



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Corso di Dottorato di Ricerca in SCIENZE AGRARIE

Dipartimento di Agraria

Curriculum

“MONITORAGGIO E CONTROLLO DEGLI ECOSISTEMI AGRARI E FORESTALI IN AMBIENTE MEDITERRANEO”

CICLO XXXII

Indagine sanitaria relativa alla presenza di patogeni di nuova introduzione in Sardegna

Docente guida: Prof.ssa Salvatorica Serra

Tutor: Dott.ssa Vanda Assunta Prota

Tesi di dottorato di:
Nicola Schianchi

Anno Accademico 2019/2020

Indice

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 <i>Vitis vinifera</i> L.	9
1.1.1 Principali fitopatie causate da virus in vite.....	13
1.2 <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai e <i>Cucumis sativus</i> L.	21
1.2.1 Il collasso delle cucurbitacee	23
1.3 Bibliografia	26
2 SCOPO DEL PROGETTO E ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTE	38
3 CAPITOLO 1	40
4 CAPITOLO 2	44
5 CAPITOLO 3	64
6 CAPITOLO 4	67
7 CAPITOLO 5	69
8 DISCUSSIONE	71
8.1 Bibliografia	75

RIASSUNTO

Questo lavoro di tesi è stato incentrato su patogeni di nuova introduzione in Sardegna, in particolare su: *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV), *Grapevine asteroid mosaic virus* (GAMaV) e funghi appartenenti al genere *Olpidium* spp.

Per quanto riguarda il GPGV, nel primo capitolo si riportano i risultati di un monitoraggio territoriale condotto nel 2016 in Sardegna e in Lazio (in collaborazione con i colleghi del CREA di Roma) per individuare piante di vite con sintomi ascrivibili alla malattia denominata “Maculatura clorotica e deformazioni fogliari della vite” (*Grapevine leaf mottling and deformation*, GLMD). I campioni di vite esaminati tra le due regioni sono stati 195; di questi, 54 sono stati prelevati in diverse aree della Sardegna su diverse cultivar. Le indagini hanno identificato il GPGV quale è stato ritrovato associato alla sintomatologia complessa riscontrata in campo per la prima volta in Lazio e Sardegna. In particolare, è stata appurata la presenza del GPGV in tutti i campioni sintomatici, ma anche in alcuni asintomatici. Sul totale dei campioni analizzati, il 28% circa (52 campioni) ha mostrato essere infetto da GPGV. Questo numero aumenta se si considerano solo i campioni prelevati in Sardegna: quelli risultati positivi sono stati circa il 54% (28 campioni). I vigneti sopra i 10 anni di età e quelli impiantati con cultivar locali sono risultati negativi al GPGV con qualche eccezione.

Nel secondo capitolo sono state approfondite le indagini riguardanti la malattia GLMD ed il suo agente patogeno, in un vigneto di Vermentino particolarmente colpito dalla malattia. A tal fine, tra il 2017 e il 2018, sono stati prelevati 154 campioni classificati in tre categorie in base ai sintomi rilevati: sintomatici, asintomatici e presentanti altri sintomi. Nei due anni d'indagine tutti i campioni sintomatici sono risultati positivi al GPGV, ma anche il 52% degli asintomatici. Il numero dei campioni provenienti da piante sintomatiche è stato molto maggiore nel 2018 poiché molte delle piante asintomatiche, ma positive al GPGV nel 2017, hanno mostrato i sintomi nel 2018. Alcuni isolati di GPGV da piante sintomatiche sono stati sequenziati. L'analisi delle sequenze delle regioni corrispondenti alla proteina di movimento (MP) e a quella del capsido (CP) ha mostrato un elevato grado di affinità con gli isolati depositati in GenBank (tra il 98,67 e 100%). Gli alberi filogenetici indicano che le sequenze MP e CP degli isolati da Vermentino si raggruppano insieme a quelle degli isolati europei. Infine, in via preliminare, sono state avviate prove di risanamento attraverso l'applicazione

della tecnica dell'espianto meristematico a gemme di viti risultate infette dal solo GPGV. Con questa tecnica è stato possibile ottenere microplantule esenti da virus.

Nel terzo capitolo, oggetto di indagine è stato il virus GAMaV, finora mai segnalato in Italia. Nel corso di un'attività di ricerca finalizzata allo studio del genoma della vite, l'analisi del DNA ha rivelato la presenza di sequenze non corrispondenti al genoma della vite in quattro piante di *Cannonau*. Le sequenze anomale sono state identificate come corrispondenti a quelle del GAMaV e ciò è stato confermato dall'amplificazione con primer specifici dell'RNA estratto da acini. L'osservazione delle piante in campo non ha messo in evidenza sintomi ascrivibili ad affezioni virali confermando quanto già noto in letteratura.

Per quanto riguarda i funghi del genere *Olpidium*, nel quarto e quinto capitolo si riportano i risultati dei monitoraggi condotti su anguria e cetriolo in alcune aziende orticole del nord Sardegna, in seguito alla segnalazione di piante con sintomi di "collasso", malattia delle cucurbitacee attribuita comunemente al *Melon necrotic spot virus* o a funghi del genere *Monosporascus*. Per accertare l'eziologia dei sintomi rilevati in campo sono state prelevate piante sintomatiche e terreno infetto adiacente alle stesse. Gli esami fitopatologici hanno messo in evidenza la presenza di specie del genere *Olpidium* che sono state identificate sia morfologicamente che molecularmente come *O. virulentus* e *O. bornovanus* su anguria, ed *O. virulentus*, *O. bornovanus* e *O. brassicae* su cetriolo. I test di patogenicità effettuati in serra utilizzando terreni infetti hanno dimostrato la patogenicità di questi funghi, che hanno riprodotto la sintomatologia osservata in campo. Per la prima volta, queste specie di *Olpidium* sono state associate al "collasso" di anguria e cetriolo in Italia.

ABSTRACT

My work was focused on the detection of some new pathogens in Sardinia, namely: *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) and *Grapevine asteroid mosaic virus* (GAMaV) affecting grapevine and *Olpidium* spp. fungal pathogens on cucurbits.

In the first chapter, I report the results of a monitoring conducted in Sardinia and Lazio regions in 2016, aiming to detect vineyards manifesting Grapevine leaf mottling and deformation (GLMD) disease. A total of 195 grapevine samples were examined in the two regions; 54 samples were collected from different areas and cultivars in Sardinia. GPGV was identified as responsible of GLMD for the first time in Sardinia and Lazio. GPGV was ascertained in all symptomatic but also in some asymptomatic samples. About 28% of the total analysed (52) samples tested positive for GPGV; this number increases up to 54% (28 samples) if we consider only the samples taken in Sardinia. The virus was not detected in samples from vineyards older than 10 years and/or planted with local cultivars, with a few exceptions.

In the third chapter, investigations on GLMD and GPGV continued in a Vermentino vineyard severely affected by the disease. For this purpose, 154 samples were collected in 2017 and 2018. Samples were classified into three categories based on the symptoms: symptomatic, asymptomatic and showing other symptoms. During the 2-years survey, all symptomatic samples tested for the presence/absence of GPGV were positive, and also 52% of the asymptomatic ones. Furthermore, the number of positive samples collected from symptomatic plants was much higher in 2018 than in 2017, as many of the asymptomatic, but GPGV positive plants sampled in 2017 showed symptoms in 2018. A blast analysis of movement protein (MP) and coat protein (CP) sequences from Sardinian isolates showed a high identity level (between 98.67 and 100%) with sequences deposited in GenBank. Both MP and CP phylogenetic trees showed that most CP and MP sequences are grouped within the European strain clade.

The third chapter reports the first detection of GAMaV in Italy. Analysis of the grapevine genome revealed the presence of sequences belonging to the GAMaV in four *Cannonau* cv plants. This was confirmed by the amplification of the RNA extracted from berries with specific primers. No detectable symptoms were observed in any of the infected vines, hence supporting the hypothesis that GAMaV may be largely latent or semilatif.

Chapters 4 and 5 report for the first time in Italy the occurrence of *Olpidium virulentus* and *O. bornovanus* on watermelon and of *O. virulentus*, *O. bornovanus* and *O. brassicae* on cucumber. This is the result of a monitoring conducted on watermelon and cucumber in northern Sardinia, where plants with symptoms of "collapse", usually attributed to *Melon necrotic spot virus* or *Monosporascus* spp., were reported. Symptomatic plants were sampled together with infected soil adjacent to symptomatic roots. Pathogenicity tests carried out in greenhouses using infected soil reproduced symptoms observed in the field. *Olpidium* species were identified by using morphological and molecular methods.

1. INTRODUZIONE

Gli accresciuti flussi di trasporto del materiale vegetale in varie parti del mondo consentono anche ai patogeni delle piante di giungere in luoghi lontani, dove possono trovare condizioni ambientali idonee che ne favoriscono l'insediamento e l'espansione.

Nell'ultimo decennio, l'Unione Europea (UE) è stata costretta ad affrontare gravi emergenze fitosanitarie indotte da patogeni di varia natura che hanno colpito colture agrarie di enorme pregio e lunga tradizione, determinando ingenti perdite in termini di produzione, forza lavoro ed immagine. Ciò ha evidenziato le difficoltà di sottoporre a controllo sanitario la grande quantità di materiale in movimento, sia in arrivo da Paesi extraeuropei che all'interno del territorio comunitario.

Il Servizio fitosanitario nazionale (SFN) è l'autorità competente per la protezione delle piante ai sensi dei regolamenti (UE) 2016/2031 e 2017/625. Esso è articolato in: Servizio fitosanitario centrale, Servizi fitosanitari regionali per le Regioni a statuto ordinario o speciale, Servizi fitosanitari delle province autonome per le province di Trento e Bolzano. A livello scientifico è supportato dall'istituto nazionale di riferimento per la protezione delle piante, individuato nel Centro di ricerca Difesa e Certificazione del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA - DC).

Il passaporto delle piante, sotto forma di etichetta apposta sull'unità di vendita (lotto) con un formato semplificato e armonizzato in tutto il territorio comunitario, rappresenta la condizione imprescindibile per la libera circolazione delle piante nella UE. È di recentissima pubblicazione il REGOLAMENTO DELEGATO (UE) 2019/827 della Commissione del 13 marzo 2019, entrato in vigore lo scorso dicembre, il quale coinvolge in prima persona gli operatori professionali e stabilisce i criteri che questi devono rispettare al fine di ottenere l'autorizzazione al rilascio dei passaporti delle piante, assumendosi maggiori responsabilità per il proprio operato.

Una maggiore responsabilità delle aziende è stata promossa anche nel settore del materiale da imballaggio in legno, sulla base della norma internazionale per le misure fitosanitarie ISPM n.15. Ogni operatore professionista che acquista o vende piante e prodotti delle piante deve registrare tutti i dati che gli consentono di identificare il fornitore o l'acquirente di ogni unità movimentata, tracciabilità che deve essere mantenuta anche per lo spostamento di piante tra i propri siti di produzione e all'interno di un unico sito.

Gli organismi nocivi delle piante sono suddivisi in quattro categorie (Normativa Fitosanitaria dal 14 dicembre 2019, <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/14624>) al fine di una migliore definizione delle priorità delle azioni e delle misure da adottare, nonché di una migliore assegnazione delle risorse.

Gli **organismi da quarantena** sono patogeni non presenti nel territorio oppure, se presenti, non sono ampiamente diffusi. Questi organismi sono in grado di introdursi, di insediarsi e di diffondersi all'interno del territorio determinando un impatto economico, ambientale, sociale inaccettabile sul territorio stesso. Sono denominati **organismi da quarantena rilevanti per l'UE** quelli il cui territorio di riferimento è l'UE e quindi possiedono questo *status* soltanto al suo interno. Tra questi sono indicati come **prioritari per l'UE** quegli organismi nocivi il cui potenziale impatto economico ambientale o sociale sul territorio dell'Unione è più grave rispetto ad altri e che, qualora dovessero insediarsi in Europa, potrebbero comportare danni considerevoli. Per tali organismi sono previste rafforzate misure di prevenzione come, per esempio, l'intensificazione della sorveglianza, l'elaborazione di piani di emergenza e di azione, lo svolgimento di corsi con esercitazioni (simulazioni) per la formazione degli uffici competenti alla gestione di eventuali emergenze (SFN e laboratori accreditati).

Gli **organismi nocivi regolamentati non da quarantena** sono comunque considerati Organismi nocivi Particolarmente Pericolosi (OPP), ma ampiamente diffusi in UE e trasmessi prevalentemente dal materiale di moltiplicazione. Vista la loro elevata diffusione, non rispondono (più) ai criteri di un organismo da quarantena ma, considerate le negative ripercussioni economiche che la loro presenza comporta, occorre adottare misure fitosanitarie di prevenzione e controllo, soprattutto al momento di scegliere il materiale di moltiplicazione.

In Europa, il coordinamento in materia fitosanitaria è svolto dall'European Plant Protection Organization (EPPO) la quale è affiancata dall'European Food Safety Agency (EFSA), coinvolta con propri gruppi di lavoro nella stima del rischio potenziale di introduzione di alcuni patogeni nel territorio europeo. Ad oggi l'EPPO, costituito da 50 membri che coprono quasi tutti i Paesi dell'Unione europea e del Mediterraneo, ha il compito di identificare gli agenti patogeni che possono rappresentare un rischio per i Paesi membri e di formulare proposte sulle misure fitosanitarie atte a prevenire o contenere eventuali nuove introduzioni (<https://www.eppo.int>).

Quando vi sia anche il solo sospetto della presenza di un Organismo nocivo da quarantena rilevante per il territorio dell'UE, un operatore professionale ha l'obbligo di informare subito

il Servizio fitosanitario competente e adottare tutte le misure precauzionali per impedirne la diffusione.

La segnalazione di patogeni nuovi per un territorio, anche se non compresi negli elenchi stabiliti dalla legislazione vigente, pone problemi relativi alla loro ulteriore diffusione, ma anche alla gestione delle malattie da essi causate. D'altronde, non di rado, la consapevolezza di avere un nuovo problema fitopatologico da affrontare avviene quando il problema è già insediato in una o più zone del territorio. Per una efficace gestione delle nuove malattie è necessario studiare il comportamento del patogeno nelle condizioni ambientali e colturali tipiche del territorio stesso.

In questo contesto, il Dipartimento di Agraria dell'Università di Sassari è sempre stato molto attivo nell'individuare i nuovi problemi fitopatologici e nell'affrontarne lo studio. Da alcuni anni è stata individuata in Sardegna una nuova malattia ad eziologia virale, denominata "Maculatura e deformazioni fogliari della vite" e associata al *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV). Nei casi più gravi, questa malattia compromette lo sviluppo vegetativo della vite riducendo sostanzialmente la produzione. I primi vigneti con sintomi sono stati notati nei primi anni del 2000 in Slovacchia e Italia (Trentino Alto Adige), ma la conferma dell'eziologia della malattia è avvenuta dopo circa 10 anni (Giampetruzzi *et al.*, 2012; Mavrič Plesko *et al.*, 2014). Successivamente, un vigneto con sintomi caratteristici di GPGV è stato individuato anche dai ricercatori del Dipartimento di Agraria di Sassari nel nord Sardegna, e dopo la conferma eziologica sono iniziati gli studi per approfondire le conoscenze su questa virosi. In quest'ambito si è inserito il mio lavoro di tesi, che è stato poi arricchito da altre prime segnalazioni di fitopatie su vite e cucurbitacee, in particolare anguria e cetriolo.

Di seguito descriverò brevemente le colture oggetto delle mie ricerche e le principali malattie che incidono su di esse.

1.1 *Vitis vinifera* L.

Le origini della vite e della sua coltivazione hanno stimolato numerosi studiosi a cui dobbiamo le cospicue informazioni utili alla costruzione del percorso evolutivo della pianta e della sua relazione con gli esseri umani. Le conoscenze geologiche relative a reperti fossili riferibili al genere *Vitis* ci danno informazioni riguardo alla sua presenza nelle terre emerse dell'attuale Europa risalenti a circa 55-60 milioni di anni fa; anche la produzione dell'uva ha origini molto antiche; infatti, le prime testimonianze di vinificazione risalgono a 7000-7400

anni fa, mentre la scoperta di semi di uva domestica risalgono all'8000 a.C. nel Medio Oriente. Nel sud Italia e nelle isole, la viticoltura si è diffusa a partire dalla Sicilia dove le testimonianze sulla presenza del vino risalgono al 2000 a.C (Scienza *et al.*, 2007).

La vite è una delle colture eduli più coltivate al mondo ma, prendendo come riferimento i dati pubblicati dalla FAO nel 2016 (Figura 1.1), possiamo notare come la superficie vitata mondiale sia drasticamente diminuita nel tempo, passando dagli oltre 9 milioni di ettari degli anni '60 ai 7 milioni del 2016. Secondo l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino (OIV), però, questa superficie aumentava fino a 7,4 Mio di ettari nel 2018. Il panorama mondiale ci mostra un aumento della superficie vitata in Cina mentre quella europea e italiana decresce. Il calo è da imputare essenzialmente ai tre paesi più vitati al mondo, Spagna, Francia ed Italia, i quali hanno perso nell'insieme circa 2,5 milioni di ettari. In controtendenza, il paese asiatico ha incrementato il suo "vigneto" a partire dagli anni '80, specialmente dal 2000 in poi passando da 418.000 a 840.000 ha in appena dieci anni. Nel 2018 la produzione di uva era di 78 Mio di tonnellate, in aumento, nonostante la riduzione della superficie vitata mondiale (<http://www.oiv.org/>) a causa dell'incremento delle rese dovuto al miglioramento delle tecniche viticole.

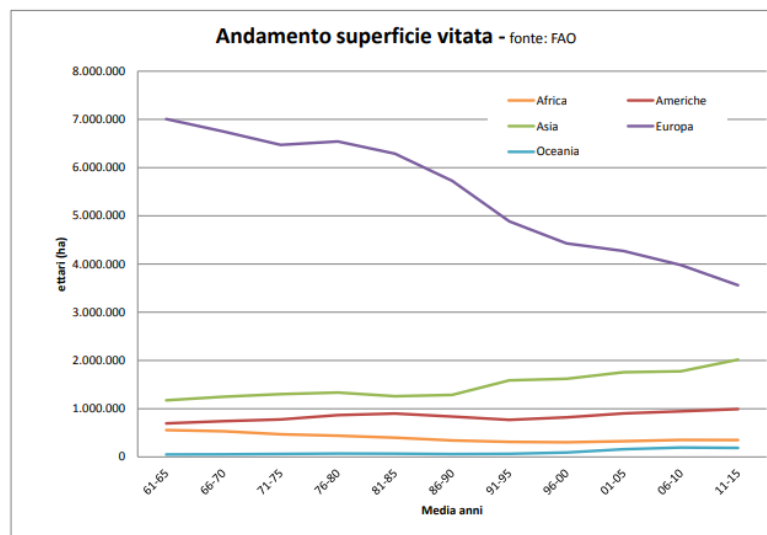


Figura 1.1 Superficie coltivata a vite nel mondo (Fonte: FAO 2016).

In Italia la superficie vitata nel 2019 era pari a 700 mila ettari, mentre in Sardegna era pari a 27 mila ettari (<http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=37850>). Di questi ultimi, 15 mila ettari erano destinati alla produzione di vini di alta qualità: un vino DOCG, 19 vini DOC e 15 vini IGT (<https://www.sardegnaimpresa.eu>).

Al fine di migliorare la produzione viticola in termini quantitativi e qualitativi, risulta importante la conoscenza delle numerose fitopatie che possono colpire la pianta, siano esse di origine fungina, batterica o virale, al fine di combatterle tramite gli appropriati mezzi di lotta. Diversi agenti patogeni sistemici sono stati identificati in *V. vinifera*: 5 viroidi, 8 fitoplasmi, 1 batterio xilematico (Martelli, 2014) e più di 80 virus (Martelli, 2018), il più alto numero di patogeni intracellulari che siano mai stati trovati in una singola coltura. Recentemente, grazie all'ausilio di tecnologie di sequenziamento ad alto rendimento, ne sono stati identificati molti altri; tra questi troviamo il *Grapevine vein clearing virus* (GVCV), il *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) ed il *Grapevine red blotch virus* (GRBV, Cieniewicz *et al.*, 2020), i quali stanno divenendo una seria minaccia per la viticoltura. Inizialmente, come a volte accade, i sintomi associati a GVCV, GPGV e GRBV sono stati confusi con quelli indotti da virus già noti, come quelli della malattia della degenerazione infettiva (nel caso di GPGV e GVCV) o associati alla malattia dell'accartocciamento fogliare (nel caso di GRBV, Figura 1.2). Questi tre virus di nuova introduzione si stanno diffondendo rapidamente nel mondo (Figura 1.3).

La vite è inoltre suscettibile ad altre malattie, tra queste le principali sono: la Peronospora, causata da *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni; l'Oidio o Mal bianco causato da *Erysiphe necator* Schwein.; la Muffa grigia causata da *Botrytis cinerea* Pers.; le malattie del legno causate da diversi patogeni fungini.

Plasmopara viticola è un oomicete endemico del Nord America. In Europa, questa specie è stata osservata per la prima volta nel 1878 e probabilmente fu introdotta tramite l'utilizzo delle talee americane per ripiantare i vigneti francesi distrutti dalla fillossera (Gessler *et al.*, 2011). Le epidemie di peronospora sono frequenti nelle zone e/o nelle annate con clima umido e piovoso durante il periodo primaverile – estivo. Oltre a ridurre la produzione dell'annata, gli attacchi di peronospora possono incidere negativamente sull'accumulo di riserve nutritive nel tralcio, determinando un rallentamento della ripresa vegetativa nell'anno successivo (Marenghi, 2007).

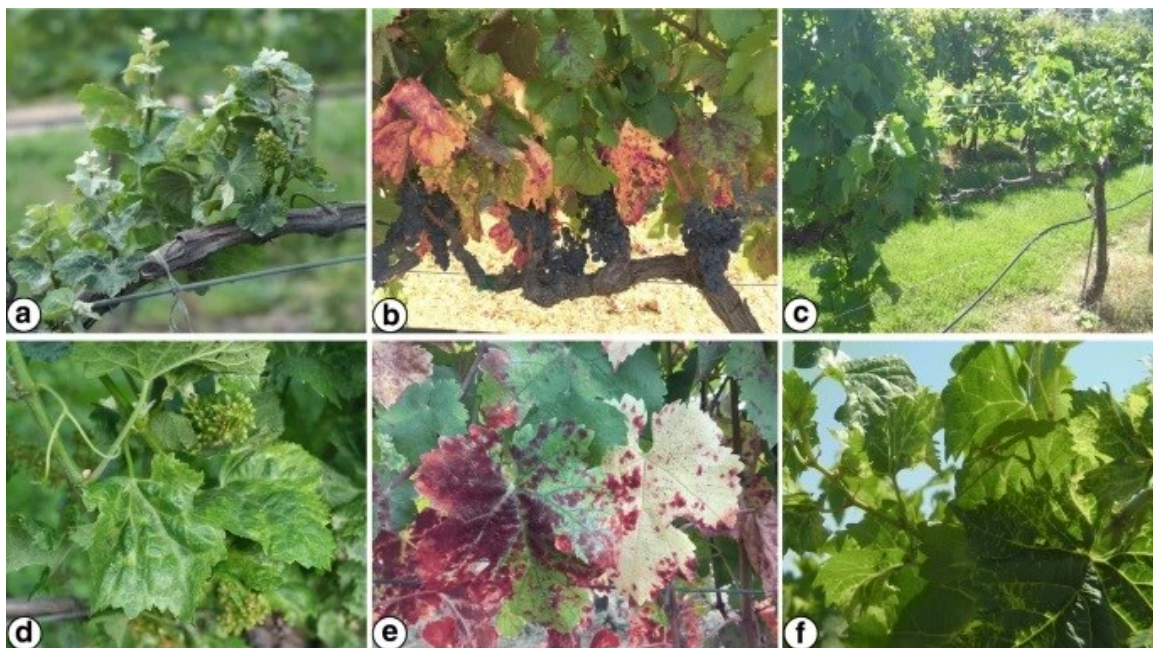


Figura 1.2. Sintomi tipici della Maculatura e deformazioni fogliari della vite sulle cvs Traminer (a) e Pinot gris (d) infettati da *Grapevine Pinot Gris Virus* (GPGV); della Malattia a macchie rosse su cvs Cabernet sauvignon (b) e Cabernet franc (e) infettati da *Grapevine red blotch virus* (GRBV); della malattia Vein clering disease su Chardonnay (f) infettato da *Grapevine vein clearing virus* (GVCV) a confronto con una pianta sana (c). Da Cieniewicz *et al.* (2020).

Erysiphe necator appartiene alla divisione degli Ascomiceti ed è anch'esso endemico del Nord America. Come la peronospora, è un parassita obbligato della vite, ma le sue epidemie sono più diffuse in quanto si sviluppa bene in un ampio range di temperatura ed umidità relativa (Gadoury *et al.*, 2015).

Botrytis cinerea è un parassita facoltativo che attacca circa 220 dicotiledoni spontanee e coltivate, causando la malattia denominata botrite o muffa grigia. Su vite i sintomi si manifestano prevalentemente sul grappolo, nel periodo che va dall'invaiaitura alla vendemmia (Wilcox *et al.*, 2015). Questo fungo è in grado di causare perdite notevoli in campo e durante la conservazione dei grappoli una volta raccolti. Inoltre, la modificazione della composizione chimica delle bacche infette determina gravi alterazioni nei vini.

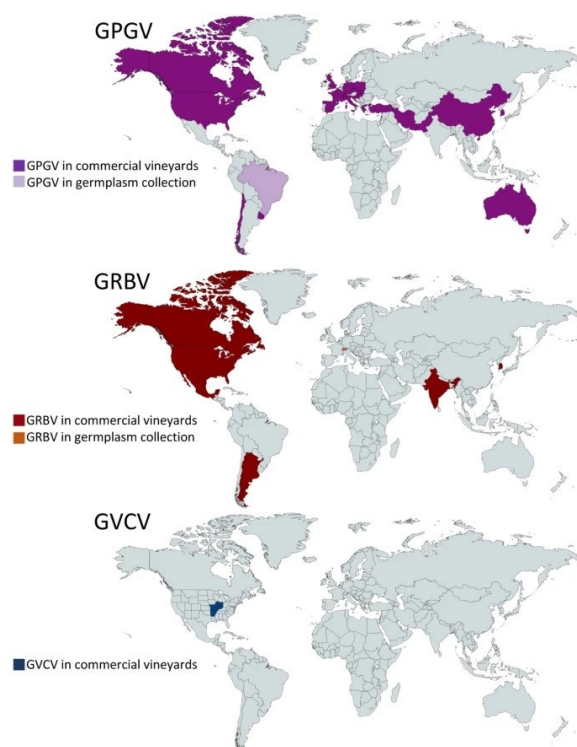


Figura 1.3. Distribuzione nel mondo del *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV, in alto), del *Grapevine red blotch virus* (GRBV, al centro) e del *Grapevine vein clearing virus* (GVCV, in basso). Da Cieniewicz *et al.* (2020).

Negli ultimi 10-15 anni hanno assunto un ruolo prioritario le malattie del legno della vite o Grapevine trunk diseases (GTD), causate da diversi agenti patogeni fungini che colonizzano il legno degli organi perenni causando necrosi, scolorimenti, infezioni vascolari e carie bianca (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2013). Gli attacchi determinano perdita di produzione, ma possono portare anche alla morte della pianta.

Poiché, per quanto riguarda la vite, la tesi è incentrata sullo studio di patologie a carattere virale, di seguito vengono riportate in maniera più dettagliata le principali virosi della vite.

1.1.1 Principali fitopatie causate da virus in vite

La vite può ospitare molte entità virali e la convivenza tra vite e virus probabilmente dura da secoli. Le prime prove indirette di malattie virali in vite risalgono all'epoca romana (Maree *et al.*, 2013; Martelli, 2014), ma i loro effetti dannosi su crescita e produzione si sono

accentuati una volta trasmesse attraverso l'innesto nel materiale di propagazione e la sua diffusione.

I virus, parassiti intracellulari obbligati che vivono a spese delle cellule ospiti, possiedono un piccolo genoma dalla capacità di codifica limitata a circa una dozzina di proteine e per compiere il proprio ciclo vitale, diffondersi ed infettare i tessuti, hanno sviluppato un rapporto molto complesso con la pianta ospite (Wang *et al.*, 2015). Negli ultimi anni, l'evolversi delle tecnologie di sequenziamento ha dato un grande contributo alla scoperta di nuove ampelopatie di origine virale in vite (Giampetruzzi *et al.*, 2012; Al Rwahnih *et al.*, 2012) e parecchi sono stati gli studi che hanno descritto la diversità genetica delle popolazioni dei virus e dei sintomi legati alle malattie da essi generate. A tutt'oggi, però, sono pochi gli studi di approfondimento sugli aspetti metabolici e fisiologici causati da infezioni virali nella vite. Solo recentemente è emerso l'interesse per questi studi, in quanto è sempre più evidente che i virus inducano diversi cambiamenti che potenzialmente possono influenzare le risposte generali della vite nell'interazione con l'ambiente.

Le principali virosi che colpiscono la vite sono: la “Degenerazione infettiva” causata da *Grapevine fan leaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV) ed altri membri appartenenti al genere dei *Nepovirus*; il “Complesso dell'accartocciamento fogliare”, indotto da più entità virali raggruppate nel complesso denominato *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) appartenenti ai generi *Ampelovirus* e *Closterovirus*; il “Complesso del legno riccio”, che comprende quattro distinte malattie associate a diversi agenti eziologici (Martelli, 2014).

L'impatto di queste importanti malattie in vite include riduzioni del vigore delle piante, della resa e della qualità dei frutti, con considerevoli perdite di tipo economico. Per tale motivo, molti studi sono mirati a trovare strategie di controllo di queste malattie, che possono causare ingenti riduzioni di profitto in campo vitivinicolo (Ricketts *et al.*, 2015).

La movimentazione del materiale di propagazione rappresenta una delle cause di maggior diffusione dei virus della vite, in tutti i casi in cui la commercializzazione del materiale di propagazione non tiene nella giusta considerazione il controllo sanitario sulla presenza di possibili agenti patogeni intracellulari (Naidu *et al.*, 2015). Oggi, innovative tecniche di diagnosi molecolare consentono, oltre che di individuare, anche di caratterizzare differenti ceppi virali, ciascuno dotato di differenti comportamenti biologici; inoltre, con l'avvento della Next Generation Sequencing technologies (NGS, Al Rwahnih *et al.*, 2015), sono aumentate

anche le conoscenze relativamente alle caratteristiche dei virus della vite (Giampetruzzi *et al.*, 2012; Basso *et al.*, 2015; Maliogka *et al.*, 2015).

Contro la diffusione dei virus è possibile adottare solo misure di tipo preventivo, che limitano i rischi di infezione soprattutto con l'impiego di materiale di propagazione sano o risanato, mentre il contenimento può essere attuato con trattamenti chimici sui vettori (Maliogka *et al.*, 2015).

Negli ultimi decenni sono state messe a punto ed applicate strategie che mirano all'eliminazione dei virus più pericolosi da viti infette, che possono così essere indirizzate verso i percorsi per la produzione di materiale certificato. Le metodologie comunemente impiegate nei programmi di risanamento in vite sono relative alla termoterapia in vitro e/o in vivo, all'espanto meristemico, alla chemioterapia e alla crioterapia. Le ultime due tecniche sono più o meno efficaci in relazione alla specie virale (Maliogka *et al.*, 2015); in particolare sono valide per il risanamento dal *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) e dai viroidi, anche se il risanamento da questi ultimi risulta più difficile (Gribaudo *et al.*, 2006; Gambino *et al.*, 2011). Invece, si è dimostrata efficace nei confronti di un gran numero di virus e viroidi la tecnica dell'embriogenesi somatica, sebbene non sia comunemente usata a causa del rischio delle variazioni somaclonali che essa può indurre (Gambino *et al.*, 2011).

1.1.1.1 Complesso dell'Arricciamento fogliare o degenerazione infettiva

È una delle malattie virali più pericolose ed è caratterizzata da due espressioni sintomatiche, malformante e cromogena, indotte rispettivamente da distinti ceppi del *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). Esso appartiene al subgroup A del genere *Nepovirus* della famiglia *Comoviridae* (Mayo e Robinson, 1996) ed è stato il primo ampelovirus ad essere trasmesso mediante inoculazione meccanica (Cadman *et al.*, 1960). La forma malformante si manifesta con foglie caratterizzate da seni peziolari aperti che conferiscono la caratteristica forma "a ventaglio", spesso accompagnata da raccorciamento degli internodi, fasciazioni e biforcazione dei germogli i quali, nel loro insieme, rendono l'aspetto generale della pianta tendenzialmente cespuglioso. Il ceppo cromogeno si evidenzia con decolorazioni, mosaico delle nervature ed ingiallimenti più o meno estesi che possono interessare l'intera lamina fogliare o addirittura l'intera pianta. Entrambe le forme causano perdite produttive che

possono raggiungere anche l'80% in relazione alla sensibilità varietale (Andret-Link *et al.*, 2004). Queste espressioni sintomatiche possono essere indotte anche da altri virus appartenenti al genere dei Nepovirus, ad esempio *Arabid mosaic virus* (ArMV).

Oltre ad essere stato il primo ampelovirus ad essere trasmesso mediante inoculazione meccanica, il GFLV è stato anche il primo ad essere caratterizzato strutturalmente e molecularmente. Esso è costituito da particelle poliedriche di circa 30 nm di diametro con genoma bipartito, composto da due singoli filamenti di RNA a senso positivo di 253 kDa (RNA-1) e di 122 kDa (RNA-2), ed è necessaria la contemporanea presenza dei due filamenti perchè possa avvenire l'infezione.

Le infezioni da GFLV e da altri nepovirus possono provocare dei cambiamenti cellulari sotto forma di strutture tubolari, contenenti la Movement Protein (MP) e raggruppate nel citoplasma o nel nucleo (Ritzenthaler *et al.*, 1995), di escrescenze nelle pareti cellulari e di corpi di inclusione vacuolari, questi ultimi composti principalmente da ribosomi, filamenti del reticolo endoplasmatico e vescicole membranose, contenenti una rete di sottili fibrille simili a filamenti di acido nucleico (Martelli e Russo, 1984).

La vite risulta suscettibile a questa virosi con diversi livelli di sensibilità a seconda della varietà. Inoltre, l'infezione risulta molto diffusa nelle viti europee, mentre sono stati riscontrati alti livelli di resistenza in alcune piante di vite asiatica in Afghanistan e Iran (Lahogue e Boulard, 1996). I portainnesti americani sono suscettibili e molto sensibili a questa malattia, mentre la *Vitis lambrusca* può risultare infetta ma asintomatica.

Il vettore risulta essere un nematode ectoparassita Longidoridae, lo *Xiphinema index* (Thorne and Allen, 1950) che si nutre dalle radici (Brown e Weischer, 1998). La trasmissione è di tipo non circolativa e semipersistente: il virus viene acquisito dal nematode attraverso le piante infette, durante le fasi trofiche, e viene inoculato in nuove piante ospiti entro 1-10 min (Wyss, 2000). Il GFLV non si replica all'interno del nematode, ma le particelle virali possono rimanere vitali per circa 8 mesi (Taylor e Rasky, 1964). Il nematode può sopravvivere nel suolo in vigneto per molti anni in presenza o in assenza di piante ospiti (Demangeat *et al.*, 2005).

1.1.1.2 Complesso dell'Accartocciamento fogliare

Tra le malattie più importanti troviamo questa virosi, la più diffusa nelle regioni viticole del mondo e la più importante da un punto di vista economico (Martelli, 2014; Naidu *et al.*, 2014).

L'affezione può causare impatti negativi, con conseguente significativa riduzione nella resa in uva e nella qualità del vino, in quanto ha effetti sulle prestazioni fisiologiche delle piante (Alabi *et al.*, 2016). I primi sintomi di questa fitopatia compaiono nelle foglie adulte per proseguire fino alle giovani foglie, con espressioni più pronunciate alla fine della stagione vegetativa. Esse si manifestano sotto forma di ripiegamento infero e consistenza cartacea della lamina fogliare e/o cambiamento di colore: antocianosi e decolorazioni internervali (Cabaleiro *et al.*, 1999), a seconda che il virus colpisca cultivar a bacca nera oppure bianca.

Responsabili di questa ampelopatia sono un gruppo di virus dalle particelle filamentose, di lunghezza variabile, appartenenti alla famiglia *Closteroviridae* ed ai generi *Ampelovirus* e *Closterovirus*, indicati dall'acronimo GLRaV (*Grapevine leafroll associated virus*). Ad oggi, tra i 9 gruppi conosciuti, i più noti e diffusi risultano essere: GLRaV-1, 2 e 3, quest'ultimo di gran lunga il più presente e dannoso (Boschia *et al.*, 1995; Gugerli, 2009).

Come per le altre malattie virali, la diffusione di questo gruppo di virus è causata principalmente dall'uomo con l'utilizzo di materiale di propagazione infetto, non sanitariamente controllato. A brevi distanze, invece, la loro trasmissione naturale, di tipo semipersistente, vede coinvolte alcune specie di Coccidi e Pseudococcidi (Belli *et al.*, 1994), ed in particolare le due specie *Planococcus ficus* e *P. citri*. La capacità vettrice è maggiore allo stadio di neanide rispetto a quello delle femmine adulte. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che quest'ultimo stadio trasmette in maniera più efficiente GLRaV-1 (Bertin *et al.*, 2016).

1.1.1.3 Complesso del Legno riccio

I patogeni virali ritenuti capaci di causare alterazioni legnose vengono raggruppati in questa malattia complessa (Martelli, 1993); essa comprende più sindromi indotte da differenti entità capaci di determinare sintomi nel legno, nei tessuti del cambio cribro-vascolare e nella corteccia. Spesso si evidenzia gonfiore dei tessuti nel punto d'innesto, accompagnato da una proliferazione più o meno intensa della corteccia e conseguente rottura, quest'ultima più

evidente al momento dell'innesto. Gli studi effettuati su questa affezione hanno consentito di identificare e caratterizzare i virus associati ad essa (Martelli, 2014): *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) e *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV). Per l'attribuzione dei sintomi indotti da ciascuna di queste entità è risultata di fondamentale importanza la selezione di indicatori quali *Vitis rupestris* St. George, LN33 (ibrido Couderc1613 X *Vitis vinifera* cv. Thompson Seedless) e Kober 5BB (ibrido *Vitis berlandieri* X *Vitis riparia*), diversamente sensibili alle sindromi virali e quindi capaci di mostrare le stesse in maniera discriminante (Goheen e Luhn, 1978; Savino *et al.*, 1989; Martelli, 1993).

Il genoma di questi virus è costituito da un singolo filamento di RNA (+) di circa 7,4-7.6 kb, incapsidato in particelle virali flessuose di circa 700 nm di lunghezza e di 12 nm di diametro (Martelli *et al.*, 2007).

L'entità più diffusa è il GVA (Garau *et al.*, 1994), appartenente al genere *Vitivirus*, che induce sull'indicatore legnoso Kober 5BB caratteristici sintomi sotto forma di butterature più o meno profonde sul legno, provocate da una cattiva differenziazione dei tessuti che porta problemi nel flusso delle sostanze nutritive. Come conseguenza, le viti affette possono evidenziare forti acinellature dei grappoli che influenzano, in modo negativo, la resa quali/quantitativa della vendemmia. Il GVB, anch'esso un *Vitivirus*, è responsabile della Suberosi corticale (Boscia *et al.*, 1993), che manifesta la propria presenza con sintomi specifici nelle combinazioni d'innesto con l'indicatore legnoso sensibile LN33; il virus produce tipiche fessurazioni nel legno e/o suberificazioni sulla corteccia, ritardo vegetativo più o meno evidente delle piante colpite con riduzione della produttività e longevità (Garau *et al.*, 1985). Entrambi i virus sono trasmessi da cocciniglie, insetti vettori appartenenti ai generi *Planococcus* e *Pseudococcus*, il cui controllo è essenziale per evitare l'espansione della malattia.

Come le altre affezioni ad eziologia virale, la diffusione di questa malattia complessa in tutte le aree viticole mondiali è attribuibile principalmente all'uso di materiale di propagazione infetto.

1.1.1.4 Maculature e deformazioni fogliari della vite

Il *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV), associato alla malattia denominata Maculatura e deformazioni fogliari della vite o Grapevine Leaf Mottling Deformation (GLMD), ha destato particolare interesse a livello mondiale. È stata l'innovativa "New Generation Sequency" (NGS) a consentire di associare a questa sintomatologia il virus, che è stato attribuito al genere *Trichovirus* fam. Betaeiviridae, (Giampetruzzi *et al.*, 2012). Il genoma virale è un single stranded RNA a senso positivo che è stato assemblato tramite la tecnologia "Illumina".

I sintomi associati al GPGV annoverano mosaici, punteggiature clorotiche, deformazioni fogliari, accrescimento stentato; il periodo durante il quale sono visibili è maggio-luglio e, nei casi più gravi, accorciano considerevolmente il vigore della pianta (Giampetruzzi *et al.*, 2012). I grappoli sono soggetti a calo in numero ed acinellatura più o meno severa con conseguenze in peso sulla quantità di uva ma anche in un peggioramento qualitativo fattori incompatibili con una ottimale produzione di vino per le perdite economiche di un certo rilievo che esso può indurre (Malossini *et al.*, 2012). Nella maggior parte dei casi le piante, dopo una prima fase primaverile di scarso sviluppo, riprendono a vegetare normalmente generando una vegetazione di soccorso che riesce in parte a tamponare i danni della malattia, ma che non può oramai recuperare la produzione persa.

Il virus è stato segnalato per la prima volta in Italia su *Pinot grigio* in Trentino Alto Adige (Giampetruzzi *et al.*, 2012) e successivamente in Francia, Svizzera, Ungheria, Spagna, Portogallo, Grecia, Turchia, Bosnia, Croazia, Romania, Serbia, Slovenia, Ucraina, Slovacchia, Repubblica Ceca, Corea del Sud, Cina, Georgia, USA e Canada (Gualandri e Saldarelli, 2016). Recentemente il GPGV è stato segnalato in: Pakistan, Brasile, Croazia, Australia, Regno Unito, Cile, Ucraina, Armenia, Iran e Argentina (Cieniewicz *et al.*, 2020).

In Italia, sintomi che richiamavano quelli osservati su *Pinot grigio* sono stati rilevati anche in Friuli Venezia Giulia su *Traminer* e *Pinot nero* (Saldarelli *et al.*, 2013), *Friulano* e *Glera* (Bianchi *et al.*, 2015). Ulteriori segnalazioni provengono dal Veneto e dall'Emilia Romagna (Beber *et al.*, 2013), dalla Puglia su *Black Magic* e *Supernova* (Morelli *et al.*, 2014) ed ultimamente anche dal Lazio e dalla Sardegna su *Vermentino*, *Torbato*, *Monica*, *Sauvignon blanc*, *Sangiovese* e *Malvasia* (Gentili *et al.*, 2017).

Di recente, il numero di piante sintomatiche risulta in crescita, così come l'identificazione del GPGV come causa della malattia, fatto quest'ultimo che suscita particolare allarme e quindi promuove la ricerca in risposta a questa nuova "emergenza".

Ad oggi, l'unico vettore accertato del GPGV è il *Colomerus vitis* (Malagnini *et al.*, 2016), acaro monofago che con il suo apparato boccale formato da pedipalpi e cheliceri è in grado di acquisire e trasmettere alcuni virus (Gispert *et al.*, 1998; Saldarelli *et al.*, 2015). Poiché il virus è stato ritrovato anche in altri ospiti, quali *Chenopodium album* L. (Fat Hen), *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.), *Asclepias syriaca*, *Rubus* spp., *Rosa* spp., *Fraxinus* spp., si suppone che ci siano altri vettori responsabili della trasmissione del GPGV (Gualandri *et al.*, 2017; Demián *et al.*, 2018).

Le principali strategie di controllo delle malattie virali delle piante si basano sulla diagnosi precoce, l'eradicazione e l'uso di cultivar geneticamente resistenti o tolleranti. Per questo, sono state sviluppate diverse tecniche per la diagnosi di GPGV, basati su saggi biologici tramite l'innesto e sulla RT-PCR convenzionale (Glasa *et al.*, 2014; Beuve *et al.*, 2015; Saldarelli *et al.*, 2015). Di recente, sono state applicate tecniche di "Real Time" RT-PCR (RTqPCR) utilizzando il SYBR Green che consente una stima della carica virale (Bertazzon *et al.*, 2017). I metodi di RTqPCR hanno dimostrato di essere molto efficaci per gli studi di carattere epidemiologico (Olmos *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2016). Inoltre, è stato sviluppato anche un kit ELISA, Bioreba AG (Svizzera), per l'identificazione del GPGV (Poignavent *et al.*, 2018).

1.1.1.5 Il Mosaico stellare

Il *Grapevine Asteroid mosaic associated virus* (GAMaV) fa parte del complesso del fleck ed appartiene al genere *Marafivirus* (Sabanadzovic *et al.*, 2000; Martelli, 2014; Sabanadzovic *et al.*, 2017). Il GAMaV è poco conosciuto ed i sintomi sono stati provvisoriamente associati alla malattia detta "Mosaico stellare della vite" (Martelli, 2014; Candresse *et al.*, 2017). Questo virus è stato descritto per la prima volta in *V. vinifera* in California e si pensava che fosse limitato agli Stati Uniti; successivamente, invece, è stato osservato anche in Europa e Sud Africa (Martelli, 2014), Canada (Xiao e Meng, 2016) e Uruguay (Jo *et al.*, 2015). I sintomi della malattia, a cui il GAMaV è associato, sono caratterizzati da punti clorotici a forma di stella sulle foglie accompagnati, a volte, da un centro necrotico, distribuiti

irregolarmente sulla lamina. Le foglie possono risultare asimmetriche, contorte e raggrinzite lungo le nervature e le viti colpite appaiono spesso rachitiche con scarsa produzione. I sintomi sull'apparato vegetativo di solito si manifestano in primavera e con l'avanzare dell'estate diventano meno severi (Martelli, 2014). In *V. rupestris* la malattia provoca delle bande gialle che si sviluppano lungo le nervature principali delle foglie (Martelli, 2014). Non sono molte informazioni su questa malattia in quanto nella maggior parte delle cv rimane latente.

In Italia è stato segnalato per la prima volta su Cannonau da Porceddu *et al.* (2018).

1.2 *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai e *Cucumis sativus* L.

L'anguria, *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai, è una pianta della famiglia delle Cucurbitacee originaria dell'area sud-est del Mediterraneo e dell'Africa settentrionale. In seguito, è stata introdotta in Asia occidentale, Asia centrale, subcontinente indiano, Cina, gran parte dell'Africa, Nord e Centro America, Caraibi, Sud America (www.eppo.int). Il paese con la maggior produzione al mondo è la Cina (63 Mio t, dati FAO), seguita da Turchia, Iran e Brasile (Schmidt *et al.*, 2019). In Brasile, la coltivazione dell'anguria ha avuto una produzione media di 2 milioni di tonnellate nel 2014 (FAOSTAT, 2015) e ha un ruolo economico e sociale importante (Souza *et al.*, 2012). In Italia, la coltivazione dell'anguria si estende su una superficie di 12.300 ha tra Sicilia, Emilia Romagna, Puglia e Lazio per le produzioni in pieno campo (Pardossi, 2018). In Sardegna l'anguria è coltivata su una superficie di 5.467 ha (Laore, 2019).

Il cetriolo, *Cucumis sativus* L., appartiene anch'esso alla famiglia delle Cucurbitaceae ed è originario dell'Africa; successivamente è stato coltivato anche in Asia, dove sono stati avviati dei processi di miglioramento genetico della specie (Staub *et al.*, 1999). Il Paese con le maggiori produzioni è la Cina (56,3 Mio t), segue l'Iran (2.3 Mio t), la Turchia (1,8 Mio t) e la Russia (1,6 Mio t). In Italia la produzione del 2018 è stata di 54.089 t (<http://www.fao.org/home/en/>). La coltivazione del cetriolo in Italia incide su circa 2.081 ha e la coltivazione in pieno campo si localizza soprattutto in Puglia, Calabria, Sicilia, Lazio, Veneto e Toscana (Pardossi, 2018). In Sardegna il cetriolo è coltivato su una superficie di 418 ha (Laore, 2019).

Le cucurbitacee sono un vasto gruppo di specie suscettibile a oltre 200 malattie causate da diversi agenti patogeni (Zitter *et al.*, 1996; Tuttle McGrath, 2004).

Per quanto riguarda le virosi, le cucurbitacee sono gravemente minacciate dal genere *Potyvirus*, famiglia Potyviridae. L'Italia produce grandi quantità di anguria, melone, cetriolo e le gravi perdite in resa sono spesso attribuite a diverse specie di potyvirus, come *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Melon necrotic spot virus* (MNSV). Quest'ultimo ha causato gravi perdite nella produzione di anguria perché causa la morte improvvisa della pianta prima o durante la maturazione dei frutti; inoltre, è in grado di aumentare la sua patogenicità quando associato al fungo vettore *Olpidium bornovanus* (Guirado *et al.*, 2006).

Le malattie causate da questi agenti eziologici possono diffondersi rapidamente e raggiungere alti livelli di incidenza in quanto sono trasmessi in modo non persistente da diverse specie di afidi. Il WMV è stato segnalato per la prima volta in Italia 40 anni fa (Lovisolo *et al.*, 1983) e per lungo tempo ha causato solo lievi sintomi senza alcun impatto rilevante sulla produzione (Leqoc *et al.*, 1998). I sintomi causati da WMV si manifestano in maniera più grave sotto forma di: mosaici, unione delle nervature, deformazioni e decolorazioni fogliari, deformazione dei frutti con significative riduzioni della resa e della qualità dei frutti (Crescenzi *et al.*, 2001; Finetti-Sialer *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda le malattie causate da miceti, tra le più importanti troviamo l'oidio o mal bianco causato da *Golovinomyces orontii* (Castagne) V.P. Heluta e *Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollacci; questa malattia è ampiamente diffusa sia in serra che in campo (McCreight, 2006). L'oidio cresce bene in ambienti con elevata umidità e temperature moderate. Le serre offrono un ambiente umido e temperato ideale per la diffusione della malattia che può indurre ingenti perdite di produzione.

La peronospora delle cucurbitacee è causata da *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev. È una delle più importanti malattie fogliari delle cucurbitacee e causa significative perdite di resa negli Stati Uniti, Europa, Cina e Israele (Thomas, 1996). Il patogeno ha un'ampia distribuzione geografica ed è stato segnalato in oltre 70 paesi, inclusi ambienti semiaridi e tropicali. Questo patogeno infetta circa 20 diversi generi di cucurbitacee (Palti e Cohen, 1980; Lebeda e Urban, 2007).

Di seguito, viene descritta in maniera più approfondita la micosi denominata il “collasso delle cucurbitacee”, in quanto è stata oggetto del lavoro di tesi.

1.2.1 Il collasso delle cucurbitacee

Il collasso delle cucurbitacee è un insieme di malattie distruttive già noto su melone ed anguria nelle aree di coltivazione aride e semiaride (Cohen *et al.*, 2012). I sintomi si manifestano nelle radici e sono caratterizzati da lesioni marroni e aree necrotiche, che si traducono in un rapido appassimento delle piante seguito da una perdita parziale o totale dei frutti. Le radici sintomatiche si presentano prive di capilizio radicale e sono spesso colonizzate da più patogeni fungini, sebbene possa prevalere, in un determinato ambiente, un singolo organismo patogeno (Infantino *et al.*, 2004; Chilosi *et al.*, 2008). Il *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker è stato segnalato come agente causale del collasso del melone in diverse aree del Mediterraneo, tra cui Italia (Chilosi *et al.*, 2008), Israele (Cohen *et al.*, 2000), Egitto (El-Desouky *et al.*, 2003) e Grecia (Markakis *et al.*, 2018). Questo patogeno si trova generalmente in ambienti aridi a semi-aridi come quelli di Messico, Honduras, Guatemala, Stati Uniti meridionali (Texas, Arizona, California), Spagna meridionale, Israele, Iran, Tunisia, Libia, Arabia Saudita, India, Pakistan, Giappone e Taiwan (Karlatti *et al.*, 1997, Martyn e Miller, 1996; Tuttle McGrath, 2004). In Tunisia, *M. cannonballus* e *M. eutypoides* (Petr.) Arx, sono stati associati al marciume radicale anche su anguria (Ben Salem *et al.*, 2013).

Ultimamente, anche i funghi appartenenti al genere *Olpidium* sono stati segnalati come agenti causali del collasso su melone (Aleandri *et al.*, 2014), anguria (Schianchi *et al.*, 2019) e cetriolo (Schianchi *et al.*, 2020).

Al genere *Olpidium* appartengono funghi Chitridiomyceti privi di micelio. Il loro tallo ha una forma rotondeggiante ed è confinato all'interno di una cellula ospite (Agrios, 2005). Il ciclo di sviluppo è ridotto: a maturità, il tallo si trasforma in uno sporangio multinucleato globoso, con collo più o meno lungo, contenente molte zoospore ovate fornite, a maturità, di un flagello. Le zoospore vengono rilasciate all'esterno della cellula attraverso il collo dello sporangio, che funziona come un tubo di uscita, e quando trovano nuove radici da infettare si incistano. Una volta stabilito uno stretto contatto con la cellula ospite, il loro protoplasto si introduce al suo interno andando a formare il tallo (Rochon *et al.*, 2004) il quale può anche trasformarsi in una spora di resistenza o spora durevole, che consente la sopravvivenza del patogeno per lungo tempo nel suolo (Rochon *et al.*, 2004, Figura 1.4).

Tra le diverse specie appartenenti a questo genere, sulle cucurbitacee sono stati segnalati *Olpidium virulentus* (Sahtiy.) Karling, *O. bornovanus* Sahtiy. ex Karling e *O. brassicae* (Woronin) P.A. Dang.

Questi funghi sono economicamente molto importanti perché, oltre a causare “il collasso”, sono anche vettori di virus (Rochon *et al.*, 2004; Sasaya e Koganezawa, 2006). Tra questi troviamo: *Cucumber necrosis virus* (CNV), *Cucumber leaf spot virus* (CLSV), *Cucumber soil-borne virus* (CSBV), *Melon necrotic spot virus* (MNSV), e il *Tobacco stunt virus* (TStV, Maccarone, 2013).

Il collasso delle cucurbitacee causato da *Olpidium* spp. si manifesta inizialmente con delle clorosi fogliari e successivamente, con l'avanzare della malattia e dello stadio fenologico, si osservava un disseccamento dell'intera pianta poco prima della maturazione dei frutti, con imbrunimenti nel colletto e nella radice (Aleandri *et al.*, 2017). Nella figura 1.5 sono rappresentati alcuni dei sintomi causati da *Olpidium* spp.

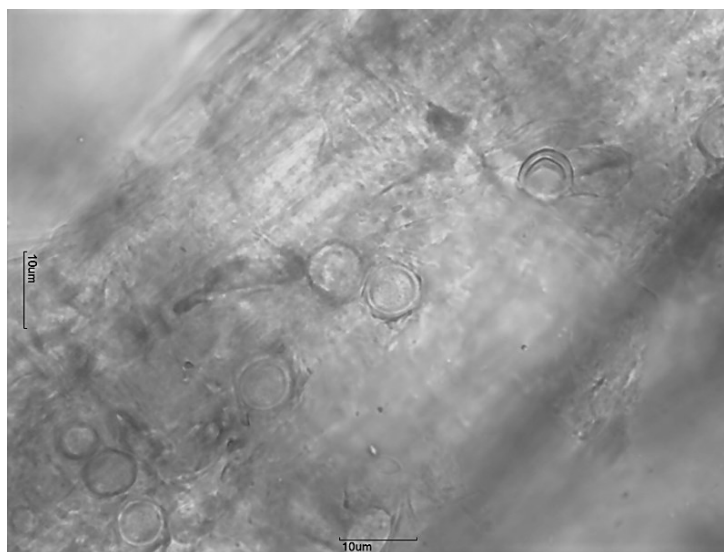


Figura 1.4. Spore durevoli sferiche di *Olpidium* spp. (< 5 µm in diametro).

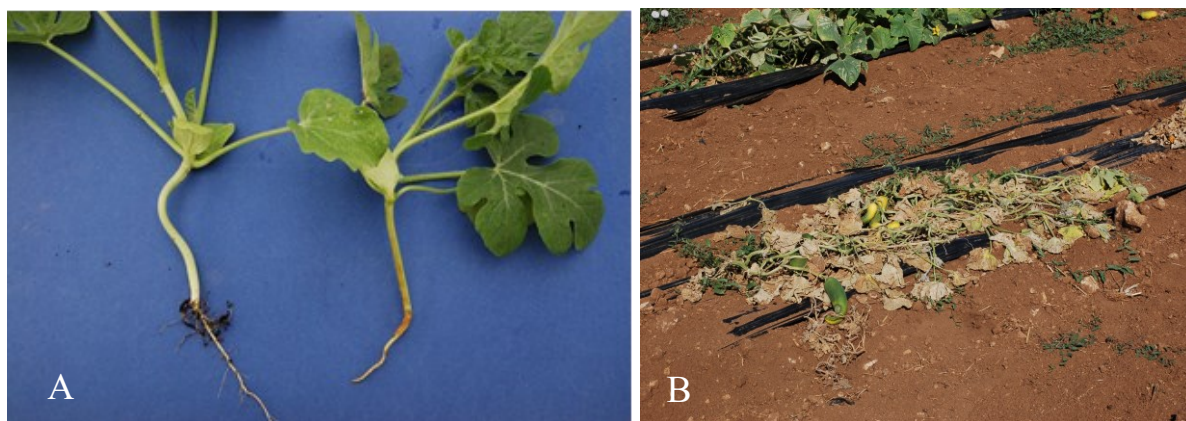


Figura 1.5. Sintomi di collasso: A, Pianta di anguria con imbrunimenti radicali (a destra) e con radice sana (a sinistra); B, pianta di cetriolo completamente disseccata.

Recentemente, è stato dimostrato che *O. bornovanus* è un patogeno virulento su melone, dove causa un ampio imbrunimento delle radici e riduzione della crescita (Stanghellini *et al.*, 2014). Inoltre, è stato riportato che, oltre a *O. bornovanus*, anche *O. virulentus* è un patogeno della radice di melone ed entrambi sono stati sospettati di essere implicati nel collasso delle cucurbitacee (Aleandri *et al.*, 2017). Infine, proprio nel corso del lavoro svolto durante il Dottorato, prove di patogenicità hanno dimostrato che *O. virulentus* ed *O. bornovanus* su anguria e, insieme ad *O. brassicae*, su cetriolo sono gli agenti causali del collasso di queste due specie ortive (Schianchi *et al.*, 2019; Schianchi *et al.*, 2020).

1.3 Bibliografia

- Agrios G.N. 2005. Plant Pathology (5 edn) Burlington, USA.
- Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D., Islas C., A., Rowhani A. 2015. Comparison of Next-Generation Sequencing Versus Biological Indexing for the Optimal Detection of Viral Pathogens in Grapevine. *Phytopatol* 105: 758-763. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0165-R>
- Al Rwahnih M., Sudarshana R., Uyemoto J.K., Rowhani A. 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Vitivirus Isolated from Grapevine. *J Virol* 86: 9545. <https://doi.org/10.1128/JVI.01444-12>
- Alabi O.J., Casassa L.F., Gutha L.R., Larsen R.C., Henick-Kling T., Harbertson J.F., Naidu R.A. 2016. Impacts of Grapevine Leafroll Disease on Fruit Yield and Grape and Wine Chemistry in a Wine Grape (*Vitis vinifera* L.) Cultivar. *PLoS ONE* 11: e0149666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149666>
- Aleandri M.P., Martignoni D., Reda R., Alfaro-Fernandez A., Font M.I., Armengol J., Chilosi G. 2017. Involvement of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* in the Occurrence of Melon Root Rot and Vine Decline Caused by *Monosporascus cannonballus* in Central Italy. *J Plant Pathol* 99: 169-176.
- Aleandri M.P., Martignoni D., Reda R., Alfaro-Fernández A., Font M.I., Armengol J., Chilosi G. 2014. First Report of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* on Melon in Italy. *Plant Dis* 98: 997. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1041-PDN>
- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C. Fuchs M. 2004. *Grapevine fanleaf virus*: Still a Major Threat to the Grapevine Industry. *J. Plant. Pathol.* 86: 183-95.
- Basso M.F., Ferreira da Silva J.C., Fajardo T.V.M., Fontes E.P.B., Zerbini F.M. 2015. A Novel, Highly Divergent ssDNA Virus Identified in Brazil Infecting Apple, Pear and Grapevine. *Virus Res* 210: 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.07.005>

- Beber R., Babini A.R., Terlizzi F., Poggi Pollini C., Credi R., Ratti C. 2013. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* in Emilia-Romagna and Veneto Regions. *J Plant Pathol* 95-S4: 37.
- Becker N., Rimbaud L., Chiroleu F., Reynaud B., Thebaud G., Lett J.M. 2016. Rapid Accumulation and Low Degradation: Key Parameters of *Tomato yellow leaf curl virus* Persistence in its Insect Vector *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 5: 17696. <https://doi.org/10.1038/srep17696>
- Belli G., Fortusini P., Casati P., Belli P.A. 1994. Transmission of a *Grapevine leafroll associated* Closterovirus by the Scale Insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale* 4: 105-108.
- Ben Salem I., Correia K.C., Boughalleb N., Michereff S.J., León, M., Abad-Campos P., Armengol J. 2013. *Monosporascus eutypoides*, a Cause of Root Rot and Vine Decline in Tunisia, and Evidence that *M. cannonballus* and *M. eutypoides* are Distinct Species. *Plant Dis* 97: 737-743. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0464-RE>
- Bertazzon N., Forte V., Filippin L., Causin R., Maixner M., Angelini E. 2017: Association between Genetic Variability and Titre of *Grapevine 'Pinot gris' virus* with Disease Symptoms. *Plant Pathol* 66: 949-959. <https://doi.org/10.1111/ppa.12639>
- Bertin S., Pacifico D., Cavalieri V., Marzachi C., Bosco D. 2016. Transmission of *Grapevine virus A* and *Grapevine leafroll-associated viruses* 1 and 3 by *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* Fed on Mixed-infected Plants. *Ann Appl Biol* 169: 53-63. <https://doi.org/10.1111/aab.12279>
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clement C., Fontaine F. 2013. Grapevine Trunk Diseases: Complex and Still Poorly Understood. *Plant Pathol* 62: 243-265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>
- Beuve M., Candresse T., Tannières M., Lemaire O. 2015. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) in Grapevine in France. *Plant Dis* 99: 293. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1008-PDN>

- Bianchi G.L., De Amicis F., De Sabbats L., Di Bernardo N., Governatori G., Nonino F., Prete G., Marrazzo T., Versolatto S., Frausin C. 2015. Occurrence of *Grapevine Pinot gris virus* in Friuli Venezia Giulia (Italy): Field Monitoring and Virus Quantification by Real-time RT-PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 45: 22-32.
- Boscia D., Greif C., Gugerli P., Martelli G.P., Walter B., Gonsalves D. 1995. Nomenclature of *Grapevine leafroll-associated* Putative Closteroviruses. *Vitis* 34: 171-175. <https://doi.org/10.5073/vitis.1995.34.171-175>
- Boscia D., Savino V., Minafra A., Namba S., Elicio V., Castellano M.A., Gonsalves D., Martelli G.P. 1993. Properties of a Filamentous Virus Isolated from Grapevines Affected by Cork Bark. *Archiv Virol* 130: 109-120. <https://doi.org/10.1007/BF01319000>
- Brown D.J.F., Weischer B. 1998. Specificity, Exclusivity and Complementarity in the Transmission of Plant Viruses by Plant Parasitic Nematodes: An Annotated Terminology. *Fund Appl Nematol* 21: 1-11.
- Cabaleiro C., Segura A., Garcia-Berrios J. 1999. Effects of *Grapevine leafroll associated virus 3* on the Physiology and Must of *Vitis vinifera* L. cv. Albarino Following Contamination in the Field. *Am J Enol Vitic* 50: 40-44.
- Cadman C.H., Dias H.F., Harrison B.D. 1960. Sap-transmissible Viruses Associated with Diseases of Grape Vines in Europe and North America. *Nature* 187: 577-579. <https://doi.org/10.1038/187577a0>
- Candresse T., Marais A., Faure C., Theil S., Beuve M., Spilmont A.S., Audeguin L., Lemaire O., Charlier L. 2017. First Report of *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* Infecting Grapevine (*Vitis vinifera*) in France. *Plant Dis* 101: 1061. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0012-PDN>
- Chilosi G., Reda R., Aleandri M.P., Camele I., Altieri L., Montuschi C., Languasco L., Rossi V., Agosteo G.E., Macrì C., Carlucci A., Lops R., Mucci M., Raimondo M.L., Frisullo S. 2008. Fungi Associated with Root Rot Collapse of Melon in Italy. *EPPO Bul* 38: 147-154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01200.x>

- Cieniewicz E.J., Qiu W., Saldarelli P., Fuchs M. 2020. Believing is Seeing: Lessons from Emerging Viruses in Grapevine. *J Plant Pathol* 102: 619-632. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00484-3>
- Cohen R., Pivonia S., Crosby K.M., Martyn R.D. 2012. Advances in the Biology and Management of *Monosporascus* Vine Decline and Wilt of Melons and other Cucurbits. *Horticul Rev* 39: 77-110. <https://doi.org/10.1002/9781118100592.ch2>
- Cohen Y., Baider A., Petrov L., Sheck L., Voloisky V. 2000. Cross-infectivity of *Sphaerotheca fuliginea* to Watermelon, Melon, and Cucumber. *Acta Horti* 510: 85-88. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.510.14>
- Crescenzi A., Fanigliulo A., Comes S., Masenga V., Pacella R., Piazzolla P. 2001. Necrosis of Watermelon Caused by *Watermelon mosaic virus*. *J Plant Pathol* 83: 227.
- Demangeat G., Voisin R., Minot J.C., Bosselut N., Fuchs M., Esmenjaud D. 2005. Survival of *Xiphinema index* in Vineyard Soil and Retention of *Grapevine fanleaf virus* Over Extended Time in the Absence of Host Plants. *Phytopathol* 95: 1151-1156. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1151>
- Demián E., Czotter N., Várallyay É. Detection of *Grapevine Pinot gris virus* in Different non-Vitis Hosts in Hungary. In: 'Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)', Santiago, Chile, 9-12 April, 2018.
- El-Desouky S., M. El-Wakil A.A. 2003. Occurrence of *Monosporascus* Root Rot and Vine Decline of Cantaloupe and Watermelon in Egypt. *Egyptian J Phytopathol* 31: 141-150.
- Finetti-Sialer M.M., Mascia T., Cillo F., Vovlas C., Gallitelli D. 2012. Biological and Molecular Characterization of a Recombinant Isolate of *Watermelon mosaic virus* Associated with a Watermelon Necrotic Disease in Italy. *Eur J Plant Pathol* 132: 17-322. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9884-1>
- Gadoury D.M., Wilcox W.F., Rumbolz J., Gubler W.D. 2015. Powdery Mildew. In: 'Compendium of Grapevine Diseases' 2nd edn. Eds W.F. Wilcox, W.D. Gubler, USA: APS Press, p. 75-83.

- Gambino G., Navarro B., Vallania R., Gribaudo I., Di Serio F. 2011. Somatic Embryogenesis Efficiently Eliminates Viroid Infections from Grapevines. *Eur J Plant Pathol* 130: 511-519. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9770-x>
- Garau R., Cugusi M., Dore M., Prota U. 1985. Investigation on the Yield of “Monica” and “Italia” Vines Affected by Legno Riccio (Stem Pitting). *Phytopathol Mediterr* 24: 64-67.
- Garau R., Prota V.A., Piredda R., Prota U. 1994. Investigation on a Stunting Factor in *Vitis vinifera* L. Transmissible by Grafting to “Kober 5BB”. *Phytopathol Mediterr* 33: 113-118.
- Gentili A., Prota V., Gabriele M., Schianchi N., Di Lucca E., Luigi M., Faggioli F. 2017. Identification of *Grapevine Pinot gris virus* in Sardinia and Lazio (South and Central Italy). *J Plant Pathol* 99: 527-530. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3872>
- Gessler C., Pertot I., Perazzolli M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol Mediterr* 50: 3-44.
- Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. 2012. A New Grapevine Virus Discovered by Deep Sequencing of Virus- and Viroid-derived Small RNAs in Cv *Pinot gris*. *Virus Res* 163: 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.010>
- Gispert C., Oldfield G.N., Perring T.M., Creamer R. 1998. Biology of the Transmission of *Peach Mosaic Virus* by *Eriophyes insidiosus* (Acari: Eriophyidae). *Plant Dis* 82: 1371-1374. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1371>
- Glasa M., Predajna L., Komínek P., Nagyova A., Candresse T., Olmos A. 2014. Molecular Characterization of Divergent *Grapevine Pinot gris virus* Isolates and their Detection in Slovak and Czech Grapevines. *Archiv Virol* 159: 2103-2107. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2031-5>
- Goheen A.C., Luhn C.F. 1978. Association of Stem Pitting with Corky Bark in Grapes and Detection by Indexing in Standard Indicators. *Phytopathol News* 12: 172.

- Gribaudo I., Gambino G., Cuozzo D., Mannini F. 2006. Attempts to Eliminate *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* from Grapevine Clones. *J Plant Pathol* 88: 293-298.
- Gualandri V., Saldarelli P. 2016. Come Riconoscere la Virosi del *Pinot grigio* (GPGV). *Inform Agr* 27: 51-53.
- Gualandri V., Asquini E., Bianchedi P., Covelli L., Brilli M., Malosiini U., Bragagna P., Saldarelli P., Si-Ammour A. 2017. Identification of Herbaceous Hosts of the *Grapevine Pinot Gris Virus* (GPGV). *Eur J Plant Pathol* 147: 21-25. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0989-4>
- Gugerli P. 25 years of serological identification of *Grapevine leafroll-associated viruses*. Antiserum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9, 24-28. In: 'Proceedings of 16th International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)', Dijon, France, 31 Aug-4 Sept, 2009.
- Guirado M.L., Rodríguez J.M., Serrano Y., Sáez E.Y., Gómez J. 2006. Eficacia de la Desinfección del Sustrato Contra *Olpidium bornovanus* y MNSV en Cucurbitáceas. *Vida Rural* 236: 50-54. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.731.44>
- Infantino A., Carlucci A., Pucci N., Ciuffreda G., Montuschi C., Lops F., Uccelletti A., Mucci M., Frisullo S. 2004. Fungi Causing Root Rots and Collapse of Cucurbits in Italy. *Petria* 14: 77-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01200.x>
- Jo Y., Choi H., Cho J.K., Yoon J., Choin S., Cho W.K. 2015 In Silico Approach to Reveal Viral Populations in Grapevine Cultivar Tannat Using Transcriptome Data. *Sci Rep* 5: 15841. <https://doi.org/10.1038/srep15841>
- Karlatti R.S., Abdeen F.M., Al Fehaid M.S. 1997. First Report of *Monosporascus cannonballus* on Melons in Saudi Arabia. *Plant Dis* 81: 1215. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1215B>
- Lahogue F., Boulard G. 1996. Recherche de Genes de Résistance Naturelle à Deux Viroses de la Vigne: le Court-noué et l'Enroulement. *Vitis* 35: 43-48. <https://doi.org/10.5073/vitis.1996.35.43-48>

- Laore, 2019. Servizio Programmazione e Controllo Agenzia. Indagini Estimative Superfici Coltivate in Sardegna.
- Lebeda A., Urban J. 2007. Temporal Changes in Pathogenicity and Fungicide Resistance in *Pseudoperonospora cubensis* Populations. *Acta Horti* 731: 327-336.
- Lecoq H., Wisler G., Pitrat M. 1998. Cucurbit Viruses: the Classics and Emerging. In: 'Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm' Ed: J.D. McCreight, USA: ASHS Press: p. 126-142.
- Lovisol O., Lisa V. 1983. Virosi e micoplasmosi delle cucurbitacee. In: 'Le Virosi delle Piante Ortive' Eds: O. Lovisol, V. Lisa, Italy: Edizioni per l'agricoltura, p.58-72.
- Malagnini V., de Lillo E., Saldarelli P., Beber R., Duso C., Raiola A., Zanutelli L., Valenzano D., Giampetruzzi A., Morelli M., Ratti C., Causin R., Gualandri V. 2016. Transmission of *Grapevine Pinot gris virus* by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to Grapevine. *Arch Virol* 161: 2595-2599. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2935-3>
- Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. 2015 Control of Viruses Infecting Grapevine. *Adv Virus Res* 91: 175-227. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>
- Malossini U., Moscon R., Ferrazza M., Bianchedi P., Varner M., Credi R. Caratteristiche Vegeto-produttive di Viti *Pinot grigio* e *Traminer Aromatico* Affette da una Nuova Virosi Segnalata in Trentino. In: 'IV Convegno Nazionale di Viticoltura (Conavi)' Asti, 10-12 luglio, 2012.
- Maree H., Almeida R., Bester R., Chooi K.M., Cohen D., Dolja V., Fuchs M., Golino D., Jooste A., Martelli G., Naidu R., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J. 2013. *Grapevine leafroll-associated virus* 3. *Front Microbiol* 4: 82. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00082>
- Marenghi M. 2007. Manuale di Viticoltura Impianto, Gestione e Difesa del Vigneto. Ed Edagricole, Bologna.

- Markakis E.A., Trantas E.A., Lagogianni C.S., Mpalantinaki E., Pagoulatou M., Ververidis F., Goumas D.E. 2018. First Report of Root Rot and Vine Decline of Melon Caused by *Monosporascus cannonballus* in Greece. *Plant Dis* 102:5. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1568-PDN>
- Martelli G.P. 1993. Rugose Wood Complex. In Graft-transmissible Diseases of Grapevines. Handbook for Detection and Diagnosis, Ed G.P. Martelli, Italy: FAO Publication Division, p. 45-53.
- Martelli G.P. 2014. Directory of Virus-like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *J Plant Pathol* 96: 1-136. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I1SUP>
- Martelli G.P., Adams M.J., Keuze J.F., Dolja V.V. 2007. Family Flexiviridae: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annu Rev Phytopathol* 45: 73-100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401>
- Martelli G.P., Russo M. 1984. Use of Thin Sectioning for the Visualization and Identification of Plant Viruses. *Meth Virol* 8: 143-224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-470208-0.50011-6>
- Martelli G.P. 2018. Where Grapevine Virology is Heading to. In: ‘Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)’, Santiago, Chile, 9-12 April, 2018.
- Martyn R.D., Miller, M.E. 1996. *Monosporascus* Root Rot and Vine Decline, an Emerging Disease of Melons Worldwide. *Plant Dis* 80: 716-725.
- Mayo M.A., Robinson D.J. 1996. Nepoviruses: Molecular Biology and Replication. In: ‘The Plant Viruses’ Eds B.D. Harrison, A.F. Murrant The Viruses. USA: Springer.
- McCreight J.D. 2006. Melon-Powdery Mildew Interactions Reveal Variation in Melon Cultigens and *Podosphaera xanthii* Races 1 and 2. *J Am Soc Hortic Sci* 131: 59-65. <https://doi.org/10.21273/JASHS.131.1.59>

- Morelli M., De Moraes Catarino A., Susca L., Saldarelli P., Gualandri V., Martelli G.P. 2014. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* from Table Grapes in Southern Italy. *J Plant Pathol* 96: 439. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I2.039>
- Mugnai L., Graniti A., Surico G. 1999. Esca (Black Measles) and Brown Wood-streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. *Plant Dis* 83: 404-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.5.404Ber>
- Naidu R.A., Maree H.J., Burger J.T. 2015. Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. *Annu Rev Phytopathol* 53: 613-634. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045946>
- Naidu R.A., Rowhani A., Fuchs M., Golino D., Martelli G.P. 2014. Grapevine leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-value Fruit Crop. *Plant Dis* 98: 1172-1185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0880-FE>
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M. 2005. Real-time Assay for Quantitative Detection of Non-persistently Transmitted *Plum pox virus* RNA Targets in Single Aphids. *J Virol Meth* 128: 151-5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.011>
- Palti J., Cohen Y. 1980. Downy Mildew of Cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): the Fungus and its Hosts, Distribution, Epidemiology, and Control. *Phytoparasitica* 8: 109-147. <https://doi.org/10.1007/BF02994506>
- Pardossi A., Prosdocimi G., Santamaria P., Incrocci L. 2018. *Orticoltura, Principi e Pratica*. Italy: Edagricole.
- Plesko M.I., Viscek Marn M., Seljak G., Zezlina I. 2014. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* Infecting Grapevine in Slovenia. *Plant Dis* 98-7. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1137-PDN>
- Poignavent V., Kosfisksas M., Gerber L., Ritzenthaler C., Muyldermans S., Altenbach D., Debonneville C. Development of Antibodies *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) in Rabbits and Camelids. In: 'Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)', Santiago, Chile, 9-12 April, 2018.

- Porceddu A., Sanna M., Prota V., Schianchi N., Mercenaro L., Nieddu G., Camiolo S. 2018. First Report of *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* Infecting Grapevines (*Vitis vinifera*) in Italy. *Plant Dis* 102: 2049. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0460-PDN>
- Ricketts K.D., Gomez M.I., Atallah S.S., Fuchs M.F., Martinson T.E., Battany M.C., Bettiga L.J., Cooper M.L., Verdegaa P.S., Smith R.J. 2015. Reducing the Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease in California: Identifying Optimal Disease Management Strategies. *Am J Enol Vitic* 66: 138-147. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14106>
- Ritzenthaler C., Schmit A.C., Michler P., Stussi-Garaud C., Pink L. 1995. Grapevine Fanleaf Nepovirus P38 Putative Movement Protein is Located on Tubules in Vivo. *Mol Plant Microbe Inter* 8: 379-387.
- Rochon A., Kakani K., Robbins M., Reade R. 2004. Molecular Aspects of Plant virus Transmission by *Olpidium* and Plasmodiophorid Vectors. *Ann Rev Phytopathol* 42: 211-241. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140317>
- Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., Castellano M.A., Digiario M., Martelli G.P. 2000. *Grapevine fleck virus*- Viruses in *Vitis* like. *Arch Virol* 145: 553-565.
- Sabanadzovic S., Aboughanem-Sabanadzovic N., Martelli G.P. 2017. Grapevine fleck and Similar Viruses. In: 'Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management' Eds: B. Meng, G. Martelli, D. Golino M. Fuchs, Switzerland: Springer, p. 331-349.
- Saldarelli P., Beber R., Covelli L., Bianchedi P., Credi R., Giampietruzzi A., Malossini U., Pirolo C., Poggi Pollini C., Ratti C., Terlizzi F., Gualandri V. 2013. Studies on a New Grapevine Disease in Trentino Vineyards. *J Plant Pathol* 95: S4.35-S4.67.
- Saldarelli P., Giampietruzzi A., Morelli M., Malossini U., Pirolo C., Bianchedi P., Gualandri V. 2015. Genetic Variability of *Grapevine Pinot gris virus* and its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathol* 105: 555-63. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0241-R>
- Sasaya T., Koganezawa H. 2006. Molecular Analysis and Virus Transmission Tests Place *Olpidium virulentus*, a Vector of Mirafiori Lettuce big-vein virus and Tobacco stunt

virus, as a Distinct Species Rather Than a Strain of *Olpidium brassicae*. *J Gen Plant Pathol* 72: 20-25. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0239-7>

Savino V., Boscia D., Martelli G.P. 1989. Rugose Wood Complex of Grapevine: Can Grafting to *Vitis* Indicators Discriminate Between Diseases? In: 'Proceedings of the 9th Meeting of the ICVG', Kiryat Anavim, Israel.

Schianchi N., Oggiano L., Chilosi G., Balmas V. 2019. First Report of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* on Watermelon in Sardinia, Italy. *J Plant Pathol* 101: 1253. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00314-6>

Schianchi N., Oggiano L., Chilosi G., Balmas V. 2020. First Report of *Olpidium virulentus*, *O. bornovanus*, *O. brassicae* on Cucumber in Sardinia, Italy. *J Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00605-3>

Schmidt D., Dalla Nora F.E., Fontana D.C., De Paula G.M., Thiesen L.A., Caron B.O. 2019. Influence of Air Temperature in the Emission of Nodes, Ramifications and Flowers in Hybrids of Watermelon (*Citrullus lanatus*). *J Agric Science* 11: 131-141. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n5p131>

Scienza A., Ponti I., Angeli R. 2007. La Vite e il Vino: Botanica, Storia e Arte, Alimentazione, Paesaggio, Coltivazione, Ricerca, Utilizzazione, Mondo e Mercato. Ed: Italy: Bayer CropScience.

Souza F.F., Dias R.C.S., Queiroz M.A. 2012. Avaliação de Descritores Morfológicos de Folha e Flor em Acessos de Melancia (pp. 1-4). In: 'II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos'.

Stanghellini M.E., Mohammadi M., Adaskaveg J.E. 2014. Effect of Soil Matric Water Potentials on Germination of Ascospores of *Monosporascus cannonballus* and Colonisation of Melon Roots by Zoospores of *Olpidium bornovanus*. *Eur J Plant Pathol* 139: 393-398. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0395-8>

Staub J.E., Serquen F.C., Horejsi T., Chen J.F. 1999. Genetic Diversity in Cucumber (*Cucumis sativus* L.): IV. An evaluation of Chinese germplasm. *Genet Resour Crop Evol* 46: 297-310. <https://doi.org/10.1023/A:1008663225896>

- Taylor C.E., Rasky D.J. 1964. On the Transmission of Grapevine Fanleaf by *Xiphinema index*. *Nematologica* 10: 489-495. <https://doi.org/10.1163/187529264X00510>
- Thomas C.E. 1996. Downy Mildew. In: 'Compendium of Cucurbit Diseases' Ed T.A. Zitter, USA: Cornell University Press, p. 25-27.
- Tuttle McGrath M. 2004. Diseases of Cucurbits and their Management. In: 'Diseases of Fruits and Vegetables Volume I' Ed S.A.M.H. Naqvi, Netherland: Springer
- Wang M., Vannozzi A., Wang G., Zhong Y., Corso M., Cavallini E., Cheng Zong-Ming (Max). 2015. A Comprehensive Survey of the Grapevine VQ Gene Family and its Transcriptional Correlation with WRKY proteins. *Front Plant Science* 6: 417. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00417>
- Wilcox W.F., Mahaffee W., Gubler W.D. 2015. Botrytis Bunch Rot and Blight. In: 'Compendium of Grapevine Diseases' 2 ed Eds W.F. Wilcox, W.D. Gubler, J. Uyemoto, USA: APS Press, p. 39-45.
- Wyss U. 2000. *Xiphinema index*, Maintenance, and Feeding in Monoxenic Cultures. In: 'Maintenance of human, animal and plant pathogen vectors' Eds: K. Maramorosch, F. Mahmood, USA: Science Publishers, p. 251-281.
- Xiao H., Meng B. 2016. First Report of *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* and *Grapevine rupestris vein feathering virus* in Grapevines in Canada. *Plant Dis* 100: 2175. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1405-PDN>
- Zitter T.A., Hopkins D.L., Thomas C.E. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases, USA: APS Press. <https://doi.org/10.1094/9780890545744>

2 SCOPO DEL PROGETTO E ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTE

Come anticipato nell'introduzione, in un vigneto della cv *Vermentino* sito in agro di Olmedo nel Nord Sardegna, sono stati rilevati sintomi non tipici delle malattie virali più conosciute. Anche i test sierologici disponibili davano esito negativo. Solo in seguito all'associazione del *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) ad una sindrome simile riscontrata in altre regioni italiane si è potuto iniziare ad indagare nel dettaglio l'alterazione riscontrata ad Olmedo.

Lo scopo principale del progetto è stato, quindi, quello di studiare il GPGV e le sue manifestazioni in Sardegna.

Innanzitutto, ci si è posti l'obiettivo di verificare l'eziologia della sindrome riscontrata su *Vermentino* attraverso l'applicazione di metodologie molecolari già consolidate (RT-PCR, One Step PCR e multiplex PCR). Quindi, si è proseguito con la caratterizzazione molecolare del virus e col sequenziamento di due regioni geniche.

Tra gli obiettivi del lavoro vi era anche quello di risanare le viti riscontrate infette al virus in esame attraverso l'applicazione della tecnica dell'espanto meristemato. Nel contempo, si è proceduto ad un monitoraggio su più ampia scala, in collaborazione con i ricercatori del CREA-PAV di Roma, per appurare la diffusione del GPGV in Sardegna.

Durante i tre anni del Dottorato sono pervenute al Dipartimento di Agraria di Sassari, altre segnalazioni relative a malattie nuove per la Sardegna ma anche per l'Italia. Si è ritenuto opportuno, quindi, a lato del progetto principale, indagare anche su queste nuove alterazioni. In particolare, in collaborazione con i genetisti del Dipartimento, è stata trovata su viti della cv *Cannonau* la presenza di un nuovo virus, il *Grapevine Asteroid Mosaic Virus*. Di tutt'altra natura, invece, sono state le notizie arrivate da parte di agricoltori, relative a sintomi non ben definiti in piante di cucurbitacee, tra i quali perdita di vigore e di produzione, che talvolta potevano portare alla morte delle piante. A tale scopo sono state avviate delle indagini compiute nei comuni di Valledoria ed Alghero (SS), che hanno portato ad individuare funghi del genere *Olpidium*, i quali sono noti perché capaci di determinare l'affezione nota con il nome di "Collasso delle cucurbitacee".

La maggior parte delle ricerche condotte durante il peripodo di dottorato sono già state pubblicate e di seguito sono riportati, preceduti da una breve sintesi, i relativi lavori così come compaiono sulle riviste scientifiche che li hanno accettati. Fa eccezione l'approfondimento sul GPGV, non ancora pubblicato, di cui si riporta il lavoro completo in forma dattiloscritta (Cap. 2).

3 CAPITOLO 1

IDENTIFICATION OF GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS IN SARDINIA AND LAZIO (SOUTH AND CENTRAL ITALY)

Sintesi

Il *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) è un virus recentemente scoperto in vite nella cv *Pinot grigio* nel nord-est dell'Italia, associato alla malattia "Grapevine leaf mottling deformation" (GLMD) che si manifesta principalmente con deformazione fogliare e macchie clorotiche.

Per stabilire la diffusione del GPGV in Sardegna e nel Lazio, nel 2016 sono stati monitorati vigneti di diverse varietà, dando maggiore importanza a quelli di età non superiore ai 10 anni, in quanto il virus risulta poco presente in impianti più vecchi. I campioni di vite esaminati tra le due regioni sono stati 195; di questi, 54 sono stati prelevati in diverse aree della Sardegna dalle cultivar: *Vermentino*, *Torbato* e *Sauvignon blanc* ad Alghero (SS); *Vermentino*, *Cannonau*, *Vernaccia* e *Moscato* ad Oristano; *Nasco*, *Vermentino*, *Monica*, *Nuragus* e *Red Globe* a Cagliari. Inoltre, per quanto riguarda la Sardegna, è stato eseguito un monitoraggio in un vigneto della cv *Vermentino*, sito nel comune di Olmedo (SS), dove nel triennio 2014-2016 sono stati esaminati ulteriori 147 campioni, classificati in tre categorie in base ai sintomi rilevati.

Le analisi molecolari effettuate hanno appurato la presenza del GPGV su tutti i campioni sintomatici ma anche in alcuni asintomatici. Sul totale dei campioni analizzati circa il 28% (52 campioni) ha risposto con esito positivo al virus. Questo numero aumenta se si considerano solo i campioni prelevati in Sardegna: quelli risultati positivi sono stati circa il 54% (28 campioni). In particolare, nel vigneto di Olmedo si è riscontrata la presenza del virus anche in campioni asintomatici, in una percentuale pari al 70% di quelli saggiati. Il virus è risultato assente dai vigneti con più di 10 anni e dalla maggior parte delle cultivar locali.

I risultati ottenuti sono stati pubblicati sulla rivista *Journal of Plant Pathology*, nel 2017.

SHORT COMMUNICATION

IDENTIFICATION OF *GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS*
IN SARDINIA AND LAZIO (SOUTH AND CENTRAL ITALY)A. Gentili¹, V. Prota², G. Moro², N. Schianchi², E. Di Lucca¹, M. Luigi¹ and F. Faggioli¹¹Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale - CREA-PAV, Via C.G. Bertero 22, 00139 Roma²Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Agraria, Via De Nicola 9, 07100 Sassari

SUMMARY

Grapevine Pinot gris virus (GPGV) was identified in several grapevine cultivars, particularly in cv. 'Vermantino' showing leaf mottling and deformation, in the Sardinia and Lazio regions of Italy. The majority of GPGV-infected cultivars were asymptomatic, but the virus was not detected in samples from vineyards older than 10 years and/or planted with local cultivars, confirming the recent introduction of the virus in these two regions likely through the distribution and use of infected propagation material. As in reports from other regions, the high incidence of GPGV in asymptomatic vines is creating challenges with regard to control.

Keywords: grapevine varieties, Sardinia, Lazio, GPGV, survey.

Grapevine Pinot gris virus (GPGV, genus *Trichovirus*, family *Betaflexiviridae*) is a recently discovered virus in grapevine cv. 'Pinot gris' in the northeast of Italy, showing leaf deformation, chlorotic mottling and stunting symptoms (Giampetruzzi *et al.*, 2012). GPGV was also detected in cultivars 'Pinot Blanc', 'Pinot Noir', 'Gewürztraminer', 'Glera', 'Friulano' (Tocai), 'Traminer', 'Sauvignon', 'Chardonnay', 'Garganega', 'Enatio', and in the table grape cultivars 'Black magic' and 'Supernova' in the following Italian regions: Friuli Venezia Giulia (Bianchi *et al.*, 2015), Veneto, Emilia Romagna (Beber *et al.*, 2013), Lombardy (Casati *et al.*, 2014) and Apulia (Morelli *et al.*, 2014). The list of countries affected by GPGV has expanded to France, Switzerland, Hungary, Spain, Portugal, Greece, Turkey, Bosnia, Croatia, Romania, Serbia, Slovenia, Ukraine, Slovakia, the Czech Republic, South Korea, China, Georgia, USA and Canada (Gualandri and Saldarelli, 2016). Leaf deformation, chlorotic mottling and stunting symptoms

(also called 'grapevine leaf mottling and deformations disease' - GLMD) are always associated with GPGV, but the virus is also detected in symptomless vines. GPGV causes economic losses due to a reduction in the number, weight and quality of grapes, which may affect wine production. GPGV was successfully transmitted to *Vitis riparia* and *V. vinifera* by grafting, but attempts to mechanically infect herbaceous plants were unsuccessful, even if, recently, the virus was detected in wild herbaceous hosts in vineyards, such as *Chenopodium album* L. and *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.) with chlorotic and mottling spots, respectively (Gualandri *et al.*, 2016).

An increase in the spatiotemporal distribution of symptomatic vines in vineyards in the Veneto and Trentino regions suggested a vine-to-vine spread operated by a slow-moving vector. The possible existence of a vector was also suggested by the close genetic and taxonomical relationship between GPGV and *Grapevine berry inner necrosis virus*, which is transmitted by the eriophyid mite *Colomerus vitis* (Pagenstecher). This mite species has been recently identified as a putative candidate for the transmission of GPGV (Malagnini *et al.*, 2016).

In order to determine the presence of GPGV and the associated disease in vineyards of Sardinia and Lazio (South and Central Italy), vineyards in the principal grape-growing areas of the regions were surveyed with a special emphasis on those not older than 10 years, assuming the absence of the virus in the older ones (Bertazzon *et al.*, 2016). Nonetheless, to confirm this hypothesis, older vineyards of local cultivars were also surveyed.

The investigation began in a vineyard situated in Olmedo (Alghero) in northern Sardinia, where 147 samples of 'Vermantino' were monitored over three years (2014-2016). In June 2016, a more extensive survey was carried out in Sardinia by inspecting 13 different vineyards located in the wine regions of Alghero (north), Oristano (centre) and Cagliari (south), during which a total of 54 leaf samples of symptomatic and asymptomatic plants of 10 local cultivars, were collected (Table 1). Over the same period, 141 samples of local, but also national and international cultivars were collected in six different vineyards located in three of the main wine producing areas of Lazio (Table 1). GPGV

Corresponding author: F. Faggioli
E-mail: francesco.faggioli@crea.gov.it

Table 1. Sites, cultivars and symptoms of grapevine collected in Sardinia and Lazio. GPGV-infected samples are in bold, whereas numbers indicate the number of sampled plants.

Region	Site	Cultivar	No. of samples (infected)
Sardinia	Alghero	Vermentino (6S, 8A), Torbato (1S, 2OS, 1A), Sauvignon blanc (1OS, 1A)	20 (8)
	Oristano	Vermentino (4S, 6A), Cannonau (1OS), Vernaccia (5/1OS), Moscato (1A)	17 (12)
	Cagliari	Nasco (2OS, 1A), Vermentino (5OS, 2A), Monica (1OS, 1A), Nuragus (1A), Red Globe (4OS)	17 (8)
	Total		54 (28)
Lazio	Maccarese	Vermentino (1S, 20/10A), Sauvignon blanc (1S, 3OS, 20/7A), Chardonnay (4OS), Malvasia (3/1A, 1OS), Cabernet Franc (2/1A), Sagrantino (2/1A), Sangiovese (1A, 1OS), Fiano (2/1A), Syrah (1OS)	62 (24)
	Montefiascone	Verdicchio bianco (1A), Falanghina (1A), Sauvignon blanc (1A), Dolcetto (1A), Malbec (1A), Sylvane verde (1A), Incrocio Manzoni (1A), Nebbiolo (1A), Nero d'Avola (1A), Marzemino (1A), Romanesco Buttone (1A), Greco Bianco (1A), Fiano Aglianico (1A), Refosco dal peduncolo Rosso (1A), Pinot nero (1A), Primitivo (1A), Romanesco (1A), Aleatico di Gradoli (1A)	18 (0)
	Viterbo	Cannonau (1A), Nero Buono (1A), Verdicchio (1A), Cannaiolo Bianco (1A), Malvasia Lazio (1A), Grechetto Bianco (1A), Cilieggiolo (1A), Verdello (1A), Cesanese (1A), Romanesco (1A), Greco (1A), Cannaiolo (1A), Aleatico (1A), Trebbiano Toscano (1A), Merlot (1A), Moscato Bianco (1A), Sangiovese (1A), Malvasia di Candia (1A), Montepulciano (1A), Malvasia Toscana (1A), Grechetto R. (1A)	22 (0)
	Aprilia	Syrah (5A, 1OS), Petit Verdot (4A), Cabernet (2A)	12 (0)
	Velletri	Bellone (2OS), Trebbiano Giallo (1OS), Greco di Tufo (1OS), Cesanese comune (2A), Cesanese Affile (2OS), Passerina (6OS), Bombino Bianco (1A), Pecorino (1A), Moscato Bianco (1A), Medoc (Cabernet Franc) (1A), Terracina Formia (1A), Cesanese (1A), Bombino Bianco (1A)	21 (0)
	Pavona	Malvasia (2OS), Chardonnay (3OS), Montepulciano (1OS)	6 (0)
	Total		141 (24)
Total		195 (52)	

S = Symptomatic, A = Asymptomatic, OS = Other Symptoms.

detection and characterization was carried out by RT-PCR and real-time RT-PCR (RT-qPCR) on total RNAs purified from 250 mg of leaf tissue with the extraction buffer previously described (MacKenzie *et al.*, 1997) and a commercial kit (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Germany), using specific primers targeting a genomic region spanning the movement protein (MP) and coat protein (CP) genes (Saldarelli *et al.*, 2015), and specific primers (Glasa *et al.*, 2014) and a probe (C. Ratti, personal communication) targeting the MP gene. For RT-PCR, an endogenous plant gene (18S) was co-amplified to check for RNA quality (Gambino and Gribaudo, 2006). Plants showing disease symptoms and testing positive for GPGV were also tested for eight grapevine viruses by multiplex RT-PCR (Gambino and Gribaudo, 2006) following the ARNADIA protocol (<http://www.strateco.it>).

Severe disease symptoms were identified, in late spring, during the Sardinian vineyard surveys, particularly in cv. 'Vermentino', in which leaves displayed severe discoloration and sometimes malformation and leaf blistering (Fig. 1). The 147 samples from Olmedo were subdivided into three categories: GMLD symptomatic (S), asymptomatic (A) or with other typical viral symptoms (OS). Results showed a high percentage of GPGV infection (78%) with 100% of the symptomatic vines testing positive for GPGV (Fig. 2). Less pronounced symptoms were found in a GPGV-infected 'Torbato' vine in the region of Alghero (Table 1).

In a vineyard in the Maccarese area in Lazio, a reduced growth of a GPGV-infected 'Vermentino' vine

and a 'Sauvignon blanc' vine was observed, although without the typical deformations and leaf mottling usually associated with the virus. These symptoms were observed in spring, but vines recovered during the summer. However, diseased vines were less vigorous and damage was overall apparent on the grapes. Therefore, in order to better understand the distribution of GPGV in the Maccarese vineyard, 20 additional samples of asymptomatic 'Vermentino' and 'Sauvignon blanc' were collected and analysed by RT-PCR. Results showed that 50% of the 'Vermentino' and 36% of the 'Sauvignon blanc' samples tested positive for GPGV.

In order to confirm the presence of GPGV and to analyze the genetic relatedness of five GPGV isolates from Sardinia (two from 'Vermentino' and one from 'Monica') and Lazio (one each from 'Vermentino' and 'Sauvignon blanc') with those for which information is available in the NCBI database, partial sequences of the MP and CP genes (Saldarelli *et al.*, 2015) were obtained and analysed using BLAST and Clustal W software. Sequence analysis of the five selected GPGV isolates confirmed the presence of GPGV in the Sardinia and Lazio grapevines. Sequence identities ranged from 95.7% to 98.6% with isolates from Slovakia (GenBank accession No. KF1341129.1), Italy (FR877530.1), USA (KT894101.1) and France (KM491305.1). GPGV was found in all symptomatic grapevine samples of Sardinia and Lazio and in many asymptomatic ones. In addition to 'Vermentino', the Sardinian cultivars infected by GPGV were 'Torbato' and 'Sauvignon blanc' collected in the countryside of Alghero; 'Moscato'



Fig. 1. Severe symptoms in 'Vermentino' plants infected by GPGV in vineyard of Olmedo area (north Sardinia).

and 'Vernaccia' collected in the Oristano area; and 'Nasco' and 'Monica' collected in the Cagliari area. GPGV was not found in vineyards older than 10 years and/or planted with local cultivars. However, local grapevine cultivars infected with GPGV in germplasm collections in Sardinia or Lazio were 'Monica', 'Nasco', 'Torbato', 'Vernaccia', 'Fiano', and 'Malvasia'. RT-qPCR consistently confirmed results obtained by RT-PCR, identifying GPGV in an additional 11 asymptomatic samples of 'Vermentino', 'Sauvignon blanc', 'Malvasia', 'Cabernet franc', 'Sagrantino', 'Sangiovese' and 'Fiano', all collected in the Maccarese vineyard from Lazio. All samples collected in other areas of Lazio tested negative for the presence of GPGV both in RT-PCR and RT-qPCR. Moreover, two GPGV-positive 'Vermentino' and 'Sauvignon blanc' tested negative for the following eight grapevine viruses: *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3*, *Grapevine fanleaf virus*, *Grapevine virus A*, *Grapevine virus B*, *Arabis mosaic virus* and *Grapevine fleck virus*.

In summary, GLMD symptoms were observed for the first time in Sardinia and in Lazio in association the presence of GPGV. This is the first report of GPGV-infected 'Vermentino' both in Sardinia and Lazio.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. P. Saldarelli for the critical reading of the paper. Particular thanks are addressed to Drs. M. Perra, R. Peretto and S. Caraffini, of the LAORE agency (Sardinia), for their help in field monitoring and to Dr. L. Isgrò for the English revision of the manuscript.

REFERENCES

Beber R., Babini A.R., Terlizzi F., Poggi Pollini C., Credi R., Ratti C., 2013. First report of Grapevine Pinot gris virus

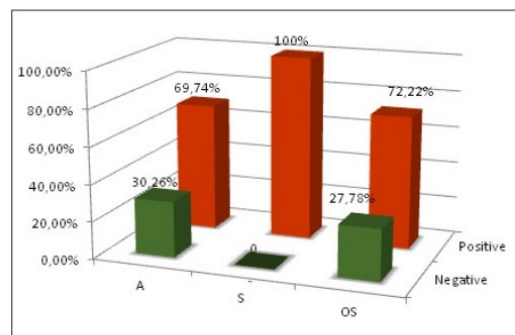


Fig. 2. Percentage of GPGV infection in asymptomatic (A), GLMD symptomatic (S) and with other symptoms (OS) plants obtained by analysing the 147 plants of 'Vermentino' collected in the Olmedo vineyard.

- (GPGV) in grapevine in Emilia-Romagna and Veneto regions. *Journal of Plant Pathology* **95**: S4.36
- Bertazzon N., Filippin L., Forte V., Angelini E., 2016. Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Archives of Virology* **161**: 711-714.
- Bianchi G. L., De Amicis F., De Sabbata L., Di Bernardo N., Governatori G., Nonino F., Prete G., Marrazzo T., Versolatto S., Frausin C., 2015. Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR. *EPPO Bulletin* **45** (1): 22-32.
- Casati P., Durante G., Quaglino F., Zacchi E., Bianco P.A., 2014. Preliminary data on the presence of Grapevine Pinot gris virus in Lombardy. *Journal of Plant Pathology* **96**: S4.46.
- Gambino G., Gribaudo I., 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with co-amplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* **96**: 1223-1229.
- Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P., 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv. Pinot gris. *Virus Research* **163**: 262-268.
- Glasa M., Predajňa L., Komínek P., Nagyová A., Candresse T., Olmos A., 2014. Molecular characterization of divergent Grapevine pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Archives of Virology* **159**: 2103-2107.
- Gualandri V., Saldarelli P., 2016. Come riconoscere la virosi del Pinot Grigio (GPGV). *L'Informatore Agrario* **27**: 51-53.
- Gualandri V., Asquini E., Bianchedi P., Covelli L., Brilli M., Malossini U., Bragagna P., Saldarelli P., Si-Ammour A., 2016. Identification of herbaceous hosts of the Grapevine Pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology* **147**: 21-25.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease* **81**: 222-226.

4 CAPITOLO 2

MOLECULAR ANALYSIS OF GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS AND ITS ASSOCIATION WITH GRAPEVINE LEAF MOTTLING AND DEFORMATION ON VERMENTINO IN SARDINIA

Sintesi

Il monitoraggio è stato eseguito in un vigneto di *Vermentino* per caratterizzare i sintomi della malattia da virus della vite causata dal *Grapevine pinot gris virus* (GPGV). Inoltre, è stata studiata la presenza del GPGV in piante sia sintomatiche che asintomatiche, insieme alla presenza di altre entità virali. Su piante sintomatiche sono stati rilevati picchiettature e decolorazioni clorotiche, arricciature e germogli con internode racorciati. Tutti i campioni sintomatici testati per la presenza / assenza di GPGV nel 2017 e nel 2018 sono risultati positivi, ma anche il 52% di quelli asintomatici. Il numero di campioni positivi raccolti da piante sintomatiche è stato molto più alto nel 2018 rispetto al 2017. Sono stati sequenziati sei isolati GPGV da campioni sintomatici. L'analisi delle sequenze della proteina di movimento (MP) e della proteina di rivestimento (CP) hanno mostrato lievi differenze rispetto agli isolati depositati in GenBank (identità compresa tra 98,67 e 100%). Entrambi gli alberi filogenetici hanno indicato che la maggior parte delle sequenze CP e MP si raggruppavano all'interno del ceppo europeo. Infine, è stata applicata la tecnica dell'espanto meristemato su piante infettate solo da GPGV, tecnica che è risultata efficace nel produrre piantine prive di virus.

Abstract

Plant health assessment and monitoring were carried out in a *Vermentino* vineyard in order to characterize *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) disease symptoms. Moreover, the presence of GPGV in both symptomatic and asymptomatic plants was investigated, together with the presence of other viral entities. Mosaics and chlorotic mottling, curling and stunted shoots were detected on symptomatic plants. All symptomatic samples tested for the presence/absence of GPGV in 2017 and 2018 were positives, but also 52% of the asymptomatic ones. The number of positive samples collected from symptomatic plants was much higher in 2018 than in 2017. Six GPGV isolates from symptomatic samples have been sequenced. Movement protein (MP) and coat protein (CP) sequences analysis showed slight differences compared to the isolates deposited in GenBank (sequence identity between 98.67 and 100%). Both phylogenetic trees indicated that most CP and MP sequences are grouped within the European strain clade. Finally, the application of the meristem explant culture technique on plants infected only by GPGV was effective in producing virus-free plantlets.

Key words: GLMD, symptoms, sequencing, micropropagation.

1. Introduction

Recently, thanks to next-generation sequencing technologies (NGS) (Adams *et al.*, 2009; Roossinck *et al.*, 2012; Glasa *et al.*, 2014) our knowledges about viral pathogens of grapevine has been significantly increased. NGS have allowed the detection and characterization of several novel grapevine viruses (Al Rwahnih *et al.*, 2009, 2012; Giampetruzzi *et al.*, 2012). A new *Trichovirus* (family Betaflexiviridae) was identified by smallRNA sequencing in the grapevine cv. *Pinot Gris* in Italy, Trentino region, and named *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV, Giampetruzzi *et al.*, 2012). Since its first discovery, GPGV has been so far reported in Korea (Cho *et al.*, 2013), Slovakia e Czech Republic (Glasa *et al.*, 2014), Slovenia (Pleško *et al.*, 2014), Greece (Martelli, 2014) France (Beuve *et al.*, 2015), Turkey (Gazel *et al.*, 2015), Georgia (Casati *et al.*, 2015), Germany (Reynard *et al.*, 2016), Canada (Xiao *et al.*, 2016), United States of America (Al Rwahnih *et al.*, 2016), China (Fan *et al.*, 2016), Spain (Ruiz-García and Olmos, 2017), Pakistan (Rasool *et al.*, 2017), Brazil (Fajardo *et al.*, 2017), Croatia

(Vončina *et al.*, 2017), Australia (Wu and Habili, 2017), United Kingdom (Silva *et al.*, 2018), Chile (Medina *et al.*, 2018), Ukraine (Eichmeier *et al.*, 2018), Armenia (Eichmeier *et al.*, 2019), Iran (Tokhmechi and Koolivand, 2019), and Argentina (Debat *et al.*, 2020).

Symptoms may include stunting, chlorotic mottling and leaf deformations (Giampetruzzi *et al.*, 2012). GPGV was reported as strongly associated with Grapevine Leaf Mottling and Deformation (GLMD) disease. GLMD represents an emerging disease in grapevine (Babini *et al.*, 2018).

The GPGV genome is a single-stranded RNA sense (+) and it is composed of 7259 nucleotides excluding the 3' poly-A region. The untranslated 5' region is composed of 104 nucleotides in the SK13, SK01 and SK30 isolates, as determined using RT-PCR 5'-RACE. Furthermore, the 3' untranslated region is composed of 82 nucleotides in ZA505-1A and SK30 isolates. It is phylogenetically similar to *Grapevine Berry Inner Necrosis virus* (GINV); indeed, the 5' UTR and 3'UTR of Slovak GPGV isolates share an identity of 78 and 85%, respectively, with that of GINV (Giampetruzzi *et al.*, 2012; Glasa *et al.*, 2014). By comparing the GPGV genome to other trichoviruses, an identity of 69.0% with GINV (NC_015220), 49.0% with *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV, X99752), 48.7% with *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV, AY713379), 47.7% with *Cherry mottle leaf virus* (CMLV, NC_002500), and 48.6% with *Peach mosaic virus* (PcMV, NC_011552) (Saldarelli *et al.*, 2017) was highlighted.

The GPGV genome is composed of three Open Reading Frames regions (ORFs): ORF1 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ca. 214 kDa; ORF2 Movement protein (MP) ca. 42 kDa; ORF3 Coat Protein (CP) approx. 22 kDa (Giampetruzzi *et al.*, 2012).

Different pairs of primers were designed on MP / CP (588 bp, Saldarelli *et al.*, 2015), MP (302 bp, Glasa *et al.*, 2014; 770 bp, Beuve *et al.*, 2015) and CP (412 bp, Glasa *et al.*, 2014; 430 bp, Bertazzon *et al.*, 2016) and genomic regions have been selected to be efficient in detecting GPGV by RT-PCR technique.

Symptoms of stunting, chlorotic mottling, and leaf deformation had been observed on cv *Vermentino* also in Sardinia (Gentili *et al.*, 2017). The main aim of the present work was to carry out a plant health assessment and monitoring in a *Vermentino* vineyard, the second most cultivated variety in Sardinia covering an overall area of about 4,200 hectares (<http://www.sardegnavinitaly.it/>), in order to characterize viral disease symptoms. The presence of GPGV in both symptomatic and asymptomatic plants was investigated, together with the

presence of other viral entities. Isolates from samples manifesting evident symptoms have been sequenced. Finally, the application of the meristem explant culture technique to plants infected only by GPGV was tested for its effectiveness in producing virus-free plantlets.

2. Materials and Methods

2.1. Study area

The study was conducted in a 15-year-old Vermentino vineyard located in northern Sardinia, near Olmedo (SS, 40°36'57'' N 8°23'05'' E). The vineyard measures one hectare and plants are distributed in 26 rows with a plant spacing 1.8 m x 0.8 m.

2.2. Monitoring and sampling

The investigation was conducted during the spring seasons in 2017 and 2018 on 153 plants. All the symptoms referred to GPGV (leaf deformation, chlorotic mottling and stunting) were detected and described. Symptoms of other grapevine viral diseases were also assessed. To connect different symptoms to viral entities, three plant classes were distinguished: asymptomatic (A), symptomatic (S) and other symptoms (OS). Five to six leaves per plant were collected in order to examine the presence of the GPGV and to exclude the presence of other phytoviruses based on biomolecular analysis.

2.3. RNA extraction

The RNA was extracted from 100 mg of petioles using the Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's protocol.

The cDNA was synthesized using the national reference diagnosis of GPGV protocol validated by the Council for Research in Agriculture and Analysis of the Agricultural Economy of Rome (CREA, https://www.fitosanitario.mo.it/files/1215/4546/7738/GPGV_-_17_Dicembre_2018.pdf).

2.4. Polymerais chain reaction (PCR)

The Movement Protein (MP) and Coat Protein (CP) partial region was amplified with the primers DET-Fow and DET-Rev (Saldarelli *et al.*, 2015; Table 2.1). Moreover, the MP and CP regions were amplified with the primers 5637F and 5939R and 6609F and 7020R respectively (Glasa *et al.*, 2014). The PCR mix was assembled in a total of 50 µL containing: 1X Green buffer, 10-25 µg of DNA template, 0.2 mM of dNTPs, 0.5 µM of each primer and 1.25 U of *Taq* polymerase (G2-Go *Taq* polymerase, Promega). The PCR programme included one cycle at 94°C x 1 m, 35 cycles at 94°C for 20 s, 56°C for 20 s, 72°C for 30 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min. PCRs were performed in the T100 TM Thermal Cycler (BioRad).

Furthermore, all samples were tested by multiplex PCR in order to test simultaneously the presence/absence of the following viruses: *Grapevine leafroll associated virus 1* (GLRa-V1), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRa-V2), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRa-V3), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Arabis Mosaic virus* (ArMV), *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV) and *Grapevine fleck virus* (GFkV). Multiplex PCR was performed following a specific protocol (Gambino and Gribaudo, 2006; Faggioli *et al.*, 2012).

Table 2.1. Primers used for RT-PCR.

Primers	Gene	Sequence	bp	Reference
DET-Fow	MP+CP	5'-TGGTCTGCAGCCAGGGGACA-3'	588	Saldarelli <i>et al.</i> (2015)
DET-Rev	MP+CP	5'- TCACGACCGGCAGGGAAGGA -3'	588	Saldarelli <i>et al.</i> (2015)
5637 F	MP	5'-ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG-3'	302	Glasa <i>et al.</i> (2014)
5939 R	MP	5'-CTGAGAAGCATTGTCCCATC-3'	302	Glasa <i>et al.</i> (2014)
6609 F	CP	5'-GAGATCAACAGTCAGGAGAG-3'	411	Glasa <i>et al.</i> (2014)
7020 R	CP	5'-GACTTCTGGTGCCTTATCAC-3'	411	Glasa <i>et al.</i> (2014)

2.5. GPGV sequence analysis

Six CP and MP sequences were analyzed with the Vector software (Invitrogen). CP phylogenetic tree was created using 16 GPGV isolates and 1 GINV isolate (Table 2.2); MP phylogenetic tree was constructed using 9 GPGV and one GINV sequences (Wu and Habili, 2017)

Table 2.2 References used for phylogenetic tree. All references were used for CP dendrogram; only references in bold were used for MP dendrogram.

* direct submission.

Accession number	Strain	Country	Reference
KF686810	SK 30-01	Slovakia	Glasa <i>et al.</i> (2014)
KF134123	SK-30	Slovakia	Glasa <i>et al.</i> (2014)
KM491305	Mer FR	France	Beuve <i>et al.</i> (2015)
KR528581	Tannat UY	Korea	Cho <i>et al.</i> (2015)*
KT894101	TN US	California	Al Rwahnih <i>et al.</i> (2016)
KX522755	25-3 DE	Germany	Reynard <i>et al.</i> (2016)
KU312039	FEM01	Italy	Gualandri <i>et al.</i> (2017)
KT345219	BJ-MGX	China	Fan <i>et al.</i> (2016b)
KF134125	SK13	Slovakia	Glasa <i>et al.</i> (2014)
FR877530	IT	Italy	Giampetruzzi <i>et al.</i> (2012)
KT345218	BJ-MLZ	China	Fan <i>et al.</i> (2016b)
KT345217	LN-HDQ	China	Fan <i>et al.</i> (2016b)
AB731567	KR	Korea	Cho <i>et al.</i> (2015)*
KT345221	LN-MGX	China	Fan <i>et al.</i> (2016b)
KT345222	LN-PLZ	China	Fan <i>et al.</i> (2016b)
KU234316	LN-Beta-RS	China	Fan <i>et al.</i> (2016a)

Both dendrograms were constructed from pairwise distance matrix by Neighbor Joining method applying MEGA version X software. Bootstraps analysis with 1,000 replicates was carried out to estimate the statistical support for different tree branches, and the number on each node represented the bootstrap value. All sequences were analyzed with a Sequence Demarcation Tool (SDT v 1.2). In addition, GPGV MP and CP sequences identities were compared to other sequences deposited in GenBank using BLAST (NCBI).

2.6. Virus eradication in *Vermantino* infected plants

Shoot samples were collected from three plants infected with GPGV to carry out meristematic explants in order to recover them. About thirty meristems were placed in a Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) and incubated at 25°C for 5 days. Plant tissues were subsequently subcultured. Plantlets of about 2-4 cm height (2-3 nodes) were used for RNA extraction.

To assess the real virus eradication from micropropagated plants, RNA was extracted as described above. The GPGV detection was performed using the RT-PCR with primers DET-Fow and DET-Rev (Saldarelli *et al.*, 2015, Table 2.1) and using One step PCR (Qualiplante Kit). All samples were tested by multiplex PCR for the presence/absence of other viruses as described above.

2.7. Statistical analysis

All statistical analysis were performed using R statistical software version 3.10 (R Development Core Team, 2016). A Chi-square test was used to test for differences in distribution of symptoms between the two years of monitoring. Pearson's standardized residuals were calculated to test observed vs expected values.

Logistic regression model was used to test the probability that plants with the presence of specific symptoms was related to the presence of virus infection. Generalized linear models (GLMs) with binomial error distribution were considered to assess differences in probability of viral infection among plants showing different levels of symptoms (i.e. symptomatic, asymptomatic, other symptoms). GLMs were performed separately for each monitoring year, considering implicit and explicit bias reduction method suggested by Kosmidis and colleagues (2019) and using `brglmFit` function in “`brglm2`” package in R (Kosmidis *et al.*,

2020). Significance of predictor (i.e. symptoms) was tested using Wald test followed by multiple pairwise comparison at 0.05 level of significance for means separation.

3. Results and discussion

Main symptoms detected on *Vermentino* leaves were mosaics and chlorotic mottling, reduced vein distension inducing curling of the blade and folding of the margins; moreover, stunted shoots with short internodes and apical necrosis of shoots were detected (Figure 2.1). Symptoms appeared in the May-July period and could significantly reduce the plant growth, thereby compromising grape production. All symptomatic samples tested for the presence/absence of GPGV in 2017 and 2018 were positives, but also 52% of the asymptomatic ones. The number of positive samples collected from symptomatic plants was much higher in 2018 than in 2017 (Figure 2.2). Consequently, the positive number of asymptomatic plants decreased.



Figure 2.1 Typical symptoms of grapevine chlorotic mottling and leaf deformation disease on GPGV-infected Vermentino: stunted shoots with short internodes (a), mosaics, chlorotic pitting and curling of the blade (b).

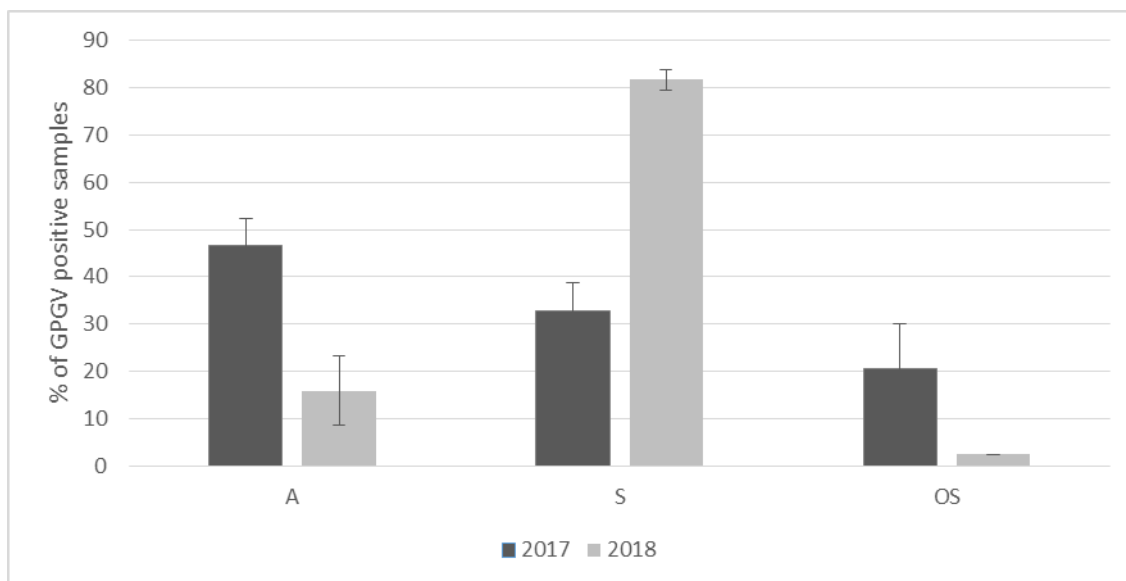


Figure 2.2 GPGV positive plants separated by symptom classes in 2017 and 2018: asymptomatic (A), symptomatic (S) and other symptoms (OS). Percentages were calculated on the total number of positive samples in the two years of survey.

Among all samples, tested by multiplex-PCR, twenty were infected by *Grapevine Virus A* (GVA) and 52 by *Grapevine Fleck Virus* (GFkV).

Symptom expression was different between the two monitoring years ($\chi^2=60.08$, $df=2$, p -value <0.01 , Table 2.3). In particular, the number of both plants with other symptoms (OS) and asymptomatic (A) ones were significantly less than expected in 2017 than in 2018. On the contrary, the number of plants with specific symptoms was higher than expected in 2018 than in 2017. The number of symptomatic plants in 2018 was more than 1.5 times higher than those observed in the previous year.

Results from GLM analysis showed that the probability of having virus positivity differed significantly among plants with or without specific symptoms both in 2017 ($\chi^2=9.24$, $p <0.01$) and 2018 ($\chi^2=44.14$, $p <0.01$, Figure 2.3). In particular, the probability calculated by fitted models of having GPGV infection in asymptomatic plants (A) was $69.53 \pm 5.2\%$ in 2017, whereas it decreased in 2018 reaching a probability of $42.36 \pm 7.36\%$ (Figure 2.3). On the contrary, the probability of having GPGV infection in plants with unspecific symptoms (OS) was lower in 2017 ($69.84 \pm 7.54\%$) than in 2018, in which a probability of $75.88 \pm 19.13\%$ of GPGV-positive plants was estimated. Symptomatic plants (S) were almost totally positive to GPGV both in 2017 ($98.92 \pm 1.63\%$) and 2018 ($97.66 \pm 1.49\%$).

Table 2.3 Occurrence of grapevine plants without (Asymptomatic) and with specific (Symptomatic) or aspecific (Other symptoms) symptoms of GPGV observed in 2017 and 2018. Results of Pearson's standardized residuals, indicating statistical differences between observed and expected values, are reported in brackets.

Plant appearance	2017	2018	Total
Asymptomatic	76 (+)	45 (-)	121
Symptomatic	40 (-)	103 (+)	143
Other symptoms	37 (+)	5 (-)	42
Total	153	153	306

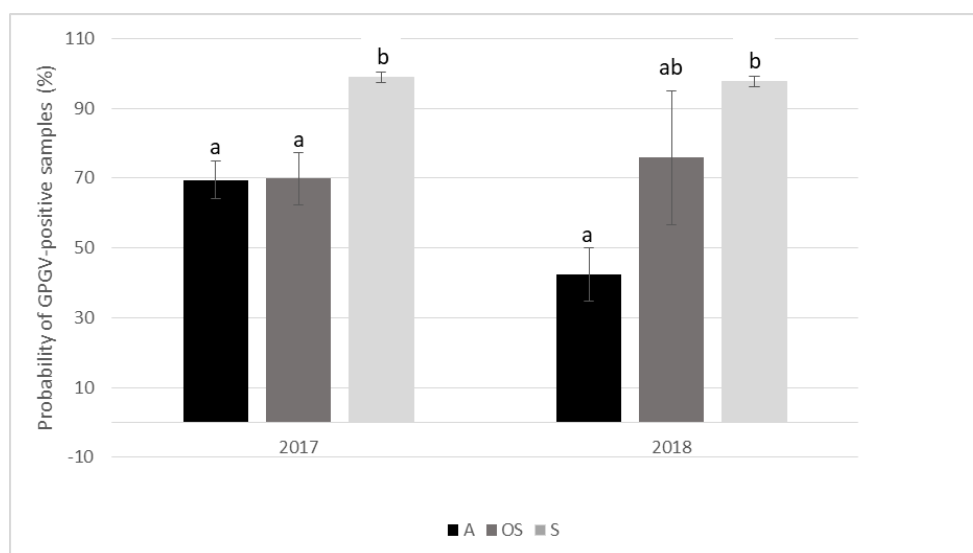


Figure 2.3. Probability (mean $\pm$ SE) of having GPGV infection in plants without (A) and with specific (S) or aspecific (OS) symptoms estimated by Generalized Linear Model (GLM) in 2017 and 2018. Different letters indicate statistically significant differences among symptomatology within each year at a level of significance of 0.05.

MP and CP sequences analysis show slight differences compared to the isolates deposited in GenBank (Table 2.4). The sequence identity is between 98.67% (VRM 4 MP) and 100% (VRM 9 MP).

Both phylogenetic trees indicated that all CP and MP sequences are grouped within the European strains clade and are not similar to Korean or Chinese strains (Figure 2.4). It is an exception VRM5 MP isolate that is grouped with Korea and USA isolates.

The tested isolates present an identity of 98% compared to most GPGV references on Genbank (Figure 2.5 and Figure 2.6). On the contrary, they show an identity of approximately 70% and 82% with CP and MP sequences of GINV, respectively.

Table 2.4 Blast analysis of MP and CP sequences from GPGV Sardinian isolates.

*direct submission.

Sample	Identity	Accession Number	Reference
VRM 4 MP	98.68%	KT894101.1	Al Rwahnih <i>et al.</i> (2016)
VRM 5 MP	99.67%	KT894101.1	Al Rwahnih <i>et al.</i> (2016)
VRM 9 MP	100.00%	MH087440.1	Tarquini <i>et al.</i> (2018)*
VRM 2 CP	99.03%	MF538642.1	Czotter <i>et al.</i> (2018)
VRM 3 CP	99.03%	KU312039.1	Gualandri <i>et al.</i> (2017)
VRM 9 CP	99.03%	MH087439.1	Tarquini <i>et al.</i> (2018)*

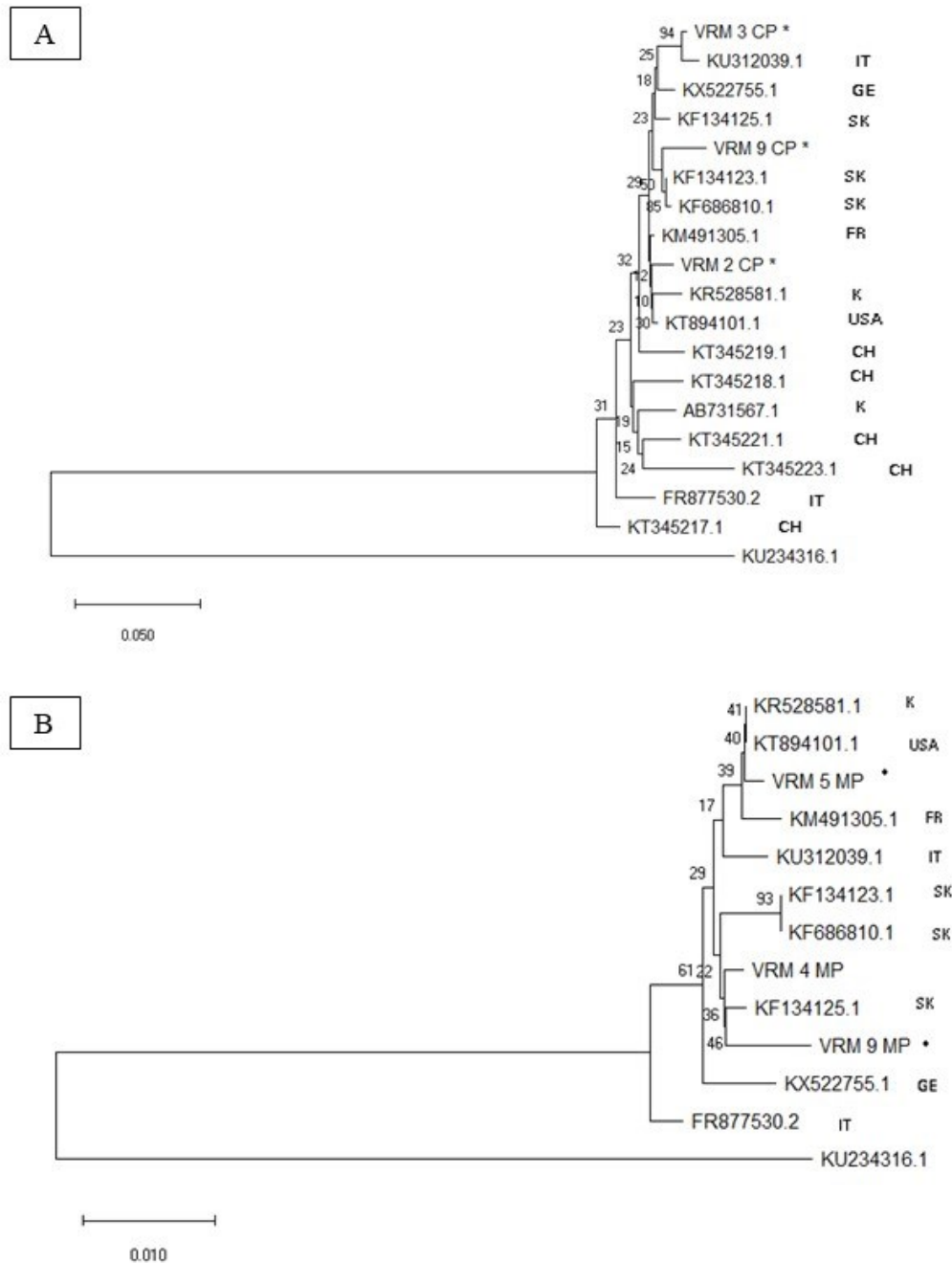


Figure 2.4. Phylogenetic trees generated from partial nucleotide genome sequences of CP region (A) and MP region (B) of GPGV isolates. Bootstrap values were obtained using 1000 replicates. CP and MP isolates in this study are indicated with an asterisk. The phylogenetic trees were reconstructed using the neighborjoining algorithm implemented in MEGA X. Sixteen isolates from China (CH), France (FR), Italy (IT), Korea (K), Slovakia (SK), Germany (GE) and the USA were selected from GenBank database and used to construct the CP dendrogram (A). Nine isolates from California (USA), Korea (K), France (FR), Italy (IT) and California (USA) were used for the MP dendrogram. The GINV sequence (KU234316) was used as outgroup.

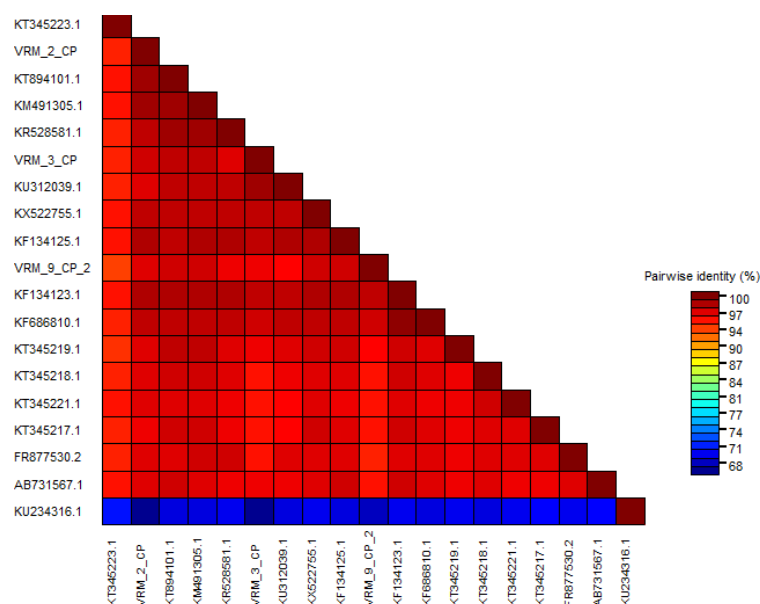


Figura 2.5. Colour-coded pairwise identity matrix conducted using partial sequences of 3 isolates of CP GPGV from this study (VRM 2, VRM 3 and VRM 9) and 16 sequences from GenBank database (as shown in Table 2.2). Pairwise identities above 98% were displayed in red. GINV sequence (KU234316) was used as outgroup.

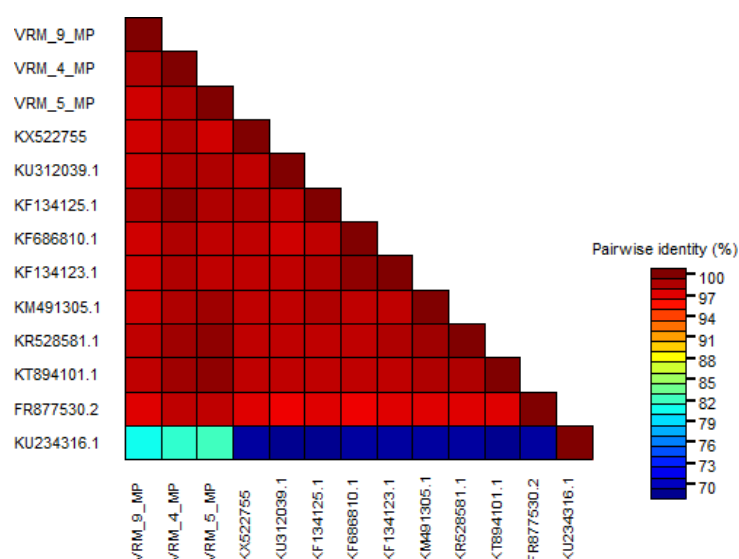


Figura 2.6. Colour-coded pairwise identity matrix conducted using partial sequences of 3 isolates of MP GPGV from this study (VRM 4, VRM 5 and VRM 9) and 10 sequences from GenBank database (as shown in Table 2.2). Pairwise identities above 98% were displayed in red. GINV sequence (KU234316) was used as outgroup.

All micropropagated plantlets tested by RT-PCR, One Step PCR and Multiplex-PCR were negative to all virus tested including GPGV.

The association between GLMD and GPGV has been ascertained in all the world's wine-growing areas where the new disease was reported.

GPGV symptoms were observed for the first time in 2001 in Slovenia (Pleško *et al.*, 2014) and in 2003 in Trentino (Giampetruzzi *et al.*, 2012). In agreement with the observations by Giampetruzzi *et al.* (2012), GPGV on *Vermentino* plants was always associated with chlorotic mottling and leaf deformations also in Sardinia (Gentile *et al.*, 2017). Nonetheless, GPGV was also found in symptomless grapevines as reported by Glasa *et al.* (2014). Several studies reported the existence of two GPGV strains, one causing the typical symptoms and the other not associated with symptoms (Bianchi *et al.*, 2015; Saldarelli *et al.*, 2015; Bertazzon *et al.*, 2017; Spilmont *et al.*, 2018; Bertazzon *et al.*, 2020).

In the present survey, several GPGV-asymptomatic plants became GPGV-symptomatic in the following year. This phenomenon may be a consequence of the increase of viral concentration in the plant tissue from one year to the following one. It would be therefore interesting to test the same samples by quantitative Real Time PCR in order to check whether clear differences in concentration can be detected. In addition, asymptomatic samples should be sequenced to check for any difference in sequence alignment.

GPGV MP and CP isolates generally gave a red colour with European counterparts, indicating a higher pairwise sequence identity than those from China and South Korea which are positioned in the orange-red zone. In addition, sardinian MP sequences has higher identity with GINV than the isolates from GenBank.

The emergence of new viral diseases is often associated with factors that favour ecological changes or intensive agronomic practices (Elena *et al.*, 2014), both common and frequent events occurring in some premium wine areas where GPGV has been found. The rapid spread of GPGV represents a new virus emergence in the world. To reduce this expansion, a collaborative effort is highly envisaged to clarify the biology and epidemiology of the GPGV but, above all, it is necessary to consider also this virus in the certification of the grapevine propagation material.

4. Acknowledgments

The authors acknowledge financial support by Erasmus+ Traineeship Program 2017/2018.

N.S. gratefully thanks Miraslov Glasa for assistance with the preliminary sequence analysis of GPGV.

5. References

- Adams I.P., Glover R.H., Monger W.A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinkiene M., Samuitiene M., Boonham N. 2009. Next-generation Sequencing and Metagenomic Analysis: a Universal Diagnostic Tool in Plant Virology. *Mol Plant Pathol* 10: 537-545. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x>
- Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D., Rowhani A. 2009. Deep Sequencing Analysis of RNAs from a Grapevine Showing Syrah Decline Symptoms Reveals a Multiple Virus Infection that Includes a Novel Virus. *Virology* 387: 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.028>
- Al Rwahnih M., Golino D., Rowhani A. 2016. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* Infecting Grapevine in the United States. *Plant Dis* 100: 1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1235-PDN>
- Al Rwahnih M., Sudarshana M.R., Uyemoto J.K., Rowhani A. 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Vitivirus Isolated from Grapevine. *J Virol* 86: 9545. <https://doi.org/10.1128/JVI.01444-12>
- Babini A., Calassanzio M., D'Anniballe A., Grillini P., Pollini C., Tommasini M.G., Ratti C. 2018. Malattia del Pinot grigio, Nuova Emergenza sulla Vite. *Inf Agrar* 10: 65-68.
- Bertazzon N., Forte V., Angelini E. 2020. Fast Transmission of *Grapevine 'Pinot gris' Virus* (GPGV) in vineyard. *Vitis* 59: 29-34. <https://doi.org/10.5073/vitis.2020.59.29-34>

- Bertazzon N., Forte V., Filippin L., Borgo M., Angelin E. 2016. Evolution of the New Grapevine Disease of *Pinot gris* and of *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV). *BIO Web of Conferences* 7: 01042. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20160701042>
- Bertazzon N., Forte V., Filippin L., Causin R., Maixner M., Angelini E. 2017: Association between genetic variability and titre of *Grapevine 'Pinot gris' Virus* with Disease Symptoms. *Plant Pathol* 66: 949-959. <https://doi.org/10.1111/ppa.12639>
- Beuve M., Candresse T., Tannières M., Lemaire O. 2015. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) in Grapevine in France. *Plant Dis* 99: 293. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1008-PDN>
- Bianchi G.L., De Amicis F., De Sabbats L., Di Bernardo N., Governatori G., Nonino F., Prete G., Marrazzo T., Versolatto S., Frausin C. 2015. Occurrence of *Grapevine Pinot gris virus* in Friuli Venezia Giulia (Italy): Field Monitoring and Virus Quantification by Real-time RT-PCR. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 45: 22-32.
- Casati P., Maghradze D., Quaglino F., Ravasio A., Failla O., Bianco P.A. 2015. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* in Georgia. *J Plant Pathol* 97: S67-S77. <https://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I4SUP.007>
- Cho I. S., Jung S. M., Cho J. D., Lim H. S. 2013. First Report of *Grapevine Pinot Gris Virus* Infecting Grapevine in Korea. *New Dis Rep* 27: 10. <https://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2013.027.010>
- Czotter N., Molnar J., Szabo E., Demian E., Kontra L., Baksa I., Szittyá G., Kocsis L., Deák T., Tusnady G.E., Burgyan J., Varallyay E. 2018. NGS of Virus-Derived Small RNAs as a Diagnostic Method Used to Determine Viromes of Hungarian Vineyards. *Front Microbiol* 9: 122. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00122>
- Debat H., Luna F., Moyano S., Diego Zavallo, Asurmendi S., Gomez-Talquenca S. 2020. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* Infecting Grapevine in Argentina. *J Plant Pathol* In press. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00608-0>

- Eichmeier A., Peňázová E., Muljukina N. 2018. Survey of *Grapevine Pinot gris virus* in Certified Grapevine Stocks in Ukraine. *Eur J Plant Pathol* 152: 555-560. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1497-5>
- Eichmeier A., Penazova E., Nebish A. 2019. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* on Grapevines in Armenia. *Plant Dis* 104: 1000. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1944-PDN>
- Elena S.F., Fraile A., García-Arenal F. 2014. Evolution and Emergence of Plant Viruses. *Adv Virus Res* 88: 161-191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00003-9>
- Faggioli F., Anaclerio F., Angelini E., Antonelli M.G., Bertazzon N., Bianchi G., Bianchedi P., Bianco P.A., Botti S., Bragagna P., Cardoni M., Casati P., Credi R., De Luca E., Durante G., Gianinazzi C., Gambino G., Gualandri V., Luison D., Luvisi A., Malossini U., Mannini F., Saldarelli P., Terlizzi F., Triolo E., Trisciuzzi N., Barba M. Validation of diagnostic protocols for the detection of grapevine viruses covered by phytosanitary rules. In: 'Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)', Davis, California, USA, October 7-14, 2012.
- Fajardo T.V.M., Eiras M., Nickel O. 2017. First report of *Grapevine Pinot Gris Virus* Infecting Grapevine in Brazil. *Australas Plant Pathol* 12: 45. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0270-5>
- Fan X., Hong N., Zhang Z., Yang Z., Ren F., Hu G., Li Z., Zho J., Dong Y., Wang G. 2016a. Identification of a Divergent Variant of *Grapevine berry inner necrosis virus* in Grapevines Showing Chlorotic Mottling and Ring Spot Symptoms. *Arch Virol* 161: 2025-2027. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62677-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62677-8)
- Fan X.D., Dong Y.F., Zhang Z. P., Ren F., Hu G.J., Li Z.N., Zhou J. 2016b. First Report of *Grapevine pinot gris Virus* in Grapevines in China. *Plant Dis* 100: 540. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0913-PDN>
- Gambino G., Gribaudo I. 2006. Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Co-amplification of a

- Plant RNA as Internal Control. *Phytopathol* 96: 1223-1229. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1223>
- Gazel M., Caglayan K., Elçi E., and Öztürk L. 2016. First Report of *Grapevine Pinot Gris Virus* in Grapevine in Turkey. *Plant Dis* 100: 657. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0596-PDN>
- Gentili A., Prota V., Moro G., Schianchi N., Di Lucca E., Luigi M., Faggioli F. 2017. Identification of *Grapevine Pinot gris virus* in Sardinia and Lazio (South and Central Italy). *J Plant Pathol* 99: 527-530. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3872>
- Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. 2012. A New Grapevine Virus Discovered by Deep Sequencing of Virus- and Viroid-derived Small RNAs in Cv *Pinot gris*. *Virus Res* 163: 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.010>
- Glasa M., Predajňa L., Komínek P., Nagyova' A., Candresse T., Olmos A. 2014. Molecular Characterization of Divergent *Grapevine Pinot Gris Virus* Isolates and Their Detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch Virol* 159: 2103-2107. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2031-5>
- Gualandri V., Asquini E., Bianchedi P., Covelli L., Birilli M., Malossini U., Bragagna P., Saldarelli P., Si-Ammour A. 2017. Identification of Herbaceous Hosts of the *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV). *Eur J Plant Pathol* 147: 21-25. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0989-4>
- Kosmidis I. 2020. brglm2: Bias Reduction in Generalized Linear Models. R package version 0.6.2 (<https://CRAN.R-project.org/package=brglm2>).
- Kosmidis I., Kenne Pagui E.C., Sartori N. 2019. Mean and Median Bias Reduction in Generalized Linear Models. arXiv e-prints, *arXiv:1804.04085*. To Appear in Statistics and Computing (<https://arxiv.org/abs/1804.04085>).
- Martelli G.P. 2014. Directory of Virus-like Diseases of the Grapevine an Their Agents. *J Plant Pathol* 96: 1-136. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I1SUP>

- Medina G., Fernández C., Quiroga N., Soto D., Cui W., ZaMorano A., Fiore N. Molecular Characterization of Newly Detected Viruses in Chilean Vineyards In: ‘Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)’, Santiago, Chile, 9-12 April, 2018.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Pleško M.I., Viscek Marn M., Seljak G., Zezlina I. 2014. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* Infecting Grapevine in Slovenia. *Plant Dis* 98: 1014. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1137-PDN>
- R Development Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rasool S., Naz S., Rowhani A., Golino D. A., Westrick N. M., Farrar K. D., Al Rwahnih M. 2017. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* Infecting Grapevine in Pakistan. *Plant Dis* 101: 1958. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0476-PDN>
- Reynard J.S., Schumacher S., Menzel W., Fuchs J., Bohenert P., Glasa M., Wetzels T., Fuchs R. 2016. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* in German vineyards. *Plant Dis* 100: 2545. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-0966-PDN>
- Roossinck M.J. 2012. Plant Virus Metagenomics: Biodiversity and Ecology. *Annu Rev Genet* 46: 359-369. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155600>
- Ruiz-García A.B., Olmos A. 2017. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* in Grapevine in Spain. *Plant Dis* 101: 1070. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1858-PDN>
- Saldarelli P., Giampetruzzi A., Morelli M., Malossini U., Pirolo C., Bianchedi P., Gualandri V. 2015. Genetic Variability of *Grapevine Pinot gris virus* and its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathol* 105: 555-63. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0241-R>
- Saldarelli P., Gualandri V., Malossini U., Glasa M. 2017. *Grapevine Pinot Gris Virus*. In: ‘Grapevine Viruses: Molecular Biology’ Eds B. Meng, G. Martelli, D. Golino, M.

- Fuchs. Diagnostics and Management. Switzerland: Springer, p. 351-363.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_17
- Silva G., Lecourt J., Clover G.R.G., Seal S.E. 2018. First Record of *Grapevine Pinot Gris Virus* Infecting *Vitis vinifera* in the United Kingdom. *New Dis Rep* 38: 7.
<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.007>
- Spilmont A.S., Sevin A.F., Guinard J., Beuve M., Alliaume A., Marais A., Faure C., Candresse T., Lemaire O. Occurrence of *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) and Grapevine Leaf Mottling and Deformation (GLMD) Syndrome in France: Genetic Diversity and Field Monitoring in Diverse Viticulture Areas. In: ‘Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)’, Santiago, Chile, 9-12 April, 2018.
- Tokhmechi K., Koolivand D. 2019. First Report of *Grapevine Pinot gris virus* Infection in Grapevine in Iran. *J Plant Pathol* 102: 549. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00437-w>
- Vončina D., Al Rwahnih M., Rowhani A., Gouran M., Rodrigo P.P.A. 2017. Viral Diversity in Autochthonous Croatian Grapevine Cultivars. *Plant Dis* 101: 1230-1235.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1543-RE>
- Wu Q., Habili N. 2017. The Recent Importation of *Grapevine Pinot Gris Virus* Into Australia. *Virus Gen* 53: 935-938. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1475-6>
- Xiao H., Meng B. 2016. First Report of *Grapevine Pinot Gris Virus* in Commercial Grapes in Canada. *Plant Dis* 100: 1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1405-PDN>

5 CAPITOLO 3

FIRST REPORT OF *GRAPEVINE ASTEROID MOSAIC-ASSOCIATED VIRUS* INFECTING GRAPEVINES (*VITIS VINIFERA*) IN ITALY

Sintesi

Il mosaico stellare è una malattia della vite, appartenente al complesso del Fleck, causata dall'agente eziologico *Grapevine asteroid mosaic associated virus* (GAMaV). Nell'estate del 2016 sono stati campionati grappoli d'uva provenienti da 48 piante di *Vitis vinifera* (24 della cv *Cannonau* e 24 della cv *Cabernet sauvignon*), situate nello stesso vigneto, per un lavoro finalizzato allo studio del genoma della vite. L'analisi RNA Seq ha rivelato, in quattro piante di Cannonau, la presenza di sequenze non corrispondenti al genoma della vite e successivamente identificate come corrispondenti a quelle del GAMaV.

L'effettiva presenza del virus è stata successivamente confermata tramite l'estrazione dell'RNA dagli acini, seguita dall'amplificazione con primes specifici. Questa è la prima segnalazione del GAMaV in Italia, ma l'osservazione delle piante in campo non ha messo in evidenza sintomi ascrivibili ad affezioni virali. La presenza del virus in una sola delle due cultivar esaminate potrebbe essere dovuta all'uso di materiale di propagazione infetto. I risultati confermano, inoltre, che questo virus possa avere fasi latenti o semilateni.

I risultati ottenuti sono stati pubblicati come first report sulla rivista *Plant Disease*.

DISEASE NOTES



First Report of Grapevine Asteroid Mosaic-Associated Virus Infecting Grapevines (*Vitis vinifera*) in Italy

A. Porceddu, M. Sanna, V. A. Prota, N. Schianchi, L. Mercenaro, G. Nieddu, and S. Camiolo



Authors and Affiliations

A. Porceddu

M. Sanna

V. A. Prota

N. Schianchi

L. Mercenaro

G. Nieddu

S. Camiolo[†], Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, 07100, Sassari, Italy.

Published Online: 3 Aug 2018 | <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0460-PDN>

Asteroid mosaic, a disease of the grapevine fleck complex characterized by starlike spots on the foliage of several cultivars of *Vitis vinifera* and clearing of primary and secondary veins on *V. rupestris*, was originally described in California (Hewitt 1954). An isometric virus, named grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV), was partially characterized from original Californian sources (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. 2003) and reported in Canada (Xiao and Meng 2016), Uruguay (Jo et al. 2015), and more recently in France (Candresse et al. 2017). In the summer of 2016, 48 grapevine berry samples (24 *V. vinifera* 'Cannonau' and 24 *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon'), were collected between veraison and harvest in Alghero (northwest Sardinian Island, 40.650638, 8.241534) and their gene expression investigated by RNAseq. For each sample, total RNA was extracted with the RNeasy Plant mini kit (Qiagen), reverse transcribed, and cDNA libraries were prepared using the TrueSeq RNA kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on an Illumina Miseq system and produced an average of 40,842,896 paired-end reads (2 × 101 nt). The obtained reads were screened against the virus genome database (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/viral/>) and aligned to the large portions of the GAMaV genome for four samples of cultivar Cannonau. The presence of the virus was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction

using primers GAMaV-F3 (5'-ATCTCGCAGCCCAACCTCTG-3') and GAMaV-R3 (5'-CATGATGACGGCTTGGGTCTT-3') (Candresse et al. 2017). Detected polymorphisms (GATK pipeline) indicated the coexistence of two distinct virus variants. De novo assembly of the produced reads (by the usage of the software Spades) followed by manual curation of the obtained scaffolds led to the reconstruction of the partial genome of such variants (two scaffolds of 6,204 nt) that were deposited to the NCBI nucleotide database with the accession numbers MH061348 and MH061349. Both sequences covered 92% of the reference genome NC_031692.1 (Vargas-Asencio et al. 2017) with a percentage of identity of 92%, and the reciprocal homology proved to be 97%. Such observations demonstrate the presence of GAMaV in Italy. Noteworthy, although the vineyard was composed of both Cannonau and Cabernet Sauvignon vines, only four samples from the cultivar Cannonau showed the presence of the virus. Although we do not provide conclusive data on a different susceptibility of the used grapevine genotypes, we suggest that clone selection may have played a primary role. No detectable symptoms were observed in any of the infected vines, thus supporting the hypothesis that GAMaV may be largely latent or semilient as previously reported (Martelli 2014). Analysis of the RNAseq experiments showed that the four infected plants were also coinfecting by grapevine fleck virus, grapevine rupestris stem pitting-associated virus, grapevine leafroll-associated virus 2, grapevine yellow speckle viroid 1, and grapevine Syrah virus 1.



The American Phytopathological Society

(APS)

📍 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, MN 55121 USA

☎ +1.651.454.7250

FAX +1.651.454.0766



© 2020 The American Phytopathological Society. Powered by Atypon® Literatum.

6 CAPITOLO 4

FIRST REPORT OF *OLPIDIUM BORNOVANUS* AND *O. VIRULENTUS* ON WATERMELON IN SARDINIA, ITALY

Sintesi

Durante l'estate del 2018 è stato condotto un monitoraggio in diversi campi di anguria nel comune di Valledoria (SS), in seguito alla segnalazione di piante con sintomi di collasso. Inizialmente, le piante mostravano clorosi fogliari e successivamente, con l'avanzare della malattia e dello stadio fenologico, arrivavano al completo disseccamento poco prima della maturazione dei frutti. Quindi, dalle aziende oggetto del monitoraggio sono state prelevate piante sintomatiche per le analisi fitopatologiche e campioni di terreno vicino alle stesse, per essere utilizzati in prove di patogenicità in serra. Piante sane sono state trapiantate sia nel terreno infetto prelevato in campo sia in terreno sterile come controllo. Nelle piante sintomatiche in campo, così come in quelle cresciute in serra nei terreni infetti, è stato possibile verificare la presenza di diverse specie di *Olpidium* che sono state identificate sia morfologicamente che molecularmente come *O. virulentus* e *O. bornovanus*. Questa risulta essere la prima segnalazione di questi miceti su anguria in Italia.

I risultati ottenuti sono stati pubblicati come first report sul Journal of Plant Pathology.



First report of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* on watermelon in Sardinia, Italy

Nicola Schianchi¹ · Leonardo Oggiano² · Gabriele Chilosi³ · Virgilio Balmas¹

Received: 13 December 2018 / Accepted: 30 April 2019 / Published online: 8 May 2019
© Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2019

Keywords *Olpidium* spp. · Root rot · Watermelon

In recent years the cultivation of watermelon (*Citrullus lanatus* L.), an economic important resource in Sardinia (Italy), has been subjected to significant losses in yield and quality due to the spread of symptoms represented by root rot and vine decline. *Olpidium* spp. and *Monosporascus cannonballus* Pollak and Uecker have recently been associated with similar symptoms on melon in Central Italy (Aleandri et al. 2017). During summer 2018, in the producing area of Valledoria (~ 80 ha), northern Sardinia, 10 symptomatic plants were sampled in a field of 6 ha, where 80% of the plant showed symptoms of collapse. From symptomatic roots no *M. cannonballus* was isolated. *Olpidium* spp. was baited by growing watermelon (cultivar Melania) plants in two different soils collected adjacent to roots of symptomatic plants. Plants grown in sterilized soil were used as a negative control. Plants grown in infested soil showed after 40 days root browning, foliage chlorosis followed by plant wilt. Twelve plants were used in each thesis. Baited roots were analysed for the presence of *Olpidium* spp. by morphological methods as described by Aleandri et al. (2017). Stellate resting spores referred to as *O. virulentus* (Sahtiyanci) Karling and *O. bornovanus* (Sahtiyanci) Karling smooth-walled resting spores with a honeycomb-like pattern were observed in diseased roots. Neither disease symptoms nor *Olpidium* spores were observed

from the plants grown in sterilized soil. For molecular analysis, DNA was extracted from watermelon roots, following the protocol described by Aljanabi and Martinez (1997) and tested by multiplex PCR to confirm *Olpidium* spp. identification as described by Herrera-Vásquez et al. (2009). Amplified PCR products, corresponding to *O. bornovanus* (977 bp fragment size) and *O. virulentus* (579 bp fragment size) were detected. *O. bornovanus* and *O. virulentus* are root-infecting plant pathogens of melon (Aleandri et al. 2017), and previously detected in watermelon roots in Spain (Herrera-Vásquez et al. 2009). To our knowledge, this is the first report of *O. virulentus* and *O. bornovanus* occurrence on watermelon in Italy.

Acknowledgements This work was supported by project grant from Regione Sardegna (delibera della Giunta Regionale n. 52/101).

References

- Aleandri MP, Martignoni D, Reda R, Alfaro-Fernandez A, Font MI, Armengol J, Chilosi G (2017) Involvement of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* in the occurrence of melon root rot and vine decline caused by *Monosporascus cannonballus* in Central Italy. J Plant Pathol 99:169–176
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res 25(22):4692–4693
- Herrera-Vásquez JA, del Carmen Cebrián M, Alfaro-Fernández A, del Carmen Córdoba M, Jordá C (2009) Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae* and *O. virulentus*. Mycol Res 113:602–610

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

✉ Virgilio Balmas
balmas@uniss.it

¹ Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italy

² Società Cooperativa Agricola Valle del Coghinias, S.M. Coghinias, 07030 Sassari, Italy

³ Dipartimento per l'Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo, Italy

7 CAPITOLO 5

FIRST REPORT OF *OLPIDIUM VIRULENTUS*, *O. BORNOVANUS*, *O. BRASSICAE* ON CUCUMBER IN SARDINIA, ITALY

Sintesi

Durante l'estate del 2019 è stato condotto un monitoraggio in un campo di cetriolo nel comune di Alghero (SS), dove alcune piante mostravano sintomi di disseccamento generalizzato.

Sono stati prelevati campioni da piante sintomatiche per le analisi fitopatologiche e campioni di terreno vicino alle stesse per essere utilizzati in prove di patogenicità in serra. Piante sane sono state trapiantate sia nel terreno infetto prelevato in campo sia in terreno sterile come controllo. Nelle prove di patogenicità, le piante cresciute nei terreni infetti hanno mostrato sintomi di clorosi nelle foglie e successivamente l'appassimento della pianta. Dalle radici delle piante infette, in campo e in serra, sono state isolate diverse specie di *Olpidium* che sono state identificate sia morfologicamente che tramite multiplex PCR come: *O. virulentus*, *O. bornovanus* e *O. brassicae*. È la prima volta che questi miceti vengono segnalati su cetriolo in Italia.

I risultati ottenuti sono stati pubblicati come first report sulla rivista Journal of Plant Pathology.



First report of *Olpidium virulentus*, *O. bornovanus*, *O. brassicae* on cucumber in Sardinia, Italy

Nicola Schianchi¹ · Safa Oufensou¹ · Giampiera Porqueddu¹ · Gabriele Chilosi² · Virgilio Balmas¹

Received: 16 December 2019 / Accepted: 24 June 2020
© Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2020

Keywords *Olpidium* spp. · Root rot · Cucumber

In the summer of 2019, in an area in North-Sardinia near Alghero, the cultivation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) was subjected to significant losses in yield and quality due to the spread of symptoms represented by root rot and vine decline. Similar symptoms had been observed on watermelon in Sardinia (Italy) in 2018, by two different species of *Olpidium*: *O. virulentus* and *O. bornovanus* (Sahtiyanci) Karling (Schianchi et al. 2019). In the infected area (around 2000 m²) almost 60% of the plants showed collapse's symptoms. Five symptomatic plants of cucumber (cv. Marketmore) were sampled in order to identify the causal agent. The roots section were disinfected with 2% of sodium hypochlorite and rinsed several times before placing them on Potato Dextrose Agar (PDA) and Water Agar (WA).

After 1 week of incubation at 25 °C, *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina phaseolina* were identified from PDA plates, while resting spores of *Olpidium* spp. were identified from roots section cut with scalpel and grown on WA. Pathogenicity test was conducted with the baiting technique by growing cucumber plants in soils collected near the roots of symptomatic plants and in a sterilized soil, used as a negative control. Plants grown in infested soil showed roots browning, foliage chlorosis followed by plant wilt after 40 days. Twelve plants were used in each thesis. Baited roots were analysed directly under microscope for the presence of *Olpidium* spp. by using morphological identification methods. Stellate

resting spores referred to as *O. virulentus* and smooth-walled resting spores referred to as *O. bornovanus* were observed in diseased roots. Neither disease symptoms nor *Olpidium* spores were observed from the plants grown in sterilized soil. For molecular analysis, DNA was extracted from cucumber roots, following the protocol described by Aljanabi and Martinez (1997) and tested by multiplex PCR, using specific primers, in order to confirm the presence of *Olpidium* spp. as described by Herrera-Vásquez et al. (2009). PCR amplification products, corresponding to *O. bornovanus* (977 bp), *O. virulentus* (579 bp) and *O. brassicae* (204 bp), were detected. To our knowledge, this is the first report of *O. bornovanus*, *O. virulentus* and *O. brassicae* occurrence on cucumber in Italy.

References

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25: 4692–4693
- Herrera-Vásquez J, del Carmen Cebrián M, Alfaro-Fernández A, del Carmen Córdoba M, Jordá C (2009) Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae* and *O. virulentus*. *Mycol Res* 113:602–610
- Schianchi N, Oggiano L, Chilosi G, Balmas V (2019) First report of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* on watermelon in Sardinia, Italy. *J Plant Pathol* 101:1253

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

✉ Nicola Schianchi
nschianchi@uniss.it

¹ Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39 07100 Sassari Italy

² Dipartimento per l'Innovazione nei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis 01100 Viterbo Italy

8 DISCUSSIONE

L'indagine sanitaria riportata in questo lavoro di tesi, incentrata su patogeni di nuova introduzione in Sardegna, conferma il principio generale per cui l'attento e costante monitoraggio di campo rappresenta un solido aiuto nel salvaguardare l'ambiente e le colture agrarie dall'ingresso di patogeni “*alieni*”, cioè non ancora presenti in un determinato areale. Inoltre, in una regione insulare come la Sardegna, dove non esiste una continuità con altri territori attraverso i quali possano arrivare malattie veicolate da vettori, il controllo sanitario del materiale di propagazione in ingresso, proveniente da altre realtà, riveste un'importanza fondamentale.

I risultati ottenuti in seguito al monitoraggio, eseguito in collaborazione con i colleghi del CREA di Roma, per valutare la diffusione del *Grapevine pinot gris virus* (GPGV) in Sardegna e nel Lazio, hanno messo in evidenza esiti di particolare rilevanza. Infatti, la presenza di questo virus è stata rinvenuta in diversi vigneti giovani, sempre di età inferiore ai 10 anni, su piante che presentavano i tipici sintomi da Grapevine leaf mottling deformation, ma anche su viti che ne erano prive, soprattutto nel vigneto di Vermentino sito in agro di Olmedo (SS). L'indagine di approfondimento compiuta su questo vigneto, nel 2017 e nel 2018, ha indicato che il 52% delle piante asintomatiche esaminate erano positive al virus. Sarà interessante approfondire gli studi per capire se il fenomeno sia dovuto all'esistenza di due ceppi genetici più o meno aggressivi del GPGV, come ipotizzato da alcuni Autori (Bianchi *et al.*, 2015; Saldarelli *et al.*, 2015; Bertazzon *et al.*, 2017; Spilmont *et al.*, 2018; Bertazzon *et al.*, 2020), oppure dipenda dalla differente carica virale, più bassa in quelle asintomatiche e più elevata in quelle sintomatiche. Infatti, nel vigneto in esame, una elevata quantità di soggetti asintomatici ma positivi ai test molecolari nel primo anno di sperimentazione, hanno mostrato i sintomi della malattia nell'anno successivo. Ciò potrebbe far pensare ad un aumento della carica virale che, nel tempo, ha portato le piante precedentemente asintomatiche a manifestare la propria sofferenza; tuttavia, non si può escludere che la manifestazione dei sintomi sia legata anche a fattori ambientali che rendono la pianta più o meno suscettibile a seconda dell'annata.

A prescindere dalle motivazioni, questo fenomeno rappresenta un importante dato scientifico, soprattutto per quanto riguarda le azioni preventive di controllo della malattia. Il riscontro del virus in vigneti impiantati con barbatelle certificate è una situazione che fa

riflettere per le importanti conseguenze in termini di pericolo di diffusione. Purtroppo, questa circostanza non è di facile soluzione; essa è infatti agevolata dal fatto che il GPGV non è ancora incluso nell'elenco dei virus sottoposti a controllo sanitario su materiale di moltiplicazione anche di categoria di eccellenza (DECRETO 24 giugno 2008, GU N° 195 del 21-08-08; Faggioli *et al.*, 2012).

Le analisi molecolari nelle quali sono state poste a confronto diverse sequenze genomiche del GPGV, sia quelle riguardanti la proteina del capsido che quelle della proteina di movimento, hanno dimostrato che gli isolati provenienti dal vigneto di *Vermentino* si raggruppano principalmente con quelli europei. Questo risultato avvalorava l'ipotesi della diffusione del virus col materiale di propagazione; d'altronde, uno dei fattori principali della diffusione del GPGV è il periodico rinnovo dei vigneti con nuove cultivar per supportare le richieste del mercato (Saldarelli *et al.*, 2015).

Il problema del materiale di propagazione viticolo risulta particolarmente sentito in Sardegna, a causa della mancanza di vivai accreditati per la certificazione la quasi totalità delle barbatelle utilizzate per i nuovi impianti arriva da rivenditori siti fuori dall'isola. Considerata la situazione sarebbe opportuno che le istituzioni promuovessero lo sviluppo di questo settore senza peraltro sottovalutare l'importanza della diffusione a livello locale tramite vettori. Nel vigneto di Olmedo è stata riscontrata la presenza del *Colomerus vitis*, vettore accertato del GPGV (Malagnini *et al.*, 2016) ma che, come già accennato nell'introduzione, visto che il GPGV è stato segnalato anche su diverse specie spontanee (Gualandri *et al.*, 2017; Demián *et al.*, 2018), questo fa pensare alla presenza di altri vettori alati, in quanto l'acaro in questione è monofago. Sono già in corso degli studi per verificare le capacità vettrici del *C. vitis* e la presenza di altri possibili vettori nel vigneto sito ad Olmedo.

Di tutt'altro tenore è la segnalazione del *Grapevine asteroid mosaic virus* (GAMaV). La sua presenza è stata rilevata per puro caso in quanto le viti infette non manifestavano sintomi. Si tratta di un virus poco diffuso e la sua associazione con il Mosaico stellare della vite non è confermata (Martelli, 2014; Candresse *et al.*, 2017). Comunque, è una malattia che non incide in modo sostanziale con la produttività della pianta. Con molta probabilità, anche in questo caso il virus è arrivato col materiale di propagazione (era presente in una sola delle due cultivar esaminate) ma, data la sua scarsa rilevanza economica, la sua esclusione dal materiale certificato non sembra necessaria.

Per quanto riguarda le cucurbitacee, i funghi del genere *Olpidium*, in particolare *O. virulentus*, sono raramente classificati come patogeni principali di queste colture. Il collasso delle cucurbitacee è solitamente attribuito a funghi del genere *Monosporascus*, in particolare *M. cannonballus* (Chilosi *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2012) ma anche a *M. eutypoides* (Ben Salem *et al.*, 2013). Una sintomatologia simile è stata attribuita agli attacchi del *Melon necrotic spot virus* (MNSV), trasmesso da *O. bornovanus* (Kishi 1966; Gonzales-Garza *et al.*, 1979; Bos *et al.*, 1984). *O. bornovanus* risulta coinvolto anche nel collasso da *M. cannonballus*: è stato dimostrato che il chitridiomicete è associato all'induzione della germinazione delle ascospore di *M. cannonballus* (Stanghellini *et al.*, 2012). Il frequente ritrovamento di funghi del genere *Olpidium* nelle radici di piante colpite da “collasso” ha indotto i ricercatori ad indagare anche sul ruolo di questi funghi parassiti obbligati.

Il ruolo di *Olpidium* spp. come patogeno principale delle cucurbitacee è stato dimostrato da Stanghellini *et al.* (2010) su melone, dove i sintomi riprodotti con le inoculazioni artificiali sono stati necrosi significativa sulle radici con conseguente riduzione dell'apparato radicale e dei germogli. Poiché la presenza contemporanea del MNSV è stata esclusa, gli Autori ritengono che l'attribuzione a questo virus dei danni ampiamente segnalati su melone in serra ed in campo debba essere rivista. Anche Aleandri *et al.* (2017) hanno dimostrato la patogenicità di *O. bornovanus* e *O. virulentus* su melone, ma non hanno rilevato nessun effetto sinergico con *M. cannonballus*. La pluralità di agenti patogeni segnalati per lo stesso tipo di sindrome su melone, ha stimolato ulteriori studi già in corso anche in Sardegna. Le piante di melone con sintomatologie simili sono risultate colonizzate da patogeni fungini differenti in base alla località ed all'annata. Tra essi spiccano per diffusione *Plectosphaerella melonis* (T. Watanabe & M. Sato) A.J.L. Phillips, A. Carlucci & M.L. Raimondo e *P. cucumerina* (Lindfors) W. Gams, considerate tra le principali cause del “collasso” nel Sud Italia (Infantino *et al.*, 2004; Chilosi *et al.*, 2008; Carlucci *et al.*, 2012), e *O. bornovanus*, mentre è limitata la presenza di *M. cannonballus* e non compare affatto MNSV.

Analogamente agli studi effettuati su melone, nelle prove di patogenicità condotte durante il periodo di Dottorato, è stato possibile dimostrare un'azione diretta di *O. virulentus*, *O. brassicae* e *O. bornovanus* nel causare necrosi radicale e clorosi fogliare seguiti da avvizzimento delle piante di anguria e cetriolo. Inoltre, sulle piante naturalmente infette non è stata mai rilevata la presenza di specie del genere *Monosporascus*, ma solo di *Olpidium* spp.

Per quanto riguarda i mezzi di lotta contro il “collasso delle cucurbitacee”, la maggior parte degli studi si riferiscono al contenimento di *M. cannonballus*. In ogni caso, la lotta contro questa alterazione non è semplice e richiede un approccio integrato basato su strategie preventive atte a ridurre la presenza dei patogeni nei terreni contaminati (Cohen *et al.*, 2012; Balmas *et al.*, 2016). Purtroppo, gli interventi più incisivi, come le lunghe rotazioni (almeno 5 anni) o la rimozione dei residui radicali, sono spesso impraticabili a causa della elevata specializzazione aziendale e/o dei costi ingenti. L'utilizzo di tecniche quali la biofumigazione e l'aggiunta di sostanza organica possono contenere lo sviluppo della malattia attraverso il ripristino dell'attività biologica del suolo, ma non sono risolutive. Al momento non sono disponibili cultivar o portainnesti resistenti.

In conclusione, l'identificazione tempestiva di nuovi patogeni permette non solo di limitarne la diffusione in aree in cui ancora non sono presenti, ma anche di far fronte nel minor tempo possibile alle problematiche che sorgono nelle aree invase. Le specie alloctone in nuovi areali, infatti, possono determinare danni anche maggiori rispetto al luogo di origine, a causa delle diverse condizioni climatiche, della presenza di specie più sensibili e di vettori più efficienti che ne consentono la veloce diffusione, determinando un forte impatto negativo sull'economia del territorio.

8.1 Bibliografia

- Aleandri M.P., Martignoni D., Reda R., Alfaro-Fernandez A., Font M.I., Armengol J., Chilosi G. 2017. Involvement of *Olpidium bornovanus* and *O. virulentus* in the Occurrence of Melon Root Rot and Vine Decline Caused by *Monosporascus cannonballus* in Central Italy. *J Plant Pathol* 99: 169-176.
- Balmas V., Infantino A., Chilosi G., Siddu G., Murru S. 2016. Collasso delle Cucurbitacee, Diffusione e Difesa in Sardegna. *L'Informatore Agrario* 18: 53-56.
- Ben Salem I., Correia K.C., Boughalleb N., Michereff S.J., León, M., Abad-Campos P., Armengol J. 2013. *Monosporascus eutypoides*, a Cause of Root Rot and Vine Decline in Tunisia, and Evidence that *M. cannonballus* and *M. eutypoides* are Distinct Species. *Plant Dis* 97: 737-743. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0464-RE>
- Bos L., Van Dorst H.J.M., Huttinga H., Maat D.Z. 1984. Further Characterization of *Melon necrotic spot virus* Causing Severe Disease in Glasshouse Cucumbers in the Netherlands and its Control. *Neth J Plant Pathol* 90: 55-69. <https://doi.org/10.1007/BF01999953>
- Candresse T., Marais A., Faure C., Theil S., Beuve M., Spilmont A.S., Audeguin L., Lemaire O., Charlier L. 2017. First Report of *Grapevine asteroid mosaic-associated virus* Infecting Grapevine (*Vitis vinifera*) in France. *Plant Dis* 101: 1061. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0012-PDN>
- Carlucci A., Raimondo M.L., Santos J., Phillips A.J.L. 2012. *Plectosphaerella* Species Associated with Root and Collar Rots of Horticultural Crops in Southern Italy. *Persoonia* 28: 34. <https://doi.org/10.3767/003158512X638251>
- Chilosi G., Reda R., Aleandri M.P., Camele I., Altieri L., Montuschi C., Languasco L., Rossi V., Agosteo G.E., Macrì C., Carlucci A., Lops R., Mucci M., Raimondo M.L., Frisullo S. 2008. Fungi Associated with Root Rot Collapse of Melon in Italy. *EPPO Bul* 38: 147-154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01200.x>

- Cohen R., Pivonia S., Crosby K.M., Martyn R.D. 2012. Advances in the Biology and Management of Monosporascus Vine Decline and Wilt of Melons and other Cucurbits. *Horticul Rev* 39: 77-110. <https://doi.org/10.1002/9781118100592.ch2>
- Demián E., Czotter N., Várallyay É. Detection of *Grapevine Pinot gris virus* in Different non-Vitis Hosts in Hungary. In: 'Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)', Santiago, Chile, 9-12 April, 2018.
- Faggioli F., Anaclerio F., Angelini E., Antonelli M.G., Bertazzon N., Bianchi G., Bianchedi P., Bianco P.A., Botti S., Bragagna P., Cardoni M., Casati P., Credi R., De Luca E., Durante G., Gianinazzi C., Gambino G., Gualandri V., Luison D., Luvisi A., Malossini U., Mannini F., Saldarelli P., Terlizzi F., Triolo E., Trisciuzzi N., Barba M. Validation of diagnostic protocols for the detection of grapevine viruses covered by phytosanitary rules. In: 'Proceedings of the 17th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)', Davis, California, USA, October 7-14, 2012.
- Gonzalez-Garza R., Gumpf D.J., Kishaba N., Bohn G.W. 1979. Identification, Seed Transmission, and Host Range Pathogenicity of a California Isolate of *Melon Necrotic Spot Virus*. *Phytopathol* 69: 340-345.
- Gualandri V., Asquini E., Bianchedi P., Covelli L., Brilli M., Malossini U., Bragagna P., Saldarelli P., Si-Ammour A. 2017. Identification of Herbaceous Hosts of the *Grapevine Pinot Gris Virus* (GPGV). *Eur J Plant Pathol* 147: 21-25. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0989-4>
- Infantino A., Carlucci A., Pucci N., Ciuffreda G., Montuschi C., Lops F., Uccelletti A., Mucci M., Frisullo S. 2004. Funghi che Causano Marciumi Radicali e il Collasso delle Cucurbitacee in Italia. *Petria* 14: 77-89.
- Kishi K. 1966. Necrotic Spot of Melon, a Newvirus Disease. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 32: 138-144.
- Malagnini V., de Lillo E., Saldarelli P., Beber R., Duso C., Raiola A., Zanutelli L., Valenzano D., Giampetruzzi A., Morelli M., Ratti C., Causin R., Gualandri V. 2016. Transmission

of *Grapevine pinot gris virus* by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to Grapevine. *Arch Virol* 161: 2595-2599. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2935-3>

Martelli G.P. 2014. Directory of Virus-like Diseases of the Grapevine and their Agents. *J Plant Pathol* 96: 1-136. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I1SUP>

Saldarelli P., Giampetruzzi A., Morelli M., Malossini U., Pirolo C., Bianchedi P., Gualandri V. 2015. Genetic Variability of *Grapevine Pinot gris virus* and its association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathol* 105: 555-63. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0241-R>

Stanghellini M.E., Alcantara T.P., Ferrin, D.M. 2010. Germination of *Monosporascus cannonballus* Ascospores in the Rhizosphere: a Host-specific Response. *Can J Plant Pathol* 32: 402-405. <https://doi.org/10.1080/07060661.2010.499270>