

ACCADEMIA DEI GEORGOFILI

ANTONINO CATARA – SEBASTIANO BARBAGALLO – MARIA SAPONARI

Il caso “tristeza” degli agrumi

Giornata di studio: «*Globalizzazione e difesa delle colture*»

Firenze, 29 novembre 2007

Estratto da
«I GEORGOFILI – QUADERNI, 2007-VI»



Firenze, 2008

ANTONINO CATARA*, SEBASTIANO BARBAGALLO**, MARIA SAPONARI***

Il caso “tristeza” degli agrumi

PREMESSA

Nota sin dalla fine dell'800, studiata successivamente a Giava (1920), in Argentina (1931) e in Brasile (1937), la “tristeza” continua ad essere la più grave delle malattie virali degli agrumi. Sono oltre 100 milioni le piante morte a causa delle infezioni da parte dell'omonimo virus (*Citrus tristeza virus* – CTV), ormai segnalato in tutti i Paesi agrumicoli.

La capacità del virus di diffondersi a livello locale in maniera molto efficace attraverso gli afidi, dando luogo a epidemie, e la gravità dei sintomi indotti in alcune condizioni ha da sempre stimolato in diversi Paesi intense attività di ricerca mirate soprattutto alla messa a punto di strumenti in grado di supportare e coadiuvare programmi di lotta (sistemi rapidi ed efficaci di diagnosi, sistemi efficaci di monitoraggio e campionamento, tecniche di differenziazione dei ceppi, etc.). Non sorprende, pertanto, se i contributi scientifici sulla malattia e sul virus responsabile occupano oltre il 40% dei Proceedings della XVI Conferenza dell'International Organization of Citrus Virologists tenutasi a Monterrey (Messico) dal 7 al 12 novembre 2004.

In Italia la malattia è stata segnalata per la prima volta oltre 50 anni fa, e poi numerose altre volte, sempre su piante o materiale di propagazione introdotto da altri paesi (Catara e Davino, 2006). Questa circostanza aveva fatto sperare di riuscire a prevenire la diffusione del virus attraverso un programma

* DISTEF - Patologia vegetale, Università degli Studi di Catania

** DISTEF - Entomologia agraria, Università degli Studi di Catania

*** Istituto di Virologia Vegetale, CNR sede di Bari e Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

di lotta obbligatoria regolamentato con apposito Decreto Ministeriale (DM 22/11/1996). Ma le misure preventive messe in atto sono risultate intempestive, inadeguate e non coordinate. La prevalente diffusione di infezioni allo stato asintomatico ha, probabilmente, per anni mascherato la presenza del virus. Ciò ha favorito la propagazione di materiale infetto, come dimostra un recente monitoraggio effettuato in Sicilia, dal quale emerge che l'incidenza delle infezioni è significativamente più elevata nei cloni di arancio di maggiore interesse commerciale. La multiforme variabilità del virus responsabile della malattia ha fatto il resto. Sono già diverse migliaia le piante con sintomi della malattia in agrumeti e alcune decine di migliaia quelle verosimilmente infette in modo asintomatico. La presenza delle infezioni anche nei vivai desta molta preoccupazione, poiché, in alcuni casi, tali contaminazioni sono dovute a trasmissione da parte delle popolazioni afidiche locali.

SINTOMATOLOGIA

Le sindromi mostrate dalle piante infette possono variare notevolmente per l'influenza di diversi fattori, quali la virulenza del ceppo, la suscettibilità dell'ospite, la combinazione nesto/portinnesto, le condizioni climatiche, ecc. Sintomatologie diffuse in alcune aree possono essere rare o non presenti in altre aree; un esempio che si può citare è la diffusa presenza di sintomi di butteratura del legno (stem pitting) su pompelmo in Sud Africa, sintomatologia raramente osservata in Florida (Garnsey et al., 2005).

La suscettibilità del portinnesto e della specie/varietà riveste un ruolo altrettanto importante nell'espressione sintomatologica delle infezioni. Molti isolati possono causare sintomi severi di butteratura del legno su arancio dolce, lima, pompelmo, pummelo e deperimento delle piante innestate su arancio amaro, ma non causare alcuna sintomatologia su mandarino. È evidente che il mascheramento dei sintomi negli ospiti non suscettibili rappresenta un fattore di rischio nell'efficacia dell'intercettazione delle infezioni e nella lotta al virus.

La definizione della virulenza di un ceppo si basa essenzialmente sulla sintomatologia indotta su piante indicatrici standard (arancio amaro, arancio dolce cv Madame vinous, pompelmo Duncan e arancio dolce innestato su arancio amaro - Garnsey et al., 2005). Pertanto, gli isolati vengono definiti come: "stem-pitting" se in grado di indurre sintomi di butteratura o altre alterazioni del legno, su arancio dolce e pompelmo Duncan; "seedling yellows" se inducono accentuati giallumi su arancio amaro e di conseguenza nanismo nelle piante di arancio dolce innestate su arancio amaro; "decline" se causano

sintomi di deperimento fulminante nelle piante di arancio dolce innestato su arancio amaro. Blandi vengono, invece, definiti i ceppi che danno luogo a infezioni asintomatiche.

La poliannualità degli agrumi e, pertanto, l'esposizione delle piante a ripetuti attacchi afidici, può determinare la compresenza di ceppi biologicamente diversi in una stessa pianta infetta.

EPIDEMIOLOGIA

La trasmissione attraverso i materiali di propagazione riveste, sicuramente, un ruolo fondamentale nella diffusione del virus, anche a lunga distanza. Spesso l'introduzione e la diffusione del virus in aree indenni è stata determinata dall'incontrollata introduzione di materiali di propagazione infetti. La caratterizzazione di ceppi geograficamente distinti non ha evidenziato nessuna differenza significativa, tanto da far pensare a una origine comune e a una successiva diffusione del virus nei diversi Paesi a seguito di un intenso scambio di materiali di propagazione infetti (Roistacher, 1982; Roistacher e Moreno, 1991; Rubio et al., 2001).

La trasmissione, in modo semipersistente, da parte degli afidi riveste, invece, un ruolo cruciale nella diffusione del virus in una determinata area. Diverse specie di afidi sono capaci di acquisire e trasmettere il virus, ma *Toxoptera citricidus* e *Aphis gossypii* sono quelle che assumono un ruolo rilevante nell'epidemiologia della malattia.

Il diverso comportamento biologico di queste due specie vettrici determina un diverso grado di sviluppo delle infezioni in campo che risultano più rapide e uniformi nel caso di *T. citricidus* (Gottwald et al., 2000). La compresenza del virus e di *T. citricidus* desta allarme oltre che per la elevata efficienza di trasmissione associata a questa specie afidica, anche per la capacità attribuita a questa specie di trasmettere in modo efficiente i ceppi severi di CTV (Rocha-Peña et al., 1995), poco o nulla trasmessi dalle altre specie afidiche. In realtà dati recenti sembrano non supportare appieno queste due ipotesi: i) in Florida, infatti, dove *T. citricidus* è presente dal 1995, non si è assistito a un aumento sensibile della incidenza dei ceppi severi locali come ci si aspettava (Halbert e Brown, 1996); ii) l'incremento delle infestazioni da *A. gossypii*, osservato negli ultimi anni in California, ha portato a un incremento vertiginoso delle infezioni di CTV, dimostrando che anche *A. gossypii* può risultare in determinate condizioni climatiche e colturali altamente efficiente nella trasmissione del virus (Yokomi et al., 2007).

IL RUOLO DEGLI AFIDI NELLA TRASMISSIONE DI CTV

Le prime dimostrazioni sperimentali della trasmissibilità del virus a opera degli afidi sono antecedenti agli anni cinquanta del secolo scorso e si propongono sino a tempi recenti. In tale contesto gli elementi essenziali che si possono cogliere riguardano fondamentalmente la modalità di trasmissione "semipersistente" del virus e la notevole variabilità nell'efficienza di trasmissione soprattutto in relazione alla specie afidica e al ceppo virale inoculato.

Con riferimento al primo aspetto, l'assunzione del virus da parte dell'afide comporta una effettiva attività alimentare (di solito floematica) di almeno 1-6 ore. Con ciò si ha il conseguente trasferimento delle particelle virali nelle parti anteriori del canale alimentare dell'afide e il loro possibile inoculo in piante sane, anche qui nel corso di qualche ora (optimum in 6-24 ore) di alimentazione (Costa e Grant, 1951; Raccach et al., 1976; Raccach et al., 1989; Katis et al., 2007).

Con riferimento al secondo aspetto, inconfutabile appare la responsabilità dell'afide tropicale degli agrumi (*T. citricidus*), evidenziata sin dalle prime esplosioni epidemiologiche di CTV in Sud America (Meneghini, 1948) e successivamente ribadita in modo circostanziato da Costa e Grant (1951). Le prove sperimentali attribuiscono paritetica capacità vettrice sia alle forme immature (neanidi e ninfe) che a quelle adulte (attere e alate), le quali risultano efficienti persino come singoli esemplari; tuttavia le percentuali più elevate di trasmissione (con valori fino al 75-88% di infezioni positive sulle piante saggiate) sono state ottenute con densità pari o superiori a 25 esemplari/pianta.

L'afide *T. citricidus* si è reso ovunque responsabile del rapido dilagare della virosi, come evidenziano le recenti ondate epidemiologiche di CTV nella regione caraibica e in Florida (Yokomi et al., 1994; Rocha-Peña et al., 1995; Halbert et al., 2004).

Fra gli altri afidi degli agrumi, in regioni dove non risulta presente *T. citricidus*, il ruolo di vettore principale viene assunto da *A. gossypii* (afide del cotone e delle cucurbitacee), come è stato messo in luce in California (Dickson et al., 1951), Florida (Norman e Grant, 1957), regioni asiatiche (India e Filippine) e nell'area del Mediterraneo (Bar-Joseph e Loebenstein, 1973; Davino et al., 1989). Prove di trasmissione effettuate in Israele con alcuni isolati di CTV (Raccach et al., 1976), hanno evidenziato per *A. gossypii* modalità di trasmissione del virus analoghe a quelle già conosciute per *T. citricidus*, benché la sua efficienza risulti manifestamente più contenuta.

Un interessante raffronto comparativo sull'efficacia di trasmissione della malattia a opera dei due afidi prima richiamati è stato evidenziato da Got-

twald et al. (1996), sulla base di dati epidemiologici di vari paesi e relativi alla velocità di incremento della malattia in presenza dell'uno o dell'altro vettore. I dati riportati evidenziano che nel caso di esclusiva presenza di *A. gossypii* i livelli di incremento della malattia risultano variabili dal 5 al 95% nell'arco di 8-15 anni, mentre, allorché il vettore presente è *T. citricidus*, analoghi incrementi sono raggiunti soltanto in 2-4 anni. In altri termini, *T. citricidus* evidenzia una capacità di trasmissione di CTV di circa 6-25 volte superiore a quella manifestata da *A. gossypii* (Yokomi et al., 1994). Inoltre, a motivo della maggiore vagilità evidenziata dalle forme alate di *A. gossypii* a confronto di quelle di *T. citricidus* (fenomeno ben rilevabile anche attraverso catture alle trappole tra i due afidi), la progressione epidemiologica delle piante infette da CTV, rispetto a un punto iniziale di inoculo, evidenzia una distribuzione sparsa nel caso di *A. gossypii* e di tipo aggregato nel caso di presenza di *T. citricidus* (Gottwald et al., 1996).

È ben noto che gli indici di trasmissibilità di CTV per mezzo degli afidi variano anche con i diversi isolati del virus, alcuni dei quali risultano più facilmente trasmissibili comparativamente ad altri (Bar-Joseph e Loebenstein, 1973; Lee et al., 2005). Ulteriori influenze sembrano connesse alle temperature (optimum intorno a 22°C) (Bar-Joseph e Loebenstein, 1973), nonché talvolta al diverso biotipo dell'afide (Yokomi et al., 2005).

Si evidenzia infine che, in aggiunta alle due specie precedenti, è stata occasionalmente provata la responsabilità di altri afidi vettori nella trasmissione di qualche isolato di CTV; fra questi figurano l'afide verde degli agrumi, *A. spiraeicola* (Norman e Grant, 1957; Davino et al., 1989) e l'afide bruno degli agrumi, *T. aurantii* (Norman e Grant, 1957); in India sono stati indicati come vettori anche *Myzus persicae*, *A. craccivora* e *Uroleucon (=Dactynotus) jaceae* (Varma et al., 1965).

In ultimo sembra opportuno evidenziare che, indipendentemente dalla specie afidica, le responsabilità della trasmissione sono dovute essenzialmente alle forme alate, in quanto attere e immature, benché parimenti efficienti, hanno marginali possibilità di spostamento effettivo da una pianta ammalata a una sana.

Sugli agrumi sono segnalate nel mondo una ventina di specie afidiche complessive, delle quali soltanto una mezza dozzina riveste significato pratico (Stroyan, 1961; Blackman e Eastop, 2000; Barbagallo et al., 2007). In Italia, analogamente a quanto avviene negli altri paesi agrumicoli del Mediterraneo, sono soprattutto frequenti e dannose tre specie soltanto, tutte polifaghe e a distribuzione cosmopolita. Esse sono l'afide del cotone o delle cucurbitacee (*A. gossypii*), l'afide verde degli agrumi (*A. spiraeicola*) e l'afide nero degli

agrumi (*T. aurantii*); i primi due sono particolarmente infestanti su arancio, mandarino, pompelmo, clementine e forme affini, mentre la terza specie afidica, pur non rara sui medesimi agrumi appena menzionati, rappresenta delle tre l'unica entità che infesta significativamente il limone. Altre specie presenti nello stesso territorio (*Myzus persicae*, *Aphis craccivora*, *Macrosiphum euphorbiae* etc.), rivestono interesse del tutto marginale.

La dannosità complessiva di tali specie e in particolare delle prime tre, è stata principalmente commisurata all'entità dei danni diretti apportati alle piante infestate. Oggi, alla luce di quanto prima richiamato, c'è da aspettarsi nel nostro territorio un significativo incremento di CTV, trasmesso da tali specie indigene e in particolare da *A. gossypii*.

Ma il rischio maggiore per tutta l'area del Mediterraneo è rappresentato dalla possibile diffusione nel territorio del temibile afide tropicale degli agrumi. L'insetto si trova già insediato nella penisola iberica, benché confinato sinora in limitate aree della parte nord-occidentale, non interessate da agrumicoltura estensiva (Ilharco et al., 2005; Cambra, 2007). L'afide ha una tipica distribuzione intertropicale, ma da poco più di un decennio ha rapidamente esteso la sua presenza in tutta la Regione Caraibica dell'America Centrale, raggiungendo la Florida e il Messico (Yokomi et al., 1994; CABI, 1998); quasi contemporaneamente, dall'altro versante dell'Atlantico, l'insetto ha fatto la sua comparsa nell'isola di Madeira, dalla quale con tutta probabilità gli è stato facile raggiungere i siti di attuale insediamento nella penisola iberica. Purtroppo le circostanze ambientali e climatiche del Mediterraneo – dove negli ultimi anni, come è ben noto, è stata registrata la tendenza a un aumento delle temperature medie stagionali – ben si conciliano con le esigenze termiche dell'insetto, che in Estremo Oriente (Giappone, Corea) vive regolarmente a latitudini fino a 40°N, ben coincidenti con quelle centrali del Mediterraneo stesso. Da ciò ne consegue l'esigenza di prepararsi a un simile indesiderato evento con opportuni interventi programmatici idonei a contrastare le nefaste conseguenze che inevitabilmente ne deriveranno per l'agrumicoltura nazionale e dell'intero Mediterraneo.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS

La diagnosi di CTV, basata sino a qualche decennio fa sul saggio biologico su limetta messicana, ha beneficiato negli ultimi 20 anni della messa a punto di strumenti sierologici e molecolari. Antisieri policlonali e anticorpi monoclonali vengono comunemente utilizzati per test ELISA e DTBIA,

mentre primer e sonde sono disponibili per la diagnosi e la differenziazione dei ceppi attraverso reazioni di amplificazione genica (Mathews et al., 1997; Hilf e Garnsey, 2000; Hung et al., 2000; Cambra et al., 2000; Huang et al., 2004; Roy et al., 2005) e ibridazione molecolare (Barbarossa e Savino, 2006a). Protocolli di real-time RT-PCR sono stati recentemente messi a punto per rilevare il virus sia nei tessuti vegetali sia nei vettori (Ruiz-Ruiz et al., 2007; Rosa et al., 2007; Saponari et al., 2007).

Da decenni diverse attività di ricerca sono state mirate alla messa a punto di sistemi diagnostici (sierologici o molecolari) in grado di differenziare ceppi severi da ceppi blandi, senza dover ricorrere al saggio biologico che, come è noto, richiede un periodo di tempo di almeno un anno. I sistemi più efficaci e più utilizzati per la caratterizzazione dei ceppi sono:

- Test sierologici con anticorpo monoclonale MCA13 (Permar et al., 1990) che rimane ancora, uno dei primi approcci per identificare la presenza/assenza di ceppi severi. Tuttavia reazioni ceppo-asicifiche sono state riportate al di fuori della Florida, ove l'anticorpo era stato prodotto;
- Amplificazione genica mediante RT-PCR seguita da: (i) analisi RFLP (Gillings et al., 1993); (ii) ibridazione molecolare con oligonucleotidi marcati, specifici per gruppi di isolati con attività biologica differente (Cevik et al., 1996 b); (iii) analisi SSCP (Rubio et al., 1996; Febres, 1995; Gago-Zachert et al., 1999; D'Urso et al., 2000; Rubio et al., 2000; Davino et al., 2005); (iv) analisi con marker molecolari multipli (Hilf et al., 2005). Con quest'ultimo metodo i ceppi vengono classificati in T30-like (ceppi blandi); VT- e T3-like (ceppi responsabili di stem-pitting e seedling yellows); T36-like (ceppi che causano deperimento).

Sieburth et al. (2005) hanno confrontato alcuni dei predetti sistemi, utilizzando gli isolati della collezione internazionale di CTV dell'USDA di Beltsville (MD, USA). I risultati evidenziano che: (i) nessun sistema disponibile è in grado, applicato singolarmente, di definire univocamente la potenziale virulenza del ceppo; il profilo dell'isolato può essere definito mediante l'utilizzo di più sistemi; (ii) in alcune situazioni al risultato molecolare non corrisponde il comportamento biologico del ceppo, probabilmente a causa della presenza di più ceppi in una stessa fonte infetta, dalla cui interazione può risultare un quadro sintomatologico diverso da quello atteso (es. "mascheramento" dei ceppi severi); (iii) il saggio biologico resta fondamentale nella determinazione della virulenza del ceppo; (iv) è auspicabile l'identificazione di un singolo marker associato alla severità dei ceppi.

Un risultato in tale direzione è riportato da Saponari et al. (2007), con la messa a punto di un protocollo di real-time RT-PCR basato sull'utilizzo di una sonda TaqMan in grado di reagire solamente con i ceppi severi che causano stem-pitting e seedling yellows.

L'uso di moderni strumenti bioinformatici, supportati da reti computazionali ad alta intensità, potrà contribuire a favorire lo studio dei fattori che intervengono nel determinare i caratteri biologici del virus, i motivi genomici strutturali e gli eventi che determinano il grado di virulenza e la disseminazione (Lombardo et al., 2007).

LA SITUAZIONE IN ITALIA

Negli anni '90 la saltuaria segnalazione in Italia della presenza del CTV, indusse il Ministero per le Politiche Agricole e Forestali, di concerto con i Servizi Fitosanitari Regionali, a emanare il decreto ministeriale del 22/11/1996 che prevede la lotta obbligatoria contro il virus. L'Italia, infatti, nell'ambito della normativa dell'UE per le misure di protezione contro gli organismi da quarantena è stata per anni zona protetta. Obiettivo prioritario del decreto è stata l'adozione di una serie integrata di interventi che impedissero l'introduzione e la diffusione del virus.

Le indagini di questo ultimo quinquennio mostrano, purtroppo, in modo chiaro che CTV è ormai diffuso in tutte le aree agrumicole, con incidenza variabile e con esiti esiziali allorché le piante sono innestate su arancio amaro. A quanto risulta le infezioni raggiungono 0,005% in alcune aree e il 64% in altre, spesso derivano da monitoraggi effettuati da gruppi di lavoro diversi, che hanno utilizzato tanto il metodo DTBIA quanto il metodo DAS-ELISA in periodi dell'anno non sempre del tutto idonei.

Poco o nulla si sa ancora, tuttavia, sulle caratteristiche biologiche e molecolari dei ceppi presenti, sulla base delle quali poter fare delle previsioni sulla loro virulenza, sulla trasmissibilità mediante i vettori attualmente presenti e sulle strategie da seguire. I pochi test biologici eseguiti hanno interessato esclusivamente la lima messicana, mentre sarebbe utile una caratterizzazione biologica completa secondo criteri internazionalmente seguiti per l'identificazione dei biotipi di CTV (Garnsey et al., 2005).

La variabilità genetica delle popolazioni di CTV in tre diverse aree agrumicole è stata studiata da Davino et al. (2005) che hanno esaminato 150 campioni per area mediante analisi SSCP e sequenza nucleotidica del gene p20 di CTV. I risultati mostrano che l'isolato presente in Puglia è differente da quel-

lo siciliano e che la popolazione del virus è omogenea, il che lascia ritenere che la diffusione è avvenuta mediante popolazioni afidiche locali. Gli isolati siciliani analizzati, responsabili di sintomi gravi su arancio Tarocco innestato su arancio amaro, hanno presentato una sequenza nucleotidica strettamente correlata agli isolati californiani SY568 and SY107 (similarità superiore al 99%). Gli isolati provenienti dalle due aree, distanti 650 km, rinvenuti su due cultivar di agrumi introdotte dalla Spagna sono risultati geneticamente correlati. Non essendo stati eseguiti test biologici su piante ospiti convenzionali, la valutazione dell'espressione sintomatica non è certamente conclusiva sui caratteri patogenetici degli isolati.

Recentemente, nel corso di un'indagine effettuata nella provincia di Catania (2005) sono stati rinvenuti per la prima volta sintomi di alveolatura inversa in piante di arancio Sanguinello di circa 30 anni di età innestate su arancio amaro. Saggi biologici e analisi di sequenza mostrano che l'isolato è differente da quelli precedentemente descritti (Davino et al., 2005). Oltre ai tipici sintomi osservati su semenzali di lima messicana (schiarimento delle nervature e macchie d'acqua sulla corrispondente pagina inferiore, associati a curvatura a coppa della foglia), sono stati anche accertati sintomi di giallume e suberificazione delle nervature su arancio amaro e su pompelmo, decolorazione delle nervature su arancio dolce. L'analisi BLAST delle sequenze dei geni codificanti per la proteina p23 ha messo in evidenza una similarità del 99% con alcuni ceppi brasiliani di seedling yellows BaraoB, Val-CB e C271-2 (Rizza et al., 2007).

Poiché entrambi i tipi di isolati, tipo californiano e tipo brasiliano, provengono da agrumeti relativamente vicini in linea d'aria, sono ospitati da due diverse cultivar e solo in un caso presentano sintomi su arancio amaro, si deve concludere che le infezioni traggano origine da fonti diverse. Sulla base di tali risultati, ancora preliminari, è verosimile che le introduzioni abbiano origine remota e che la malattia abbia cominciato a manifestarsi negli agrumeti italiani solo dopo una lenta selezione di isolati virali e di biotipi del vettore più efficienti e compatibili fra loro. Ciò potrebbe spiegare la lunga fase asintomatica e l'assenza di alveolatura inversa sul portinnesto arancio amaro nel caso di cultivar locali.

Le indagini effettuate in Puglia, dove i primi gravi focolai sono stati segnalati a partire dal 2002, hanno rivelato la diffusa presenza di uno stesso ceppo, verosimilmente identico al ceppo blando T30 della Florida. Tuttavia, un isolato con genotipo non assimilabile a nessun isolato standard di riferimento è stato individuato in uno dei focolai ed è attualmente oggetto di approfondimenti (Barbarossa e Savino, 2006b). L'analisi dei risultati dei

monitoraggi effettuati nelle aree circostanti i focolai, dimostrano che vi è trasmissione e diffusione del virus da parte delle popolazioni afidiche locali. Le stesse sembrano essere responsabili della contaminazione delle produzioni di alcuni vivai ubicati in aree limitrofe a focolai.

Sintomatologie assimilabili a deperimenti, ritardi nella ripresa vegetativa e sofferenze delle piante sono riscontrabili in diversi impianti ove l'infezione è presente. Non sono stati tuttavia riscontrati casi di stem pitting, a conferma che si tratterebbe di ceppi blandi. Studi sono in corso per verificare l'efficienza di trasmissione da parte delle popolazioni locali di *A. spiraecola* e *A. gossypii*, per accertare la trasmissibilità dei ceppi, per verificare il ruolo del clementine, molto diffuso e molto suscettibile alle infestazioni afidiche, nell'evoluzione delle infezioni.

I primi dati riguardanti le infezioni riscontrate in Basilicata e Calabria, confermano quanto riscontrato in Puglia, ossia presenza di ceppi blandi e progressivo aumento dell'incidenza di casi di deperimento associato alla presenza di arancio amaro, evidenti soprattutto a seguito dei periodi di caldo estivo.

INTERVENTI PER IL CONTENIMENTO

In considerazione di questa situazione, nel 2003 si è costituito un Coordinamento Interregionale per la lotta obbligatoria contro il virus della tristezza degli agrumi, con l'obiettivo di aggiornare il succitato DM 22/11/1996 ed elaborare una norma in grado di offrire gli strumenti idonei per intervenire tempestivamente nella situazione di emergenza fitosanitaria creatasi.

Purtroppo la complessità della problematica, l'indisponibilità di adeguate risorse finanziarie per incentivare l'applicazione del decreto di lotta obbligatoria e soprattutto l'eradicazione dei focolai d'infezione del virus e della malattia, l'esiguità e talvolta la mancanza presso i Servizi fitosanitari delle competenze e delle risorse necessarie ad attuare un efficace e capillare controllo, l'inesistenza di un programma coordinato di divulgazione presso gli operatori del settore, la scarsa collaborazione di molte figure della filiera, hanno reso difficili e intempestivi gli interventi, sino ad arrivare all'attuale situazione di emergenza, che, almeno in Puglia, non interessa solo gli agrumeti ma ha interessato buona parte dei vivai agrumicoli.

Al di là dei necessari interventi di tipo politico nel destinare le risorse idonee e necessarie a supportare la filiera in questa situazione critica, dal punto di vista tecnico-scientifico si rende necessario attivare urgentemente alcune

misure relative alle attività di monitoraggio, inclusa la metodologia di campionamento, di saggio, la caratterizzazione biologica e molecolare dei ceppi, la caratterizzazione dei biotipi del vettore/i e della loro efficienza nella trasmissione del virus, la vigilanza sulla presenza/introduzione di *T. citricidus*. Indilazionabile appare l'organizzazione di una rete nazionale di monitoraggio coordinato e pianificato.

Contemporaneamente occorrerà definire i criteri e le misure per il contenimento a breve e lungo termine dei danni causati dalla malattia nei nuovi impianti e nei reimpianti.

Come dimostrato in altri Paesi l'eradicazione ha la sua efficacia come misura preventiva e di contenimento nel breve periodo. Recenti studi epidemiologici in California dimostrano che le infezioni, in aree dove è in atto un programma di eradicazione, sono contenute (0,09-0,7%) rispetto ad aree dove non è in atto un programma di eradicazione, e l'incremento annuale delle infezioni può raggiungere il 3,6% (Yokomi et al., 2005). L'efficacia del programma di eradicazione ha i suoi punti deboli nella cooperazione degli agricoltori, nella disponibilità di risorse finanziarie in grado di supportare un monitoraggio capillare e di integrare il reddito degli agrumicoltori, nonché nella capacità di contenere le infestazioni afidiche.

Strategie di contenimento a lungo termine devono essere, pertanto, pianificate al fine di poter far fronte a situazioni, alcune già attuali, in cui l'eradicazione non è più una via perseguibile.

La sperimentazione di portinnesti tolleranti alternativi, adatti alle diverse condizioni pedoclimatiche delle aree agrumicole del nostro Paese, rappresenta sicuramente una via da intraprendere tenendo anche conto della loro suscettibilità ad altri parogeni (Catara e Tessitori, 2006).

L'impiego di ceppi blandi ai fini della cross-protection è un'ulteriore possibilità di contenimento, applicata finora con discreto successo nel caso di *tristeza-stem pitting*, che può aiutare a ritardare gli effetti disastrosi della malattia. Esperienze pregresse dimostrano, in ogni caso, che si tratta di fenomeni che possono essere superati nel giro di qualche decennio e soprattutto che ceppi blandi con effetto di *cross-protection* selezionati in una determinata area possono non essere efficaci in un'altra area.

Il trasferimento dei geni di *Poncirus trifoliata* (immune a CTV) coinvolti in ospiti sperimentali e varietà coltivate del genere *Citrus* è stato ottenuto con successo mediante metodi convenzionali e non convenzionali. Questo approccio ha i suoi limiti sia per quanto riguarda l'utilizzo di materiale geneticamente modificato, sia perché il vasto panorama varietale che caratterizza l'agrumicoltura, renderebbe necessario intervenire su un ampio numero di cultivar e/o cloni.

La lotta diretta contro *T. citricidus* – al di là di teorici ma improbabili successi di eradicazione, ove si dovesse diffondere da noi – può essere ovviamente posta in essere attraverso le varie metodologie di solito utilizzate contro gli altri afidi agrumicoli e delle quali vari ricercatori hanno puntualmente richiamato le principali linee operative, focalizzandone specifiche azioni di ordine colturale, di lotta biologica, nonché di lotta chimica guidata e integrata (Rocha-Peña et al., 1995; Halbert e Brown, 1996).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le infezioni causate da CTV, come accennato nell'introduzione, hanno determinato, dall'inizio del secolo scorso, gravi ripercussioni sull'agrumicoltura di molti Paesi. Nonostante i tanti sforzi messi in atto e i progressi dal punto di vista scientifico che hanno permesso di chiarire i meccanismi di diffusione, definire la potenziale virulenza e migliorare le tecniche diagnostiche, il virus rappresenta ancora oggi una minaccia, soprattutto per le aree ove l'arancio amaro è utilizzato come portainnesto prevalente. Programmi di certificazione fitosanitaria dei materiali di propagazione, e il monitoraggio delle aree indenni, sono in corso in diversi Paesi, ma l'intensificarsi degli scambi commerciali mina costantemente lo stato sanitario della coltura.

L'impiego di materiali di propagazione esenti da CTV, attraverso specifici programmi di certificazione, abbinato alla sostituzione dell'arancio amaro con portainnesti tolleranti ha rappresentato la via più efficace di contenimento degli effetti della malattia. Ciò va tuttavia integrato da un sistema efficace di monitoraggio e intercettazione dei ceppi severi, che potrebbero pregiudicare l'asintomaticità e l'equilibrio del binomio ceppo blando/portainnesto tollerante.

Sarà in ogni caso necessario valutare criticamente gli effetti bioagronomici e fitopatologici che una riconversione indiscriminata potrebbe comportare, se non accompagnata da misure fitosanitarie restrittive, rivolte a limitare la diffusione di materiale di propagazione infetto e l'introduzione di altri patogeni di rilevante importanza economica. Sono noti, infatti, gli effetti devastanti che diverse specie di *Candidatus Liberibacter*, responsabili del "greening", stanno provocando in Florida e Brasile. Non sono, peraltro, da sottovalutare i rischi connessi ad altri patogeni virali, ancora non presenti nell'area del Mediterraneo, quale il *Citrus tatter leaf virus*, o recentemente accertati su combinazioni d'innesto di minore interesse commerciale, quale il virus responsabile del "citrus leaf blotch". Infine, una riflessione attenta va fatta sulla suscettibilità di alcuni portainnesti a miceti tel-

lurici, quale *Fusarium* spp., i cui effetti negativi su citrange e altri ibridi di arancio trifogliato sono sotto gli occhi di tutti (Catara e Polizzi, 1999). Sarà, pertanto, opportuno monitorare l'evoluzione del quadro fitosanitario globale dell'agrumicoltura nell'area del Mediterraneo, al fine di essere attrezzati a fronteggiare eventuali nuove emergenze fitosanitarie (Catara et al., 2007).

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Prof. V. Savino, il Prof. G.P. Martelli, il Prof. R.K. Yokomi, la Dott.ssa S.E. Halbert, la Prof.ssa M.A. Hoy e il Dott. F.A. Ilharco per i suggerimenti e i contributi forniti.

BIBLIOGRAFIA

- BARBAGALLO S., COCUZZA G., CRAVEDI P., KOMAZAKI S. (2007): *IPM Case Studies: Tropical and subtropical fruit tree*, in: Aphids as crop pests, van Emden H. F. & Harrington R. (eds.), CAB Int., Wallingford-UK, Cap. 30, pp. 663-676.
- BARBAROSSA L., SAVINO V. (2006a): *Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of Citrus tristeza virus by dot-blot hybridization*; «J. Phytopathology», 154, pp. 329-335.
- BARBAROSSA L., SAVINO V. (2006b): *Comparative sequence analysis of coat protein gene of Apulian Citrus tristeza virus isolates*, XIII Congresso Nazionale S.I.Pa.V., Foggia, 12-15 settembre 2006.
- BAR-JOSEPH M., LOEBENSTEIN G. (1973): *Effects of strain, source-plant, and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid*, «Phytopathology», 63, pp. 716-720.
- BLACKMAN R.L., EASTOP V.F. (2000): *Aphids on the world's crop. An identification and information guide*, 2nd ed. Wiley, Chichester-UK, 466 pp.
- CAB INTERNATIONAL (1998): *Distribution maps of plant pests: Toxoptera citricidus (Kirkaldy)*, Map No. 132, 5 pp.
- CAMBRA M., OLMOS A., GORRIS M.T., MARROQUIN C., ESTEBAN O., GARNSEY S.M., LAUGER R., BATISTA L., PENNA I., HERMOSO DE MENDOZA A. (2000): *Detection of citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissue and single aphids*, in: Proc. 14th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 42-49.
- CAMBRA M. (2007): *Un unexpected visit: Toxoptera citricidus in Northern part of the Iberian peninsula. The current situation 2007*, IOCV Newsletter, May 2007, pp. 7-8.
- CATARA A., DAVINO M. (2006): *Il virus della tristezza degli agrumi in Sicilia*, Rivista di Frutticoltura e di Ortoflorocoltura, 68 (1), pp. 18-23.
- CATARA A., POLIZZI G. (1999): *Il "marciume secco delle radici" degli agrumi: sintomi, cause e suscettibilità dei portinnesti*, Frutticoltura, 61 (1), pp. 38-41.
- CATARA A., TESSITORI M. (2006): *Problematiche fitosanitarie dell'agrumicoltura italiana dopo la diffusione del virus della "tristezza"*, «Italus Hortus», 13 (1), pp. 49-60.

- CATARA A., RIZZA S., TESSITORI M. (2007): *New scenarios for the Mediterranean citriculture as a result of citrus tristeza virus diffusion?*, IOBC IPM WG Meeting, Catania 5-7 novembre 2007.
- CEVIK B., PAPPU S.S., PAPPU H.R., BENSHER D., IREY M., LEE R.F., NIBLETT C.L. (1996a.): *Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: Detection and strain differentiation*, in: Proc. 13th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 17-24.
- CEVIK B., PAPPU S.S., LEE R.F., NIBLETT C.L. (1996b): *Detection and differentiation of citrus tristeza closterovirus using a point mutation and minor sequence differences in their coat protein genes*, «Phytopathology», 86, S101.
- COSTA A.S., GRANT T.J. (1951): *Studies on transmission of the tristeza virus by the vector, Aphis citricidus*, «Phytopathology», 41, pp. 105-113.
- DAVINO M., AREDDIA R., POLIZZI G., PATTI I. (1989): *Aphid transmissibility of some isolates of citrus tristeza virus (CTV) under restrict environment in Sicily*. Proc. "Euraphid" network: Trapping and aphid prognosis. CEC, Joint Res. Centre, Ispra (Italy), pp. 237-244.
- DAVINO S., RUBIO L., DAVINO M. (2005): *Molecular analysis suggests that recent Citrus tristeza virus in Italy were originated by at least two independent introductions*, «E. Journal of Plant Pathol.», 111, pp. 289-293.
- DICKSON R.C., FLOCK R.A., JOHNSON M. McD. (1951): *Insect transmission of Citrus quick-decline virus*, «J. Econ. Entomol.», 44, pp. 172-176.
- D'URSO F., AYLLON M.A., RUBIO L., SAMBADE A., HERMOSO DE MENDOZA A., GUERRI J., MORENO P. (2000): *Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of Citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission*, «Plant Pathol.», 49, 288-294.
- FEBRES V.J. (1995): *Molecular characterization of citrus tristeza virus genes and their use in plant transformation*, Ph. D. Thesis. University of Florida, Gainesville, FL, 1995.
- GAGO-ZACHERT S., COSTA N., SEMORILE L., GRAU O. (1999): *Sequence variability in p27 gene of citrus tristeza virus (CTV) revealed by SSCP analysis*. «ECE Electronic J. Biotechnol.», 2, 1: <http://ejb.ucv.cl/content/vol27issue1>.
- GARNSEY S.M., CIVEROLO E.L., GUMPF D.J., PAUL C., HILF M.E., LEE R.F., BRLANSKY R.H., YOKOMI R.K., HARTUNG J.S. (2005): *Biological characterization of an international collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates*, In: Proc. 16th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 75-93.
- GILLINGS M., BROADBENT P., INDSTO J., LEE R.F. (1993): *Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction*, «J. Virol. Methods», 44, pp. 305-317.
- GOTTWALD T.R., GIBSON G., GARNSEY S.M., IREY M. (2000): *The effect of aphid vector population composition on local and background component of Citrus tristeza virus spread*, in: Proc. 14th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 88-93.
- GOTTWALD R.T., GARNSEY S.M., CAMBRA M., MORENO P., IREY M., BORBÓN J. (1996): *Differential effects of Toxoptera citricida vs. Aphis gossypii on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus tristeza*, in: Proc. 13th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 120-129.
- HALBERT S.E., BROWN L. (1996): *Toxoptera citricida (Kirkaldy), Brown citrus aphid: identification, biology and management strategies*, FL Dept. Agric. & Consumer Serv., Entomology Circ. N. 374, 6 pp.
- HALBERT S.E., GENC H., CEVIK B., BROWN L.G., ROSALES I. M., MANJUNATH K.L., POMERINCKE M., DAVISON D.A., LEE R.F., NIBLETT C. (2004): *Distribution and cha-*

- racterization of *Citrus tristeza virus* in South Florida following establishment of *Toxoptera citricida*, «Plant Disease», 88, pp. 935-941.
- HILF M.E., GARNSEY S.M. (2000): *Characterization and classification of citrus tristeza virus isolates by amplification of multiple molecular markers*, in: Proc. 14th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 18-27.
- HILF M.E., MAVRODIEVA, V.A., GARNSEY S.M. (2005): *Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms*, «Phytopathology», 95, pp. 909-917.
- HUANG Z., RUNDELL A.P., GUAN X., POWELL A.C. (2004): *Detection and isolate differentiation of Citrus tristeza virus in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction*, «Plant Disease», 88, pp. 625-629.
- HUNG T.H., WU M.L., SU H.J. (2000): *A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of Citrus tristeza virus*, «J. Phytopathol.», 148, 469-475.
- ILHARCO F.A., SOUSA-SILVA C.A., ALVAREZ A. (2005): *First report on Toxoptera citricidus (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal*, «Agronomia Lusit.», 51(1), pp. 19-21.
- KATIS N.I., TSITSIPIS J.A., STEVENS M., POWELL G. (2007): *Transmission of plant virus*, in *Aphids as crop pests*, van Emden H. F. & Harrington R. (eds.), CAB Int., Wallingford-UK, Cap. 14, pp. 353-390.
- LEE L., HUNTER W., DAWSON W.O., HILF M. E. (2005): *Variability in transmission of Citrus tristeza virus isolates from Florida by Toxoptera citricida*, Am. Phytopath. Soc., Ju. 30-Aug. 3, 2005, Austin, Tx. Paper no. P-494.
- LOMBARDO A., DAVINO S., IACONO MANNO M., MUOIO A. (2007): *A high computing bioinformatic approach based on GRID for detecting recombination in whole citrus tristeza virus genomes*, XIV Congresso Nazionale S.I.Pa.V., Perugia, 18-21 settembre 2007, p. 61.
- MATHEWS D.M., RILEY K., DODDS J.A. (1997): *Comparison of detection methods for citrus tristeza virus in field trees during months of non optimal titer*, «Plant Diseases», 81, pp. 525-529.
- MENEGHINI M. (1948): *Experiências de transmissão da doença "tristeza" dos citrus pelo pulgão preto da laranjeira*, «Biologico» 14, pp. 115-118.
- NORMAN P.A., GRANT T.J. (1957): *Transmission of tristeza virus by aphids in Florida*, «Proc. Fla. Hort. Soc.», 69, pp. 38-42.
- PERMAR T.A., GARNSEY S.M., GUMPF D.J., LEE R.L. (1990): *A monoclonal antibody that discriminate strains of citrus tristeza virus*, «Phytopathology» 80, pp. 224-228.
- RACCAH B., LOEBENSTEIN G., BAR-JOSEPH M. (1976): *Transmission of citrus tristeza virus by the melon aphid*, «Phytopathology», 66, pp. 1102-1104.
- RACCAH B., ROISTACHER C.N., BARBAGALLO S. (1989): *Semipersistent transmission of viruses by vectors with special emphasis on citrus tristeza virus*, in: *Advances in Disease Vector Research*, 6, Springer-Verlag, New York, pp. 301-340.
- RIZZA S., LOMBARDO A., NOBILE G., CATARA A. (2007): *Biological and molecular characterization of two additional Citrus tristeza virus isolates associated with sour orange inverse pitting rootstock*, XIV Congresso Nazionale S.I.Pa.V., Perugia, 18-21 settembre 2007, p. 85.
- ROCHA-PEÑA M.A., LEE R.F., LASTRA R., NIBLETT C.L., OCHOA-CORONA F.M., GARNSEY S.M., YOKOMI R.K. (1995): *Citrus tristeza virus and its aphid vector Toxoptera citricida: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America*, «Plant Disease», 79, pp. 437-445.

- ROISTACHER C. N. (1982): *A blueprint for disaster-seedling yellows tristeza in California*, «Citograph», 67, pp. 48-53.
- ROISTACHER C.N., MORENO P. (1991): *The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus*: A review, in: Proc. 11th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA.
- ROSA C., POLEK M., FALK B.W., ROWHANI A. (2007): *Improved efficiency for quantitative and qualitative indexing for Citrus tristeza virus and Citrus psorosis virus*, «Plant Disease», doi:10.1094/PDIS-91-9-1089.
- ROY A., FAYAD A., BARTHE G., BRLANSKY R.H. (2005): *A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees*, «J. Virol. Methods», 129, pp. 47-55.
- RUBIO L., AYLLON M.A., GUERRI J., PAPPU H.R., NIBLETT C.L. (1996): *Differentiation of citrus tristeza virus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene*, «Ann. App. Biol.» 129, pp. 479-489.
- RUBIO L., GUERRI J., MORENO P. (2000): *Characterization of Citrus tristeza virus isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of DNA complementary to their RNA population*, in Proc. 14th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, pp. 12-17.
- RUBIO L., AYLLON M.A., KONG P., FERNANDEZ A., POLEK M., GUERRI J., MORENO P., FALK B. (2001): *Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence of mixed infection and recombination*, «J. Virol.», 75, pp. 8054-8062.
- RUIZ-RUIZ S., MORENO P., GUERRI J., AMBROS S. (2007): *A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantification of Citrus tristeza virus in different plant tissues*, «J. Virol. Methods» (2007), doi: 10.1016/j.jviromet.2007.05.011.
- SAPONARI M., MANJUNATH K.M., YOKOMI R.K. (2007): *Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan)*, «J. Virol. Methods», doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.026.
- SIEBURTH P.J., NOLAN K.G., HILF M.E., LEE R.F., MORENO P., GARNSEY S.M. (2005): *Discrimination of stem-pitting from other isolates of Citrus tristeza virus*, in Proc. 16th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA, 1-10.
- STROYAN H. L. G. (1961): *Identification of aphids living on Citrus*, «FAO Plant Protection Bull.», 9, pp. 45-65.
- VARMA P.M., RAO D.G., CAPOOR S.P. (1965): *Transmission of tristeza virus by Aphis craccivora (Koch) and Dactynotus jaceae (L.)*, «Indian J. Ent.», 27, pp. 67-71.
- YOKOMI R.K., LASTRA R., STOETZEL M.B., DAMSTEEGT V.D., LEE R.F., GARNSEY S.M., GOTTFELD R.T., ROCHA-PEÑA M.A., NIBLETT C.L. (1994): *Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus*, «J. Econ. Entomol.», 87, pp. 1078-1085.
- YOKOMI R.K., JOOST P., BACKUS E. (2005): *Preliminary evaluation of two biotypes of Aphis gossypii on the transmission of citrus tristeza virus*, Proc. 16th IOCV Conference, IOCV, Riverside, CA., p. 496.
- YOKOMI R.K., POLEK M., GRAFTON-CARDWELL E.E., O'CONNELL N. (2007): *Rapid assessment of the citrus tristeza isolates detected at the Lincove Research and Extension Center, Exter, CA, in spring 2007*. Abstract, 17th IOCV Conference, Adana, Turkey, 21-26 Oct. 2007.