini* 4: 43-46.

- De Lotto G., 1975-** Notes on the vine mealybug (Homoptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 38: 125-130.
- Demontis M.A., Ortu S., Cocco A., Lentini A., Migheli Q., 2007-** Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *Planococcus citri* (Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. *Journal of Applied Entomology*, 131: 59-64.
- Dimitrijevic B., 1973-** Some observations on natural spread of Grapevine Leafroll Disease in Yugoslavia. *Rivista di Patologia Vegetale* 9: 114-119.
- Dolja V.V., Karasev A.V., Koonin E.V., 1994-** Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build up of large RNA genomes. *Annual Review of Phytopathology* 32: 261-285.
- Dolja V.V., Kreuze J.F., Valkonen J.P.T., 2006-** Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117: 38-51.
- Douglas N., Krüger K., 2006-** Grapevine leafroll-associated virus 3 transmission efficiency of *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Extended Abstracts of 15th ICVG Conference, Stellenbosch, 3rd -7th April, 2006*, 191-192.
- Douglas N., Krüger K., 2006-** Transmission efficiency of *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *European Journal of Plant Pathology*, 122 (2): 207-212.
- Dovas C., Katis N.I., 2003-** A spot multiplex nested RT-PCR for simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *Journal of Virological Methods*, 109 (2): 217-226.
- Dufour B., 1988-** Utilisation d'une méthode de transmission pour la caractérisation des formes togolaises de virus du swollen shoot du cacaoyer. *Café Cacao Thé* 32 (3): 219- 228.
- Dufour B., 1991-** Place et importance des différentes espèces d'insectes dans l'écologie du CSSV (Cocoa Swollen Shoot Virus). *Café Cacao Thé* 35 (3): 197- 204.

Engelbrecht D.J., Kasdorf G.G.F., 1990a- Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* 22: 341-346.

Engelbrecht D.J., Kasdorf G.G.F., 1990b- Field spread of corky bark, fleck, leafroll and shiraz decline diseases and associated viruses in south African grapevines. *Phytophylactica*, 22: 347-354.

Ezzat Y.M., McConnell H.S., 1956- A classification of the mealybug tribe Planococcini (Homoptera: Pseudococcidae). *Bulletin University of Maryland Agricultural Experiment Station*, 84: 1-108.

Fabre E., 1853- Les maladies régnantes de la vigne. *Bulletin de la Société Centrale Agronomique Herault* 40: 11-75.

Fazeli C.F., Rezaian M.A., 2000- Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of Grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs. *Journal of General Virology*, 81: 605-615.

Fortusini A., Scattini G., Prati S., Cinquanta S., Belli G., 1997- Transmission of grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and grapevine virus A (GVA) by scale insects. *Proceeding of 12th Meeting of ICVG, Lisbon, 28th September-2nd October, 1997*, 121-122.

Gambino G., Bondaz J., Gribaudo I., 2006- Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 397-404.

Garau R., Prota V.A., Boscia D., Fiori M., Prota U., 1995- *Pseudococcus affinis* Mask., new vector of grapevine trichoviruses A and B. *Vitis*, 34 (1): 67-68.

Geering A.D.W., Pooggin M.M., Olszewski N.E., Lockhart B.E.L., Thomas J.E., 2005- Characterisation of Banana streak Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. *Archives of Virology*, 150: 787-796.

Goheen A.C., 1970- Grape leafroll. *Virus disease of small fruits and grapevine*. Frazier N.W. (ed.) University of California, Div. Agricultural Sciences, Berkeley, 209-219.

- Goheen A.C., Cook J.A., 1959-** Leafroll (red-leaf rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality and yield. *Am. J. Enol., Vitic.* 10: 173-181.
- Golino D.A., Sim S., Rowhani A., 2000-** Experimental transmission of Grapevine Leafroll associated viruses by mealybugs. *Extended Abstracts of 13th Meeting ICVG, Adelaide, 12-17th March 2000*, 19-20.
- Golino D.A., Sim S.T., Gill R., Rowhani A., 2002-** California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56 (6): 196-201.
- Golino D.A., Sim S.T., Rowhani A., 1995-** Transmission Studies of Grapevine Leafroll Associated Virus and Grapevine Corky Bark Associated Virus by the Obscure Mealybug. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (3): 408.
- Gribaudo I., Bondaz J., Cuzzo D., Gambino G., 2003-** Elimination of *Grapevine Leafroll-associated Virus 3* from the wine grapevine Müller-Thurgau (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 240-241.
- Gugerli P., 2003-** Grapevine Leafroll and related viruses. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 25-31.
- Gugerli P., Brugger J.J., Bovey R., 1984-** L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture*, 16, 299-304.
- Harris K.F., 1977-** An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. In: Harris K.F., Maramorosch K. (eds.), *Aphids as virus vectors*. Academic, New York, 166-220.
- Harris K.F., 1981-** Arthropod and nematode vectors of plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 19: 391-426.
- Hommay G., Komar V., Lemaire O., Herrbach E., 2008-** *Grapevine virus A* transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *European Journal of Plant Pathology* 121 (2): 185-208.

- Hu J.S., Gonsalves D., Boscia D., Maixner M., Golino D., 1991-** Comparison of rapid detection assays for leafroll disease associated closteroviruses. *Vitis* 30:87-95.
- Hu J.S., Gonsalves D., Teliz D., 1990-** Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Phytopathology*, 128: 1-14.
- Huffaker C.B., 1948-** An improved cage for work with small insects. *Journal of Economic Entomology*, 41 (4): 648-649.
- Ioannou N., Hadjinicolis A., 2001-** Resistance of American varieties of grapevine rootstock to mealybug-transmitted leafroll-associated virus 3. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 (2): 194.
- Karasev A.V., 2000-** Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 293-324.
- Kim H.R., Choi Y.M., Yiem M.S., Chung J.D., Park J.W., 2003-** Effects of thermotherapy and shoot apical meristem culture, antiviral compounds for GLRaV-3 elimination in Grapevine. *Korean Journal of Plant Biothechnology*, 30(2): 155-160.
- Komar V., Vigne E., Demangeat G., Fuchs M., 2007-** Beneficial Effect of Selective Virus Elimination on the Performance of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (2): 202-210.
- Komínek P., Glasa M., Bryxiová M., 2005-** Analysis of the Molecular Variability of *Grapevine Leafroll-associated Virus 1* Reveals the Presence of Two Distinct Virus Groups and their Mixed Occurrence in Grapevines. *Virus Genes*, 31 (3): 247-255.
- Krastanova Ling T.K.S., Zhu H.Y., Xue B., Burr T., Gonsalves D., 2000-** Development of transgenic grape rootstocks with genes from grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll-associated closteroviruses -2 and -3. *Acta Horticulturae*, 528: 367-372.

- Krüger K., Saccaggi D., Douglas N., 2006-** Grapevine leafroll-associated virus 3- vector interactions: transmission by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Extended Abstracts of 15th ICVG Conference, Stellenbosch, 3rd -7th April*, 130-131.
- Laflin H.M., Parrella M.P., 2004-** Developmental biology of citrus mealybug under conditions typical of California rose production. *Annals of the Entomological Society of America*, 97 (5): 982-988.
- Little A., Fazeli C.F., Rezaian M.A., 2001-** Hypervariable genes in Grapevine leafroll associated virus 1. *Virus Research*, 80: 109-116.
- Lockhart B.E.L., Kittisak Kiratiya-Angul, Jones P., Eng L., Padmini De Silva, Olszewski N.E., Lockhart N., Nuanchan Deema, Sangalang J., 1997-** Identification of *Piper* yellow mottle virus, a mealybug-transmitted badnavirus infecting *Piper* spp. in Southeast Asia. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 303-311.
- Longo S., Mazzeo G., Russo A., 1991-** Note bioetologiche su *Planococcus ficus* (Homoptera: Coccoidea Pseudococcidae) in Sicilia. *Atti XVI Congresso nazionale italiano di Entomologia, Bari-Martina Franca, 23-28 Settembre 1991*, 705-710.
- Lopez-Moya J.J., 2001-** Plant Viruses as Molecular Pathogens. Khan J.A., Dijkstra J. (eds.) 31-61.
- Maliogka V.I., Dovas C.I., Katis N. I., 2008-** Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. *Virus Research* 135: 125-135.
- Mannini F., 2003-** Virus elimination in grapevine and crop performance. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 234-239.
- Marotta S., 1990-** Studio morfo-sistematico delle specie italiane della famiglia Pseudococcidae (Homoptera: Coccoidea). Tesi di Dottorato, parte II, 21-23.
- Martelli G.P., 1975-** Il punto sulle attuali conoscenze sui virus, le virosi e le altre malattie infettive della vite. *Italia agricola*, 112 (2): 80-97; (3): 108-118; (4): 95-102.

Martelli G.P., 2002- Le principali virosi della vite oggi. *L'Informatore Fitopatologico* 4, 18-27.

Martelli G.P., 2004- Virosi della vite: scenario italiano ed europeo. *La Vite- Convegno Nazionale Villa Gualino, Torino 2-3 Dicembre 2004.*

Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C., Yoshikawa N., 2000- Family *Closteroviridae*. In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.L., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (eds) *Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, 943-952.

Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C., Yoshikawa N., 2002- The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology* 147(10): 2039-2044.

Martelli G.P., Boudon-Padieu E., 2006- Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998- 2004. *Options méditerranéennes Serie B* 55: 59-92.

Martelli G.P., Prota U., 1985- Le virosi della vite. *Italia agricola*, Ed. Reda, 2: 201-228.

Martelli G.P., Saldarelli P., Boscia D., 1997- Filamentous viruses of the grapevine: Closteroviruses. In: *Filamentous Viruses of Woody Plants* (Monette P.L. ed.). Research Signpost, Trivandrum, 1-9.

Materazzi A., Luvisi A., Triolo E., 2006- Diffusione e peculiarità di agenti virali su ceppi di Sangiovese selezionati in Toscana. In: *Il Sangiovese identità e peculiarità: vitigno tipico e internazionale*, ARSIA (Ed.), Firenze, 339-343.

Materazzi A., Triolo E., Luvisi A., 2004- Il Sagrantino a Montefalco e l'Aleatico all'Elba: due casi difficili per la selezione sanitaria. *La Vite- Convegno Nazionale Villa Gualino, Torino 2-3 Dicembre 2004.*

- Monis J., 2000-** Development of monoclonal antibodies reactive to a new grapevine leafroll-associated closterovirus. *Plant Disease* 84: 858-862.
- Nakano M., Nakaune R., Komazaki S., 2003-** Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 218.
- Nakaune R., Nakano M., 2006-** Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. *Journal of Virological Methods* 134: 244-249.
- Nault L.R., 1997-** Arthropod Transmission of Plant Viruses: a new Synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 90 (5): 521-541.
- Ng J.C.K., Falk B.W., 2006-** Virus-Vector Interactions Mediating Nonpersistent and Semipersistent Transmission of Plant Viruses. *Annual Reviews of Phytopathology* 44:183-212.
- Orecchia M., Nölke G., Saldarelli P., Dell’Orco, Uhde-Holzen K., Sack M., Martelli G., Fischer R., Schillberg S., 2008-** Generation and characterization of a recombinant antibody fragment that binds to the coat protein of grapevine leafroll-associated virus 3. *Archives of Virology*, 153: 1075-1084.
- Osman F., Rowhani A., 2006-** Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 133: 130-136.
- Panattoni A., D’Anna F., Triolo E., 2004-** Effetti della termoterapia su espanti *in vitro* di Sangiovese infetti da GLRaV-3. *Proceedings 2th International Symposium: Il Sangiovese, Firenze*.
- Panattoni A., D’Anna F., Triolo E., 2006-** Improvement in grapevine chemotherapy. *Extended Abstracts of 15th ICVG Conference, Stellenbosch, 3rd -7th April 2006*, 139-140.
- Panattoni A., Triolo E., 2003-** Effect of antiviral drugs in *Vitis vinifera* infected explants. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 244.

- Panis A., 1969-** Observations faunistiques et biologiques sur quelques *Pseudococcidae* (Homoptera, Coccoidea) vivant dans le midi de la France. *Annales de Zoologie Ecologie Animale* 1 (3) 211-244.
- Pastre J., 1891-** La brunissure de la vigne. *Progrés Agricole et Viticole* 12 : 219-233.
- Pedroso E.I., Sequeira O.A., Pinto M.E.G., Simões V., 1991-** Assays of transmission of grapevine virus by pseudococcids. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 10 (2): 39-46.
- Peng C.W., Dolja V.V., 2000-** Leader proteinase of the beet yellows closterovirus: mutation analysis of the function in genome amplification. *Journal of Virology*, 74: 9766-9770.
- Petersen C.L., Charles J.G., 1997-** Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46: 509-515.
- Pollini A., 1998-** Manuale di Entomologia Applicata. Edagricole, 348-350.
- Quorin M., Lepoivre P., 1977-** Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de prunus. *Acta Horticulture* 78 : 437-442.
- Rosciglione B., Gugerli P., 1986-** Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture* 18, 207-211.
- Rosciglione B., Gugerli P., 1989-** Transmission of Grapevine Leafroll disease and an associated *Closterovirus* to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica* 17 (1): 63.
- Rotundo G., Tremblay E., 1976-** La discriminazione sierodiagnostica negli Pseudococcidi (Homoptera: Coccoidea). II. *Planococcus citri* (Ris.) e *Planococcus ficus* (Sign.). *Bollettino Laboratorio Entomologia Agraria "Filippo Silvestri"*, 33: 99-107.
- Rowhani A., Zhang Y.P., Golino D., Uyemoto J.k., 2003-** Isolation and characterization of a putative new virus from grapevine. *Phytopathology*, 92:S71.

Roy A., Brlansky R.H., 2004- Genotype classification and molecular evidence for the presence of mixed infections in Indian *Citrus tristeza virus* isolates. *Archives of Virology*, 149 (10): 1911-1929.

Saccaggi D.L., Krüger K., Pietersen G., 2008- A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98: 27-33.

Scheu G., 1935- Die Rollkrankheit des Rebstockes. *Der Deutsche Weinbau* 14: 222-223, 345-346, 356-358.

Sforza R., Boudon-Padiou E., Greif C., 2003- New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109: 975-981.

Sforza R., Greif C., 2000- Les cochenilles et l'enroulement viral de la vigne. *Phytoma*, 532: 46-50.

Silhavy D., Burgyan J., 2004- Effects and side effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in Plant Science* 9: 76-83.

Sim S.T., Golino D.A., Rowhani A., 2003- Experimental transmission of Grapevine Leafroll associated viruses types 5 and 9 by longtailed mealybugs. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 210-212.

Tanne E., Ben-Dov Y., Raccach B., 1987- Transmission of closterolike particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (Pseudococcidae) in Israel. *Proceedings of the 9th Meeting ICVG, Kiryat Anavim, 6-11th September 1987*, 71-73.

Tian T., Rubio L., Yeh H.-H., Crawford B., Falk B.W., 1999- Lettuce infectious yellows virus: *in vitro* acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* 80: 111-117.

Tranfaglia A., 1976- Studi sugli Homoptera Coccoidea IV. Su alcune cocciniglie nuove o poco conosciute per l'Italia (Coccidae, Eriococcidae, Pseudococcidae). *Bollettino Laboratorio Entomologia Agraria "Filippo Silvestri"*, 33: 128-143.

Tranfaglia A., 1978- Considerazioni sull'affinità morfologica tra *Planococcus citri* (Risso) e *Planococcus ficus* (Signoret) (Homoptera: Coccoidea). *Atti XI Congresso nazionale Italiano di Entomologia, Portici-Sorrento 10-15 Maggio 1976*, 91-93.

Tremblay E., 1981- Entomologia applicata. Liguori Editore, vol. 2, parte I, 189-200; 211-214; 231.

Tsai C.W., Chau J., Fernandez L., Bosco D., Daane K.M., Almeida R.P.P., 2008- Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology*, 98 (10): 1093-1098.

Valero M., Ibanez A., Morte A., 2003- Effects of high vineyard temperatures on the Grapevine Leafroll associated Virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, 97(3/4): 289-296.

Velasco L., Padilla C.V., Cretazzo E., Hita I., Padilla V., 2006- Some aspects of the presence of Grapevine B vitivirus in Spain: detection of GVB in *Planococcus citri* Risso. *Extended Abstracts of 15th ICVG Conference, Stellenbosch, 3rd -7th April 2006*, 240-241.

Vuittenez A., 1958- Transmission per greffage d'une virose du type "enroulement foliaire" commune dans le vignobles de l'est du centre est de la France. *Comptes Rendues de l'Academie d'Agriculture de France* 44: 313-316.

Walter B., Legin R., 1986- Connaissances actualles sur les virus de l'enroulement de la vigne. *Le Vigneron Champenois*, 9: 433-446.

Walter B., Zimmermann D., 1991- Further characterization of closterovirus-like particles associated with the grapevine leafroll disease. *Proceedings 10th Meeting of ICVG, Volos 1990*, 62-66.

Wijkamp I., van de Wetering F., Goldbach R., Peters D., 1996- Transmission of Tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis*, median acquisition and inoculation period. *Ann. Appl. Biol.*, 129: 303-313.

Winterhagen P., Brendel G., Krczal G., Reustle G.M., 2007- Development of an *in vitro* Dual Culture System for Grapevine and *Xiphinema index* as a Tool for Virus Transmission. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 28 (1): 1-5.

Zimmermann D., Sommermeyer G., Walter B., Van Regenmortel M.H.V., 1990- Production and characterization of monoclonal antibodies specific to closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Phytopathology* 130: 277-288.

Zorloni A., Cinquanta S., Prati S., Bianco P.A., 2006- Transmission of an italian isolate of Grapevine Leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Heliococcus bohemicus* Sulc. *Extended Abstracts of 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003*, 214-215.

Zorloni A., Molino Lova M., Prati S., Belli G., 2007- Acquisition of GLRaV-1 (*Grapevine Leafroll associated virus 1*) by *Planococcus ficus* Signoret. *Atti del XIV Congresso SIPAV, Perugia 18-21 Settembre, 2007*, 105.

Zorloni A., Prati S., Bianco P.A., Belli G., 2004- Further data on the experimental transmission of *Grapevine Leafroll- associated virus 1* and 3 and of *Grapevine virus A* by mealybugs. *Journal of Plant Pathology* 86 (4, Special issue): 339-340.

Zorloni A., Prati S., Bianco P.A., Belli G., 2006- Transmission of grapevine virus A and grapevine leafroll-associated virus 3 by *Heliococcus bohemicus*. *Journal of Plant Pathology* 88 (3): 325-328.

Zorloni A., Prati S., Chiesa S., Bianco P.A., 2006- Transmission of Grapevine Leafroll-associated virus 3 by the soft scale *Neopulvinaria innumerabilis*. *Journal of Plant Pathology* 88 (3, Supplement): S61.

ALLEGATI

Allegato A - Composizione del substrato di coltura Quorin e Lepoivre (1977)

NH ₄ NO ₃	4,00 g/l
KNO ₃	18,00 g/l
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	3,60 g/l
KH ₂ PO ₄	2,70 g/l
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	8,337 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,25 g/l
KI	0,083 g/l
H ₃ BO ₃	0,620 g/l
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,86 g/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,230 g/l
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,0025 g/l
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,0025 g/l
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,278 g/l
Na ₂ EDTA	0,373 g/l
6-Benzilamminopurina (BAP)	0,04 g/l
Acido Gibberellico (GA ₃)	0,01 g/l
Acido α-naftalenacetico (NAA)	0,01 g/l
Inositolo	0,10 g/l
Tiamina	0,0004 g/l
Glicina	0,002 g/l
Acido Nicotinico	0,0005 g/l
Piridossina	0,0005 g/l
Zucchero	30 g/l
Agar	6 g/l
pH	5,7

Allegato B- Tamponi e soluzioni per il saggio ELISA

1. Tampone di sensibilizzazione (pH 9,6)

1,59 g/l Na₂CO₃

2,93 g/l NaHCO₃

0,2 g/l NaN₃

2. Tampone fosfato salino 1X PBS (pH 7,4)

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KH₂PO₄

11,5 g/l Na₂HPO₄

0,2 g/l KCl

0,2 g/l NaN₃

3. Tampone di lavaggio PBST (pH7,4)

1,01 PBS 1X

0,5 ml Tween-20

4. Tampone di estrazione (pH 8,2)

60,5 g/l TRIS

8,0 g/l NaCl

20,0 g/l PVP (Polivinil pirrolidone)

10,0 g/l PEG (Polietilene glicole)

0,2 g/l NaN₃

0,5 ml Tween-20

5. Tampone di coniugazione (pH 7,4)

1,01 PBST

20,0 g/l PVP

2,0 g/l BSA (bovine serum albumin)

6. Tampone di substrato (pH 9,8)

97 ml Dietanol ammina

0,2 g/l NaN₃

Allegato C- Tamponi usati per l'estrazione di acidi nucleici totali (Osman e Rowhani, 2006)

1. Extraction buffer

1,59 g/l Na₂CO₃

2,93 g/l NaHCO₃

pH 9,6

2% PVP-40

0,2 % BSA

0,05% Tween-20

1% Na₂S₂O₃

2. GES buffer

0,1 M Glicina

0,05 M NaCl

1 mM EDTA

0,5% TritonX-100

Allegato D- Master mix per OneStep RT-PCR

RNase-free water	24 µl
5X Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	10 µl
dNTP Mix (containing 10 mM of each dNTP)	2 µl
Primer A (LR ₁ 9727U)	3 µl
Primer B (LR ₁ - 10019D)	3 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix	2 µl

Allegato E- Tampone per l'elettroforesi (TBE 1X)

TRIS 890 mM

Acido Borico 890 mM

EDTA 25 mM