

TECNOLOGIE A SUPPORTO DELLA GESTIONE DEL VIRUS DELLA TRISTEZZA DEGLI AGRUMI (CTV) IN "ZONE D'INSEDIAMENTO"¹

A. BERTUCCIO, M. TOMASELLO, S. FASSARI, A. CATARA
Laboratorio di diagnosi e biotecnologie fitosanitarie,
Parco Scientifico e Tecnologico della Sicilia,
Z.I. Blocco Palma I, via V. Lancia, 57, 05121 Catania
acatara@pstsicilia.it

RIASSUNTO

Citrus tristeza virus (CTV) è oggetto di un decreto di lotta obbligatoria che prevede l'estirpazione delle piante infette. Tale misura potrebbe provocare gravi danni all'economia di quelle aree in cui non è più possibile eradicare il virus (zone di insediamento). Per valutare possibili soluzioni alternative, è stata monitorata l'evoluzione della malattia nel corso di sei anni in una parcella di piante di arancio "Sanguinello" innestate su arancio amaro, tutte infette dall'isolato CTV-SY. L'appezzamento è stato monitorato in remoto attraverso immagini da satellite (Google Earth), osservazioni visive e saggi di laboratorio mediante CE-SSCP. Nel 2008 le piante sono state potate e, a distanza di tre anni, hanno mostrato una eccellente ripresa vegeto-produttiva. Il profilo CE-SSCP non ha subito alcuna modificazione. I risultati mettono in luce i vantaggi offerti dalle nuove tecnologie d'indagine per i servizi fitosanitari e per la gestione della malattia in aree in cui non è più possibile l'eradicazione del virus e suscitano perplessità sulla validità attuale delle norme contenute nel decreto di lotta obbligatoria.

Parole chiave: *Citrus tristeza virus*, agrumi, monitoraggio, immagini da satellite

SUMMARY

TECHNOLOGIES TO SUPPORT THE MANAGEMENT OF CITRUS TRISTEZA VIRUS IN A "SETTLEMENT AREA"

Citrus tristeza virus (CTV) is subjected to a decree for the compulsory eradication of infected plants. A measure that may cause serious damage to the economy of those areas where it is not possible anymore to eradicate the virus. To assess alternatives solutions the disease has been monitored over six years in a plot of Sanguinello sweet orange grafted on sour orange infected with a CTV-SY isolate. The monitoring has been carried out in remote via satellite images (Google Earth), visual observations, and laboratory tests of the CE-SSCP profile. In 2008 the plants were pruned and, after three years, show a good vegetative-productive recovery. The CE-SSCP profile has not revealed any modification. The results highlight the advantages offered by new technologies for plant protection services and for the management of the disease in citrus areas where its eradication is not possible, and give rise some doubts on the validity of the current rules on mandatory control of CTV.

Keywords: *Citrus tristeza virus*, citrus, monitoring, satellite image

¹ Lavoro eseguito nell'ambito del Progetto "Lotta al virus della tristezza degli agrumi" finanziato dall'Assessorato delle Risorse Agricole ed Agroalimentari della Regione Siciliana, cofinanziato dall'Ue.

INTRODUZIONE

Citrus tristeza virus (CTV) è un patogeno da quarantena, inserito nella lista EPPO (D'Anna e Schilirò, 1999). Segnalato in Italia dal 1953 (Catara *et al.*, 2008), per parecchi anni è stato sporadicamente rilevato solo su cultivar di agrumi importate da Paesi terzi.; soltanto negli ultimi anni ha assunto una elevata diffusione. Nel 1996, uniformandosi all'orientamento del tempo dei principali Paesi produttori l'allora Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste ha emesso un decreto di lotta obbligatoria (D.M. 22 novembre 1996) che prevede l'estirpazione delle piante infette, a prescindere dall'aggressività dell'isolato del virus, o di tutto l'agrumeto nel caso in cui le infezioni interessano oltre il 30% delle piante. Quel provvedimento ha consentito al nostro Paese di mantenere fino al 2006 lo status di "zona protetta", successivamente revocato in seguito alla diffusione del virus².

Già a quel tempo (1996) isolati del virus ad elevato potenziale distruttivo erano stati descritti in diversi Paesi. Alcuni (CTV-SP) attaccano direttamente il nesto, causando forme variamente gravi di butteratura del legno (stem pitting), deperimento delle piante, produzione modesta e di qualità scadente, indipendentemente dalla suscettibilità del portainnesto. Altri sono responsabili di deperimenti nelle combinazioni di innesto arancio dolce/arancio amaro (CTVdecline) e giallumi (seedling yellows) su semenzali di arancio amaro, pompelmo e limone (CTV-SY), i cui esiti negativi possono essere eliminati o mitigati con l'uso di portinnesti tolleranti o resistenti (citrange, citrumelo, arancio trifogliato, mandarino Cleopatra e altri). Molto spesso le infezioni sono dovute a miscele di isolati con diversa virulenza, la cui manifestazione fenotipica varia con le piante ospiti e le condizioni ambientali. Non mancano infine isolati in grado di superare la resistenza di arancio trifogliato o dei citrange (Catara *et al.*, 2008).

In Italia, sono prevalentemente presenti due tipi di isolati riferibili ai biotipi 1 (blando) e 4 (aggressivo); un terzo isolato, riferibile al biotipo 3, è stato rilevato solo sporadicamente. Il biotipo 4 possiede un genotipo MMM del tipo T3+VT o T30+T3 e presenta un'omologia di sequenza dei geni p23, p20, p18 e p25 prossima al 99% con le sequenze nucleotidiche finora caratterizzate degli isolati C271-2 dell'Argentina, Barao B-6 e Val-23-4 del Brasile e, tra gli isolati completamente sequenziati, con l'isolato spagnolo T318 e con l'SY568 descritto in California (Catara *et al.*, 2010; Yahiaoui *et al.*, 2011; Raspagliesi *et al.*, 2011). Essendo stato descritto originariamente in Spagna (Roistacher e Moreno, 1991), secondo la legislazione UE si tratta di un ceppo europeo e, nonostante la gravità dei sintomi indotti, non dovrebbe essere oggetto di alcuna misura di eradicazione. In Italia, tuttavia, essendo in vigore il Decreto sopra citato si rende obbligatorio abbattere tutti gli agrumeti con oltre il 30% di piante infette. Anzi, dovrebbero essere abbattuti anche gli agrumeti infetti da isolati blandi di CTV. E' ovvio che l'attuazione della norma provocherebbe gravi danni economici non soltanto ai singoli produttori ma ad un intero settore portante dell'economia del mezzogiorno. Si ricorda anche che la normativa europea e i comportamenti degli altri Paesi hanno largamente superato il concetto di eradicazione e hanno messo a punto strategie per convivere con la malattia.

Indagini effettuate in Sicilia hanno messo in evidenza che circa 20.000 dei 90.000 ettari di agrumi coltivati sono infetti da CTV, in alcune aree con intensità tale da escludere ogni possibilità di eradicazione del virus. Si ha motivo di ritenere che situazioni non dissimili siano pre-

² Tale prerogativa hanno mantenuto Portogallo (ad eccezione di Madeira), Grecia, Malta e Corsica secondo il Regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione del 4 luglio 2008 e il regolamento n° 436/2011 del 5 Maggio 2011 relativo al riconoscimento di zone protette esposte a particolari rischi in campo fitosanitario nella Comunità.

senti anche in altre regioni agrumicole. Esistono, pertanto, le condizioni per definire quelle aree vere e proprie “zone di insediamento del virus”. In altri Paesi (California, Florida) la decisione se estirpare o meno le piante infette è lasciata ai produttori e avviene in base alla redditività della coltivazione, fatto salvo l’obbligo di non movimentare materiale vegetale verso aree indenni. E’ compito del Servizio fitopatologico far rispettare il divieto e monitorare l’eventuale comparsa di ceppi più aggressivi in quanto ciò potrebbe esporre a rischio non solo l’azienda interessata ma anche quelle vicine e creare pregiudizio per l’intera agrumicoltura.

Su questa base nel 2005 è stata avviata una sperimentazione in un agrumeto di circa 40 anni di età, gravemente infetto da CTV-SY, al fine di monitorare l’evoluzione della malattia, la diffusione del virus, gli interventi utili per rallentare/mitigare gli effetti dell’infezione e prolungare la redditività dell’impianto utilizzando alcuni supporti tecnologici utili per rendere più efficiente e documentata l’attività di monitoraggio.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione ha riguardato un’azienda in prossimità di Catania (37° 28’ 12,03” N e 14° 54’ 58,90” E), nel cuore di un’area agrumicola ad elevata incidenza della malattia (Catara e Davino, 2006). Attraverso immagini satellitari (Google Earth) e un’attenta ricognizione dei luoghi è stata individuata una parcella di circa due ettari, costituita da piante di arancio “Sanguinello” innestate su arancio amaro poste a dimora da circa 40 anni al sesto di m 5x5, con gravi sintomi di deperimento. Essa è ubicata all’interno di un più ampio appezzamento coevo di circa 6 ettari con terreno palesemente limo-argilloso e giacitura leggermente declive. All’inizio della sperimentazione le piante dell’appezzamento presentavano una struttura arborea ben sviluppata, mentre quelle localizzate nella parte più bassa mostravano deperimenti accentuati per il periodico verificarsi di condizioni di anossia radicale. Alcune di esse presentavano rami defogliati (figura 1B) e un’evidente alveolatura sulla faccia cambiale della corteccia di arancio amaro, al di sotto della linea d’innesto (alveolatura inversa) alla quale corrispondevano minute estroflessioni a carico del legno (figura 1C-D). Poiché tale sintomo è un aspetto distintivo delle infezioni di CTV (Catara, 1968), e inoltre un campione di 10 piante con gravi forme di deperimento era risultato infetto da CTV-SY, si è deciso di studiare l’evoluzione della malattia nell’impianto a partire dal 2002, attraverso immagini Google Earth.

In conseguenza del dilagare delle infezioni in diversi appezzamenti l’azienda decideva pertanto di avviare un programma di estirpazione e reimpianto cominciando dagli appezzamenti del tutto improduttivi e di ritardare l’estirpazione nell’appezzamento di arancio Sanguinello, limitandosi ad eseguire minimi interventi colturali. Nel corso degli anni tale appezzamento è stato monitorato in remoto attraverso immagini da satellite e mediante sopralluoghi per verificare l’evoluzione della malattia e individuare i siti per campionamenti supplementari. Nel 2008 si decise di tentare, a mero titolo sperimentale, il recupero di 12 piante eseguendo una drastica potatura, lasciando solamente l’impalcatura principale. Constatata la buona ripresa vegetativa di tali piante, nella primavera del 2011 l’intervento è stato esteso a tutto l’appezzamento.

Fra il 2005 e il 2011 tutte le piante dell’appezzamento sono state saggiate più volte per CTV mediante test ELISA, utilizzando il kit ELISA Ingezim CTV (Ingenasa, Spagna). La successiva caratterizzazione degli isolati del virus è stata effettuata mediante analisi del polimorfismo della conformazione dei singoli filamenti con elettroforesi capillare (CE-SSCP) (Raspagliesi *et al.*, 2011). I profili elettroforetici ottenuti sono stati archiviati e confrontati nei diversi anni. Alcune piante sono state anche saggiate su semenzali di lima messicana, arancio amaro, pompelmo Duncan, e su piante bimembri di arancio dolce/arancio amaro, secondo i metodi convenzionali (Catara *et al.*, 2010).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi delle immagini da satellite ha permesso di rilevare l'evoluzione dei deperimenti di singole piante già dal 2002 e di identificare alcune zone di terreno soggette a ristagno idrico, dove i deperimenti erano già rilevabili da satellite. Le analisi chimiche hanno messo in evidenza che il terreno presenta un contenuto di argilla e limo superiore al 50%, pH 8,1, basso tenore di calcare, e buone disponibilità di azoto, fosforo assimilabile e potassio scambiabile. Alcune piante deperite, mostravano sintomi di anossia radicale, altre avevano esiti di infezioni di *Phytophthora* sp. Tenuto conto che l'infezione di CTV provoca lo sfaldamento delle radici era difficile discriminare il ruolo dei diversi fattori di stress. Risultava piuttosto ipotizzabile che la presenza di più concause avesse aggravato nel tempo la situazione complessiva. Le condizioni edafiche del sito avevano inizialmente favorito uno sviluppo rapido delle piante, seguito da un arresto nelle aree in cui l'abitabilità per le radici risultava ridotta. Le successive infezioni ad opera di CTV e di *Phytophthora* sp. hanno reso il quadro fitopatologico più complesso, a causa dei marciumi delle radici.

I saggi biologici e molecolari hanno permesso di accertare che tutte le piante dell'appezzamento sono infette da un isolato di CTV-SY, noto per la sua particolare virulenza (Roistacher e Moreno, 1991). Tuttavia, i saggi sulla serie di piante indicatrici hanno messo in evidenza che l'isolato siciliano non induce sintomi di butteratura del legno sull'indicatrice arancio dolce/arancio amaro, che del resto sono tuttora assenti anche sulle piante di arancio Sanguinello in campo. Una leggera butteratura, osservata solamente su pompelmo Duncan, conferma che l'isolato di CTV appartiene al biotipo 4. I profili CE-SSCP (figura 1E) non hanno mostrato modificazioni nel corso degli anni, mettendo in evidenza che non sono stati introdotti nuovi isolati del virus e che non sono avvenute modificazioni rilevabili nel genotipo.

A distanza di sei anni dall'accertamento dell'infezione, le piante di arancio Sanguinello/arancio amaro infette da CTV-SY, ma non da *Phytophthora*, non hanno aggravato la loro condizione sotto l'aspetto fenotipico. Ciò lascia supporre che l'infezione di CTV sia avvenuta in epoca relativamente recente, probabilmente da circa 10 anni, in piante completamente sviluppate, e che in considerazione della struttura ormai raggiunta dalle piante l'evoluzione della malattia non sia stata rapida e il decorso sia ben diverso da quello che si registra nel caso di infezioni in vivaio o nelle prime fasi dell'impianto.

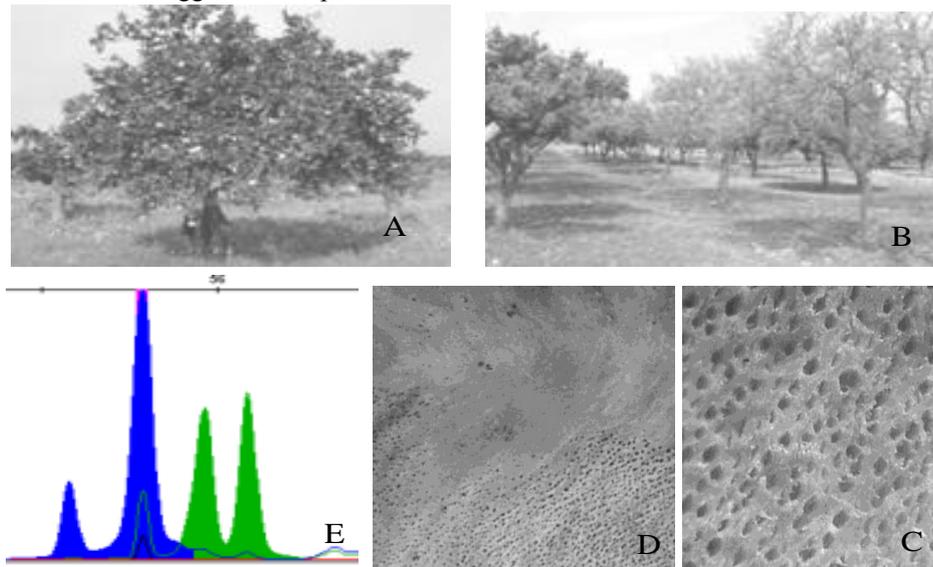
A distanza di tre anni dagli interventi di potatura effettuati le piante presentano un eccellente vigore vegetativo, una buona colorazione delle foglie e un elevato numero di frutti (figura 1 A). Il volume della chioma ha superato i 3 metri di diametro. Quelle potate nella primavera del 2011 hanno ripreso un colore normale e lasciano prevedere una normale fruttificazione per il prossimo anno, come rilevabile anche dalle immagini su Google Earth.

CONCLUSIONI

L'uso di immagini satellitari disponibili su Google Earth ha permesso di effettuare un accurato studio sull'evoluzione della malattia nel lungo periodo e di archiviare una documentazione preziosa per future osservazioni sullo stato dei luoghi nell'appezzamento preso in considerazione e nel territorio a contorno. La georeferenziazione di singole piante ha permesso di indirizzare e semplificare la scelta dei campioni da saggiare e di ottenere informazioni puntuali sull'evoluzione del quadro fitosanitario. Applicata su ampia scala potrebbe consentire di mappare le aree ancora indenni, quelle con un numero limitato di piante infette (zone focolaio) quelle in cui il virus è largamente diffuso (zone di insediamento). Tale delimitazione si rende necessaria anche per indirizzare gli interventi sul territorio e per non crea-

re discriminazioni tra le attività svolte nei territori già oggetto di monitoraggio e le aree non ancora monitorate, ritenute pertanto “indenni”, talvolta indebitamente.

Figura 1. A) Pianta di arancio Sanguinello infetta da CTV SY, tre anni dopo la drastica potatura. B) Aspetto delle piante nel 2005, al momento dell'accertamento delle infezioni di CTV. C e D) Alveolatura della faccia cambiale della corteccia di arancio amaro al di sotto della linea d'innesto. E) Profilo CE SSCP sul gene p23 dei due filamenti dell'isolato di CTV SY accertato nell'area oggetto della sperimentazione



La caratterizzazione CE-SSCP dell'isolato di CTV ha consentito di confrontare agevolmente i profili di migrazione dei singoli filamenti, documentando l'assenza di modificazioni dell'isolato medesimo. La tecnologia risponde all'esigenza di documentazione, abbinando all'accuratezza e speditezza del metodo SSCP la creazione di un catalogo/archivio di profili del virus.

Un impiego diffuso di entrambe le tecnologie potrebbe consentire un monitoraggio più puntuale del territorio non solamente in relazione all'uso del suolo ma anche quale supporto alle decisioni da intraprendere relativamente alla ordinaria gestione agronomica, ma anche al monitoraggio di epidemie, all'evoluzione di scenari fitosanitari.

I Paesi che hanno una lunga esperienza di CTV hanno abbandonato l'idea di condurre una lotta senza quartiere per eradicare la malattia ed hanno adottato una strategia basata sulla convivenza con CTV, assumendo posizioni differenti a seconda che si tratti di “zone focolario” o “zone di insediamento” del virus. Tale orientamento scaturisce dall'aver sperimentato che allorché piante innestate su arancio amaro cominciano a mostrare sintomi di deperimento da CTV non c'è alcun trattamento che possa arrestarne la sua diffusione, pertanto le azioni da intraprendere sono guidate ad una valutazione economica (Brlansky *et al.*, 2011). Gli incoraggianti risultati riportati, ancorché preliminari, sembrano confermare la validità della scelta.

Non è da sottovalutare l'ipotesi che anche nel nostro Paese la rimozione delle piante infette debba essere limitata alle zone focolaio, mentre nelle zone di insediamento la rimozione possa essere rinviata finché la produzione delle singole piante o dell'intero appezzamento raggiunga livelli non redditivi. Condizione irrinunciabile è che le piante siano rimpiazzate con piante certificate innestate su portinnesti tolleranti. Ma ciò è possibile solo attraverso un vivaismo attento e responsabile e un Servizio fitosanitario attrezzato e organizzato, nei quali si spera ormai da anni.

Le tecnologie qui utilizzate, unitamente a quelle convenzionali, potrebbero essere funzionali ad una gestione controllata delle zone di insediamento del virus, consentendo al Servizio fitosanitario di monitorare l'area di interesse e di fornire ai produttori maggiori informazioni sulle scelte tecniche da operare. In tal modo sarebbe possibile prolungare la vita economica degli impianti, difendendo il reddito dei produttori, e consentire tempi ragionevolmente adeguati per la modificazione auspicata per la nostra agrumicoltura, ancora per l'80% innestata su arancio amaro, e magari dare più tempo alla ricerca per mettere in atto strategie oggi allo studio in vari Paesi agrumicoli incluso il nostro.

LAVORI CITATI

- Brlansky R.H., Hilf M.E., Siebourn P. J., Dawson W.O., Roberts P.D., Timmer L.W., 2011. Citrus pest management guide. University of Florida, IFAS Extension, 181
- 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., Davino M., 2006. Il virus della tristezza degli agrumi in Sicilia. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, 68, 18-23.
- Catara A., Barbagallo S., Saponari M., 2008. Il caso "tristezza" degli agrumi. I georgofili, Quaderni 2007-VI, "Globalizzazione e difesa delle colture", Edizione Polistampa, Firenze, 123-138.
- Catara A., Lombardo A., Nobile G., Rizza S., 2010. Characterization of additional *Citrus tristeza virus* isolates in a highly infected citrus area of Sicily. *Proc.17th Conference IOCV*, IOCV Riverside, CA, USA, 80-83.
- D'Anna R., Schilirò E., 1999. Il virus della Tristezza degli agrumi nel quadro della normativa fitosanitaria. *Informatore Fitopatologico*, 3, 35-38.
- Raspagliesi D., Licciardello G., Rizza S., Lombardo A., Catara A. 2011. Quick characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphism. *Acta Horticulturae* 892,183-188.
- Roistacher C.N., Moreno P., 1991. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus*. *Proc.11th Conference IOCV*, IOCV Riverside, CA, USA, 7-19
- Yahiaoui D., Djelouah K., D'Onghia A.M., Catara A., 2011. Genetic diversity of Mediterranean *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA populations. *European Journal of Plant Pathology* (in corso di stampa).