

## VARIABILITÀ GENETICA DI ISOLATI DI CITRUS TRISTEZA VIRUS (CTV) RISCONTRATI IN ITALIA NEGLI ULTIMI VENTI ANNI\*

S. DAVINO<sup>(1)</sup>, M. GUARDO<sup>(2)</sup>, A. CARUSO<sup>(2)</sup>, M. DAVINO<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie Sez. di Patologia vegetale (DISTEF),  
Univ. degli Studi di Catania, v. S. Sofia 100, 95123 Catania - wdavino@unict.it

<sup>(2)</sup> Istituto Sperimentale per l'Agricoltura di Acireale (ISA),  
Corso Savoia 190, 95123 Acireale (CT)

### RIASSUNTO

Dal 1982 ad oggi sono state individuate in Italia migliaia di piante di agrumi infette dal virus della "tristeza" degli agrumi introdotte illegalmente dall'estero appartenenti alle seguenti specie: "alemow", arancio dolce cvv Shamouti, Navelina e Valencia, calamondino, lima "di Rangpur", limone "Ceylon", mandarino "Fortune" e "Nova", pompelmo, satsuma e tangelo "Minneola", nonché piante locali di arancio dolce cv Tarocco. Poiché i diversi isolati di CTV differiscono per le loro caratteristiche biologiche in modo particolare per il tipo e per l'intensità dei sintomi causati nei diversi ospiti in campo, sulle indicatrici, nella trasmissibilità attraverso gli afidi vettori o nella loro abilità nella protezione crociata si è ritenuto opportuno studiare le caratteristiche genetiche degli isolati sino ad oggi accertati in Italia, mediante SSCP, PCR bidirezionale e sequenziamento. I risultati mostrano chiaramente che diversi isolati risultano riconducibili a ceppi blandi già da tempo presenti in diversi Paesi del Bacino del Mediterraneo mentre altri sono più virulenti e più simili a isolati asiatici ed americani.

**Parole chiave:** RT-PCR, SSCP, RT-PCR bidirezionale, clonaggio, sequenziamento

### SUMMARY

#### GENETIC VARIABILITY OF ISOLATES OF CITRUS TRISTEZA VIRUS DISCOVERED IN ITALY IN THE LAST 20 YEARS

Since 1982 thousand of citrus plants affected by Citrus Tristeza Virus, illegally introduced by foreign countries, have been detected in Italy. The plants belong to the following species: "Alemow", "Shamouti", "Navelina" and "Valencia" sweet orange, calamondin, "Rangpur" lime, "Ceylon" lemon, "Fortune" and "Nova" mandarin, grapefruit, satsuma, "Minneola" tangelo and recently also thousand of local "Tarocco". CTV isolates differ by their biological characteristics in particular by the intensity of the symptoms on the different cultivars, in the transmissibility by aphids vectors and in their ability in the cross-protection, therefore it is suitable to study the genetic characteristics of Italian CTV isolates. Genetic variability of CTV isolates have been analysed using SSCP, bi-directional PCR and sequencing. The results clearly show that different isolates are referable to mild isolates present since long time in different countries of the Mediterranean Basin, while others are more virulent and more similar to Asians and Americans isolates.

**Key words:** RT-PCR, SSCP, bi-directional RT-PCR, cloning, sequencing

### INTRODUZIONE

La tristeza (*Citrus tristeza virus* – CTV) è una delle malattie degli agrumi trasmissibili per innesto di maggior importanza economica a livello mondiale. Si stima che ha causato la morte di oltre 85 milioni di alberi di arancio dolce, mandarino e pompelmo innestate su arancio

---

\* Lavoro realizzato nell'ambito del Progetto MIPAF "Ricerche e sperimentazione nel settore dell'agrumicoltura italiana" Pubbl. N. 58 e MIUR

amaro (Cambra *et al.*, 1999). La comparsa della tristezza come malattia è stata una conseguenza dell'utilizzazione di massa dell'arancio amaro come portinnesto per propagare gli agrumi. Il virus è riportato endemico nella maggior parte dell'Asia, Australia, Africa del Sud, e gran parte del Sud America, con un'incidenza elevata nelle principali aree agrumicole degli Stati Uniti (California e Florida), Israele e Spagna e si sta disperdendo attivamente in vari paesi dell'America Centrale come Panama, Costa Rica, Repubblica Dominicana, Giamaica e Cuba, mentre focolai sono stati riscontrati in vari altri paesi del mediterraneo e Medio Oriente come Albania, Algeria, Cipro, Egitto, Francia, Grecia, Italia, Giordania, Libano, Libia, Marocco, Palestina, Potogallo, Siria, Tunisia e Turchia. Altri focolai sono stati individuati anche in Belice, Cile, Ecuador, El Salvador, Honduras, Messico e Nicaragua (Cambra e Moreno 2000). Gli ospiti naturali del virus della tristezza degli agrumi appartengono tutti alla famiglia delle *Rutaceae* e sono specie ed ibridi dei generi *Citrus* e *Fortunella*. Il virus è stato anche trasmesso ad alcune specie di generi affini a *Citrus* come *Aegle* spp., *Aeglopsis* spp., *Afraegle* spp., *Atalantia* spp., *Citropsis* spp., *Clausena* spp., *Eremocitrus* spp., *Hersperthusa* spp., *Merilla* spp., *Microcitrus* spp., *Pamburus* spp., *Pleiospermium* spp., e *Swinglea* spp. (Bar-Joseph e Lee, 1989). In forma sperimentale sono state infettate due specie non *rutaceae*: *Passiflora gracilis* e *P. coerulea* (Roistacher e Bar-Joseph, 1987). Il virus della tristezza degli agrumi è un membro del genere *closterovirus*, famiglia *closteroviridae* (Martelli *et al.*, 2000). I virioni di CTV sono particelle flessuose di approssimativamente 2000 nm di lunghezza x 10-12 nm di diametro, che contengono un'unica molecola di RNA genomico (gRNA) incapsidata da due proteine di 25 e 27 KDa (Sekiya *et al.*, 1991; Febres *et al.*, 1994) che coprono rispettivamente il 95% ed il 5% della lunghezza della particella virale e danno a quest'ultima una particolare struttura di serpente.

Il gRNA di CTV è di polarità positiva e contiene 19226-19296 nucleotidi, organizzati in 12 frammenti aperti di lettura (ORFs), che potenzialmente codificano 19 prodotti proteici, più 2 zone non codificanti (UTR) di 108 e 209 nucleotidi nell'estremo 5' e nell'estremo 3' rispettivamente (Karasev *et al.*, 1995). Dal 1982 ad oggi sono state individuate in Italia migliaia di piante di agrumi introdotte illegalmente dall'estero appartenenti alle seguenti specie: alemow, arancio dolce cvv Shamouti, Navelina e Valencia, calamandino, lima di "Rangpur", limone "Ceylon", mandarino "Fortune" e "Nova", pompelmo, satsuma e tangelo "Minneola". Poiché i diversi isolati di CTV differiscono per le loro caratteristiche biologiche in modo particolare per il tipo e per l'intensità dei sintomi causati nei diversi ospiti in campo, sulle indicatrici, nella trasmissibilità attraverso gli afidi vettori o nella loro abilità nella protezione crociata si è ritenuto opportuno studiare le caratteristiche genetiche degli isolati sino ad oggi riscontrati in Italia.

## MATERIALI E METODI

Dal 1982 al 2003 sono stati raccolti ed analizzati numerosi campioni di piante affette da tristezza provenienti da diverse parti d'Italia. Tutti i campioni selezionati sono stati saggiati per DAS-ELISA e conservati liofilizzati. Nella Tabella 2 sono riportati i campioni delle piante conservate liofilizzate come collezione ed utilizzate durante le prove.

L'RNA totale è stato estratto da ogni campione da analizzare con un kit commerciale della ditta Qiagen (Qiagen RNeasy Plant minikit) secondo il protocollo della ditta produttrice. Per RT-PCR è stato amplificato il gene p23 con appositi primers (tabella n. 1) costruiti esternamente a questo gene (PM50 e PM51) (Sambade *et al.*, 2003). In un volume finale di 25µl sono stati posti 2µl di RNA totale, 25mM Tris-HCL, pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM dNTPs, 1µM di ciascun primer, 0,2 U di SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) 0,5 U di Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 0,2 U di RNaseOUT ribonuclease

inhibitor (Invitrogen). I prodotti di PCR di circa 697 pb sono stati analizzati su un gel di agarosio all'1,5% colorato con Bromuro di etidio.

#### Caratterizzazione elettroforetica mediante SSCP

Sono state effettuate prove di polimorfismo del DNA a singola elica per il gene oggetto di studio. Ad 1µl di RT-PCR-prodotto sono stati aggiunti 9µl di agente denaturante (95% di formammide, 0,05% di blu di bromofenolo e 0,05% di xilencianolo). La miscela è stata incubata per 10 min a 95° C e subito dopo posta in ghiaccio e caricata in un gel non denaturante di poliaccrilammide 8%. Il gel è stato fatto correre a 4° C per 3,5 h a 200 V e successivamente colorato in nitrato d'argento secondo il protocollo di Beidler *et al.* (1982).

#### Caratterizzazione elettroforetica mediante RT-PCR bidirezionale

*Denaturazione* - A 4,5 µl di estratto sono stati aggiunti 0,5 µl di idrossido di metilmercurio, la miscela è stata lasciata a R.T. per circa 10 min.

Successivamente sono stati aggiunti 0,5 µl di β-mercaptoetanolo, il tutto è stato posto subito in ghiaccio per evitare la chiusura delle catene.

*Retrotrascrizione* - In un volume finale di 25 µl sono stati posti 2 µl di RNA totale, 5 µl di 5x Buffer (Invitrogen), 1,25 µl di 0.1 DTT, 0,4 mM dNTPs, 1 µM del primer PM85, 0,2 U di SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) e 0,2 U di RNaseOUT ribonuclease inhibitor (Invitrogen). La miscela è stata posta in un termociclatore Celbio per 1h a 42° C e successivamente per 15 min a 72° C per disattivare gli enzimi.

*PCR-1 (distinzione tra isolati virulenti e blandi)* - In un volume finale di 25 µl sono stati posti 2 µl di cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione, 25 mM tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µM di ciascun primers (PM85, PM86, PM82 e PM83) (tabella 1), 0,4 mM dNTPs, 0,5 U di Taq DNA polymerase (Invitrogen).

La PCR includeva 35 cicli di 10s a 94 °C, 30s a 58° C e 40s a 72 °C ed una elongazione finale di 4 min a 72 °C. I prodotti di PCR di circa 612, 450 e 239 pb sono stati analizzati su un gel di agarosio al 2% colorato con Bromuro di etidio.

*PCR-2 (distinzione tra isolati virulenti ed atipici)*- In un volume finale di 25 µl sono stati posti 2 µl di cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione, 25 mM tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µM di ciascun primers (PM85, PM86, PM82 e PM84) (tabella 1), 0,4 mM dNTPs, 0,5 U di Taq DNA polymerase (Invitrogen).

La PCR includeva 35 cicli di 10s a 94 °C, 30s a 58° C e 40s a 72 °C ed una elongazione finale di 4 min a 72 °C.

Come controllo negativo sono stati utilizzati RNA totali dalle specie e cvv saggiate che si trovano in collezione presso l'ISA ed il DISTEF esenti da infezioni ed allevati in serra ed H<sub>2</sub>O. I prodotti di PCR di circa 612, 450 e 239 pb sono stati analizzati su un gel di agarosio al 2% colorato con Bromuro di etidio.

Tabella 1 – Primers utilizzati e loro posizione genomica (Sambade *et al.*, 2003)

Primer	Polarità	Sequenza Nucleotidica	Posizione genomica
PM50	+	ACTAACTTTAATTCGAACA	18347-18365 (T36)
PM51	-	AACTTATTCCGTCCTTC	19026-19044 (T36)
PM82	+	AAACACGATAAGGCATCGAG	18544-18563 (VT)
PM83	-	CACTTACGTTTCAGTCTTGAGCG	18588-18609 (T385)
PM84	-	CATTTACGTTTCGGTCTTCAAC	18627-18647 (T36)
PM85	+	GGACAAACTTTTCTGTGAACCTTC	18409-18437 (T36)
PM86	-	GATGAAGTGGTGTTCACGGAGAACTC	18995-19020 (T36)

## Clonaggio e sequenziamento

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi del polimorfismo del cDNA a singola elica e dalla RT-PCR bidirezionale si è deciso di effettuare il clonaggio di tutti i campioni che mostravano profilo diverso. I cDNA dopo essere stati purificati dai sali usando un kit della Roche e mediante il protocollo della stessa casa commerciale sono stati clonati in un plasmide linearizzato e timidilato della ditta Promega denominato pGem-T secondo il protocollo della ditta commerciale. La ligazione è stata eseguita nel seguente modo: In un volume finale di 10 µl sono stati posti 5 µl di cDNA quantificato allo spettrofotometro, 1 µl di vettore, 1 µl di tampone ligase (Promega) 5X ed 1 µl di enzima ligasi (Promega).

I prodotti di ligazione sono stati inseriti in cellule rese elettrocompetenti di *Escherichia coli* ceppo *Sure* per elettroporazione. Le cellule così ottenute sono state poste a crescere in tubi eppendorff da 1,5 ml contenenti mezzo nutritivo LB, Ampicillina e Kanamicina in concentrazioni standard e fatte crescere per 1h a 37° C, successivamente il mezzo contenente le cellule è stato posto in piastre di LB-agar contenenti Ampicillina, Kanamicina ed X-Gal al fine di ottenere uno screening delle colonie. Di tutte le colonie cresciute e mostranti colore bianco n. 5 per ciascun gruppo di cDNA sono state sottoposte a successiva PCR per verificare la presenza dell'inserto. I campioni risultati positivi alla PCR sono stati sequenziati. Le sequenze ottenute sono state confrontate tra di loro e con altre sequenze note già presenti in "genbank". Mediante il programma MEGA è stato possibile disegnare un albero filogenetico.

## RISULTATI

Tabella 2 – Infezioni da CTV accertate in Italia e risultati ottenuti mediante RT-PCR bidirezionale

N.	Anno	Specie o cultivar	Località del reperto	RT-PCR bidirezionale			
				Banda controllo	Blando	Severo	Atipico
1	1982	Pompelmo Marsh seedless	Monasterace (RC)	+	+	-	+
2	1983	Arancio Golden Buckeye	Monasterace (RC)	+	-	-	+
3	1983	Limone Ceylon	Copanello (CZ)	-	-	-	-
4	1983	Satsuma Wase	Monasterace (RC)	+	+	+	-
5	1984	Satsuma precoce	Catania (CT)	+	+	-	-
6	1986	Satsuma	Monasterace (RC)	+	+	-	-
7	1991	Pompelmo Marsh seedless	Catania (CT)	+	+	-	+
8	1991	Alemow	Catania (CT)	+	-	+	+
9	1991	Arancio Shamouti	Catania (CT)	+	-	+	+
10	1993	Satsuma Long Yanzhai	Catania (CT)	+	+	-	-
11	1994	Arancio Valencia	Catania (CT)	+	+	-	-
12	1995	Lima di Rangpur	Pescia (PT)	+	+	-	-
13	1995	Calamondino	Pescia (PT)	+	+	-	-
14	1996	Calamondino	Pescia (PT)	+	+	-	-
15	2002	Mandarino Fortune	Siracusa (SR)	+	+	+	-
16	2003	Arancio Navelina	Massafra (TA)	+	+	-	-
17	2003	Arancio Tarocco	Catania (CT)	+	-	+	-

I 17 campioni analizzati hanno dato tutti esito positivo alla RT-PCR con i primers PM50 e PM51 ad eccezione del campione numero 3 (Limone Ceylon) dove non si è potuto ottenere prodotto di RT-PCR. Dall'analisi del polimorfismo del cDNA a singola elica si evince che dei 17 campioni analizzati si sono potuti osservare 8 profili differenti presumibilmente con variazioni puntiformi (figura 1), mentre dalle analisi della RT-PCR bidirezionale si sono messi in evidenza 6 profili diversi (figura 2). I risultati delle analisi sono riportati nella tabella 2. I risultati delle sequenze hanno permesso di disegnare un albero filogenetico con i diversi isolati riscontrati (figura 3)

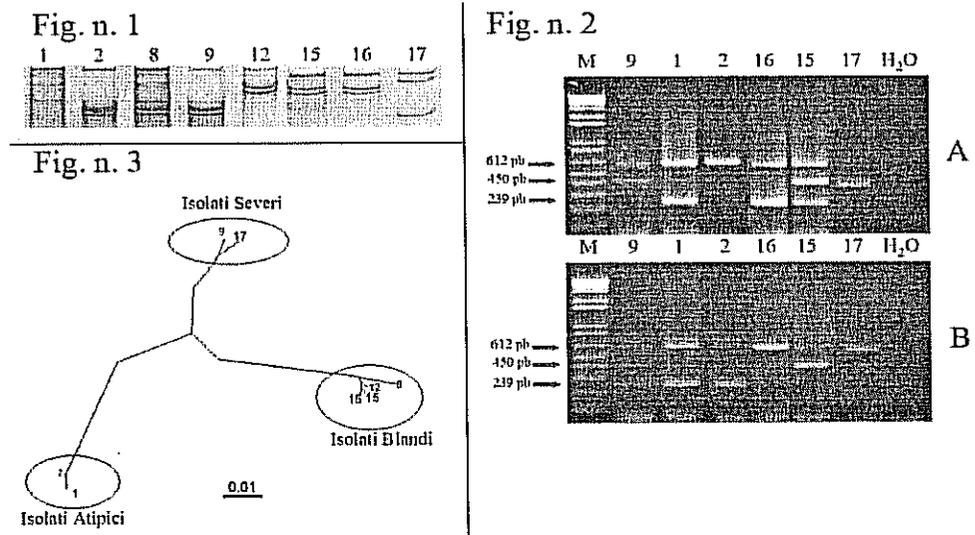


Figura 1 – Differenti profili di SSCP individuati; i numeri 1, 2, 8, 9, 12, 15, 16, 17 rappresentano le specie o cultivar della tabella 2

Figura 2 – A) RT-PCR bidirezionale con primers PM85, PM86, PM82 e PM83 per distinguere gli isolati virulenti e dagli isolati blandi, M=Marker 1Kb plus (Invitrogen), 9, 1, 2, 16, 15, 17 rappresentano le specie o cultivar della tabella n. 2. La banda a 612 pb rappresenta la discriminante del gene *p23*, la banda a 450 pb rappresenta la discriminante degli isolati virulenti mentre la banda a 239 pb rappresenta la discriminante per gli isolati blandi; B) RT-PCR bidirezionale con primers PM85, PM86, PM82 e PM84 per distinguere gli isolati virulenti e dagli isolati atipici, M=Marker 1Kb plus (Invitrogen), 9, 1, 2, 16, 15, 17 rappresentano le specie o cultivar della tabella 2. La banda a 612 pb rappresenta la discriminante del gene *p23*, la banda a 450 pb rappresenta la discriminante degli isolati virulenti mentre la banda a 239 pb rappresenta la discriminante per gli isolati atipici.

Figura 3 – Filogenesi degli 8 isolati sequenziati. I numeri 1, 2, 8, 9, 12, 15, 16, 17 rappresentano le specie o cultivar della tabella 2

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

L'individuazione di isolati di CTV geograficamente distanti ma geneticamente correlati suggeriscono frequenti movimenti del virus tra aree geografiche diverse causati dal movimento illegale delle piante a partire dagli inizi del '900. Le nostre indagini mostrano chiaramente che gli isolati di CTV riscontrati in Italia appartengono sia a ceppi che si possono trovare nel Bacino del mediterraneo che a ceppi caratteristici degli Stati Uniti d'America e

del Giappone e quindi geograficamente molto distanti. Tutto questo fa escludere una diffusione primaria della malattia attraverso gli afidi che invece giocano un ruolo fondamentale dal momento in cui i nuovi ceppi vengono introdotti in Italia (Moreno, 2003). In particolare gli isolati riscontrati su satsuma Wase, alemow, nonché arancio dolce cv Shamouti, mandarino "Fortune" appartengono al gruppo degli isolati virulenti e quello riscontrato di recente su arancio dolce cv Tarocco appartiene al componente virulento "giallume dei semenzali". L'elevato numero di piante infette riscontrate negli ultimi anni soprattutto in pieno campo nonché la loro virulenza mettono a rischio l'agrumicoltura italiana.

#### LAVORI CITATI

- BAR-JOSEPH M., LEE R.F. 1989. Citrus Tristeza Virus. *AAB Descriptions of Plant Viruses* N° 353.
- BEIDLER L.L., HILLIARD P.R., RILL R.L. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemistry* 126: 374-380.
- CAMBRA M., MORENO P., 2000. Tristeza. In: Enfermedades de los cítricos, eds Duran-Vila, N., Moreno, P. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid., 77-81.
- CAMBRA M., GORRIS M.T., CAMARASA E., ROMAN M.P., NARVAEZ G., TERRADA M.E., MARTINEZ M.C., 1999. Inmunopresión-ELISA: Método ideal para detección del virus de la tristeza de los cítricos. *Agraria* 13, 4-14.
- DAVINO S., GUARDO M., SORRENTINO G., SAMBADE A., CARUSO A., DAVINO M., 2003. Il virus della "tristeza" degli agrumi su arancio dolce in Sicilia: grave minaccia per l'agrumicoltura italiana. *Informatore Fitopatologico*, 53, (12): 48-52.
- FEBRES V.J., PAPPU H.R., ANDERSON E.J., PAPPU S.S., LEE R.F., NIBLETT C.L. 1994. The diverged copy of the *Citrus tristeza virus* coat protein is expressed *in vivo*. *Virology*, 201: 178-81.
- KARASEV A.V., BOYKO V.P., GOWDA S., NIKOLAEVA O.V., HILF M.E., KOONIN E.V., NIBLETT C.L., CLINE K., GUMPF D.J., LEE R.F., GARNSEY S.M., LEWANDOWSKY D.J., DAWSON W.O. 1995. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, 208: 511-520.
- MARTELLI G.P., AGRANOYSKY A.A., BAR-JOSEPH M., BOSCIA D., CANDRESSE, T., COUTTS R.H.A., DOLJA V.V., DUFFUS J.E., FAILK B.W., GONSALVES D., JELKMANN W. KARASEV A.V., MINAFRA A., MURANT A., NAMBLA S., NIBLETT C.L., VETTEN H.J., YOSHIKAWA N. 2000. Family *Closteroviridae*. In: Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J. Mayo, M.K., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R.B., eds. Academic Press, San Diego, CA., U.S.A, 943-952.
- MORENO P. 2003. Situazione mondiale della "tristeza" e strategie adottate per il suo controllo. Atti Piano Agrumicolo Nazionale. Acireale 8-9 Aprile 2003 (in corso di stampa).
- ROISTACHER C.N., BAR-JOSEPH M. 1987. Transmission of *Citrus tristeza virus* (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and from *Passiflora* species. *Phytophylactica* 19: 179-182.
- SAMBADE A., LOPEZ C., RUBIO L., FLORES R., GUERRI J., MORENO P. 2003. Polymorphism of a specific region in gene *p23* of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch. Virol.*, 148, (12), 2325-2340.
- SEKIYA M.E., LAWRENCE S.D., McCAFFERY M., CLINE K. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequences of the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Journl of Gen. Virology*, 72:1013-1020.