

MARIO DAVINO e ROSA LA ROSA

Istituto di Patologia vegetale, Università di Catania

INDAGINI SULLA DIFFUSIONE DEL VIRUS DELLA VARIEGATURA INFETTIVA DEGLI AGRUMI

La variegatura infettiva degli agrumi è una malattia causata da un virus ILAR (CVV) di 24-32 nm, di cui si conoscono ceppi differenti (GARNSEY et al., 1983), trasmessi meccanicamente a numerosi ospiti arborei ed erbacei (DESJARDINS, 1975).

La malattia è frequente su limone (Citrus limon (L.) Burm.) ma può interessare anche altre specie di agrumi, causando decolorazioni delle nervature, bollosità e maculature a punta di spillo sulle foglie giovani. Lo sviluppo dei germogli è ridotto nei mesi primaverili, ma diventa normale nella vegetazione estiva. I frutti possono presentare bitorzoli, corrugamenti, asimmetrie e, qualche volta, dimensioni ridotte. Le piante infette da variegatura infettiva assumono a volte uno sviluppo ridotto. I test di immunodiffusione hanno lasciato ritenere che questa entità virale è sierologicamente correlata a quella della foglia rugosa (CLRV) o foglia bollosa (CCLV) (GARNSEY, 1975), ma i sintomi indotti sui differenti ospiti arborei ed erbacei suggeriscono di considerare i due virus come entità diverse (FULTON, 1981). Recenti ricerche hanno permesso di mettere a punto anche per questo virus un saggio con il metodo immunoenzimatico (ELISA), grazie alla

preparazione di un siero anti-variegatura a titolo più elevato di quelli ottenuti in precedenza (DAVINO e GARNSEY, 1983).

Pur non essendo una malattia distruttiva, la variegatura infettiva causa dei danni di una certa entità su limone, arancio dolce (C. sinensis Osbeck) e mandarino (C. reticulata Blanco) (CATARA et al., 1981). Abbiamo ritenuto pertanto utile effettuare un'indagine per accertare la diffusione del virus nelle cultivar di agrumi.

Materiali e metodi

Le indagini sono state effettuate su materiale in collezione, presso alcuni campi di orientamento varietale dell'Istituto di Coltivazioni Arboree dell'Università di Catania. Le specie prese in considerazione sono: arancio dolce, limone, mandarino e similari e pompelmo (C. paradisi Macf.). In totale sono state saggiate n. 344 piante appartenenti alle specie e cultivar indicate nella tab. n. 1.

Preparazione dell'antisiero. L'antisiero utilizzato era stato ottenuto immunizzando per ben quattro volte un coniglio con un ceppo blando di variegatura infettiva (CVV-2) (GARNSEY et al., l.c.) e presentava un titolo di 1/256, accertato mediante doppia diffusione in gel di agar.

Saggi immunoenzimatici. Per i saggi sono state utilizzate foglie giovani completamente espanse e/o corteccia di giovani germogli prelevati direttamente dalle piante in campo, durante il periodo primaverile-estivo o da loro moltiplicazioni allevate in serra.

Come testimoni infetti sono stati usati semenzali di limone volkameriano (C. volkameriana Pasq.) inoculati con ceppi di variegatura infettiva a diversa virulenza denominati

CVV-1 (PV196), CVV-2 (GARNSEY et al., l.c.) e FD-CVV (isolato da piante di limone femminello Fior d'arancio) (CATARA et al., l.c.).

I saggi sono stati eseguiti adottando il procedimento già utilizzato nel nostro laboratorio per il virus della tristezza degli agrumi (BAR-JOSEPH et al., 1980). Gli estratti sono stati preparati da campioni raccolti al momento del saggio o conservati per qualche giorno a -32°C . I tessuti sono stati omogenati in mortai o in frantumatore cinematico in presenza di tampone fosfato salino (1:20) contenente Tween 20 (0,5 ml/l) (PBS-T) e polivinilpirrolidone (20 g/l) o tampone Tris 0,05 M pH 7,8.

La γ globulina è stata preparata mediante precipitazione con ammonio solfato e purificazione attraverso una colonna di DEAE-cellulosa (Sephacel).

Sono state adoperate indifferentemente tre tipi di piastre di polistirene Dynatech M 129 A a fondo piatto, Nunclon-Delta e Greiner Labor Technik a fondo rotondo. La γ globulina si faceva legare alla fosfatasi alcalina (Sigma-type VII) mediante gluteraldeide. Le pozzette venivano rivestite con γ globulina alla concentrazione di $1 \mu\text{g/ml}$ in tampone (1,59 g di Na_2CO_3 ; 2,93 di NaHCO_3 ; 0,2 g di NaN_3 /l). Il coniugato è stato diluito 1/1000 in tampone PBS-T contenente 2% di polivinilpirrolidone e 0,2% di ovalbumina. Il substrato, costituito da p-nitrofenilfosfato (Sigma 104- 105) è stato usato alla concentrazione di 0,6-0,8 mg/ml. Ogni campione veniva mescolato con un egual volume di acqua distillata al momento della lettura che veniva effettuata mediante spettrofotometro. Tutti i campioni che alla lunghezza d'onda di 405 nm presentavano un valore di 0,15 più elevato rispetto al controllo sono stati considerati positivi. I saggi sono stati sempre eseguiti in doppio.

Saggi su piante indicatrici. Questi saggi sono stati effettuati in serra su piantine di limone Femminello S. Teresa nucelare allevate in contenitori di 3-5 l su substrato composto per 2/3 di torba e per 1/3 di terreno vulcanico, sterilizzato con calore umido, mettendo in atto gli accorgimenti necessari per favorire rapidi accrescimenti ed evitare contaminazioni accidentali. La temperatura variava da 22 a 25°C. Le inoculazioni sono state effettuate per inserzione di tessuti corticali utilizzando n. 4 piantine per saggio.

Risultati e discussione

Circa il 70% delle piante di limone saggiate è risultato affetto da CVV. Infezioni più modeste si sono riscontrate su arancio dolce, mandarino e pompelmo (Tab. n.1). Nei campioni prelevati in campo i migliori risultati sono stati ottenuti nel periodo primaverile in quanto durante il periodo estivo anche piante infette risultavano sane. Nei testimoni allevati in serra, ove le temperature erano costantemente favorevoli alla replicazione delle particelle virali, i saggi sono risultati sempre positivi anche quando si è operato con foglie senza sintomi.

Le osservazioni di campo effettuate nei mesi primaverili ed estivi hanno più frequentemente permesso di osservare bollosità delle foglie, più simili a quelle causate da CCLV che non a CVV. Nel caso del limone Femminello Comune, Continella e Fior d'arancio la diagnosi sintomatica di infezioni di CVV è risultata coincidente con quella del test immunoenzimatico. Il limone Femminello Incappucciato, pur presentando sintomi fogliari che lasciavano sospettare la presenza di CVV, è risultato infetto solo da foglia bollosa, avendo indotto bollosità e decolorazione delle nervature

Tabella n. 1 - Specie e cultivar di agrumi saggiate per il virus della variegatura infettiva, campi collezione e numero di piante saggiate

Specie e cultivar	Campo collezione	Test ELISA per CVV	Piante saggiate n.
<u>Arancio</u>			
Moro	Sferro	-	6
Navelina	Ispica, Noto, Sferro, Siracusa	-	24
Salustiana	Ispica, Noto, Sferro	-	12
Thomson navel	Sferro	-	6
<u>Limone</u>			
Femminello Apireno	Ispica, Noto	+	12
" Comune	Giarre	+	6
" Continella	Giarre, Ispica, Noto, Trepunti	+	24
" Dosaco	Giarre, Ispica, Noto, Trepunti	+	24
" Fior d'arancio	Giarre, Ispica, Noto, Trepunti	+	24
" Incappucciato	Giarre, Ispica, Noto	-	12
" Messina	Giarre, Ispica, Noto, Trepunti	-	16
" S. Teresa	Giarre, Ispica, Noto, Trepunti	+	16
Monachello	Giarre, Ispica, Noto	-	12
<u>Mandarino e similari</u>			
Clementine comune	Ispica, Noto, Sferro, Trepunti	+	20
" Monreal	Trepunti	-	6
" di Nules	Ispica, Noto, Sferro, Trepunti	-	16
" Oroval	Ispica, Noto, Sferro, Trepunti	-	16
" Precoce	Sferro	-	4
" SRA 63	Sferro	-	4
Clementine Tardivo	Ispica, Noto	-	8
Satsuna Owari	Sferro, Trepunti	-	8
" Wase	Sferro, Trepunti	-	8
<u>Pompelmo</u>			
Pink	Ispica, Noto	+	8
Ruby	Ispica, Noto, Sferro, Trepunti	-	16

sull'indicatrice mentre è risultato negativo al saggio immunoenzimatico. Il clementine Comune ed il pompelmo Pink pur non mostrando sintomi sulle piante in campo sono risultati ambedue infetti da CVV.

Su tutte le piante indicatrici dopo circa 40-50 giorni dalle inoculazioni sono state osservate vistose decolorazioni delle nervature e bollosità più o meno accentuate della lamina fogliare, margine irregolare ed asimmetria. La variabilità dell'intensità dei sintomi osservata sulle indicatrici lascia ritenere che anche in Sicilia esistono parecchi ceppi di variegatura infettiva. Il ceppo più virulento risulta quello osservato su piante di limone Femminello Fior d'arancio.

Dal momento che la malattia è largamente diffusa nei vecchi cloni di limoni, ancora preferiti alle selezioni nucellari a causa della loro minore suscettibilità al "mal secco" (PERROTTA e TRIBULATO, 1977), si rende necessaria a breve termine un'indagine nei vivai per conoscere la frequenza delle infezioni nelle piante distribuite agli agricoltori. Sarebbe inoltre da scoraggiare la pratica del reinnesto delle piante di limone con altre specie di agrumi in quanto le infezioni esistenti potrebbero causare lo scadimento qualitativo anche degli altri frutti. Sarebbe infine auspicabile un più intenso lavoro di risanamento mediante microinnesto e/o termoterapia al fine di ottenere materiale sano.

Riassunto

E' stata avviata un'indagine sistematica al fine di accertare la diffusione del virus della variegatura infettiva degli agrumi in alcuni campi di orientamento varietale della Sicilia orientale, mediante test immunoenzimatico (ELISA) e saggi su piante di limone. In totale sono state saggiate n.

308 piante di varie specie e cultivar. Il virus è risultato diffuso soprattutto nelle piante di limone, mentre è meno frequente su arancio dolce, mandarino e similari e pompelmo.

Summary

A survey for citrus variegation virus.

A survey for citrus variegation virus has been undertaken on citrus trees growing in homologation fields in Sicily. Tests were carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and by graft-inoculation of lemon seedlings.

The virus is widespread on lemon trees and less frequent on sweet oranges, mandarine and mandarin-like and grapefruit trees.

Letteratura citata

- 1) BAR-JOSEPH M., GARNSEY S.M., GONSALVES D., PURCIFULL D. (1980). Detection of citrus tristeza virus. I. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and SDS-immunodiffusion methods. In: Proc. 8th Conf. IOCV, Univ. California, Riverside, 1-8.
- 2) CATARA A., CARTIA G., DAVINO M. (1981). Citrus virus diseases in Italy: Past, present and a look to the future. Proc. Int. Soc. Citriculture, 1, 426-430.
- 3) DAVINO M., GARNSEY S.M. (1983). Purification, characterization and serology a mild strain of citrus infectious variegation virus from Florida. In: Proc. 9th Conf. IOCV, (in corso di stampa).
- 4) DESJARDINS P.R. (1975). Infectious variegation-Crinkly leaf. In: Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus: a collection of colour slides, vol. II, IFAC, Paris, 6 pp.

- 5) FULTON R.W. (1981). Iilarviruses (citrus variegation virus). In: Handbook of Plant virus infections, comparative diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 390-392.
- 6) GARNSEY S.M. (1975). Purification and properties of citrus-leaf-rugose virus. *Phytopathology*, 65, 50-57.
- 7) GARNSEY S.M., BAKSH N., DAVINO M., AGOSTINI J.P. (1983). A mild isolate of citrus variegation virus found in Florida citrus. In: Proc. 9th Conf. IOCV, (in corso di stampa).
- 8) PERROTTA G., TRIBULATO E. (1977). Observations on the susceptibility nucellar of lemon to mal secco disease in Sicily. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3, 1004-1005.