

VITI TRANSGENICHE PER LA RESISTENZA AI VIRUS: SECONDO O CONTRO NATURA?

G.P. Martelli

Università degli Studi “Aldo Moro”, Bari e Istituto di Virologia Vegetale del CNR, UOS Bari.

Riassunto

La gravità delle malattie virali della vite, sostenute da un alto numero di patogeni, ha richiesto interventi che si sono concretizzati nel miglioramento sanitario (selezione sanitaria, risanamento e certificazione). Questo, tuttavia, non impedisce la reinfezione dei impianti migliorati da parte dei vettori (nematodi e cocciniglie) le cui popolazioni non sono eradicabili. Il miglioramento genetico per la resistenza con metodi tradizionali (incrocio e reincrocio) non è perseguibile per la mancanza di fonti di resistenza. Incoraggianti invece sono state le esperienze di trasformazione genetica con l’inserimento di geni virali nel genoma di diverse cultivars e portinnesti di vite. La presenza di sequenze virali endogene (transgene) nelle cellule dell’ospite geneticamente modificato (GM) scatena un meccanismo (silenziamento genico) che blocca la moltiplicazione di virus dello stesso tipo del transgene che entrano in contatto con la pianta GM. Tra le molte accuse rivolte all’ingegneria genetica vi è anche quella di essere una pratica contro natura. Ebbene, nei genomi delle due accessioni di cv. Pinot nero recentemente sequenziati, è stata riscontrata la presenza di frammenti integrati di acido nucleico di cinque diversi virus a DNA. Queste sequenze nucleotidiche virali, definibili come “transgeni naturali”, verosimilmente proteggono la pianta dalla infezione di virus dello stesso tipo, con un meccanismo identico a quello che si sviluppa nelle piante GM. La natura, pertanto, aveva già messo in opera, e da tempi assai lontani, quanto l’uomo ha di recente imitato.

Summary

Transgenic grapevines for resistance to viruses: according to or against nature?

The severity of virus diseases of the grapevine, which are induced by a wide range of pathogens, has prompted the implementation of sanitary improvement measures (sanitary selection, sanitation, certification). These however, do not avoid the re-infection of newly established vineyards mediated by vectors (nematodes and mealybugs), whose populations cannot be eradicated. Whereas the traditional breeding for resistance may not be applicable to grapevines due

to the lack of valuable sources of natural resistance, the transfer of viral genes by genetic engineering techniques to several cultivars and rootstocks has given promising results. The presence of endogenous viral sequences (transgenes) in the cells of the genetically modified hosts, primes a mechanism (gene silencing) that impairs the replication of viruses from which the transgene was derived. Genetic engineering, however, is not well received, especially in Europe, where it has been accused, among other charges, of being a practice against nature. It so happened that in the recently sequenced genomes of two accessions of cv. Pinot noir, multiple fragments of the nucleic acid of five different DNA viruses have been found. These viral sequences, which can be regarded as “natural transgenes”, may likely protect the plants from infection by viruses of the same type, with a mechanism identical to gene silencing in engineered plants. It seems then, that nature had already devised, very long ago, what humans have much more recently imitated.

Le specie del genere *Vitis* (vite europea e portinnesti americani) sono soggette agli attacchi di un elevato numero di agenti infettivi intracellulari (ben oltre 70 tra virus, viroidi, fitoplasmi e batteri xilematici) che incidono pesantemente sulla produttività e la longevità degli impianti. Di virus ne sono stati a tutt'oggi individuati oltre 60, appartenenti a 24 diversi generi (Tabella 1). E' questo in assoluto il più alto e variegato numero di agenti virali mai riscontrato in una specie coltivata. Di essi, un buon terzo è costituito da comprovati patogeni. Le loro affezioni più importanti (“degenerazione infettiva”, “accartocciamento fogliare”, “legno riccio” e “disaffinità all'innesto”), diffuse in natura da vettori (nematodi e cocciniglie), sono tanto note a viticoltori e tecnici, e così largamente trattate (Martelli, 1973; Martelli e Boudon-Padieu, 2006), da non richiedere descrizione.

Il progressivo degrado sanitario dei vigneti, un male antico che si è aggravato con la globalizzazione dei commerci, costituisce una emergenza fitopatologica internazionale cui, dagli anni 60 dello scorso secolo, si cerca di porre rimedio con una strategia di prevenzione fondata sulla certificazione (produzione di materiale clonale sano, sua propagazione e diffusione commerciale) e la lotta ai vettori. Queste misure si sono rivelate utili ma insufficienti per la soluzione del problema, anche perché le popolazioni di nematodi che trasmettono nepovirus (agenti di degenerazione infettiva) e di cocciniglie vettrici di vitivirus e closterovirus (agenti di legno riccio e accartocciamento fogliare) sono praticamente ineradicabili. La reinfezione degli impianti costituiti con materiale risanato è pertanto pressoché ineluttabile.

A ciò si potrebbe porre rimedio con l'uso di soggetti resistenti alle infezioni virali, così come sperimentato con altre colture, sicché, anche nella vite, si è tentato un approccio migliorativo nei riguardi della degenerazione infettiva. La vite europea (*Vitis vinifera*) infatti, al contrario dei

portinnesti americani, è largamente tollerante all'agente di questa malattia (GFLV), col quale si è coevoluto negli areali di differenziazione (Medio Oriente). In effetti, i soggetti di *V. vinifera* autoradicati mostrano sintomi di degenerazione infettiva meno gravi di quelli innestati (Martelli e Boudon-Padieu, 2006). La tolleranza, però, non rappresenta un carattere utile ai fini del miglioramento per incrocio. Diversa è la resistenza propriamente detta ("host plant resistance") che, pur essendo stata identificata, sotto il controllo di due geni recessivi, in due cultivars di *V. vinifera* di origine iraniana ed afgana, rispettivamente (Walker *et al.*, 1985; Walker e Meredith, 1990), è stata poi cercata senza successo in una collezione di 531 accessioni di *Vitis* europee, asiatiche ed americane (Lahogue e Boulard, 1996). Questa resistenza, comunque, non ha trovato applicazioni in programmi di miglioramento genetico.

Sempre in relazione ai nepovirus, *Muscadinia rotundifolia* è resistente agli attacchi di *Xiphinema index* (il vettore di GFLV) ed allo stesso GFLV se inoculato nella pianta dal vettore (Bouquet, 1981). Questa resistenza, mediata da un singolo gene dominante (Walker and Jin, 2000), ha consentito l'ottenimento di portinnesti ibridi di *V. vinifera* x *V. rotundifolia*, uno dei quali (O39-16) ha mostrato "resistenza durevole" (tolleranza) alle infezioni di GFLV in esperienze di campo (Walker *et al.*, 1994).

Questo sembra essere l'unico risultato positivo, anche se di non grande portata pratica, a tutt'oggi conseguito nei tentativi di miglioramento genetico tradizionale della vite per la resistenza ai virus.

Non sorprende, peraltro, che questa stessa via non sia stata battuta per altre affezioni virali. E' fallita infatti la ricerca di resistenze al virus del mosaico dell'arabis (ArMV), un parente stretto di GFLV, e ai closterovirus 1 e 3 (GLRaV-1, GLRaV-3) dell'accartocciamento fogliare della vite in 407 (ArMV) e 233 (GLRaV-1 e GLRaV-3) in accessioni di *Vitis* europee, asiatiche ed americane (Lahogue e Boulard, 1996).

Tutto ciò fa ritenerne che, se non intervengono fatti nuovi, non vi siano grandi speranze di ricorrere alla "resistenza tradizionale" per alleviare, se non risolvere, i problemi virologici della vite. Questo stallo ha consigliato di percorrere altre vie quali, ad esempio, l'uso della resistenza transgenica derivata dal patogeno o PDR ("pathogen-derived resistance"). E' questa una forma di resistenza indotta dalla introduzione stabile nel genoma dell'ospite di sequenze virali che mettono in moto un meccanismo ("silenzamento genico") che comporta l'inattivazione degli acidi nucleici "invasori" (RNA virali dello stesso tipo del transgene), con modalità sequenza-specifica (Voinnet, 2001).

Negli anni scorsi molto si è lavorato negli USA ed in Europa (Francia, Germania, Svizzera ed Italia) sulla trasformazione di vari portinnesti (SO4, 41B, 125AA, 5C, *V. rupestris*, 110R, 3309,

V. riparia) e cultivars (Chardonnay, Nebbiolo, Superior seedless, Russalka, Lumassina, Blaufrankish) con transgeni derivati da sequenze nucleotidiche che codificano soprattutto la proteina dell'involucro proteico (CP) di nepovirus (degenerazione infettiva) closterovirus (accartocciamento fogliare) e vitivirus (legno riccio), con risultati positivi (Fuchs *et al.*, 2007; Laimer *et al.*, 2009). Prove di campo effettuate in Francia (le uniche condotte a tutt'oggi in Europa) hanno dimostrato che viti di cv. Chardonnay innestate su portinnesti di SO4 e 41B trasformati con la CP di GFLV si sono comportate assai bene (Vigne *et al.*, 2004).

La perdurante ostilità dell'opinione pubblica, soprattutto europea, verso le piante geneticamente modificate e l'impossibilità di condurre sperimentazioni di campo, ha scoraggiato nel nostro continente il proseguimento delle ricerche, che però sono portate avanti negli USA, Cina ed altri Paesi extraeuropei.

La trasformazione di piante con materiale genetico di origine non vegetale (PDR nel caso dei virus) è stata bollata come una pratica pericolosa ed eticamente repressibile, anche perché "contro natura". E quest'ultimo punto lo si potrebbe forse concedere, se non fosse smentito dalle risultanze delle analisi dei sempre più numerosi genomi vegetali interamente sequenziati.

E' così accaduto, infatti, che nelle due accessioni della cv. Pinor nero la cui costituzione molecolare è stata recentemente determinata, sono state rinvenute inserzioni di frammenti di acido nucleico dei seguenti fitovirus a DNA (Bertchs *et al.*, 2009):

Virus tungro bacilliforme del riso (RTBV, genere *Tungrovirus*), 5 frammenti

Virus del mosaico del cavolfiore (CaMV, genere *Caulimovirus*), 1 frammento

Virus della scolorazione perinervale della fragola (SVBV, genere *Caulimovirus*), 2 frammenti

Virus associato alla distorsione del Lamium (LLDaV, genere *Caulimovirus*), 2 frammenti

Virus della maculatura infossata del garofano (CERV, genere *Caulimovirus*), 6 frammenti

nessuno dei quali compare nella lista della Tabella 1.

Non è questa una novità assoluta, né sorprendente, poichè analoghe integrazioni di acidi nucleici virali erano già state rilevate fin da una decina di anni addietro in altre specie vegetali, tra cui pomodoro, patata, petunia, tabacchi, orzo e banana (Staginnus e Richert-Poggler, 2006)

I frammenti di DNA virale ritrovati nella vite appartengono tutti a "pararetrovirus" che, in campo vegetale, infettano un'ampia gamma di ospiti. I pararetrovirus stati così denominati per distinguerli dai "retrovirus" dei vertebrati, che però possiedono un genoma ad RNA ed annoverano temibilissimi rappresentanti quali, ad esempio, il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), responsabile dell'AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita).

A parte le differenze nella morfologia delle particelle e nei meccanismi di diffusione naturale (epidemiologia), ciò che distingue le due tipologie di virus è, come si è accennato, la diversa natura dell'acido nucleico che ne costituisce il patrimonio genetico (RNA nei retrovirus, DNA nei pararetrovirus). Ciò che invece li accomuna è: (i) l'intervento nel loro ciclo replicativo di un enzima noto come trascrittasi inversa (o retrotrascrittasi, da cui la denominazione degli agenti infettivi che la posseggono), in grado di sintetizzare molecole di DNA da uno stampo di RNA; (ii) la capacità di integrarsi nel genoma dell'ospite a seguito di ricombinazione (trasferimento orizzontale).

Ma anche quest'ultima caratteristica è fonte di differenziazione poiché, mentre nei vertebrati è l'intero genoma virale che si disloca in quello della cellula ospite trasformandola, ciò avviene più di rado nelle piante, nelle quali si conoscono solo tre esempi (banana, petunia e tabacco) di integrazione di un genoma pararetrovirale completo. Questi eventi sfociano nella "nascita" di veri e propri virus endogeni che si trasmettono alla progenie (trasferimento verticale) e che di norma sono silenti, ma in grado di attivarsi a seguito di stress (ferita, estremi termici, siccità, modifica del fotoperiodo), dando così origine a malattie analoghe a quelle prodotte da infezioni esogene (si veda tra gli altri Richert-Pöggeler *et al.*, 2003).

Sin qui la similitudine, anche comportamentale, tra virus retroidi degli animali e delle piante.

In queste ultime tuttavia, è stata più di frequente riscontrata la presenza non di interi genomi virali bensì di loro frammenti (come nella vite), costituiti da sequenze nucleotidiche ripetute che si integrano in loci diversi dei loro cromosomi.

Sembra evidente che queste incomplete inserzioni esogene non possano generare malattie. Ci si è pertanto chiesti se esse abbiano un qualche significato per la pianta che li ospita, e quali funzioni eventualmente svolgano. Una possibile risposta la si è trovata nel meccanismo di azione della PDR che, come si è detto, è basato sul "silenzamento genico postrascrizionale" innescato dal transgene (RNA espresso dal gene usato per la trasformazione) che scatena l'inattivazione sequenza-specifica dell'RNA virale invasore ("RNA silencing"). E' plausibile infatti che le sequenze pararetrovirali endogene della vite rappresentino dei veri e propri "transgeni naturali" (Martelli, 2008) [concetto già espresso in generale da T. Hon (in Staginnus e Richert-Pöggeler, 2006) poi ripreso per la vite da Bertsch *et al.* (2009)] i cui RNA verrebbero individuati dalle cellule ospiti come invasori, mettendo così in moto il sistema di silenzamento genico della pianta, a protezione dall'infezione di virus esogeni dello stesso tipo. A conforto di ciò, a fronte della mai riscontrata presenza nella vite di nessuno dei pararetrovirus di cui sopra, vi è la recente scoperta negli USA di infezioni di un badnavirus pararetroide (Grapevine vein clearing virus) (Zhang *et*

al., 2001) del cui genoma, però, non c'è traccia in quello delle due viti di Pinot nero sequenziate. Ciò rende di ancor maggiore interesse la ricerca di integrazioni genomiche virali, e quali, nel patrimonio genetico dei vitigni italiani in corso di sequenziamento.

Se mancano gli elementi per determinare “quando” e “dove” le accessioni di Pinot nero sono entrate in contatto con i paratetrovirus elencati (RTBV è presente solo nel sud est asiatico) per il “come” è possibile ipotizzare l'intervento di vettori (i caulimovirus sono trasmessi da afidi e RTBV da cicadellidi).

La morale di questa storia è che l'inserimento di geni virali nel genoma delle piante, che determinerebbe sviluppo di resistenza alle infezioni da virus omologhi, è un fenomeno naturale vecchio di anni, verosimilmente centinaia di migliaia, se non milioni [l'integrazione di badnavirus nel banano è stata datata a 4,6 milioni di anni fa (Lescot *et al.*, 2008)], che si ritiene abbia preso corpo nel corso del processo co-evolutivo ospite-virus. L'uomo, pertanto, con le recenti applicazioni biotecnologiche (ingegneria genetica), non ha fatto altro che imitare, pur se inconsapevolmente, quanto la natura aveva già da lungo tempo messo in opera. E questo, con buona pace di coloro che ancor oggi avversano l'uso dell'ingegneria genetica in agricoltura, tacciandola, come si detto, di manipolazione contro natura ed eticamente riprovevole.

Bibliografia

Bertsch C., Beuve M., Dolja V.V., Wirth M., Pelsy F., Herrbach E. and Lemaire O., 2009. Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. *Biology Direct* **4**: 21.

Bouquet A., 1981. Resistance to grape fanleaf virus in muscadine grape inoculated with *Xiphinema index*. *Plant Disease* **65**: 791-793.

Fuchs M., Cambra M., Capote N., Jelkmann W., Kundu J., Laval V., Martelli G.P., Minafra A., Petrovic N., Pfeiffer P., Pompe-Novak M., Ravelonandro M., Saldarelli P., Stussi-Garaud C., Vigne E. and Zagrai I., 2007. Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insight into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *Journal of Plant Pathology* **89**: 5-12.

Lescot M., Piffanelli P., Ciampi A., Ruiz M., Blanc C., Leebens-Mack J., da Silva F., Santos C., D'Hont A., Garsmeur O., Vilarinhos A., Kanamori H., Matsumoto T., Ronning C., Cheung F., Haas B., Pappas G., Sasaki T., Souza M., Miller R., Glaszmann J.C. and Town C., 2008. Insight into the Musa genome: syntenic relationships to rice and between Musa species. *BMC Genomics* **9**: 58.

Lahogue F. and Boulard G., 1996. Recherche de gènes de résistance naturelle à deux viroses de la vigne: le court noué et l'enroulement. *Vitis* **35**: 43-48.

- Laimer M., Lemaire O., Herrbach E., Goldschmidt V., Minafra A. Bianco P. and Wetzler T., 2009. Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: a review. *Journal of Plant Pathology* **91**: 7-23.
- Martelli G.P., 1993. Detection and diagnosis of graft-transmissible diseases of grapevines. FAO Publication Division, Rome, Italy, 263 pp.
- Martelli G.P. and Boudon-Padieu E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. *Options Méditerranéennes* **55**: 7-201.
- Martelli G.P., 2008. I transgeni naturali. *Informazioni dai Georgofili* **2**: 5.
- Richert-Pöggeler K.R., Noreen F., Schwarzacher T., Harper G. and Hohn T., 2003. Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. *The EMBO Journal* **22**: 4836-4845.
- Staginnus C. and Richert-Pöggeler K.R. , 2006. Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. *Trends in Plant Science* **11**: 485.491.
- Vigne E., Komar V. and Fuchs M., 2004. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research* **13**: 165-179.
- Voinnet O., 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* **17**: 449-459.
- Walker M.A., Meredith C.P. and Goheen A.C., 1985. Sources of resistance to Grapevine fanleaf virus (GFLV) in *Vitis* species *Vitis* **24**: 218-228.
- Walker M.A and Meredith C.P., 1990. The genetic resistance to Grapevine fanleaf virus of *Vitis vinifera*. *Proceedings 5th International Symposium on Grape Breeding, St. Martin/Pflaz, Germany. Vitis* (special issue): 228-238.
- Walker M.A., Wolpert G.A. and Weber E., 1994. Viticultural characteristics of VR hybrid rootstocks to control *Xiphinema index* and fanleaf degeneration. *Vitis* **33**: 19-23.
- Zhang Y., Singh K., Kaur R. and Qiu W., 2011. Association of a novel DNA virus with grapevine vein clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology* **101**: 1081-1090.

Tabella 1. Virus della vite e loro collocazione tassonomica

FAMIGLIA	GENERE	VIRUS
A. Virus appartenenti a generi inquadrati in famiglie		
Virus con genoma a DNA		
<i>CAULIMOVIRIDAE</i>	<i>Badnavirus</i>	Grapevine vein clearing virus (GVCV)
Virus con genoma a ds-RNA		
<i>REOVIRIDAE</i>	<i>Oryzavirus</i>	Virus non denominato
<i>ENDORNAVIRIDAE</i>	<i>Endornavirus</i>	Due virus non denominati
<i>PARTITIVIRIDAE</i>	<i>Alphacryptovirus</i>	Virus simile a <i>Raphanus sativus</i> cryptic virus 3 (RSCV-3)
\Virus simile a <i>Beet cryptic virus 3</i> (BCV-3)		
Virus con genoma a ss-RNA negativo		
<i>BUNYAVIRIDAE</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)
Virus con genoma a ss-RNA positivo (particelle filamentose)		
<i>CLOSTEROVIRIDAE</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)
	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1) <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3) <i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV-4) GLRaV-4 ceppo 5 GLRaV-4 ceppo 6 GLRaV-4 ceppo 9 GLRaV-4 ceppo Pr GLRaV.4 ceppo Car
	<i>Velarivirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV-7)
<i>ALPHAFLEXIVIRIDAE</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i> (PVX)
<i>BETAFLEXIVIRIDAE</i>	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV)

Trichovirus *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV)
Grapevine Pinot gris virus (GPGV)

Vitivirus *Grapevine virus A* (GVA)
Grapevine virus B (GVB)
Grapevine virus D (GVD)

POTYVIRIDAE *Potyvirus* Virus potyvirus-simile isolato in Giappone da una cultivar russa
Bean common mosaic virus (BCMV) ceppo arachide

Virus con genoma a ss-RNA positivo (particelle bastoncelliformi)

VIRGAVIRIDAE *Tobamovirus* *Tobacco mosaic virus* (TMV)
Tomato mosaic virus (ToMV)

Virus con genoma ad ss-RNA positivo (particelle sferiche)

SECOVIRIDAE *Fabavirus* *Broadbean wilt virus* (BBWV)

Nepovirus *Artichoke italian latent virus* (AILV)
Arabidopsis mosaic virus (ArMV)
Blueberry leaf mottle virus (BBLMV)
Cherry leafroll virus (CLRV)
Grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)
Grapevine Anatolian ringspot virus (GARSV)
Grapevine deformation virus (GDefV)
Grapevine chrome mosaic virus (GCMV)
Grapevine fanleaf virus (GFLV)
Grapevine Tunisian ringspot virus (GTRV)
Peach rosette mosaic virus (PRMV)
Raspberry ringspot virus (RpRV)
Tobacco ringspot virus (TRSV)
Tomato ringspot virus (ToRSV)
Tomato blackring virus (TBRV)

Sadwavirus *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)

BROMOVIRIDAE *Alfavirus* *Alfalfa mosaic virus* (AMV)

Cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Illavirus *Grapevine line pattern virus* (GLPV)
Grapevine angular mosaic virus (GAMoV)

TOMBUSVIRIDAE *Carmovirus* *Carnation mottle virus* (CarMV)

Necrovirus *Tobacco necrosis virus D* (TNV-D)

	<i>Tombusvirus</i>	<i>Grapevine Algerian latent virus (GALV)</i> <i>Petunia asteroid mosaic virus (PAMV)</i>
<i>TYMOVIRIDAE</i>	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV)</i> <i>Grapevine redglobe virus (GRGV)</i> <i>Grapevine Syrah virus 1 (GSV-1)</i>
	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus (GFkV)</i> <i>Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVfV)</i>
<i>LUTEOVIRIDAE</i>	<i>Enamovirus</i>	Virus non denominato

B. Virus appartenenti a generi non inquadrati in famiglie

	<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)</i>
	<i>Sobemovirus</i>	<i>Sowbane mosaic virus (SoMV)</i>

C. Virus non classificati

Virus filamentoso non denominato
Grapevine Ajinashika virus (GAgV)
Grapevine stunt virus (GSV)
Grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)
Southern tomato virus (STV)
