



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE FITOSANITARIE

SEZ. PATOLOGIA VEGETALE

DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE FITOSANITARIE
XXII ciclo 2006-2010

GIUSEPPE NOBILE

Modificazioni del fenotipo e dell'espressione genica
in semenzali di arancio amaro inoculati con *Citrus tristeza virus*.

Tesi di Dottorato

COORDINATORE
Prof. Gabriella Cirvilleri

TUTOR
Prof. Antonino Catara

Dedicato alla mia Famiglia

Ringraziamenti

Ci corre l'obbligo di ringraziare ,in primo luogo, il nostro Tutor che virtuosamente ci ha guidato alla definizione delle problematiche oggetto dello studio rappresentato nell'elaborato.

La collaborazione con le professionalità e i laboratori del Parco Scientifico e Tecnologico della Sicilia hanno significativamente determinato i risultati scientifici ottenuti.

Un ringraziamento ulteriore a quanti ,comunque, con il loro contributo hanno agevolato la nostra ricerca.

INDICE

Riassunto.....	»	1
1 - Importanza economica degli agrumi	»	5
2 – Principali malattie degli agrumi.....	»	9
2.1 – Malattie da funghi e batteri.....	»	9
<i>2.1.1 Infezioni dell'apparato radicale e del colletto.....</i>	<i>»</i>	<i>9</i>
<i>2.1.2 Mal secco.....</i>	<i>»</i>	<i>11</i>
<i>2.1.3 Alternariosi dei frutti e delle foglie.....</i>	<i>»</i>	<i>12</i>
<i>2.1.4 Cancri gommosi del tronco e dei rami.....</i>	<i>»</i>	<i>12</i>
<i>2.1.5 Malattie minori delle foglie e dei frutti.....</i>	<i>»</i>	<i>12</i>
2.2 - Malattie da virus, viroidi e procarioti endogeni.....	»	14
<i>2.2.1 - Malattie da virus o attribuite a virus.....</i>	<i>»</i>	<i>15</i>
<i>2.2.2 - Malattie causate da viroidi.....</i>	<i>»</i>	<i>17</i>
<i>2.2.3 - Malattie da procarioti endogeni.....</i>	<i>»</i>	<i>17</i>
3 - La tristeza degli agrumi.....	»	20
3.1 - Origine ed incidenza.....	»	20
3.2 - Sintomatologia.....	»	22
3.3 - Pianta ospiti.....	»	24
3.4 - Agente causale.....	»	26
3.5 - Metodi per la caratterizzazione di CTV.....	»	29
<i>3.5.1 - Saggi su piante indicatrici.....</i>	<i>»</i>	<i>30</i>
<i>3.5.2 - Saggi sierologici.....</i>	<i>»</i>	<i>32</i>
<i>3.5.3 - Metodi molecolari.....</i>	<i>»</i>	<i>35</i>
<i>3.5.4 - Microarray.....</i>	<i>»</i>	<i>38</i>
3.6 - Metodi di differenziamento degli isolati del virus.....	»	39
3.7 - Modalità di trasmissione.....	»	42
3.8 - Metodi di contenimento della malattia.....	»	44
4 - Scopo del lavoro.....	»	46
5 – Rassegna della letteratura.....	»	49

6 - Materiali e metodi..... »	53
6.1 – Caratterizzazione fenotipica degli isolati di CTV..... »	53
6.2 – Analisi differenziale dell’espressione genica..... »	57
7 - Risultati.....»	64
7.1 – Rilevamento e caratterizzazione biologica..... »	64
7.2 – Caratterizzazione molecolare degli isolati..... »	67
7.3 – Analisi delle modificazioni dell’espressione genica mediante reverse Northern blot..... »	70
7.4 – Analisi della modulazione di alcuni geni via real time-PCR quantitativa..... »	72
7.5 – Analisi mediante Differential Display RT-PCR..... »	76
8 – Discussione dei risultati..... »	77
9 – Letteratura citata..... »	85

Riassunto

La tristeza degli agrumi, causata da *Citrus tristeza virus* (CTV) è uno dei fattori limitanti l'agrumicoltura mondiale. Nonostante il considerevole impegno della ricerca, le informazioni sulla caratterizzazione degli isolati del virus sono limitate ai geni principali. Ancora in fase preliminare sono anche gli studi sull'espressione genica a parte un recente lavoro su piante di lima messicana in risposta a due differenti ceppi di CTV.

Questo studio ha riguardato la risposta fenotipica di indicatori diverse, dopo inoculazione con un isolato virulento di CTV e le connesse modificazioni dell'espressione genica in arancio amaro, lima messicana, pompelmo Duncan, cedro Etrog e alemow. L'isolato utilizzato è stato selezionato nel corso di indagini preliminari. Dopo la caratterizzazione con test biologici su piante indicatori le analisi molecolari hanno permesso di concludere che si tratta di un isolato con un 99% di identità nucleotidica con alcuni ceppi del Sud America (BaraoB, Val-CB e C271-2), verosimilmente appartenente al biogrupo 4.

Le relazioni che il virus stabilisce con la pianta ospite sono state studiate attraverso una ricerca mirata ad accertare le modificazioni del profilo genico sulle piante sopra indicate inoculate sperimentalmente.

Allo scopo è stata utilizzata la tecnica del reverse northern blot con specifiche sonde, la real time e la tecnica espressione differenziale dell'RNA messaggero (DDRT-PCR).

Dopo una prima fase dedicata alla ricerca bibliografica sull'uso di tecniche molecolari per lo studio della modulazione genica in piante di agrumi, con riferimento a stress biotici e abiotici, sono state valutate le differenze tra piante di arancio amaro inoculate con l'isolato di CTV selezionato (SG29) e piante sane mediante reverse Northern blot, utilizzando sonde ricavate da una ricerca sulle infezioni di *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in piante di cedro Etrog. Successivamente mediante real time PCR quantitativa sono stati selezionati sette geni, risultati differenzialmente espressi in arancio amaro, al fine di valutarne la modulazione in

cinque specie di agrumi (arancio amaro, lima messicana, cedro, pompelmo e ale-mow) inoculati con CTV SG29. E' stata infine effettuata l'analisi differenziale dell'RNA messaggero in semenzali di arancio amaro inoculati con CTV SG29.

Le analisi real time PCR hanno messo in evidenza che nei semenzali di arancio amaro, il gene della metallotioneina (MT), il regolatore del silenziamento genico (rgs-CaM) e il gene COSTANS-like, risultavano sovra espressi; di contro l'espressione dell'EREBP e del gene della perossidasi (PRX) mostravano un differente comportamento risultando sotto espressi. I geni codificanti per l'alcool deidrogenasi (ADH) e la permeasi degli amminoacidi, risultavano essere rispettivamente sotto e sovra espressi, mentre i geni per l'ADH e per la PRX, coinvolti nella risposta generale ai fattori di stress, si mostravano sotto espressi in tutti gli ospiti saggiati. Viceversa, rgs-CaM, AP e CLP erano sotto espressi nel cedro Etrog, nel pompelmo e nell'arancio dolce e sovra espressi nell'arancio amaro. La sovra espressione dell'EREBP, era presente solamente nel cedro Etrog e nell'arancio dolce, mentre MT era indotto solo nell'arancio amaro e nell'arancio dolce.

Nella lima messicana, così come nei semenzali di arancio amaro, l'infezione di CTV ha indotto la sotto espressione di tutti i geni selezionati eccetto il gene rgs-CaM che risultava drasticamente sovra espresso. Dal momento che entrambi gli ospiti sono suscettibili a CTV SG29 e reagiscono con sintomi molto gravi, si ipotizza che l'azione dell'rgs-CaM come soppressore del silenziamento genico sia specie-specifico e che CTV induca fortemente la sua espressione nelle piante suscettibili, riuscendo ad evadere l'attività di silenziamento dell'RNA.

L'analisi differenziale (DDRT-PCR) ha permesso di individuare l'alterazione di altri 4 geni (up e down) a seguito dell'inoculazione con CTV. Due di essi mostrano una elevata omologia di sequenza con 2 diverse sequenze EST di *Citrus sinensis* la cui funzione risulta però sconosciuta, la terza è altamente omologa ad un retrotrasposone di *Arabidopsis thaliana*, il cui ruolo in condizioni di stress biotici e abiotici è largamente riportato in letteratura. L'ultimo trascritto, che risulta invece essere regolato negativamente, codifica per una proteina del ci-

tocromo P450.

The research concerns one of the most important limiting factor of the citriculture worldwide, the tristeza disease, caused by the *Citrus tristeza virus* (CTV). Despite the efforts made by the research many informations are still lacking, being available only some data concerning few genes. Still in a preliminary stage are the studies about the gene modulation after the infection, a part a recent paper on the Mexican lime response to infection by two CTV isolates. The study has investigated the phenotypic response of some indicators plants inoculated with a severe isolate of CTV and the gene expression modification connected. In sour orange, mexican lime, Duncan grapefruit, sweet orange and Etrog citron. The CTV isolate was selected during a preliminar survey, characterized with biological tests, as well with molecular analysis. According to the results the isolate has 99% identity with some strains of South America, nomely Barao B, Val-CB and C271-2, likely belonging to biogroup 4.

The relations between CTV and host plants have been investigated thought a study of the gene patterns of inoculated sour orange.

To this aim the reverse Northern blot with specific probes, the real time PCR and the differential display analysis of m-RNA, have been undertaken.

After a critical literature review on the molecular techniques used to study the gene modulation in citrus trees affected by biotic or abiotic stress, the differences between sour orange CTV infected or not, were evaluated by Reverse Northern Blot, using probes obtained in a previous research Etrog citron infected with *Citrus exocortis viroide* (CEVd).

Seven genes differently expressed in sour orange were selected to evaluate their modulation by reverse transcriptase quantitative real time PCR in five citrus species (sour orange, mexican lime, citron, grapefruit and alemow) inoculated with CTV SG29.

A messenger RNA differential display RT-PCR analysis (DDRT-PCR) of sour orange seedlings inoculated with the viral isolate CTV SG29 in comparison

with healthy controls, was also carried out for identifying further differentially expressed.

In sour orange seedlings, quantitative real time PCR revealed that genes codifying for metallothionein (MT), regulator of gene silencing–calmodulin-like protein (rgs-CaM) suppressor of RNA silencing, and CONSTANS-like (CLP) were up regulated, as observed in Northern blot analysis; in contrast, the expression of ethylene-responsive binding protein (EREBP) and peroxidase (PRX) genes showed a different behavior resulting down regulated. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aminoacid permease (AP) genes, not detected by Northern, resulted to be down and up regulated, respectively. ADH and PRX genes, involved in general response to stress factors, exhibited the same pattern of expression (down regulation) in all citrus hosts tested. On the contrary, rgs-CaM, AP and CLP were down regulated in Etrog citron, grapefruit and sweet orange and over expressed in sour orange. Up regulation of EREBP occurred only in Etrog citron and in sweet orange, whereas MT is induced only in sour orange and sweet orange. Interestingly, CTV infection in Mexican lime as well as on sour orange seedling induced the down regulation of all the selected genes, but the rgs-CaM was drastically over expressed. Since both hosts are susceptible to CTV S29 and showed very severe symptoms, the hypothesis is advanced that rgs-CaM may act as host specific RNA silencing suppressor and CTV strongly induces its expression in susceptible plants, evading RNA silencing activity.

Four new transcripts were identified in the first fingerprints obtained. Three of them are positive regulated in response to CTV infection, two show high sequence similarity with two different EST of *Citrus sinensis*, whose biological function is unknown, the third one shows sequence similarity with a retrotransposon of *Arabidopsis thaliana*, whose role under conditions of biotic and abiotic stress is largely reported in literature. The last transcript, which is negatively regulated, encodes a protein belonging to the family of cytochrome P 450.

1. Importanza economica degli agrumi

Con il termine agrumi si identifica l'insieme di specie appartenenti ai generi *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* della famiglia delle *Rutaceae*, subfamiglia *Aurantioideae*. Sin dalla notte dei tempi essi accompagnano l'uomo con riferimenti alimentari, di poesia, letteratura, usanze e ricordi, insomma di evoluzione culturale legata, in molti casi, da un filo invisibile con la vita umana.

Le prime memorie risalgono all'imperatore Ta Yu della regione di An-Yang (2205- 2197 A.C. circa) che riceveva gli agrumi come doveroso tributo dal lontano Yangchou¹. Alla corte dell'imperatore Han Wu Ti un dignitario, detto Chu Kuan Chang, era adibito al controllo dei tributi in Kan, ovvero mandarini di grossa taglia, che raggiunse l'apice della coltivazione durante la dinastia Tang (dal 618 al 907 D.C.).

La prima testimonianza scritta dell'esistenza degli agrumi in Cina si ha nel diario della missione di Vasco De Gama in oriente compiuta nel XIV secolo: *"sonvi melancrie assai, ma tutte dolci"*². Nel 1520 Valmont De Bomare riporta dell'esistenza di un albero di arancio direttamente importato dalla Cina nella corte di San Lorenzo a Lisbona.

Secondo Gallesio l'introduzione di questi frutti, in Italia, è dovuta ai Genovesi avendo essi sviluppato traffici commerciali dal mar Tirreno al mar Nero, all'Estremo Oriente. L'ipotesi è supportata dal fatto che nel resoconto del viaggio di Marco Polo (seconda metà del 1200), non vi sono notizie relative agli agrumi. Altre teorie, attribuiscono agli Arabi il merito dell'introduzione in Europa degli agrumi.

Certo è che nel 1523 gli agrumi erano già diffusi in Italia, come si evince nelle "note del viaggio" di Leandro Alberti: *"Descrittione di tutta l'Italia et isole*

¹ Corrispondente all'area geografica compresa fra le attuali province di Kiangsu, Anhwei e Kiangsi.

² Supporta questa ipotesi il fatto che l'arancio comune o dolce venne nominato Portogallo, nome dialettale ancora in voga in Sicilia e in Calabria (in dialetto calabrese *"Purtuallu"*). Altri riferimenti possono essere le *portogalliere* liguri e il termine greco *portogalea*, riferito sempre alle arance.

pertinenti ad essa”, che fanno esplicito richiamo all’arancio in alcune località della Calabria e della Sicilia. Col passare degli anni, altri agrumi, come il bergamotto, il pompelmo, il mandarino mediterraneo, i tangerini, il clementino e il mandarancio si diffusero in Occidente, inizialmente mediante il movimento dei semi. Il movimento di piante e gemme diventò particolarmente intenso a partire dal XVIII secolo, dovuto al crescente interesse per gli agrumi, sia dal punto di vista botanico che dal punto di vista commerciale. Questa fu anche la principale via di disseminazione di patogeni da una zona all’altra.

Attualmente la coltivazione degli agrumi interessa la maggior parte della regione tropicale e sub-tropicale del mondo, compresa fra i paralleli 40° Nord e 40° Sud. Nel 2008 la superficie mondiale, ha raggiunto i 1.094.229 Ha, mostrando un significativo aumento (+ 2,6% rispetto al 2004, pari a 1.066.315 Ha). La produzione complessiva si attesta sui 7.452.302 t (Faostat, 2010).

Nel 2008 i Paesi Europei che si affacciano sul **Mediterraneo** hanno prodotto poco più di 11.000.000 di t (7% meno rispetto al 2006). Ottima la performance dell’Italia che, nel 2008, ha prodotto 250.000 t di agrumi in più, vale a dire il 19% in più rispetto al 2006. Negli altri paesi del Mediterraneo si nota la crescita dell’Egitto (+2% nel triennio 2006-2008), il notevole decremento della Spagna che, pur confermandosi come primo produttore, ha visto una riduzione pari al 13% e del Marocco che ha visto un calo del 3,3%.

Disaggregando **l’analisi per specie**, l’arancio risulta la specie più importante, esprimendo il 57% dell’offerta agrumicola totale (Ismea, 2005). I più importanti produttori europei sono la Spagna e l’Italia.

L’importanza economica del segmento per il nostro Paese assume un significato maggiore se si considera che oltre l’80% della produzione nazionale è circoscritta nel Mezzogiorno³. Nel dettaglio, in questa area geografica, le superfici investite ad arancio nel 2009 sono state pari a 101.222 Ha per una produzione to-

tale di 2.477.139 t seguito da clementine 697.792 t (su una superficie di 29.011 Ha), limone 567.084 t (su 29.996 Ha) e mandarino 144.979 t (su 9.435 Ha) (Istat, 2009)⁴.

La Sicilia, con una produzione di arance pari a 1.249.290 t, rappresenta il maggior polo produttivo italiano ed una delle principali realtà nel panorama europeo (Istat, 2009). La provincia con la più alta produzione è Catania con 550.000 t seguita da Siracusa con 370.000 t (Istat, 2009). L'arancio dolce interessa circa il 61% della superficie coltivata (in massima parte a polpa pigmentata, con diversi cloni di Tarocco), seguono il limone (20%) e il clementine (18%) mentre altre specie (pompelmo, bergamotto e cedro) rappresentano l'1%.

Tabella 1 - Superficie (ettari) e produzione (quintali): arancio, mandarino, clementine, limone. Dettaglio per regione (Rilevazione maggio 2010)

Regioni	Arancio		Mandarino		Clementine		Limone	
	Superficie Ha	Produzione t	Superficie Ha	Produzione t	Superficie Ha	Produzione t	Superficie Ha	Produzione t
Abruzzo	4	45	-	-	-	-	-	-
Campania	1.235	26.064	584	11.306	407	8.314	1.157	23.530
Puglia	6.156	162.945	118	2.180	60	92.163	276	4.150
Basilicata	5.845	116.747	37	550	2.125	30.792	52	963
Calabria	22.340	859.702	1.953	48.216	17.319	497.484	1.373	35.400
Sicilia	59.950	1.249.290	5.976	74.853	3.440	59.932	26.531	497.090
Sardegna	5.692	62.345	767	7.874	960	9.107	607	5.951
	101.222	2.477.139	9.435	144.979	29.011	697.792	29.996	567.084

(Fonte ISTAT, 2009)

Dal punto di vista varietale il gruppo più consistente comprende le **arance pigmentate**; seguono le **ombelicate** e per ultimo le **bionde**, prevalentemente **Va-**

lencia, mentre altre selezioni bionde rivestono importanza limitata, per **mercati di nicchia (Biondo di San Giuseppe)** o per mercati locali.

La coltivazione delle arance **pigmentate**, è localizzata principalmente nella Sicilia orientale⁵, dove le caratteristiche climatiche consentono di ottenere una buona espressione di antocianine e un buon rapporto zuccheri/acidi. La cultivar più diffusa è il **Tarocco** che ha preso il sopravvento, a scapito del **Moro, Sangui-nello e altre minori**, anche perché la selezione clonale ha consentito l'isolamento di genotipi, che si differenziano per epoca di maturazione, contenuto in antociani-na della polpa, consistenza del frutto e persistenza sulla pianta (Calabrese, 2009). Fra esse sono alcune selezioni tardive come **Messina, Misterbianco e Meli**.

Tra le arance a polpa bionda risultano interessanti alcune selezioni tardive di navel (**Navelate e Lanelate**) per le migliori caratteristiche dei frutti rispetto alle **Valencia e Ovale**, nonché per la plasticità di adattamento ai vari ambienti pedo-climatici, peraltro comune a tutte le selezioni di navel.

Di rilievo è anche la produzione annua di piante ornamentali, circa 2.500.000 piante (50% limone, 15% kumquat, 16% calamondino, 7% chinotto, 12% altre specie, quali limoni cedrati, lime, arancio dolce, mandarini e pompelmi).

Se si esclude il settore ornamentale, dove vengono utilizzati diversi portainnesti, si può affermare che la quasi totalità degli agrumi italiani (98%) sono innestati su arancio amaro. Gli altri portainnesti, utilizzati in maniera minore, sono citrange, citrumelo, arancio trifogliato ed alemow.

⁵ Principalmente alcuni comuni delle province di Catania, Siracusa, Enna.

2. Principali malattie degli agrumi

Gli agrumi sono suscettibili a numerosi agenti di stress biotici e abiotici, alcuni dei quali responsabili di deperimenti e perdita della capacità produttiva. I più dannosi sono gli agenti biotici trasmissibili per innesto (virus, viroidi e procariot endogeni) in quanto, essendo intimamente associati con il materiale vegetativo, si propagano assieme ad esso. Non meno gravi sono altre malattie da funghi e batteri, la cui rilevanza varia con le combinazioni d'innesto, le condizioni pedoclimatiche e le pratiche colturali (Catara e Rizza, 2009; Rizza e Catara, 2009).

2.1 Malattie da funghi e batteri

2.1.1 Infezioni dell'apparato radicale e del colletto

Marciumi da Phytophthorae spp.: Il genere *Phytophthora* è incluso nell'elenco degli organismi nocivi che interessano la qualità, di cui è richiesta l'assenza di sintomi in vivaio.

Indagini effettuate in vari paesi mostrano che nelle aree tropicali le infestazioni da *Phytophthorae* possono interessare il 20% delle superficie agrumetata. Ciò è comprensibile ove si tenga conto che spesso i terreni agrumetati sono di medio impasto o tendenzialmente pesanti e che l'evoluzione della tecnica colturale verso nuove forme di allevamento, di gestione del terreno e di irrigazione, crea condizioni favorevoli alle infezioni.

La suscettibilità delle diverse specie di agrumi nei confronti di *Phytophthora* spp. è molto varia anche a livello di selezioni o cloni ed è influenzata dalla combinazione di innesto. Gli agrumi si distinguono in molto suscettibili (limone ed alcune selezioni di citrange), a suscettibilità intermedia (arancio dolce, limetta, tangelo Sampson, rough lemon, limone volkameriano, pompelmo, mandarino, etc...) e resistenti (limone Ichang, *C. macrophylla*, arancio amaro ed alcune selezioni di *Poncirus*).

Essenzialmente due sono i quadri sintomatologici associati a *Phytophthora* spp.:

La gommosi del colletto e il marciume delle radici. La prima causata per lo più da *P. citrophthora*, riconoscibile per la presenza di necrosi e cancri e la cui evoluzione è variabile con il portainnesto, la combinazione e l'altezza dell'innesto e l'andamento climatico;

Il marciume delle radici da *P. nicotianae*, è favorito da condizioni di stress della pianta e di saturazione idrica del terreno e attacca preferibilmente il limone volkameriano ed il mandarino Cleopatra.

Altre malattie dell'apparato radicale sono:

Il Marciume secco delle radici associato ad infezioni di *Fusarium* spp., ad habitus tellurico ed in particolar modo a *F. solani*, patogeni tipicamente opportunisti che si insediano in piante debilitate da stress di natura biotica ed abiotica. Tra i portinnesti suscettibili ricordiamo i citrange, l'alemow, il citrumelo e l'arancio trifogliato. I sintomi si osservano su piante di 7-15 anni e consistono in nervature ingiallite, clorosi, filloptosi e disseccamento dei rametti e dei frutti. Tutti i sintomi che provocano una perdita di funzionalità dell'apparato radicale, generano una riduzione di sviluppo talvolta accentuato. Segue un lento deperimento che può protrarsi per alcuni anni finché, alla ripresa vegetativa, le piante collassano improvvisamente. Già nei primi stadi la malattia induce la produzione di fioriture ritardate con conseguente peggioramento della qualità dei frutti. La malattia si distingue dal marciume da *Phytophthora* per l'assenza di gommosi e per l'alterazione del cilindro legnoso.

Il Marciume fibroso da Armillaria, si può osservare anche in terreni sciolti specialmente nel caso di impianti che seguono coltivazioni di castagno, vite o drupacee. I sintomi fogliari, simili a quelli causati da altri patogeni radicali, consi-

stono in decolorazioni delle nervature primarie e secondarie, clorosi della lamina, filloptosi e disseccamento dei rametti a partire da quelli più giovani. A differenza degli altri marciumi non si ha presenza di gomma nei tessuti, mentre sono presenti rizomorfe di colore bianco o bruno all'interno degli strati corticali e fra legno e corteccia.

2.1.2 *Mal secco*

E' una malattia particolarmente dannosa poichè interessa il sistema vascolare, il cui agente eziologico è il Deuteromicete *Phoma tracheiphila*. Il fungo è potenzialmente capace di infettare, oltre che specie del genere *Citrus*, anche *Poncirus*, *Severinia* e *Fortunella*, nonché ibridi interspecifici e intergenerici. Nelle condizioni di campo, tuttavia, le specie di agrumi più suscettibili sono il limone e l'arancio amaro.

Il fungo penetra attraverso le ferite e colonizza lo xilema inducendo ingiallimento delle nervature e clorosi generalizzata a partire dalle foglie apicali, filloptosi o avvizzimento repentino delle foglie, e disseccamento dei rami e dell'intera pianta. Negli strati più esterni del parenchima corticale il parassita differenzia un ifenchima lasso su cui si sviluppano le fruttificazioni picnidiche. I picnidi si presentano sottoforma di corpuscoli neri disposti generalmente lungo linee longitudinali parallele all'asse del ramo.

Un elemento diagnostico utile per il riconoscimento della malattia è la colorazione rosa-salmone che assumono i tessuti legnosi infetti, rilevabile asportando la corteccia, o sezionando questi organi trasversalmente.

Nelle infezioni radicali, il patogeno, normalmente rimane relegato nei vasi xilematici più interni, dando luogo ad una particolare sindrome conosciuta con il nome di "*mal nero*", per la colorazione nero seppia che assume il legno. Nel caso in cui il fungo raggiunge gli strati esterni del legno, si ha un improvviso collasso della chioma ("*mal fulminante*").

2.1.3 Alternariosi dei frutti e delle foglie

Nota da tempo in aree agrumicole tropicali, la malattia, causata da *Alternaria alternata* pv. *citri*, ha assunto importanza anche in ambiente mediterraneo. Attacca principalmente il mandarino Dancy e i suoi ibridi, ma anche il pompelmo e l'arancio dolce. I primi sintomi si manifestano già sulle foglie in fase di sviluppo, interessando i margini del lembo con macchie brunastre di varia dimensione circondate da un alone clorotico, che provocano la distorsione della pagina fogliare. Nei casi più gravi si può avere filloptosi e cascola dei frutticini. Sui frutti si riscontrano macchie decolorate che evolvono in macchie brune necrotiche.

2.1.4 Cancri gommosi del tronco e dei rami

Sono principalmente causati dalle specie fungine *Dothiorella ribis* e *Phomopsis citri*. Le infezioni si riscontrano più frequentemente su piante adulte di limone, in particolar modo in ambienti umidi, e possono causare danni di un certo rilievo se trascurati. La malattia in genere si manifesta sul tronco, sopra il punto di innesto, ed il primo sintomo consiste nella comparsa sulla corteccia di una macchia d'umido, la quale fessurandosi, emette un essudato gommoso abbondante e fluido. Sotto la corteccia si ha la formazione di una caratteristica sacca gommosa che interessa anche le cerchie esterne del legno.

2.1.5 Malattie minori delle foglie e dei frutti

Numerose sono le malattie delle foglie e dei frutti, che in condizioni sfavorevoli, possono causare danni rilevanti.

Muffa grigia, è causata da *Botrytis cinerea*, un fungo altamente polifago che in condizioni ambientali favorevoli attacca fiori, frutti, rametti e foglie. In condizioni di elevata umidità ambientale le infezioni sono facilmente riconoscibili per la presenza sugli organi colpiti di micelio di colore grigio.

Intumescenze gommose, si manifesta con caratteristiche maculature brune irregolarmente distribuite sulla pagina fogliare inferiore e più frequenti lungo il margine della lamina e le nervature principali. La malattia accertata su arancio dolce, limone e pompelmo, in diverse aree della Sicilia e della Calabria, si manifesta dall'inizio dell'estate e assume proporzioni vistose in autunno allorché le foglie interessate cadono (Grasso e Catara, 1982). Recenti ricerche lasciano ritenere che la malattia sia causata da *Mycosphaerella* spp.

Septoriosi. Causata da numerose specie di *Septoria*, tra le quali riveste maggiore importanza *S. citri*. Le specie più suscettibili risultano limone e pompelmo dove sulle foglie si osservano macchie brune di forma irregolare con un alone giallo. In seguito la zona centrale diventa necrotica e assume colorazione marrone-chiaro e nei tessuti necrosati si sviluppano i picnidi. La prematura filloptosi costituisce il danno più grave delle infezioni fogliari mentre sui frutti invaiati si osservano piccole aree depresse necrotiche.

Antracnosi. Causata da *Colletotrichum gloeosporioides*, l'antracnosi si manifesta con aree di tessuti disseccati e fruttificazioni rotondegianti in cerchie concentriche sui rametti fortemente debilitati per altre infezioni.

Piticchia batterica. E' causata dal batterio *Pseudomonas syringae* che si manifesta con la comparsa di aree depresse sui frutti, di aree bruno-rossastre o brune sulle foglie e sui rametti, seguiti da filloptosi e disseccamenti della porzione distale.

Marciume bruno o allupatura. Tale alterazione interessa i frutti a maturazione autunno-vernina, sia sull'albero, sia durante le fasi di lavorazione, di conservazione e di trasporto. Gli agenti eziologici sono rappresentati da numerose specie di *Phytophthora* che vivono nel suolo, tra cui *P. citrophthora*, *P. cactorum*, *P. syringae* e *P. hibernalis*. Se bene i limoni sono più suscettibili, anche gli

altri agrumi possono essere gravemente danneggiati, specie a maturazione. I sintomi consistono in una colorazione oliva, o bruno-verdastra della superficie infetta che diventa di tonalità più scura nelle fasi avanzate ed emana un'intenso odore di rancido o fermentato. In condizioni di elevata umidità si ha la comparsa di una muffa bianca evanescente.

2.2 Malattia da virus, viroidi e procarioti endogeni

Un tempo tutte le malattie trasmissibili per parti vegetative o con porzioni di tessuto infetto erano denominate “virosi”. Oggi sappiamo che alcune di esse hanno eziologia virale sperimentalmente dimostrata, altre sono causate da viroidi, batteri e fitoplasmi; una restante parte continua ad essere ad eziologia sconosciuta.

Molte malattie trasmissibili per innesto sono presenti nella maggior parte delle zone agrumicole del mondo, mentre altre sono limitate ad un solo paese o ad una sola zona biogeografica. Alcune di esse si propagano unicamente con l'utilizzo di materiale vegetale infetto, mentre altre possono trasmettersi meccanicamente con gli attrezzi da lavoro o mediante vettori e questo fa sì che la loro incidenza aumenti molto rapidamente ed il controllo risulti molto difficile.

Nell'area del Mediterraneo sono presenti numerose malattie da virus, viroidi e procarioti il cui potenziale di rischio non è stato ancora esplorato adeguatamente o è mascherato dal loro confinamento in ambienti e/o ospiti limitati. Il rispetto delle norme fitosanitarie assume carattere irrinunciabile per evitare rischi non gestibili qualora i patogeni dovessero essere introdotti nel nostro Paese.

Per effetto dell'intenso lavoro di ricognizione e di selezione sanitaria e delle norme che disciplinano il settore vivaistico, nell'ultimo decennio il quadro delle malattie da virus e viroidi degli agrumi ha subito un profondo mutamento, presentandosi oggi ben diverso dal passato. Il prezioso lavoro svolto, seppure ancora suscettibile di miglioramenti, ha consentito infatti di rimuovere alcune malattie un tempo frequenti nei nostri agrumeti, delle quali si forniscono brevi cenni.

2.2.1 Malattie da virus o attribuite a virus

Variegatura infettiva. E' causata da un virus multicomponentiale di forma icosaedrica (*Citrus variegation virus*, CVV) che induce una vistosa bollosità fogliare associata a clorosi, con deformazione della lamina fogliare che appare molto stretta e allungata, con margine irregolare. Le giovani foglie sono spesso curve all'estremità (foglie a barca) o possono presentare una minuta macchiatura clorotica a punta di spillo. I frutti si presentano piccoli, rugosi, bitorzoluti e malformati. I sintomi sono più frequenti su limone ma si riscontrano anche su arancio amaro, arancio dolce, limetta dolce, pompelmo e cedro Etrog. Tali sintomi possono essere mascherati dalle alte temperature.

Psorosi. L'agente causale della malattia è un ofiovirus (*Citrus psorosis virus*, CPsV) che induce sulle piante infette marcate bandature perinervali delle foglie giovani, più evidenti a luce indiretta e sulle foglie meno esposte al sole. Tali sintomi non assumono valore diagnostico specifico essendo associati ad altre malattie virali, quali impietratura, cristacortis, concavità gommose e a sacche. Il tronco e i rami presentano dei lembi di corteccia che tendono ad arrotolarsi verso il centro e a distaccarsi, lasciando scoperti i tessuti sottostanti ancora verdi. In presenza di infezioni in atto già da qualche anno segue un deperimento progressivo che porta alla morte della pianta. L'arancio amaro, le specie del gruppo limone, l'arancio trifogliato e i citrange non mostrano sintomi corticali, mentre l'arancio trifogliato e l'yuzu non mostrano sintomi fogliari.

Citrus leaf blotch (CLBV). E' responsabile di disaffinità su clementine Nules, e arancio Navelina e Navelate su arancio trifogliato e su calamondino e kumquat Nagami su citrange Troyer (Guardo *et al.*, 2007). CLBV, si trasmette per innesto e, unico virus degli agrumi, per seme. Tale aspetto lo rende meritevole di particolare attenzione anche nei programmi di certificazione.

Concavità gommosa e a sacche. Con questo nome si indicano malformazioni dei rami caratterizzate da depressioni ampie, con bordi a losanga (concavità gommosa) o allungati (concavità a sacca) che interessano sia il legno che la corteccia del tronco e dei rami principali. Talvolta tali depressioni possono fessurarsi lasciando fuoriuscire la gomma accumulata. Le foglie giovani possono presentare una caratteristica bandatura perinervale “a foglia di quercia” utile a fini diagnostici. Le specie più suscettibili a tali infezioni sono arancio dolce, mandarino e tangelo. Arancio amaro, limone e arancio trifogliato sono asintomatici, ancorchè ospiti dell’agente della malattia (portatori muti).

Cristacortis. Ampiamente diffusa nel passato in tutta l’area del Mediterraneo, determina creste sulla faccia cambiale della corteccia su tronchi e rami di varie specie di agrumi a causa della disorganizzazione del cambio in zone diffuse. A seguito dell’accrescimento radiale, le depressioni verticali che si hanno dalla disorganizzazione del cambio, scompaiono ricoperte da cerchie legnose normali e si riformano in altri siti. Sono ospiti asintomatici limone, limetta messicana, cedro, bergamotto, arancio trifogliato e citrange.

Impietratura. Il nome deriva dalla consistenza che assumono i frutti, duri come pietre, altri sintomi sono cascola e/o pezzatura ridotta dei frutti, piccole aree depresse e clorotiche sulla buccia, foglie con scolorazioni perinervali del tipo psorosi. I frutti affetti si riconoscono quando raggiungono 1,5-2 cm di diametro, per un alone che circonda una piccola area indurita con ghiandole oleifere imbrunite, a volte accompagnate da emissione di gomma.

Maculatura anulare. La malattia si presenta su varie cultivar di agrumi con macchie clorotiche o anelli di colore verde chiaro su foglie, su frutti e sulla corteccia di giovani germogli che sono talvolta associati a desquamazione della corteccia del tronco e dei rami.

2.2.2 Malattie causate da viroidi

Exocortite. E' causata da *Citrus exocortis viroid* (CEVd) che determina su arancio trifogliato, lima di Rangpur, lima di Tahiti e limetta messicana fessurazioni longitudinali e desquamazioni della corteccia alla base del tronco e riduzione della taglia variabile in rapporto alle combinazioni di innesto, alle condizioni ambientali e all'aggressività dell'isolato (Catara *et al.*, 2008). La patogenicità nei confronti degli ibridi di arancio trifogliato è oggi messa in discussione dalle nuove conoscenze sui viroidi e da esperienze di campo prolungate negli anni (Rizza *et al.*, 2007).

Cachessia. Malattia caratterizzata da formazione di gomma nella corteccia e alveolature nel legno di piante di mandarino e su ibridi, come tangelo e tangor, e su clementine. L'agente eziologico è stato recentemente identificato in una variante del viroide del luppolo (*Hop stunt viroid*, HSVd) e classificato come CVd IIb e CVd IIc nel catalogo dei viroidi degli agrumi.

Citrus dwarfing viroid (CDVd). Si tratta di un viroide che infetta solo il genere *Citrus*, causando esclusivamente riduzione della taglia nelle combinazioni di innesto su arancio trifogliato. Poiché non induce alcun effetto negativo sulla produzione (Verniere *et al.*, 2004), viene utilizzato in alcuni paesi per ridurre la taglia delle piante innestate su arancio o citrange per impianti ad alta densità.

2.2.3 Malattie da procarioti endogeni

Huanglongbing (HLB) o “*greening*”. Questa malattia rappresenta la più grave minaccia per l'agrumicoltura mondiale. Dopo aver decimato gli agrumeti del sud-est asiatico e del Sud Africa, sta mettendo in ginocchio l'agrumicoltura in Florida e Brasile. Non è presente nell'area del Mediterraneo. Le piante infette mostrano foglie di colore giallo o con maculature clorotiche, ingiallimento di tutta la

chioma, defogliazione e disseccamento dei rami. I frutti sono piccoli, ovali e di colore verde persistente (da qui il nome greening), con semi abortiti e di gusto amaro.

L'agente eziologico è un batterio floematico, non coltivabile *in vitro* di cui si conoscono tre specie: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus*; infetta tutte le specie e cultivar di *Citrus*, gli ibridi e alcune specie correlate, in modo particolare arancio dolce, mandarino e suoi ibridi. La trasmissione avviene per innesto e mediante due psillidi (*Trioza erytreae* e *Diaphorina citri*).

Variegatura clorotica. Rappresenta oggi uno dei fattori maggiormente limitanti la coltivazione dell'arancio dolce in Sud America. Non è presente nell'area del mediterraneo. I sintomi principali sono a carico delle foglie che presentano clorosi internervali e macchie brune nella pagina inferiore da cui il nome (*Citrus variegated chlorosis*, CVC). Le piante si presentano di taglia ridotta con frutti di pezzatura inferiore, duri e acidi ed invaiano precocemente. L'agente eziologico è *Xylella fastidiosa*, batterio strettamente floematico.

Stubborn. E' una malattia diffusa in zone a clima caldo secco tra cui Nord Africa, est del Bacino del Mediterraneo e Medio Oriente. L'agente della malattia è *Spiroplasma citri*, un mollicute elicoidale coltivabile *in vitro* e trasmesso per innesto. La diffusione di questo patogeno avviene ad opera di cicaline (*Circulifer haematoceps* e *C. tenellus*). Le piante infette hanno taglia ridotta, internodi accorciati, foglie ispessite ripiegate a coppa e con clorosi simili a carenze nutrizionali, fioriture regolari, frutti fuori stagione, con ritardo di colorazione nell'estremità stilare ed aborto dei semi.

Scopazzi. E' una grave malattia delle limette, presente in Omar, negli Emirati Arabi e in Iran, causata da *Ca. Phytoplasma aurantifolia*, trasmissibile per innesto e verosimilmente tramite *Hishimonus phycitis*. Il sintomo principale è dato

da foglie molto piccole che disseccano. Dopo 4-5 anni le piante arrivano alla morte.

3. La tristezza degli agrumi

3.1 Origine ed incidenza

La tristezza è la malattia degli agrumi di maggior interesse economico mondiale, avendo causato la morte di oltre 85 milioni di alberi di arancio dolce, mandarino e pompelmo innestati su arancio amaro. L'agente causale è il *Citrus tristeza closterovirus* (CTV), probabilmente apparso nelle zone autoctone degli agrumi del sud-est asiatico, nell'arcipelago malese, e propagatosi successivamente in tutte le principali aree agrumicole del mondo mediante il movimento incontrollato di piante e marze. E' egualmente probabile che gli agrumicoltori di quelle zone d'origine utilizzassero semi e varietà o combinazioni d'innesto tolleranti, quali piante innestate su arancio trifogliato e quindi i danni causati dal virus fossero minori di quelli rilevati in altre zone agrumicole col passaggio a varietà o combinazioni più sensibili.

L'utilizzazione generalizzata dell'arancio amaro come portinnesto degli agrumi al fine di evitare il diffondersi dei marciumi del colletto e delle radici causate da funghi del genere *Phytophthora*, procurò molti danni in numerose aree agrumicole del mondo. In Sud Africa e Australia si osservò che alcune varietà vegetavano bene se innestate su limone rugoso o arancio trifogliato, ma deperivano in tempi brevi quando si propagavano su arancio amaro. In Brasile e Argentina, alla fine degli anni '30 la malattia si manifestò in forma epidemica causando la morte delle piante su portinnesto arancio amaro. Questo quadro sintomatologico prese il nome di "*podridao das radicillas*" in Argentina (Speroni e Frezzi, 1939) e "tristeza" in Brasile. Da quell'avvenimento, fino a tempi più recenti, sono state registrate numerose epidemie similari in diversi paesi agrumicoli come: California (1939), Florida (1951), Spagna (1957), Israele (1970), Venezuela (1980), Cuba e Cipro (1992). Dal 2001 sono stati segnalati focolai molto consistenti anche in Italia (Davino *et al.*, 2004).

Parallelamente all'epidemia degli agrumi propagati su arancio amaro, in Ghana si riscontrava un'altra malattia denominata "*malattia della lima*" (Hughes e Lister, 1949) e in Sud Africa la malattia della "*butteratura del legno del pompelmo*". L'inoculazione su lima messicana ha permesso di evidenziare come il deperimento nell'arancio amaro, la malattia della lima e la butteratura del legno erano manifestazioni distinte del medesimo agente patogeno.

Oggi il virus della tristezza è endemico nella maggior parte dell'Asia, Australia, Africa del Sud, e gran parte del Sud America, inoltre ha una incidenza elevata nelle principali zone agrumicole degli Stati Uniti (California e Florida), Israele e Spagna e in vari paesi dell'America Centrale come Panama, Costa Rica, Repubblica Domenicana, Giamaica e Cuba. Focolai isolati sono stati accertati anche in vari altri paesi del mediterraneo e Oriente come Albania, Algeria, Cipro, Egitto, Francia, Grecia, Italia, Giordania, Libano, Libia, Marocco, Palestina, Portogallo, Siria, Tunisia e Turchia (fig. 1). Altri focolai sono stati individuati anche in Belize, Cile, Ecuador, El Salvador, Honduras, Messico e Nicaragua (Cambra e Moreno, 2000). Nell'area del mediterraneo la malattia è nota da più di 50 anni, in particolare modo su piante importate o ottenute da materiale di propagazione introdotto da altri paesi.

In Italia è stata segnalata per la prima volta oltre 50 anni fa, e poi numerose altre volte, sempre su piante o materiale di propagazione introdotti da altri Paesi (Catara e Davino, 2006). Inadeguate, non coordinate e intempestive sono risultate le misure preventive messe in atto. Le indagini di questo ultimo quinquennio mostrano che CTV è ormai diffuso in quasi tutte le aree agrumicole, con incidenza variabile (0,005% in alcune aree e 64% in altre), con esiti esiziali allorché le piante sono innestate su arancio amaro (Catara *et al.*, 2008).

In Spagna, paese simile all'Italia per clima e situazioni ambientali, il virus della tristezza degli agrumi ha causato la morte di circa 40 milioni di alberi innestati su arancio amaro ed ha obbligato gli agrumicoltori a sostituire il portinnesto arancio amaro con altri tolleranti a CTV.

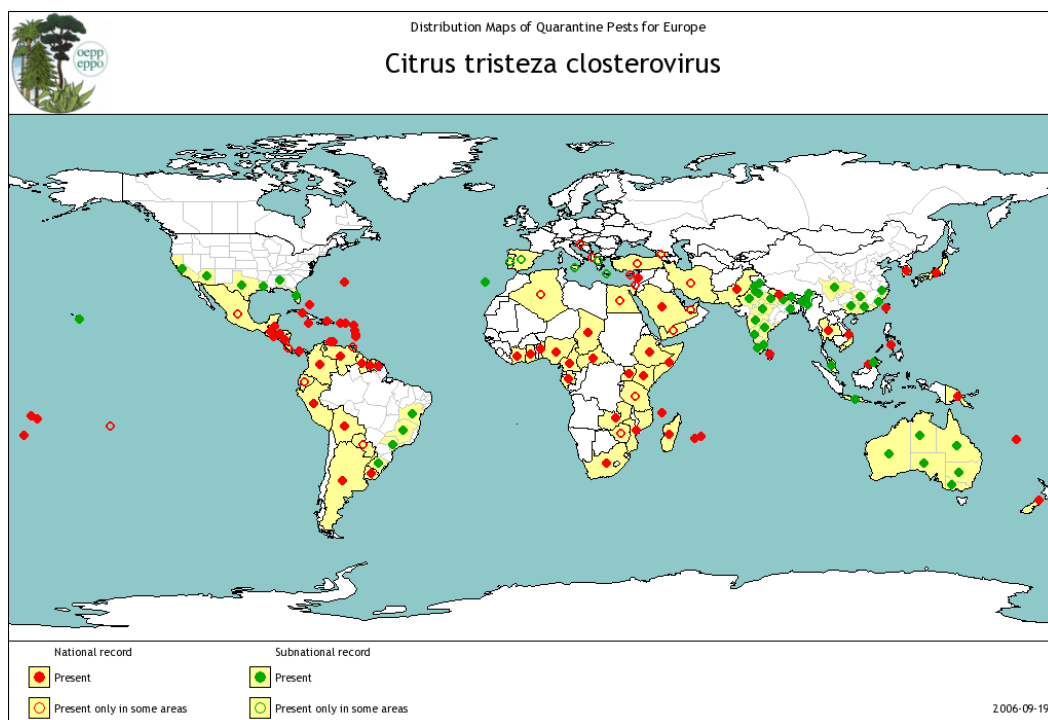


Figura 1. Mappa di distribuzione di *Citrus tristeza closterovirus* CTV nel mondo.

3.2 Sintomatologia

Le piante infette mostrano sintomi variabili con la virulenza del ceppo, la suscettibilità dell'ospite, la combinazione nesto/portainnesto, le condizioni climatiche, etc. Il mascheramento dei sintomi negli ospiti non suscettibili rappresenta un fattore di rischio nell'efficacia dell'intercettazione delle infezioni e nella lotta al virus. Il deperimento è causato da necrosi del floema, appena al di sotto della linea d'innesto, riduzione del flusso dei carboidrati dalla chioma alle radici, mancata emissione di peli radicali e progressivo deperimento della chioma. Gli effetti negativi sulla produzione rendono necessaria la sostituzione delle piante già dopo poco tempo la comparsa dei sintomi. I sintomi di deperimento delle piante innestate su arancio amaro in numerose zone agrumicole sono stati sicuramente quelli che hanno ispirato il nome della malattia (tristeza) e successivamente del virus.

Questa sindrome è riscontrabile su tutte le specie coltivate e ibridi innestati su arancio amaro.

Il deperimento è prodotto dalla morte delle cellule del floema dell'arancio amaro e dal conseguente blocco dei tubi conduttori della linfa elaborata, che causa la morte progressiva delle radici, e una condizione di deficit di acqua e sali minerali nella chioma. Da qui i sintomi di perdita di foglie, seccume dei rami ed ingiallimento.

Gli isolati vengono definiti in base ai sintomi che inducono:

”*stem-pitting*”, se in grado di indurre sintomi di butteratura o altre alterazioni del legno, su limette, arancio dolce e pompelmo Duncan;

”*seedling yellows*”, se inducono accentuati giallumi per lo più in condizioni sperimentali, su semenzali di arancio amaro, limone, pompelmo e di conseguenza nanismo nelle piante di arancio dolce innestato su arancio amaro;

”*quick decline*”, se causano sintomi di deperimento rapido nelle piante di arancio dolce innestate su arancio amaro, con morte delle piante in uno o due anni dall’infezione.

Ceppi “blandi” vengono, invece, definiti i ceppi che danno luogo ad infezioni asintomatiche e a fenomeni di deperimento lenti.

La butteratura dei rami produce caratteristiche depressioni a carico del legno di molte cultivar e portinnesti, a causa di un’anomala differenziazione delle cellule cambiali. La vita degli alberi affetti da ”*stem-pitting*” non supera i 15 anni. Molte cultivar presentano riduzione della taglia delle piante, frutti di pezzatura ridotta e qualità scadente. Le limette e il pompelmo sono altamente suscettibili; l’arancio dolce è suscettibile solo ad alcuni isolati.

La longevità degli agrumi, esponendo le piante a ripetuti attacchi afidici, favorisce la co-presenza, in una stessa pianta infetta, di ceppi biologicamente diversi, la cui espressione sintomatica varia per effetto delle interazioni che hanno luogo nella pianta.

E’ possibile osservare in pieno campo sintomi “specifici” in relazione alla combinazione nesto/portinnesto: foglie colore bronzeo, decolorazione delle nerva-

ture, butteratura del legno, marciume delle radici assorbenti, disaffinità ed alveolature nel punto d'innesto, frutti di dimensioni ridotte, etc. La diagnosi differenziale con altre patologie che presentano analoghi sintomi non è sempre facile o possibile da personale non esperto, per cui necessitano metodi più specifici.

3.3 Piante ospiti

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., *Hersperthusia* spp., *Merilla* spp., *Microcitrus* spp., *Pamburus* spp., *Pleiospermium* spp., e *Swinglea* spp. (Bar-Joseph e Lee, 1989; Yoshida, 1996). In condizioni sperimentali sono stati infettati anche *Passiflora gracilis* e *P. coerulea* (Roistacher e Bar-Joseph, 1987).

Gli unici generi che manifestano geni di resistenza alla maggioranza degli isolati del virus sono l'arancio trifogliato (*Poncirus trifoliata*) (Mestre *et al.*, 1997a), alcune linee di *Fortunella crassifolia* (Mestre *et al.*, 1997b) ed alcuni pompelmi (Garnsey *et al.*, 1997).

Allorchè la malattia ha un decorso rapido le piante passano da un aspetto normale sino a restare senza foglie e frutti nel giro di pochi giorni o qualche settimana. Talvolta il deperimento è così rapido che il virus risulta difficilmente individuabile o addirittura assente nella chioma (Bar-Joseph e Nitzan, 1991).

Nel deperimento lento le piante affette mostrano progressiva perdita delle foglie mentre i rami esterni della chioma cominciano a disseccare producendo nuovi germogli piccoli e corti situati nei rami vecchi, diminuisce la produzione di frutti i quali si presentano anche di dimensione ridotta e con una colorazione pallida. Tutto ciò porta alla totale improduttività, anche se talvolta le piante possono sopravvivere molti anni con una vegetazione rachitica ed una produzione pratica-

mente nulla fino alla morte biologica. Alcuni isolati di tristezza producono nanismo fino a quando non si osservano deperimenti della chioma. Questi sintomi possono apparire associati ad altre malattie, per esempio lo stubborn, la xiloporosi o cause genetiche di disaffinità tra i due bionti. In alcune zone questi ultimi sintomi possono servire da mezzo diagnostico preliminare di tristezza in campo.

La sindrome di clorosi nervale e butteratura del legno si manifesta in distinte specie di agrumi coltivati sia franche che innestate. La clorosi nervale consiste normalmente nell'ingiallimento discontinuo delle nervature secondarie ma gli isolati più virulenti possono dar luogo ad una suberificazione generalizzata della nervatura.

La butteratura del legno produce generalmente deformazione dei tronchi e dei rami che nei casi più gravi appaiono totalmente solcati da scanalature. L'accrescimento della pianta risulta molto ridotto, l'albero debilitato e presenta frutti di piccolo calibro. Tra le più sensibili annoveriamo alcune lime acide come la lima messicana, l'alemow, *C. excelsa* Webster, *C. hystrix* DC., cedro Etrog e la lima dolce di Palestina, i pompelmi, l'hassaku alcuni kunquat, pompelmi tangor e citrange Morton, Rusk e Savage e alcune varietà di arancio dolce, come Pera (brasiliana) e Verna (spagnola).

Queste risultano tolleranti a molti isolati di tristezza soprattutto quelli dell'area mediterranea e della Florida, ma mostrano sintomi con altri isolati più virulenti presenti in Asia, Sud Africa, Sud America e Australia. Alcuni isolati virulenti presenti in Brasile, Perù, Giappone, Australia e sud-est asiatico inducono sintomi anche in quasi tutte le cultivar di arancio dolce, limone rugoso, lima di Rangpur ed alcuni citrumeli e *C. excelsa* (Cambra e Moreno, 2000).

Tra le specie più tolleranti alla tristezza ritroviamo il limone Meyer come ospite muto del virus e i mandarini, anche se sono stati trovati isolati che infettano, causando sintomi visibili su questi agrumi in alcune aree agrumicole del Giappone, India, Indonesia e Africa centrale (Koizumi, 1991; Muharam e Whittle 1991).

La sindrome nota come giallume dei semenzali ("seedling yellow") prodotta da alcuni isolati del virus della tristezza consiste in una clorosi intensa, dimensioni ridotte della nuova vegetazione e arresto di sviluppo della pianta (nanismo). Questa sindrome, riscontrata su limone, pompelmo ed arancio amaro (Fraser, 1952), in associazione agli isolati più virulenti, non si osserva normalmente in campo però si utilizza in serra per la caratterizzazione biologica gli isolati del virus della tristezza.

3.4 Agente causale

Citrus tristeza virus è un membro del genere closterovirus, famiglia Closterovirida. Con virioni costituiti da particelle flessuose di 2000 nm circa di lunghezza x 10-12 nm di diametro contenenti un'unica molecola di RNA genomico (gRNA) incapsidata da due proteine di 25 e 27 kDa che coprono rispettivamente il 95% ed il 5% della lunghezza della particella virale conferendole una struttura a forma di serpente (Bar-Joseph e Dawson, 2008).

Il gRNA di CTV è di polarità positiva e contiene 19226-19296 nucleotidi, organizzati in 12 frammenti aperti di lettura (ORF), che potenzialmente codificano 19 prodotti proteici, più due zone non codificanti (UTR) di 108 nell'estremo 5' e 209 nucleotidi e nell'estremo 3' (Karasev *et al.*, 1995; Karasev e Hilf, 1997).

Il primo ORF che si incontra a partire dall'estremo 5'(ORF1a) codifica una poliproteina di 349 kDa, che contiene due motivi caratteristici della proteina tipo papaina, un dominio metiltrasferasi ed un dominio elicasi, l'ORF1b codifica una proteina di 57 kDa con motivi caratteristici di una RNA polimerasi dipendente da RNA che si esprime per un meccanismo di deriva ribosomiale di tipo +1. I rimanenti ORF codificano prodotti proteici di 33, 6, 65, 61, 27, 25, 18, 13, 20 e 23 kDa. Fra questi vi è una proteina idrofoba (p65) la quale presenta analogie con le "shock proteins" della famiglia HSP70 ed un'altra (p61) che sembra simile alle

proteine HSP90. Entrambe sono indispensabili per la corretta formazione del virione (Satyanarayana *et al.*, 2000).

Inoltre abbiamo la proteina maggioritaria (p25) e minoritaria (p27) del capsido, la proteina p20 che si accumula nei corpi di inclusione cellulare (Gowda *et al.*, 2007) e la proteina p23 che contiene una regione di amminoacidi basici ed una struttura a dito di zinco che ha la capacità di unirsi all'RNA (Karasev *et al.*, 1995; Lòpez *et al.*, 2000). Non è ancora conosciuta la funzione biologica dei restanti prodotti proteici. I due ORF prossimi all'estremo 5' si esprimono a partire dal gRNA, mentre gli altri dieci che occupano la seconda metà del genoma estremo 3' codificano RNAsub genomico (sgRNA) che sono 3' coterminali (Hilf *et al.*, 1995), di ciascuno dei quali si traduce l'ORF che occupa la posizione 5' terminale.

Nella cellula infetta da CTV oltre a gRNA e a sgRNA, vengono prodotti RNA difettivi (D-RNA) contenenti gli estremi 5' e 3' del gRNA, ma non la porzione variabile della regione centrale (Mawassi *et al.*, 1995). I D-RNA si generano mediante vari meccanismi di cambio di stampo della polimerasi durante il processo di replicazione (Ayllòn *et al.*, 1999a ; Yang *et al.*, 1997) e frequentemente si accumulano nelle cellule infette. Almeno in un caso si è associato un D-RNA con la modulazione dei sintomi dell'isolato al quale stava associato (Yang *et al.*, 1999).

Conosciamo la sequenza completa del gRNA maggioritario degli isolati di CTV T36 (Karasev *et al.*, 1995) e T30 (Albiach-Marti *et al.*, 2000c) della Florida, VT (Mawassi *et al.*, 1996) di Israele, T385 (Vives *et al.*, 1999) della Spagna e SY568 (Yang *et al.*, 1999) della California, più molte altre sequenze parziali di altri isolati. Recentemente si è osservato che, da una parte, le sequenze degli estremi 3' di tutti gli isolati CTV, che sono stati sequenziati, sono per il 97 e l'89% identiche se comparate alle regioni non traslate 3' (NTRs) e per il resto degli estremi 3', dall'altra parte le sequenze degli estremi 5' spesso differiscono considerevolmente. Per esempio gli isolati T36 e VT mostrano soltanto il 60 e il 60-70% di identità rispettivamente per la loro 5' NTR e per i rimanenti estremi 5'. La considerevole

deviazione del ceppo T36 da quello del gruppo VT suggerisce che il ceppo T36 può essere il risultato di un recente evento di ricombinazione coinvolgente l'estremo 3' di un isolato VT-simile e l'estremo 5' derivato da un differente closterovirus (Bar-Joseph e Dawson, 2008).

La struttura del genoma è pressochè uguale in tutti questi isolati, mostrando soltanto modeste differenze nel numero dei nucleotidi. Le differenze di sequenza tra l'isolato T36 e gli altri isolati stanno asimmetricamente distribuiti all'estremità del genoma, mentre i cambiamenti nucleotidici alla metà 3' terminale del gRNA sono dell'ordine del 10%. Nella metà 5' terminale queste differenze vanno aumentando fino all'estremo, arrivando a valori di identità nucleotidica inferiore al 50% (Mawassi *et al.*, 1996; Lòpez *et al.*, 1998). Pertanto è possibile supporre che il T36 possa essere il risultato di una ricombinazione tra un antenato di T36 e di un altro closterovirus (Bar-Joseph *et al.*, 1997).

Analoga situazione si osserva con la sequenza degli isolati T385 (o T30) e SY568 ove entrambi gli estremi del gRNA presentano un'identità di sequenza di circa il 90%, mentre la regione centrale di 6000 nt è identica, ipotizzando così una ricombinazione tra un antenato di SY568 ed un altro con sequenza tipo T385 (Vives *et al.*, 1999). Dalla comparazione tra VT e T385 o SY586 si osservano differenze nucleotidiche del 10% circa in tutto il genoma, fatta eccezione degli estremi 3' e 5', non codificanti.

Attualmente si dispone di un clone di cDNA del genoma completo di T36 del quale si sono ottenuti trascritti di RNA che sono risultati infettivi in protoplasti (Satyanarayana *et al.*, 1999) e danno luogo a virioni normali che, amplificati e meccanicamente inoculati in agrumi, hanno dato i sintomi tipici dell'isolato T36 (Satyanarayana *et al.*, 2001).

3.5 Metodi per la caratterizzazione di CTV

Negli ultimi 20 anni notevole impegno ha profuso la ricerca per differenziare i ceppi mediante sistemi alternativi ai saggi biologici standard (arancio amaro, arancio dolce Madam Vinous, pompelmo Duncan e arancio dolce innestato su arancio amaro). Antisieri policlonali ed 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 e ibridazione molecolare. Protocolli di real-time RT-PCR sono stati recentemente messi a punto per rilevare il virus sia nei tessuti vegetali sia nei vettori.

È noto, infatti, che i saggi biologici richiedono tempi lunghi, ambienti attrezzati per l'allevamento delle piante e competenze sempre più rare (Garnsey *et al.*, 2005). I sistemi più efficaci per la caratterizzazione dei ceppi impiegano:

- i) anticorpi monoclonali in test sierologici per accertare la presenza assenza di ceppi severi;
- ii) l'amplificazione genica mediante RT-PCR seguita da analisi RFLP o da ibridazione molecolare con oligonucleotidi marcati o da analisi SSCP;
- iii) RT-PCR bidirezionale;
- iv) marker molecolari multipli;
- v) DTBIA seguito da real time-RTPCR (Bertolini *et al.*, 2007)

Tutti i risultati finora ottenuti dimostrano che solo l'utilizzo di più sistemi può consentire di tracciare il profilo dell'isolato. Intatti, il risultato molecolare non sempre collima con il comportamento biologico, probabilmente a causa della co-presenza di ceppi blandi, che possono “mascherare” quelli severi. Tutt'oggi solo il saggio biologico consente di determinare con certezza la virulenza del ceppo, ma la ricerca è molto attiva e darà buoni risultati in breve.

Recentemente sono stati messi a punto diversi protocolli di real-time RT-PCR basati sull'utilizzo di sonde TaqMan in grado di reagire solamente con ceppi severi che causano stem-pitting e seedling yellows (Saponari e Yokomi, 2010) o di distinguere ceppi aggressivi, blandi e T36-like (Ruiz Ruiz *et al.*, 2009). Molto

promettente appare un innovativo protocollo di caratterizzazione molecolare mediante elettroforesi capillare, particolarmente adatto a studi epidemiologici o di analisi della popolazione virale di ampi territori.

3.5.1 Saggi su piante indicatrici

Gli isolati di CTV presentano differenze biologiche che si manifestano nella diversa intensità dei sintomi indotti in campo (Aubert e Bove, 1984; da Graça *et al.*, 1984; Roistacher e Moreno, 1991) ed in piante indicatrici (McClean, 1974; Ballester-Olmos *et al.*, 1988, 1993), nella trasmissibilità per afidi (Bar-Joseph e Loebenstein, 1973; Roistacher e Bar-Joseph, 1984; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984, 1988 a) e nella capacità di interferire nella moltiplicazione di altri ceppi virulenti (Costa e Muller, 1980; Van Vuuren *et al.*, 1993).

Per differenziare gli isolati di CTV si ricorre all'osservazione e alla valutazione dei sintomi indotti dal virus in distinte specie indicatrici di agrumi in condizioni standard (Garnsey *et al.*, 1991, 1995).

Le lime messicane ottenute da seme ed il cedro Etrog sono tra le piante più comunemente impiegate per il rilevamento delle infezioni del virus della tristezza. La prima, varietà poliembrionica, fornisce piante omogenee e permette la diagnosi della malattia già entro qualche settimana ed comunque entro due anni dall'inoculazione. I saggi sono eseguiti in assenza di insetti vettori ed impiegando piante in vaso, serre con rete ad esclusione degli afidi, dotata di controllo di luminosità, umidità e temperatura, fattori importanti per la crescita delle piante ma anche per la replicazione virale. L'inoculazione di semenzali di lima messicana consente di evidenziare ceppi virulenti e blandi di CTV ma non consente di distinguere i vari biotipi del virus.

Il saggio viene eseguito in serra a 22-24° C, innestando gemme o porzioni di corteccia su giovani semenzali, (preferibilmente quattro), che vengono capitozzati due settimane dopo l'inoculazione. I sintomi appaiono dopo un mese, con de-

colorazione delle nervature, seguita, dopo diversi mesi da suberificazione delle nervature ed alveolatura del legno; in assenza di sintomi l'osservazione viene protratta per un anno⁶.

Una ricerca accurata condotta saggiando su cinque indicatori standard (arancio dolce, pompelmo Duncan, arancio amaro, limetta Messicana e arancio dolce innestato su arancio amaro) una collezione internazionale di 253 isolati del virus provenienti da tutti i continenti ha messo in evidenza 11 profili biologici diversi (Fig. 2).

Profilo	LR	DEC	SY	GSP	OSP	N° isolati
0	O	O	O	O	O	4
1	X	O	O	O	O	32
2	X	X	O	O	O	20
3	X	X	X	O	O	36
4	X	X	X	X	O	16
5	X	X	X	X	X	44
6	X	X	X	O	X	42
7	X	X	O	X	X	6
8	X	O	O	X	X	9
9	X	X	O	X	O	23
10	X	O	O	X	O	21

LR = Lime Reaction; DEC = Decline; SY = Seedling Yellows;
GSP = Grapefruit stem pitting; OSP = Sweet orange stem pitting

Figura 2. Profili biologici di *Citrus tristeza virus* provenienti da varie parti del mondo.

Quattro isolati non hanno indotto alcun sintomo, mentre tutti gli altri hanno indotto sintomi su limetta messicana. Quarantaquattro isolati hanno indotto sintomi su tutte e cinque le indicatori. Ben 138 isolati sono risultati riferibili al gruppo SY-CTV, 36 di essi hanno mostrato anche sintomi di “stem pitting”. Il profilo SP-CTV è stato osservato per 44 isolati, su entrambe le indicatori pompelmo e arancio amaro, mentre altri 42 isolati hanno indotto sintomi solo su arancio dolce e 16 solo su pompelmo. Anche l'intensità dei sintomi sulle diverse indi-

⁶ Fa eccezione l'isolato di CTV detto “K lime”, che non dà decolorazione delle nervature su lima messicana (Bovè *et al.*, 1988).

catrici è risultata molto diversificata, mettendo in evidenza differenze non rilevabili con metodi immunoenzimatici e mediante amplificazione genica (Garnsey *et al.*, 2005).

3.5.2 Saggi sierologici

Per eliminare le limitazioni della caratterizzazione biologica si sono sviluppati vari metodi di laboratorio per mezzo dei quali è possibile discernere i vari isolati di CTV, basandosi su differenze localizzate nella proteina capsidica p25, nel profilo dei dsRNA ed in variazioni di sequenza localizzati in distinte zone del gRNA (Moreno e Guerri, 1997). I metodi a cui si ricorre più frequentemente sono il confronto della reazione ELISA con diversi anticorpi monoclonali (Vela *et al.*, 1986; Gumpf *et al.*, 1987; Permar *et al.*, 1990; Tsai E Hsu, 1991; Cambra *et al.*, 1993; Zebzami *et al.*, 1993). Quest'ultimo procedimento presenta il vantaggio di una facilità d'uso basso costo e rapidità di esecuzione per cui è possibile analizzare in poco tempo numerosi campioni. La sua limitazione sta nel fatto che le differenze che individua sono circoscritte a cambi di amminoacidi in una proteina che rappresenta meno del 5% della capacità codificante del gRNA. L'epitopo che determina la reazione con un anticorpo monoclonale può includere un unico amminoacido come è il caso del monoclonale MCA 13 (Permar *et al.*, 1990; Pappu *et al.*, 1993 a) e 3DF1, talvolta non relazionabile con alcun determinante di patogenicità.

Test immuno enzimatici ELISA. Lo sviluppo della biologia molecolare e la produzione di anticorpi monoclonali ha permesso negli ultimi anni di disporre di reagenti di diagnostica di grande sensibilità e specificità anche in forma di kit, di facile utilizzazione ed interpretazione. Il test utilizza di anticorpi marcati con un enzima (generalmente perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano un'attività sia immunologica sia enzimatica. Essendo uno dei componenti (antige-

ne o anticorpo) adeso alla piastra di polistirene, materiale ad alta capacità di assorbimento, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto può essere evidenziata con l'aggiunta del substrato, che reagendo con l'enzima produrrà una colorazione visibile ad occhio nudo o quantificabile con un colorimetro. Poiché sono disponibili diversi kit commerciali disponibili e si possono realizzare studi sierologici senza necessità di grandi mezzi.

I test ELISA sono di uso corrente in quanto consentono lo screening di un numero elevato di campioni in breve tempo tipicamente (24-48 h) e con parziale o totale automatizzazione della procedura (Clark e Adams, 1977). Questa analisi, che ha rivoluzionato la diagnosi, è ormai correntemente impiegata per il monitoraggio di vaste aree agrumetate e nei vivai e per studi epidemiologici.

Tra i diversi anticorpi impiegati, l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale MCA13 ha consentito di discriminare i ceppi particolarmente aggressivi che come dimostrato, sono in grado di legarsi fortemente a questo anticorpo che invece non ha alcuna reazione con i ceppi più blandi e meno virulenti. Dal confronto della reazione ELISA con diversi anticorpi monoclonali è possibile differenziare alcuni isolati (Vela *et al.*, 1986; Gumpf *et al.*, 1987; Permar *et al.*, 1990; Tsai e Hsu, 1991; Cambra *et al.*, 1993; Zebzami *et al.*, 1993). La sua limitazione sta nel fatto che le differenze che individua sono circoscritte a cambi di amminoacidi in una proteina che rappresenta meno del 5% della capacità codificante del gRNA. L'epitopo che determina la reazione con un anticorpo monoclonale può includere un unico amminoacido, come è il caso del monoclonale MCA 13 e 3DF1, talvolta non relazionabile con alcun determinante di patogenicità.

L'analisi della mappa dei peptidi generati mediante la digestione del capside p25 con distinte endoproteasi accerta soltanto il cambio di amminoacidi della proteina p25 pur mostrando una maggiore capacità di discriminazione (Lee *et al.*, 1988; Guerri *et al.*, 1990). Mediante una caratterizzazione sierologica delle mappe dei peptidi ("western blot") è possibile accorciare i tempi e migliorare la capacità di risoluzione (Albiach-Martí *et al.*, 2000 a).

L'uso di anticorpi fluorescenti (Tsuchizaki *et al.*, 1978) consente di rilevare le particelle virali in sezioni di nervature fogliari montate in glicerolo e osservate al microscopio a fluorescenza.

Immunoprinting DTBIA (Direct Tissue Blot Immuno Assay). Questa tecnica è una variante della tecnica immunoenzimatica DAS e consente di avere risultati in tempi più brevi (Garnsey *et al.*, 1993). Viene eseguita ponendo un'impronta dei piccioli fogliari e dei rametti, sede di maggiore concentrazione virale, su una membrana di nylon, che viene successivamente incubata con anticorpi monoclonali o antisieri policlonali. Il rilevamento avviene mediante visualizzazione al microscopio ottico dell'impronta previa colorazione con particolari reagenti, che assume un colore viola in presenza del virus (Garnsey *et al.*, 1993). L'impronta ottenuta con l'ovario dà risultati anche migliori rispetto ai piccioli fogliari o lamine fogliare (Djelouah *et al.*, 2002).

Rispetto all'ELISA, il DTBIA ha una maggiore sensibilità riuscendo a rilevare il virus in campioni che in ELISA appaiono di dubbia interpretazione. Ciò sembra dovuto al fatto che nell'ELISA e nell'immunoblotting tradizionale c'è una forte competizione di legame tra le proteine dell'ospite e l'antigene presenti nell'estratto della pianta o semplicemente una bassa concentrazione virale. Nel DTBIA invece c'è un legame diretto con il virus presente nelle cellule infette della superficie di tessuto utilizzata per il saggio, senza alcuna diluizione delle proteine presenti in cellule non infette di altre parti della pianta. I campioni, inoltre sono stabili sulla membrana che può essere conservata anche per lunghi periodi. La tecnica offre il vantaggio di essere riproducibile, sensibile, rapida e vantaggiosa, anche dal punto di vista economico. Inoltre, consente di avere informazioni sulla distribuzione del virus all'interno dell'ospite.

Nel tentativo di distinguere i ceppi potenzialmente meno aggressivi da quelli più pericolosi, in Florida è stata messa a punto una nuova metodologia che accoppia il DTBIA alla multiplex real-time PCR quantitativa, riuscendo, anche

grazie all'utilizzo dell'anticorpo MCA13, a distinguere i ceppi VT, T3 e T36 like rispetto a quelli T36NS associati a un fenotipo "mild" (Yokomi e Saponari, 2010).

Anche in questo caso il DTBIA si è rilevato più sensibile dell'ELISA. E' tuttavia da notare che l'anticorpo MCA13 è stato sperimentato solo per la caratterizzazione di isolati CTV presenti in Florida e difficilmente potrebbe assicurare gli stessi risultati in altri ambienti.

3.5.3 Metodi molecolari

*Tecnica dei double strand RNA*⁷. RNA a doppio filamento, riscontrati in virus dei vegetali con genoma ad RNA, come i tombusvirus o il virus del mosaico del tabacco, il virus del mosaico giallo del cavolo navone (VMJN), e numerosi altri (Gildow *et al.*, 1988), sono stati osservati e studiati anche nei closterovirus (Dodds e Bar-Joseph, 1983; Valverde *et al.*, 1986).

Oltre a queste forme a doppio filamento, costituite da due catene di RNA intero ed appaiate in tutta la loro lunghezza e denominate forme replicative (RF), è possibile estrarre dalle cellule dei tessuti infetti da RNA virus un secondo tipo di molecole denominate intermedie di replicazione (RI).

Queste catene contengono una sequenza di RNA complementare completa e più catene virali di lunghezza crescente nell'estremità 3' formanti con l'RNA complementare una "colonna verticale" a doppio filamento che possono essere nell'estremità, a singolo filamento. Questi due tipi di molecole, l'una a doppio filamento e l'altra con prolungamenti singoli, non si osservano in vivo ma soltanto durante l'estrazione. Le forme a doppio filamento sono riconducibili all'RNA

⁷ La replicazione di un virus RNA a singola elica, di polarità "+" indica la sintesi nelle cellule dell'ospite infetto di una catena di RNA complementare (RNA "-"), che sarà utilizzata come matrice per la sintesi di nuove molecole di RNA genomico. Questa catena complementare è sintetizzata con l'ausilio di un enzima, la replicasi, che utilizza l'RNA virale come matrice.

complementare ed all'RNA virale in via di sintesi, mantenuto in fase dalla replicasi, e questo fenomeno potrebbe essere agevolato dalla presenza di fenolo o SDS o probabilmente dovuto a un meccanismo di invecchiamento cellulare (Keil e Hofschneider, 1973).

Da piante di agrumi inoculate con il virus della tristezza, sono stati isolati alcuni dsRNA a maggiore peso molecolare ($13,3 \times 10^6$ d), che probabilmente rappresentano la forma replicativa, mentre altri con RNA a doppio filamento presentano un peso molecolare inferiore (Dawson e Dodds, 1982). Diversi isolati del virus della tristezza sono stati inoculati in distinte piante e si è osservata una diversa sintomatologia. Si è cercato inoltre di individuare i vari isolati studiando i loro profili elettroforetici poiché i dsRNA appartenenti a isolati virali differenti presentano diversi profili elettroforetici.

L'analisi dei dsRNA di piante infette ha permesso di distinguere alcuni isolati di CTV (Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990), ancorchè essi non appaiano consistentemente associati a caratteristiche biologiche (Moreno *et al.*, 1990). Più recentemente si è visto che i dsRNA che caratterizzano alcuni isolati di CTV sono forme replicative di D-RNA (Mawassi *et al.*, 1995; Ayllón *et al.*, 2001; Albiach-Martí *et al.*, 2000 b) che si accumulano nelle cellule infette. In alcuni sistemi virus-pianta i D-RNA possono modulare l'espressione di sintomi producendo un'attenuazione o una intensificazione (Roux *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1993). I D-RNA potrebbero essere un meccanismo di ricombinazione che aiuterebbe a riparare mutazioni deleterie e a incrementare la variabilità del virus, facilitando il suo adattamento a distinte condizioni (Yang *et al.*, 1997; Bar-Joseph *et al.*, 1997).

Ibridazione molecolare. Queste tecniche sono molto veloci specifiche, e permettono di clonare nei vettori appropriati (plasmide o fago lambda) dei frammenti di DNA omologhi ad una parte del genoma dell'agente patogeno da utilizzare come sonde. Rosner *et al.* (1986) hanno creato a partire dall'RNA virale di un isolato virulento di "giallume dei semenzali" del virus della tristezza, dei

cDNA corrispondenti a porzioni differenti del genoma virale, poi utilizzati come sonde. Alcuni di essi possedevano la capacità di riconoscere alcuni ceppi virali con caratteri patogenetici differenti, altri invece ibridavano con tutti i ceppi saggiati; dimostrando che alcune regioni del genoma sono differenti da un ceppo all'altro e porzioni sono "conservate". Nessuna relazione è emersa tra l'ibridazione con sonde e i sintomi di "giallume dei semenzali", né tra le differenze osservate nelle prove di ibridazione e quelle rilevate dall'analisi dsRNA.

Questo può dipendere dalla natura stessa dei cDNA ottenuti a partire dall'RNA virale, sui quali la sintesi della trascrittasi inversa è stata avviata a caso, per cui alcuni cDNA potranno rappresentare tratti delle regioni variabili altri tratti di regioni conservative e contenere delle sequenze comuni a parecchi RNA virali. Le differenze osservate tra diversi dsRNA di differenti ceppi virali sono probabilmente riflessi di differenze all'interno dell'espressione del genoma virale che di conseguenza si riflette sull'organizzazione genetica del virus.

Partendo da RNA a doppio filamento, isolati da piante infette con un ceppo del virus che provoca il sintomo "giallume dei semenzali", si è cercato di ottenere dei cDNA con un duplice fine: ottenere sonde a cDNA da utilizzare a scopo diagnostico per gli isolati appartenenti alla componente giallume dei semenzali e studiare le caratteristiche dell'RNA virale e quindi il suo genoma (Cashdollar *et al.*, 1985; Imai *et al.*, 1983; Asamizu *et al.*, 1985; Antoniwi *et al.*, 1986).

L'ibridazione molecolare con sonde a cDNA o cRNA si utilizza per l'analisi di acidi nucleici virali per fini diagnostici e anche per la differenziazione di isolati con diverse sonde per individuare gli isolati di CTV (Rosner e Bar-Joseph, 1984; Hilf *et al.*, 1999) e per studiare i cambi che avvengono nella popolazione virale nei processi di soprainoculazione con nuovi isolati (Albiach-Marti *et al.*, 1996) e trasmissione per afidi.

E' possibile individuare distinte zone del gRNA e confrontare contemporaneamente molti campioni, con due importanti limitazioni: l'alta concentrazione di acidi nucleici totali e di dsRNA per cui il metodo risulta costoso e laborioso, e l'utilizzo di sonde marcate con radioattivo, normalmente P32, possibile esclusi-

vamente nei laboratori a norma. La possibilità di disporre di sonde non radioattive (sonde fredde), ad alta sensibilità e utilizzabili in qualsiasi laboratorio ha aperto nuove prospettive di diagnosi.

3.5.4 Microarray

Con l'avvento della tecnologia laser, l'ibridazione molecolare applicata alla identificazione/diagnostica avanzata di fitovirus ha avuto un nuovo sviluppo, quello del "DNA array". Esso permette l'interrogazione comparativa di migliaia di sequenze di DNA allineate perpendicolarmente ad un supporto solido (di solito un vetrino per microscopia ottica) in un'area di alcuni cm². Il DNA array presenta due vantaggi fondamentali: l'uso di un supporto non poroso come il vetro, il quale permette la miniaturizzazione e l'uso di marcatori fluorescenti (fluorofori) che consentono identificazioni/diagnosi multiple. Con la microrobotica è possibile applicare circa 10.000 differenti cDNA su un vetrino per microscopia, e con la tecnica fotolitografica questo numero può essere elevato a 400.000. Grazie alle informazioni molecolari disponibili in banca dati è teoricamente possibile creare DNA array contenenti librerie di cDNA dell'intero genoma di tutte le specie di fitovirus di uno stesso genere o famiglia o di quelle che infettano differenti specie vegetali nell'ambito di uno stesso genere o famiglia botanica.

L'ibridazione avviene fra i cDNA allineati sul vetrino che, in questo caso, costituiscono le sonde, e molecole di cDNA marcato in soluzione che rappresentano molecole bersaglio sintetizzate su preparati di acido nucleico estratti da una o più piante infette. La lettura del DNA array, effettuata generalmente da un laser è in grado di cogliere le più piccole variazioni e consente oltre alla grossolana discriminazione sana e infetta o tra virus, l'individuazione di mutazioni, anche puntiformi, del genoma virale.

Quest'analisi richiede la selezione e la preparazione di sonde dotate di adeguata sensibilità e un'attenta interpretazione dei risultati. Sebbene essa sia interamente computerizzata, è necessaria un'accurata taratura per evitare risultati non

attendibili dovuti, per esempio, al non perfetto allineamento (Ramisse *et al.*, 2003; Yokomi *et al.*, 2010).

Questa tecnica costituisce un sensibile ed efficace strumento per esaminare gli effetti globali sull'espressione genica di un range di processi biologici. Gandia *et al.* (2007) hanno analizzato gli effetti di un isolato a media virulenza e uno altamente virulento sull'espressione genica su lima messicana. Utilizzando una piattaforma cDNA Microarray (7K *Citrus chip*) che include 12672 punti corrispondenti a 6875 differenti geni. Con questa tecnica sono stati identificati e classificati geni che sono differenzialmente espressi nelle piante di lima messicana sane e infette da CTV.

La tecnica del cDNA microarray estremamente affidabile per indentificare molti virus in piante. E' una tecnica innovativa poichè può essere utilizzato un gran numero di oligonucleotidi di DNA applicati ad una superficie solida, permettendo analisi in parallelo di ibridazione, riducendo il tempo di lavoro richiesto per la preparazione del campione. Lo svantaggio sta nell'alto costo dello strumento per l'analisi.

3.6 Metodi di differenziamento degli isolati del virus

Sequenziamento. La comparazione mediante sequenziamento è senz'altro il metodo più efficace e preciso però anche costoso e molto complicato e quindi non applicabile ad indagini epidemiologiche e massali.

Il sequenziamento del gRNA di distinti isolati di CTV ha messo in evidenza zone di variabilità sull'intero genoma. Alcuni studiosi hanno confrontato le sequenze nucleotidiche del gene p25 e del gene p23 di distinti isolati (Pappu *et al.*, 1993 b; 1997) ed hanno costruito alberi filogenetici da dove si evince che gli isolati più virulenti appaiono raggruppati.

Differenze localizzate nella proteina capsidica p25, nel profilo dei dsRNA ed in variazioni di sequenza localizzate in distinte zone del gRNA sono state rilevate da Moreno e Guerri (1997).

Recentemente si è osservato un D-RNA che sembrerebbe attenuare i sintomi prodotti dall'isolato VT israeliano (Yang *et al.*, 1999).

Polimorfismo dei frammenti di restrizione. Un metodo veloce ed economico per individuare differenze nelle sequenze di un segmento di gRNA consiste nell'analizzare i prodotti per **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** digerendo un prodotto cDNA con determinate endonucleasi. L'analisi RFLP del gene p25 ha differenziato isolati di CTV con diversa virulenza in Australia (Gillings *et al.*, 1993) ed ha individuato la presenza di infezioni miste. Poiché è necessario l'impiego di diverse endonucleasi per codificare la variabilità di un determinato gene, risulta laborioso, lento e costoso; pertanto non si presta ad esaminare numerosi campioni.

L'analisi del polimorfismo di conformazione del cDNA monocatenario ("Single-strand Conformation Polymorphism", SSCP) è stata impiegata per individuare mutazioni puntiformi in frammenti di cDNA omologhi. La comparazione di distinti cloni del gene p25 di CTV ha permesso di individuare cambi di un solo nucleotide in 710 (Rubio *et al.*, 1996).

SSCP. L'analisi SSCP del gene p 23 è stata impiegata per studiare la struttura della popolazione virale di distinti isolati di CTV (Ayllòn *et al.*, 1999) e le modificazioni che compaiono nei processi di cambio di ospiti (Rubio *et al.*, 2000) o trasmissione di afidi (D'Urso *et al.*, 2000). Il metodo è relativamente economico e veloce e permette di effettuare comparazioni di distinti segmenti su tutto il gRNA utilizzando primers adeguati; però è possibile esaminare soltanto un numero limitato di campioni.

Qualsiasi metodo venga impiegato i determinanti di patogenicità di CTV sono ancora sconosciuti e gli isolati di CTV sono composti di solito da una popo-

lazione di varianti di sequenza, la cui composizione determina la gran parte delle caratteristiche biologiche. Durante la sua vita la pianta di agrume può subire ripetute inoculazioni per afidi, il che dà luogo a popolazioni virali notevolmente complicate. Pertanto, la differenza tra isolati è basata sulla capacità di indurre determinati sintomi e la presenza di certi marcatori molecolari.

Gli isolati di CTV, come altri virus a genoma RNA, sono formati da una popolazione di varianti di sequenza, che si creano come conseguenza della bassa fedeltà di copia e in assenza di automatismi di correzione di errori delle RNA polimerasi dipendenti da RNA durante il processo di replicazione. La pressione selettiva può far sì che alcune varianti scompaiano mentre altre divengano predominanti.

La disposizione di popolazioni attorno a più sequenze predominanti in diverse regioni del gRNA di CTV (López *et al.*, 1998; Ayllón *et al.*, 1999 b; Rubio *et al.*, 2001) potrebbe scaturire da ulteriori inoculazioni di piante infette con diversi isolati del virus. Nonostante le informazioni sulla variabilità del virus siano a tutt'oggi insufficienti, dai dati disponibili possiamo dedurre che esso ha una variabilità genetica maggiore rispetto ad altri (Rubio *et al.*, 2001).

Lo studio sulla variabilità del CTV nelle regioni 3' e 5' ha permesso di accertare che la prima regione è altamente conservata, presentando più del 96% di identità nucleotidica, mentre la seconda presenta una elevata variabilità e mostra un'identità inferiore al 50%. La totalità dei cloni sequenziati da diversi isolati sono stati distinti in tre gruppi 1-2-3. I cloni dello stesso gruppo presentano un'identità nucleotidica superiore all'88%, mentre questa scende a 55-77 % tra cloni di tipo 1 e 2, a 62-64% tra tipo 2 e 3 e a 44-45% tra 1 e 3.

Lo studio dell'incidenza delle sequenze di tipo 1 - 2 e 3 nei diversi isolati di CTV attraverso RT-PCR con primer specifici ha mostrato che le sequenze tipo 3 sono presenti in tutti gli isolati e che, la gran parte di essi contiene più sequenze di tipo 1 e/o 2. Gli isolati contenenti soltanto sequenze di tipo 3 sono poco virulenti e non danno batteratura nelle piante indicatrici né giallume dei semenzali invece quelli più aggressivi contengono costantemente sequenze tipo 2 (Ayllón *et*

al., 2001). Non è stato possibile associare una caratteristica sintomatologia alle sequenze di tipo 1 e 2 poiché in nessun isolato si sono riscontrate singolarmente.

3.7 Modalità di trasmissione

La trasmissione attraverso i materiali di propagazione gioca, sicuramente, un ruolo fondamentale nella diffusione di CTV a lunga distanza, mentre gli afidi assumono un ruolo cruciale nella sua diffusione locale. *Toxoptera citricidus* (afide bruno degli agrumi) e *Aphis gossypii* (afide del cotone) sono le due specie di afidi più attive nell'epidemiologia della malattia. Entrambe acquisiscono il virus solo durante l'attività alimentare (1-6 ore) e, dopo spostamenti in altre piante ed una nuova fase di alimentazione (6 e 24 ore), operano la successiva inoculazione.

Dati epidemiologici evidenziano che in presenza di *A. gossypii* la percentuale di piante infette cresce dal 5 al 95% nell'arco di 8-15 anni, mentre in presenza di *T. citricidus* analoghi incrementi sono raggiunti in 2-4 anni (Gottwald *et al.*, 1996). La maggiore mobilità delle forme alate di *A. gossypii* da luogo ad una distribuzione puntiforme dei focolai d'infezione, mentre in presenza di *T. citricidus* essa risulta a chiazze e uniforme.

Dopo aver raggiunto la regione Caraibica dell'America centrale, la Florida e il Messico *T. citricidus* ha fatto la sua comparsa nell'isola di Madeira e recentemente nella penisola iberica, in limitate aree nord-occidentali, non interessate da agrumicoltura estensiva. Ciò suscita giustificati timori di maggiori rischi per l'agrumicoltura dell'intero Mediterraneo, anche se l'esperienza maturata in Florida e in California lascia ritenere possibili scenari differenti da quelli canonici, a conferma dell'importanza del monitoraggio continuo e della ricerca.

Infine il virus può diffondersi per inoculazione meccanica attraverso tagli effettuati nel floema (Garnsey *et al.*, 1977) anche se questa modalità ha scarsa importanza epidemiologica per la limitata efficienza di trasmissione. Non è stata, a tutt'oggi, dimostrata la trasmissione virale attraverso il seme.

La trasmissione per afidi avviene in forma semi persistente e con diversa efficacia a secondo della specie di afide, dell'isolato del virus e della specie donatrice e accettrice (Hermoso De Mendoza *et al.*, 1984, 1988 a,b). Altre specie di afidi in grado di trasmettere CTV, sono: l'afide verde degli agrumi (*A. citricola* Van der Goot), l'afide nerastro degli agrumi (*T. aurantii* Boyer de Fonscolombe) e l'afide del pesco (*Myzus persicae* Sulzer) e *Dactynotus jaca* L.

I vettori più efficaci, rimangono, *T. citricidus* e *A. gossypii*. In condizioni comparabili si è dimostrato che l'efficienza di trasmissione del primo è venti volte maggiore del secondo (Yokomi *et al.*, 1994), mentre l'efficienza di *A. citricola* e *T. aurantii* è molto più ridotta e pare che quest'ultimi siano incapaci di trasmettere alcuni isolati del virus (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988 a).

T. citricidus è molto diffusa in America del sud, parte dell'America centrale (Panama, Rica, Nicaragua, Honduras, Belice ed estremo oriente del Messico), isole dei Caraibi, Florida ed inoltre in Africa (sud e centro), in Asia e in Australia (Yokomi *et al.*, 1994; Batista *et al.*, 1996; Garnsey *et al.*, 1996).

La trasmissione attraverso afidi dà luogo a distinte punte di dispersione spazio-temporale. Così mentre la dispersione per *A. gossypii* da luogo ad un aumento temporale dell'infezione relativamente blando nei primi anni, 5% circa, fino ad arrivare ad una dispersione ed infezione del 95% circa a 15 anni, invece quando il vettore dominante è *T. citricidus* la propagazione virale è più veloce e la massima incidenza della malattia si realizza in 4-5 anni (Gottwald *et al.*, 1996, 1997). Quando è *A. gossypii* il vettore predominante le nuove infezioni avvengono ad una certa distanza dall'albero primario, mentre in presenza di *T. citricidus* come vettore dominante le nuove infezioni avvengono per contiguità (Gottwald *et al.*, 1997). La copresenza dei due vettori provoca una diffusione rapida a distanza e localizzata.

3.8 Metodi di contenimento della malattia

La prevenzione è fondamentale nel limitare la diffusione del virus in zone indenni e nel contenere i danni da CTV in zone già interessate dalla malattia. Nei paesi o nelle aree agrumicole indenni dal CTV si raccomanda di intraprendere programmi di quarantena e di certificazione del materiale di propagazione, ricorrendo ove occorresse, a programmi di risanamento varietale (Navarro, 1993).

Dove il portainnesto predominante è l'arancio amaro e l'incidenza della malattia è ancora molto limitata è consigliabile estirpare gli alberi infetti al primo apparire della malattia, per ritardarne la diffusione. Questi programmi sono stati messi in atto a Cipro (Kyriakou *et al.*, 1996), Cuba (Batista *et al.*, 1996), California (Dodds *et al.*, 1996) e in Israele (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

La riuscita del programma di eradicazione dipende da diversi fattori: dalla tempestività dell'intervento; dall'incidenza iniziale della malattia; dalla trasmissibilità degli isolati di CTV presenti e dalla efficienza degli insetti vettori nel territorio interessato. E' importante che il programma di eradicazione venga continuato almeno per cinque anni dopo il primo riscontro di infezione nella zona e fin tanto che non si osservano piante infette. L'incremento di piante infette è inversamente proporzionale al numero di piante rimosse per anno (Dodds *et al.*, 1996).

Nei casi in cui la dispersione naturale risulta incontrollabile è possibile contenere i danni utilizzando portainnesti tolleranti, quali i citrange e il mandarino Cleopatra. Questa soluzione risulta efficace in quelle aree agrumicole, come il Bacino del Mediterraneo e la Florida, dove predominano isolati relativamente meno aggressivi che non provocano sintomi su arancio dolce, mandarino e pompelmo.

In presenza di isolati virulenti, (agenti di stem pitting, che inducono nanismo, scarsa produzione e frutti piccoli) occorre attivare il controllo sanitario del materiale di propagazione per evitare la diffusione e disporre di mezzi adeguati per la loro identificazione.

La protezione crociata è stata sperimentata con successo in Brasile per proteggere il limone Galeco e l'arancio dolce Pera (Costa e Muller, 1980) ed in sud Africa per proteggere il pompelmo (Van Vuuren, 1993) è tuttora impiegata. La

sua applicazione avviene su base sperimentale empirica⁸, poiché a tutt'oggi non sono ancora conosciute le basi molecolari della protezione crociata. La selezione di un ceppo idoneo alla protezione, richiede numerosi saggi. Non tutti i ceppi “benigni” sono infatti appropriati. La protezione è specifica per una determinata varietà e a volte non è duratura (Folimonova *et al.*, 2010).

La capacità di protezione dei ceppi non aggressivi dei virus si può valutare monitorando, attraverso tecnologie idonee a differenziare i vari isolati di CTV, l'evoluzione della popolazione virale in piante inoculate con l'isolato blando e con quello virulento.

L'impiego di ceppi blandi per indurre meccanismi di protezione nelle piante, applicato finora con discreto successo nel caso di SP-CTV, 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 alle varietà coltivate, con metodi convenzionali o non convenzionali, di geni di resistenza presenti in alcune specie fra cui *P. trifoliata*, ha i suoi limiti sia nell'utilizzo di materiale geneticamente modificato, sia nel vasto panorama varietale, che renderebbe necessario intervenire su un congruo numero di cultivar e/o cloni (Catara *et al.*, 2008).

La sperimentazione di portinnesti tolleranti alternativi, adatti alle diverse condizioni pedoclimatiche, rappresenta sicuramente una via da intraprendere, ma bisogna tener conto della loro suscettibilità ad altri patogeni.

4. Scopo del lavoro

Lo studio degli isolati di CTV presenti nell'area del Mediterraneo è stato finora affrontato in modo saltuario e discontinuo con modalità differenti non sempre comparabili. Contributi più significativi si sono avuti in Spagna e in Israele, ancor più negli USA. Pertanto, allo stato attuale, poco è dato di sapere sulla composizione della popolazione del virus e sugli effetti che i vari isolati/ceppi provocano in piante ospiti modello a livello del fenotipo e dell'espressione genica.

Da segnalare un recente lavoro sugli studi sull'espressione genica su piante di lima messicana in risposta a due differenti ceppi di CTV hanno dimostrato, differenze statisticamente significative solo in presenza di infezioni causate da ceppi altamente virulenti. Di contro le infezioni causate da ceppi a media virulenza non inducevano cambiamenti significativi (Gandia *et al.*, 2007).

Allo stato attuale nel nostro Paese non si dispone di una sistematica caratterizzazione biologica degli isolati rinvenuti, mentre sono disponibili dati di caratterizzazione molecolare. Conseguentemente non si dispone di informazioni certe sulla virulenza dei ceppi. Limitati sono anche i dati di sequenza (Barbarossa e Vovlas, 2007; Davino e Davino, 2004; Djelouah *et al.*, 2002; Rizza *et al.*, 2009; Yokomi *et al.*, 2010).

Tali conoscenze sono importanti nel caso in cui si volesse continuare ad utilizzare il portainnesto arancio amaro, che per la sua plasticità si adatta meglio di altri portinnesti a valorizzare le caratteristiche organolettiche e sensoriali delle cultivar di arance pigmentate e di altre specie di agrumi tipiche di alcune zone produttive italiane.

Sono infine da considerare i rischi connessi con i mutamenti delle caratteristiche biologiche negli isolati nelle zone agrumicole ove prevalgono quelli poco aggressivi come nel Bacino del Mediterraneo. Ad esempio l'isolato spagnolo T385, asintomatico nella combinazione arancio dolce/arancio amaro, dà lievi sintomi in lima messicana (Moreno *et al.*, 1991) mentre il suo passaggio a vari ospiti seleziona due sub-isolati T318 e T305 molto virulenti in lima messicana che dan-

no sintomi quali giallume dei semenzali e butteratura del legno (Moreno *et al.*, 1993 a, b).

Allo scopo di portare un contributo alla migliore conoscenza delle proprietà biologiche di CTV è stato avviato uno studio su un isolato virulento con caratteristiche di particolare interesse (“inverse pitting”), per accertare la risposta fenotipica di indicatori diverse e di studiare le modificazioni dell’espressione genica indotte dal virus in piante di arancio amaro e limetta messicana, indicatori specifiche di SY-CTV, in cedro e in alemow.

Il presente lavoro è stato mirato ad accertare le modificazioni del profilo genico in piante di arancio amaro sperimentalmente inoculate.

Per individuare e caratterizzare i geni, la cui espressione subisce un’alterazione (“up-o-down-regulation”) a seguito della inoculazione con CTV, e iniziare a studiare i meccanismi molecolari che sono alla base dell’interazione ospite-parassita, si è deciso di procedere mediante l’analisi differenziale del trascrittoma di piante inoculate a confronto con piante non inoculate, tramite tecniche Northern blot, real time-PCR e DDRT-PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction).

Dopo un’indagine preliminare per l’individuazione di isolati diversi di CTV, che ha consentito di selezionare un isolato aggressivo e di caratterizzarlo con test biologici e molecolari, la ricerca specifica sui geni ha avuto più fasi:

- la prima fase è stata dedicata alla ricerca bibliografica sullo studio della modulazione genica in piante di agrumi con riferimento a stress biotici e abiotici;
- la seconda alla valutazione dei livelli di espressione di 23 geni in semenzali di arancio amaro inoculati con l’isolato selezionato (CTV SG29). Le determinazioni sono state fatte in reverse Northern blot mediante sonde ottenute in uno studio sul *Citrus dwarfing viroid* (CDVd) presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie dell’Università di Catania. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti da Tessitori *et al.* (2007) in risposta ad infezioni di CDVd (CVd IIb);

-la terza fase ha riguardato la determinazione mediante real time-PCR quantitativa di sette geni che sono risultati differenzialmente espressi in arancio amaro al fine di comparare la modulazione in cinque specie di agrumi (arancio amaro, lima messicana, cedro, pompelmo e alemow) inoculati con CTV SG29.

Parallelamente è stata avviata, mediante la tecnica del Differential display RT-PCR, un'analisi dell'espressione genica in semenzali di arancio amaro CTV SG29 a confronto con semenzali non inoculati.

5. Rassegna della letteratura

Il differential display (DD-PCR) è una tecnica potente per l'isolamento di geni che sono specificatamente indotti o repressi in particolari tipi di cellule ed in diverse condizioni di stress. I risultati ottenuti indicano che la risposta della pianta ai vari stress implica cambiamenti in numerose vie metaboliche e di trasduzione del segnale. Persino geni espressi a livelli molto bassi, come fattori trascrizionali ed enzimi rari, possono essere isolati con successo utilizzando questa tecnica. I geni identificati con il DD-PCR sono, spesso, differenti da quelli identificati con altre tecniche, che risultano pertanto complementari le une con le altre.

L'impiego di tali tecniche molecolari ha contribuito a migliorare le conoscenze sulla genetica degli agrumi e le relazioni con agenti patogeni responsabili di gravi danni economici a livello mondiale. Esse consentono di accelerare i programmi di miglioramento genetico, a supporto di tecniche complesse necessarie per lo studio delle caratteristiche biologiche specifiche degli agrumi (apomissia, incompatibilità sessuale, caratteri giovanili prolungati).

Benchè adesso siano disponibili diverse tecniche di analisi della espressione genica, come SAGE e cDNA microarray, PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) continua a registrare centinaia di articoli l'anno, nei quali la tecnica del DD-PCR viene utilizzata nella ricerca di base. La tecnica permette una rapida, accurata e sensibile identificazione delle modificazioni nell'espressione genica in diversi sistemi biologici, in modo semplice.

Essa si basa sulle tre tecniche di biologia molecolare più comunemente utilizzate: RT-PCR, elettroforesi su gel di poliacrilammide e clonaggio del cDNA. I vantaggi sono numerosi:

- buona sensibilità con piccole quantità di trascritti di mRNA;
- individuazione contemporanea sia di geni indotti che repressi;
- possibilità di comparare più di due campioni alla volta;

- possibilità di rilevare le modificazioni presenti nei profili di mRNA dei campioni a confronto senza bisogno di conoscere anticipatamente le sequenze genomiche delle specie in studio, al contrario di altre tecniche, come DNA microarray.

Negli ultimi anni, il DD-PCR ha consentito di produrre una enorme quantità di letteratura riguardante l'isolamento di geni di piante coinvolti in processi fisiologici, trasduzione del segnale, risposta a stress e metabolismo secondario, fra cui la risposta degli agrumi a stress biotici e abiotici. Una rassegna puntuale, ricca di riferimenti bibliografici, ai quali si rimanda per gli approfondimenti è stata pubblicata recentemente (De Luca *et al.*, 2009).

Geni coinvolti in stress abiotici. Lers *et al.* (1998) hanno isolato nella buccia di pompelmo irradiata con UV una sovraespressione di un gene codificante per una proteina isoflavone reductase-like (IRL), altamente omologa alle isoflavone riduttasi caratterizzate nei legumi. Questo gene, la cui funzione non è ancora chiara, è indotto anche da ferite ed infezioni da patogeni.

Kagami e Suzuki 2005, studiando la tolleranza al freddo dei frutti di pompelmo trattati col calore, hanno isolato mediante DD-PCR cNHX1, un gene che catalizza lo scambio di Na^+ con H^+ attraverso il tonoplasto, regolando il pH intracellulare e i livelli di sodio. Quando i frutti erano tenuti a 20°C, l'aumento dei livelli di mRNA cNHX1 indotto era temporaneo, e rilevabile solo alle 24h ore dopo il trattamento. Al contrario, nel trattamento con calore e successiva frigoconservazione l'aumento osservato era maggiore e più duraturo, da 2 settimane dopo il trattamento con calore a 6 settimane.

Lang *et al.* (2005) hanno studiato le variazioni dell'espressione genica in frutti di *Citrus unshiu* in risposta all'acclimatamento al freddo, identificando sei geni *up-regolati* e due *down regolati*. I geni *up* identificati erano correlati principalmente con la trasduzione del segnale (14-3-3), sintesi di proteine ribosomiali (S23 e L15), trasporto di aminoacidi (AAP6), organizzazione della struttura dei cromosomi, mentre quelli *down* espressi erano correlati con la risposta di difesa nelle piante (miraculina), e il metabolismo della parete cellulare (β -galattosidasi).

In *P. trifoliata*, una specie molto resistente al freddo, Zhang *et al.* (2005) hanno identificato otto geni, principalmente coinvolti nella modulazione osmotica, nella protezione foto-ossidativa e nel regolamento della fotosintesi.

Porat *et al.* (2004) hanno isolato da arancio un gene, down regolato in seguito all'esposizione a bassi livelli di ossigeno, appartenente alla famiglia delle deidrine, proteine della pianta indotte in risposta a vari stress ambientali. Pasentsis *et al.*, (2007) hanno isolato 25 trascritti dal flavedo di agrumi, 11 dei quali erano indotti in seguito a ipossia e/o anossia, undici si esprimevano per costituzione, e tre venivano soppressi da bassi livelli di ossigeno. Tra i geni up-regolati, cinque sono a funzione sconosciuta, mentre i sei geni rimanenti sono coinvolti nell'utilizzazione dei composti di carbonio e dei carboidrati, nel metabolismo degli aminoacidi e nella biosintesi di brasinosteroidi. I geni down-regolati includono una cisteina peptidasi, una deidrina (riportata anche da Porat *et al.*, 2004), ed una sintasi dell'amido granulare.

Fujisawa *et al.* (2003) hanno identificato nella buccia di agrumi diversamente conservati modificazioni dell'espressione genica simili a quella individuata in altre piante sottoposte a differenti tipi di stress. Fra essi, anche alcuni geni che inducono la produzione di auxina e un inibitore di proteinasi.

Geni coinvolti in stress biotici. Tessitori *et al.* (2007) hanno accertato significative alterazioni della trascrizione genica in foglie di cedro Etrog in seguito ad infezione con il *Citrus viroid III* (CVd-III), oggi *Citrus dwarfing viroid* (CDVd). Dei diciotto geni identificati, tredici erano up regolati (extensin-like protein, metallothionein (MT), alcohol-dehydrogenase (ADH), ethylene-responsive element binding protein (EREBP), regulator of gene silencing (RGS), O-SJNBa0033G05.21 protein, flavonol synthase (FLS), prefoldin subunit 2, hedgehog interacting protein-like 1 (HIPL1), recQ DNA helicase, peroxidase, CONSTANTS-like protein (COL), ed una proteina a funzione ignota. Cinque geni, invece, erano down regolati (β -galactosidase, NADPH-dehydrogenase, NHX1, amino acid permease 6 (AAP6), ed una proteina a funzione ignota.

Eccetto per due geni che codificano per proteine a funzione sconosciuta, i rimanenti geni sono coinvolti principalmente nelle risposte di difesa della pianta a stress (MT, ADH, FLS, recQ DNA helicase, peroxidase), trasduzione del segnale (HIPL1), trasporto di aminoacidi (AAP6), metabolismo delle proteine (prefoldin), struttura della parete cellulare (extensin, β -galactosidase), ed altre funzioni (NHX1 eNADPH-dehydrogenase).

Due dei geni up-regolati (EREBP and COL) sono fattori di trascrizione che coordinano l'espressione genica a valle della via della trasduzione del segnale da stress. Di particolare interesse è il fatto che il livello di espressione di un gene soppressore cellulare dell'RNA silencing (RGS) aumenta in seguito all'infezione con CDVd. Poiché l'RNA silencing è un meccanismo chiave di difesa della pianta contro molecole di RNA invasive (Bass 2000; Wang *et al.*, 2004), l'induzione di RGS scatenata dall'infezione del CDVd supporta l'ipotesi che i viroidi possono evadere il silenziamento genico dell'ospite attivando meccanismi endogeni che regolano negativamente l'attività dell'RNA silencing.

Successivamente Rizza *et al.* (2007) hanno dimostrato che tra i geni up-regolati, particolarmente interessante è l'attivazione di un soppressore dell'RNA silencing dell'ospite, riportato come modulatore della patogenicità nei viroidi e nei virus, così come l'attivazione di altri geni (metallotionina, alcool-deidrogenasi, ethylene-responsive element binding protein (EREBP), perossidasi e proteina CONSTANS-simile.

Lo studio mediante DD-PCR delle modificazioni nell'espressione genica di *P. trifoliata*, in risposta all'infezione con CTV, ha permesso di identificare differenti geni che potrebbero essere coinvolti indirettamente nella risposta globale della pianta all'infezione del virus, così come glutaredoxin, superoxide dismutase (SOD), e GTP pirofosfochinasi (Hernández-Jasso *et al.*, 2004).

6. Materiali e metodi

6.1 Caratterizzazione fenotipica degli isolati di CTV

Selezione degli isolati di CTV. Le indagini sono svolte nella provincia di Catania e precisamente nel comune di Motta Sant'Anastasia, in agrumeti innestati su arancio amaro e citrange Troyer. Le piante innestate su arancio amaro mostravano sintomi di deperimento (Fig. 3 e 4), carenze tipo Zn, seccumi generalizzati e apparato radicale fortemente compromesso. Invece, le piante su citrange Troyer non mostravano alcun sintomo. In alcuni casi i frutti si presentavano ingialliti, più piccoli del normale e di forma a ghianda.

Saggi su piante indicatrici. I saggi sono stati effettuati in cella climatica o in serra, utilizzando una serie di piante indicatrici scelte fra quelle convenzionalmente utilizzate per la individuazione dei diversi biogruppi, secondo la classificazione tipo internazionalmente adottata (Hilf *et al.*, 1995). Semenzali di lima messicana, arancio amaro, cedro Etrog, limone Femminello, pompelmo Duncan e arancio dolce Pineapple, allevati in contenitori di 4 litri contenenti un substrato composto per 2/3 di torba e per 1/3 di terreno vulcanico sterilizzato con calore umido, sono stati inoculati con porzioni di corteccia prelevata da piante di campo con sintomi di deperimento da CTV, o da piante sperimentalmente inoculate. Dopo l'inoculazione le piante sono state capitozzate in modo da consentire l'emissione di una nuova vegetazione.

Per assicurare adeguati livelli nutritivi sono stati usati concimi fisiologicamente acidi ed irrorazioni con soluzioni di microelementi. Tutte le operazioni di potatura sono state effettuate con attrezzi disinfettati con NaOCl (1%) al fine di evitare contaminazioni accidentali. Nelle prove in serra le piante sono state protette con reti in modo da impedire il contatto con afidi o altri insetti.

Al termine dello screening preliminare condotto in campo, sulla base dei test immunoenzimatici e dei saggi su lima messicana sono stati individuati tre isolati denominati SG 29, TAPI e TDV utilizzati nelle successive fasi della ricerca, che ha mirato a valutare gli effetti indotti dai tre isolati su semenzali di arancio amaro di 18 mesi di età allevati in serra in contenitori da 8 litri.

In totale sono state inoculate n. 80 semenzali di 8 mesi di età; n. 20 per ogni isolato e n. 20 come piante controllo sane.

Test immunoenzimatici. Da ogni pianta da saggiare sono state prelevate n. 4 foglie giovani completamente espanse dell'ultimo stacco di vegetazione, rametti o picciuoli successivamente analizzati per l'identificazione del patogeno. I campioni raccolti sono stati omogenati in tampone di estrazione e posti in frigorifero a 4° C per evitare fenomeni di ossidazione. I test sono stati effettuati secondo i protocolli DAS-ELISA o DTBIA, utilizzando una miscela di anticorpi monoclonali della ditta Ingenasa (Spagna).

Estrazione degli acidi nucleici. Tutti i campioni, circa 60, risultati positivi a DAS-ELISA o DTBIA sono stati sottoposti ad estrazione di RNA totale mediante Trizol reagent, seguendo il protocollo della ditta produttrice (Invitrogen - Life Technologies) con piccole variazioni al fine di aumentare la resa in RNA totale.

Trattandosi di un virus floematico per l'estrazione sono stati utilizzati 100 mg di picciuoli tagliati a fettine sottilissime dentro una scatola Petri sterile e polverizzati in azoto liquido. Il campione è stato quindi trasferito in un tubo eppendorf da 1,5 ml, posto in ghiaccio per evitare fenomeni di ossidazione. Successivamente è stato aggiunto 1 ml di Trizol freddo, il tubo è stato posto ad agitare e ad incubare per 5 minuti circa a temperatura ambiente.

Il campione è stato centrifugato a 12.000 g per 5 minuti ed il surnatante è stato recuperato in un nuovo tubo sterile, nel quale sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio, e successivamente, agitato vigorosamente per 15 secondi.

Dopo incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti e centrifugazione a 12.000 g per 15 minuti a 2°C, è stata recuperata la fase acquosa di colore bianco e trasferita in un nuovo tubo sterile. Sono stati aggiunti 250 µl di isopropanolo freddo e 250 µl di cloruro di sodio 1,2 M + citrato di sodio 0,8 M, dopodiché è stato agitato vigorosamente.

Nella fase successiva il campione è stato incubato per 10 minuti a -20° C, centrifugato per 10 minuti a 12.000 g a 2°C. Scartato il surnatante, il precipitato è stato sospeso in etanolo al 75% e centrifugato per 5 minuti a 12.000 g di velocità sempre a temperatura di 2° C. Eliminato il surnatante, il precipitato è stato riscosso in 50 ml di H₂O ultra pura.

Retrotrascrizione e successiva PCR (RT-PCR). L'RNA totale estratto è stato utilizzato per la retrotrascrizione e successiva analisi del gene p23. In un volume finale di 25 µl sono stati posti 2 µl di RNA totale, tampone 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 1 µM di primer p23, 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 minuti a 72° C per disattivare gli enzimi.

In un volume finale di 20 µl sono stati posti 5 µl di cDNA ottenuti dalla retrotrascrizione, 25 mM tris-HCl pH 9, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs 0,4 mM di ciascun primer, 0,5 U di Taq DNA polymerase (Invitrogen). La PCR includeva 35 cicli di 10s a 94 °C, 30s a 50° C e 10s a 72 °C ed una elongazione finale di 4 minuti a 72 °C. Come controllo negativo è stato utilizzato RNA totale di semenzali di arancio amaro esente da infezioni ed allevati in serra. I prodotti PCR sono stati analizzati su gel di agarosio al 2%, successivamente colorato con bromuro di etidio.

Analisi del polimorfismo della conformazione del singolo filamento (Single Strand Conformation Polymorphism). Al fine di rilevare eventuali differenze genomiche dei diversi isolati di CTV e di avere informazioni sulla co-presenza di

più varianti di CTV tutti i campioni che hanno dato esito positivo per RT-PCR sono stati analizzati per SSCP. Le prove hanno riguardato il gene p23. Ad 1 µl di cDNA sono stati aggiunti 9 µl di agente denaturante (95% di formamide, 0,05 % di blu di bromofenolo e 0,05 % di xilencianolo).

La miscela è stata incubata per 10 minuti a 99°C, subito dopo posta in ghiaccio e caricata in un mini gel (Biorad) non denaturante di poliacrilammide all'8% (2,66 ml di acrilamide-bisacrilamide 30:1; 2 ml di TBE 5X; 5,230 ml di H₂O; 10 µl di TEMED e 100 µl di APS).

Il gel è stato fatto correre a 4° C per 2 h a 200 V e successivamente colorato in nitrato d'argento secondo il protocollo di Beidler *et al.* (1982). Il gel è stato posto in etanolo 10% per 10 minuti e dopo in acido nitrico 1% per 3 minuti, quindi sono stati eseguiti due lavaggi di 3 minuti con H₂O, dopo i lavaggi il gel è stato posto in una soluzione di nitrato di argento al 2% per 20 minuti e sottoposto a due ulteriori lavaggi ed infine colorato in carbonato di sodio addizionato di formaldeide.

Clonaggio e sequenziamento. I cDNA sono stati purificati dai sali usando il kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) e clonati utilizzando il kit pGEM-T vector system 1 (Promega) all'interno del plasmide linearizzato pGEM-T, che presenta delle terminazioni poli-T (utili per evitare problemi durante la ligazione e potere sfruttare al massimo le terminazioni poli-A tipiche dei prodotti di PCR) ed una lunghezza di 3003 pb. In un volume finale di 10µl sono stati posti 5µl di cDNA quantificato allo spettrofotometro, 1µl di vettore, 1 µl di tampone ligase (Promega) 5X ed 1µl di enzima ligasi (Promega).

I prodotti di ligazione sono stati inseriti in cellule elettrocompetenti di *Escherichia coli* ceppo Sure, poste in tubi eppendorf da 1,5 ml contenenti substrato nutritivo LB + ampicillina e kanamicina in concentrazioni standard e fatte crescere per 1 h a 37°C. Dopo il substrato contenente le cellule è stato posto in piastre di LB-agar contenenti ampicillina e kanamicina ed X-Gal. Le piastre, così preparate, sono state poste ad incubare a 37° C per circa 16h. Per ciascun gruppo di cDNA

20 colonie di colore bianco sono state sottoposte a successiva PCR ed SSCP secondo i protocolli descritti in precedenza.

Studio delle sequenze e confronto con sequenze in "genbank". I cloni di cDNA ottenuti sono stati inviati a sequenziare presso la ditta MWG Eurofins e le sequenze ottenute sono state confrontate tra di loro e con altre sequenze note già presenti in "genbank" e analizzate per omologia mediante l'utilizzo del programma BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, che le compara con tutte le sequenze proteiche depositate sul database di GenBank.

6.2 Analisi differenziale dell'espressione genica

Estrazione dell'RNA totale. Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit Concert Plant RNA Reagent della Invitrogen. Circa 1 gr di foglie sono state istantaneamente congelate con azoto liquido e triturate in un mortaio con pestello, fino ad ottenere una polvere fine. Le polveri azotate ottenute sono state omogeneizzate in Plant RNA Reagent fornito nel kit. Dopo una breve incubazione a temperatura ambiente, la sospensione è stata chiarificata mediante una breve centrifugazione (12.000 g x 2 minuti). Al surnatante è stato aggiunto cloroformio e le fasi acquosa e organica sono state separate tramite centrifugazione a 12.000 g x 10 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata e l'RNA è stato fatto precipitare con isopropanolo. Il pellet ottenuto è stato lavato con etanolo al 75% e risospeso in un volume appropriato di H₂O RNase-free.

La concentrazione e la purezza dell'RNA sono stati determinati spettrofotometricamente (OD260 nm/OD280 nm) utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% in tampone TAE (Tris-acetato-EDTA).

Allo scopo di rimuovere eventuali contaminazioni di DNA genomico dalle preparazioni di RNA è stato usato il kit DNA-free della Ambion. I campioni di RNA sono stati incubati con l'enzima DNasi I ($2\text{U}/\mu\text{L}$), altamente purificato e privo di attività ribonucleasica, a 37°C per 20 minuti. La reazione è stata quindi bloccata con 0,1 volumi di DNase Inactivation Reagent, fornito dal kit.

Amplificazione del cDNA mediante kit RNA image. L'analisi del cDNA, condotta mediante la tecnica del Differential Display, è stata effettuata utilizzando il kit RNImage della GenHunter Corporation. Il kit utilizza tre “*anchored primer*” oligodT denominati H-T11G, H-T11C e H-T11A, per suddividere la popolazione di mRNA successivamente amplificati mediante l'utilizzo di sets di 8 primer arbitrari, denominati H-AP1, H-AP2 e così via.

Per prima cosa sono state approntate tre reazioni di trascrizione inversa, utilizzando tre diversi anchored primer: H-T11G, H-T11A e H-T11C.

In dettaglio, il cDNA è stato ottenuto a partire da $0,5\ \mu\text{g}$ di RNA totale, mediante polimerizzazione con l'enzima MMLV-RT fornito dal kit. L'RNA è stato denaturato a 65°C per 5 minuti, quindi retrotrascritto in un buffer contenente 10 nmoli dei desossiribonucleotidi dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 200 unità dell'enzima MMLV-RT e, come primer di innesco della reazione, quattro pmol di oligo (dT) H-T11(M). La reazione è stata condotta a 37°C per 1 h, dopodiché l'enzima è stato inattivato per 5 min a 75°C . Ciascuna delle tre popolazioni di cDNA ottenute è stata sottoposta a reazioni di PCR in combinazione con i vari primers arbitrari H-AP(n) forniti dal kit, per un totale di 72 combinazioni. La miscela di reazione di ciascuna PCR conteneva, in un volume di $20\ \mu\text{l}$: $2\ \mu\text{l}$ del cDNA a singola elica, 1 U di HotMasterTaq DNA polimerasi (Eppendorf), $0,2\ \mu\text{M}$ di ciascun dei primer H-AP sopra citati, $2\ \mu\text{M}$ di ciascuno dei quattro dNTP, $2\ \mu\text{Ci}$ di $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ in Tris/HCl $25\ \text{mM}$ pH 8,0 contenente KCl $35\ \text{mM}$, MgCl_2 $2,5\ \text{mM}$, EDTA $0,1\ \text{mM}$, DTT $1\ \text{mM}$.

Dopo 40 cicli tutti a bassa stringenza (94°C per 30 sec, 40°C per 2 minuti, 72°C per 30 secondi) e 1 ciclo finale di 5 minuti a 72°C , ciascuna banda di cDNA

identificata, eluita dal gel, è stata reamplificata usando la stessa coppia di primers che l'aveva prodotta. Le condizioni di PCR sono state: in un volume di 50 µl: 10 µl del cDNA eluito dal gel di poliacrilammide/Urea, 1 U di HotMasterTaq DNA polimerasi (Eppendorf), 0,2 µM di primer H-AP, 0,2 µM di primer H-T11, 0,2 mM di ciascuno dei quattro dNTP, in Tris/HCl 25 mM pH 8 contenente KCl 35 mM, MgCl₂ 2,5 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM. I campioni, reamplificati sono stati caricati su gel d'agarosio all'1,2 %, in tampone TAE (Tris-acetato di sodio-EDTA) 1X.

Dopo reamplificazione, le bande sono state purificate con il kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf) e caricate su gel di agarosio all'1,5%, al fine di quantizzarle. Come marker è stato usato il Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Clonaggio del cDNA. Ciascuna banda di cDNA purificata (4 µl) è stata inserita nel vettore plasmidico pCR4, già linearizzato, contenuto nel kit TOPO TA Cloning (Invitrogen)⁹, mediante incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti. Cellule di *Escherichia coli* TOP10F' sono state allevate su terreno contenente ampicillina. Inoltre, pCR4 mostrava diretta selezione dei ricombinanti, mediante la repressione di un gene letale (*ccdB*) per *E. coli*, fuso all'estremità carbossilica del frammento LacZα. Due µl di miscela proveniente dalla reazione di produzione del plasmide ricombinante sono stati aggiunti a 40 µl di cellule TOP10F' ed i campioni sono stati incubati su ghiaccio per 30 minuti. Lo shock termico è stato effettuato mediante incubazione a 42° C per 30 secondi. Al termine di questa reazione, ai campioni sono stati aggiunti 250 µl di SOC medium e le cellule batteriche fatte crescere a 37° C per 1 h. Dopo tale periodo, 50 µl della coltura sono stati piastrati su terreno solido (LB Agar + ampicillina 100 µg/ml) e le piastre incubate a 37° C per 16 h, per permettere la crescita dei batteri ricombinanti.

⁹ Tale vettore determina la resistenza all'antibiotico ampicillina da parte del batterio ospite; inoltre lega covalentemente l'enzima topoisomerasi I che catalizza la reazione di ligasi tra l'inserito e il vettore.

Isolamento del DNA plasmidico e sequenziamento del cDNA. Il DNA plasmidico contenente il frammento di cDNA di interesse è stato purificato utilizzando il Kit Qiaprep Plasmid kit (Qiagen) basato sul metodo della lisi con alcali. Una singola colonia batterica del ceppo opportunamente trasformato con il plasmide contenente il frammento di DNA esogeno è stata inoculata in 5 ml di substrato LB (Luria-Bertani) medium contenente ampicillina (100 µg/ml) e fatta crescere a 37°C per 16 h. La coltura è stata poi centrifugata a 3000 g per 15 minuti ed il pellet batterico risospeso in tampone Tris-HCl 50 mM pH 8 contenente EDTA 10 mM. Successivamente la sospensione batterica è stata lisata in condizioni alcaline ed il lisato neutralizzato in un tampone ad elevata concentrazione salina. Il DNA plasmidico è stato quindi adsorbito su una colonnina di gel di silice e separato da RNA, proteine ed altri componenti cellulari. L'eluizione finale è avvenuta mediante Tris 10 mM pH 8.

Ciascun frammento di cDNA clonato nel plasmide pCR-4 è stato sequenziato presso il servizio di sequenziamento di PRIMM Biotech. Come primers di innesco della reazione sono stati usati due oligonucleotidi complementari ai promotori T7 e T3, presenti sul plasmide alle due estremità del frammento inserito, i quali permettono di far avvenire la reazione di sequenziamento su entrambe le catene del DNA.

Reverse Northern blot. I livelli di espressione dei prodotti genici identificati sono stati analizzati mediante Reverse Northern dot-blot, che ha il vantaggio di poter confrontare simultaneamente più cloni in un unico esperimento di ibridazione. Essi comprendono 18 geni, di cui 13 up regolati in seguito all'infezione con il viroide, e 5 down regolati, eccetto 2 geni che codificano per proteine a funzione sconosciuta, i rimanenti geni risultano essere coinvolti principalmente nelle risposte di difesa delle piante a stress (MT, ADH, FLS, recQ DNA helicase, perossidasi), trasduzione del segnale (HIPL1), trasporto di aminoacidi (AAP6), metabolismo delle proteine (prefoldin), struttura della parete cellulare (extensin, β -galattosidasi), ed altre funzioni (NHX1 e NADPH-deidrogenasi). Due dei geni up

regolati (EREBP e COL) sono fattori di trascrizione che coordinano l'espressione genica a valle della via della trasduzione del segnale da stress. Un terzo gene agisce da soppressore cellulare dell'RNA silencing (RGS).

Aliquote (150 ng) di ciascun cDNA in esame sono stati denaturati con 0,5 N NaOH/0,5mM EDTA a 95°C per 5 minuti e poi neutralizzati con 0,75 M CH₃COONa, pH 5. Dopo aver portato il volume a 110 µl, aliquote (50 µl) di ogni campione sono state blottate, in duplicato, su due filtri di nylon (Immobilon Ny+, Millipore) mediante l'apparecchio Bio Dot (Biorad). I filtri, lavati con SSC 6X e messi ad asciugare su carta 3MM, sono stati sottoposti a UV-crosslinking ad una energia di 30 mJ/cm², allo scopo di fissare il DNA sugli stessi. I due filtri sono stati preibridati nel buffer di ibridazione UltraHyb (Ambion) a 42°C per 50 minuti.

Mediante retrotrascrizione con il kit Reverse Prime cDNA Labeling kit (GenHunter Corporation) sono state preparate due sonde cDNA a singolo filamento. L'RNA totale estratto (20 µg) da piante inoculate e non, è stato denaturato a 65°C per 5 minuti e retrotrascritto in buffer contenente 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM ditiotreitolo (DTT), 75 mM dATP, 75 mM dTTP, 75 mM dGTP, 20 unità del- l'inibitore delle ribonucleasi SuperaseIN (Ambion), 50 µCi di [α -³²P] dCTP, 200 unità dell'enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e, come primer di innesco della reazione, 200 nM del primer T20, fornito dal kit.

La reazione è stata condotta a 42°C per 1 h, dopodichè l'enzima è stato inattivato per 15 minuti a 70°C. Al fine di eliminare i nucleotidi non incorporati in esso, le sonde sono state purificate per gel-filtrazione su colonnine cromatografiche Bio-Spin P30 della Biorad. Dopo eluizione le sonde sono state raccolte in eppendorf sterili e ne è stata misurata la radioattività con uno scintillatore Packard.

Le sonde (5×10^6 cpm/ml) sono state denaturate a 94°C per 5 minuti e ibridate separatamente con uno dei due filtri a 42°C per 16 h in UltraHyb buffer. Al termine, i filtri sono stati lavati 2 volte per 5 minuti in soluzione SSC 2X, SDS

0,1% (lavaggio a bassa stringenza) e poi 2 volte per 15 minuti in SSC 0,1X, SDS 0,1% (lavaggio ad alta stringenza).

Il segnale radioattivo è stato rilevato mediante un Phosphorimager (Storm Imaging System, GE Healthcare) e la quantificazione effettuata mediante il software Image Quant installato sullo strumento.

Trasferimento dell'RNA su filtro (blotting). Dopo elettroforesi, il gel è stato lavato brevemente in DEPC-H₂O ed incubato in SSC 20X (Sodio cloruro 3M, Sodio citrato 0,3M) per 30 minuti (2 volte). L'RNA è stato quindi trasferito (blotting) dal gel di agarosio ad una membrana di nylon (Immobilon Ny+, Millipore) per capillarità per 16 h, usando come soluzione di trasferimento SSC 20X. Al termine del blotting, il filtro è stato incubato in SSC 6X per 5 minuti, e l'RNA fissato sulla membrana mediante irraggiamento con raggi UV (254 nm), ad una energia di 30 mJ/cm², usando l'apparato BioLink BLX-254 della EuroClone.

Marcatura delle sonde di cDNA. I frammenti di cDNA in esame (20-25 ng), ottenuti da cedro Etrog, dopo essere stati opportunamente reamplificati per PCR, sono stati marcati radioattivamente mediante il metodo “random priming” utilizzando 30 µCi di [alfa-³²P]dCTP con attività specifica di 3000 Ci/mmol.

Ibridazione dei filtri. La membrana con l'RNA totale immobilizzato, è stata preibridata in ULTRAhyb buffer (Ambion) a 42°C per 30 minuti in un apposito incubatore (Hybaid). L'ibridazione è stata effettuata nello stesso buffer, dopo aver aggiunto la sonda di cDNA precedentemente marcata (5X10⁶ cpm/ml), a 42°C per 16 h. Al termine, la membrana è stata lavata (2 volte in SSC 2X contenente SDS 0,1% per 5 minuti a 42°C e 2 volte in SSC 0.1X contenente SDS 0,1% per 15 minuti a 42°C) e asciugata all'aria è stata esposta in un “phosphor screen” (GE Healthcare) per 12 h. Per l'acquisizione dei dati è stata utilizzata un “PhosphorImager” (Storm Imaging System, GE Healthcare), munito di software ImageQuant (GE Healthcare) per la quantizzazione del segnale radioattivo. Le variazioni nel livello

di espressione sono state calcolate dividendo il valore relativo al campione inoculato per quello relativo al controllo.

Real Time-PCR. Sulla base delle sequenze nucleotidiche di geni espressi in cedro Etrog inoculato con CDVd (Tessitori *et al.*, 2007) sono state disegnate delle coppie di primer con prodotti di amplificazione nel range 80-120 pb. L'estrazione dell'RNA totale da piante di arancio amaro, limetta messicana, cedro Etrog, pompelmo Duncan, arancio dolce Hamlin è stata effettuata mediante kit Trizol reagent Invitrogen.

La retrotrascrizione e l'amplificazione sono state effettuate in un unico tubo di reazione in un volume finale di 20 μ l utilizzando Brilliant Sybr Green Master Mix 1X (Stratagene), 0,4 μ M di ciascun primer, 0,4 U di RNase inhibitor (Applied Biosystem), 0,4 U Multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystem), e 5 μ l di RNA totale. Le reazioni sono state eseguite con l'amplificatore Stratagene Mx3000P System seguendo un protocollo che prevede un ciclo di retrotrascrizione a 50°C per 30 minuti, e una denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti e 40 cicli a 95°C per 30 secondi, 60°C per 60 secondi e 72°C per 30 secondi.

Il rilevamento di ogni campione è stato eseguito mediante monitoraggio in tempo reale e l'elaborazione dei dati della fluorescenza (in fase di appaiamento) con il software Mx3000. Tutte le reazioni sono state effettuate in triplice copia. Per la quantificazione relativa dell'espressione genica tutti i dati sono stati normalizzati ai livelli di espressione dell' Elongation Factor EF rRNA come gene housekeeping di riferimento (Cotroneo *et al.*, 2006). La quantificazione relativa dei geni target (MT, EREBP, ADH, PRX, RGS-CAM, AP, CLP) è stata effettuata comparando i Δ Ct (Ct del gene EF sottratto al Ct del gene target). L'attivazione è stata calcolata con l'espressione $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PE Applied Biosystems, users' bulletin 2), riportando i dati come logaritmo in base 10 delle unità relative.

7. Risultati

7.1 Rilevamento e caratterizzazione biologica

Nel 2005 sono stati rilevati alcune piante di arancio dolce Sanguinello su arancio amaro che mostravano leggeri ma evidenti sintomi di inverse pitting sul portainnesto, subito sotto la linea di innesto. . Le piante innestate su arancio amaro mostravano sintomi di deperimento (Fig. 3 e 4), carenze tipo Zn e seccumi generalizzati e l'apparato radicale si presentava fortemente compromesso. In alcuni casi i frutti si presentavano ingialliti, più piccoli del normale e di forma a ghianda.



Figura 3. Appezamento di arancio Valencia innestato su arancio amaro con sintomi di clorosi, giallume e defogliazione causate da infezioni di CTV.



Figura 4. Esito finale dell'infezione con ceppi severi di CTV in piante di arancio Valencia innestate su arancio amaro.

Mediante gli esami visivi e i test immunoenzimatici nell'area oggetto di indagine sono state accertate numerosi casi di piante infette da CTV, con percentuali variabili dal 4 al 41%.

La successiva caratterizzazione degli isolati individuati, al fine di selezionare i ceppi tipo da utilizzare nella ricerca, è stata effettuata attraverso l'inoculazione di piante indicatrici, l'analisi del polimorfismo della conformazione del filamento singolo e l'analisi della sequenza nucleotidica.

Per la caratterizzazione biologica è stato effettuato uno screening preliminare su semenzali di lima messicana allevati in cella climatica, successivamente sono stati selezionati alcuni isolati saggiati in serra con piante indicatrici secondo lo schema suggerito da Garnsey *et al.* (2005).

Al termine dell'indagine sono stati selezionati tre isolati, uno proveniente da piante di arancio Sanguinello dell'età di 30 anni innestate su arancio amaro, uno ottenuto da una pianta di Tarocco Tapi e un terzo da una pianta di Tarocco TDV, entrambe asintomatiche in quanto innestate su citrange Troyer. I profili fe-

notipici ottenuti sulla base dei sintomi osservati sulle indicatrici hanno permesso di riferire l'isolato selezionato al biograppo 4.

Già un mese dopo l'inoculazione i semenzali di lima messicana mostravano decolorazioni delle nervature (“*vein clearing*”) delle giovani foglie e “*water spots*” delle nervature principali, visibili sulla pagina inferiore.

Dopo circa 6 mesi dall'inoculazione, si osservava un inizio di giallume, accorciamento degli internodi e riduzione di crescita, sintomi tipicamente associati ad infezioni di ceppi virulenti di CTV-*seedling yellows* (SY-CTV). Successivamente le foglie iniziavano a incurvarsi a coppa, le nervature fogliari assumevano un colore giallo e suberificavano (*vein corking*).

I semenzali di arancio amaro inoculati con SG29 mostravano clorosi, giallumi, riduzione della lamina fogliare e suberificazione delle nervature. Dopo 6 mesi, si osservava un notevole accorciamento degli internodi e riduzione di taglia (*stunting*) rispetto ai controlli sani (Fig. 5), sintomi accompagnati da un intenso giallume (*seedling yellows*).



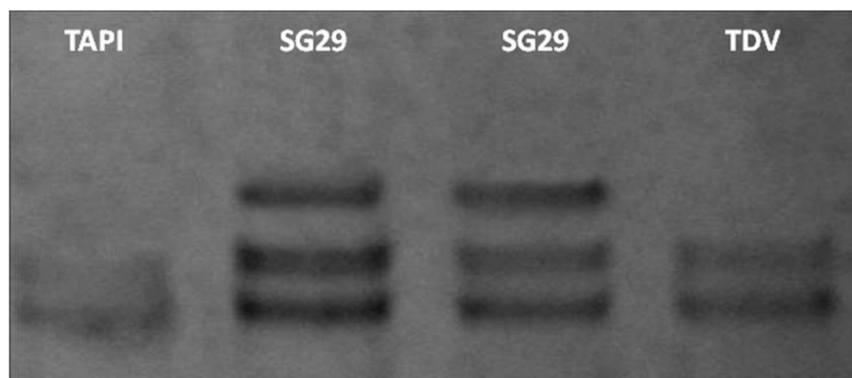
Figura 5. Accorciamento degli internodi e giallumi indotti dal ceppo di CTV virulento isolato da arancio Sanguinello su semenzali di arancio amaro (piante non inoculate a destra)

Su pompelmo Duncan sono stati osservati sintomi molto simili a quelli dei semenzali di arancio amaro e, dopo circa un anno, una leggera butteratura del legno. Su cedro Etrog i sintomi sono stati rilevati già dopo 8 mesi. Le piante di cedro Etrog hanno, nanismo e butteratura del legno già dopo 6-8 mesi.

Gli isolati Tapi e TDV, che erano entrambi asintomatici in campo in quanto innestate su citrange Troyer, hanno indotto decolorazione delle nervature (vein clearing), accorciamento degli internodi e foglia a coppa su limetta messicana, ma hanno mostrato sintomi molto blandi su arancio amaro, cedro Etrog e pompelmo Duncan.

7.2 Caratterizzazione molecolare degli isolati

L'analisi SSCP del gene p23 dei tre isolati ha evidenziato due bande ben distinte nel caso degli isolati TDV e Tapi e 3 bande per l'isolato SG29 (Fig. 6). Il gene p23 è stato successivamente clonato e sequenziato. Le sequenze ottenute sono state depositate nella banca dati di Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sono: con i seguenti numeri di accessione: EU487601; EU487602 e EU487603.



**Figura 6. Analisi SSCP del gene p23 degli isolati TAPI,SG29 e TDV.
I profili ottenuti si differenziano per il bandeggio in gel di poliacrilamide.**

L'analisi per omologia delle sequenze nucleotidiche parziali del gene p23 degli isolati SG29, Tapi e TDV è stata effettuata confrontandole nel database GenBank con quelle dello stesso gene di isolati di cui è nota la sequenza dell'intero genoma. Dal confronto sono emersi diversi livelli di omologia (Tab. 3).

SG29 ha presentato un grado di omologia pari al 99% con le sequenze dei ceppi C271-2, Val-23-4 e CB5. Si tratta di isolati provenienti dal Sud-America, con elevata omologia con gli isolati BaraoB e Val-CB. Il primo appartiene al biogruppo 4 in quanto causa stem pitting su pompelmo, mentre il secondo è incluso nel biogruppo 5 in quanto causa stem pitting anche su arancio dolce.

Tapi clusterizza con i ceppi californiani SY 464-1, 464-2 e 425 con omologia del 99%, mentre TDV presenta omologia del 99% con quelli spagnoli T385, T411 e 385-23-1. Si tratta per lo più di isolati blandi che causano leggeri ingiallimenti delle nervature su limetta messicana e nessun sintomo di stem pitting su pompelmo e arancio dolce.

Questi dati concordano con l'albero filogenetico ottenuto dall'allineamento degli isolati siciliani con la sequenza dei genomi depositati in Genbank (Fig. 7). Tapi e TDV si collocano in un gruppo che include le varianti di sequenza degli isolati blandi T30 e T385 sostenuti da un valore di bootstrap del 99%, mentre SG29 forma un gruppo con i ceppi severi NuaGA, T318, NZ-B18, B165 e SY 568 con valore di bootstrap del 91%.

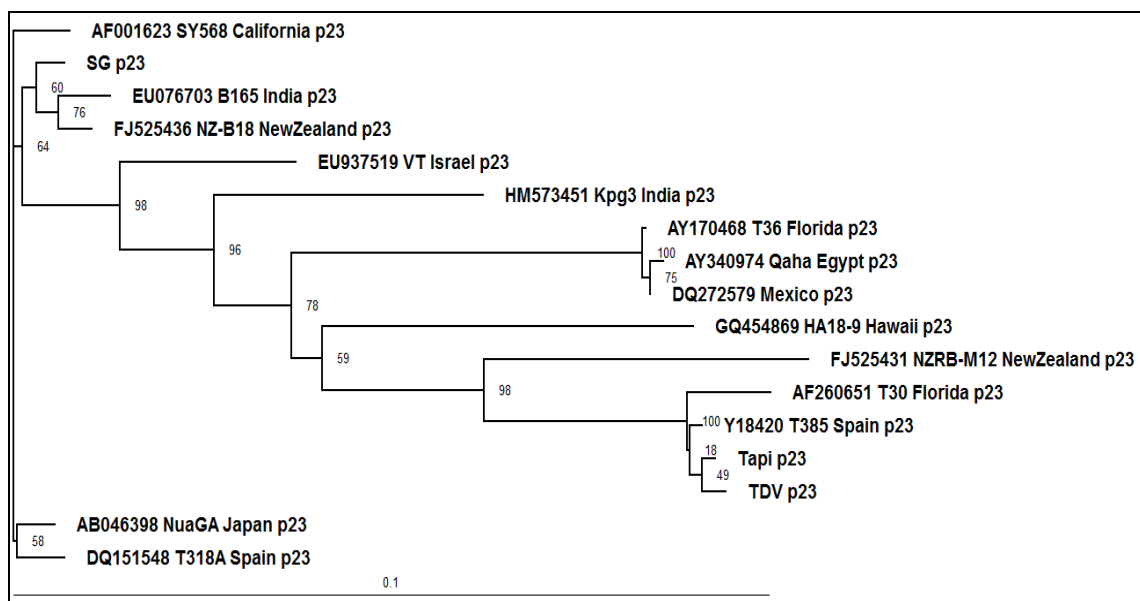


Figura 7. Albero filogenetico del gene p23 degli isolati SG29, Tapi e TDV in relazione con gli isolati di CTV interamente sequenziati. I valori di bootstrap per 1000 repliche in valore percentuale sono indicati in prossimità dei nodi.

Tabella 3. Analisi BLAST delle sequenze p23 di SG 29, TAPI e TDV.

p23	ID Gen-Bank ^a	Omologia ^b	Stato ^c	Autori e anno dell'annotazione
SG29				
C271-2	AY750752	99%	Argentina	Iglesias,N.G., Gago-Zachert,S.P., Robledo,G., <i>et al.</i> , (2008)
Val-23-4	AJ579779	99%	Brasile	Sambade,A., Lopez,C., Rubio,L., <i>et al.</i> ,(2003)
CB5	GQ475048	99%	Brasile	Santos,F.A., Souza,A.A., Coletta Filho,H.D., (2009)
Tapi				
464-2	AY995566	99%	California	Roy,G., Yokomi,R.K., Ullman,D.E, (2005)
464-1	AY995565	99%	California	Roy,G., Yokomi,R.K., Ullman,D.E, (2005)
425	AY995564	99%	California	Roy,G., Yokomi,R.K., Ullman,D.E, (2005)
TDV				
T385	Y18420	99%	Spagna	Vives,M.C., Rubio,L., Lopez,C., <i>et al.</i> , (1999)
T411	Y18368	99%	Spagna	Ayllon,M.A., Lopez,C., Navas-Castillo,J., <i>et al.</i> , (2006)
385-23-1	AJ579762	99%	Spagna	Sambade,A., Lopez,C., Rubio,L., (2003)

^aNumero identificativo dell'annotazione nella banca dati di GenBank

^b Livello di omologia risultante dall'analisi BLAST

^c Luogo di identificazione dell'isolato

7.3 Analisi delle modificazioni dell'espressione genica mediante reverse Northern blot

Per la valutazione delle modificazioni dell'espressione genica indotte in semenzali di arancio amaro dall'isolato virulento SY CTV SG29 sono state utilizzate 23 sonde geniche, generate da uno studio delle modificazioni che si verificano in piante di cedro Etrog inoculate con *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), un viroide che provoca esclusivamente una lieve riduzione della taglia degli agrumi (Tessitori *et al.*, 2007).

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 5 a confronto con quelli relativi alla modificazione che essi presentano in risposta all'infezione con CDVd. Come si può rilevare i semenzali di arancio amaro inoculati con il ceppo SG29 mostrano l'attivazione di 10 geni che si attivano anche in seguito all'inoculazione con CDVd.

Dal confronto tra i risultati ottenuti è emerso che i rispettivi profili di espressione dei 23 geni presi in considerazione sono numericamente differenti per i due binomi patogeno/pianta ospite.

Tutti i valori in aumento infatti sono risultati generalmente di ampiezza più contenuta rispetto a quella osservata in foglie di cedro infette con CDVd. Nel caso di metallotioneina e alcool deidrogenasi le differenze riscontrate sono particolarmente rilevanti. La metallotioneina ha presentato un valore di +5,3 nel sistema CDVd/cedro e +1,55 nel sistema SY CTV/arancio amaro; mentre i valori di alcool deidrogenasi sono stati +4,63 per CDVd vs 0 con CTV.

Particolarmente interessante appare il fatto che il gene *rgs-caM* (*regulator of gene silencing- calmodulin-like protein*), codificante per un soppressore del silenziamento genico risulta essere attivato in entrambi i sistemi: in CDVd/cedro era di +2,7 in CTV/arancio amaro +1,2.

Tabella 5. mRNA rilevati mediante Northern blot in piante di cedro Etrog e arancio amaro rispettivamente inoculate con CDVd e CTV.

Geni modificati	Livelli di mRNA	
	Cedro + CDVd	Arancio amaro + CTV
Hypothetical protein	- 2.3	+ 1.76
β -galactosidase	- 1.54	+ 1.67
Extensine-like protein	+ 1.31	+ 1.93
1-PI-3P-5kinase	---	---
NADPH-dehydrogenase	- 1.33	+ 1.55
Metallothionein	+ 5.3	+ 1.55
NHX1(Na ⁺ -H ⁺ exchanger)	- 1.56	---
Alcohol-dehydrogenase	+ 4.63	---
ERE-binding protein	+ 2.4	+ 1.66
Digalactosyldiacylglycerol synthase	---	+ 1.98
Regulator of gene silencing	+ 2.7	+ 1.62
Photosystem II reaction center L prot.	---	---
OSJNBa0033G05.21 protein	+ 2.4	+ 1.82
Flavonol synthase	+ 2.1	+ 1.58
Prefoldin	+ 2	+ 1.76
Hypothetical protein	---	+ 1.66
Hedgehog interacting protein-like 1	+ 2.3	---
Maturase K	---	+ 1.65
RecQ DNA helicase	+ 2	+ 1.52
Aminoacid permease 6	- 1.35	---
Peroxidase	+ 2.9	+ 1.51
CONSTANS-like protein	+ 2.9	+ 1.58
Hypothetical protein	+ 1.8	---

7.4 Analisi della modulazione di alcuni geni via Real time-PCR quantitativa

Sette tra i geni espressi differenzialmente nelle precedenti analisi Northern, e precisamente metallothioneina, regolatore del silenziamento genico (rgs-CaM), COSTANS-like, EREBP, perossidasi (PRX), alcool deidrogenasi (ADH) e permeasi degli amminoacidi, sono stati scelti per valutare la risposta di alcune specie di agrumi inoculati con CTV SG29. Frammenti dei sette geni sono stati sequenziati e sulle sequenze ottenute sono stati disegnati i primer per l'analisi PCR. Le sequenze ottenute sono riportate nella tabella 6.

Tabella 6. Frammenti di sequenze utilizzati per valutare la risposta di alcune specie di agrumi inoculati con CTV SG29.

Metallothionein
GAGACGACAACGGTGGCTGCAAGTGCAACCCATGCAACTGCAACCCGTGCAACTGCAGCAAATAAGAAACA GATGCGCCATGCGGCCTATGGAATTAATTAACCAGCTGCCTGTTAAAAGCAGATATATGGATCTTTCTTTAA ATAAGAACTAATAGATAGAATCTAAGACCTATGTTTGCTTCTGCTTCGATGGCTTTCTGTGAAAGTTGTAA AATATAGAATAGACTACTGTTTTATGTATT
Alcool-dehydrogenase
TAAATTCGCAAAACAAGTATACAACGGAAAGGCAGTAGAAAAATAACGTTTTACATTATGACCACAAAACAAC AATACTTATAAAGACATCTTTGCAAATATTAATAATTTGAACATGACAATGACACAGACCACCTTGAATTATT TATCTACACAAACTACTCTTCCATCCGGATGATGCATCGGAGACCTTCTCTCTAAGCATGTACTCAAAGGCC TTGTTGATTTCGGGAGATGGGACTGTATGGGTAATGAATTTTCCACTTC
Ethylene-responsive binding protein
GGAGCAAATTACATATTTCTTAAGAGTAATAACAGCACATATACATTTGAGAATCCTGAATCTGAGAAGGTC TTATTTTTCTAGATAATTGAGATGGTTGATTCTTGCAAATCCAGTGCTTCTCTCTTCTTTTCTACTGTTC TTTGTGGAGGGCTATCAGCTCCAGCCTCCAGAGGGAATCAAGATTGCTTTGCGACCCCTCATC
Regulator of gene silencing
ACAACCATTACACCATCATGATATTCTAAATTCATAAAAAATATAATAATCAATATACAAATGTACAAAAC GATCTATGAAGTCACGACATCATGATCCTAAATTCATCAAAATTTAGGACTCCATCACCATTGAGATCAAAAT AAGCAATCATCGACTTACATTCATCATCACTTTTGGACTGCCCTA
Aminoacid permease
GAAAAGTTGTAGCTGACAACCAATTTAAATCACTGAAACCCTAATCCCCCTTAGGGGTTGGGTACGTCAATC GTCCCTGGCATTGAGGCTACAAACACATAATTATTAATAATAAGTAAAAATATTACATCNGTTTCACTCTTC TTGCACAGCTTGGAAGGGCTTGATGCTTGAGGCTTTGGATCAGACCTTGGACGGACCCAACGAGGGCGAC AAGTGAACATATGAAGCAGGACCAGATTAATATTTTCAACCACCCACGCGAATGAAAAATCTTCGTATCTT AGTACGAGCAATGTACATTTCCACCGGAAAAATAAAGTGTAAATGGC
Peroxidase
GCTACACGGCAATTGGAAGCAACCCCGTCAAATTAATTCGATAAGAAAGGTAGCTG GTAGTTATAAACGTACAGCTATCAATGATACAAATTAAGGCTTCAGCTGCGCAAACA CACCCACATCCTTAATTTATTCCGTGGAACAATTATCAACTGATCTTAACAAACCCA CAAGCCCAGCAGCAGCCTAAATTGGTAATTACATTGATATCAGATAGATGAGTGCAA CAAATCTCTGGATTATTAATAACACTGCACTTCTTCGAATCTCCCTTGAGTGCC AGTGAGAACATTCATAGCTCCCATCTCTTCATTGA
CONSTANS-like protein
TCAAGGGCAGGTTTCGGAAGAGAACTGATGCTGAAGTTGAAGTTGATCAAAATGTTCT CCGCAACATTGATGACCGATCCTGGATATGGCATTGTTCCCTTCATTCTAAATCCATC GATGAGTCGAAGAATAGCTCTCAAGATTAGAGGTCTACTGGTTATTACTAAGGTACT ACTACTGTATCGTAGCTCTCTTAATATAATTATCCGAATCAATGAGATATTTCTTT TGCCGTATAGTAATTTCTTGCTATTTCATGCAACCAGGACACTGCTATGTTGTAAA TGTATGTATATTCATAATTTTGAATTAATTCATCACGAT

L'analisi condotta tramite real time-PCR quantitativa su semenzali di lima messicana, arancio amaro, pompelmo, arancio dolce e alemow hanno dato risultati interessanti, anche se non sempre in linea con quelli del Northern (Tab. 7 e Graf. 2).

Nei semenzali di arancio amaro, il gene della metallotioneina (MT), il regolatore del silenziamento genico (rgs-CaM) e il gene COSTANS-like, sono risultati sovra espressi, così come osservato nell'analisi Northern blot; di contro l'espressione dei geni dell'EREBP e della perossidasi (PRX) hanno mostrato un differente comportamento, risultando sotto espressi. I geni codificanti per l'alcool deidrogenasi (ADH) e la permeasi degli amminoacidi (AP), non rilevati dall'analisi Northern blot, risultavano essere rispettivamente sotto e sovra espressi, grazie al maggiore potere risolutivo della real time-PCR.

Anche per quanto attiene il comportamento delle diverse specie saggiate, la risposta dei diversi geni non è stata omogenea. I geni per l'ADH e per la PRX, coinvolti nella risposta generale ai fattori di stress, hanno mostrato lo stesso pattern di espressione (sotto espressi) in tutti gli ospiti saggiati. Viceversa, rgs-CaM, AP e CLP sono risultati sotto espressi in cedro Etrog, pompelmo e arancio dolce e sovraespressi nell'arancio amaro. Il gene dell'EREBP era attivato solamente nel cedro Etrog e nell'arancio dolce, e MT solo nell'arancio amaro e nell'arancio dolce.

Per un ulteriore approfondimento è stata analizzata anche l'ampiezza della modificazione genica in risposta all'inoculazione con isolati di CTV di differente virulenza. L'analisi ha riguardato due specie di agrumi, arancio amaro e lima messicana, e due isolati di CTV, SG29 (virulento) e TDV (blando) (Tab. 6 e Graf. 1).

I dati acquisiti rivelano che l'infezione di TDV induce un diverso pattern di espressione di alcuni geni, che apparentemente sono diversamente modificati in relazione alla virulenza del ceppo di CTV inoculato.

Nel caso in cui a essere inoculato è un ceppo blando come TDV nell'arancio amaro il gene di EREBP è risultato sovra espresso mentre CLP ha mostrato un diverso pattern di espressione risultando sottoespresso. Gli altri geni,

pur non subendo un'alterazione così evidente, mostrano nelle piante infette con TDV dei cambiamenti di espressione meno accentuati rispetto alle piante infette con SG29. Nessuna modificazione di espressione è stata invece rilevata nel caso del gene AP.

Le piante di lima messicana non hanno fatto rilevare apprezzabili differenze di espressione se non per il gene PRX che viene represso in presenza di SG29 e leggermente indotto con TDV. Analogamente a quanto rilevato per l'arancio amaro, eccetto che per MT, in cui TDV causa una maggiore induzione, i livelli di alterazione nelle piante infette con il ceppo blando sono quasi sempre minori rispetto a quelle con SG29.

Tabella 6. Livelli di espressione genica in semenzali di arancio amaro e limetta inoculati con un isolato virulento e uno blando.

	AD	EREB	MT	RGS	AP	CLP	PRX
Arancio amaro SG	-0,32	-0,32	1,01	1,41	0,40	0,72	-1,32
Arancio amaro TDV	-0,06	0,39	0,15	0,61	0,37	-0,17	-0,50
Lima messicana SG	-0,72	-1,07	0,05	1,15	-0,08	0,00	-1,38
Lima messicana TDV	-0,36	-0,13	0,58	0,91	0,06	-0,13	0,05

Tabella 7. Livelli di espressione genica in varie piante ospiti inoculate con un isolato virulento di CTV.

	AD	EREB	MT	RGS	AP	CLP	PRX
Arancio amaro	-0,32	-0,32	1,01	1,41	0,40	0,72	-1,32
Lima messicana	-0,72	-1,07	0,05	1,15	-0,08	0,00	-1,38
Pompelmo Duncan	-0,17	-2,29	-0,51	-0,86	-0,13	-1,20	-0,46
Cedro Etrog	-0,31	0,14	-0,58	-0,43	-0,19	-0,74	-1,06
Arancio dolce	-0,75	0,54	0,76	-0,19	-0,98	-1,04	-1,95

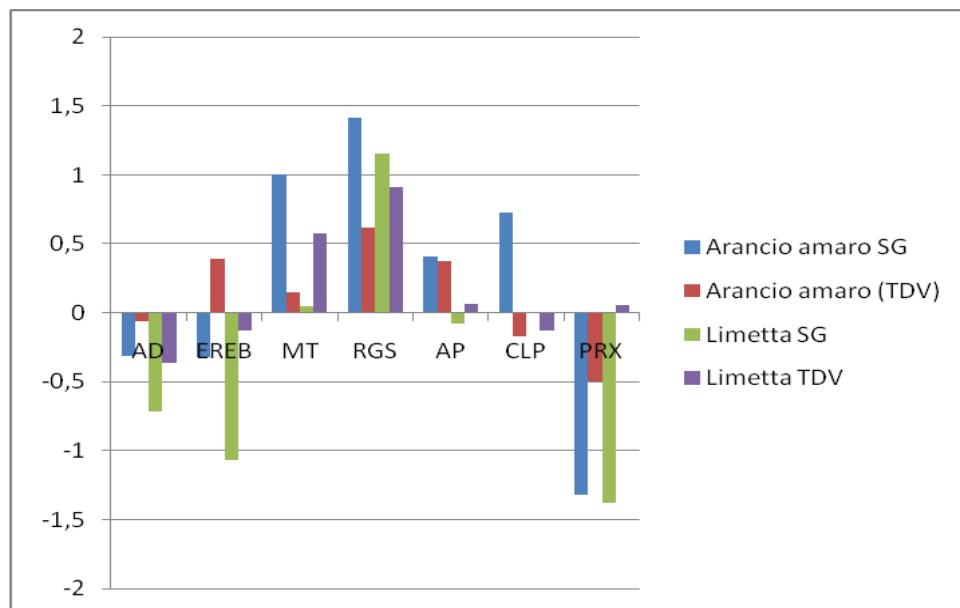


Grafico 1. Livelli di espressione genica indotti da un isolato di CTV virulento (SG29) e da un isolato blando (TDV) in arancio amaro e lima messicana.

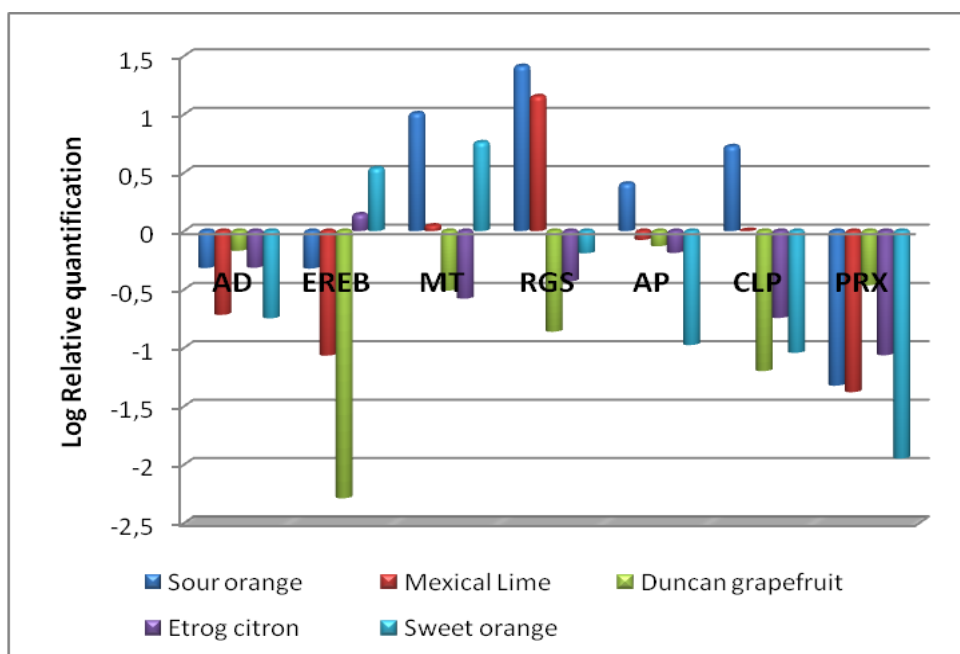


Grafico 2. Livelli di espressione genica indotti da un isolato di CTV (SG29) in varie piante ospiti.

7.5 Analisi mediante Differential Display RT-PCR

L'analisi differenziale (DDRT-PCR), tra il pattern di espressione dell'RNA mes-saggero di semenzali di arancio amaro inoculati con il ceppo SG29 e non inoculati, ha permesso l'individuazione e la caratterizzazione dell'alterazione di altri geni (up e down) a seguito dell'inoculazione con CTV. In un primo fingerprint sono stati identificati 4 nuovi trascritti differenzialmente espressi. Tre di questi risultano essere attivati in seguito all'infezione con CTV, 2 mostrano una elevata omologia di sequenza con 2 diverse sequenze EST di *Citrus sinensis* la cui funzione risulta però sconosciuta, la terza è altamente omologa ad un retrotrasposone di *Arabidopsis thaliana*, il cui ruolo in condizioni di stress biotici e abiotici è largamente riportato in letteratura. L'ultimo trascritto, che risulta invece essere regolato negativamente, codifica per una proteina del citocromo P450.

8. Discussione dei risultati

La ricerca effettuata ha prodotto nuove conoscenze sulla tristeza degli agrumi con riferimento alla virulenza degli isolati presenti nel nostro Paese e alle modificazioni post-infezionali dell'espressione genica.

I sintomi di “inverse pitting” rilevati in piante di arancio Sanguinello innestate su arancio amaro ed i risultati dei saggi biologici, permettono di concludere che l'isolato SY-CTV SG29 è riferibile al biogrupo 4, secondo la classificazione internazionalmente accettata (Hilf e Garnsey, 2005). In considerazione delle dimensioni del fusto, delle branche delle piante interessate e della virulenza dell'isolato SG29 è ragionevole ipotizzare che l'infezione sia avvenuta in tempi relativamente recenti.

Le analisi molecolari hanno accertato un'identità nucleotidica del 99% con alcuni ceppi del Sud America (BaraoB, Val-CB e C271-2), dimostrando che il ceppo selezionato è differente dagli altri finora descritti in Sicilia, in Puglia e in Calabria (Davino *et al.*, 2005; Barbarossa e Savino, 2006; Filetti *et al.*, 2009). Questo è il primo isolato di CTV rinvenuto in Italia assimilabile ad isolati del Sud America.

Gli altri due isolati, TDV e Tapi, rinvenuti su due appezzamenti limitrofi in giovani piante innestate su citrange Troyer, e quindi asintomatiche, sono riferibili al biogrupo 2. L'analisi molecolare li assegna ad un gruppo costituito da ceppi di CTV californiani e spagnoli, complessivamente blandi.

E' interessante notare che i due biogruppi rinvenuti provengono da due agrumeti ubicati a distanza limitata, in cui le prime coltivazioni di agrumi risalgono agli anni sessanta; l'impianto dei due agrumeti è avvenuto in date differenti, le cultivar interessate sono diverse, così come i vivai da cui le piante provengono. Tutti questi elementi, oggi supportati dai risultati di test biologici su indicatori standard e da analisi di similarità molecolare, confermano che, negli anni, in Italia si è verificata più di una introduzione di CTV, da diversi areali di provenienza, e che la successiva diffusione è avvenuta attraverso vettori locali. E' verosimile che

le infezioni siano rimaste mascherate per lungo tempo fino a quando le popolazioni afidiche locali hanno selezionato isolati di CTV trasmissibili e piante ospiti recettive, dando luogo al variegato quadro di manifestazioni fenotipiche oggi presenti nel nostro Paese. L'insieme di queste conoscenze contribuisce a comporre il quadro della composizione della popolazione del virus nel nostro Paese e di disporre finalmente di isolati di CTV di virulenza accertata. Elementi che risultano utili per avviare ricerche avanzate per nuove strategie di difesa contro questa grave malattia.

Del tutto originali sono i risultati relativi alle modificazioni dell'espressione genica post-infezionale dell'arancio amaro e alla risposta di lima messicana, alemow, limone Femminello e cedro Etrog all'inoculazione con un isolato virulento e, ancorché ancora preliminari, con un isolato blando di CTV.

L'unico lavoro pubblicato sull'argomento identifica e classifica i cambiamenti nell'espressione genica indotti su piante di lima messicana da due isolati di CTV virulento (T305) e blando (T385) (Gandia *et al.*, 2007). Gli autori riportano che in risposta ad infezioni con l'isolato T305 sono stati rilevati cambiamenti dell'espressione statisticamente significativi ($P \geq 0,01$) su 334 geni, mentre l'infezione con T385 non ha indotto modificazioni significative. Fra i geni modificati 145 non hanno significativa similarità con sequenze note e 189 sono stati classificati in 7 categorie funzionali attraverso Gene Ontology. I geni connessi con la risposta allo stress ed alla risposta della pianta a patogeni rappresentavano la categoria principale e includevano il 28% dei geni indotti. In seguito a processi infettivi, infatti, le piante di agrumi inducono, l'espressione di geni interessati alla produzione di proteine coinvolte nella resistenza sistemica indotta (SAR), di geni di proteine della famiglia PR (pathogenesis-related proteins), di proteine da shock termico (heat shock proteins). Si registra, altresì, la produzione di enzimi coinvolti nella detossificazione dell'ossigeno (ROS) e nella sintesi dell'etilene.

Sulla base dei risultati ottenuti nella presente ricerca, tra i 23 geni dell'arancio amaro analizzati mediante Northern blot in risposta a CTV, 5 rientra-

no nella categoria funzionale dei geni indotti da stress e di difesa (MT, ADH, FLS, recQ DNA elicasi, PRX). In accordo a quanto rilevato anche da Gandia *et al.*, (2007) questi geni vengono sovra-espressi, così come rilevato nella presente ricerca. In particolare, il gene MT della famiglia delle metallotioneine (MT), testato anche in real-time PCR, potrebbe avere un ruolo in risposta a CTV nella riduzione della concentrazione degli ioni metallici liberi nella cellula e prevenire un aumento delle specie reattive dell'ossigeno prodotte in condizioni di stress. Il gene denominato *prefolding* e sovraespresso nelle piante di arancio amaro inoculate con CTV, rientra nella categoria dei geni del metabolismo proteico che rappresentano il 16% dei geni alterati secondo l'analisi microarray. Tra i geni alterati si evidenziano anche EREBP e CLP, fattori di trascrizione che attivano a loro volta l'espressione di altri geni a valle nella via di trasduzione del segnale in risposta a stress.

Nelle condizioni sperimentali in cui si è operato la ricerca ha messo in evidenza che l'infezione di un isolato aggressivo di SY- CTV induce in arancio amaro una risposta genica diversamente espressa rispetto a piante di cedro Etrog inoculate con CDVd. Alcuni geni sono up regolati e altri down, come si evince dai livelli dei trascritti:

- a. nove geni sono attivati in entrambi i sistemi, con livelli di risposta superiore nel binomio CDVd/cedro,
- b. un gene con livelli di attivazione superiori in CTV/arancio amaro,
- c. tre geni sono attivati in CTV e non modificati in CDVd,
- d. tre geni attivati in CDVd non modificati in CTV,
- e. quattro geni attivati solo nelle infezioni di CTV o di CDVd,
- f. due geni non modificati in entrambi binomi.

L'esame nel dettaglio è riportato diseguito.

Risulta pertanto evidente che CTV e CDVd inducono nelle rispettive piante ospiti un differente profilo di espressione dei geni presi in considerazione. Tutti i

valori in aumento sono risultati generalmente inferiori rispetto a quelli osservati in foglie di cedro infette con CDVd. Particolarmente rilevanti sono le differenze riscontrate nel caso di metallotioneina (da +5,3 a +1,55), alcool deidrogenasi (+4,63 vs 0), regolatore del silenziamento genico(+2,7 vs +1,2), aminoacido permeasi (-1,35 vs 0) e altre.

a. Geni attivati in entrambi i sistemi considerati, con valori più elevati in CDVd

- *Metallotioneina*, una proteina coinvolta in risposte cellulari a fattori di stress, capace di sequestrare ioni di metalli pesanti e specie ossigeno-reattive (ROS) (Baker e Orlandi, 1995). Il valore in CTV/arancio amaro è stato meno di un terzo rispetto a CDVd/ cedro (+1,55 vs +5,3). Anche l'analisi real time conferma questo andamento con un valore di induzione pari a 1,01 ($\log_{10}$) nell'arancio amaro inoculato con CTV.
- *Ethylene-responsive binding protein*, attiva gli elementi di risposta presenti sui geni che regolano la formazione dell'etilene, notoriamente connessa a stress biotici e abiotici. I livelli di espressione sono stati pari a +1,66 per CTV e +2,4 per CDVd. Questo dato non è stato confermato dall'analisi real time in cui l'espressione dell' EREBP risulta essere repressa dopo l'infezione di CTV di -0,32 ($\log_{10}$).
- *Regolatore del silenziamento genico*, una proteina che determina la soppressione del fenomeno del silenziamento genico (Anandalakshmi *et al.*, 2000). I livelli per CTV sono pari a +1,62 contro +2,7 per CDVd. Anche l'analisi in real time-PCR ha messo in evidenza nell'arancio amaro una sovra espressione dell'*rgs*-Cam pari a + 1,41($\log_{10}$).
- *Proteina contenente domini C2* che legano il calcio. Essi sono presenti in un gran numero di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale e nel traffico di membrane (Benes *et al.*, 2005). Valori per CTV sono stati +1,82 e per CDVd +2,4.
- *Flavonol sintasi* è un enzima chiave della via biosintetica dei flavonoli, potenti antiossidanti che giocano un ruolo fondamentale nei processi difensivi degli

organismi vegetali nei confronti di patogeni (Verhoeven *et al.*, 2002). Il valore per CTV è stato +1,58, mentre per CDVd è stato +2,1.

- *Prefoldina* forma un complesso proteico che accompagna le proteine non ancora in conformazione nativa al sistema delle chaperonine di tipo II che ne favoriscono il corretto folding (Okochi *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2001). I valori di CTV e CDVd sono poco differenti (+1,76 vs +2,0).
- *RecQ DNA elicasi* è un enzima coinvolto nei processi di ricombinazione e riparazione del DNA e nel mantenimento della stabilità genomica (Ries *et al.*, 2000). La sua espressione nel sistema CTV è stata +1,52, mentre nel sistema CDVd +2,0.
- *Perossidasi*, appartiene alle perossidasi di classe III, aumenta considerevolmente in situazioni di stress o attacco di patogeni (Hiraga *et al.*, 2001). Nel caso di CTV il livello di espressione è stato +1,51, in CDVd +2,9.
- *CONSTANS-like proteins*, una classe di proteine fondamentali nell'induzione della fioritura, ha fatto rilevare +1,58 nelle infezioni di CTV e +2,9 in CDVd. Nell'analisi in real time il valore di sovra espressione è stato pari a 0,72 (log₁₀) nelle piante di arancio amaro inoculate con CTV.

b. Geni attivati in entrambi i sistemi con valori più elevati in CTV

Estensin-like protein, una glicoproteina abbondante nelle piante superiori, in quanto componente strutturale della parete cellulare (Robert e Shirsat, 2006). In CTV arancio amaro il valore è stato +1,93 in CDVd/cedro +1,31.

c. Geni attivati nel sistema CTV, repressi in CDVd

-*Beta-galattosidasi*, un enzima coinvolto nel metabolismo della parete cellulare con un ruolo importante nello sviluppo del frutto, che ha un livello +1,67 in CTV e -1,54 in CDVd.

-*NADPH-deidrogenasi*, un enzima mitocondriale della catena respiratoria, insensibile al rotenone (Geisler *et al.*, 2001), con valori di +1,55 in CTV e -1,33 in CDVd.

-Proteina ipotetica, +1,76 in CTV e -2,3 in CDVd.

d. Geni attivati in CDVd e non modificati in CTV

-*Alcool deidrogenasi*, un enzima associato alla fermentazione glicolitica, che facilita la sopravvivenza della cellula durante episodi di stress da ipossia, freddo, essiccamento (Garabagi *et al.*, 2005). Ampiamente presente nelle infezioni di CDVd (+4,63), nell'analisi Northern non è stato modificato in CTV/arancio amaro, così come confermato anche nell'analisi real time-PCR che mostra un livello di sotto espressione pari a $-0,32$ ($\log_{10}$).

-*NHX1*, che catalizza gli scambi tra Na^+ e H^+ attraverso la membrana vacuolare e regola il pH interno, il volume cellulare e i livelli citoplasmatici e vacuolari di sodio (Kagami e Suzuki, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2001; Apse *et al.*, 2003). Sottoespresso nel binomio CDVd (-1,56).

-*Aminoacid permease*, un trasportatore di aminoacidi dal sistema radicale agli organi metabolicamente attivi della pianta. Sottoespresso in CDVd (-1,35), non è stato modificato in CTV e presenta un leggero livello di sovra espressione pari a $0,4$ ($\log_{10}$) nell'analisi real time.

e. Geni attivati solo nelle infezioni di CTV o di CDVd

- *Maturasi K*, attivato solo in CTV

- *Digalattosil-diacilglicerolo sintasi*, attivato solo in CTV

- *Hedgehog interacting protein-like1*, attivato solo in CDVd, appartiene a una classe di proteine legate alle membrane mediante glicosilfosfatidilinositolo (GPI) (Ikezawa, 2002). La sua funzione nelle piante non è conosciuta.

- *Proteina ipotetica*, a funzione sconosciuta, attivato solo in CDVd

f. Geni non modificati in entrambe le infezioni:

- *1-PI-3P-5chinasi*;

- *Centro di reazione del fotosistema II*

Sulla base dei risultati ottenuti nel reverse Northern blot sono stati scelti sette geni (MT, EREBP, ADH, PRX, rgs-CaM, AP, CLP) per determinarne i livelli di risposta in diversi ospiti, mediante analisi real time-PCR quantitativa. I risultati ottenuti hanno permesso di accertare una risposta differenziata in piante a diversa suscettibilità al virus. In particolare, i geni AP e CLP risultano sottoespressi in cedro Etrog, pompelmo Duncan e arancio dolce, mentre vengono attivati nell'arancio amaro. Solo nel cedro Etrog e nell'arancio dolce l'infezione di CTV induce l'espressione di EREBP che è invece represso nell'arancio amaro, nella limetta e nel pompelmo. Le metallotioneine, a loro volta, coinvolte nell'azione protettiva in risposta a stress, subiscono una forte induzione solo nell'arancio amaro e nell'arancio dolce risultando invece sotto espresse negli altri ospiti.

Particolarmente interessante appare la risposta di rgs-CaM, noto come soppressore del gene RNA silencing, un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA a doppio filamento sono in grado di inibire la traduzione di un mRNA "target" regolando negativamente i livelli di espressione delle proteine da esso codificate. Tale meccanismo opera durante la difesa contro l'attacco di organismi patogeni che funzionano sia da induttori che da bersaglio dell'apparato di RNA silencing dei loro ospiti (Carbonell *et al.*, 2008). L'espressione di questo fattore di trascrizione fortemente indotta sia da CDVd che da CTV dimostrerebbe che i patogeni sono in grado di eludere il meccanismo di difesa delle piante bloccando l'attività di gene silencing dell'ospite.

In tal senso lascerebbe concludere il fatto che in piante molto suscettibili, e con gravi sintomi della malattia (clorosi fogliare, suberificazione delle nervature, arresto di sviluppo) l'aumento dei livelli di espressione è risultato 25 volte superiore ai controlli non inoculati nell'arancio amaro e 14 volte nella limetta. Al contrario, in pompelmo, cedro e arancio dolce, che non presentavano sintomi estremamente gravi, l'espressione di questo regolatore non risulta indotta, sebbene il virus fosse presente e la malattia in atto.

Questi risultati fanno ritenere che la regolazione dell'espressione di rgs-CaM sia ospite specifico e abbia un ruolo importante nel regolare il silenziamento

genico delle piante a SY-CTV. L'attivazione genica in risposta all'infezione e la manifestazione sintomatica delle piante considerate suggeriscono l'ipotesi che il virus sia in grado di evadere il meccanismo di difesa della pianta mediante silenziamento genico, aumentando l'espressione di un soppressore.

In base ai risultati di altre prove, inoltre, appare che piante infette con un ceppo blando di CTV, presentano livelli di sovra espressione di rgs-CaM ridotti rispetto a quelle inoculate con l'isolato più aggressivo e solo 4-8 volte superiori rispetto al controllo non inoculato, in arancio amaro e limetta messicana rispettivamente. Nelle piante di limetta, la minore differenza nell'espressione in relazione all'aggressività del ceppo di CTV viene giustificata con la maggiore suscettibilità di questa pianta indicatrice.

L'analisi di piante di arancio amaro a diversi tempi di infezione consente di affermare che non vi è una relazione strettamente connessa tra livelli di espressione genica e tempi di inoculazione e che, superata una soglia minima di 6-8 mesi, i tessuti della pianta rispondono al virus in maniera pressochè analoga o non in maniera quantitativamente lineare.

I risultati ottenuti, ancorché richiedano ulteriori conferme e approfondimenti, costituiscono un primo contributo alle poche conoscenze attualmente disponibili sulla risposta degli agrumi all'infezione di CTV, nel caso in specie SY-CTV. Essi offrono, inoltre nuovi spunti di riflessione e di indagine sul tema più generale della resistenza genetica e sul ruolo che il silenziamento genico assume in Patologia vegetale.

Interessanti prospettive si aprono anche per gli aspetti applicativi che potranno derivarne in relazione allo screening precoce di nuove varietà e ibridi nei confronti CTV e alla valutazione biologica dell'aggressività di biogruppi ed isolati di CTV.

9. Letteratura citata

Albiach-Marti, M.R., da Graça, J.V., Van Vuuren, S.P., Guerri, J., Laigret, F., Cambra, M., Moreno, P. 1996. The effects of different hosts and natural disease pressure on mild isolates of *Citrus tristeza virus* (CTV). pp. 147-153. In: Proc. 13th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV, da Graça, Moreno, P., Yokomi, R.K., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Cambra, M., Garnsey, S.M., Moreno, P. 2000a. Differentiation of *Citrus tristeza virus* isolates by serological analysis of the p25 coat protein peptide maps. *J. Virol. Meth.*, 88: 25-34.

Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, R., Ballesster-Olmos, J.F., Moreno, P. 2000b. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA population of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology*, 90: 134-138.

Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M.E., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M.C., Lopèz, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. 2000c. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology*, 74: 6856-6865.

Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., Dawson, W.O. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*, 274: 246-254.

Antoniw J.F., Linthorst H.J.M., White R.R., Bol J.F. 1986. Molecular cloning of the double-stranded RNA of beet cryptic viruses. *J. Gen. Virol.*, 7: 2047-2051.

Asamizu T., Summers D., Motika M.B., Anzola J.V., Nuss D.L. 1985. Molecular cloning and characterization of the genome of wound tumor virus: a tumor-inducing plant reovirus. *Virology*, 144: 398-409.

Aubert, B., Bové, C. 1984. Mild and severe strains of *Citrus tristeza virus* in Reunion island. pp 57-61. In: Proc. 9th Conference International Organization of

Citrus Virologists-IOCV. Garnsey, S.M., Timmer, L.W., Dodds, J.A., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Ayllòn, M.A., Lòpez, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. 1999a. New defective RNAs from *Citrus tristeza virus*: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *Journal of General Virology*, 80: 817 - 821.

Ayllòn, M.A., Rubio, L., Moya, A., Guerri, J., Moreno, P. 1999b. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology*, 255: 32-39.

Ayllòn, M.A., Lòpez, C., Navas-Castillo, J., Garnsey, S.M., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: Incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology*, 146: 27-40.

Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Navarro, L. 1988. Detection of a tristeza seedling yellows strain in Spain. pp. 28-32. In: Proc. 10th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonel, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M., Navarro, L. 1993. Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 219-229.

Barbarossa, L., Vovlas, C. 2007. Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Epirus (Greece). Proc. 17th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV, Adana (Turkey).

Bar-Joseph, M., Dawson, W.O. 2008. Citrus Tristeza Virus. In: *Encyclopedia of Virology*, 3rd Edition, vol. 1, pp. 520-525.

Bar-Joseph, M., Lee, R.F. 1989. Citrus Tristeza Virus. AAB Descriptions of plant Viruses n° 353.

Bar-Joseph, M., Loebenstein, G. 1973. Effect of strain, source plant and temperature on the transmissibility of *Citrus tristeza virus* by the melon aphid. *Phytopathology*, 63: 716-720.

Bar-Joseph, M., Nitzan, Y. 1991. The spread and distribution of *Citrus tristeza virus* isolates in sour orange seedlings. pp. 162-165. *In: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV*. Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291-316.

Bar-Joseph, M., Yang, G., Gafny, R., Mawassi M. 1997. Subgenomic RNAs: The possible building blocks for modular recombination of *Closteroviridae* genomes. *Seminars in Virology*, 8: 113-119.

Bass, B.L. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 101: 235-238.

Batista, L., Porras, D.N., Gutiérrez, A., Peña, I., Rodríguez, J., Fernández del Amo, O., Pérez, R., Morera, J.L., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1996. Tristeza and *Toxoptera citricida* in Cuba: Incidence and control strategies, pp. 104-111. *In: Proc. 13th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV*. da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, R.K., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Bertolini E., Moreno A., Capote N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panades, J., Cambra, M., 2007. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* DOI 10.1007/s10658-007-9206-9.

Calabrese F., 2009. Principali paesi produttori e destinazione del prodotto. *In: Citrus - Trattato di agrumicoltura* (pp. 17-26). Vacante V. e Calabrese F. (coord.ri). Edagricole, Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE, Milano.

Cambra M., Moreno, P. 2000. Tristeza. pp. 77-81 *In: Enfermedades de los citricos*. Duran-Vila, N., Moreno, P. (coord.ri). *Ediciones Mundi-Prensa*, Madrid.

Cambra, M., Camarasa, E., Gorris, M.T., Garnsey, S.M., Gumpf, D.F., Tsai, M.C. 1993. Epitope diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. pp. 33-38. *In: Proc. 12th Conference International Organization*

of Citrus Virologists-IOCV. Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., López, A. Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencia Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85-95.

Cashdollar, L.W., Esparza J., Hudson, G.R., Chmelo, R., Lee P.W.K., Joklik W.K. 1985. Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: sequence of the cloned S2 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79: 7644-7648.

Catara A., Lombardo A., Nobile G., Rizza S. 2007. Characterization of additional Citrus tristeza virus isolates in an highly citrus infected area of Sicily. In: Book of abstracts 17th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV.

Catara, A., Davino, M., 2006. Il virus della tristezza degli agrumi in Sicilia. Estratto da “Frutticoltura”. n.1 Gennaio pp. 18-23.

Catara, A., Rizza, S., Tessitori, M., 2008. Virus, viroidi e procarioti endogeni degli agrumi. *Tecnica Agricola*, ISSN 0371 . 5124, 1: 29-43.

Catara A., Rizza S. 2009. Principali malattie causate da funghi e batteri. In: Citrus “Trattato di agrumicoltura”. Vacante V. e Calabrese F. (coord.ri). Edagricole, Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE, Milano, pp 383-394.

Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Liked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.

Costa, A.S., Müller., G.W. 1980. Tristeza control by cross protection: A.U.S.- Brasil cooperative success. *Plant Disease*, 64: 538-541.

Cotroneo, P.S., Russo, M.P., Ciuni, M., Reforgiato Recupero, G. and Lo Piero, A.R. 2006. Quantitative real time reverse transcriptase-PCR profiling of anthocyanin biosynthetic genes during orange fruit ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 13:537–543.

Da Graça, J.V., Marais, L.J., Yon Broembsen, L.A. 1984. Severe

tristeza stem pitting decline of young grapefruit in South Africa. pp. 62-65. In: Proc. 9th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Garnsey, S.M., Timmer, L.W., Dodds, J.A., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Davino M., Barbara M., Caruso A., Davino S., Guardo M., D'Onghia A., Savino V. 2004. *Citrus tristeza virus* (CTV): a serious threat to the Italian citrus groves. Proc. Int. Society of Citriculture: 790 – 793.

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. J. Plant Pathol., 111:289 – 293.

Dawson W.O., Dodds J.A. 1982. Characterization of sub-genomic double stranded RNAs from virus infected plants. Biochem. Biophys. Res. Commun., 107: 1230-1235.

De Luca V., Rizza S., Catara G., Capasso C, Capasso A., Carginale V. 2009. The Application of Differential Display as a Gene Profiling Tool in Citrus. *Tree and Forestry Science and biotechnology*, 3 (S2): 1-4.

Djelouah K., Frasher D., D'Onghia A.M. 2002. Serological diagnosis of *Citrus psorosis virus* and *Citrus tristeza virus* using flower parts. 5th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV.

Dodds J.A., Bar-Joseph M. 1983. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses, *Phytopathology*, 73: 419-423.

Dodds J.A., Jarupat T., Lee J.G., Roistacher C.N. 1987a. Effect of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 77: 442-447.

Dodds, J.A., Jordan, R.L., Roistacher, C.N., Jarupat, T. 1987b. Diversity of *Citrus tristeza virus* isolates indicated by dsRNA analysis. *Intervirology*, 27: 177-188.

Dodds, J.A., Riley, K., Polek, M. 1996. Effect of suppression by tree removal on the incidence of *Citrus tristeza virus* in California. pp. 168-171. In: Proc. 13th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV.

da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, R.K., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

D'Urso, F., Ayllón, 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) in the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology*, 49: 288-294.

FAO 2001: <http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>

Faostat 2010. Production of Citrus fruit in year 2008. FAO Statistics Division. <http://faostat.fao.org>

Folimonova S.Y., Robertson C.J., Shilts T., Folimonov A.S., Hilf M.E., Garnsey S.M., and Dawson W.O. 2010. Infection with strains of *citrus tristeza virus* does not exclude superinfection by other strains of the virus. *J. Virology*, 84: 1314-1325.

Fraser, L. 1952. Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural Gazette of N.S. Wales*, 63: 125-131.

Fujisawa, H., Minami, M., Ogata, T., Takahara, T. 2003. Isolation and analysis of mRNAs relating to citrus rind injury under various storage conditions. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72: 7-12.

Gandia M., Conesa A., Ancillo G., Gadea J., Forment J., Pallas V., Flores R., Duran-Vila N., Moreno P., Guerri J., 2007. Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 367: 298-306.

Garnsey, S., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Yokomi, R., Lee, R.F. 1991. Development of a worldwide collection of citrus virus isolates. pp. 113-120. In: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

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 M. E. Hilf • N. Duran-Vila • M. A. Rocha-Peña (coord.ri.). Proceedings of the 16th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. IOCV, Riverside, California, 75-93.

Garnsey, S., Civerolo, E.L., Lee, R.F., Yokomi, R.K., Behe, C.C. 1995. Using the Beltsville internacional CTV collection facility to determine severity of Caribbean isolates of *Citrus tristeza virus*. pp.253-259. In: Proc. 3rd International workshop on *Citrus tristeza virus* and the brown citrus aphid in the Caribbean basin: Management strategies. Lee, RF., Rocha Peña , M., Niblett, C.L., Ochoa, F., (coord.ri). FAO, USDA-OICD, Lake Alfred, Florida.

Garnsey, S.M., Christie, R.G., Derrick, K.S., Bar-Joseph, M. 1980. Detection of *Citrus tristeza virus*. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral Virologists. Calavan, E.C., Garnsey S.M., Timmer, L.W. (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Purcifull, D.E. 1977. Mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 67: 965-968.

Garnsey S.M., Gonsalves D., Purcifull D.E. 1978. Rapid diagnosis of *Citrus tristeza virus* infection by SDS-immunodiffusion procedures. *Phytopathology*, 69: 88-95.

Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Borbon, J.C. 1996. Rapid dissemination of mild isolates of *Citrus tristeza virus* following introduction of *Toxoptera citricida* in the Dominican Republic. pp.92-103. In: Proc. 13th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, RK., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Garnsey, S., Gumpf, D.J., Roistacher, C.H., Civerolo, E.L., Lee, R.F., Yokomi, R., Bar-Joseph, M. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*, 19: 151-157.

Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., Henderson, C.T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). pp.39-50. In: Proc. 12th Conference International Organization of Cit-

rus Virologists-IOCV. Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Garnsey, S.M., Su, H.J., Tsai, M.C. 1997. Differential susceptibility of pummelo and Swingle citrumelo to isolates of *Citrus tristeza virus*. pp. 138-146. In: Proc. 13th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, R.K., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Gildow P.E., Bollinger M.E., Rochow W.F. 1988. Identification of double stranded RNAs associated with barley dwarf virus infection of oat. *Phytopathology*, 73: 1570-1572.

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. Meth.*, 44: 305-317.

Gottwald, T.R., Cambra, M., Moreno, P., Piquer, J., Camarasa, E. 1996. Spatial and temporal analysis of *Citrus tristeza virus* in Eastern Spain. *Phytopathology*, 86: 45-55.

Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M., Borbon, J. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52: 397-404.

Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Lombardo, A., Davino, S., Iacono G., M., Muoio, A. 2007. A high computing bioinformatics approach based on GRID for detecting recombination in whole citrus tristeza virus genomes. XIV Congresso Nazionale SIPAV, Perugia: 61.

GranBastien, M.A. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science*, 3(5): 181-187.

Grasso, S., Catara, A., 1982. Observation on the gummy blisters found on citrus leaves. *Informatore fitopatologico*, 32 (9-10): 43-46.

Guardo, M., Sorrentino, G., Marletta, T., Caruso, A., 2007. First

report of Citrus leaf blotch virus on Kumquat in Italy. *Plant Disease*, 91 (8): 1054.

Guerri, J., Moreno, P., Lee, R.F. 1990. Identification of strains of *Citrus tristeza virus* by peptide maps of virion coat protein. *Phytopathology*, 80: 692 - 698.

Gumpf, D.J., Zheng, G.Y., Moreno, P., Diaz, J.M., 1987. Production and evaluation of specific monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* strains. *Phytophylactica*, 19: 159-161.

Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A. 1984. Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (*Homoptera*, *Aphididae*) in Spain. pp 68-70. In: Proc. 9th Conference International Organization of Citrus Virologists. Garnsey, S.M., Timmer, L.W., Dodds, J.A., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A. 1988a. Comparative aphid transmission of a common *Citrus tristeza virus* isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. pp. 68-70. In: Proc. 10th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Serra, J., Fuertes, C. 1988b. Differences in transmission efficiency of *Citrus tristeza virus* by *Aphis gossypii* using sweet orange, mandarin or lemon trees as donor or receptor host plants. pp. 62-64. In: Proc. 10th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Navarro, L., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Hernández-Jasso, J.C., da Graça, J.V., Louzada, E.S. 2004. Identification of differentially expressed genes from *Poncirus trifoliata* triggered by *Citrus tristeza virus* inoculation. *Subtrop. Plant Sci.*, 56: 26-32.

Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblet, C.L., Garnsey, S.M. 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic

RNAs in infected tissue. *Virology*, 208: 576-582.

Hilf, M.E., Karasev, A.V., Albiach-Marti, M.R., Dawson, W.O., Garnsey, S.M. 1999. Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology*, 89: 336-342.

Hughes, W.A., Lister, C.A. 1949. Lime disease in the Gold Coast. *Nature*, 164: 880.

Imai M., Richardson M.A., Ikegami N., Shatkin A.J., Furuichi Y. 1983. Molecular cloning of double-stranded RNA virus genomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80: 373-377.

Ismea, 2005. La tendenza della produzione agrumicola.

Istat, Istituto Nazionale di Statistica, 2009. Tavola C24 – Superficie (ettari) e produzione (quintali): arancio, mandarino, clementina, limone. Dettaglio per ripartizione geografica. Istat, Istituto Nazionale di Statistica, 2009.

Kagami, T., Suzuki, M., 2005. Molecular and functional analysis of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene of Rosa hybrid. *Genes Genet. Syst.* 80, 121 – 128.

Karasev, A.V., Hilf, M.E. 1997. Molecular biology of the *Citrus tristeza virus*. pp. 121-131. In: Filamentous viruses of woody plants. Monette, P. (coord.). Research Signpost, Trivandrum, India.

Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, C.L., 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.

Keil T.U., Hofschneider P.H. 1973. Secondary structure of RNA phage MI2 replicative intermediate in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 312: 297-310.

Kimura, Y., Tosa, Y., Shimada, S., Sogo, R., Kusaba, M., Sunaga, T., Betsuyaku, S., Eto, Y., Nakayashiki, H., Mayama, S. 2001. OARE-1, a Ty1-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stresses. *Plant and Cell Physiology*, 42:1345-1354.

Koizumi, M. 1991. *Citrus tristeza virus* field isolates from declined or

dwarfed citrus trees in Japan. pp 25-30. In: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. BrIansky, RH., Lee, RF., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Kyriakou, A., Loannou, N., Gavriel, J., Bar-Joseph, M., Papayianis, C., Kapar-Isaia, T., Savva, G. 1996. Management of *Citrus tristeza virus* in Cyprus. pp. 172-178. In da Graça, J.V., Moreno, P., Yokomi, RK., (coord.ri). In: Proc. 13th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. IOCV, Riverside, California.

Lang, P., Zhang, C.K., Ebel, R.C., Dane, F., Dozier, W.A., 2005. Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* by mRNA differential display. *Gene*, 359: 111-118.

Lee, R.F., Calvert, L.A., Nagel, J., Hubbard, J.D. 1988. *Citrus tristeza virus*: characterization of coat proteins. *Phytopathology*, 78: 1221-1226.

Lers, A., Burd, S., Lomaniec, E., Droby, S., Chalutzitz, E., 1998. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. *Plant Mol. Biol.*, 36: 847-856.

Liang, P., Pardee, A.B., 1992. Differentially display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971.

López, C., Ayllón, M.A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., Flores, R. 1998. Molecular variability of the 5' and 3' terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology*, 88: 685-691.

López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores, R. 2000. The 23 kDa protein coded by the 3' -terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA binding protein. *Virology*, 269: 462-470.

Mawassi, M., Karasev, A.V., Mietkiewska, E., Gafny, R., Lee, R.F., Dawson, W.D., Bar-Joseph, M. 1995. Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 208: 383-387.

Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., Bar-Joseph, M.

1996. Unusual sequence relationship between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.*, 77: 2359-2364.

McClean, A.P.D. 1974. The tristeza virus. pp. 59-66. *In*: Proc. 6th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Weathers, L.G., Calavan, B.C., (coord.ri). University of California, Div. Agr. Sci., Richmond, California.

Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Navarro, L. 1997a. Molecular markers flanking *Citrus tristeza virus* resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf Theoretical and Applied Genetics, 94: 458-464.

Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Navarro, L., 1997b. Efficient search for new resistant genotypes to the *Citrus tristeza c1osterovirus* in the orange subfamilia Aurantioideae. *Theor. Appl. Genetics*, 95: 1282.

Moreno, P., Guerri, J. 1997. Variability of citrus tristeza c1osterovirus (CTV): Methods for differentiating isolates. pp. 97-108. *In*: Filamentous viruses of woody plants. Monet, P.L., (coord.). Research Signpost, Trivandrum, India.

Moreno, P., Guerri, J., Munoz, N., 1990. Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology*, 80: 477-482.

Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Martinez, M. E. 1991. Segregation of *Citrus tristeza virus* strains evidenced by double stranded RNA (dsRNA) analysis. pp. 20-24. *In*: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Bransky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W.(coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Albiach-Marti, M.R., Martinez, M.E. 1993a. Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology*, 42: 35-41.

Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., Fuertes-Polo, C., Albiach-Marti, M.R., Martinez, M.E. 1993b. Variations in pathogenicity and double-

stranded RNA (dsRNA) patterns of *Citrus tristeza virus* isolates induced by host passage. pp. 815. In: Proc. 12th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W., (co-ord.ri). IOCV, Riverside, California.

Muharam, A., Whittle, A.M. 1991. Stem-pitting strains of *Citrus tristeza virus* in Indonesia. pp. 150-155. In: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologist. Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Navarro, L. 1993. Citrus sanitation, quarantine and certification programs. pp. 383-391. In: Proc. 12th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W., (co-ord.ri). IOCV, Riverside, California.

Pappu, H.R., Pappu, S.S., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1993a. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 90: 3641-3644.

Pappu, H.R., Pappu, S., Niblett, C.L., Lee, R.F., Civerolo, E.L. 1993b. Comparative sequence analysis of the coat protein of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 7: 255-264.

Pappu, S.S., Febres, V.J., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1997. Characterization of the 3' proximal gene of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virus Research*, 47: 51-57.

Pasentsis, K., Falara, V., Pateraki, I., Gerasopoulos, D., Kanellis, A.K. 2007. Identification and expression profiling of low oxygen regulated genes from citrus flavedo tissues using RT-PCR differential display. *J. Exp. Bot.*, 8: 2203-2216.

Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.F., Lee, R.F. 1990. Monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytophology*, 80: 224- 228.

Porat, R., Pasentsis, K., Rozentzvieg, D., Gerasopoulos, D., Falara, V., Samach, A., Lurie, S., Kanellis, A.K. 2004. Isolation of a dehydrin cDNA from orange and grapefruit citrus fruit that is specifically induced by the combination of heat followed by chilling temperatures. *Physiologia Plantarum*, 120: 256-264.

Ramisse, V., Balandreau, J., Thibault, F., Vidal, D., Vergnaud, G., Normand, P., 2003. DNA-DNA hybridization study of *Burkholderia* species using genomic DNA macro-array analysis coupled to reverse genome probing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 739-746.

Rizza S., Capasso C., Catara G., Capasso A., Conte E., Catara A. 2007 (in stampa). Host plant-viroid interaction in Troyer citrange, sour orange and alemow rootstocks infected by Citrus viroid IIIb (CVd-IIIb). In: Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists-IOCV.

Rizza S., Catara A., 2009. Virus, viroidi e procarioti endogeni degli agrumi. Pagg. In: Citrus “Trattato di agrumicoltura”. Vacante V. e Calabrese F. (coord.ri). Edagricole, Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE, Milano, pp. 395 - 406.

Rizza S., Nobile G., De Luca V., Catara A., Capasso C., Carginale V. 2009. Gene expression analysis in sour orange seedlings inoculated with citrus tristeza virus. Locorotondo SIPaV September 2009.

Roistacher, C.N., Bar-Joseph, M. 1984. Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. pp. 9-18. In: Proc. 9th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Garnsey, S.M., Timmer, L.W. Dodds, I.A., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

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.

Roistacher, C.N., Moreno, P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus*. pp. 7-19. In: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Rosner A., Bar-Joseph M., Moscovitz M., Mevarch M. 1983a. Diagnosis of specific viral RNA sequences in plant extracts by hybridization with a polynucleotide kinase-mediated, 32P-labeled, double-stranded RNA probe. *Phytopathology*, 73: 699-702.

Rosner A., Ginsburg I., Bar-joseph M. 1983b. Molecular cloning of complementary DNA sequence of citrus tristeza virus RNA. *J.Gen. Virol.*, 64: 1757-1763.

Rosner, A., Bar-Joseph, M. 1984. Diversity of *Citrus tristeza virus* strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology*, 139: 189-193.

Rosner, A., Lee, R.F., Bar-Joseph, M. 1986. Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 76: 820-824.

Roux, L., Simon, A.E., Holland, J.J. 1991. Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Advances in Virus Research*, 40: 181-212.

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. pp.12-17. In: Proc. 14th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. da Graça, J.V., Lee, R.F., Yokomi, R.K., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Rubio, L., Ayllón, M.A., Guerri, J., Niblett, C.L., Moreno, P. 1996. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology*, 129: 479-489.

Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M.L., Guerri,

J., Moreno, P., Falk, B.W. 2001. Genetic variation of *Citrus Tristeza Virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *J. Virol.*, 75: 8054-8062.

Ruiz-Ruiz S., P. Moreno, J. Guerri, and S. Ambrós. 2009. Discrimination between mild and severe Citrus tristeza virus Isolates with a rapid and highly specific Real-Time Reverse Transcription-Polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Virology*, 99 (3): 307 – 315.

Saponari, M., Yokomi, R.K., 2010. Molecular analysis among MCA13-reactive isolates reveals a rapid strategy for assessment of *Citrus tristeza virus* severity. *Acta Horticulturae*.

Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A.V., Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowski, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 7433-7438.

Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Marti, M.R., Ayllón, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology*, 278: 253-65.

Satyanarayana, T., Bar-Joseph, M., Mawassi, M., Albiach-Marti, M.R., Ayllón, M.A., Gowda, S., Hilf, M.E., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W.O. 2001. Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology*, 280: 87-96.

Speroni, H.A., Frezzi, M. 1939. Podredumbre de la raicilla del naranjo. *Revista de la Corporacion de Fruticultores de Argentina*, 5: 25-31.

Tessitori, M., Maria, G., Capasso, C., Catara, G., Rizza, S., De Luca, V., Catara, A., Capasso, A., Carginale, V. 2007. Differential Display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III. *Bioch. et Biophysica Acta*, 1769: 228-235.

Tsai, M.C., Hsu, H.J., 1991. Development and characterization of monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* (CTV) strains in Taiwan. pp. 46-50. In: Proc. 11th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

Tsuchizaki T., Sasaki A., Saito Y. 1978. Purification of citrus tristeza virus from diseased citrus and the detection of the virus in citrus tissues by fluorescent antibody techniques. *Phytopathology*, 68: 139-142.

Valverde, R.A., Dodds, J.A., Heick, J.A. 1986. Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathology*, 76: 459-465.

Van Vuuren, S.P., Collins, R.P., da Graça, J.V. 1993. Evaluation of *Citrus tristeza virus* isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease*, 77: 24-28.

Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguët, J.G., Pérez de San Roman, C., Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *J. Gen. Virology*, 67: 91-96.

Vernière, C., Perrier, X., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., Bovè, J.M., Duran-Vila, N., 2004. *Citrus viroids*: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of Clementine trees grafted on trifoliate orange. *Plant Disease*, 88: 859-866.

Vives, M.C., Rubio, L., Lòpez, C. Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. 1999. The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *J. Gen. Virol.*, 80: 811-816.

Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101: 3275-3280.

Yang, G., Mawassi, M., Gorman, R., Garny, R., Bar-Joseph, M. 1997. Involvement of subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective *Citrus tristeza virus* molecules. *J. Virology*, 71: 9800-9802.

Yang, G., Che, X., Gofman, R., Ben-Shalom, Y., Piestun, D., Gafny, R., Mawassi, M., Bar-Joseph, M. 1999. D-RNA molecules associated with subisolates of the VT strain of *Citrus tristeza virus* which induce different seedling-yellows reactions. *Virus Genes*, 19: 5-13.

Yang, Z.N., Mathews, D.H., Dodds, J.A., Mirkov, T.E. 1999. Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes*, 19: 131-142.

Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteeg, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Peña, M., Niblett, E.L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (*Homoptera: Aphididae*) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of *Citrus tristeza virus*. *J. Econom. Entomol.*, 87: 1078-1085.

Yokomi, R.K., Saponari, M., Sieburth, P.J., 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 100: 319-327.

Yoshida, T. 1996. Graft compatibility of *Citrus* with plants in the *Aurantioideae* and their susceptibility to *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease*, 80: 414-417.

Zhang, C., Lang, P., Dane, F., Ebel, R.C., Singh, N.K., Locy, R.D., Dozier, W.A. 2005a. Cold acclimation induced genes of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*). *Plant Cell Reports*, 23: 764-769.

Zhang, C., Lang, P., Ebel, R.C., Dane, F., Singh, N.K., Locy, R.D., Dozier, W.A. 2005b. Down-regulated gene expression of cold acclimated *Poncirus trifoliata*. *Can. J. Plant Sci.*, 85: 417-424.

Zebzami, M., Hill, J.H., Van Deusen, R.L., Nadori, E.B. 1993. Characterization of monoclonal antibodies raised against *Citrus tristeza virus* in Morocco. pp. 93-99. In: Proc.

12th Conference International Organization of Citrus Virologists-IOCV. Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W., (coord.ri). IOCV, Riverside, California.

LISTA DEI NOMI SCIENTIFICI DELLE SPECIE RUTACEAE CITATE

ALEMOW	<i>C. MACROPHYLLA</i> WESTER
ARANCIO AMARO	<i>C. AURANTIUM</i> L.
ARANCIO DOLCE	<i>C. SINENSIS</i> L. OSB.
ARANCIO TRIFOGLIATO	<i>PONCIRUS TRIFOLIATA</i> RAF.
BERGAMOTTO	<i>C. BERGAMIA</i> RISSO E POIT.
CALAMONDINO	<i>C. MADURENSIS</i> LOUR.
CEDRO	<i>C. MEDICA</i> L.
CHINOTTO	<i>C. MYRTIFOLIA</i> RAF.
CITRANGE	<i>C. SINENSIS</i> X <i>P. TRIFOLIATA</i>
CITRUMELO	<i>C. PARADISI</i> X <i>P. TRIFOLIATA</i>
CLEMENTINE	<i>C. CLEMENTINA</i> HORT. EX TAN.
KUMQUAT	<i>FORTUNELLA</i> SPP. SWING
LIMA	<i>C. LATIFOLIA</i> TAN.
LIMA DI RANGPUR	<i>C. LIMONIA</i> OSBECK
LIMA DI TAHITI	<i>C. LATIFOLIA</i> TAN.
LIMA DOLCE	<i>C. LIMETTIODES</i> TAN.
LIMA MESSICANA	<i>C. AURANTIFOLIA</i> (CHRISTM.) SWING
LIMONE	<i>C. LIMON</i> L. BURM .
LIMONE KARNA	<i>C. KARNA</i> RAF.
LIMONE LIMETTA	<i>C. ICHANGENSIS</i> SWING.
LIMONE MEYER	<i>C. MEYERI</i> TAN.
LIMONE PONDEROSA	<i>C. PYRIFORMIS</i> HASSK.
LIMONE RUGOSO	<i>C. JAMBHIRI</i> LUSH
LIMONE VOLKAMERIANO	<i>C. VOLKAMERIANA</i> WOLKAMER
MANDARINO	<i>C. RETICULATA</i> BLANCO
MANDARINO CLEOPATRA	<i>C. RESHNI</i> HORT.EX TAN.
MANDARINO ACIDO	<i>C. SUNKI</i> HORT.EX TAN.
MANDARINO TACHIBANA	<i>C. TACHIBANA</i> (MAK.) TAN.
PAPEDA	<i>C. MACROPTERA</i> MONTR.
PECTINIFERA	<i>C. DEPRESSA</i> HAY
POMPELMO	<i>C. PARADISI</i> MACF.
PUMMELO	<i>C. GRANDIS</i> L. OSB.
SATSUMA	<i>C. UNSHIU</i> (MAK.) MARC.
TANGELO	<i>C. RETICULATA</i> X <i>C. PARADISI</i>
TANGOR	<i>C. RETICULATA</i> X <i>C. SINENSIS</i>
