



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE FITOSANITARIE

SEZ. PATOLOGIA VEGETALE

DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE FITOSANITARIE
XXIII ciclo 2007-2010

DOMENICO RASPAGLIESI

Caratterizzazione di isolati del virus della tristezza degli agrumi
mediante elettroforesi capillare della conformazione dei
polimorfismi del singolo filamento (CE-SSCP) e messa a punto
di protocolli di analisi rapida.

Tesi di Dottorato

COORDINATORE
Prof. Gabriella Cirvillieri

TUTOR
Prof. Antonino Catara

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Antonino Felice Catara, padre scientifico e maestro di vita, che mi ha instillato la passione per la ricerca.

Ringrazio il Parco Scientifico e Tecnologico della Sicilia per avermi permesso di svolgere l'attività di ricerca all'interno della struttura.

Ringrazio i colleghi e amici del Parco Scientifico e Tecnologico della Sicilia con i quali condivido giornalmente le gioie e i dolori della ricerca.

Ringrazio i miei genitori per aver sempre creduto nelle mie potenzialità sostenendo con entusiasmo ogni mia scelta.

Un ringraziamento particolare a Loredana e a Gaia, a cui dedico ogni vittoria della mia vita.

Sommario

	Pag.
Riassunto	1
1. Introduzione	5
2. Malattie degli agrumi causate da virus, viroidi e procarioti endogeni	
2.1. Malattie da virus	7
2.2. Malattie causate da viroidi	12
2.3. Malattie a presunta eziologia virale	13
2.4. Malattie da procarioti	14
3. La tristezza	
3.1. Diffusione della malattia	16
3.2. Sintomatologia	18
3.3. Modalità di trasmissione in campo	22
3.4. Metodi di difesa	23
3.5. Agente causale	24
4. Identificazione e caratterizzazione del virus della tristezza degli agrumi	
4.1. Saggi biologici	26
4.2. Test sierologici	27
4.3. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	29
4.4. Amplificazione a catena mediante polimerasi (PCR)	30
4.5. Rilevamento e quantificazione in tempo reale (real time-PCR)	30
4.6. Microarray	31
5. Scopo del lavoro	34
6. Materiali e metodi	
6.1. Isolati di CTV	36
6.2. Indexing biologico	36
6.3. DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA)	37
6.4. DTBIA (Direct tissue blot immunoassay)	38
6.5. Estrazione dell'RNA totale	38
6.6. Retrotrascrizione	39
6.7. Reazione di amplificazione PCR	39
6.8. Analisi SSCP	40
6.9. Analisi CE-SSCP	41
6.10. Clonaggio e sequenziamento	41

6.11. Analisi ELISA/CE-SSCP	43
6.12. Saggio Real-Time RT-PCR mediante l'utilizzo di sonde TaqMan	43
6.13. Analisi filogenetiche	44
7. Risultati	
7.1. Analisi SSCP	45
7.2. Analisi CE-SSCP	47
7.2.1 Analisi CE-SSCP del gene p18	47
7.2.2 Analisi CE-SSCP del gene p23	59
7.2.3 Analisi CE-SSCP del gene p25	61
7.2.4 Analisi CE-SSCP del gene p20	62
7.3. Analisi ELISA-CE-SSCP	64
7.4. Analisi delle sequenze	66
8. Discussione dei risultati	81
9. Riferimenti bibliografici	84

Riassunto

Citrus tristeza virus (CTV) è una specie virale del genere *Closterovirus* che causa una delle malattie più dannose per l'agrumicoltura. Il CTV ha portato alla morte oltre 85 milioni di piante di agrumi in tutto il mondo e reso economicamente improduttive altrettante. L'uso di portinnesti tolleranti consente di arginare gli effetti di alcuni ceppi del virus ma non di tutti.

L'eradicazione delle piante infette è una strategia di lotta efficace, perseguita in molti Paesi del mondo e valida fino al punto in cui la malattia non abbia ancora assunto livelli di diffusione superiori al 5%. Superato questo limite la ricerca e l'esperienza suggeriscono l'estirpazione limitata alle piante affette da ceppi virulenti e l'impiego di tecniche di protezione crociata o di interferenza. Per questo motivo, negli anni recenti, sono state messe a punto numerose tecniche per la caratterizzazione degli isolati di CTV. Oltre ai saggi biologici, troppo lunghi e costosi, affidabili sono l'uso di multiple-molecular-markers (MMM) (molto laborioso) ed il sequenziamento (non accessibile a tutti i laboratori). Informazioni utili può dare l'analisi della conformazione dei polimorfismi del filamento singolo (SSCP) della quale, nella ricerca oggetto del dottorato, si è cercato di migliorare la potenzialità attraverso l'elettroforesi capillare.

La ricerca eseguita ha permesso di mettere a punto e validare protocolli di CE-SSCP (elettroforesi capillare dell'analisi della conformazione dei polimorfismi del filamento singolo) specifica per CTV. Questa tecnica abbina le potenzialità della tradizionale tecnica SSCP ai vantaggi dell'elettroforesi capillare.

Per la messa a punto del metodo sono stati utilizzati tre isolati provenienti dalla Sicilia (SG29, Tapi e TDV) e un isolato esotico (RPC3), precedentemente caratterizzati biologicamente. I prodotti dell'amplificazione dei geni p18 (425bp), p23 (594bp) e p25 (415bp) sono stati utilizzati per l'analisi SSCP e CE-SSCP. I profili ottenuti hanno permesso di clusterizzare gli isolati SG29, RPC3, TDV e Tapi in gruppi differenti. TDV e Tapi, isolati da piante provenienti dallo stesso vivaio e presenti in due appezzamenti contigui hanno mostrato profili simili, così come tanti altri isolati provenienti da piante dell'areale.

SG29 e RPC3 hanno mostrato sintomi gravi in tutte le piante indicatrici, mentre Tapi e TDV hanno mostrato sintomi tipici degli isolati blandi. Le analisi filogenetiche rivelano che questi due isolati sono localizzati in un cluster che comprende le varianti di sequenza dei ceppi blandi, mentre SG29 e RPC3 ricadono nel clado degli isolati virulenti.

In base ai risultati ottenuti la tecnica è stata utilizzata per caratterizzare 54 isolati di CTV provenienti da diversi areali della Sicilia, ai fini della validazione e della definizione del protocollo di analisi. Dalla vasta gamma di pattern ricavati è stata effettuata una suddivisione in 9 gruppi. In alcuni di essi vi erano gruppi di piante residenti in appezzamenti agrumicoli vicini. La clusterizzazione arbitraria degli isolati è stata confermata dai dati ottenuti dalla caratterizzazione biologica e dalle analisi filogenetiche.

Per poter consentire una migliore applicazione del metodo messo a punto è stato anche predisposto un protocollo di analisi che combina, in maniera sequenziale, la tecnica molecolare CE-SSCP con il test immunologico DAS-ELISA. In tal modo è possibile abbinare la rapidità dello screening all'analisi della struttura genetica, risparmiando tempo e risorse.

Il metodo è altamente sensibile, semplice e particolarmente conveniente per l'analisi rapida di numerosi campioni. In tale circostanza consente di sviluppare una rapida caratterizzazione della variabilità genetica di popolazioni di isolati del virus, risultando vantaggioso rispetto alla SSCP convenzionale, anche per la migliore risoluzione e per la possibilità di accumulare i dati e di gestirli tramite un software.

Abstract

Citrus tristeza virus (CTV), a viral species of the *Closterovirus* genus, is responsible for the most economically damaging disease of *Citrus*. It has killed over 85 millions of *Citrus* trees all over the world and made as many economically unproductives. Eradication programmes and use of CTV tolerant rootstocks are suitable to mitigate the negative effect of mild strains, whereas they are not effective against SP strains. Moreover, eradication is effective as long as the disease does not assume spread levels over 5%, otherwise it is suggested to pull out only those trees affected by severe strains as well as cross-protection with mild strains or interfering RNA, being envisaged the future strategy to control the disease. For this reason, the development of new characterization techniques is becoming of important concern. In addition to the biological characterization (time consuming and costly), the most reliable techniques are the multiple-molecular-markers (labor consuming) and sequencing (not easy for many laboratories). Useful information can be achieved by the single-stranded conformation polymorphism analysis (SSCP), which this doctoral research has empowered by performing the analysis through capillary electrophoresis.

In this paper a novel fluorescence-based Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) protocol was applied for molecular characterization of CTV isolates. It combines the potentiality of single strand conformation analysis with automation and standardization of capillary electrophoresis. Three CTV isolates from Sicily (SG29, TDV, Tapi) and an exotic isolate (RPC3) previously characterized biologically were used in conventional SSCP and CE-SSCP analyses of partial p18 (425 bp), p23 (594 bp) and p25 (415 bp) genes. Profiles showed clear differences between SG29, RPC3, TDV and Tapi, although the two latter isolates were similar, as expected, being originated from two close-by plots and coming from the same nursery. Characterization of the clustered isolates were confirmed by data obtained from biological characterization and phylogenetic analysis. SG29 and RPC3 showed severe symptoms on the set of indicator plants, while Tapi and TDV showed typical symptoms of mild isolates. The phylogenetic analysis revealed that Tapi and TDV are localized in a cluster comprising the sequence variance of mild isolates, while SG29 and RPC3 belong to the cluster of virulent isolates.

Based on these results a collection of 54 CTV isolates collected in different orchards of Sicily was analysed by CE-SSCP to further validate the protocol. A wide range of patterns was observed, ten-

tatively placed in 9 groups. Clusters mostly included samples from trees originating from near-by infected trees, apparently infected with closely similar CTV isolates.

Furthermore, in the present work we present a new protocol which combines the CE-SSCP molecular assay with DAS-ELISA immunological test in a sequential time. This new methodology allows the detection of CTV as well as the rapid analysis of the genetic structure of the isolates in a continuous process. The method is highly sensitive, simple and very convenient for massive samples analysis. The technique enables rapid characterization of genetic variability within virus isolates, gives the best resolution compared to conventional SSCP and allows data accumulation and management through a specific software, thus saving both time and resources.

1. Introduzione

Con una produzione annua di oltre 100 milioni di tonnellate, gli agrumi rappresentano una delle coltivazioni da frutto più diffuse ed economicamente importanti a livello mondiale. La più alta produzione spetta al Brasile, seguito da Cina e Stati Uniti d'America (FAOSTAT, 2007). Negli Stati Uniti la produzione ha un valore di circa 21 miliardi di dollari l'anno, grazie allo stato della Florida che è il maggiore produttore.

Il centro di origine degli agrumi è il sud-est asiatico, dove la coltivazione ebbe inizio già 4000 anni a.C. Successivamente essa si è diffusa in tutte le regioni tropicali e subtropicali (entro 40° di latitudine Nord-Sud) e nei paesi mediterranei, leaders internazionali nella produzione di frutta fresca.

Fra i paesi di recente diffusione della coltura si annovera l'Egitto che, con una notevole produzione di agrumi di alta qualità, circa 2,8 milioni di tonnellate nel 2005, si colloca all'undicesimo posto nella graduatoria mondiale.

In Italia, la superficie dedicata alla coltivazione degli agrumi è di circa 180.000 ettari, con una produzione annua vicina a 3.000.000 di tonnellate (FAOSTAT, 2007). La Sicilia, dalla quale provengono circa i due terzi della produzione nazionale, è la regione maggiormente rappresentata.

Le specie più diffuse sono l'arancio dolce (*Citrus sinensis*), il limone (*C. lemon*) e il clementino (*C. clementina*), con il 61%, il 20% e il 18% rispettivamente. Altre specie rilevanti, per il consumo fresco o la trasformazione industriale, sono il mandarino (*C. reticulata*), il pompelmo (*C. paradisi*), il bergamotto (*C. bergamia*), il chinotto (*C. myrtifolia*) e il cedro (*C. medica*). Il portainnesto più diffuso è l'arancio amaro (*C. aurantium*) che possiede ottime caratteristiche bioagronomiche e fitosanitarie (fatta salva la suscettibilità al virus della tristezza).

La produzione mondiale di agrumi è minacciata da molte malattie virali, batteriche e fungine. Fra tutte, uno dei principali fattori limitanti è costituito dal virus della "tristeza" (citrus tristeza virus, CTV) che colpisce soprattutto gli impianti innestati su arancio amaro. Anche il greening, oggi ribattezzato con il nome di Huanglongbin ("giallume dei germogli") originariamente dato alla malattia da Reinking (1919) che la descrisse per primo in Cina, rappresenta oggi una importante minaccia per gli agrumi in tutto il mondo.

Il numero di patogeni trasmessi mediante materiale di propagazione infetto è tuttavia elevato ed è oggetto di studio di numerosi ricercatori che afferiscono alla International Organization of Citrus Virologists.

La conoscenza di questi patogeni risulta oggi imprescindibile prerequisito per affrontare in modo organico la problematica della sanità del materiale agrumicolo di propagazione (virus esente), conformemente al protocollo di certificazione del Ministero delle Politiche Agricole alimentari e forestali (decreto del 20 novembre 2006).

2. Malattie degli agrumi causate da virus, viroidi, procarioti endogeni

2.1. Malattie da virus

Psorosi degli agrumi

E' la più conosciuta malattia degli agrumi trasmissibile per innesto, essendo stata segnalata già nel 1926 (Doidge, 1926), anche se il suo agente eziologico è stato identificato solo nel 2000 (Milne *et al.*, 2000).

Oggi sappiamo che è causata dal *Citrus psorosis virus* (CPsV), virus ad RNA a singolo filamento di polarità negativa, appartenente al genere degli Ophiovirus (Vaira *et al.*, 2005). E' presente in tutte le aree agrumicole del mondo e può infettare tutte le specie di *Citrus* anche se, a causa della selezione, ha perso di importanza.

Il sintomo tipico è la desquamazione corticale del tronco e talvolta delle branche, associata a depositi di gomma, prevalentemente su piante adulte con età superiore ai 15 anni. Altri sintomi sono l'accumulo di gomma nel legno, il deperimento progressivo delle piante fino alla morte.

Le piante affette da psorosi sono meno produttive, più sensibili al freddo e alla siccità e meno longeve. Sintomi fogliari sono le scolorazioni perinervali che colpiscono la nuova vegetazione primaverile ed autunnale e scompaiono a maturità.

La sindrome nota come Psorosi B causa maculatura ad anello a carico dei frutti, delle foglie e talvolta pustole sulla corteccia.

Variegatura infettiva degli agrumi

Causata dal *Citrus infectious variegation virus* (CIVV) del genere *Ilarvirus*, famiglia *Bromoviridae*, è stato il primo virus degli agrumi trasmesso sperimentalmente (Trabut 1913). Fawcett e Klotz (1939) lo hanno descritto come una nuova malattia chiamata "variegatura infettiva". E' trasmesso attraverso materiale di propagazione agamica con possibilità d'infettare tutte le specie di *Citrus*.

I sintomi di variegatura sono caratterizzati dalla presenza di aree clorotiche e scolorazioni più o meno evidenti della lamina fogliare ed in alcuni casi anche da giallumi; la lamina fogliare si presenta allungata con margine spesso, ondulato e irregolare.

La bollosità e la scolorazione si manifestano con maggiore frequenza su limone mentre i giallumi fogliari si osservano su diverse varietà di arancio e su pumelo. L'infezione viene rilevata in laboratorio mediante ELISA (Davino e Garnsey, 1984), e ibridazione molecolare (Garnsey, 1975). Le piante indicatrici per i saggi biologici sono limone Eureka, cedro Etrog e limetta messicana.

Foglia rugosa

Scoperta in Florida diversi anni fa (Garnsey, 1968) è causata da *Citrus leaf rugose virus* (CiLRV), appartenente al genere *Ilarvirus*, un virus di 25-32 nm di diametro che induce chiazze in limone Eureka, rugosità delle foglie in limetta messicana e arresto della crescita nelle giovani piante di pompelmo Duncan. E' diffusa in molti paesi del Mediterraneo ma non ha rilevanza ai fini economici.

Foglia smerlettata

Citrus tatter leaf virus (CTLV) è stato inizialmente segnalato in California come una infezione latente in piante di limone Meyer, probabilmente introdotta negli Stati Uniti dalla Cina nel 1906 (Garnsey, 1970). L'indicatore biologico della malattia è il limone Meyer (Wallace e Drake, 1962).

CTLV induce una incompatibilità d'innesto in piante di agrumi innestate su arancio trifogliato e suoi ibridi (Miyakawa e Ito, 2000; Bronson *et al.*, 2004).

Anche se nessun vettore è stato riportato per CTLV e non ci sono segnalazioni di trasmissione naturale di questo virus, la possibilità di eventuale diffusione da limoni Meyer infetti ad altre cultivar di agrumi resta una minaccia permanente per i maggiori produttori di agrumi degli Stati Uniti (Miyakawa e Ito, 2000). Recentemente, usando un antisiero ASGV (*Apple stem grooving virus*) per *immuno-capture* di virioni CTLV-ML, insieme a una RT-PCR, è stato possibile ottenere due ampliconi di 600 e 1.100 bp, che saranno il 78-83% di identità con le sequenze corrispondenti di vari ceppi ASGV (Hilf, 2008).

Maculature a chiazze delle foglie

E' stata rilevata per la prima volta nel 1984, in Spagna, in un clone di kumquat Nagami, SRA-153. L'agente responsabile è un virione ad RNA a singolo filamento positivo di 960 nm, che ha preso il nome di *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) (Galipienso *et al.*, 2001). E' trasmissibile per innesto e, inoculato artificialmente a varie specie di agrumi, induce macchie clorotiche in Dweet tangor, butteratu-

ra del legno in cedro Etrog, decolorazione delle nervature in diverse cultivar di arancio dolce e, di importanza economica, disaffinità d'innesto in piante innestate su citrange Troyer (Navarro *et al.*, 1984).

Di particolare interesse è la sua trasmissibilità attraverso il seme, che espone al rischio di infezione, unico fra tutti i virus degli agrumi, anche le produzioni da seme (Li *et al.*, 2003).

CLBV è stato rilevato in diverse specie di agrumi in Spagna, Australia, Francia, Giappone, USA e Italia (Galipienso *et al.*, 2004; Vives *et al.*, 2002; Guardo *et al.*, 2007), confermando che questo patogeno è diffuso in molte zone agrumicole. L'interesse per l'utilizzo di citrange Troyer come portainnesto resistente alla tristeza, potrebbe portare nel giro di pochi anni ad un nuovo stato di allerta fitosanitario.

Blight o young tree decline

La malattia, osservata per la prima volta in Florida nel 1964, è diventata successivamente un problema molto grave in impianti giovani innestati su limone rugoso e citrange (Smith 1974). I sintomi si notano in piante di 6-10 anni e consistono nel progressivo deperimento della chioma, con foglie piccole e decolorate, morte dei nuovi getti e fioritura ritardata. Col progredire della malattia le radici principali e il capillizio radicale muoiono, causando la morte della pianta.

Da piante affette da *blight* è stato isolato un virus, il cui ruolo nel determinismo della malattia è ancora da provare (Brlansky e Howd, 2002).

Nanismo del satsuma

La malattia è stata descritta nel 1952 in Giappone su mandarino Satsuma (Yamada e Sawamura, 1952). Successivamente, su ospiti differenti sono stati descritti, altri sintomi (Citrus mosaic, Navel orange infectious mottling e Natsudaidai dwarf), che in base agli studi molecolari sono stati attribuiti ad agenti causali molto simili che potevano rientrare in un nuovo genere distinto della famiglia *Comoviridae* (Ito *et al.*, 2004). Le piante colpite da *Satsuma dwarf virus* (SDV), virione icosaedrico con un diametro di 26nm, mostrano nanismo con conseguente diminuzione della produzione e macchie verdi sulle bucce dei frutti, causandone un deprezzamento. La malattia rimane comunque limitata al Giappone.

Enazioni delle nervature

Questa malattia si caratterizza per la formazione di enazioni a carico delle nervature fogliari e in alcuni casi disaffinità d'innesto (Garnsey, 1988). L'agente è il *Citrus vein enation virus* (CVEV), descritto per la prima volta in California su limone rugoso e limetta Messicana (Wallace e Drake, 1953). Mediante microscopia elettronica sono state osservate particelle virali icosaedriche di 27 nm di diametro nel floema e nei tessuti interessati da enazioni fogliari (da Graça, 1991). CVEV è trasmesso da diverse specie di afidi: *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Toxoptera aurantii* (Hermoso de Mendoza, 1993) e *T. citricida* (Maharaj e da Graca, 1989).

Maculatura anulare

Descritta da Ahlawat (1989) come malattia che interessa principalmente il mandarino di Kinnow, è molto diffusa (fino a 100%) in India del Nord.

I sintomi tipici appaiono su mandarino Kinnow e nell'arancio dolce, nel periodo invernale, come maculature anulari verdi al centro che scompaiono in estate. Altri sintomi sono macchie clorotiche e decolorazione delle nervature. La produzione subisce una riduzione quantitativa e uno scadimento qualitativo.

Il virus responsabile della maculatura anulare degli agrumi (ICRSV), è unico membro del genere *Mandarivirus* nella famiglia *Flexiviridae* (Adams *et al.*, 2004, 2005).

Leprosi

Si presenta con tipiche macchie necrotiche su foglie, rametti e frutti, causate da due forme dello stesso virus: il *Citrus leprosis virus tipo citoplasmatico* (CiLV-C) e il *tipo nucleare* (CiLV-N). Le particelle virali sono bacilliformi, con un diametro di 50-70 nm, lunghe 120-130 nm e si ritrovano sempre rilegate in cavità della membrana citoplasmatica o nel nucleo.

La trasmissione avviene per mezzo di acari piatti (*B. phoenicis*, *B. californicus*, *B. obovatus*). Il virus rimane nell'acaro per tutto il ciclo di vita.

L'ospite più suscettibile è l'arancio dolce seguito da mandarino e arancio amaro che mostrano sintomi molto meno gravi. CiLV-C è stato rilevato in quasi tutti i paesi sudamericani e recentemente in Messico meridionale (González Arias *et al.*, 2009).

Morte improvvisa degli agrumi (CSD).

E' stata ritrovata per la prima volta nel 2001 a sud del Triângulo Mineiro nello stato di Minas Gerais e a nord di São Paulo, in Brasile (Gimenes-Fernees e Bassanezi, 2001). CSD è considerata una grave minaccia per la produzione di arancio e mandarino innestati su lima di Rangpur e limone Volkameriano.

I sintomi sono caratterizzati da decolorazione fogliare, parziale defogliazione, riduzione di taglia dei nuovi germogli, morte di gran parte dell'apparato radicale e sviluppo di una macchia gialla nella parte floematica del portainnesto. Col procedere della malattia i sintomi si intensificano culminando con il collasso improvviso e la morte dell'albero, senza abscissione dei frutti (Gimenes-Fernees e Bassanezi, 2001).

La malattia risulta associata a due virus, CTV e un nuovo virus Tymoviridae, provvisoriamente chiamato *Citrus sudden death virus* (CSDaV) (Coletta Filho *et al.*, 2005; Maccheroni *et al.*, 2005). Tuttavia, l'estrema variabilità e complessità di CTV e la bassissima concentrazione di CSDaV rende l'eziologia di questa malattia ancora difficile da dimostrare.

Decolorazione gialla delle nervature

Questa patologia, caratterizzata da schiarimento delle nervature e macchature gialle è stata rilevata per la prima volta su limone e arancio amaro in Pakistan (Catara *et al.*, 1993). Essa è stata poi descritta in altri Paesi fra cui la Turchia e la Cina (Alshami *et al.*, 2003; Onelge *et al.*, 2007). Sulla pianta infetta, i tessuti lungo la nervatura assiale possono assumere aspetto idropico per poi imbrunire, mentre la lamina fogliare presenta bollosità e malformazioni persistenti, con margini ondulati. Su arancio dolce si osserva solo una decolorazione delle nervature. I sintomi della malattia si osservano in campo nel periodo autunnale e primaverile, per poi scomparire in estate. Grimaldi e Catara nel 1996 hanno osservato in foglie di limone infette particelle virali con un diametro di 13-14 nanometri e una lunghezza compresa tra 530 e 1.800 nanometri, media di circa 670-700 nanometri.

Recentemente alcune prove sperimentali hanno dimostrato che *Aphis craccivora* e *Aphis gossypii* sono i possibili vettori del virus responsabile della malattia (Satana e Onelge, 2009), in quanto sono stati in grado di trasmettere i sintomi da piante di limoni infetti a piante di fagiolo e di limone sani.

2.2 Malattie causate da viroidi

I viroidi sono agenti infettivi simili ai virus, scoperti nel 1971 da Theodor O. Diener. Sono costituiti da una piccola molecola di RNA aploide circolare (alcune centinaia di nucleotidi) priva di rivestimento capsidico. I viroidi infettano i vegetali, e possono essere trasmessi mediante materiale di propagazione, polline e attrezzi da taglio. A causa di questa loro versatilità di trasmissione sono tra gli agenti infettivi degli agrumi più ubiquitari (Roistacher, 1983; Barbosa *et al.*, 2005).

Exocortite

L'agente eziologico che causa la malattia è *Citrus exocortis viroid* (CEVd), genere *Pospviroid*, famiglia *Pospviroidae* che possiede un genoma di 370 nucleotidi (Flores *et al.*, 2005). La malattia interessa la maggior parte degli agrumeti perché trasmissibile attraverso il materiale di propagazione infetto e gli attrezzi da taglio (Garnsey *et al.*, 1973; Barbosa *et al.*, 2005).

Gli ospiti suscettibile sono il cedro Etrog, che è l'indicatore specifico, e l'arancio trifogliato dai quali sintomi prende il nome la malattia. Su questo portainnesto, infatti, si hanno delle fessurazioni verticali e desquamazioni della corteccia che iniziano, qualche anno dopo l'innesto, nella zona del colletto ed interessano successivamente anche le radici principali ed il tronco. La corteccia desquamata presenta impregnazioni gommose e sulla corteccia dei rametti si possono notare ingiallimenti.

Cachessia o Xiloporosi

Le specie suscettibili a questa malattia, individuata per la prima volta in Palestina (Reichert e Perlberger, 1934), il cui agente infettivo è il viroide *Hop stunt viroid* (HSVd) genere *Hostuviroid* e famiglia *Pospiviroidae*, sono il mandarino, il clementine, il mandarino Satsuma, la limetta dolce, il Kumquat e l'alemow; risultano tolleranti l'arancio dolce, l'arancio amaro, il limone, l'arancio trifogliato e il limone Volkameriano.

Superata la fase giovanile, le piante mostrano un progressivo deperimento con riduzione dello sviluppo, clorosi e disseccamento dei rametti. In prossimità della zona d'innesto si notano delle alveolature sul cilindro legnoso, con eventuali impregnazioni di gomma, alle quali corrispondono delle sporgenze sulla faccia interna della corteccia.

2.3 Malattie a presunta eziologia virale (virus simili)

Impietratura

I primi sintomi di impietratura sono stati descritti da Reichert e Hellinger (1930) in Palestina. Essa interessa quasi esclusivamente i frutti che induriscono da cui il nome di “impietratura” (Ruggieri 1955), manifestando piccoli ingrossamenti di alcune zone del pericarpo in corrispondenza delle quali l'albedo è imbrunito per la presenza di sacche gommose. Inoltre, la pezzatura dei frutti è ridotta con malformazione ed ingiallimento prematuro della buccia, i frutti affetti cadono prematuramente o non sono commerciabili. Le foglie presentano il tipico mosaico a ‘foglia di quercia’, associato anche ad altre malattie da virus simili.

L'arancio dolce, il pompelmo, il limone Volkameriano e il limone rugoso sono molto suscettibili, mentre mandarino, clementine, limone e arancio amaro presentano sintomi blandi o sono asintomatici. Su alcune cultivar, più frequentemente Moro e Sanguinello, i frutti diventano piriformi ed hanno sviluppo variamente ridotto. Sulle piante infette possono trovarsi frutti impietrati accanto a frutti sani (Catara e Scaramuzzi, 1980).

La trasmissione in natura avviene attraverso il materiale di propagazione infetto.

Cristacortite

Questa malattia, descritta nei paesi del bacino del Mediterraneo (Vogel e Bové 1964; 1980), un tempo era molto diffusa su arancio amaro e, a volte, anche su arancio dolce e mandarino, sia nei vecchi che nei giovani impianti. I sintomi tipici si osservano sugli organi legnosi anche di pochi mesi d'età e consistono in formazioni crestiformi prominenti sulla faccia cambiale della corteccia, alle quali corrispondono delle alveolature nel legno con depositi gommosi. Sulle foglie giovani si osservano maculature clorotiche del tipo a foglia di quercia. Le piante affette appaiono con sviluppo leggermente ridotto. La diffusione in campo avviene attraverso il materiale di propagazione infetto.

Concavità gommose

La malattia è in gran parte presente nel Mediterraneo, anche se diffusa in tutto il mondo. Le lesioni si sviluppano lentamente, ma gli alberi possono subire gravi danni nel corso del tempo. Molti

casi erano presenti nei vecchi impianti di mandarino e di arancio dolce delle cultivar del gruppo Navel; spettacolari quelli presenti su Navelina. La malattia può essere molto grave e invalidante per gli agrumi giovani. La trasmissione avviene mediante l'utilizzo di materiale di propagazione infetto.

Nanismo clorotico

Scoperta a metà degli anni 1990 in Turchia, la malattia (Citrus chlorotic dwarf, CCD) è trasmessa da *Parabemisia myricae* (Kersting *et al.*, 1996; Korkmaz *et al.*, 2000). Induce la formazione di foglie rugose ed arricciate su piante di limone, mandarino e arancio, simili a quelli causati dalla variegatura infettiva degli agrumi. Le piante mostrano anche una marcata riduzione di taglia.

2.4 Malattie da procarioti

Huanglongbing o greening

La malattia degli agrumi nota come Huanglongbing (HLB) o "greening", è attualmente la più devastante malattia degli agrumi nel mondo (Bové, 2006, 2008). Tre tipi di batteri floematici Gram-negativi, non coltivabili *in vitro*, appartenenti al genere *Candidatus Liberibacter* (α -Proteobacteria) sono associati con la malattia: *Ca. L. africanus* in Africa, *Ca. L. asiaticus*, in Asia, Nord (USA) e Sud America (Brasile) e *Ca. L. americanus*, per la prima volta segnalato in Brasile (Teixeira *et al.*, 2005) ora individuato anche in Cina (Lou *et al.*, 2008). Fitoplasmi 16Sr del gruppo IX e 16Sr del gruppo I sono stati trovati associati con HLB a São Paulo (Teixeira *et al.*, 2008) e in Cina meridionale (Chen *et al.*, 2008). Recentemente due specie geneticamente simili ma biologicamente distinte di *Candidatus Liberibacter* sono state associate alla malattia in Brasile (Lopes *et al.*, 2009a e 2009b).

Oltre che con il materiale di propagazione infetto i tre batteri associati con HLB sono trasmessi da due psille degli agrumi: *Diaphorina citri* (Capoor *et al.*, 1967; Yamamoto *et al.*, 2006) e *Trioza erythrae* (McClellan e Oberholzer, 1965) e sperimentalmente da cuscuta (*Cuscuta campestris*) (Bové, 2006, 2008). Il vettore asiatico di HLB, *D. citri*, è stato individuato a Cuba nel 1999 e si è già diffuso in tutto il paese (González *et al.*, 2007).

Le piante che vengono contagiate da questo batterio possono non manifestare alcun sintomo nel corso dei primi due anni di infezione. Quando i segni evidenti della malattia fanno la loro compar-

sa, con caratteristiche screziature gialle su foglie e germogli, ormai è troppo tardi. La pianta produce soltanto frutti verdi, amari e immangiabili, arrivando a morte in 5-7 anni (Capoor *et al.*, 1974; Roistacher 1996).

Per la gravità dei danni che la malattia arreca e la velocità di diffusione in Brasile sono state messe a punto straordinarie misure di contenimento, basate su due azioni complementari:

- gestione della malattia nelle zone colpite e interessate aree limitrofe mediante l'applicazione di insetticidi per ridurre le popolazioni di vettori, in modo da evitare la diffusione degli agenti patogeni, e produzione e messa a dimora in vivaio di piante sane;
- soppressione di HLB mediante l'uso di "piattaforme" che si muovono fra i filari ad una velocità di 3-4 km/h sulle quali stanno due o quattro ispettori. Controllando ~5000 alberi/giorno, e permettendo un eccellente controllo delle parti superiori dell'albero; gli alberi sintomatici che sono stati identificati durante il controllo, devono essere rimossi il più rapidamente possibile. Dopo aver rimosso l'albero, i germogli o le altre parti dell'albero rimaste a terra devono essere eliminate perché fonte d'inoculo.

3. La Tristeza

3.1 Diffusione della malattia

La “tristeza” è una delle malattie più dannose e distruttive degli agrumi, in quanto colpisce gravemente la maggior parte delle specie coltivate, soprattutto se innestate su arancio amaro¹. Il virus responsabile (*Citrus tristeza virus*, CTV) infetta la maggior parte delle cultivar ed ibridi di *Citrus* spp. (Muller e Garnsey, 1984), altre *Rutaceae* come *Poncirus trifoliata*, *Swinglea glutinosa*, *Severinia buxifolia*.

Al di fuori delle *Rutaceae*, il virus si moltiplica solo in alcune specie di *Passiflora*, soprattutto *Passiflora gracilis* (Muller *et al.*, 1974; Roistacher e Bar-Joseph, 1987).

Il termine “tristeza” fu coniato dagli agricoltori brasiliani in seguito ad un’epidemia che colpì il Sud America alla fine degli anni ’30 ma, la sua origine, con ogni probabilità è nel sud-est asiatico da dove si è progressivamente diffusa nelle più importanti aree agrumicole del mondo. Nel bacino del Mediterraneo la malattia è segnalata in forma epidemica in alcune regioni, nelle quali si è diffusa causando la morte di milioni di piante, ed in molte altre aree sta cominciando a diffondersi: Tunisia (1950), Spagna (1957), Algeria (1957), Egitto (1958), Turchia (1963), Israele (1970), Libia (1976), Marocco (1978), Francia (1988), Cipro (1992), Albania (1998), Libano (1998) e Palestina (2000).

In Italia la malattia fu segnalata, per la prima volta, solo su poche piante nel 1955. Russo (1956) segnalò che in molte aree del Mediterraneo, inclusa l’Italia, vi era uno stato di allerta per CTV e che era presente un serio rischio per il futuro dell’industria agrumicola Mediterranea poiché tutti gli impianti erano innestati su arancio amaro e col tempo, il virus avrebbe infettato i frutteti di tutto il mondo tramite il limone Meyer (*C. meyeri*) e il mandarino Satsuma (*C. unshiu*).

¹ La ricerca di nuovi portinnesti resistenti a *Phytophthora* spp. responsabile di una grave epidemia che ebbe la massima diffusione intorno al 1935 determinò un profondo cambiamento nella tecnica vivaistica, con l’abbandono delle piante franche di piede e l’utilizzo contemporaneo e generale dell’ arancio amaro come portainnesto, con l’eccezione di alcuni paesi, come il Sud Africa e l’Australia, dove fu preferito il limone rugoso in quanto dopo qualche anno dall’impianto le piante innestate su arancio amaro morivano.

Russo (1956) accertò sperimentalmente la presenza di infezioni in 4 piante di limone Meyer ad Acireale (Catania) e Palermo, 3 di mandarino Satsuma ad Acireale e 2 a Paternò (Catania). Altri ritrovamenti furono fatti in Sardegna su Satsuma (Servazzi *et al.*, 1967), a Monasterace (Calabria) su limone Meyer (Catara, 1968). I rinvenimenti crearono un grave allarme, inascoltato, circa l'esigenza di un decreto di lotta obbligatoria per la tristezza (Catara, 1968). Nel 1974 a Catania furono ritrovate marze infette di Satsuma importate dal Giappone e nel 1982, nello stesso agrumeto dove 15 anni prima era stata ritrovata l'infezione su Meyer, fù individuata la presenza di nuovi casi in arancio dolce Golden Burckeye, limone di Ceylon, pompelmo Marsh e mandarino Satsuma Wase.

Grazie al nuovo test immunoenzimatico (ELISA) furono individuate nei due anni successivi altre 200 piante infette di arancio dolce cv. Golden Burckeye, satsuma tipo Wase e pompelmo Marsh infette da CTV (Davino *et al.*, 1983). Nel 1995 furono riscontrate infezioni su 3-4.000 piante di lima di Rangpur (*C. limonia*) e su 8-10.000 di calamondino in alcuni vivai di Pescia (Pistoia) (Davino e Terranova, 1999).

Finalmente, con troppo ritardo, il tanto atteso decreto di lotta obbligatoria venne emanato dal Ministero delle Risorse agricole, alimentari e forestali (pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 285 del 5 dicembre 1996). Esso prevede l'applicazione di misure di prevenzione e di controllo adeguate al tempo, ma non più rispondenti alla situazione attuale di diffusione della malattia e alle conoscenze generali acquisite a livello mondiale.

Negli anni più recenti vasti focolai sono stati riscontrati in provincia di Siracusa su piante di due ibridi importati dalla Spagna, mandarini Fortune e Nova, su piante di pompelmo e arancio Tarocco in provincia di Catania e Navelina in provincia di Taranto (Davino *et al.*, 2003; Caruso *et al.*, 2003). Qualche anno più tardi il virus fu ritrovato nella provincia di Catania su Tarocco comune e su arancio dolce Navelina (Davino *et al.*, 2004). Quasi contemporaneamente furono trovate infezioni di CTV in Puglia su Navelina e a Rosarno (Calabria) su Fortune e Satsuma.

Test ELISA condotti su queste piante infette evidenziarono che per il 90% l'infezione era stata causata da *Aphis gossypii* Glover. Indagini molecolari individuarono un isolato (CTV-SY568) molto virulento considerato fortemente distruttivo e trasmesso da *A. gossypii*. Di oltre 60.000 piante testate 30.000 risultarono infette.

Solo nel 2005 è stata avviata una prova di variabilità genetica di CTV, sfruttando la tecnica SSCP, su 450 piante di agrumi provenienti da 3 diverse aree agrumicole (Davino *et al.*, 2005). I risul-

tati ottenuti dimostrano che l'isolato blando ritrovato in Puglia è differente dagli isolati siciliani DS1-SR che hanno un'alta similarità di sequenza con i ceppi blandi californiani SY568 e SY107.

Indagini effettuate in Puglia, hanno rivelato la diffusa presenza di uno stesso ceppo, verosimilmente identico al ceppo blando T30 della Florida. Tuttavia in uno dei focolai è stato individuato un isolato con genotipo non assimilabile a nessun isolato standard di riferimento.

Un'altra indagine condotta da Davino *et al.* (2004), su 17 campioni provenienti dalla Calabria e dalla Sicilia, mediante l'ausilio di SSCP, RT-PCR bidirezionale, clonaggio e costituzione di alberi filogenetici, ha permesso di dimostrare chiaramente che gli isolati di CTV riscontrati in Italia appartengono sia a ceppi che si possono trovare nel Bacino del mediterraneo che a ceppi caratteristici degli Stati Uniti d'America e del Giappone e quindi geograficamente molto distanti. Tutto questo fa escludere una diffusione primaria della malattia attraverso gli afidi che invece giocano un ruolo fondamentale dal momento in cui i nuovi ceppi vengono introdotti in un territorio (Moreno, 2003).

Le indagini condotte dal 2000 al 2006 hanno mostrato che il virus si era rapidamente diffuso in quasi tutte le aree agrumicole (Catara e Davino, 2006). Una successiva indagine, ha permesso di ritrovare un ceppo nettamente virulento, del tutto diverso da quelli ritrovati precedentemente, che presenta un'alta omologia di sequenza nucleotidica con ceppi brasiliani di seedling yellows Barao B, Val-CB e C271-2 (Rizza *et al.*, 2007). Oggi il numero di piante affette da CTV riscontrate negli agrumeti siciliani, non è più quantificabile.

Recentemente allarmi di nuovi focolai del virus sono stati identificati in differenti aree della Calabria (Albanese *et al.*, 2010).

3.2 Sintomatologia

La sintomatologia della “tristeza” varia a seconda dei ceppi virali e della suscettibilità della specie o combinazione nesto-portinnesto della pianta ospite. Sebbene alcuni isolati appaiano asintomatici, la maggior parte induce uno o più dei seguenti sintomi, rilevabili più facilmente sulle piante indicatrici:

- deperimento della pianta (decline)
- alveolatura inversa (inverse pitting)
- clorosi nervale (vein clearing)
- butteratura del legno (stem pitting)

- giallume dei semenzali (seedling yellows)

Il **deperimento** delle piante (Fig. 1) che ha dato il nome alla malattia, è il sintomo più evidente provocato dal virus e si manifesta in tutti gli agrumi innestati su arancio amaro, eccetto il limone. Esso è dovuto dalla necrosi delle cellule floematiche dell'arancio amaro che porta a morte le radici e quindi al mancato apporto di acqua e sali minerali alla chioma e di conseguente ingiallimento e successiva caduta delle foglie e disseccamento dei rametti.

Il deperimento può presentarsi in forma acuta (quick decline) o in forma cronica (slow decline). Nel primo caso le piante appassiscono rapidamente e in pochi giorni o poche settimane, restano senza foglie e senza frutti; in certi casi, il processo è così rapido che non si riesce neanche ad individuare il virus nella chioma (Bar-Joseph e Nitzan, 1991). Se la malattia si manifesta attraverso deperimento lento le piante perdono progressivamente le foglie, mentre i rami iniziano a seccare portando alla formazione di germogli stentati. Inoltre si ha una diminuzione evidente della pezzatura dei frutti che porta, ancor prima della morte della pianta, ad una perdita di valore commerciale.

In alcuni casi gli alberi non presentano sintomi per molti anni o, ancor prima dei sintomi tipici della tristeza, presentano uno sviluppo ridotto (Garnsey *et al.*, 1996). In ogni caso però la malattia finisce per portare gli alberi alla sintomatologia tipica della tristeza e alla successiva morte (Garnsey e Jackson, 1975).

L'**alveolatura inversa** (Fig. 2) è un sintomo che si osserva a carico del portinnesto arancio amaro al di sotto del punto d'innesto ed è associato ad un impoverimento d'amido nei tessuti legnosi e sulla faccia interna della corteccia dell'arancio amaro dove si nota la presenza di piccole alveolature a cui corrispondono delle estroflessioni sulla superficie del legno.



Fig. 1. Sintomo di Decline su arancio dolce innestato su arancio amaro



Fig. 2. Sintomo di alveolatura inversa (inverse pitting) sulla faccia cambiale di corteccia di arancio amaro infetto con un isolato virulento di CTV

La **clorosi nervale** (Fig. 3) consiste nell'ingiallimento delle nervature secondarie delle foglie seguita nei casi più gravi, dalla suberificazione delle nervature (vein corking) (Fig. 4).



Fig. 3. Sintomo di vein clearing su limetta messicana inoculata con un isolato virulento.



Fig. 4. Sintomo di Vein corking su limetta messicana inoculata con un isolato virulento.

La **butteratura del legno** (Fig. 5) porta alla formazione di depressioni e solchi sulla corteccia, ai quali corrispondono depressioni del legno, e alla fragilità dei rami che, di conseguenza, si rompono facilmente. Mentre nelle fasi iniziali si notano soltanto piccole depressioni sul legno esterno, in una fase più avanzata i rami e i tronchi appaiono deformati e striati e la corteccia ispessita in modo anormale. Inoltre, l'accrescimento della pianta è ridotto e i frutti sono di piccole dimensioni.



Fig. 5. Sintomo di butteratura del legno (stem pitting) su cedro Etrog

La sintomatologia detta **giallume dei semenzali** (Fig. 6) viene associata agli isolati più virulenti ed è caratterizzata da foglie a coppa, intensa clorosi, accorciamento degli internodi e arresto di svi-

luppo della pianta. Si riscontra nel limone, nel pompelmo e nell'arancio amaro (Roistacher, 1982, Fraser, 1952).



Fig. 6. Sintomi di seedling yellows su arancio amaro

3.3 Modalità di trasmissione in campo

La diffusione primaria del *Citrus tristeza virus* in nuove zone avviene principalmente attraverso il materiale di propagazione infetto. La dispersione secondaria, cioè a livello locale, avviene attraverso insetti vettori (Cohen e Bové, 1981); praticamente trascurabile è la trasmissione per inoculazione meccanica attraverso tagli nel floema che si realizza in laboratorio (Garnsey *et al.*, 1977).

Gli insetti vettori sono rappresentati da diverse specie di afidi: afide bruno (*Toxoptera citricidus*), afide del melone (*Aphis gossypii*), afide verde degli agrumi (*A. citricola*), afide nerastro degli agrumi (*T. aurantii*), afide del pesco (*Myzus persicae*) e *Dactynotus jaca* (Marroqu'in *et al.*, 2004).

La trasmissione attraverso afidi avviene in forma semi-persistente e con diversa efficacia a seconda della specie di afide e della specie di agrume donatrice e accettrice (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984; 1988). L'afide più efficiente è *T. citricidus* seguito da *A. gossypii*; in particolare è stato dimostrato (Yokomi *et al.*, 1994) che, a parità di condizioni, l'efficacia del primo è circa venti volte superiore del secondo. *T. citricidus* è una specie diffusa in Asia, Africa centrale e meridionale, Australia, America del Sud, America centrale e in Florida (Marroqu'in *et al.*, 2004), ma si teme un suo ingresso in Europa in quanto recentemente è stato riscontrato nell'isola di Madeira (Portogallo) e nella penisola iberica, in limitate aree nord-occidentali, non interessate da agrumicoltura intensiva (Catara *et al.*, 2007).

3.4 Metodi di difesa

Lo strumento principale per contrastare il CTV è la prevenzione (Rocha-Peña *et al.*, 1995). Nelle aree agrumicole dove ancora il virus non è presente si raccomandano programmi di quarantena e certificazione del materiale di propagazione. Quando il virus è stato introdotto in una zona con arancio amaro come portinnesto si deve procedere all'eradicazione degli alberi infetti, come è stato fatto per molti anni in Israele (Bar-Joseph *et al.*, 1989), California (Dodds *et al.*, 1996), Cipro (Kyriaku *et al.*, 1996) e Cuba (Batista *et al.*, 1996). Fondamentali per l'esito del programma di eradicazione sono il tempismo dell'intervento, la percentuale iniziale di alberi infetti e l'efficienza degli afidi vettori nell'area interessata. In California è stato rilevato che è consigliabile proseguire con il programma di eradicazione per almeno 5 anni (Dodds *et al.*, 1996) fino a quando non vengono riscontrate più piante infette. Nel caso in cui la malattia ha diffusione epidemica tale approccio risulta inefficace e dispendioso.

Se la dispersione del virus diviene incontrollabile, un modo per contrastarlo è l'utilizzo di portinnesti tolleranti; i più utilizzati nei Paesi dov'è presente la malattia sono l'arancio trifogliato e il mandarino Cleopatra (*C. reshni*) (Forner e Pina, 1992). Questo provvedimento è efficace nelle zone dove prevalgono isolati più aggressivi e gli alberi mostrano nanismo, scarsa produzione e frutti piccoli (Muller *et al.*, 1988; Roistacher, 1988; Koizumi, 1991; Muharam e Whittle, 1991; Broadbent *et al.*, 1992), mentre nel caso di isolati meno virulenti, come nei paesi del Mediterraneo e in Florida, risulterebbe dispendioso visto che le piante continuano a produrre convivendo per diversi anni col virus. La strategia ormai seguita nei paesi in cui la malattia interessa oltre il 5% delle piante è quella di eliminare solo le piante con infezioni da ceppi molto virulenti. L'utilizzo di portinnesti tolleranti, pur essendo efficace nel contrastare la malattia, risulta economicamente svantaggioso per gli agrumicoltori e, in alcuni casi, espone al rischio connesso alla sensibilità elevata alla gommosi del colletto ed al marciume secco delle radici (Catara e Polizzi, 1999; Catara e Tessitori, 2006).

Un altro accorgimento per contrastare i ceppi più virulenti consiste nella protezione crociata utilizzata in Brasile da oltre 40 anni. Si è osservato, infatti, che le piante inoculate con ceppi blandi del virus, risultano protette dagli isolati più aggressivi. Questo intervento ha dato buoni risultati in Brasile (Muller e Costa, 1972; Costa e Muller, 1980; Muller *et al.*, 1988) e in Sud Africa (Van Vuuren *et al.*, 1993). Tuttavia non si è riusciti ancora a dimostrare su quali basi avvenga questo fenomeno, per cui la sua applicazione su ampia scala richiede ulteriori approfondimenti. Infatti la protezione crociata ri-

guarda solo alcuni ceppi blandi e solo alcune *cultivar* e spesso è solo temporanea (Rocha-Peña *et al.*, 1995). Per lungo tempo sono stati enfatizzati i rischi derivanti da possibili mutazioni che possono portare alla nascita di nuovi ceppi virulenti (Ayllón *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001), ma non risultano casi documentati.

3.5 Agente causale

Citrus tristeza virus appartiene alla famiglia *Closteroviridae*, genere *Closterovirus* (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Bar-Joseph e Lee, 1989; Martelli *et al.*, 2000). Il virus ha circa 2000 nm di lunghezza e 10-12 nm di diametro, con un capsido formato da due proteine di 25 e 27 kDa (Sekiya *et al.*, 1991; Febres *et al.*, 2003) che ricoprono rispettivamente il 95% e il 5% del virus, conferendogli una struttura filamentosa.

Il genoma di CTV consiste in un'unica molecola di RNA di polarità positiva, contenente 19226-19296 nucleotidi organizzati in 12 moduli di lettura (ORF, Open reading frame), che codificano potenzialmente per 19 proteine, e 2 zone non codificanti (UTR, Untranslated Region) all'estremità 5' e 3', di 108 e 209 nucleotidi rispettivamente (Karasev *et al.*, 1995; Karasev e Hilf, 1997). La prima ORF (ORF1a), a partire dall'estremità 5', codifica per una poliproteina di 349 kDa che contiene un dominio della proteina tipo papaina, un dominio metiltrasferasi ed un dominio elicasi.

L'ORF1b codifica per una RNA polimerasi RNA dipendente di 57 kDa, che viene tradotta con un meccanismo di deriva ribosomiale di tipo + 1. Le successive ORF codificano per prodotti proteici di circa 33, 6, 65, 61, 27, 25, 18, 13, 20 e 23 kDa. Tra questi si ritrovano delle proteine necessarie per la formazione del virione (Satyanarayana *et al.*, 2000): una piccola proteina idrofoba (p6) di membrana responsabile dell'ancoraggio che probabilmente è coinvolta in caso di infezione sistemica, una proteina simile alle proteine da shock termico della famiglia HSP70 (p65) ed un'altra (p61) probabilmente relazionata con le proteine HSP90 e coinvolta nella fase di assemblamento del virione.

A valle, verso l'estremità 3', sono presenti la proteina capsidica minoritaria (p27) e quella maggioritaria (p25) coinvolte nell'assemblamento del virione, una proteina (p20) che si accumula in corpi di inclusione cellulare (Gowda *et al.*, 2000) e la proteina p23 che presenta una regione di aminoacidi basici e una struttura a dito di zinco capace di unirsi all'RNA (Karasev *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 2000) la quale è responsabile dell'espressione dei sintomi (Ghorbel *et al.*, 2001, Fagoaga *et al.*, 2005). Le proteine p23, p20 e p25 sono responsabili dei meccanismi di soppressione del silenziamento genico

(Lu *et al.*, 2004). Le proteine p6 e p64 sono responsabili del movimento tra cellula e cellula, p25 e p20 sono coinvolte nel movimento all'interno delle cellule. La funzione degli altri prodotti proteici è ancora sconosciuta. A differenza delle prime due ORF, che si esprimono a partire dall'RNA genomico (gRNA), le altre dieci si esprimono tramite la produzione di RNA subgenomici (sgRNA) 3' coterminali (Hilf *et al.*, 1995; Ayllón *et al.*, 2005).

Oltre al gRNA e ai sgRNA, nelle cellule infettate dal CTV vengono prodotti RNA difettivi (D-RNA) che contengono le estremità 5' e 3' del gRNA, ma non presentano il frammento variabile della regione centrale (Mawassi *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999). I D-RNA si creano tramite cambi di stampo dell'RNA polimerasi durante il processo di replicazione (Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999) e, almeno in un caso, sono stati correlati alla modulazione dei sintomi del ceppo virale al quale erano associati (Yang *et al.*, 1999).

CTV presenta inoltre un alto tasso di mutazioni genetiche riconducibili ad errori da parte dell'RNA polimerasi RNA dipendente durante il processo di replicazione. Questi errori, insieme alle ricombinazioni dovute a ripetute infezioni da afidi o da innesti (Rubio *et al.*, 2001), portano a diverse varianti genetiche dette "quasi - specie" che necessitano di diverse tecniche per essere differenziate (Niblett *et al.*, 2000).

4. Identificazione e caratterizzazione del virus della tristezza degli agrumi

4.1 Saggi biologici

Una delle poche tecniche che ancora oggi riesce a differenziare e caratterizzare i ceppi di CTV è il saggio biologico. Si utilizza un set standard di piante indicatrici su cui valutare l'espressione dei sintomi e, mediante la tabulazione e lo studio dei diversi quadri sintomatici, si riescono a classificare i diversi tipi di isolati. Le piante indicatrici utilizzate (Garnsey *et al.*, 2005) sono:

- Semenzali di limetta messicana, che reagiscono con scolorazione delle nervature (VC), water spot sulla pagina inferiore, foglia a coppa, suberificazione delle nervature, alveolatura del legno e arresto dello sviluppo.
- Semenzali di arancio amaro che manifestano sintomi accentuati di giallumi fogliari e accorciamento degli internodi (seedling yellows SY).
- Semenzali di pompelmo Duncan che misurano l'abilità dei diversi ceppi nel causare stem pitting (SP), caratterizzato da sintomi di clorosi nervale e scanalature sul legno, oltre ai sintomi di seedling yellows (SY), simili a quelli su arancio amaro.
- Semenzali di arancio dolce Madam Vinous, per osservare stem pitting (SP) nei ceppi più virulenti.
- Piantine di arancio dolce Hamlin o Valencia innestate su arancio amaro, per rilevare la capacità dei ceppi ad indurre clorosi e stunting e che riflettono la difficoltà che ha la pianta nel fare fluire la linfa elaborata alle radici attraverso i vasi floematici, parzialmente o totalmente occlusi, per la formazione di placche di callosio. Questi sintomi sono indicatori di decline e vengono indotti dai ceppi più virulenti.
- Piantine di pompelmo Duncan su limone rugoso, per i ceppi molto aggressivi che non permettono lo sviluppo del Pompelmo non innestato.

Il saggio viene eseguito su piante del diametro di circa 8 mm che vengono inoculate con frammenti di corteccia o foglia infetta, mediante inoculazione a gemma o a tassello. Le piante vengono mantenute in serra a temperatura compresa tra i 18° e i 25° e dopo circa sei mesi si registrano i sintomi. Il saggio si conclude dopo 12 mesi.

La presenza o assenza dell'insieme dei sintomi permette la clusterizzazione in biogruppi (Fig. 7) (Garnsey *et al.*, 2005).

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

Fig.7. Rappresentazione schematica di 11 profili dei sintomi ottenuti dalla caratterizzazione di una collezione di isolati di *Citrus tristeza virus* provenienti da varie parti del mondo. **LR**: sintomi fogliari e butteratura del legno su limetta messicana; **DEC**: clorosi e riduzione di taglia sulla combinazione d'innesto arancio dolce su arancio amaro; **SY**: giallume dei semenzali su semenzali di arancio amaro; **GSP**: butteratura del legno su semenzali di pompelmo Duncan; **OSP**: butteratura del legno su semenzali di arancio dolce Madame Vinous.

4.2 Test sierologici

L'ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) è la metodologia più utilizzata per l'identificazione di CTV in pianta, riesce a rilevare anche piccole quantità di virus (in estratto di pianta infetta, in concentrazione dell'ordine di 10ng/ml), su materiale vegetale prelevato direttamente dal campo. Si tratta di un saggio immunoenzimatico in fase solida con miscele di anticorpi policlonali o monoclonali specifici per il rilevamento del virus; la reazione di legame tra virus e anticorpo viene resa visibile attraverso il viraggio di colore di un opportuno substrato catalizzato da un enzima, la fosfatasi alcalina, previamente legato agli anticorpi.

La reazione è realizzata nelle pozzette di una piastra in polistirene, nelle quali sono aggiunti in successione, una sospensione di anticorpi purificati, l'estratto vegetale, una sospensione di anticorpi coniugati con l'enzima e il substrato (p-nitrofenil-fosfato) deputato al viraggio di colore in presenza dell'enzima. Continui lavaggi fanno sì che, se l'estratto non contiene il virus omologo agli anticorpi utilizzati, questi ultimi, nella forma legata all'enzima, non sono trattenuti e vengono quindi eliminati. Poiché l'intensità di colore è proporzionale alla concentrazione del virus nel campione, effettuando una lettura con un fotometro, è possibile ottenere anche dati semi quantitativi.

I metodi ELISA vengono distinti in diretti e indiretti. Quello più frequentemente utilizzato per CTV è diretto perché l'enzima è coniugato all'anticorpo specifico per il virus e viene indicato con la sigla **DAS ELISA** (Double Antibody Sandwich-ELISA) (Vela *et al.*, 1986).

Un metodo sierologico semplice e rapido noto come **direct tissue blot immunoassay (DTBIA)** è stato sviluppato e applicato per la rilevazione di numerosi virus, in particolare cucumovirus, luteovirus, potexvirus, e *Tomato spotted virus*, ampiamente utilizzato per il monitoraggio del virus in numerosi Paesi.

Dopo aver eseguito l'immunoimpronta di una sezione vegetale su un foglio di nitrocellulosa, questa viene lavata con PBS contenente 1% di BSA e incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente la membrana viene incubata per 2h a temperatura ambiente con l'anticorpo specifico e 1h col coniugato.

Altra tecnica immunoenzimatica ampiamente utilizzata per l'identificazione di CTV è **l'immune-tissue printing** (immunoimpronta di tessuto). Consiste nel tagliare foglie germogli o rametti e nell'appoggiare la sezione risultante dal taglio su una membrana di nylon. La presenza di virus nell'impronta lasciata dal tessuto viene poi rivelata in laboratorio con la metodica ELISA. A differenza dell'ELISA, il metodo permette di conservare meglio l'RNA ad adeguate temperature (4°C) sulle membrane di nylon, anche per diversi anni.

Una tecnologia sostitutiva del test ELISA è conosciuta come **Lateral Flow (LF)** (Danks e Barker, 2000; Salomone e Roggero, 2001). Il dispositivo di test LF, di tipo immunocromatografico, consiste di una membrana cromatografica inserita tra due supporti in plastica. Sulla faccia superiore si aprono un pozzetto per il caricamento dell'estratto vegetale da analizzare ed una finestra per la lettura del risultato. Sotto la zona di deposizione del campione (*sample pad*) è collocato un reagente rivelatore, ottenuto coniugando anticorpi anti-virus con oro colloidale (rosso) essiccato su fibra di vetro (*con-*

jugate pad). Gli stessi anticorpi sono immobilizzati sulla membrana formando una linea perpendicolare alla direzione di flusso in corrispondenza della lettera T. Anticorpi sono immobilizzati a formare un'altra linea in corrispondenza della lettera C. Una zona assorbente (*absorbent pad*) situata all'estremità opposta del sample pad favorisce il flusso del campione lungo la membrana per capillarità (Paek *et al.*, 2000). Una piccola quantità di tessuto vegetale viene omogeneizzata manualmente in adeguato tampone di estrazione e 3-4 gocce dell'estratto sono depositate nell'apposito foro. La sospensione diffonde lungo la membrana per capillarità e, non appena raggiunge la linea di anticorpi di cattura (T), il complesso viene trattenuto secondo uno schema "a sandwich". Le particelle in eccesso continuano a diffondere fino alla linea di controllo, dove sono nuovamente bloccate. I campioni positivi danno luogo alla formazione di due linee colorate; quelli negativi formano la sola linea di controllo. L'intensità della colorazione rossa è proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione, quindi del virus (10 minuti). La tecnica, molto rapida e sensibile anche a basse concentrazioni di virus è più costosa rispetto all'ELISA, pur essendo sempre una tecnica qualitativa.

Altri metodi sierologici, attualmente meno utilizzati per CTV, sono i saggi: dot-immunoblotting (Rocha-Peña *et al.*, 1991) e radio immunoassorbente (RISA) (Rocha-Peña *et al.*, 1991), utilizzando un test sierologico specifico per microscopio elettronico a scansione (SSEM) (Brlansky *et al.*, 1984), immunofluorescenza in sito (ISIF) (Brlansky *et al.*, 1984), saggio immunoenzimatico *in situ* (ISIA) e saggio Western blot (Rocha-Peña *et al.*, 1991).

4.3 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).

La tecnica più comunemente usata per differenziare i ceppi di Closterovirus è l'**SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)**. Basata sull'alterazione della conformazione del DNA a singola elica che solo permette di rilevare anche una sola sostituzione nucleotidica, causa di una diversa velocità di migrazione su gel di poliacrilammide del frammento di DNA in cui è avvenuta la mutazione.

Il DNA a doppia elica è denaturato con calore e formammide e raffreddato rapidamente per evitare la rinaturazione. Il DNA a singola elica assume conformazioni diverse: la migrazione su gel di poliacrilammide non denaturante sarà determinata dalla conformazione piuttosto che dalle dimensioni. Il pattern di conformazioni è sequenza-dipendente: anche una singola sostituzione nucleotidica altera la conformazione.

La tecnica è stata utilizzata per comparare ceppi provenienti da diverse aree geografiche osservando le variazioni nella proteina capsidica (p27) e per confrontare e distinguere diversi ceppi di CTV (Rubio *et al.*, 1996). I pattern di bande generate in SSCP nel caso di infezioni miste presentano una visualizzazione molto complessa ed è stato anche dedotto che differenti pattern in SSCP non implicano necessariamente variazioni significative nelle sequenze. La tecnica risulta inadeguata per la comparazione simultanea di molti campioni (Niblett *et al.*, 2000).

Rubio l'ha utilizzata per studiare le diversità biologiche osservate in molti isolati di CTV (Rubio *et al.*, 2000), inoculando la stessa popolazione di ceppi CTV in diverse cultivar ospiti dalle quali ha ottenuto diversi pattern per ogni ceppo, indicando così l'ospite selezionato in base alla variante di sequenza predominante nella popolazione.

Sambade e altri (2002) hanno applicato la tecnica per i geni p18, p13, p20 e p23 e hanno osservato che gli isolati blandi presentano due bande mentre gli isolati che mostrano una sintomatologia severa in SSCP presentano più bande.

In test di cross-protection i sub-isolati nel gene p27 sono stati differenziati mediante SSCP (van Vuuren *et al.*, 2000).

4.4 Amplificazione a catena mediante polimerasi (PCR)

Basata su una reazione di amplificazione di una molecola di DNA stampo che avviene grazie a una DNA polimerasi termostabile a cicli a diverse temperature. Poiché CTV è un virus a RNA è necessario attivare prima una retrotrascrizione per convertire l'RNA a DNA.

La tecnica PCR è stata utilizzata per caratterizzare i diversi isolati di CTV tramite amplificazione specifica di sequenze utilizzando dei marker molecolari (disegnando set specifici di primer), ricavati dalle sequenze dell'intero genoma dei ceppi VT, T3, T30 e T36 (Hilf *et al.*, 1999; Hilf *et al.*, 2000; Hilf *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2003; Sambade *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Hilf *et al.*, 2005).

4.5 Rilevamento e quantificazione mediante amplificazione in tempo reale (real time-PCR)

L'evoluzione naturale della normale PCR è la **PCR Real Time** (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007), che permette di aumentare la sensibilità della PCR rilevando anche particelle di virus 100 volte inferiori e avere una stima quantitativa. La tecnica viene anche utilizzata per quantificare la variazione dell'espressione genica e rivelare mutazioni. E' possibile monitorare l'andamento della reazione in

tempo reale. I dati che si ottengono a fine ciclo si possono utilizzare per effettuare una quantificazione relativa del frammento amplificato. Questo è possibile tramite l'impiego di fluorofori il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR. Tutte le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da PC.

La real-time PCR si può realizzare mediante l'impiego di coloranti intercalanti che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA doppia elica, oppure con sonde che si legano in modo specifico al gene di interesse, marcate con molecole fluorescenti.² Una delle sonde più diffuse è la TaqMan, un oligonucleotide disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del gene da amplificare, che presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher". In una configurazione di questo tipo la molecola "Quencher" impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del "Reporter".

Nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento si ha il distacco del "Reporter" che non subisce più l'inibizione del "Quencher" portando all'emissione della fluorescenza. Questa tecnica è stata utilizzata per differenziare i ceppi aggressivi da quelli blandi sia con tre diverse sonde TaqMan specifiche per gli isolati tipo VT e T3, T36 e T36NS (Saponari *et al.*, 2008; Yokomi *et al.*, 2010), sia con SYBRGreen (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007). La real-time è stata utilizzata per il rilevamento di virus in diversi insetti vettori (Boonham *et al.*, 2002; Olmos *et al.*, 2005).

Una tecnica recente per la classificazione dei ceppi di CTV, nota col nome di **Multiple Molecular Markers**, permette di attribuire un "profilo genotipico" a isolati non caratterizzati basandosi sull'amplificazione di sequenze specifiche mediante l'utilizzo di set di primer progettati su tre diverse regioni non-conservate degli isolati di riferimento VT, T3, T30 e T36 (Hilf e Garnsey, 2000; Hilf *et al.*, 2005).

4.6 Microarray

Una tecnica utilizzata per studiare l'espressione genica è il DNA microarray che permette l'analisi d'espressione anche di migliaia di geni in maniera simultanea. I microarrays, o matrici ad alta densità, sono la più recente di una serie di tecniche che sfruttano le caratteristiche peculiari della doppia

² Esistono varie tipologie di sonde che sfruttano chimiche diverse (SYBRGreen, TaqMan, Scorpion, Molecular Beacons, Amplifluor; Locked Nucleic Acid (LNA) Probes, Sigma Prologo; Cycling Probe Technology (CPT), Takara; Light Upon eXtension (Lux) Fluorogenic Primers, Invitrogen Corporation; Plexor Technology, Promega), attualmente esistono una ventina di prodotti chimici differenti (Lukhtanov *et al.*, 2007).

elica del DNA, ovvero la natura complementare delle due catene e la specificità dell'accoppiamento delle basi. Infatti, da circa 25 anni, le tecniche standard di laboratorio per il rilevamento di specifiche sequenze nucleotidiche utilizzano una sonda di DNA, costituita da un piccolo frammento di acido nucleico marcato con un isotopo radioattivo o una sostanza fluorescente. La sonda, rappresentante la sequenza complementare a quella del gene da individuare, viene posta in contatto con un supporto solido (ad esempio, un gel od un filtro poroso) sulla cui superficie sono ancorati acidi nucleici provenienti da un dato genoma. Grazie alla peculiarità degli acidi nucleici di riconoscere le sequenze ad essi complementari, la sonda può legarsi in maniera selettiva al frammento ancorato ad essa complementare così che, semplicemente misurando la presenza e la quantità di marcatore legato al supporto solido, è possibile quantificare se e quanto è stato espresso un determinato gene (Southern *et al*, 1975).

Questa tecnica, ha aperto di fatto la strada alla possibilità di analizzare i profili di espressione genica di un intero organismo. Tuttavia, l'applicazione su larga scala di questa metodologia si è avuta solo di recente grazie all'utilizzo di supporti solidi non porosi, come il vetro, e alla messa a punto di tecniche fotolitografiche per la sintesi di frammenti oligonucleotidici ad alta densità spaziale. In particolare, i protocolli sviluppati dal gruppo di Pat Brown a Stanford, hanno permesso di ancorare automaticamente migliaia di catene di cDNA su vetrini da microscopio e, grazie alla loro ibridazione con campioni di mRNA marcati selettivamente con molecole fluorescenti, di studiare il profilo di espressione di colture cellulari in stati fisiologici diversi (Brown e Botstein, 1999).

Esistono di fatto due tecnologie per la produzione di microarrays: la prima denominata a spotting e la seconda detta *in situ*, in cui le sonde vengono ancorate su un supporto solido e sviluppata da Affimetrix, è frutto dell'interazione di due tecnologie particolari, la fotolitografia e la sintesi diretta in fase solida di oligonucleotidi.

I targets, ovvero gli acidi nucleici da ibridizzare alle catene di cDNA ancorate al supporto solido, sono normalmente ottenuti dalla marcatura dell'mRNA proveniente da un dato organismo con molecole fluorescenti. Probes e targets vengono poi messi a contatto per fare avvenire la reazione di ibridazione e dopo alcuni lavaggi per rimuovere i prodotti aspecifici, l'array viene passato attraverso uno scanner per la misura dei segnali fluorescenti. Di fatto, livelli diversi di fluorescenza indicano livelli diversi di ibridazione e quindi di espressione genica. Il segnale rilevato dallo scanner viene poi sottoposto ad algoritmi di filtrazione e di pulizia del segnale e convertito in valori numerici.

In generale, quindi, un esperimento di analisi dei profili di espressione fornisce come risultato

una matrice di dati, in cui le righe rappresentano i geni monitorati e le colonne corrispondono alle diverse condizioni sperimentali. Ogni elemento della matrice rappresenta quindi il livello di espressione di un particolare gene in uno specifico stato fisiologico. È necessario avere a disposizione tutta una serie di tecniche computazionali capaci di gestire ed interpretare questi enormi database nonché di interfacciarsi con gli strumenti bioinformatici per l'analisi funzionale.

La tecnica è stata utilizzata per differenziare i ceppi di tristeza T30 e T36 (Franke-Whittle *et al.*, 2005) e per analizzare le modificazioni dell'espressione genica in semenzali di lima messicana inoculate con due ceppi di CTV (Gandia *et al.*, 2007).

Altre tecniche utilizzate per studiare le variazioni della sequenza del genoma di CTV sono il polimorfismo dei frammenti di restrizione (**RFLP**) (Gillings *et al.*, 1993), l'ibridazione con sonde ceppo-specifici (**SSP**) (Cevik, 1995) e il test di mobilità della doppia elica (**HMA**) che valuta la variazione genotipica dei virus (Cai *et al.*, 1991; Delwart *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Berry e C., 2001). Questo metodo è stato applicato per individuare i genotipi sconosciuti in miscele di isolati CTV (Biswas *et al.*, 2004).

5. Scopo del lavoro

Da decenni la ricerca mira alla messa a punto di sistemi diagnostici (sierologici e molecolari) in grado di differenziare i ceppi virulenti dai ceppi blandi, senza dover ricorrere al saggio biologico. I sistemi più efficaci e più utilizzati per la caratterizzazione sono:

- Test sierologico con anticorpo monoclonale MCA13 (Permar *et al.*, 1990) che rimane ancora uno dei primi approcci per identificare la presenza/assenza di ceppi severi. Tuttavia reazioni ceppo-aspecifiche sono state riportate in Paesi al di fuori della Florida, ove l'anticorpo era stato prodotto;
- Amplificazione genica mediante RT-PCR seguita da: (i) analisi RFLP (Gillings *et al.*, 1993); (ii) ibridazione molecolare con oligonucleotidi marcati, specifici per gruppi di isolati con attività biologica differente (Cevik *et al.*, 1995); (iii) analisi SSCP (Rubio *et al.*, 1996; Davino *et al.*, 2005); (iv) analisi con marker molecolari multipli (Hilf *et al.*, 2005).

Con quest'ultimo metodo i ceppi vengono classificati in T30-like (ceppi blandi); VT e T3-like (ceppi responsabili di stem-pitting e seedling yellows); T36-like (ceppi che causano deperimento).

Sieburth *et al.* (2005) hanno valutato la collezione internazionale di CTV dell'USDA di Beltsville (MD, USA). Evidenziando che: (i) nessun sistema è in grado, applicato singolarmente, di definire univocamente la potenziale virulenza del ceppo, ma occorrono più sistemi; (ii) in alcuni casi il risultato molecolare non corrisponde al comportamento biologico del ceppo, probabilmente a causa della copresenza di più ceppi dalla cui interazione può risultare un quadro sintomatologico diverso (es. "mascheramento" dei ceppi severi); (iii) il saggio biologico resta fondamentale nella determinazione della virulenza del ceppo; (iv) è auspicabile disporre di un singolo marker associato alla virulenza dei ceppi.

Un risultato interessante è riportato da Saponari e Yokomi (2010), con la messa a punto di un protocollo di real-time RT-PCR basato sull'utilizzo di una sonda TaqMan in grado di reagire solamente con i ceppi virulenti che causano stem-pitting e seedling yellows.

Negli ultimi anni le ricerche si sono moltiplicate e sono stati effettuati alcuni studi per caratterizzare i diversi ceppi di CTV esistenti in Italia e nel bacino del Mediterraneo.

particolare Fra queste sono le recenti analisi di Ferretti *et al.*, (2010) hanno evidenziato la presenza in Calabria di isolati di CTV recettivi all'anticorpo MCA13 poi associati, mediante analisi molecolari MMM, ai genotipi VT-T3.

I dati suggeriscono che la popolazione CTV per il genotipo T36 ha subito una pressione selettiva differente comparabile con quella delle popolazioni del genotipo T30 e del genotipo VT. Il metodo

adottato risulta tuttavia molto laborioso e costoso, oltre ad essere limitato dal fatto che alla base è l'uso di anticorpi monoclonali ottenuti per i ceppi del virus presenti in Florida e non è certo che essi rispondano anche alla popolazione di isolati presenti nel nostro Paese o nel Mediterraneo.

Da quanto sopra scaturisce la conferma dell'esigenza di disporre di un metodo di caratterizzazione semplice, rapido, riproducibile e affidabile che consenta di distinguere e catalogare in modo univoco i diversi isolati di CTV che, sulla base dei dati sparsi non sempre confrontabili, affliggono la nostra agrumicoltura. Sarebbe così possibile anche affrontare uno studio epidemiologico serio, ormai indifferibile.

6. Materiali e metodi

6.1 Isolati di CTV

I test iniziali sono stati condotti con 4 isolati di CTV, tre da piante infette ritrovate in Sicilia, nella provincia di Catania, e un isolato esotico proveniente dalla Cina. L'isolato SG29 è stato ritrovato in un arancio dolce "Sanguinello" (*C.sinensis* Osbeck), innestato su arancio amaro vecchio di 25 anni. L'albero infetto, di struttura robusta ma in fase di deperimento avanzato da alcuni anni mostrava sintomi di alveolatura inversa (inverse pitting) sull'arancio amaro, in prossimità della linea d'innesto. Gli isolati Tapi e TDV sono stati ritrovati su piante di arancio dolce "Tarocco" innestate su citrange Troyer, in due lotti adiacenti. a distanza di 5 metri

Dall'analisi BLAST effettuata per il gene P23, l'isolato SG29 possiede una omologia di sequenza del 99% con i ceppi seedling yellow del Sud America like Barao B, Val-CB e C271-2, Tapi (EU487602) e TDV (EU487603) un omologia del 99% con il ceppo T385 (Catara *et al.*, 2007).

Un quarto isolato (RPC3) proviene da un altro Paese ed è stato isolato da una pianta asintomatica di arancio dolce innestata su *Poncirus trifoliata*.

Altri 54 campioni provenienti da diverse parti della Sicilia, dalla parte meridionale della penisola italiana e 22 provenienti da altri paesi del Mediterraneo, sono stati utilizzati per validare la affidabilità del metodo diagnostico.

Come controlli sono state utilizzate piante di arancio dolce innestate su arancio amaro esenti da CTV e anche piante infette da virus (*Citrus psorosis virus*, *Citrus variegation virus*), yellow vein e viroidi (*Citrus exocortis viroid-CEVd*, *Citrus dwarfing viroid-CDVd*).

Le piante utilizzate per la sperimentazione dell'analisi sequenziale ELISA/CE-SSCP sono rappresentate da piante naturalmente e artificialmente infette sono illustrate in Tabella 9. Altre piante sono state utilizzate come controlli negativi: arancio amaro AA 488, AA 26/2008, AA 58/2008, AA 64/2008, AA 59/2008, AA 66/2008, AA 26/2008 e citrange Troyer 16/2008.

6.2 Indexing biologico

I quattro isolati di CTV sono stati testati utilizzando un panel standard di piante indicatrici e precisamente:

- semenzali di limetta messicana, arancio amaro, arancio dolce Hamlin e pompelmo Duncan;
- giovani piantine di cedro Etrog e di arancio dolce Hamlin innestate su arancio amaro.

L'allevamento delle piante è stato fatto in serra con temperatura controllata (14-16°C / 22-30°C) o in camera di crescita (26°C, 16 h giorno / 22°C, 8 h notte). Le piante indicatrici sono state infettate con tasselli di corteccia provenienti dalle piante madri.

6.3 DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA)

Per l'esecuzione del saggio ELISA è stato utilizzato un Kit commerciale, indicato nel protocollo diagnostico EPPO, che utilizza una miscela di anticorpi monoclonali 3DF1 + 3CA5 INGENASA Hermanos García Noblejas 41, 2a planta, Madrid (ES), <http://www.ingenasa.es>. Il protocollo seguito è quello suggerito dalla ditta produttrice.

Un grammo di foglie espanse appartenenti a rametti dell'ultimo stacco fogliare o vegetativo è stato posto in sacchetti di estrazione con 10 volumi di Extration buffer e omogeneizzato in busta. L'anticorpo primario (IgG monoclonal) è stato diluito in Coating buffer (Carbonate buffer) con un rapporto 1:1000 (v/v) e aliquote di 200 µl sono stati posti in ogni pozzetto della micro piastra e incubati a 37° C per 4 h. Trascorso questo tempo la piastra è stata lavata 4 volte per 3min con Washing buffer

Aliquote (200 µl) del campione omogeneizzato sono stati dispensati in due pozzetti e incubati per 16 h a 4° C. I campioni di riferimento erano costituiti da volumi uguali di controllo positivo, del campione negativo e del solo tampone di estrazione. Trascorso questo tempo la piastra è stata lavata 4 volte per 3 min con Washing buffer.

Il coniugato primario è stato diluito con extraction buffer nel rapporto di 1:1000, 200 µl sono stati aliquotati in ogni pozzetto della micropiastra e incubati per 2,5 h a 37° C. La piastra è stata quindi lavata 4 volte per 3 min con Washing buffer.

Il coniugato secondario è stato diluito con extraction buffer nel rapporto di 1:1000, 200 µl sono stati aliquotati in ogni pozzetto della micropiastra e incubati per 30' a temperatura ambiente. Dopodichè la piastra è stata lavata 4 volte per 3 min con Washing buffer.

Una compressa di p-nitrophenyl phosphate è stata sciolta in 5 ml di substrate buffer, 200 µl di questa soluzione sono stati posti in ogni pozzetto e incubati a temperatura ambiente per 30-60 min.

I risultati sono stati letti utilizzando un fotometro per micropiastre alla lunghezza d'onda di 405 nm. Sono state ritenute positive le reazioni con valori di assorbanza 2 volte superiori a quelle del controllo positivo.

6.4 DTBIA (*Direct tissue blot immunoassay*)

Per l'esecuzione dell'immunoimpronta è stato utilizzato il protocollo fornito, insieme al kit (Plant print), dalla ditta spagnola Plant-Print Diagnostics S.L. Dopo aver eseguito delle sezioni trasversali su giovani rametti o piccioli fogliari, è stata effettuata una leggera pressione su una membrana di nitrocellulosa che successivamente è stata riposta all'interno di un apposito contenitore e ricoperta con una soluzione acquosa all'1% di BSA e incubata in agitazione per 1h. Successivamente dopo aver eliminato la soluzione di BSA è stata immersa la membrana in una soluzione contenente l'anticorpo monoclonale specifico di CTV coniugato con fosfatasi alcalina diluito in 100 ml di PBS e incubata per 3 h a temperatura ambiente. Al termine delle 3 h è stato eliminato l'anticorpo ed è stata lavata la membrana con washing buffer per 5 min. Trascorso il tempo di incubazione la membrana è stata immersa in una soluzione tampone ottenuta sciogliendo una pasticca (BCIP-NBT, Sigma Fast) in 10 ml di acqua distillata, incubata a temperatura ambiente fino alla visualizzazione di un precipitato viola-porpora nel controllo positivo (da 3 a 7 min), che indica il momento in cui deve essere bloccata la reazione, tramite lavaggio della membrana in acqua corrente. Dopo aver riposto la membrana ad asciugare su carta assorbente è stato possibile vedere le impronte con l'ausilio di un binoculare (X10-X20).

6.5 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto da 100 mg di tessuto vegetale fresco, preventivamente polverizzato mediante azoto liquido, utilizzando il Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) secondo il seguente protocollo. Aggiungere a 0,1g di tessuto vegetale 1ml di Trizol, agitare vorticosamente e lasciare riposare per 5 min a temperatura ambiente. Successivamente aggiungere 200 µl di cloroformio e invertire i tubi di reazione per 15sec, lasciare riposare a temperatura ambiente per 3min e poi centrifugare a 12000 rcf per 15sec a 4°C, recuperare il surnatante senza disturbare l'interfase e aggiungere 500 µl di alcol isopropilico, lasciare 10min a temperatura ambiente e centrifugare a 12000 rcf per 10min a 4 °C. Scartare il surnatante e lavare il pellet con 1 ml di etanolo al 75%, centrifugare a 7500 rcf a 4 °C

per 5min ed eliminare totalmente tutti i residui di etanolo. Reidratare il pellet con 50 µl di acqua bidistillata.

6.6 Retrotrascrizione

In 13 µl di reazione all'interno di un tubo da micro centrifuga sono stati aggiunti 0,4 mM dNTPs, 0,4 µM di primers reverse (Tab.1), 200 ng di RNA totale e acqua bidistillata fino al raggiungimento del volume di 13 µl. La mix è stata riscaldata a 65 °C per 5min e incubata in ghiaccio per 1min. Successivamente sono stati aggiunti First-Strand-Buffer 1X (Invitrogene), DTT 5 mM, 1 U di SuperScript III RT™ (Invitrogene) e 1 U di RNaseOUT™ (Invitrogene). La reazione di retrotrascrizione è stata ottimizzata a 55°C per 60min e inattivata a 70°C per 15min.

6.7 Reazione di amplificazione PCR

Un'aliquota di cDNA precedentemente prodotta è stata amplificata, mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), in 25 µl di reazione contenente 1X Nova Hot Start Taq Buffer (Novagen®), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,4 µM di primer forward, 0,4 µM of primer reverse, primers specifici per i geni di interesse da amplificare (Tab. 2.) e 1,25 U di Nova Hot Start Taq DNA Polymerase (Novagen®). Le condizioni di amplificazione sono 95°C per 7min, 35 cicli di 94°C per 20sec, (56°C per P18; 57°C per P20; 58°C per P23; 57 °C per P25) per 30sec, 72°C per 40sec, e una estensione finale a 72°C per 4min (Eppendorf, Mastercycler egradient Thermocycler, UK). I primers presentano legati alle estremità dei fluorofori che serviranno per l'individuazione dei filamenti nell'analisi CE-SSCP. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1%.

Tab. 1. Sequenze dei primers utilizzati per le amplificazioni.

Geni	Sequenza primers	Fluorofori	Frammento amplificato
P18 FW	TTCTATCGGGATGGTGGAGT	6-FAM	425bp
P18 RV	GACGAGATTATTACAACGG	NED	(Pappu <i>et al.</i> 1994)
P20 FW	ACAATATGCGAGCTTACTTTA	6-FAM	540bp
P20 RV	AACCTACACGCAAGATGGA	NED	(questo lavoro)
P23 FW	CTGTGAACCTTTCTGACGAAAG	6-FAM	594bp
P23 RV	TCTCGTCTTCTCCCTTTCAGC	VIC	(questo lavoro)
P25 FW	CTCAAATTGCGRTTCTGTCT	NED	415bp
P25 RV	ATGTTGTTGCNGCNGAGTC	VIC	(questo lavoro)

6.8 Analisi SSCP

Dopo l'amplificazione, 1 µl di RT-PCR è stato miscelato con 9 µl di loading solution (0,05% blu di bromo fenolo, 0,05% xilene-cianolo, 20mM EDTA), riscaldato per 10 min a 95°C per effettuare la separazione delle 2 eliche rapidamente raffreddato in ghiaccio evitare la rinaturazione delle due eliche. La definitiva separazione dei filamenti e la loro visualizzazione è stata effettuata mediante corsa elettroforetica in gel non denaturante di poliacrilamide all'8%. Il gel ha corso in buffer TBE 1X (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA pH 8.0) per 3h a 200 V a 4°C (Rubio *et al.*, 1996), utilizzando l'apparato elettroforetico mini protean 3 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Il gel è stato colorato utilizzando il nitrato d'argento, utilizzando il seguente protocollo:

Il gel è stato fissato immergendolo in una soluzione al 10% di etanolo per 10 min, sensibilizzato mediante immersione in acido nitrico all'1% per 3min e successivamente sciacquato bene con acqua bi-distillata, posto in nitrato d'argento 1% per 20 min e successivamente sciacquato bene con acqua bi-distillata. Lo sviluppo per immersione in una soluzione di 100 ml di carbonato di sodio al 3% e 0,54% di formaldeide.

La reazione è stata bloccata quando le bande sono risultate ben visibili, con un lavaggio del gel in acido acetico al 5% per 10 min e successivo lavaggio con acqua bi-distillata.

6.9 Analisi CE-SSCP

La sperimentazione è stata performata all'interno dell'analizzatore genetico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), equipaggiato con un capillare di 36 cm di lunghezza, una finestra di detection per emissione di fluorescenza con uno spettro a 480 nanometri e un software per il controllo delle temperature, il volume e il tempo di iniezione del campione.

Un microlitro del prodotto PCR diluito 128 volte è stato miscelato con 0,25 µl di GeneScan-500 ROX Size Standard e 10 µl di formamide Hi-Di (Applied Biosystems). La mix di reazione è stata denaturata a 95°C per 10 min e immediatamente raffreddata in ghiaccio prima di essere caricata nello strumento. Il tempo di iniezione del campione e il voltaggio sono stati settati a 12s e 3.5 kV, il tempo di migrazione per 1450s a 24°C. Il polimero utilizzato è il CAP (POP polymer Conformational Analysis, Applied Biosystems).

I profili CE-SSCP sono stati analizzati utilizzando il software GeneMapper™ Software Version 4.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) e utilizzando come size standard per l'allineamento del pattern dei picchi il Genescan 500 ROX.

6.10 Clonaggio e sequenziamento

Le varianti di sequenza per il gene P18, utilizzate per l'analisi CE-SSCP, sono stati clonati utilizzando il Kit istaclone PCR cloning kit (Fermentas™).

I prodotti amplificati sono stati inseriti nel plasmide linearizzato e timidilato PTZ57R/T di 2886 pb (Fermentas) (Fig. 8) e trasferiti in cellule di *E. coli* TOP10, rese chimicamente competenti.

La ligazione è stata eseguita aggiungendo a 3 µl di vettore pTZ57R/T (0,165 µg, 0,18 pmol finale), 4 µl di frammento PCR purificato (circa 0,54 pmol finale), 6 µl di buffer di ligazione 5x, 1 µl T4 DNA Ligase (5U) e 16 µl di H₂O "nuclease-free", per un volume finale di 30 µl. La miscela di ligazione è stata incubata *overnight* a 22° C. Come controllo dell'efficienza di ligazione sono stati utilizzati 4 µl (168 ng, 54 pmol finale) di un frammento di PCR (953 pb) fornito con il kit.

La coltura batterica è stata allestita utilizzando 50 µl di cellule di *E. coli* (ceppo TOP10) che sono stati inoculati in 2 ml di TrasformAid C-Medium e posti ad incubare *overnight* a 37° C in agitazione a 220 rpm. Successivamente 0,15 ml di questa coltura sono stati posti in tubi da microcentrifuga

pre-riscaldati, contenenti 1,5 ml di C-Medium, e lasciati ad incubare per 20' in agitazione (220 rpm) a 37° C.

Le colture fresche, quindi, sono state centrifugate a 13000 rpm per 1' a temperatura ambiente (RT). I *pellet* ottenuti sono stati risospesi in 300 µl di TrasformAid T-Solution e posti in ghiaccio per 5'. La sospensione è stata centrifugata (13000 rpm per 1' RT), risospesa in 120 µl di TrasformAid T-Solution e incubata in ghiaccio per 5'. A 50 µl di cellule risospese sono stati aggiunti 2,5 µl di miscele di ligazione e 1 µl di plasmide con e senza inserto (forniti con il kit) come controlli. Dopo 5' di incubazione in ghiaccio le cellule sono state piastrate in terreno LB (agar contenente 100 µg/ml di ampicillina e 70 µg/ml di X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galattoside)). Le piastre sono state poste ad incubare *overnight* a 37° C. Sono state, quindi, prelevate le colonie bianche, usando delle anse sterili, strisciate in piastre numerate, e incubate a 37° C a 220 rpm *overnight*.

Le colonie sono state sospese in tubi da microcentrifuga contenenti 100 µl di TRIS 50 mM a pH 12,6 e 3% di SDS (sodio dodecil solfato) e incubate a 55° C per 30'.

Successivamente, dopo l'aggiunta di 100 µl di fenolo-cloroformio (1:1), i tubi sono stati vortexati brevemente e centrifugati a 13000 rpm per 5'. I plasmidi estratti sono stati osservati tramite elettroforesi su gel d'agarosio all'1% in TAE buffer 1X, contenente bromuro d'etidio, usando come controlli i plasmidi, con e senza inserto. I plasmidi, di dimensioni coerenti con l'avvenuto clonaggio dei geni di CTV, sono stati estratti utilizzando il PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen®) secondo il protocollo della casa produttrice.

Le sequenze dei geni codificanti la P18 dei campioni denominati SG29, Tapi, TDV e RPC3-A e RPC3-B sono stati ottenuti inviandoli all'MWG sequencing service. I geni clonati sono stati sequenziati in forward e reverse utilizzando i primer universali M13.

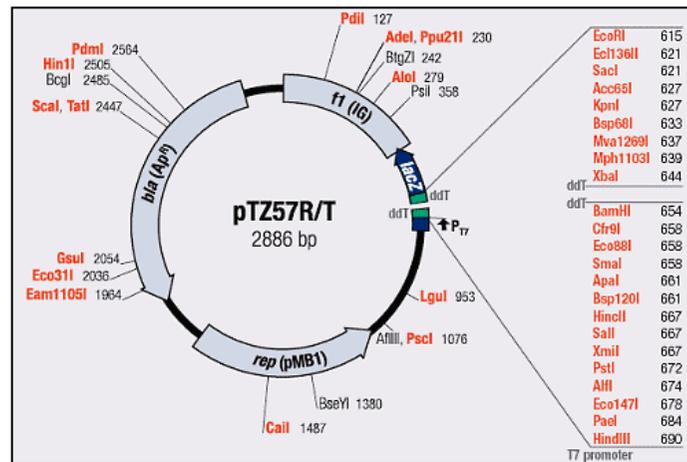


Fig.8. Mappa dei siti di restrizione del plasmide pTZ57R/T

6.11 Analisi sequenziale ELISA/CE-SSCP

Utilizzando il protocollo descritto da Harju *et al.* (2005) è stata effettuata l'estrazione di RNA direttamente dalla piastra utilizzata per l'analisi ELISA e i campioni utilizzati per l'analisi CE-SSCP.

Al termine dell'analisi ELISA le pozzette delle piastre positive, sono stati lavati con una soluzione salina di tampone fosfato (PBS), contenente 0,05% (v/v) di Tween 20 e dopo essersi completamente asciugati, sono stati riempiti con 50 µl di tampone di rilascio per il virus (VRB), contenente 10mMTris-HCl, pH 8.0 con 1.0% (v/v) Triton X-100, e coperti con un film in nylon per evitare l'evaporazione. Dopo riscaldamento a 65°C a 200 rpm per 5 min. i campioni sono stati lasciati decantare a 4°C per 1 h prima dell'analisi o conservati a 80 °C per analisi successive (Harju *et al.* 2005).

Aliquote di 5 µl sono state retrotrascritte, amplificate e utilizzate per l'analisi CE-SSCP.

6.12 Saggio Real-Time RT-PCR mediante sonde TaqMan

Sono state utilizzate una coppia di primer [(P27F (TACGYGATTTGGGWAAGTAYTTDTA) e P27R (GACCCCTTAAAGCAGTGCTCA)] e 3 sonde oligonucleotidiche disegnate nella zona intergenica tra p25(CP) e p27(CPm) (Yokomi *et al.*, 2010) selettivi per il rilevamento di 3 tipologie di isolati severi positivi all'anticorpo MCA-13. La sonda TaqMan CPi-VT3([MGB]-ACGGKGRATTRCGC) è selettiva per l'identificazione degli isolati con genotipo VT e T3 (Yokomi *et al.*, 2010), la CPi-T36 ([MGB]-ACGGTAACATTATACTATCCC) per gli isolati con genotipo T36

e la CPi-T36NS ([MGB]-ACGGTARTATYATRCCATCCT) per gli isolati atipici che reagiscono in maniera lieve all'anticorpo MCA-13 ma che manifestano sintomatologia blanda in pianta .

Le sonde CPi-VT3 e CPi-T36 sono marcate rispettivamente con NED (Applied Biosystem) e VIC (Applied Biosystems), mentre la sonda CPi-T36NS con TET (Applied Biosystem).

Le reazioni sono state eseguite sull'amplificatore LightCyclerTM 480 (Roche) in 20 µl contenenti FastStart DNA Master^{plus} mix HybProbe (Roche) 1X, 160 nM di ciascuna sonda CPi, 320 nM dei primer P27F/R, 0.5 U Multiscribe Reverse transcriptase (Applied Biosystem), 0.5 U Rnase Inhibitor (Applied Biosystem) e 5 µl di RNA. Il profilo di amplificazione è stato di un ciclo a 55°C per 30 min e 5 min a 95°C, seguito da 40 cicli a 95°C per 15 sec e 56°C per 40 sec (one step qPCR). Il rilevamento di ogni campione è stato eseguito mediante monitoraggio in tempo reale e elaborazione dei dati della fluorescenza (in fase di appaiamento) con il software LightcyclerTM 480 Instrument v. 1.2. Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

6.13 Analisi filogenetiche

Le sequenze nucleotidiche sono state analizzate per omologia nel database GenBank utilizzando il software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Le sequenze dei citati frammenti degli isolati utilizzati in questo lavoro sono state allineate con i genomi completi dei ceppi di CTV presenti in GeneBank mediante il software ClustalW[®] e la costituzione degli alberi filogenetici è stata realizzata mediante l'utilizzo del software TreeView[®].

7. Risultati

7.1 Analisi SSCP

L'analisi SSCP è stata eseguita sui quattro isolati di CTV selezionati come standard di riferimento per la ricerca, amplificando frammenti del gene P18 di 425 paia di basi, del gene p23(594 bp), del gene p25(425bp). Come si evince dalla Fig. 9 nell'analisi di p18 gli isolati Tapi e TDV presentano due bande, con migrazione molto simile, anche se la distanza fra le due bande lascia desumere leggere differenze mentre l'isolato SG29 presenta più bande, 2 chiaramente leggibili e altre 6 più flebili, e una migrazione più lenta rispetto agli altri due. Sulla base di tali risultati si ritiene che gli isolati Tapi e TDV siano uguali, mentre differiscono da SG29 in considerazione del numero di bande e della migrazione. Differente dagli altri tre è il profilo dell'isolato RPC3 che presenta più bande elettroforetiche, la cui migrazione è simile a Tapi e TDV per le due bande più veloci e a SG29 per le altre due, lasciando presumere la concomitante presenza di più isolati nello stesso campione.

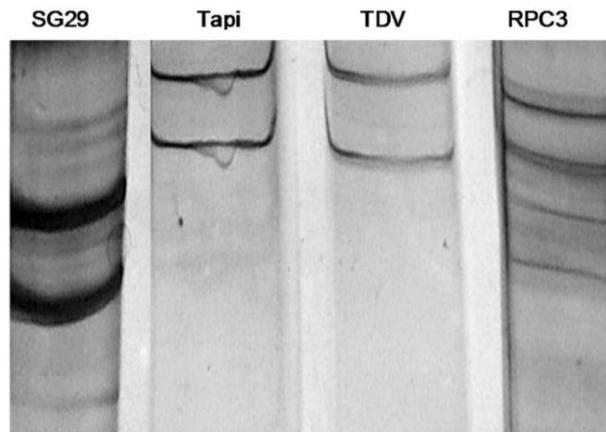


Fig. 9. Profili del gene p18 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi convenzionale SSCP in gel di poliacrilamide.

Nella corsa elettroforetica del frammento di 594bp del gene p23 (Fig. 10) complessivamente i profili degli isolati differiscono poco fra loro. Tapi e TDV hanno uguale mobilità elettroforetica, leggermente differente da quella del campione SG29. Il campione RPC3 non si presenta con molte bande elettroforetiche come dall'analisi della p18, probabilmente perché la concentrazione degli altri isolati presenti nel campione risulta bassa.

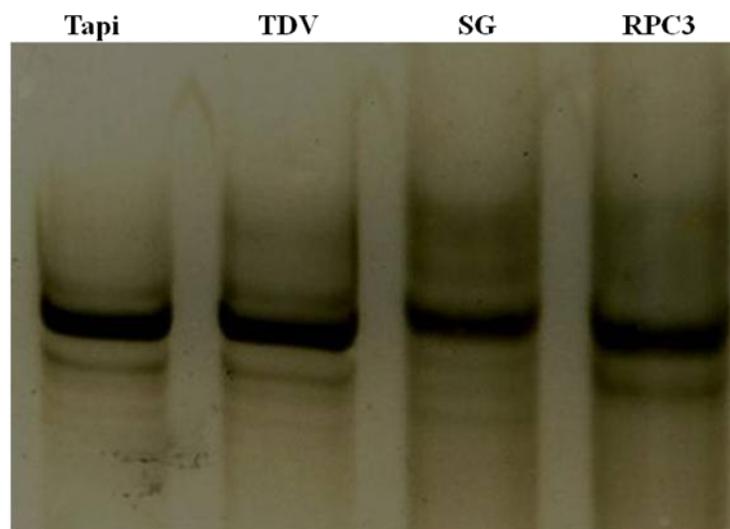


Fig. 10. Profili del gene p23 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi convenzionale SSCP in gel di poliacrilamide.

L'analisi SSCP in gel di poliacrilamide del frammento di 415bp per il gene p25 (Fig. 10), mostra chiaramente la netta differenza di mobilità del campione SG rispetto a Tapi e TDV. Tuttavia, a differenza da quanto osservato nell'analisi della p18, le velocità di migrazione sono meno differenti fra loro.

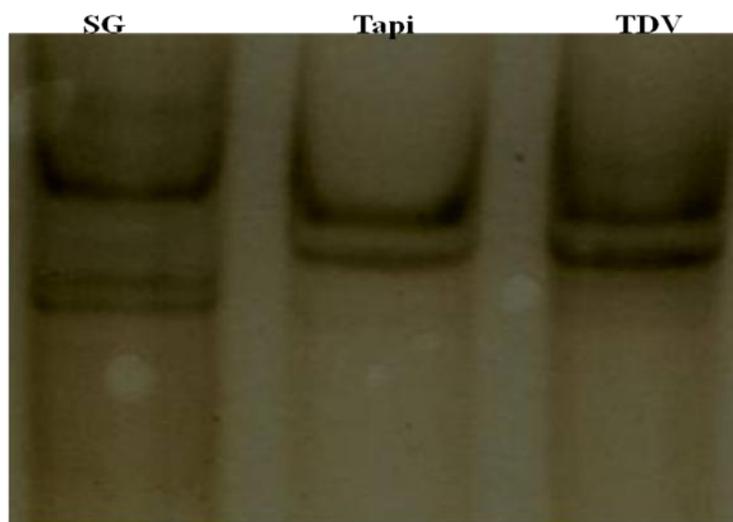


Fig. 11. Profili del gene p25 di 3 isolati di CTV ottenuti mediante analisi convenzionale SSCP in gel di poliacrilamide.

7.2 Analisi CE-SSCP

La messa a punto del metodo ha richiesto un ingente quantitativo di prove effettuate sui diversi geni caratterizzanti CTV (P18, P20, P23, P25). Il miglior risultato preliminarmente ottenuto sui 4 campioni scelti per la standardizzazione della tecnica è stato ottenuto analizzando un frammento del gene P18 di 425bp.

7.2.1 Analisi CE-SSCP del gene p18

I risultati prodotti mostrano 2 picchi elettroforetici per ognuno dei ceppi analizzati, perfettamente distinguibili grazie alla marcatura con fluorofori dei due filamenti, forward (fw) e reverse (rv), all'apprezzabile definizione della mobilità elettroforetica fra loro e rispetto allo standard di riferimento ROX 500 e ai dati desumibili grazie al software Gene Mapper.

SG29 pur presentando 2 picchi come Tapi e TDV, si distingue da questi ultimi per diversa mobilità elettroforetica, mentre Tapi e TDV risultano identici (Fig. 12). Questi dati, apprezzabili visivamente sono rafforzati dai dati numerici scaturiti dall'andamento dei picchi. SG29 possiede dati di riferimento per la mobilità elettroforetica del filamento forward di 70.05 e di 74.43 per il reverse, mentre Tapi e TDV hanno valori di fw 68.17 e rev 72.25 (Tab 2).

Discorso completamente diverso si deve fare per il campione RPC3 che possiede un profilo elettroforetico costituito da 4 picchi, 2 marcati con il fluoroforo per il fw e 2 con quello per il rev (fig. 13), rispettivamente con valori 70.86 e 72.93 per i fw e 74.2 e 76.16 per il rev.

Le prove, ripetute sei volte utilizzando sempre materiale vegetale fresco, hanno dato luogo a differenze minime rappresentate nella Tab 2.

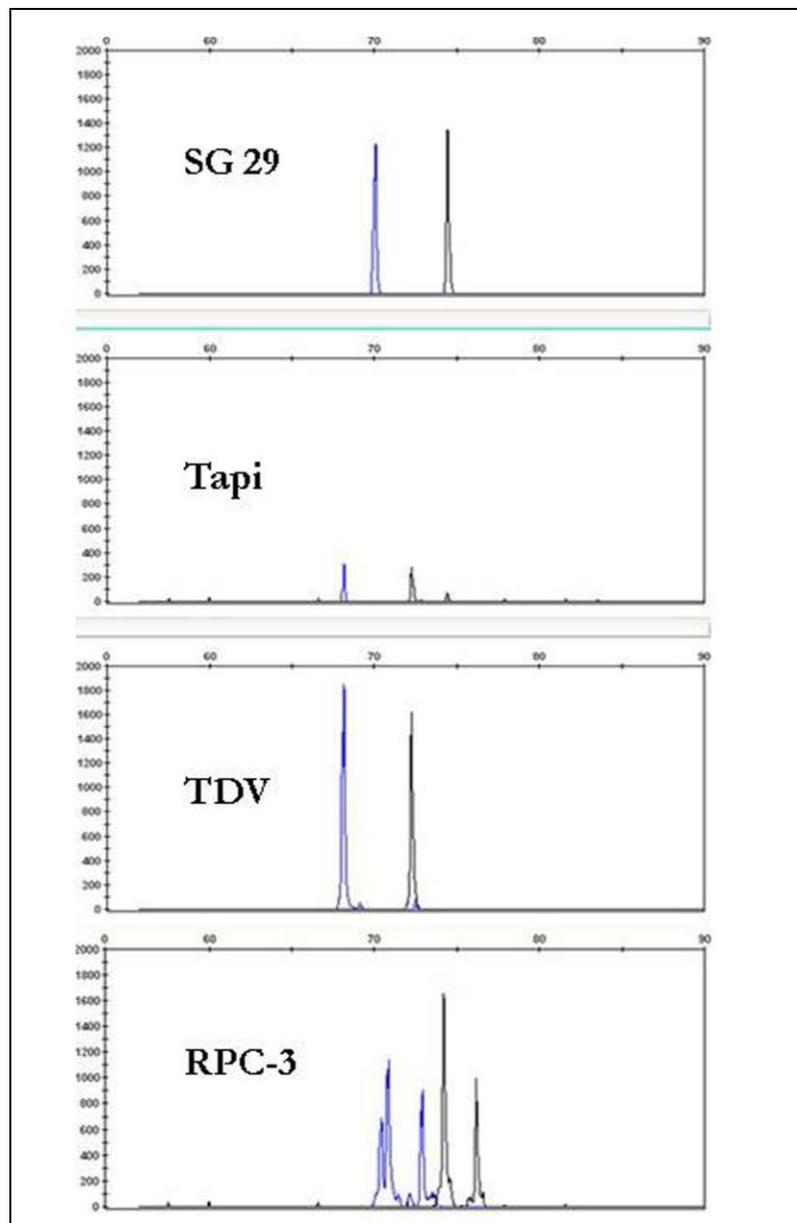


Fig. 12. Profili del gene p18 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi CE-SSCP. I picchi blu indicano i filamenti forward, marcati col fluoroforo 6-FAM, mentre quelli neri i filamenti reverse, marcati col fluoroforo NED.

Tab. 2. Migrazione elettroforetica relativa dei due filamenti forward e reverse degli isolati di CTV in studio ottenuta mediante analisi CE-SSCP di 3 campioni e 2 sub campioni dell'isolato RPC3.

Isolati	No. repeat	Migrazione relative dei filamenti	
		Forward	Reverse
SG 29	6	70.91±0,051	74,04±0.044
Tapi	6	68.76±0.032	72.85±0.057
TDV	6	68.76±0.032	72.85±0.057
RPC3B	6	70.87±0.032	74.23±0.057
RPC3A	6	72.94±0.051	76.19±0.057

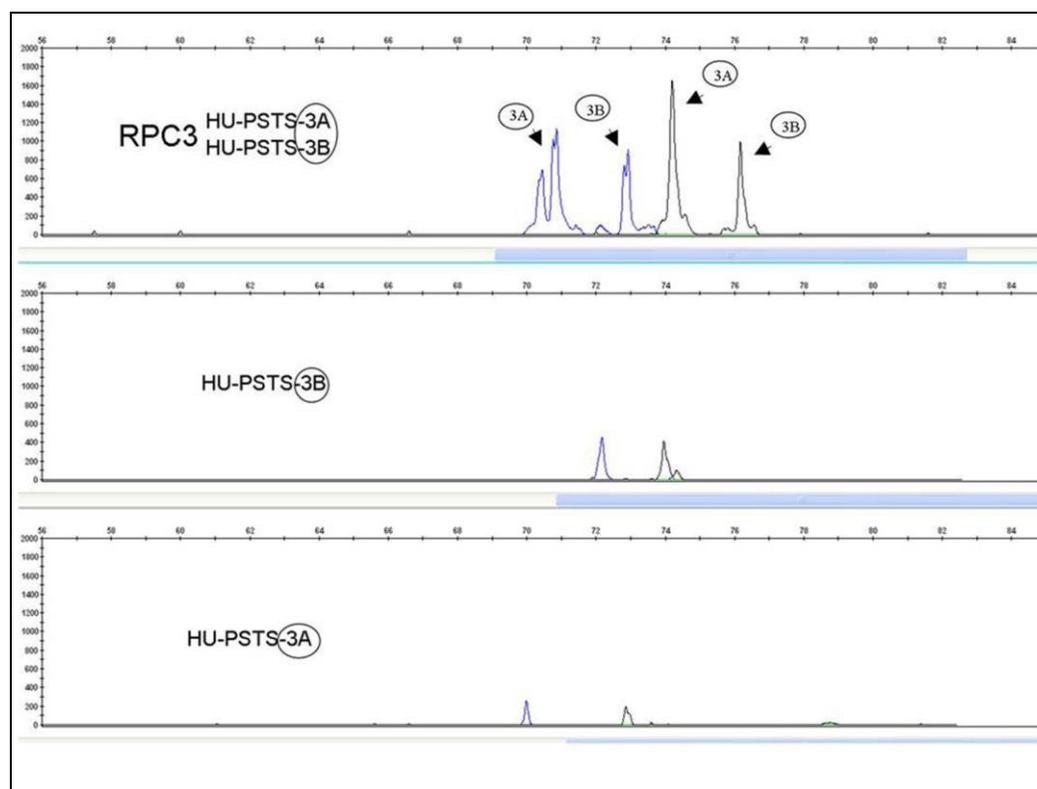


Fig. 13. L'elettroferogramma mostra la presenza di due isolati presenti nel campione RPC3, designate come HU-PSTS-3A e HU-PSTS-3B, mostrate prima e dopo la separazione.

L'analisi CE-SSCP e il pattern precedentemente ottenuto nell'analisi SSCP di quest'ultimo campione, la presenza di 2 isolati sullo stesso campione, è stata confermata grazie alla selezione ma-

nuale dei cloni e successiva differenziazione mediante CE-SSCP. Tra i cloni ottenuti 50 di essi sono stati amplificati, denaturati e caricati nell'analizzatore genetico, ottenendo due gruppi di profili diversi (Fig. 14). Anche la mobilità elettroforetica e i valori scaturiti da essa risultano paragonabili a quelli ottenuti dal campione che conteneva la miscela dei 2 isolati. Lo stesso profilo elettroforetico ottenuto con la miscela dei due isolati è stato ottenuto mettendo in un unico pozzetto i due isolati separati ed effettuando un'unica corsa elettroforetica. Le stesse analisi sono state ripetute per 3 volte utilizzando per ogni prova materiale vegetale fresco e ottenendo sempre i medesimi risultati.

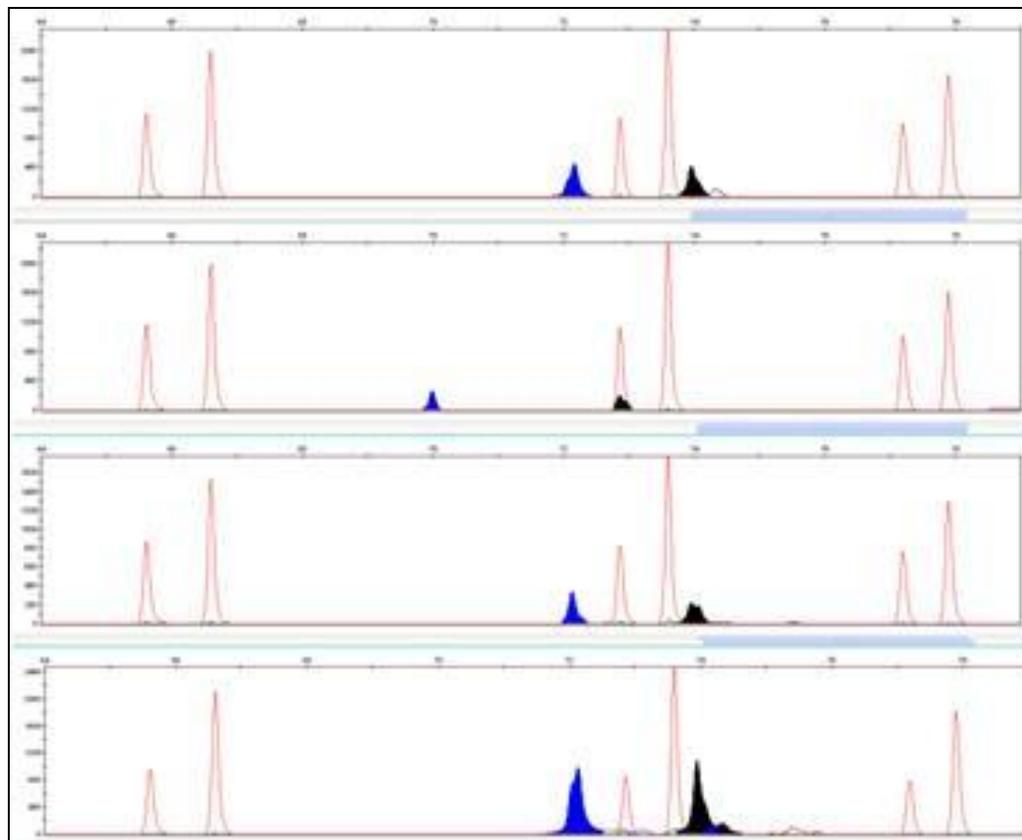


Fig. 14. Elettroferogramma esemplificativo dei profili ottenuti dai cloni generati mediante clonaggio del campione RPC3.

I cinque campioni sono stati sia inseriti tutti all'interno di un unico pozzetto e sia escludendo il ceppo RPC3, simulando una miscela di più isolati e provando a vedere se la mobilità ne risultava compromessa (Fig. 15). Gli isolati sono risultati perfettamente distinguibili, soprattutto escludendo il ceppo RPC3, e risulta interessante notare che gli isolati Tapi e TDV sono perfettamente sovrapponibili.

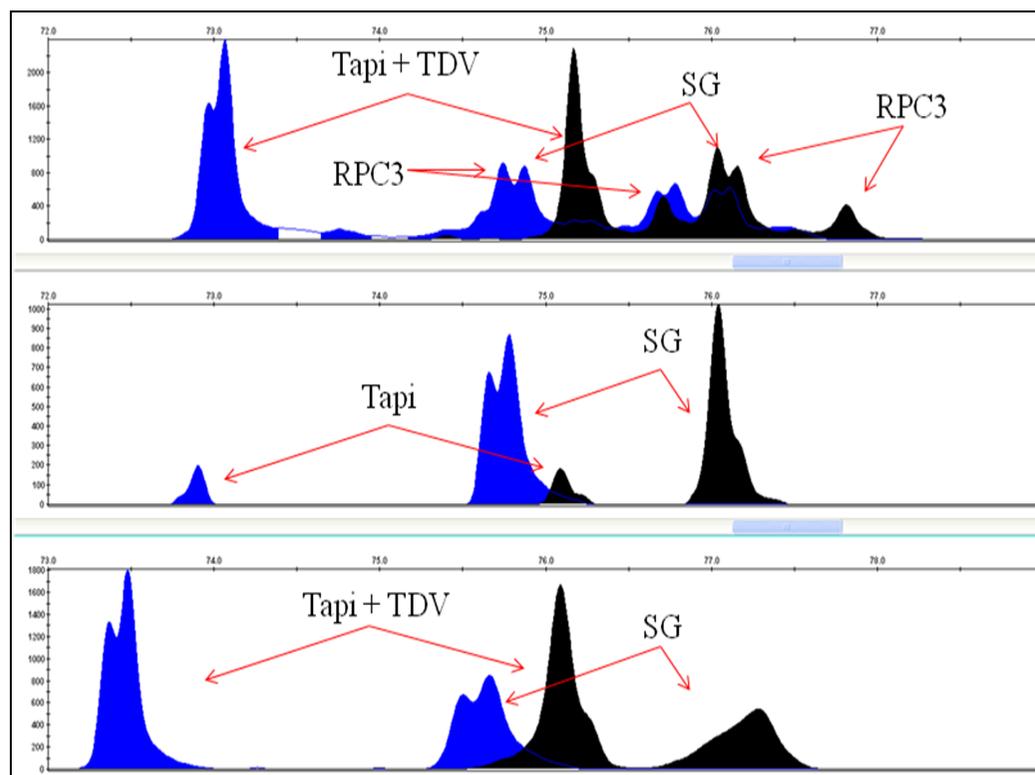


Fig. 15. Profili elettroforetici ottenuti dalla coiniezione di miscele di due o più isolati di CTV in un unico pozzetto. I profili di colore blu indicano i filamenti forward, marcati col fluoroforo 6-FAM, quelli neri i profili reverse, marcati col fluoroforo NED. La coiniezione di un mix di isolati di CTV all'interno di un unico pozzetto non influisce sulla rispettiva.

Al fine di procedere alla stesura dei protocolli d'impiego del metodo di analisi sono state effettuate diverse prove di settaggio, procedendo ad analisi ripetute dei diversi campioni alle temperature di 18°C, 24 °C e 30°C, fino a raggiungere la standardizzazione ottimale. Gli altri parametri analizzati per la stesura del protocollo di analisi sono stati: volume di polimero iniettato, voltaggio e tempo prima della corsa elettroforetica, corrente di stabilità, voltaggio e tempo per l'iniezione e per la corsa elettroforetica del campione, numero di step del voltaggio e tempo di corsa elettroforetica.

Le condizioni operative ottimali sono riportate nella Tab. 3.

Tab. 3. Protocollo di corsa ottimale per analisi CE-SSCP su CTV.

Name	Run module
Oven Temperature	24 °C
Poly Fill Vol	4840 steps
Current Stability	5.0 µAmps
Pre Run Voltage	15.0 kVolts
Pre Run Time	180 sec.
Injection Voltage	3.5 kVolts
Injection Time	12 sec.
Voltage Number of steps	10 nk
Voltage Step Interval	60 sec.
Data Delay Time	1 sec.
Run Voltage	15.0 kVolts
Run Time	1600 sec.

I protocolli di analisi settati alle 3 temperature emblematicamente illustrati nella figura (16) per il campione SG29, mostrano una migliore separazione elettroforetica dei campioni alle temperature di 18 e 24 °C, mentre a 30°C i picchi di riferimento dei due filamenti si presentano troppo compattati. I picchi dei campioni e del ladder (ROX 500) a 24 °C sono più uniformi e presentano meno increspature, indice di una corretta separazione elettroforetica, rispetto a quelli a 18 °C che all'atto dell'analisi evidenziano molti picchi falsi positivi.

Nel corso delle numerose analisi effettuate è emersa l'esigenza di standardizzare la valutazione della diversa migrazione elettroforetica, onde evitare di incorrere in false interpretazioni. Per ovviare a questo inconveniente e per poter valutare gli elettroferogrammi solo dalla tabulazione numerica dei data point è stato deciso di introdurre nelle tabulazioni dei campioni apparentemente difformi i data point dei picchi del ladder prima e dopo i picchi dei campioni (Fig. 17) (Tab. 4).

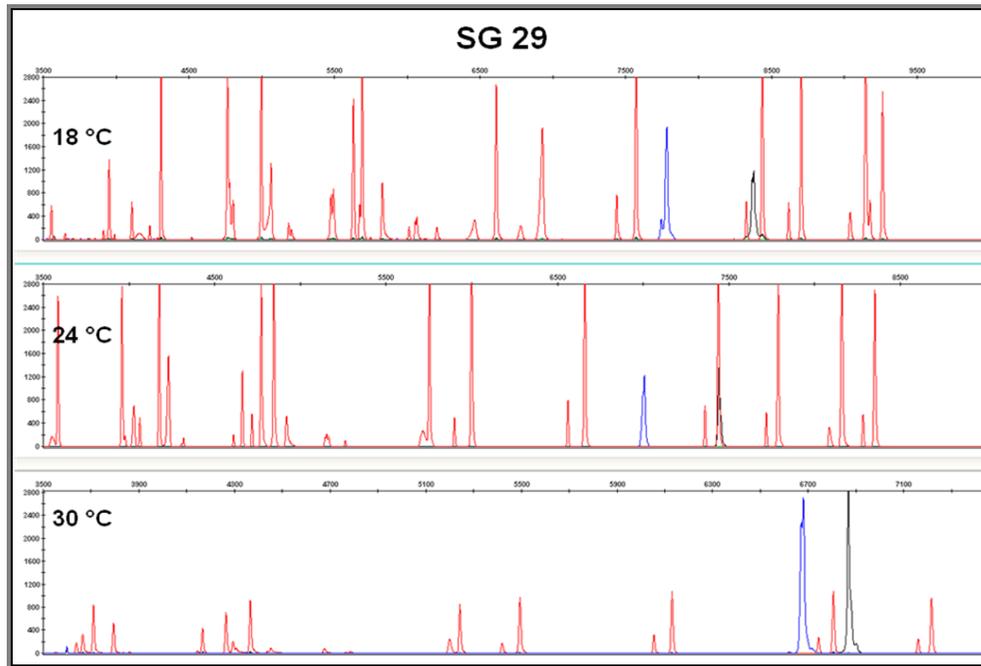


Fig. 16. Campione SG29 testato con tre protocolli di analisi a temperature di 18°, 24°, 30 °C. I profili in rosso si riferiscono ai picchi dello standard ROX 500.

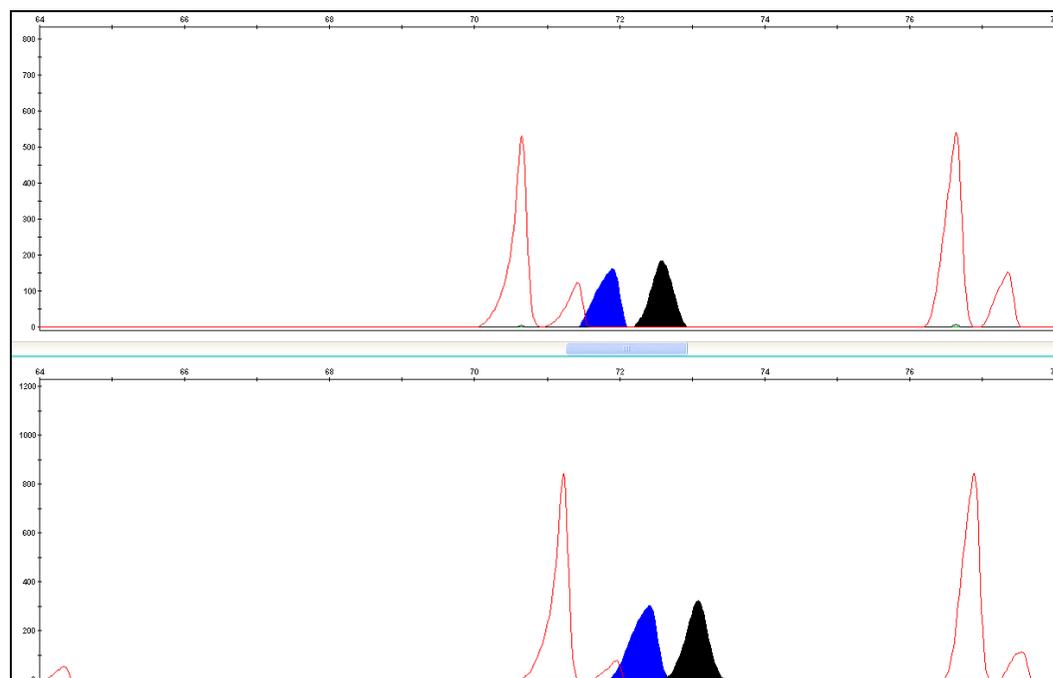


Fig. 17. Profili di due sub campioni di CTV con visivamente uguali ma con data point di migrazione dei frammenti differenti. Anche i picchi del ladder, in rosso, presentano uno shift di migrazione paragonabile a quello subito dai campioni. Entrambe le corse sono state effettuate contemporaneamente, col medesimo protocollo di analisi.

Tab. 4. Dati numerici della migrazione elettroforetica per i due filamenti, normalizzati dai dati numerici ottenuti dai valori dei picchi dello standard prima e dopo i due filamenti del campione.

Campione	Migrazioni relative dei frammenti			
	Data point ladder prima	Forward	Reverse	Data point ladder dopo
LF 024	70,65	71,91	72,59	76,65
LF 037	71,23	72,41	73,08	76,9

L'analisi dei profili CE-SSCP dei 76 campioni di campo risultati positivi al test ELISA ha mostrato, nella maggior parte dei campioni esaminati, migrazione dei picchi elettroforetici identici o simili. Tuttavia, per alcuni campioni, i profili sono risultati completamente differenti. In accordo con i valori di riferimento del size standard, sono stati individuati 9 gruppi arbitrari (Tab. 5).

Tra gli isolati testati, i 54 campioni raccolti in una zona altamente agrumicola a sud-est del monte Etna hanno un profilo molto simile, rientrando nei profili 1, 2 o 3 (Fig. 18-19-20), mentre gli altri 22 provenienti da altre regioni e / o aree geografiche del mediterraneo presentano diversi profili elettroforetici.

Tab.5. Tentativo di raggruppamento in cluster arbitrari degli isolati di CTV in base alla mobilità elettroforetica relativa dei filamenti fw e rv.

Tentativo di cluster	No. di isolati clusterizzati	Migrazione relativa dei filamenti	
		Forward	Reverse
1	28	72.36±0.074	74.04±0.005
2	16	70.90±0.057	74.04±0.044
3	10	72.07±0.042	72.08±0.042
4	3	71.12±0.024	73.02±0.028
5	3	67.03±0.061	67.03±0.020
6	2	68.09±0.0	69.08±0.0
7	2	74.32±0.0	75.22±0.0
8	6	76.06±0.04	75.14±0.03
9	6	80.34±0.012	80.35±0.021

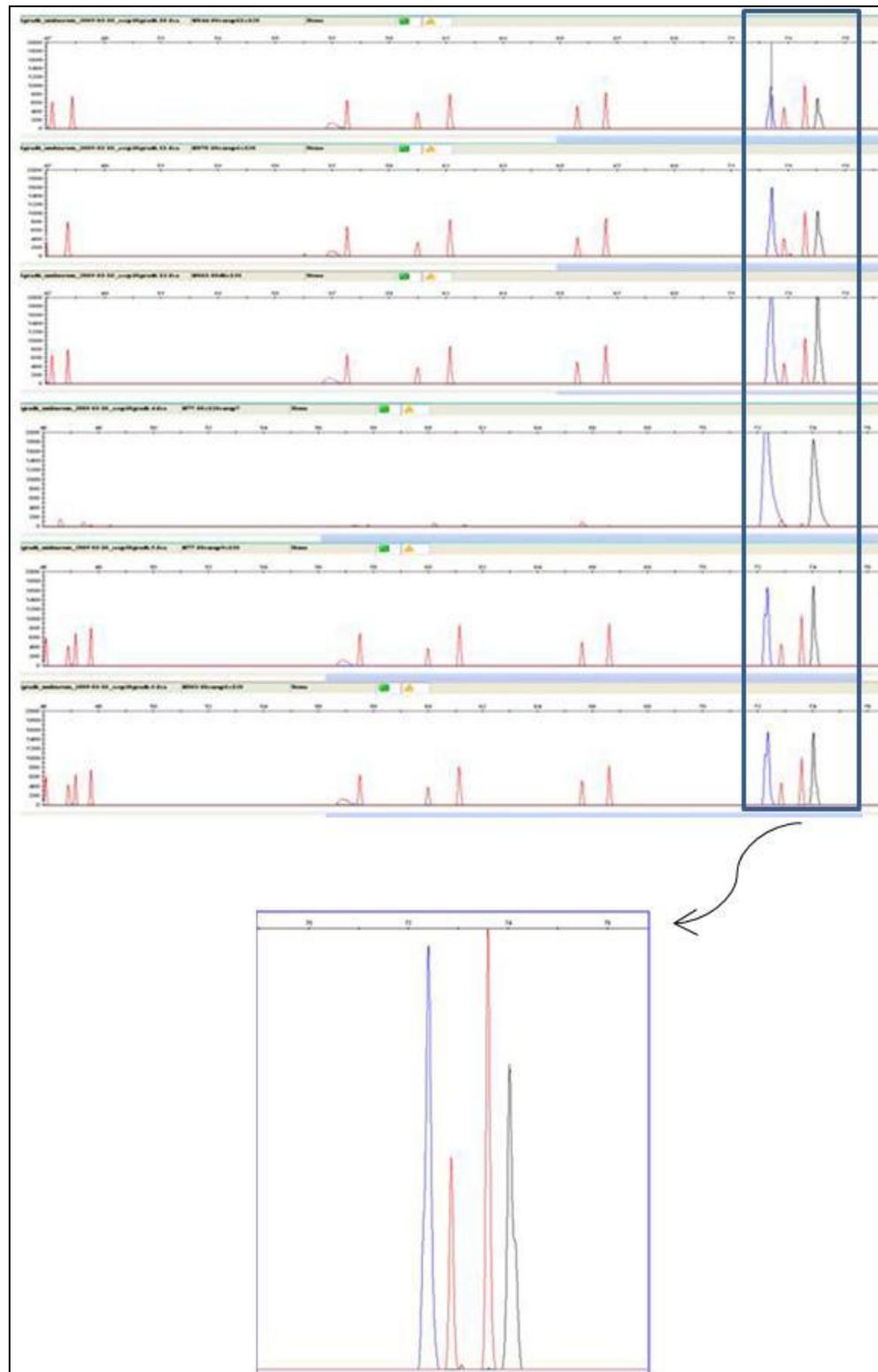


Fig. 18. Profilo elettroforetico di tipo 1 ottenuto in 28 dei 54 campioni dall'analisi del frammento di 425bp del gene p18, nelle condizioni operative riportate nella Tab. 4.

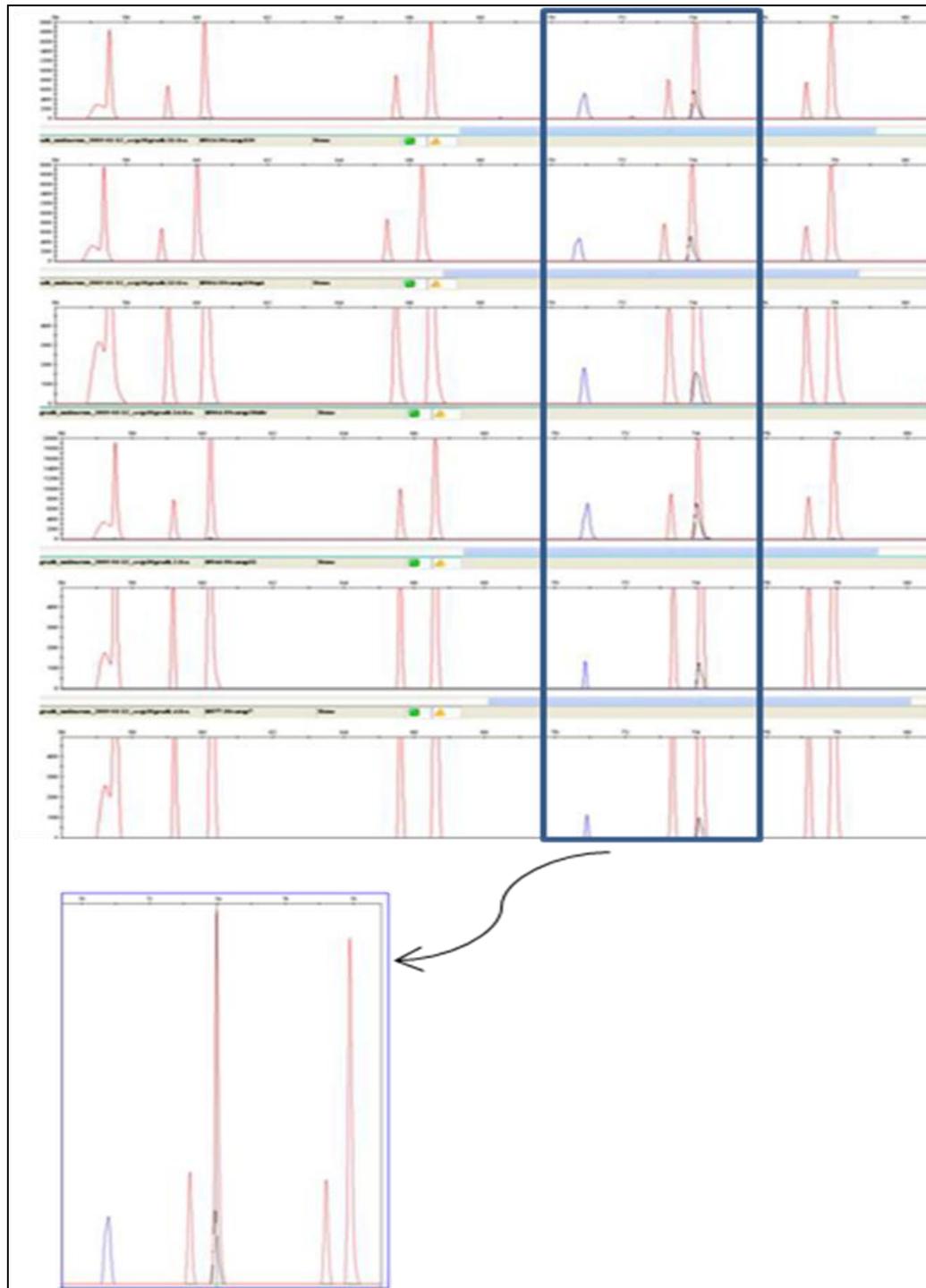


Fig. 19. Profilo elettroforetico di tipo 2 ottenuto in 16 dei 54 campioni dall'analisi del frammento di 425bp del gene p18, nelle condizioni operative riportate nella Tab. 4.

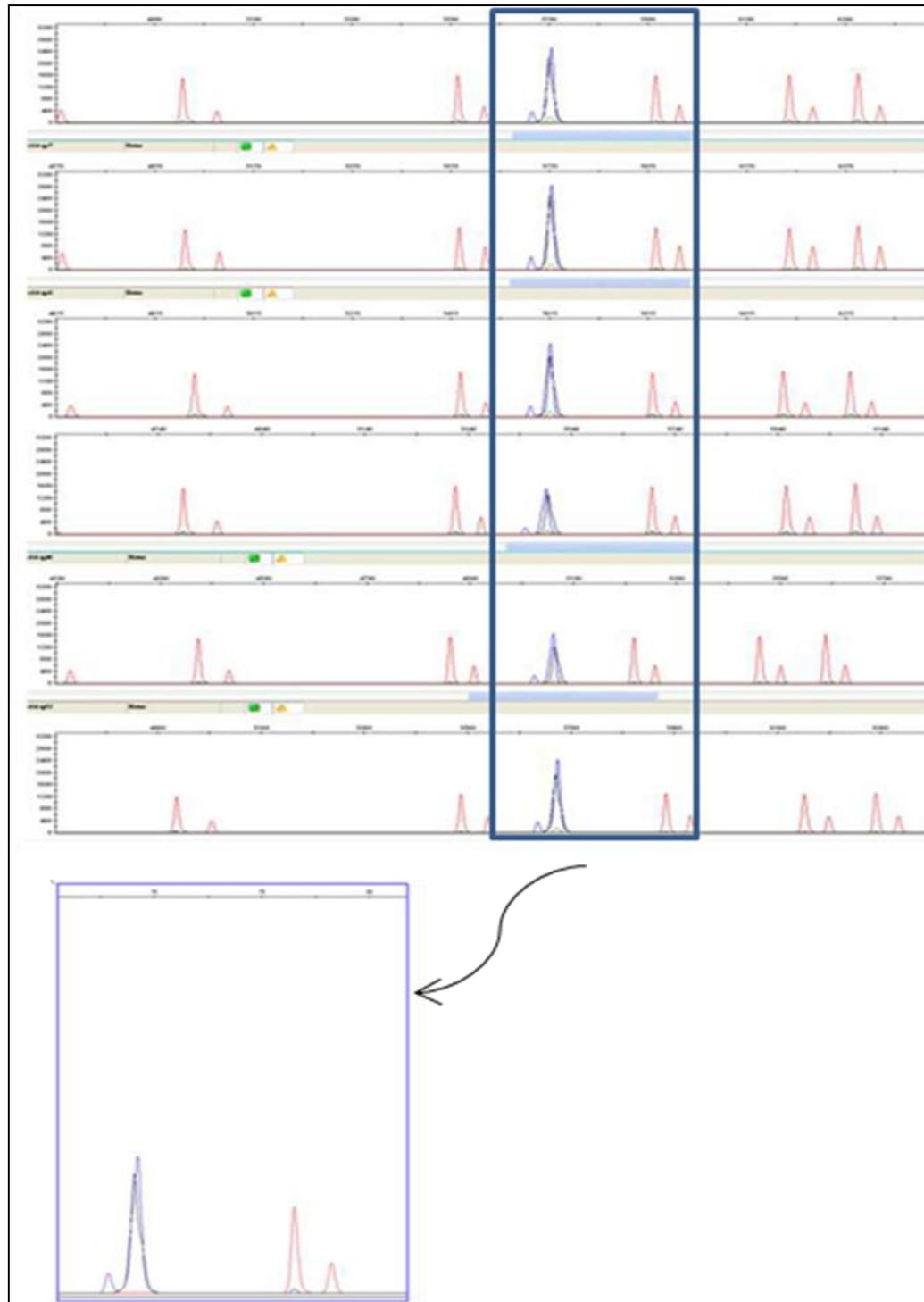


Fig. 20. Profilo elettroforetico di tipo 3 ottenuto in 10 dei 54 campioni dall'analisi del frammento di 425bp del gene p18, nelle condizioni operative riportate nella Tab. 4.

7.2.2 Analisi CE-SSCP del gene p23

Il frammento amplificato del gene P23 di 594 bp ha permesso di ottenere dei risultati dei profili elettroforetici per gli isolati su menzionati paragonabili a quelli ottenuti dall'analisi della P18, ma con una sostanziale differenza di mobilità elettroforetica (Fig. 21). Inoltre il pattern elettroforetico dei picchi ha presentato nella maggior parte dei casi delle fratture del singolo picco, rendendo visivamente più caratteristico il profilo di ogni campione, e consentendo altresì di poter disporre di più valori numerici per l'identificazione dei picchi (Tab. 6).

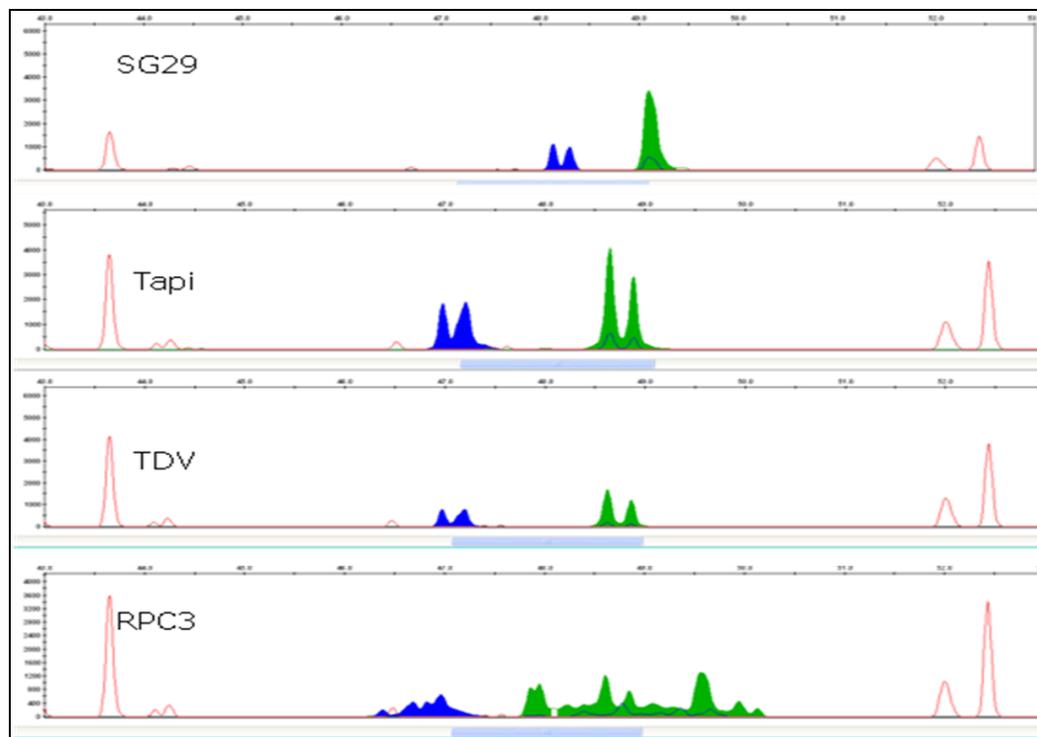


Fig. 21. Profili del gene p23 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi CE-SSCP in un frammento di 594bp. I picchi blu indicano i filamenti forward, marcati col fluoroforo 6-FAM, mentre quelli verdi i filamenti reverse, marcati col fluoroforo VIC.

Tab. 6. Dati numerici della migrazione elettroforetica per i due filamenti del template p23 di 594bp.

Isolati	Migrazione relativa dei filamenti	
	Forward	Reverse
SG29	52,59	55,07
	53,04	
Tapi	51,92	54,35
	52,59	54,54
TDV	51,92	54,35
	52,59	54,54
RPC3	50,92	53,84
	52,45	54,04
	52,66	55,8
	53,25	56,06

Allorché sono stati miscelati in un unico pozzetto della piastra, i frammenti dei geni p18 (425bp) e p23(594bp), i profili sono risultati perfettamente distinguibili (Fig. 22). Le analisi sono state ripetute 4 volte utilizzando per ogni prova materiale vegetale fresco e ottenendo sempre i medesimi risultati. Questo permette di analizzare, per ogni campione vegetale, contemporaneamente più geni in un'unica reazione.

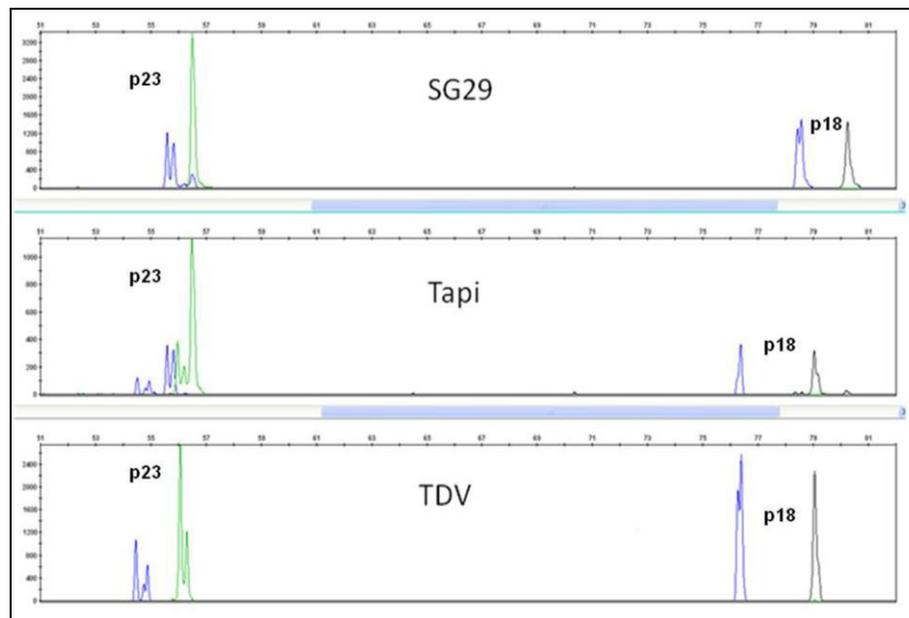


Fig. 22. Profili di ampliconi di diversa grandezza, p18 (425 bp) e p23 (594 bp), coiniettati e analizzati in un'unica corsa elettroforetica.

7.2.3 Analisi CE-SSCP del gene p25

Il frammento amplificato del gene p25 di 415 bp si presenta con una conformazione dei picchi spesso frastagliata, caratterizzata da spaccature profonde tali da permettere la separazione numerica in picchi distinti, spesso accompagnata da spalle laterali ai picchi principali che numericamente non sono nominabili ma otticamente caratterizzano i campioni analizzati. I 4 campioni hanno dato i medesimi risultati ottenuti con gli altri geni pur presentando la migrazione e la conformazione specifica per questo gene (Fig. 23) (Tab. 7).

Discorso a parte fa il campione RPC3 che presenta al suo interno non 2 ma 3 isolati differenti. Come nel caso dell'analisi del gene p18 anche qui il campione è stato clonato e i cloni analizzati per CE-SSCP, ottenendo 3 profili differenti (Fig. 23).

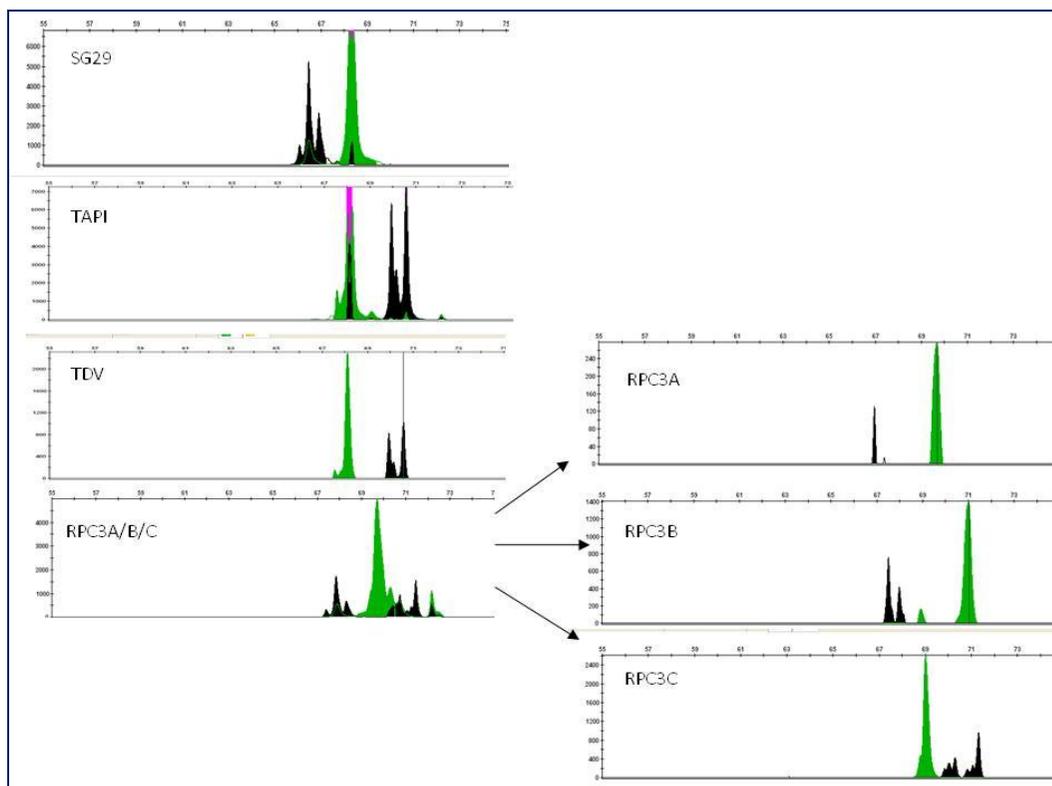


Fig. 23. Profili del gene p25 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi CE-SSCP di un frammento di 415bp. I picchi neri indicano i filamenti forward, marcati col fluoroforo NED, quelli verdi i filamenti reverse, marcati col fluoroforo VIC. Il campione RPC3 è stato separato mediante clonaggio e i cloni analizzati mediante CE-SSCP ottenendo 3 profili differenti.

Tab. 7. Dati numerici della migrazione elettroforetica di 4 campioni per i due filamenti del template p25 di 515bp.

Isolati	Migrazione relativa dei filamenti	
	Forward	Reverse
SG29	66,11	68,5
	66,49	
	66,93	
Tapi	69,94	68,01
	70,59	68,25
TDV	69,93	68
	70,58	68,24
RPC3	67,4	69,71
	67,85	70,31
	68,32	70,73
	70,73	72,17
	71,45	
	72,17	

7.2.4 Analisi CE-SSCP del gene p20

I profili elettroforetici ottenuti dal frammento del gene p20 di 540 bp, mostrano un andamento dei picchi più curvilineo e una separazione tra i diversi picchi più marcata.

I quattro campioni anche per questo gene presentano gli stessi raggruppamenti. In particolare nel campione RPC3 la mistione degli isolati si risolve ottimamente (Fig. 24) (Tab. 8).

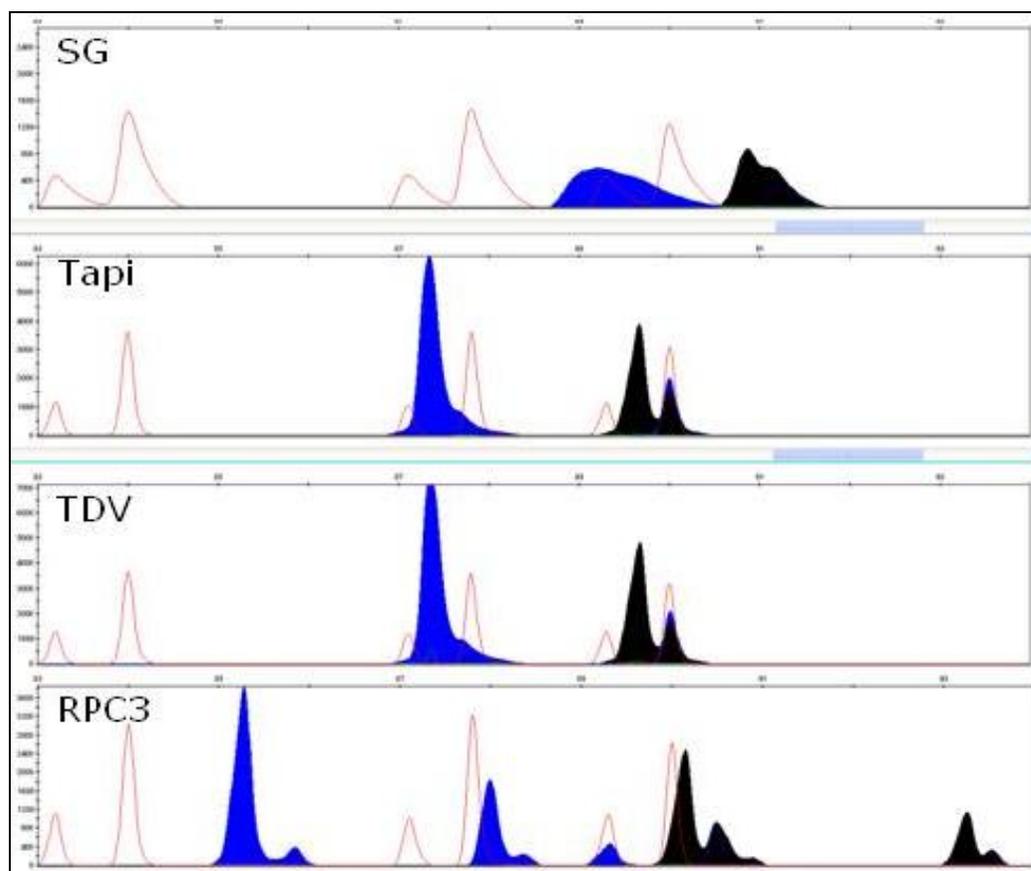


Fig. 24. Profili del gene p20 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi CE-SSCP in un frammento di 540bp. I picchi blu indicano i filamenti forward, marcati col fluoroforo 6-FAM, quelli verdi i filamenti reverse, marcati col fluoroforo NED.

Tab. 8. Dati numerici della migrazione elettroforetica di 4 isolati per i due filamenti del templatò p20 di 540bp.

Isolati	Migrazione relativa dei filamenti	
	Forward	Reverse
SG29	89,21	90,8
Tapi	87,34	89,67
		90
TDV	87,35	89,67
		90
RPC3	85,28	90,2
	85,84	90,5
	87,99	93,3
	89,32	93,5

7.3 Analisi ELISA-CE-SSCP.

Tutti i campioni mostrano due picchi elettroforetici forward e reverse, distinti per colorazione grazie all'utilizzo di fluorofori differenti (Fig. 24). I risultati (Tab. 10), scaturiti da tre corse elettroforetiche indipendentemente condotte analizzando il gene p18, hanno valori medi di migrazione dei due filamenti di 71 forward e 73 reverse, per Tapi e TDV. SG29 invece ha valori di 73 e 74, rispettivamente per forward e reverse.

I valori di migrazione ottenuti con questo protocollo sequenziale ELISA-CE-SSCP sono perfettamente identici a quelli ottenuti dai campioni estratti con Trizol.

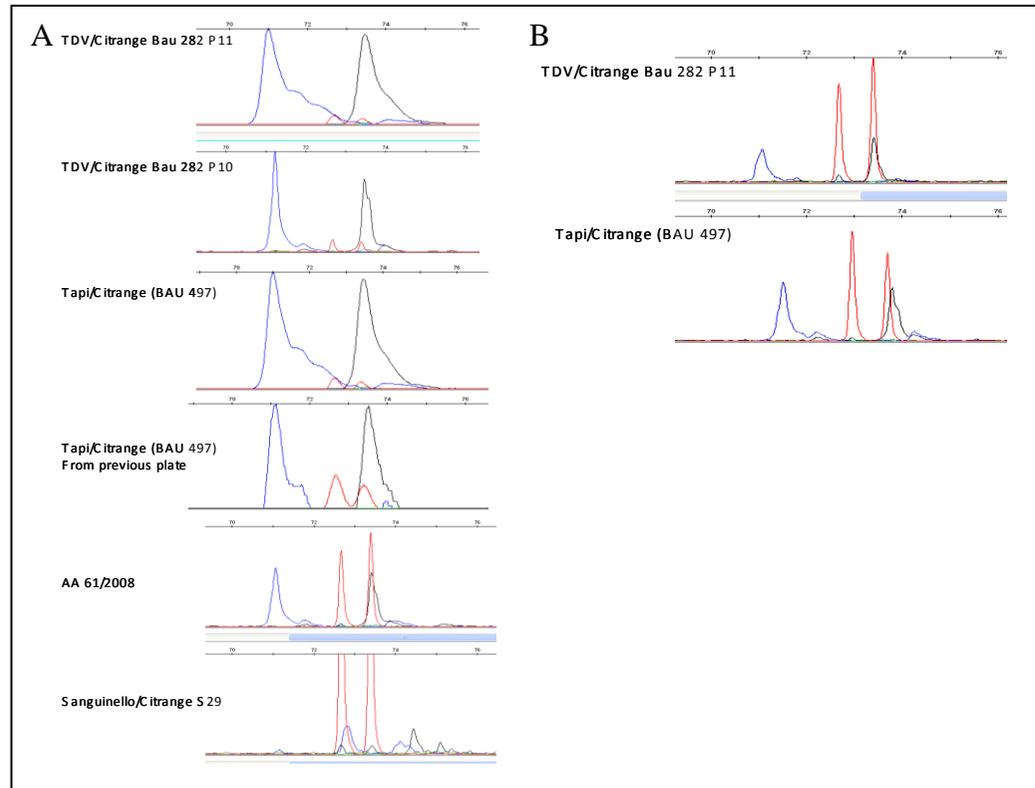


Fig. 25. Profili elettroforetici ottenuti da analisi sequenziale ELISA-CE-SSCP (A) e diretta CE-SSCP (B) del gene p18.

Tab. 9. Analisi CE-SSCP del gene p18 ottenute da piante naturalmente e artificialmente infette da CTV.

Isolati CTV	Campioni	Migrazione relative dei filamenti	
		FW	RW
Analisi sequenziale ELISA-CE-SSCP			
TDV	P11 TDV/Citrange Bau 282 ^a	71,50 ± 0,091	74,19 ± 0,11
TDV	P10 TDV/Citrange Bau 282 ^a	71,16 ± 0,079	73,77 ± 0,57
TAPI	Tapi/Citrange (BAU 497) ^a	71,09 ± 0,11	73,40 ± 0,17
SG29	Sanguinello/Citrange (Pac 29) ^a	73,24 ± 0,50	74,70 ± 0,38
TAPI	Arancio amaro AA 41/2008 ^b	71,21 ± 0,02	73,68 ± 0,34
SG29	Cedro Etrog/arancio amaro 9/2008 ^b	72,99 ± 0,09	74,51 ± 0,05
SG29	Hamlin/arancio amaro P8 CTV 1/09 ^b	73,25 ± 0,35	74,40 ± 0,28
SG29	arancio amaro AA 905 ^b	73,04 ± 0,02	74,44 ± 0,08
Tapi/TDV	arancio amaro AA 61/2008 ^c	71,39 ± 0,41	73,68 ± 0,36
Tapi/TDV	Tarocco Sant'Alfio/ arancio amaro 15 D ^c	71,47 ± 0,01	73,59 ± 0,01
SG29	Valencia/ arancio amaro 1 ^c	73,10 ± 0,06	74,23 ± 0,05
SG29	Valencia/ arancio amaro 2 ^c	73,14 ± 0,03	74,22 ± 0,05
SG29	Tarocco Gallo/ arancio amaro 7 ^c	73,16 ± 0,04	74,36 ± 0,08
SG29	Tarocco Comune/ arancio amaro 3 ^c	73,35 ± 0,40	74,72 ± 0,38
Analisi diretta CE-SSCP			
TDV	P11 TDV/Citrange Bau 282 ^a	71,6 ± 0,45	73,83 ± 0,36
TAPI	Tapi/Citrange (BAU 497) ^a	71,62 ± 0,48	73,84 ± 0,39

^a Piante madri; ^b piante artificialmente inoculate; ^c campioni derivanti da piante naturalmente infette

La sperimentazione è poi proceduta con l'analisi del gene p25, e anche in questo caso la conformazione dei picchi e la migrazione elettroforetica non sono risultate compromesse dall'applicazione di una diversa metodologia di ottenimento del template (Fig. 25).

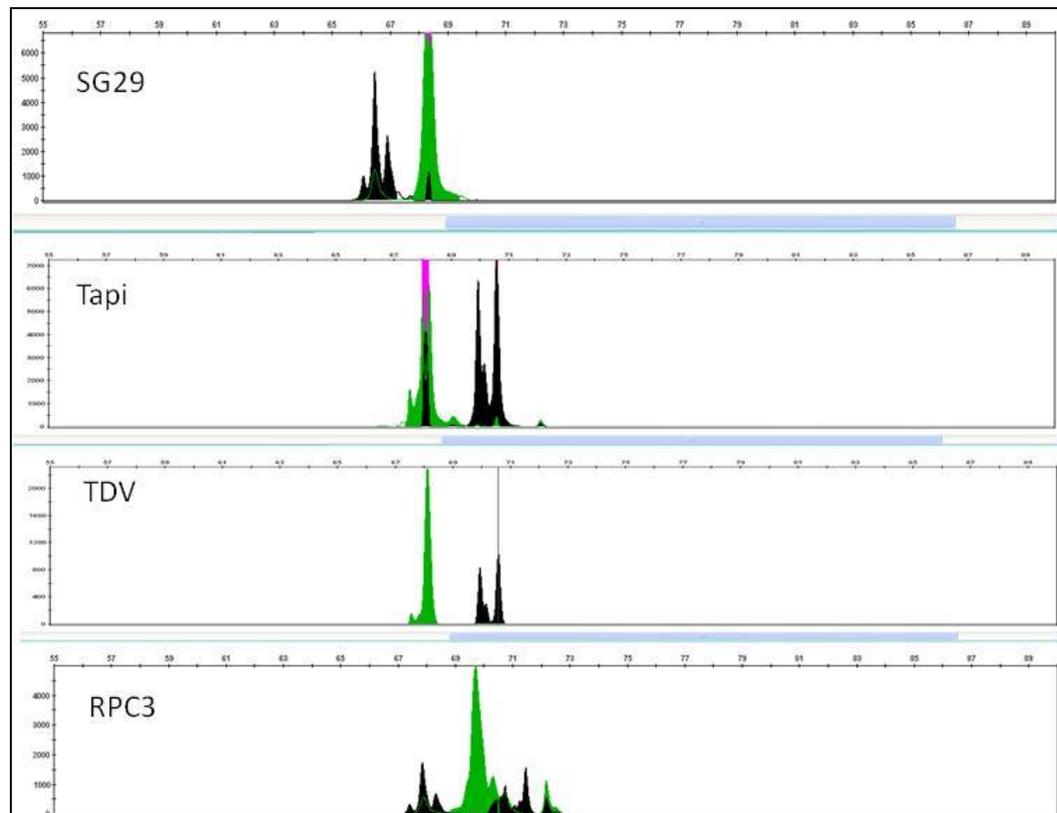


Fig. 26. Profili del gene p25 di 4 isolati di CTV ottenuti mediante analisi sequenziale ELISA/CE-SSCP in un frammento di 415bp. I picchi neri indicano i filamenti forward, marcati col fluoroforo NED, mentre quelli verdi i filamenti reverse, marcati col fluoroforo VIC.

7.4 Analisi delle sequenze

Gene p18

Le analisi delle sequenze nucleotidiche relative alle sequenze parziali del gene p18 per i campioni SG29, Tapi, TDV e i due RPC3, depositate nel database GenBank con i relativi numeri di accessione GQ119002, GQ119003, GQ119004, GQ119005, GQ119006 hanno confermato i risultati ottenuti con la tecnica CE-SSCP.

L'allineamento nucleotidico di Tapi e TDV ha mostrato un'omologia pari al 100% e un'omologia del 95% di queste con SG29.

Tra le 2 varianti del campione RPC3, quella denominata B ha un grado di omologia del 96,4% con SG 29 e del 93,1% con Tapi e TDV. La variante A ha grado di omologia del 94,6% con SG 29 e 90,6% con Tapi e TDV.

Successivamente, le sequenze nucleotidiche sono state analizzate per omologia a confronto con le accessioni presenti in GenBank (Tab. 10).

La sequenza parziale del gene p18 di SG29, presenta un grado di omologia del 97% con i ceppi T68-1, NUaGa e NZ-B18. Tra questi ceppi severi sono stati classificati come seedling yellows il NUaGa e stem-pitting NZ-B18. Le sequenze parziali della p18 di Tapi, TDV, mostrano una omologia del 99% con gli isolati T30, 81P e 432. Tra questi, il più noto è sicuramente il ceppo T30, di cui è stato sequenziato anche l'intero genoma (EU937520), endemico in Florida e assai simile al ceppo spagnolo T385, in grado di indurre sintomi blandi su limetta messicana.

Le due varianti genomiche (A e B) ritrovate all'interno dell'isolato RPC3 sono state depositate in GenBank con la denominazione HU-PSTS-3A/B. La variante A mostra il 98% di omologia con gli isolati T30, 81P e 432. Mentre la variante B il maggior grado di omologia 98% lo esplica con i ceppi T68-1, NUaGa e NZ-B18.

Utilizzando il metodo Neighbour-Joining per la costituzione dell'albero filogenetico (fig. 27), scaturito dall'allineamento degli isolati con le sequenze nucleotidiche dei genomi completi presenti in GeneBank (Fig. 28), si è visto che Tapi, TDV e la variante A dell'RPC3 sono localizzati in un clado che comprende gli isolati blandi (biogruppi 1 e 2) T30, T385, dato supportato da un valore di bootstrap del 100%. L'SG29 e la variante B dell'RPC3 si collocano invece all'interno del cluster di isolati virulenti appartenenti al biogruppo 5 (NuaGA, T318, NZ-B18, B165, SY 568), e al biogruppo 4 (VT), sostenuti da valori di bootstrap dell'89 e 91 % rispettivamente.

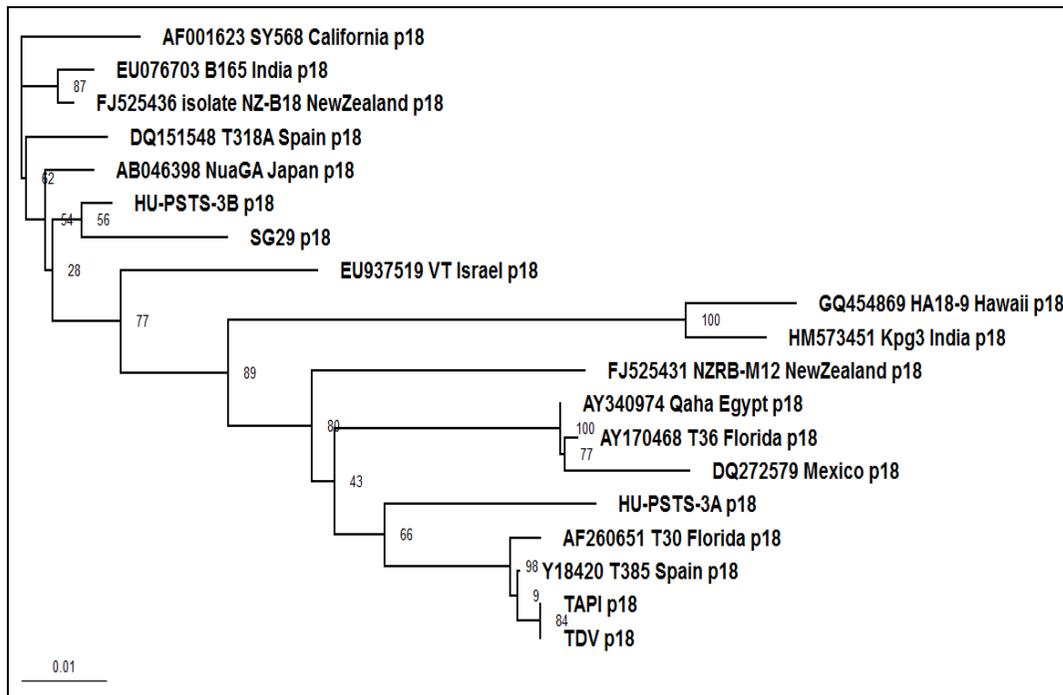


Fig. 27. Albero filogenetico del gene parziale p18 degli isolati siciliani SG29,Tapi,TDV e dell'isolato cinese RPC3 (HU-PSTS-3A, HU-PSTS-3B), in relazione alle sequenze dei genomi completi presenti in genbank. I valori di bootstrap per 1000 repliche, in valore percentuale, sono indicati in prossimità dei nodi.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
AB046398_N : .....A.....T..... : 105
AF260651_T : .....C.....G.....T..... : 105
TAPI_p18 : ..... : 27
TDV_p18 : ..... : 27
Y18420_T38 : .....T..... : 105
HU-PSTS-3A : .....T..... : 27
AV170468_T : .....C.....G..... : 105
X1340974_Q : .....C.....G.....A..... : 106
DQ272579_M : .....C.....G.....C..... : 105
FJ525431_N : .....G.....G.....C.....T..... : 105
SQ454869_H : .....A.....CA.....G.T.....A.C..... : 105
HM573451_K : .....T.....T.A.....CA.....G.....A.C..... : 105
EU937519_V : .....G.....T.....T..... : 105
HU-PSTS-3B : ..... : 27
SG29_p18 : ..... : 27
EQ151548_T : .....T.A.....TG..... : 105
AF001623_S : .....G..... : 105
EU076703_B : .....T..... : 105
FJ525436_i : .....T..... : 105
TTcaTcGTGAACGTgGStGAtAtAAT

*      120      *      140      *      160      *      180      *      200
AB046398_N : .....T.....T.....C.....A.....G..... : 211
AF260651_T : .....C.....A.....T.....T.....G.....T..... : 211
TAPI_p18 : .....C.....A.....T.....T.....G.....T..... : 133
TDV_p18 : .....C.....A.....T.....T.....G.....T..... : 133
Y18420_T38 : .....C.....A.....C.....T.....G.....T..... : 211
HU-PSTS-3A : .....C.....A.....T.....T.....C.....T..... : 133
AV170468_T : .....C.....A.....T.....T.....T..... : 211
X1340974_Q : .....C.....A.....T.....T.....T..... : 212
DQ272579_M : .....C.....T.....A.....T.....T..... : 211
FJ525431_N : .....C.....A.....A.....T.....T..... : 211
SQ454869_H : .....C.....A.....GA..... : 211
HM573451_K : .....C.....A.....GA.....C.....A..... : 211
EU937519_V : .....T.....C.....G.....C..... : 211
HU-PSTS-3B : .....T.....T.....C.....A.....G..... : 133
SG29_p18 : .....T.....T.....C.....A.....G..... : 133
EQ151548_T : .....T.....T.....C..... : 211
AF001623_S : .....T.....C.....A..... : 211
EU076703_B : .....T.....T.....C.....A..... : 211
FJ525436_i : .....T.....G.....C.....A..... : 211
GT CCGGT GCCTACA GTTcCTA tGAaGAtaTGCTGAATag TTTTCAGCTATATCGAATTGtAcGAT ATAGC GA GGTAGtGcTTAcTAAa GAcAA A

*      220      *      240      *      260      *      280      *      300      *      3
AB046398_N : .....G..... : 317
AF260651_T : .....C.....C..... : 317
TAPI_p18 : .....C.....C..... : 239
TDV_p18 : .....C.....C..... : 239
Y18420_T38 : .....C.....C..... : 317
HU-PSTS-3A : .....C..... : 239
AV170468_T : .....C.T.....G.....A..... : 317
X1340974_Q : .....C.T.....G.....A..... : 316
DQ272579_M : .....C.C.T.....T.....A..... : 317
FJ525431_N : .....C.....T.....G.T.....C.....T..... : 317
SQ454869_H : TC..AT.....G.....C.....C.....A..... : 317
HM573451_K : .C..A.....T.....G.....C.....A..... : 317
EU937519_V : .....A.....G.....C..... : 317
HU-PSTS-3B : .....G.....C..... : 239
SG29_p18 : .....A.....G..... : 239
EQ151548_T : .....G..... : 317
AF001623_S : .....C..T.C.....G.T..... : 317
EU076703_B : .....G..... : 317
FJ525436_i : .....G..... : 317
ctGTggTtGA cgtTTAGA GcATGAATCCtTGGCTTgTtAAATTAGCgAAAACGACTACTACTATTtGtTtAc ATGtCtAATAAGSTTCTtTTGG

*      20      *      340      *      360      *      380      *      400      *      420
AB046398_N : .....T.....T..... : 423
AF260651_T : .....C.....A.....G.....CG.....G..... : 423
TAPI_p18 : .....C.....A.....CG.....G..... : 345
TDV_p18 : .....C.....A.....CG.....G..... : 345
Y18420_T38 : .....C.....A.....CG.....G..... : 423
HU-PSTS-3A : .....C.....A.....G.....AC.....C..... : 345
AV170468_T : .....C.....A.....G.....A.....C..... : 423
X1340974_Q : .....C.....A.....G.....C..... : 424
DQ272579_M : .....C.....A.....G..... : 423
FJ525431_N : .....T.....A.....A.....G.....C.....G..... : 423
SQ454869_H : .....T.....G.....CA.....T..... : 423
HM573451_K : .....C.....A.....T..... : 423
EU937519_V : .....G.....T.....C.....A.....T..... : 423
HU-PSTS-3B : .....G.T..... : 345
SG29_p18 : .....G.T.....CG.....G.....G..... : 345
EQ151548_T : .....T..... : 423
AF001623_S : .....T.....C..... : 423
EU076703_B : .....T.....C.....T.....T..... : 423
FJ525436_i : .....T.....T.....G..... : 423
TACTAC AAaTC GAACC CTTAGTTGTTAGCTaTcaCGTcGAtCGAaTTTTaTCAAGTT TtAtgGG cTAAcGtTGAtGAttCTCG TG GcTGCaGt

*      440      *      460      *      480      *      500
AB046398_N : .....G.....C..... : 504
AF260651_T : ..... : 504
TAPI_p18 : ..... : -
TDV_p18 : ..... : -
Y18420_T38 : ..... : 504
HU-PSTS-3A : ..... : -
AV170468_T : .....C.....T.....T.....T..... : 504
X1340974_Q : .....C.....T.....T..... : 504
DQ272579_M : .....C.....T.....T..... : 504
FJ525431_N : .....G.....T.....C..... : 504
SQ454869_H : ..C.....A.T.....G.....G.....T..... : 504
HM573451_K : ..C.....A.T.....G.....G.....T..... : 504
EU937519_V : .....G.....T.....G..... : 504
HU-PSTS-3B : ..... : -
SG29_p18 : ..... : -
EQ151548_T : .....T.....G.....C..... : 504
AF001623_S : .....G.....C..... : 504
EU076703_B : .....G.....C..... : 504
FJ525436_i : .....G.....C..... : 504

```

Fig. 28. Allineamento nucleotidico del gene parziale p18 degli isolati siciliani SG29,Tapi,TDV e dell'isolato cinese RPC3 (HU-PSTS-3A, HU-PSTS-3B), in relazione alle sequenze dei genomi completi presenti in genebank.

Tab. 10. Analisi BLAST delle sequenze p18 di SG29, TAPI, TDV e delle due varianti RPC3.

P18	ID GenBank ^a	Omologia ^b	Stato ^c	Autori e anno di annotazione
SG29				
T68-1	EF200108	97%	USA	Hilf,M.E., (2007)
NUaGa	AB046398	97%	Giappone	Suastika,G., et al., (2005)
NZ-B18	FJ525436	97%	Nuova Zelanda	Harper,S.J., et al., (2009)
Tapi				
T30	EU937520	99%	Florida	Weng,Z., et al., (2008)
81P	AY995567	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
432	AY995562	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
TDV				
T30	EU937520	99%	Florida	Weng,Z., et al., (2008)
81P	AY995567	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
432	AY995562	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
RPC3A				
432	AY995562	98%	California	Roy,G., et al., (2005)
T30	EU937520	98%	Florida	Weng,Z., et al., (2008)
81P	AY995567	98%	California	Roy,G., et al., (2005)
RPC3B				
T68-1	EF200108	98%	USA	Hilf,M.E., et al., (2007)
NUaGa	AB046398	98%	Giappone	Suastika,G., et al., (2005)
NZ-B18	FJ525436	98%	Nuova Zelanda	Harper,S.J., et al., (2009)

^a Numero identificativo dell'annotazione nella banca dati di GenBank

^b Livello di omologia risultante dall'analisi BLAST

^c Luogo di identificazione dell'isolato

Gene p23

L'analisi per omologia effettuata nel database GenBank delle sequenze nucleotidiche parziali del gene p23 per i campioni SG29, Tapi e TDV (Tab. 11), depositate nel database GenBank con i relativi numeri di adesione EU487601, EU487602, EU487603 mostra per il campione SG29 un grado di omologia pari al 99% con le sequenze dei ceppi C271-2, Val-23-4 e CB5, ceppi appartenenti al biogruppo 2 che causano seedling yellows e stem pitting su arancio dolce e su pompelmo. Tapi clusterizza con i ceppi della California 464-1, 464-2 e 425 con omologia del 99%, ceppi molto vicini filogeneti-

camente al ceppo blando T385, mentre TDV presenta omologia del 99% con quelli spagnoli T385, T411 e 385-23-1.

L'albero filogenetico mostrato in figura 29, ottenuto dall'allineamento degli isolati con le sequenze nucleotidiche dei genomi completi presenti in GeneBank (Fig. 30) permette di individuare Tapi e TDV in un clado che include le variazioni di sequenze degli isolati blandi T30 e T385 sostenuti da un valore di bootstrap del 99%, mentre SG29 forma un clado con i ceppi severi NuaGA, T318, NZ-B18, B165 e SY 568 con valore di bootstrap del 91%.

Tab.11. Analisi BLAST delle sequenze p23 di SG29, TAPI, TDV e delle due varianti RPC3.

p23	ID GenBank ^a	Omologia ^b	Stato ^c	Autori e anno di annotazione
SG29				
C271-2	AY750752	99%	Argentina	Iglesias,N.G., et al., (2008).
Val-23-4	AJ579779	99%	Brasile	Sambade,A., et al., (2003)
CB5	GQ475048	99%	Brasile	Santos,F.A., et al., (2009)
Tapi				
464-2	AY995566	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
464-1	AY995565	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
425	AY995564	99%	California	Roy,G., et al., (2005)
TDV				
T385	Y18420	99%	Spagna	Vives,M.C., et al., (1999)
T411	Y18368	99%	Spagna	Ayllon,M.A., et al., (2006)
385-23-1	AJ579762	99%	Spagna	Sambade,A., et al., (2003)

^a Numero identificativo dell'annotazione nella banca dati di GenBank

^b Livello di omologia risultante dall'analisi BLAST

^c Luogo di identificazione dell'isolato

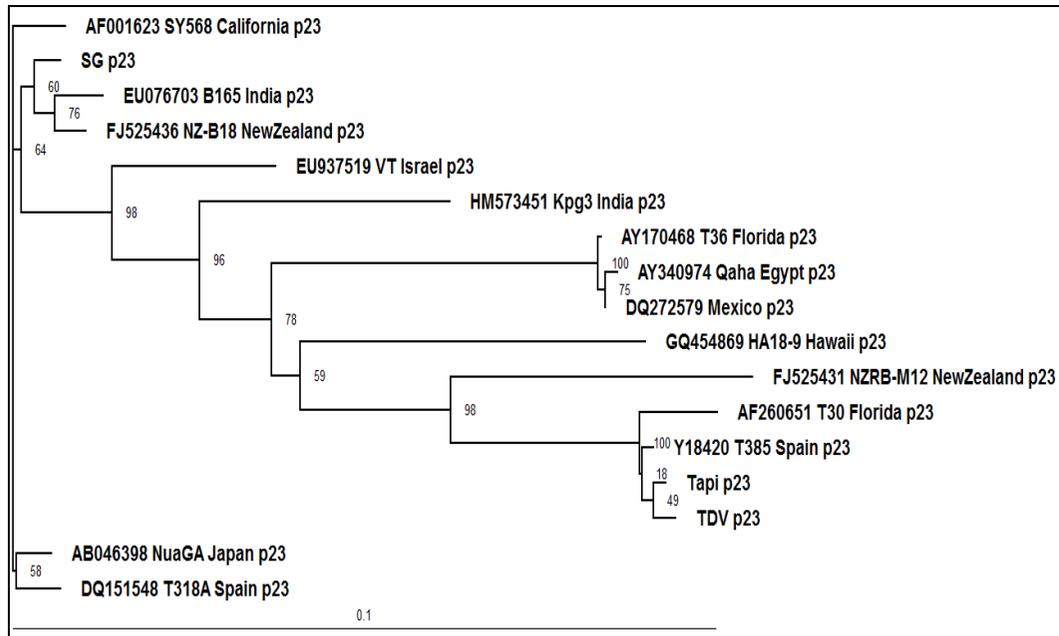


Fig. 29. Albero filogenetico del gene parziale p23 degli isolati siciliani SG29, Tapi e TDV in relazione alle sequenze dei genomi completi presenti in genebank. I valori di bootstrap per 1000 repliche, in valore percentuale, sono indicati in prossimità dei nodi.

Gene p25

L'analisi dell'omologia delle sequenze nucleotidiche del gene p25 dei campioni degli isolati utilizzati in questo lavoro, con le accessioni presenti nel database GenBank ha permesso di ottenere i risultati mostrati nella Tab. 12. La sequenza di SG29 possiede il maggior grado di omologia con i ceppi severi 065-17, 010-6 e BaraoB-6 che causa stem pitting e seedling yellows in arancio dolce e in pompelmo. Tapi e TDV clusterizzano con i ceppi blandi italiani 4B e IT08-1 clone 3b, e con il ceppo blando spagnolo 20-25-06. Dal clonaggio dell'isolato RPC3 sono state rilevate 3 varianti che si raggruppano nel seguente modo: la variante A con i ceppi CwS1_D (98% di omologia), C257-9 clone 5 (97% di omologia) e col ceppo AR13 (96% di omologia). La variante B con i ceppi X24, 010-8 e BaraoB-4 col 100% di omologia. La variante C possiede il 98% di omologia col ceppo CwS1_F e il 97% con X24, 010-8 e BaraoB-4.

L'albero filogenetico della p25 (Fig. 31), del relativo allineamento nucleotidico (Fig. 32), raggruppa Tapi e TDV in un clado che comprende le variazioni di sequenze degli isolati blandi T30 e T385 (biogruppi 1 e 2), dato supportato da un valore di bootstrap del 100%. L'isolato SG29 si colloca all'interno del gruppo degli isolati virulenti del biogruppo 5 (NuaGA, T318, NZ-B18, B165, SY 568), e 4 (VT), sostenuti da valori di bootstrap del 95%. Le varianti di RPC3 a differenza dei raggruppamenti ottenuti dall'analisi filogenetica della p18, clusterizzano in un clado di due ceppi definiti "atipici" HA18-9 e Kpg3 con valori di bootstrap del 95%.

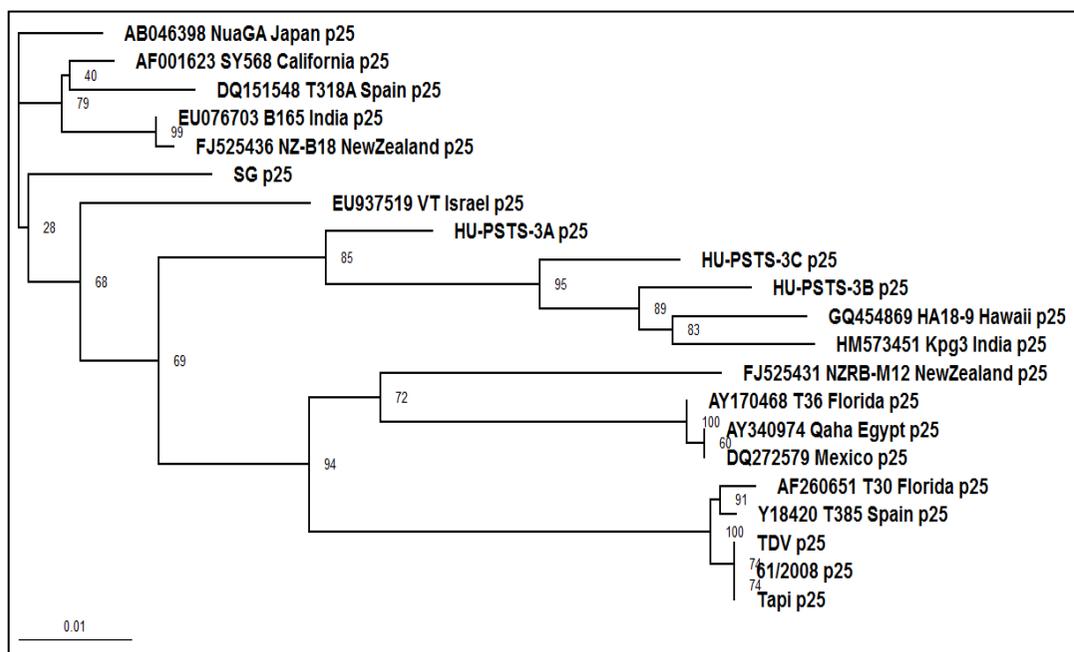


Fig. 31. Albero filogenetico del gene parziale p18 degli isolati siciliani SG29,Tapi,TDV e dell'isolato cinese RPC3 (HU-PSTS-3A, HU-PSTS-3B, HU-PSTS-3C) , in relazione alle sequenze dei genomi completi presenti in genbank. I valori di bootstrap per 1000 repliche, in valore percentuale, sono indicati in prossimità dei nodi.

Tab.12. Analisi BLAST delle sequenze p25 di SG29, TAPI, TDV e delle due varianti RPC3.

p25	ID GenBank ^a	Omologia ^b	Stato ^c	Autori e anno di annotazione
SG29				
065-17	EU579366	99%	Venezuela	Nolasco,G., et al., (2009)
010-6	EU579364	99%	Venezuela	Nolasco,G., et al., (2009)
BaraoB-6	EU579362	99%	Brasile	Nolasco,G., et al., (2003)
Tapi				
4B	FN661497	99%	Italia (Puglia)	Abou Kubaa,R., et al., (2010)
IT08-1 clone 3b	GQ981583	99%	Italia (Puglia)	Saponari,M., (2009)
20-25-06	EU579430	99%	Spagna	Nolasco,G., et al., (2009)
TDV				
4B	FN661497	99%	Italia (Puglia)	Abou Kubaa,R., et al., (2010)
IT08-1 clone 3b	GQ981583	99%	Italia (Puglia)	Saponari,M., (2009)
20-25-06	EU579430	99%	Spagna	Nolasco,G., et al., (2009)
RPC3A				
CwS1_D	EU288068	98%	Croazia	Cerni,S., et al., (2008)
C257-9 clone 5	AY750766.	97%	Argentina	Iglesias,N.G., et al., (2008)
AR13	DQ363387	96%	Brasile	Roy,A., et al., (2006)
RPC3B				
X24	FJ667598	100%	Cina	Liu,Y., et al., (2009)
010-8	EU579365	100%	Venezuela	Nolasco,G., et al., (2009)
BaraoB-4	EU579363	100%	Brasile	Nolasco,G., et al., (2003)
RPC3C				
CwS1_F	EU288070	98%	Croazia	Cerni,S., et al., (2008)
X24	FJ667598	97%	Cina	Liu,Y., et al., (2009)
010-8	EU579365	97%	Venezuela	Nolasco,G., et al., (2009)
BaraoB-4	EU579363	97%	Brasile	Nolasco,G., et al., (2003)

^a Numero identificativo dell'annotazione nella banca dati di GenBank

^b Livello di omologia risultante dall'analisi BLAST

^c Luogo di identificazione dell'isolato

Analisi in silico del grado di severità degli isolati mediante reattività all' anticorpo monoclonale MCA-13

Secondo quanto descritto da Pappu et al., 1993, la positiva reattività all'anticorpo monoclonale MCA-13, che consente di discriminare i ceppi severi da quelli mild, è dovuta al ruolo critico di un residuo aminoacidico presente nella "coat protein" (CP, p25).

Una singola alterazione nucleotidica alla posizione 371 del gene p25 provoca la sostituzione aminoacidica alla posizione 124 dell'aminoacido fenilalanina (F) con Tirosina (Y) compromettendo la reattività all'anticorpo MCA-13. Stando a tale evidenza sperimentale, tutti gli isolati severi che causano decline, stem pitting o seedling yellows, positivo alla reazione con l'anticorpo MCA-13 presentano quindi una F alla posizione 124 della "coat protein".

Al fine di valutare il grado di severità dei ceppi oggetto di questo studio, è stata condotta un'analisi *in silico* allo scopo di valutare la reattività all'MCA-13 indagando sulla suddetta variazione aminoacidica.

Le sequenze nucleotidiche dei geni p25, precedentemente ottenute mediante clonaggio, e le putative sequenze aminoacidiche sono state messe a confronto mediante allineamento con le sequenze di alcuni isolati rappresentativi del grado di severità. (Fig. 30). Dal confronto si evince che l'isolato SG29 e tutte le varianti dell'isolato RPC3 sono reattive all'anticorpo MCA-13 *in silico*, in quanto presentano nella posizione 124 la fenilalanina al posto della tirosina dovuta alla presenza del nucleotide timina al posto dell'adenina nella posizione 371 della sequenza nucleotidica. Da notare l'omologia con gli isolati severi BaraoB, VT e SY568. Al contrario, gli isolati Tapi e TDV risulterebbero MCA-13 negativi possedendo nella medesima posizione la tirosina analogamente agli isolati mild T30, T385 e IT08-1.

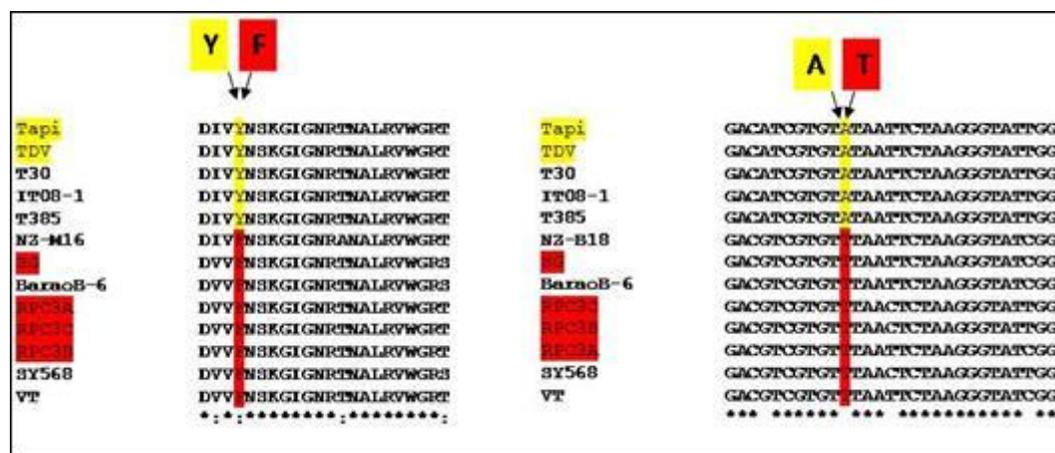


Fig. 30. Rappresentazione parziale dell'allineamento aminoacidico e nucleotidico degli isolati SG29, Tapi, TDV e RPC3 (A, B, C) con le sequenze aminoacidiche e nucleotidiche presenti in GenBank per la conferma della presenza o assenza in posizione 124 dell'epitopo dell' MCA-13 F/Y (sinistra), determinata dai risultanti codoni TAT o TTT nella posizione 371 della sequenza nucleotidica della coat protein (destra).

Poiché l'anticorpo MCA-13 non distingue gli isolati che causano solo deperimento da quelli che causano anche stem pitting o seedling yellow, è stato sviluppato un saggio che consente di discriminare rapidamente i ceppi di CTV tra gli isolati positivi a tale anticorpo (Yokomi *et al.*, 2010). Grazie all'uso di 3 sonde oligonucleotidiche progettate nella regione intergenica tra i geni p27 e p25 è possibile mediante un saggio in real-time PCR, discriminare tra isolati potenzialmente in grado di indurre SP o SY. In particolare, la sonda denominata CPi-VT3 è stata progettata per identificare gli isolati con genotipo VT e T3; la sonda CPi-T36 per quelli con genotipo T36 e la CPi-T36-NS per identificare gli isolati mild di un out-group con genotipo T36-like.

L'analisi real-time PCR con le suddette sonde ha rilevato che nessuno degli isolati oggetto di studio è positivo alle sonde CPi-T36 e CPi-T36-NS. Sono risultati essere positivi alla sonda CPi-VT3 solo gli isolati SG29 e RPC3, mentre come previsto, Tapi e TDV risultano negativi anche a questa (Tab. 13).

Tab. 13. Specificità del saggio real-time PCR secondo protocollo di Yokomi et al., 2010.

Isolato	Ciclo soglia		
	CPi-VT3	CPi-T36	CPi-T36-NS
SG29	15,93	0	0
Tapi	0	0	0
TDV	0	0	0
RPC3	19,98	0	0

Secondo le analisi *in silico*, gli isolati SG29 e RPC3 sono quindi classificabili tra i ceppi severi di CTV in grado di provocare stem pitting, in quanto risulterebbero positivi al saggio ELISA con anticorpo MCA-13 e sono positivi all'uso della sonda CPi-VT3 specifica per gli isolati con genotipo VT e T3. Gli isolati Tapi e TDV, che risultano negativi a entrambe le analisi, causerebbero invece solo sintomi blandi, in accordo ai saggi biologici.

8. Discussione dei risultati

L'esperienza maturata in vari laboratori da anni impegnati nella ricerca sulla tristezza degli agrumi ha modificato la strategia per la gestione e il controllo delle epidemie da CTV orientandola verso azioni integrate di eradicazione "mirata" dei ceppi/isolati più virulenti, l'uso di portinnesti tolleranti/resistenti e la protezione attiva delle piante mediante ceppi blandi o molecole di RNA interferente (siRNA). L'applicazione di tale strategia richiede la conoscenza della variabilità genetica della popolazione di isolati presenti nella regione di riferimento, le caratteristiche biologiche degli isolati candidati ad applicazioni di protezione crociata, in modo particolare l'assenza di virulenza sui diversi ospiti, la compatibilità con la popolazione dominante, la trasmissibilità attraverso vettori.

Sulla base di queste motivazioni ha preso le mosse la ricerca su cui si è riferito. I risultati acquisiti dimostrano che l'applicazione della metodologia CE-SSCP, messa a punto per la prima volta per la caratterizzazione degli isolati di CTV, presenta non pochi vantaggi per indagini di ampio respiro come la strategia oggi richiede.

Per la messa a punto del metodo sono stati utilizzati tre isolati presenti nell'area della Sicilia maggiormente colpita dalla malattia, di cui uno virulento (SG29) e due blandi (Tapi e TDV) ed uno proveniente dalla Cina (RPC3). Questi sono stati selezionati dopo un'attenta valutazione della risposta fenotipica di una serie di piante indicatrici, utilizzate a livello internazionale, e adeguate analisi molecolari. Questi elementi hanno consentito di riferire gli isolati ai biogruppi 2, 4 e 5 e di definire le relazioni filogenetiche con gli isolati di CTV il cui genoma è stato interamente sequenziato.

In una prima fase, i frammenti genomici di 3 geni (p18, p23, p25) sono stati analizzati mediante CE-SSCP, prima di selezionare, per un'analisi su un numero ampio di campioni, un frammento di 425 bp del gene p18. I risultati ottenuti con CE-SSCP sono stati ulteriormente validati dai dati filogenetici e dall'analisi in silico della reattività all'anticorpo monoclonale MCA-13.

I risultati dimostrano che la separazione dei frammenti a singolo filamento, mediante elettroforesi capillare, consente di ottenere un profilo chiaro e ben definito per ogni isolato. Sebbene l'elettroferogramma ottenuto mediante CE-SSCP abbia un pattern uguale a quello ottenuto con i profili SSCP, essendo il numero di picchi corrispondente a quello delle bande, ha il vantaggio di ottenere una migliore separazione il che consente un'agevole identificazione degli aplotipi.

Il metodo consente di analizzare contemporaneamente più campioni o più geni dal momento che i profili ottenuti simultaneamente nella stessa corsa sono distinguibili per la diversa mobilità dei frammenti e il colore dei fluorofori.

Nella fase di validazione del metodo sono stati analizzati 54 isolati provenienti da aree diverse al fine di valutare i livelli di affidabilità in applicazioni su larga scala. Sulla base dei parametri forniti dall'analizzatore genetico, riferiti alla conformazione spaziale che il frammento analizzato assume riavvolgendosi su se stesso dopo essere stato denaturato e al dato numerico (data point), scaturito dalla migrazione relativa del frammento in relazione alla migrazione standard del ROX 500, gli isolati di CTV provenienti dalla stessa area hanno presentato un elevato livello di similarità dei profili riferibili a possibili cluster.

A confronto con la SSCP convenzionale, la cui sensibilità diminuisce all'aumentare della grandezza del frammento, l'elettroforesi capillare consente l'analisi di frammenti anche superiori a 400 bp; ha una maggiore riproducibilità dovuta alla maggiore accuratezza del controllo della temperatura utile per la selezione della temperatura ottimale alla separazione dei frammenti; è maggiormente riproducibile.

Altri vantaggi includono il confronto con uno standard interno per la normalizzazione della mobilità; una maggiore possibilità di identificare polimorfismi minori che possono risultare da piccole mutazioni; la presenza di un rilevatore a raggio laser per il monitoraggio di differenze nella mobilità di ciascun frammento.

Il sistema offre inoltre la possibilità di settare il software su diverse fluorescenze consentendo di analizzare più geni contemporaneamente, velocizzando l'analisi per la caratterizzazione e l'identificazione degli isolati.

Ancora, tutti gli elettroferogrammi vengono archiviati e gestiti automaticamente dal software annesso alla macchina che li memorizza e li confronta all'occorrenza.

Inoltre non è da sottovalutare l'enorme potenzialità dell'analisi sequenziale ELISA/CE-SSCP per un rapido screening e per il fatto che offre notevoli vantaggi pratici. Permette di evitare l'estrazione dell'RNA permettendo di ottenere un notevole risparmio economico, di tempo e di eliminare l'esposizione degli operatori a sostanze tossiche. In sintesi il metodo permette di associare la rapidità dello screening per il rilevamento di campioni infetti da CTV all'analisi della struttura genetica degli isolati.

Sulla base di quanto esposto si ritiene che il metodo CE-SSCP possa dare un contributo considerevole nella realizzazione di un monitoraggio a tappeto di tutte le aree agrumicole siciliane e del Mediterraneo, consentendo non solo di rilevare le infezioni ma anche di definire i profili di virulenza. Ciò permetterebbe di recuperare il tempo perduto e di fornire dati indispensabili per avviare un nuovo percorso di gestione e controllo della malattia, coerente alle recenti indicazioni della ricerca internazionale. Un'applicazione della tecnica è in atto in Francia per lo studio epidemiologico di *Plum pox virus* (PPV), con risultati positivi (Dallot *et al.*, 2008).

9. Riferimenti bibliografici

- Adams M.J., Accotto G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia M., 2005. Family Flexiviridae. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, London, 1089-1124.
- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., Fauquet C.M., 2004. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives Virology* **149**: 1045-1060.
- Ahlawat Y.S., 1989. Psorosis: a disease of citrus in India. *Indian Phytopathology* **42**: 21-25.
- Albanese G., Schimio R., Fontana A., Ferretti L., Palmeri V., Campolo O., Barba M., 2010. Assessment of *Citrus tristeza virus* incidence in Calabria (southern Italy): results of a three-year survey. *Phytopatologia Mediterranea*, (in press).
- Aubert B., Grisoni M., Villemin M., Rossolin G., 1996. A case study of huanglongbing (greening) control in Réunion. *Proceedings of the 13th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, USA, 276-278.
- Ayllón M. A., Rubio L., Sentandreu V., Moya A., Guerri J., Moreno P. 2006. Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host 588 passage. *Virus Genes* **32**: 119-128.
- Ayllón M.A., Rubio L., Moya A., Guerri J., Moreno P. 1999. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology* **255**: 32-39.
- Ayllón M. A., Satyanarayana T., Gowda S., Dawson W. O. 2005. An atypical 3'-controller element mediates low-level transcription of the p6 subgenomic mRNA of *Citrus tristeza virus*. *Molecular Plant Pathology* **6**: 165-176.
- Barbosa C.J. Pina J.A., Pérez-Panadés J., Bernad L., Serra P., Navarro L., Duran-Vila N., 2005. Mechanical Transmission of Citrus Viroids. *Plant Disease*, 89 (7): 749-754.
- Bar-Joseph M., Garnsey S.M., Gonsalves D., Moscovitz M., Purcifull D.E., Clark M.F., Loebenstein G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **69**: 190-194.
- Bar-Joseph M., Lee R.F. 1989. *Citrus tristeza virus*. *AAB Descriptions of plant Viruses* 353.
- 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., Nitzan Y., 1991. The spread and distribution of *Citrus tristeza virus* isolates in sour orange seedlings. *Proceedings of 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 162-165.
- Bassanezi R.B., Bergamin Filho A., Amorim L., Gimenes-Fernandes N., Gottwald T.R., Bové, J.M., 2003. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology* **9**: 502-512.
- 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. *Proceedings of 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, Riverside, California, USA, 104-111.
- Bernet G.P., Breto M.P., Asins M.J., 2004. Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 592-602.
- Berry S., and C., R.M.E. 2001. Differentiation of cassava-infecting begomoviruses using heteroduplex mobility assays. *Journal of Virological Methods* **92**: 151-163.

- Biswas K.K., Manjunath K.L., Marais L.J., Lee R.F. 2004. Single aphids transmit multiple genotypes of *citrus tristeza virus*, but often with changed population dynamics. *Phytopathology* **94**: S8.
- Boonham N., Smith P., Walsh K., Tame J., Morris J., Spence N., Bennison J., Barker I., 2002. The detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real-time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* **101**: 37-48.
- Bovè J.M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* **88**: 7-37.
- Bové J.M., 2008. Huanglongbing. IOCV Citrus Diseases, <http://www.ivia.es/iocv/>
- Brlansky R. H., Garnsey S.M., Lee R.F., Purcifull D.E., 1984. Application of Citrus tristeza virus antisera in labeled antibody, immunoelectron microscopical, and sodium dodecyl sulphate immunodiffusion tests. *Proceedings of the 9th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 337-342.
- Brlansky R. H., Howd D.S., 2002. Purification of virus-like particles from blight-affected citrus trees. *Proceedings of the 9th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 297-305.
- Broadbent P., Indsto J., Dephoff C., Turner O., 1992. An Outbreak of orange stem pitting in Queensland, Australia. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, **2**: 765-771.
- Bronson C., Gaskalla R., Kessinger M., 2004. Annual report, Florida citrus budwood protection program. Bureau of citrus budwood registration, Winter Haven, FL.
- Brown O. P., Botstein D., 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* supplement **21**: 33-37.
- Cai S.P., Eng B., Kan Y.W., Chui D.H.K., 1991. A rapid and simple electrophoretic method for detection of mutations involving small insertions and deletions: applications to β -thalassemia. *Human Genetics* **87**: 720-728.
- Capoor S.P., Rao D.G., Viwanath S.M., 1967. *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the Greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* **37**: 572-576.
- Capoor S. P., Rao D. G., Viswanath S. M. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama *Proceedings of the 6th Conference International Organization of Citrus Virologists*, Richmond, USA, 43-49.
- Caruso A., Savino V., Davino M., 2003. La tristezza in Italia. Atti: Risultati I anno di attività “Piano agrumicolo nazionale” Acireale, CT, Italia.
- Catara A., 1964. Osservazioni sulla incidenza di alcune virosi in coltivazioni agrumicole della Sicilia orientale e prime realizzazioni per la produzione di materiale vivaistico sano. Estratto da “ Atti su la propagazione delle specie legnose”. Pisa, 26-28 novembre 1964.
- Catara A., 1966. La “Exocortite” degli agrumi in Sicilia. *Tecnica Agricola* **18**: 187-196.
- Catara A., 1968. Un nuovo caso di tristezza ripropone l’urgenza del controllo sanitario delle nostre coltivazioni agrumicole. *Tecnica Agricola* **33**: 49-59.
- Catara A., 1998. La tristezza degli agrumi, una mina vagante per l’agrumicoltura siciliana. Pubblicazione a cura della Provincia Regionale di Catania, 24.

- Catara, A., Davino M., 2006. Il virus della tristezza degli agrumi in Sicilia. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* **68**: 18-23.
- Catara A., Lombardo A., Nobile G., Rizza S., 2007. Characterization of additional citrus tristeza virus isolates in an highly citrus infected area of Sicily. *Proceedings of the 17th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, (in stampa).
- Catara A., Perrotta G., Cartia G., Granata G., 1976. Problemi fitopatologici connessi con l'impiego di portinnesti diversi dall'arancio amaro in Sicilia. Atti dell'incontro frutticolo su "I portinnesti degli alberi da frutto", Società Ortofloricultorale Italiana, Pisa, 249-258. Catara A., Polizzi G., 1999. Il marciume secco delle radici degli agrumi: sintomi, cause e suscettibilità dei portinnesti. *Frutticoltura* **70**: 38-41.
- Catara A., Polizzi G., 1999. Il marciume secco delle radici degli agrumi: sintomi, cause e suscettibilità dei portinnesti. *Frutticoltura*, 70 (1): 38-41.
- Catara A., Rizza S., Tessitori M., 2007. Virus, viroidi e procarioti endogeni degli agrumi. *Tecnica agricola* 1-2.
- Catara A., Scaramuzzi G. 1980. Impietratura. Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of colour slides. Paris, I.R.F.A. SETCO-FRUITES.
- Catara A., Tessitori M., 2006. Problematiche fitosanitarie dell'agrumicoltura italiana dopo la diffusione del virus della "tristezza". *Italus Hortus* **13**: 49-60.
- Cevik B., 1995. Molecular differentiation of strains of *citrus tristeza virus* using the coat protein gene sequences. M.S. Thesis. University of Florida, Gainesville. Fl. Pp 112.
- Chen J., Deng X., Liu S., Pu X., Li H., Civerolo E., 2008. Detection of phytoplasma Candidatus *Liberibacter asiaticus* in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P.R. China. *Phytopathology* **98**: 35.
- Cohen, M., Bové, J.M., 1981. Tristeza, En: Description and a illustration of virus like disease of citrus. A collection of colour slides. SETCO-IRFA, París.
- Coletta Filho H.D., Targon M.L.P.N., Takita M.A., Müller G.W., Santos F.A., Dorta S.O., De Souza A.A., Astúa-Monge G., Freitas-Astúa J., Machado M.A., 2005. Citrus tristeza virus variant associated with citrus sudden death and its specific detection by RT-PCR. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, USA, 499.
- Costa A.S., Muller G.W., 1980. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brasil cooperative success. *Plant Disease* **64**: 538-541.
- da Graça, J. V., Maharaj S. B., 1991. Citrus vein enation virus, a probable luteovirus. *Proceedings of the 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 391-394.
- Dalot S., Boeglin M., Labonne G., 2008. Spatial pattern and genetic structure of ppv-m in a delimited area of stone fruit orchards in southern France. *Acta Horticulture (ISHS)* **781**: 235-242.
- Danks S C., Barker I., 2000. On site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. OEPP/EPPO Bulletin 30: 421-426.
- Davino M., Davino S., Barba M., Caruso A., Guardo M., D'Onghia A., Savino V., 2004. Citrus tristeza virus (CTV): a serious threat to the italian citrus groves. *Proceedings of the International Society of Citriculture* **2**: 790-793.

- Davino, M., Garnsey, S.M., 1984. Purification, characterization and serology of a mild strain of citrus variegation virus from Florida. *Proceedings of the 9th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 196-203.
- Davino M., Russo F., Cartia G., Terranova G., 1983. Nuovi casi di tristezza degli agrumi accertati in Calabria. *Informatore Fitopatologico* **33**: 1-55.
- Davino M., Terranova G., 1999. Il virus della “tristezza degli agrumi” e i criteri di prevenzione e controllo. *Frutticoltura* **61**: 18-25.
- Davino S., Davino M., Sambade A., Guardo M., Caruso A., 2003. The first citrus tristeza virus outbreak in a relevant citrus producing area of Sicily. *Plant Disease* **87**: 314.
- Davino S., Guardo M., Caruso A., Davino M., 2004. Variabilità genetica di isolati di *Citrus tristeza virus* (CTV) riscontrati in Italia negli ultimi 20 anni. *Atti Giornate Fitopatologiche*, **2**: 361-366.
- Davino S., Guardo M., Sorrentino G., Caruso A., Davino M., 2003. Il virus della “tristezza” degli agrumi (CTV) su arancio dolce in Sicilia: grave minaccia per l’agrumicoltura italiana. *Informatore Fitopatologico* **53**: 48-52.
- Davino S., Guardo M., Sorrentino G., Caruso A., Davino M., 2005. Variability among Italian citrus tristeza virus isolates revealed by SSCP analysis, cloning and sequencing. *Proceedings of the 16th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 137-142.
- Delwart L.E., Shpaer G.E., Louwagie J., McCutchan E.F., Grez M., Rubsamen- Waigmann H., Millins J.I., 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 env genes. *Science* **262**: 1257-1261.
- Dodds J.A., Riley K., Polek M. 1996. Effect of suppression by tree removal on the incidence of *Citrus tristeza virus* in California. *Proceedings of 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 168-177.
- Doidge, E. M., 1926. Scaly bark (psorosis) of citrus trees. *Journal of the Department Agriculture Union South Africa* **12**: 61-67.
- D'Onghia A.M., de Marco P., Savino V., 1992. Gravi casi di concavita' gommose su navalina in Puglia. (Severe cases of concave gum on Navalina orange in Apulia). *Informatore Fitopatologico* **3**: 39-41.
- D'Urso, F., Ayllòn, 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.
- Fagoaga C., López C., Moreno P., Navarro L., Flores R., Peña L., 2005. Viral-like symptoms induced by the ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **18**: 435-445.
- Fawcett, H.S., Klotz L.J., 1939. Infectious variegation of citrus. *Phytopathology* **29**: 911-912.
- Febres V.J., Niblett C.L., Lee R.F., Moore G.A., 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with Citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Reports* **21**: 421-428.
- Ferretti L., Fontana A., Schimio R., Sciarroni R., Albanese G., Barba M., 2010. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates in Calabria. *Journal of Plant Pathology* **4** suppl: 561-562.
- Flores R., Hernandez C., Martínez de Alba A.E., Daròs J.A., Di Serio F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 117-139.

- Forner J.B., Pina J.A. 1992. Plantones tolerantes a tristeza: Veinte años de historia (I) Patrones. *Levante Agrícola* **319**: 88-92
- Franke-Whittle I.H., Klammer S.H., Mayrhofer S., Insam H., 2005. Comparison of different labeling methods for the production of labelled target DNA for microarray hybridization. *Journal of Microbiological Methods* **65**: 117-126.
- Fraser, L., 1952. Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural Gazette of N.S. Wales* **63**: 125-131.
- Galipienso L., Navarro L., Ballester-Olmos J. F., Pina J., Moreno P., Guerri J., 2000. Host range and symptomatology of a graft-transmissible pathogen causing budunion crease of citrus on trifoliolate rootstocks. *Plant Pathology* **49**: 308-314.
- Galipienso L., Vives M. C., Moreno P., Milne R. G., Navarro L., Guerri, J., 2001. Partial characterisation of Citrus leaf blotch virus, a new virus from Nagami kumquat. *Archives of Virology* **146**: 357: 368.
- Galipienso L., Vives M. C., Navarro L., Moreno P., Guerri J., 2004. Detection of Citrus leaf blotch virus using digoxigenin-labeled cDNA probes and RT-PCR. *Journal Plant Pathology* **110**: 175-181.
- Garnsey S. M., 1964. Detection of tatter leaf virus of citrus in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society* **77**: 106-109.
- Gandia M., Conesa A., Ancillo G., Gadea J., Forment J., Pallas V., Flores R., Duran-Vila N., Mo-reno P., Guerri J., 2007. Transcriptional response of Citrus aurantifolia to infection by Citrus tristeza virus. *Virology*, **367**: 298-306.
- Garnsey S. M., 1968. Additional non-citrus hosts for the Florida isolate of citrus variegation virus. *Phytopatology* **58**: 1433-1434.
- Garnsey S. M., 1970. Viruses in Florida's Meyer lemon trees and their effects on other citrus. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society* **83**: 66-71.
- Garnsey, S.M., 1975. Purification and properties of citrus leaf rugose virus. *Phytopathology* **65**: 50-57.
- Garnsey S.M., 1988. Vein enation (woody gall). In: Compendium of citrus. 50. American Phytopathological Society, St. Paul, USA
- 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. *Proceedings of the 16th Conference International Organization of Citrus Virologists, IOCV Riverside, CA, USA*, 75-93.
- Garnsey S.M., Gonsalves D., Purcifull D.E., 1977. Mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* **67**: 965-968.
- 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. *Proceedings of the 16th Conference International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA, USA*, 75-93.
- Garnsey S.M., Gottwald T.R., Borbón J.C., 1996. Rapid dissemination of mild isolates of Citrus tristeza virus following introduction of *Toxoptera citricida* in Dominican Republic. *Proceedings of 13th Conference International Organization of Citrus Virologists, Riverside, California, USA*, 92-103.
- Garnsey S.M., Jackson J.L., 1975. A destructive outbreak of tristeza in Central Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **88**: 65-69.

- Garnsey S.M., Permar T.A., Cambra M., Henderson C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). *Proceedings of 12th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 39-50.
- Garnsey S. M., Whidden R., 1973. Efficiency of mechanical inoculation procedures for citrus exocortis viroids. *Plant Disease Report* **57**: 886-889.
- Gillings M., Broadbent P., Indsto J., Lee R.F., 1993. Characterisation of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **44**: 305-317.
- Gimenes-Fernandes N., Bassanezi R.B., 2001. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. *Summa Phytopathology* **27**: 93.
- González C., Gómez M., Fernández M.D., Hernández, Tapia J-L., Batista L., 2007. *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) Behavior and natural enemies in Cuban citriculture. *Proceedings of the 17th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 180.
- González Arias G., Sáenz Díaz M., Jiménez Jiménez S., 2009. Información actualizada sobre los principales aspectos del virus de la leprosis de los cítricos (Citrus Leprosis virus) (CiLV-C). A Current Information of Main Aspects Related with Citrus leprosis virus (CiLV-C). *Fitosanidad* **13**.
- Ghorbel R., López C., Fagoaga C., Moreno P., Navarro L., Flores R., Peña L., 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* 639 p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* **2**: 27-36.
- Gowda S., Satyanarayana T., Davis C.L., Navas Castillo J., Albiach Martí M.R., Marassi 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.
- Grant G.T., Smith P.F., 1960. Infectious variegation of citrus found in Florida. *Plant Disease Report* **44**: 426- 429.
- Grimaldi V., Catara A., 1996. Association of a filamentous virus with yellow vein clearing of lemon. *Proceedings of the 13th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 343-345.
- 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.
- Harju V.A., Skelton A., Clover G.R.G., Ratti C., Boonham N., Henry C.M., Mumford R.A., 2005. The use of real-time RT-PCR (TaqMan(R)) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *Journal Virological Methods* **123**: 73-80.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester Olmos J.F., Pina J.A., 1984. Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (*Homoptera, Aphididae*) in Spain. *Proceeding of 9th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 68-70.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester Olmos J.F., Pina J.A., 1988. Comparative aphid transmission of a common *Citrus tristeza virus* isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. *Proceedings of 10th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 68-70.
- Hermoso de Mendoza A., Pina J. A., Ballester-Olmos J. F., Navarro L., 1993. Persistent transmission of citrus vein enation virus by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*. *Proceedings of 12th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 361-362.
- Hilf M. E., 2008. An immunocapture RT-PCR procedure using Apple stem grooving virus antibodies facilitates analysis of Citrus tatter leaf virus from the original Meyer lemon host. *Plant Disease* **92**: 746-750.

- Hilf M. E., Garnsey S. M., 2000. Characterization and Classification of Citrus Tristeza Virus Isolates by Amplification of Multiple Molecular Markers. *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 18-27.
- Hilf M. E., Garnsey S. M., 2002. *Citrus tristeza virus* in Florida: A synthesis of historical and contemporary biological, serological and genetic data. *Proceedings of 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 13-20.
- 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.
- Hilf M.E., Karasev A.V., Pappu H.R., Gumpf D.J., Niblett C.L., Garnsey S.M., 1995. Characterization of *Citrus Tristeza Virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* **208**: 576-582.
- Hilf M. E., Mavrodieva V.A., Garnsey S.M., 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* **95**: 909-917.
- Huang Z., Rundell P.A., Guan X., Powell C.A., 2004. Detection and isolate differentiation of Citrus tristeza virus in infect field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* **88**: 625-629.
- Inglesias N.G., Riquelme K., Marengo J., Costa N., Plata M.I., Semorile L., 2005. Genetic structure of *Citrus tristeza virus* (CTV) populations from field Argentinian grapefruit isolates. *Proceedings of 16th Conference International Organization of Citrus Virologists*, Monterrey, Mexico, 143-149.
- Ito T. Iwanami T., Ieki H., Shimomura K., Shimizu S., Ito T., 2004. A new virus related to satsuma dwarf virus: nucleotide sequence of the 3'-terminal regions of Hyuganatsu virus RNAs 1 and 2. *Archives Virology* **149**.
- 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.
- Karasev A.V., Hilf M.E., 1997. Molecular biology of the *Citrus tristeza virus*. Filamentous viruses of woody plants. In Monette P. (eds). *Proceedings of Research Signpost*, Trivandrum, India, 121-131.
- Kersting U. Korkmaz S., Çınar A., Ertugrul B., Önelge N., Garnsey S. M., 1996. Citrus chlorotic dwarf: A new whitefly transmitted disease in the east Mediterranean region of Turkey. *Proceedings of 13th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 220-225.
- Koizumi M., 1991. *Citrus tristeza virus* field isolates from declined or dwarfed citrus tree in Japan. *Proceedings of 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 25: 30.
- Korkmaz S., Garnsey S. M., 2000. Citrus chlorotic dwarf. In *Compendium of Citrus Diseases*. 55-56. APS Press. St. Paul, MN.
- Kyriakou A., Loannou N., Gavriel J., Bar-Joseph M., Papayannis C., Kapar-Isaia T., Savva G., 1996. Management of *Citrus tristeza virus* in Cyprus. *Proceedings of 13th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 172-178.
- Li W.B., Pua W.D., Lacava P.M., Qin X., Hartung J.S., 2003. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. *Phytopathology* **93**: 953-958.
- Lin S.S., Hou R.F., Yeh S.D., 2000. Heteroduplex Mobility and Sequence Analyses for assessment of variability of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Phytopathology* **90**: 228-235.

- Lopes S. A., Bertolini E., Frare G. F., Martins E. C., Wulff N. A., Teixeira D. C., Fernandes N. G., Cambra M., 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Ca. Liberibacter asiaticus* in citrus plants. *Phytopathology* **99**: 301-306.
- Lopes S. A., Frare G. F., Bertolini E., Cambra M., Fernandes N. G., Ayres A. J., Marin D. R., Bové J. M. 2009a. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: “*Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, “*Ca. L. americanus* is heat sensitive. *Plant Disease* **93**: 257-262.
- López C., Navas Castillo J., Gowd, 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.
- Lu R., Folimonov A., Shintaku M., Li W. X., Falk B. W., Dawson W. O., Ding S. W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of National Academy Sciences, U S A* **101**: 15742-15747.
- Lukhtanov E.A., Likhov S.G., Gorn V.V., Podyminogin M.A., Mahoney W., 2007. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic Acids Research* **35**: 30.
- Maccheroni W., Alegria M.C., Greggio C.C., Piazza J.P., Kamla R.F., Zacharias P.R.A., Bar-Joseph M., Kitajima E.W., Assumpção L.C., Camarotte G., Cardozo J., Casagrande L.C., Ferrari F., Franco S.F., Giachetto P.F., Girasol Jordão Júnior H., Silva V.H.A., Souza L.C.A., Aguilar-Vildoso C.I., Zanca A.S., Arruda P., Kitajima J.P., Reinach F.C., Ferro J.A., Silva A.C.R., 2005. Identification and genomic characterization of a new virus (*Tymoviridae* Family) associated with citrus sudden death disease. *Journal of Virology* **79**: 3028-3037.
- Maharaj S. B., da Graça J. V., 1989. Transmission of citrus vein enationvirus by *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* **21**: 81-82.
- Marroquín C., Olmos A., Gorris M.T., Bertolini E., Martínez M. C., Carbonell E.A., Hermoso de Mendoza A., Cambra M., 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research* **100**: 101–108.
- Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Duffus J.E., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Murant A., Namba S., Niblett C.L., Vetten H.J., Yoshikawa N., 2000. *Proceedings of the 7th International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA, USA, 943-952.
- Mawassi M., Karasev A.V., Mietkiewska E., Gafny R., Lee R.F., Dawson W.O., Bar-Joseph M., 1995. Defective RNA molecules associated with *Citrus tristeza virus*. *Virology* **208**: 383-387.
- McClellan A.P.D., Oberholzer P.C.J., 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. South Africa Journal of Agricultural Science, 8: 297-298.
- Meneghini M., 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença “Tristeza” dos Citrus. *O Biologico* **12**: 285-287.
- Milne RG, Garcia ML, Grau O, 2000. Genus Ophiovirus. Virus Taxonomy. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 627-631. New York: Academic Press.
- Miyakawa T., Ito T., 2000. Tatter leaf-citrange stunt. In: Compendium of Citrus Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Moreno P., 2003. Situazione mondiale della “tristeza “ e strategie adottate per il suo controllo. *Atti Piano Agrumicolo Nazionale*. Acireale, Catania, ITALIA.
- Moreno P., Ambros S., Albiach-Martí M.R., Guerri J., Pena L., 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* **9**: 251-268.

- Muharam A., Whittle A.M., 1991. Stem pitting strains of *Citrus tristeza virus* in Indonesia. *Proceedings of 11th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 150-155.
- Muller G.W., Costa A.S., 1972. Reduction in the yield of Galego lime avoided by pre-immunization with mild strains of the tristeza virus. In Price, W.C., ed. Univ. Of Florida. *Proceedings of 4th Conference International Organization of Citrus Virologists*, Gainesville, Florida, USA, 171-175.
- Muller G.W., Costa A.S., Castro J.L., Guirado N., 1988. Results from preimmunization test to control the Capao Bonito strain of tristeza. *Proceedings of 13th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 82-85.
- Muller G.W., Costa A.S., Kitajima E.W., Camargo J.B. 1974. Additional evidence that tristeza multipleis in *Passiflora* spp. *Proceedings of the 6th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 75-77.
- Muller G.W., Costa A.S., Castro J.L., Guirado N., 1988. Results from preimmunization test to control the Capao Bonito strain of tristeza. *Proceedings of 10th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 82-85.
- Muller G.W., Garnsey S.M., 1984. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives, and non-rutecous plants to slash-cut mechanical inoculation with *citrus tristeza virus*. *Proceedings of the 8th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 62-65.
- Murphy F. A., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Ghabrial S. A., Jarvis A. W., Martelli G. P., Mayo M. A., Summers M. D., 1995. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology Supplement* **10**: 450-457.
- Navarro L., Pina J. A., Ballester-Olmos J. F., Moreno P., Cambra M., 1984. A new graft transmissible disease found in Nagami kumquat. *Proceedings of 9th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 234-240.
- Niblett C.L., Genc H., Cevik B., Halbert S., Brown L., Nolasco G., Bonacalza B., Manjunath K.L., Febres V.J., Pappu H.R., Lee R.F., 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Research* **71**: 97-106.
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M., 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods* **128**: 151-155.
- Onelge N., Bozan O., Gok M., Satar S., 2007. Yellow vein clearing of lemons in Turkey. *Proceedings of 17th Conference International Organization of Citrus Virologists*, Adana, 176.
- Paek S., Lee S. H., Cho J. H., Kim. Y. S., 2000. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods* **22**: 53-60.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.F., Lee, R.F. 1990. Monoclonal antibody that discriminates strains of Citrus tristeza virus. *Phytopathology*, **80**: 224- 228.
- Reichert I., Hellinger E., 1930. Internal decline. A new physiological disease of citrus fruits in Palestine. *Hadar* **3**: 220-224.
- Reichert I., Perlberger P., 1934. Xyloporosis, the new citrus disease. Agr. Exp. Sta. Rehovoth, *Palestine Bulletin* **12**: 44.
- Reinking O.A., 1919. Diseases of economic plants in southern China. *Philippines Agriculture* **8**: 109-135.
- Rizza S., Lombardo A. Nobile G., Catara A., 2007. Biological and molecular characterization of two additional *Citrus tristeza virus* isolates associated with sour orange inverse pitting rootstock. *Journal of Plant Pathology* **89**: 57.

- Rocha Peña M.A., Lee R.F., 1991. Serological technique for detection of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Virological Methods* **34**: 311-331.
- Rocha Peña M.A., Lee R.F., Lastra R., Niblett C.L., Ochoa Corona F.M., Garnsey S.M., Yokomi R.K. 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricidus*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* **79**: 437-445.
- Roistacher C.N., 1982. A blueprint of disaster I: The history of seedling yellows disease. *California Citrograph* **67**: 48-53.
- Roistacher C. N., 1983. Cachexia disease: Virus or viroid. *Citrograph* **68**: 111-113.
- Roistacher C.N., 1988. Observation on the decline of sweet orange trees in coastal Peru caused by stem pitting tristeza. *FAO Plant Protection Bulletin* **36**: 19-26.
- Roistacher C. N., 1996. The economics of living with citrus diseases: Huanglongbing (greening) in Thailand. *Proceedings of the 13th Conference International Organization of Citrus Virologists*. IOCV Riverside, California, USA, 279-285.
- Roistacher C.N., Bar-Joseph M., 1987. Aphid transmission of *Citrus tristeza virus*: a review. *Phytophylactica* **19**: 163-167.
- Roy A., Ramachandran P., Brlansky R.H., 2003. Grouping and comparison of Indian *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Archives Virology* **148**: 707-722.
- Rubio L., Ayllon M.A., Guerri J., Pappu H.R., Niblett C.L., Moreno P., 1996. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of 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. *Journal of Virology* **75**: 8054-8062.
- 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. *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, CA, USA, 12-17.
- Ruggieri G., 1955. Le arance impietrate. *Rivista di Agricoltura* **1**: 65-69.
- Ruiz-Ruiz S., Moreno P., Guerri J., Ambros S., 2007. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *citrus tristeza virus* in different plant tissues. *Journal of Virological Methods* **145**: 96-105.
- Russo F., 1956. La presenza del virus della tristeza sul limone "Dwarf Meyer" e mandarino "Satsuma" riscontrata in Sicilia. *Rivista di Agricoltura* **1**: 281-289.
- Salomone A., Roggero P., 2001. Development of a rapid diagnostic field test for plant viruses based on lateral-flow immunochromatography. In *Proceedings of the 5° Congresso Nazionale Biotecnologie* l'Aquila, Italy, 160.
- Sambade A., Lòpez C., Rubio L., Flores R., Guerri J., Moreno P., 2003. Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Archives of Virology* **148**: 2325-2340.
- Sambade A., Rubio L., Garnsey S. M., Costa N., Müller G. W., Peyrou M., Guerri J., Moreno P., 2002. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathology* **51**: 257-265.

- Saponari M., Keremane M., Yokomia, R.K., 2008. Quantitative detection of *citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods* **147**: 43–53.
- 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*, in press.
- Satana S., Onelge N., 2009. First report of the transmission of citrus yellow vein clearing by *Aphis craccivora koch*. *Journal of Plant Pathology* **91**: 97-112.
- Satyanarayana T., Gowda S., Mawassi M., Albiach Martí 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**: 253-265
- Sekiya M.E., Lawrence S.D., McCaffery M., Cline K., 1991. Molecular cloning and nucleotide sequences of the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology* **72**: 1013-1020.
- Servazzi O., Marras F., Foddai A., 1967. La presenza del virus della “Tristezza” degli agrumi in Sardegna. Studi Sassari Sez. III, 15: 215-219.
- Sieburth P.J., Nolan K.G., Hilf M.E., Lee R.F., Moreno P., Garnsey S.M., 2005. Discrimination of stem-pitting from other isolates of *Citrus tristeza virus*. *Proceedings of the 16th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 1-10.
- Smith P. F., 1974. History of citrus blight in Florida. *Citrus Industries* **55** (9): 13-14, 16, 18-19; 55(10): 9-10, 13-14.
- Southern E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Molecular Biology* **98**: 503–517.
- Svetlana Y., Folimonova, Alexey S., Folimonov, Satyanarayana T., Dawson W.O., 2008. *Citrus Tristeza Virus*: survival at the Edge of the movement continuum. *Journal of Virology* **82** : 6546–6556.
- Swingle W.T., Webber H.J., 1896. The principal diseases of citrus fruits in Florida. *USDA Division of Vegetable Physiology and Pathology Bulletin*, 8.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Teixeira D.C., Saillard C., Eveillard S., Danet J.L., Ayres A.J., Bové J.M., 2005. “Candidatus Liberibacter americanus”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo state, Brazil. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* **55**: 1857-1862.
- Teixeira D.C., Wulff N.A., Martins E.C., Kitajima E.W., Bassanezi R., Ayres J., Eveillard S., Saillard C., Bové J.M., 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon pea witches’ broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with huanglongbing disease of citrus in the State of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* **98**: 977-984.
- Trabut M., 1913. A note. In *Comptes rendus de l'Académie des sciences, Paris* **156**: 243-244.
- Vaira A.M., Accotto G.P., Gago-Zachert S., Garcia M.L., Grau O., Milne R.G., Morikawa T., Natsuaki T., Torok V., Verbeek M., Vetten H.J., 2005. Genus Ophiovirus. In *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 673-679. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- 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.
- Van Vuuren S.P., Van der Vyver J.B., Luttig M., 2000. Diversity among sub-isolates of cross-protecting *Citrus tristeza virus* isolates in South Africa. *Proceedings of the 14th Conference International Organization of Citrus Virologists*, IOCV Riverside, California, USA, 103-109.

- Vela C., Cambra M., Cortés E., Moreno P., Miguét J.G., Pérez de San Román C., Sanz A., 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of Virology* **67**: 91-96.
- Vives M. C., Rubio L., Galipienso L., Navarro L., Moreno P., Guerri J., 2002. Low genetic variation between isolates of Citrus leaf blotch virus from different host species and different geographical origins. *Journal General Virology* **83**: 2587-2591.
- Vogel R., Bové J.M., 1964. Stem pitting sur bigaradier et sur oranger tarocco en Corse: une maladie à virus. *Fruits* **19**: 269-274.
- Vogel R., Bové J.M., 1980. Cristacortis. In Description and illustration of virus and viruslike diseases of citrus. A collection of colour slides and text. Paris, I.R.F.A. SETCO-FRUITTS.
- Wallace J. M., Drake R. J., 1953. A virus induced vein enation in citrus. *Citrus Leaves* **33**: 22-24.
- Wallace J. M., Drake R. J., 1962. Tatter leaf, a previously undescribed virus effect on citrus. *Plant Disease Report* **46**: 211-212.
- Whiteside J.O., Garnsey S.M., Timmer L.W., 1988. Compendium of citrus diseases. 80. APS Press, USA,
- Wittwer C. T., Reed G. H., Gundry C. N., Vandersteen J. G., Pryor R. J., 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC Green. *Clinical Chemistry* **49**: 853–860.
- Yamada S., Sawamura K., 1952. Studies on the dwarf disease of Satsuma orange, Citrus unshiu Marcovitch (Preliminary report). *Horticultural Division of Tokai Kinki Agricultural Experiment Station Bulletin* **1**: 61-71.
- Yamamoto P.T., Teixeira D.C., Martins E.C., Santos M.A., Felipe M.R., Garbim L.F., Carmo A.U., Abrahao D.P., Souza M.C., Bové J.M., 2006. Detection of Candidatus Liberibacter americanus and asiaticus in Diaphorina citri Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Proceedings of Huanglongbing-Greening International Workshop*, Ribeirão Preto 87.
- Yang Z.N., Mathews D.M., 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.
- Yang G., Mawassi M., Gofman R., Gafny R., Bar-Joseph M., 1997. Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective citrus tristeza virus molecules. *Journal Virology* **71**: 9800–9802.
- Yokomi R.K., Lastra R., Stoetzel M.B., Damsteegt V.D., Lee R.F., Garnsey S.M., Gottwald T.R., Rocha Peña M., Niblett C.L., 1994. Establishment of the brown citrus aphid (*Homoptera, Aphididae*) in Central America and the Caribbean Basin and Transmission of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Economical Entomology* **87**: 1078-1085.
- Yokomi R.K., Tang Y.Q., 1996. A survey of parasitoids of brown citrus aphid (*Homoptera, Aphididae*) in Puerto Rico. *Biological Control* **6**: 222-225.
- 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.