

INDAGINI SULLA PRESENZA DI VIRUS E VIROIDI NEI SEMI DI SPECIE DIVERSE DI AGRUMI

DAVINO M., AREDDIA R. e DOMINA F.

Istituto di Patologia vegetale, Università di Catania

Negli ultimi anni il numero di malattie da virus delle piante e di agenti virus simili ed a sospetta eziologia virale che si trasmettono per seme si è notevolmente incrementato: da 53 nel 1967 (Bennet, 1969) si è passati a 119 nel 1979 (Mandahar, 1981). Nello stesso periodo il numero di piante nelle quali è stata accertata tale modalità di trasmissione è passato da 82 a 162 (Bennet, l.c.; Mandahar, l.c.).

A tale incremento hanno contribuito le nuove tecniche sierologiche (ELISA, RISA, immunodiffusione) e di microscopia elettronica applicate sempre più diffusamente sia per diagnosi massali che per indagini sulla distribuzione dei virus nei diversi tessuti del seme (Luisoni, 1982; Russo, 1982).

Per quanto riguarda gli agrumi i dati disponibili si riferiscono più ad osservazioni occasionali che a ricerche sistematiche. Non mancano tuttavia casi di trasmissione sospetta o accertata. I primi reperti risalgono al 1957 allorché Wallace (1957) segnalò sintomi riferibili a infezioni di foglia bollosa su limone. Nel 1963, sono stati osservati sintomi del tipo psorosi (Ps-A) in semenzali di citrange Carrizo (Bridges et al., 1965), Troyer (Childs e Johnson, 1966; Pujol, 1966) e arancio trifogliato (Campiglia et al., 1971).

Per quanto riguarda i viroidi è stata sospettata la trasmissione per seme dell'exocortite (CEV) in alcune varietà di arancio dolce ma non in limetta di Rangpur (Salibe e Moreira, 1966); la cachessia-xiloporosi (Cx-Xy) non è risultata trasmissibile per seme in varie specie di agrumi (Childs et

al., 1965).

Spiroplasma citri, agente dello stubborn degli agrumi, è presente nei tegumenti che vengono utilizzati per l'isolamento in coltura e le diagnosi mediante il metodo ELISA (Clark et al., 1978).

Recentemente inoltre è stata accertata la presenza del virus della variegatura infettiva (CVV) nei tegumenti e nei semi di limone Femminello Fior d'arancio (Davino et al., 1986).

Nel presente lavoro, si è voluto studiare la presenza di virus e/o viroidi nei semi di varie specie di agrumi mediante l'applicazione della tecnica ELISA e dell'elettroforesi in gel di poliacrilammide (PAGE) al fine di acquisire elementi sulla possibilità di una loro eventuale trasmissibilità per seme.

Materiali e Metodi

Per le indagini sul complesso del virus della tristezza (CTV) sono stati utilizzati semi di agrumi in collezione ad Umbeluzi (Maputo, Mozambico). Le specie prese in considerazione sono state: pompelmo Marsh, Citrus macrophylla, arancio dolce Shamouti e arancio trifogliato (selezioni English large, Yamaguchi, Christiansen e New Mexico). Il materiale è stato prelevato da piante naturalmente infette da butterscuratura del legno, un componente del complesso del virus della tristezza altamente trasmissibile.

Per il virus della variegatura infettiva sono stati utilizzati: semi di limone Femminello Fior d'arancio infetto da un isolato molto virulento (F1-CVV); semi di limone volkameriano prelevati da piante inoculate sperimentalmente con un ceppo molto virulento (CVV-1) e con uno blando (CVV-2). Le piante erano inoculate da circa cinque anni ed erano allevate in pieno campo. Quasi tutti i frutti di limone volkameriano infetti da CVV-1 presentavano rugosità e malformazioni indotti dal virus,

mentre quelli di piante inoculate con il ceppo blando non presentavano alcun sintomo.

I saggi sono stati eseguiti su semi asciugati all'aria e utilizzati alcuni giorni dopo (2-20). Sono stati saggiati anche 100 semenzali di limone Femminello Fior d'arancio di 2 e 4 mesi di età provenienti da semi di piante infette.

Per la ricerca dei viroidi sono stati utilizzati semi di cedro prelevati da piante sperimentalmente inoculate con il viroide dell'exocortite (CEV) e/o il viroide B (CBV) degli agrumi (Albanese et al., 1986) e di clementine comune e limone volkameriano affetto da viroidi diversi.

Test ELISA. In tutti i saggi è stato utilizzato il metodo ELISA secondo la procedura del doppio sandwich (Bar-Joseph et al., 1979). Per CVV è stato utilizzato un antisiero preparato con il ceppo CVV-2 (Davino e Garnsey, 1984); per CTV è stato utilizzato un antisiero monoclonale della ditta Ingenasa (Spagna).

Gli estratti grezzi da sottoporre a saggio ELISA sono stati preparati utilizzando separatamente semi interi, semi privi di tegumento e tegumenti. Ciascun campione era costituito da un numero variabile di semi. Per calcolare la percentuale di infezione in semi di C. volkameriana sono stati saggiati campioni costituiti ciascuno da due semi. L'omogenato è stato preparato in mortaio in presenza di N₂ liquido; il tampone di estrazione (PBS-T + 2% di PVP) è stato utilizzato nel rapporto 1:10. Per il saggio dei semenzali sono state omogenate giovani foglie appena raccolte.

Le piastre sono state lette a 405 nm mediante un Titerk Multiskan MCC. Sono stati considerati infetti tutti i campioni che avevano un valore di assorbanza 2,5 volte più elevato del controllo sano.

PAGE. L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita utilizzando semi interi, semi senza tegumenti e tegumenti, mediante fenolo-cloroformio, frazionamento con LiCl 2M (Albanese et al., l.c.) e cromatografia in cellulosa CF11 (Semancik, 1986). L'elettroforesi bidirezionale degli estratti è stata eseguita in gel di poliacrilammide al 5% (Schumacher et al., 1983).

Risultati

ELISA. Il virus della tristezza è stato riscontrato con frequenza e concentrazione diversa nelle specie e nei tessuti indagati (Tab. 1). Nel pompelmo Marsh tutti i campioni saggiati sono risultati infetti e la concentrazione è risultata maggiore nei tegumenti. Nel caso del Citrus macrophylla il virus è stato riscontrato, in bassa concentrazione, solo nei tegumenti mentre negli estratti dei semi l'assorbanza è risultata al limite dei valori positivi.

Anche i semi di arancio dolce Shamouti hanno dato esito positivo con valori di assorbanza abbastanza elevati. Per quanto riguarda i semi di arancio trifogliato nessun campione è risultato positivo indipendentemente dai tessuti saggiati.

Il virus della variegatura infettiva è stato riscontrato in semi di limone Femminello Fior d'arancio in tre campioni su 90, mentre nei semi di limone volkameriano infetti il numero di campioni infetti è stato superiore al 90% per CVV-1 e del 72% per CVV-2. In entrambe le specie il virus è risultato presente in maggiore concentrazione nei tegumenti.

I semenzali di limone Fior d'arancio sono risultati esenti da CVV.

PAGE. Sono stati effettuati saggi preliminari su n. 9 campioni di 100 semi con o senza tegumenti e 5 di tegumenti. I risultati

hanno messo in evidenza su cedro Etrog la presenza di RNA riferibili a viroidi.

Discussione

I risultati dimostrano la versatilità della tecnica ELISA per la diagnosi delle infezioni da virus anche nei semi di agrumi confermando una precedente esperienza (Davino et al., l.c.). Rilevante è il fatto che nel caso del limone volkameriano la percentuale di infezioni è risultata elevata, con differenze apprezzabili fra i due ceppi di CVV in esame. Ciò lascerebbe pensare ad una più elevata sistemicità del virus in questa specie rispetto al limone Fior d'arancio. Poichè ciascun campione era costituito da n. 2 semi la percentuale di semi infetti da ciascun dei due ceppi di virus è non inferiore al 45% per CVV-1 e al 35% per CVV-2.

E' noto peraltro che le percentuali d'infezione da Ilarvirus nei semi di specie diverse è generalmente sostenuta.

La presenza di CTV nei semi non risulta segnalata in precedenza. Essa tuttavia non sorprende dal momento che le particelle del virus erano già state riscontrate in elevate quantità sia nel peduncolo che nell'albedo dei frutti di Hassaku (Tsuchizachi et al., 1978). Anche in questo caso è stato osservato un diverso comportamento delle specie in esame. Il virus è stato riscontrato tanto su pompelmo Marsh e su C. macrophylla (ospiti sintomatici) quanto su arancio dolce Shamouti, ospite asintomatico mentre non è stato riscontrato in alcuna delle selezioni di arancio trifogliato notoriamente resistenti a CTV. Per quanto riguarda i saggi sui semi di C. macrophylla è da sottolineare che il virus è stato riscontrato nei tegumenti in concentrazione relativamente bassa ed in un solo campione di semi.

E' tuttavia da ricordare che McClean (1957) non ha riscontrato infezioni in semenzali ottenuti da semi di piante

Tabella 1 - Risultati dei saggi ELISA effettuati su semi interi, semi senza tegumenti e tegumenti di specie diverse di agrumi.

Specie e cultivar	Virus	N. campioni positivi/ saggiati	N. semi campione	Assorbanza media 405 nm
Pompelmo cv Marsh	CTV			
semi interi		5/5	8	0,828
semi senza tegumenti		5/5	8	1,160
tegumenti		5/5	8	1,680
<u>C. macrophylla</u>	CTV			
semi interi		1/5	8	0,083
semi senza tegumenti		0/5	8	0,014
tegumenti		5/5	8	0,140
Arancio dolce cv Shamouti	CTV			
semi interi		4/4	8	0,785
Arancio trifoliato diverse selez.	CTV			
semi interi		0/20	8	0,010
Limone Femminello Fior d'arancio	F-1-CVV			
semi interi		3/90	20	0,932
Limone volkameriano				
semi senza tegumenti	CVV-1	22/23	2	0,197
tegumenti		21/23	2	0,944
semi senza tegumenti	CVV-2	13/18	2	0,184
tegumenti		13/18	2	1,014

infette.

I risultati relativi ai test per i viroidi sono in parte attribuibili alla difficoltà riscontrata durante la preparazione degli estratti che richiede certamente delle modificazioni. Non è da sottovalutare il fatto che la concentrazione più elevata dei viroidi nelle piante si osserva nei mesi più caldi, mentre la maturazione dei frutti nelle nostre condizioni avviene allorché si abbassano le temperature. E' interessante in proposito il fatto che l'unico campione positivo era costituito da semi di cedro che è l'indicatrice arborea di alcuni viroidi degli agrumi.

In conclusione allo stato attuale sembra prematuro definire l'importanza pratica dei reperti che suggeriscono tuttavia indagini approfondite per le ripercussioni di origine fitosanitaria che si possono prevedere.

Riassunto

Si riportano i risultati di indagini effettuate mediante test immunoenzimatici (ELISA) ed elettroforetici (PAGE) su semi di specie di agrumi con infezioni note di virus e viroidi. Il virus della tristezza è stato individuato nei tegumenti di semi di arancio Shamouti, Citrus macrophylla e di pompelmo Marsh ma non in semi di arancio trifogliato (quattro selezioni); mentre il virus della variegatura infettiva è stato ritrovato in bassa percentuale nei tegumenti e nei semi di limone Femminello Fior d'arancio e in percentuale molto elevata in quelli di limone volkameriano, con differenze a secondo dei ceppi del virus. RNA simili a viroidi sono stati ritrovati in semi di cedro Etrog sperimentalmente inoculato.

Summary

Investigation on virus and viroids in seeds of citrus species.

Results of a screening by ELISA and PAGE tests for detection of citrus tristeza virus (CTV), variegation virus (CVV) and viroids are reported. CTV was detected in seed coats and seeds of Shamouti orange, alemow, Marsh grapefruit whereas those of trifoliate orange (four selections) were healthy. CVV was found at a low rate in seed coats and seeds of Femminello Fior d'arancio and at a very high rate in those of volkamer lemon. Two tested strains of CVV gave different results. Viroid like RNAs have been found in seeds of Etrog citron.

Letteratura citata

- ALBANESE G., LA ROSA R., DAVINO M., HAMMOND R.W., SMITH D.R. e DIENER T.O. (1986). A viroid different from CEV found in commercial citrus in Sicily. In: Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV (in corso di stampa).
- BAR-JOSEPH M., GARNSEY S.M., GONSALVES D., MOSCOVITZ Mira, PURCIFULL D.Z., CLARK M.F. e LOEBEINSTEIN G. (1979). The use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 69, 190-194.
- BENNET C.W. (1969). Seed transmission of plant. *Adv. Virus Res.*, 14, 221-261.
- BRIDGES G.V., YOUTSEY C.O. e NIXON R.R. (1965). Observations indicating psorosis transmission by seed of carrizo citrange. In: Proc. F.la State Hort. Soc., 78, 48-50.
- CAMPIGLIA H.G., SILVEIRA C.M., SALIBE A.A. (1976). Psorosis transmission through seeds of trifoliate orange, p. 132-134. In: Proc. 7th Conf. IOCV, IOCV, Univ. California, Riverside.
- CHILDS J.F.L., JOHNSON R.E. e EICHHORN J.L. (1965). The question of seed transmission of citrus viruses, p. 90-94. In: Proc. 3rd Conf. IOCV, IOCV Gainesville.
- CHILDS J.F.L. e JOHNSON R.E. (1966). Preliminary report of seed transmission of psorosis virus. *Plant Dis. Repr.*, 50, 81-83.

- CLARK M.F., FLEGG C.L., BAR-JOSEPH M. e ROTTEM S. (1978). The detection of Spiroplasma citri by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopathology Z.*, 92, 332-337.
- DAVINO M. e GARNSEY S.M. (1984). Purification, characterization, and serology of a mild strain of citrus infectious variegation virus from Florida, p. 196-203. In: Proc. 9th Conf. IOCV, IOCV Riverside.
- DAVINO M., AREDDIA R. e GARNSEY S.M. (1986). Distribution of citrus variegation virus within citrus hosts. In: Proc. 10th Conf. IOCV (in corso di stampa).
- LUISONI E. (1982). Moderne metodiche per il rilevamento delle infezioni virali nei semi. I. Sierologia. La difesa delle piante, 5-6, 381-394.
- MANDAHAR C.L. (1981). Virus transmission through seed and pollen, p. 241-292. In: Plant diseases and vectors: ecology and epidemiology. Maramorosch K. e Harris K.F. eds., 367 pp.
- MCCLEAN A.P.D. (1957). Tristeza virus of citrus: evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis. Repr.*, 41, 821.
- PUJOL A.R. (1966). Transmission de prososis a traves de semilla de citrange Troyer. INTA, Estacion Central Agropecnoria (Concordia), Serie Tecnica, n. 8, 15.
- RUSSO M. (1982). Moderne metodiche per il rilevamento delle infezioni virali nei semi. II. Immunomicroscopia elettronica. La difesa delle piante, 5-6, 395-404.
- SALIBE A.A. e MOREIRA S. (1965). Seed transmission of Exocortis Virus, p. 139-142. In: Proc. 3rd Conf. IOCV, IOCV Gainesville.
- SCHUMACHER J., RANDLES J.W. e RIESNER D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.*, 135, 288-295.
- SEMANCICK J.S. (1986). Separation of viroid RNAs by cellulose chromatography indicating conformational distinctions. *Virology*, 155, 39-45.

- TSUCHIZAKI T., SASAKI A. e SAITO Y. (1978). Purification of citrus tristeza virus from diseased fruits and the detection of the virus in citrus tissues by fluorescent antibody techniques. *Phytopathology*, 68, 139-142.
- WALLACE J.M. (1957). Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. *Hilgardia*, 27, 223-246.