

Problematiche fitosanitarie dell'agrumicoltura italiana dopo la diffusione del virus della "tristeza"

Antonino Catara e Matilde Tessitori*

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie, Università di Catania, Via S. Sofia 100, 95123 Catania

Ricevuto 28 dicembre 2005; accettato 10 gennaio 2006

Phytosanitary condition of the Italian citrus industry after the diffusion of Citrus Tristeza virus

Abstract. *Citrus tristeza virus* (CTV), an aphid-borne closterovirus, is the casual agent of the most important citrus disease all around the world. Due to different foci of CTV signalled in South Italy, recently an EU Directive ruled out Italy from protected zones for CTV. The phytosanitary situation needs a new evaluation of control measures for CTV and a broad regulation strategy. This paper reviews the characteristics of citrus tristeza disease, as well as biological, serological and genomic properties of the causal virus and the available control strategies in different cases of epidemics. Harmful citrus pathogens, included in the directive 2002/89/EU (recently applied in Italy by DL n. 214 of 24.10.2005) and in EPPO lists of quarantine pests, such as variegated chlorosis, huanglongbing, stubborn, witches' broom, satsuma dwarf virus, leprosis, tatter leaf, blight, sudden death, are also discussed.

Key words: citrus, *Citrus tristeza virus*, virus vectors, other harmful organisms.

Introduzione

Malattie degli agrumi causate da virus e da agenti virus-simili sono presenti da molto tempo in Italia (Scaramuzzi *et al.*, 1986; Albanese *et al.*, 1994; Tessitori e La Rosa, 2002). Poiché la loro diffusione avviene attraverso materiale di propagazione, l'adozione di schemi di selezione e di certificazione sanitaria ne ha consentito la progressiva scomparsa nei nuovi impianti. La recente improvvisa diffusione del virus della tristeza (*Citrus tristeza virus*, CTV) in forma epidemica, ha aperto nuovi scenari e suscita alcune riflessioni sulle problematiche fitosanitarie dell'agrumicoltura, un settore produttivo con una superficie di oltre 170.000 Ha ed una produzione di circa 30 milioni di quintali, con 400 Ha di vivai che producono

annualmente ben cinque milioni di piante (1,5 per impianti commerciali e 3,5 per usi ornamentali). Il problema principale è legato al fatto che il portinnesto utilizzato, l'arancio amaro (98%), a fronte di valide caratteristiche agronomiche e fitosanitarie, fra cui la tolleranza a *Phytophthora* spp., ai viroidi e ad altri patogeni virus simili, presenta la più elevata suscettibilità al virus. Il nuovo problema ha, pertanto, un impatto socio-economico di portata eccezionale. In altri paesi, dove la diffusione del virus ha creato problematiche simili, ricerche approfondite sono oggetto di numerose pubblicazioni relative agli aspetti biologici, epidemiologici e molecolari del virus della tristeza (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Rocha-Pena *et al.*, 1995; Garnsey *et al.*, 1998; Timmer *et al.*, 2000), che comprendono una vasta bibliografia su argomenti specifici alla quale si rimanda per gli approfondimenti.

È inoltre da considerare che falliti gli obiettivi perseguiti dal decreto di lotta obbligatoria contro il virus della tristeza (DM del 22.11.1996), l'Italia è stata esclusa dall'elenco delle zone protette per CTV (Direttiva 2005/18/CE del 2 marzo 2005), e che l'esperienza maturata in altri paesi ammonisce che altri patogeni e parassiti, non tutti elencati nella direttiva 2002/89/CE, potenzialmente nocivi per la nostra agrumicoltura, sono in agguato. Il tema, già affrontato in passato, si è arricchito negli ultimi anni di nuove conoscenze e competenze che consentono di valutare meglio i rischi e di mettere in atto le corrette norme di prevenzione. In tale prospettiva, sono discussi i problemi più pressanti ed esaminate le possibili soluzioni.

La situazione in Italia: retrospettiva e attualità

A partire dalla prima segnalazione (Russo, 1956), per circa 50 anni i reperimenti ufficiali di CTV in Italia hanno fatto riferimento a materiale di propagazione o piante introdotte da paesi terzi, prontamente eliminati (Davino *et al.*, 1983). Recentemente, tuttavia, la moltiplicazione incontrollata di alcune fonti introdotte clandestinamente ha innescato un processo

*mtessitori@unict.it

di diffusione del virus attraverso vettori che ha amplificato problematiche finora sconosciute.

Nel 2001 la presenza del virus fu accertata a Siracusa e in Basilicata, in agrumeti con evidenti sintomi di deperimento e, in seguito, in altre aree agrumicole della Sicilia ed in Puglia (Davino *et al.*, 2003) con percentuali d'infezione fino al 46%. Recentemente un nuovo focolaio è stato rinvenuto in Calabria. Conseguentemente, la Commissione Europea, con direttiva 2005/18/CE, ha revocato il riconoscimento all'Italia di "zona protetta" per CTV. Un'opportunità difesa per anni ma sprecata per il mancato rispetto delle regole e per l'inadeguatezza degli investimenti nel settore fitosanitario.

L'incidenza della malattia è molto variegata con differenze significative per specie, cultivar e aree di coltivazione. Le evidenze raccolte lasciano ritenere probabile che le infezioni traggano origine prevalentemente da fonti infette. Infatti, alcune cultivar o singoli cloni mostrano percentuali d'infezione elevate mentre altri sono interessati solo in modo occasionale. Nei primi focolai localizzati sono state riscontrate infezioni dal 10 al 50% e talvolta del 100%. Allontanandosi da tale areali le percentuali d'infezione sono entro limiti accettabili (inferiori all'1%). I dati disponibili, tuttavia, vanno letti con prudenza, dal momento che necessitano di un adeguato trattamento di normalizzazione. Nessuna delle indagini fin qui esperite nelle varie regioni agrumicole ha accertato sintomi di butteratura del legno, notoriamente causati da ceppi *stem pitting* di CTV, né le estroflessioni puntiformi del legno (*inverse pitting*), su portinnesto arancio amaro, a cui corrispondono minutissimi forellini nella faccia cambiale della corteccia, che caratterizzano le infezioni da alcuni isolati di CTV che determinano deperimento. Da rilevare, tuttavia, che questi ultimi sintomi sono stati osservati in piante di pompelmo e arancio Navelina e dei mandarini Satsuma e Fortune.

Il clonaggio ed il sequenziamento del cDNA del gene p20 di CTV hanno permesso di identificare un isolato (Tarocco) simile all'isolato CTV-SY568-California, mentre altri due (Fortune e Navelina) sono simili al T385 spagnolo (Davino *et al.*, 2005). Pertanto, è verosimile che le introduzioni del materiale di propagazione infetto siano da riferire a fonti e, possibilmente, ad aree geografiche diverse.

Caratteristiche biologiche e genomiche degli isolati di CTV

Il nome della malattia, originariamente "tristeza", risale agli anni trenta e fotografa il deperimento delle

piante di agrumi a seguito della introduzione e diffusione della malattia in Argentina e Brasile; in altri paesi prese il nome di "decline", "quick decline", "tristeza". L'associazione della malattia ad un agente di tipo virale, trasmissibile da insetti vettori, fu dimostrata nel 1946. La purificazione e la visualizzazione delle particelle avvenne negli anni '70 e spianò la strada alla caratterizzazione del virus del giallume della bietola (*Beet yellows virus*, BYV) ed alla definizione del gruppo dei *Closterovirus*. Solo dopo molti anni, si arrivò alla sua caratterizzazione completa (Karasev *et al.*, 1995).

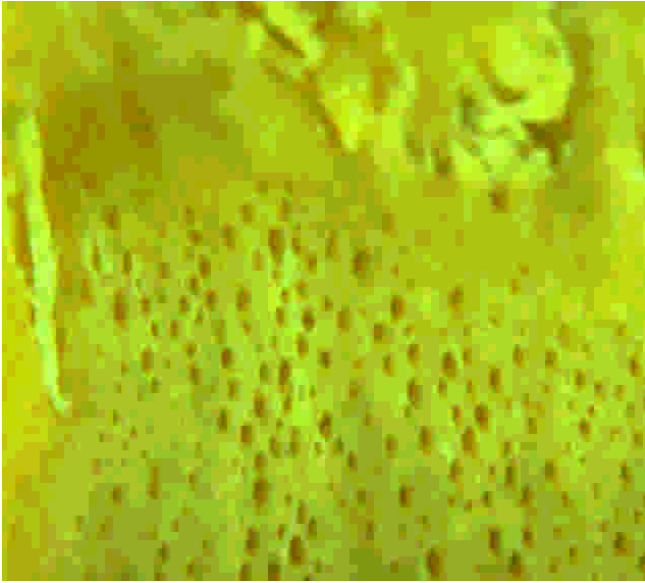
CTV causa due distinte malattie economicamente importanti: il deperimento cronico (*decline*, D) o rapido (*quick decline*, QD) delle piante innestate su arancio amaro (Garnsey *et al.*, 1998; Bar-Joseph *et al.*, 2002) e la butteratura dei rami (*stem pitting*, SP) su limette, pompelmo e arancio dolce. Una terza sindrome, denominata giallume dei semenzali (*seedling yellows*, SY), si osserva, per lo più in condizioni sperimentali, su semenzali di arancio amaro, limone e pompelmo.

Nel caso di piante innestate su arancio amaro il deperimento è causato da necrosi del floema, appena al di sotto della linea d'innesto (fig. 1), riduzione del flusso dei carboidrati dalla chioma alle radici, mancata emissione di peli radicali e progressivo deperimento della chioma. Gli effetti negativi sulla produzione rendono necessaria la sostituzione delle piante già dopo poco tempo dalla comparsa dei sintomi. Nel caso di QD, il deperimento è in genere veloce e la malattia porta a morte le piante in uno o due anni dall'infezione.

La butteratura dei rami produce caratteristiche depressioni a carico del legno di molte cultivar e portinnesti, a causa di un'anomala differenziazione delle cellule cambiali (fig. 2). La vita degli alberi affetti da SP non supera i 15 anni. Molte cultivar presentano riduzione della taglia delle piante, frutti di pezzatura ridotta e qualità scadente (fig. 3). Le limette e il pompelmo sono altamente suscettibili; l'arancio dolce è suscettibile solo ad alcuni isolati.

Citrus tristeza virus è membro del genere dei *Closterovirus* (dal greco *kloster* = fuso, filo), famiglia *Closteroviridae*. È un virus filamentoso con particelle lunghe circa 2000 nm, con due proteine capsidiche (CP e CPm) che coprono rispettivamente il 95 ed il 5% delle particelle (fig. 5). Gli studi genomici su CTV presero avvio solo dopo la caratterizzazione molecolare di BYV, membro tipo del genere dei *Closterovirus* in cui CTV fu inserito.

Il genoma di CTV è ad RNA a singolo filamento (positive strand), con circa 19.226-19.296 nucleotidi e



1



2



3



4

Fig. 1 - Alveolatura sulla faccia interna della corteccia di arancio amaro in pianta infetta da CTV-QD. Si noti l'assenza di sintomi sulla porzione superiore corrispondente al nesto.

Fig. 1 - Pinholing, or honeycombing, in the inner face of bark of sour orange in tree infected by CTV-QD. Notice absence of symptom on portion corresponding to the scion.

Fig. 2 - Butteratura su rami di arancio dolce causati da CTV-SP in Brasile.

Fig. 2 - Stem pitting of sweet orange limb infected by CTV-SP in Brazil.

Fig. 3 - Grave deperimento di pianta di arancio dolce innestata su *Citrus macrophylla* a seguito di infezione naturale di CTV-SP.

Fig. 3 - Severe decline of a plant of sweet orange on *Citrus macrophylla* due to natural infection of CTV-SP.

Fig. 4 - Suberificazione delle nervature in foglie di pompelmo Duncan inoculato sperimentalmente con isolati di CTV in saggio biologico.

Fig. 4 - Corky veins in leaves of Duncan grapefruit experimentally inoculated with CTV isolates in bioassay.

12 ORF (*open reading frame*) che codificano almeno 19 proteine, alcune delle quali a funzione ancora non nota (Rubio *et al.*, 2001). La sequenza genetica completa è stata ottenuta per diversi isolati: T36, T30, 3800 e T2K in Florida (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995; Albiach-Martì *et al.*, 2000; Manjunath *et*

al., 2004), VT in Isreale (Mawassi *et al.*, 1996), SY568 in California (Yang *et al.*, 1999), T385 e T318A in Spagna (Vives *et al.*, 1999; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2004), NUagA in Giappone (Suastika *et al.*, 2001) e Qaha in Egitto. Sequenze parziali di molti altri isolati sono note in bibliografia e disponibili in GenBank

che registra più di 20.000 accessioni tra cui EST (*Expressed Sequence Tags*), varianti e proteine di risposta.

Le piante infette da CTV contengono anche un RNA subgenomico (Hilf et al., 1995) e degli RNA difettivi (D-RNAs) (Ayllòn et al., 1999; Mawassi et al., 1995a; 1995b), risultato di delezioni interne dell'RNA genomico (Yang et al., 1999). Peraltro, le popolazioni di CTV presentano un elevato livello di eterogeneità (Rubio et al., 1996) e durante i processi di inoculazione in un nuovo ospite e di trasmissione per afidi subiscono modificazioni significative (D'Urso et al., 2000).

Per tali caratteri di eterogeneità e di variabilità, la definizione delle strategie di controllo richiede la conoscenza del comportamento biologico dei vari isolati presenti che, non può essere sostituita dall'analisi di parti del genoma ma richiede il supporto di un'adeguata caratterizzazione biologica (Ballester-Olmos et al., 1993), per accertare la virulenza dei ceppi, la suscettibilità degli ospiti, la concentrazione minima necessaria per l'induzione dei sintomi (fig. 4).

La replicazione del virus è ottimale a 21°C e si riduce con il progredire delle temperature con conseguente influenza sulla distribuzione e concentrazione del virus negli organi da sottoporre ad analisi. L'accertamento della sua presenza nelle piante durante i mesi estivi può risultare talvolta incerta e rende necessaria l'adozione di attente procedure di campionamento e diagnosi.

Vettori

Toxoptera citricidus e *Aphis gossypii*, che sono i due vettori principali di CTV in campo, presentano diversa efficienza, piante ospiti e distribuzione geografica. *T. citricidus* (afide bruno) è il più efficiente ed è comune in molti paesi agrumicoli dell'emisfero australe. Solo di recente è stato segnalato il suo arrivo in Europa (Portogallo) (EPPO, 2004) e in Spagna. Gli agrumi sono gli ospiti primari. Anche *A. gossypii* può trasmettere CTV con alta efficienza, per quanto inferiore a quella dell'afide bruno. È diffuso in tutti i paesi del mondo ed è polifago prediligendo, tra l'altro, anche ospiti non rutacei. Due biotipi di *A. gossypii* (melone e cotone) sembrano avere diversa efficienza nella trasmissione di CTV (Yokomi et al., 2004).

Toxoptera aurantii, strettamente correlato a *T. citricidus*, ha una più ampia diffusione mondiale, ma, forse anche a causa del suo vasto gruppo di piante ospiti, non è vettore efficiente di CTV. Sono, infatti, pochi i casi di trasmissione ad opera di questa specie, peraltro in con-

dizioni sperimentali, con un'efficienza di circa 0-6% (Cambra et al., 2000). Si ricorda, anche, *Aphis spiraeicola* ad efficienza di trasmissione simile a *T. aurantii*.

Alcuni autori hanno ipotizzato che la diversa efficienza dei vettori di CTV dipenda dalla loro attrazione verso alcune specie e cultivar (Rodríguez et al., 2004); altri attribuiscono maggiore importanza alla concentrazione del virus nelle piante ospiti.

In Italia, le esperienze nel settore sono modeste essendo limitate ad alcuni tentativi di trasmissione sperimentale di isolati rinvenuti localmente (o introdotti con finalità scientifiche) e, più recentemente, ad osservazioni sulla diffusione del virus in condizioni naturali. Nel caso del primo rinvenimento di focolai in Calabria le piante limitrofe a quelle infette risultarono sane e i tentativi di trasmissione con afidi dei ceppi di CTV isolati nel tempo diedero esito negativo (Cartia et al., 1980). Davino e Patti (1985), tuttavia, in successive prove di trasmissione con afidi, riportarono di aver trasmesso l'isolato di CTV della Calabria, tramite *A. spiraeicola* ma non con *A. gossypii*, *A. fabae*, *Myzus persicae* e *T. aurantii*.

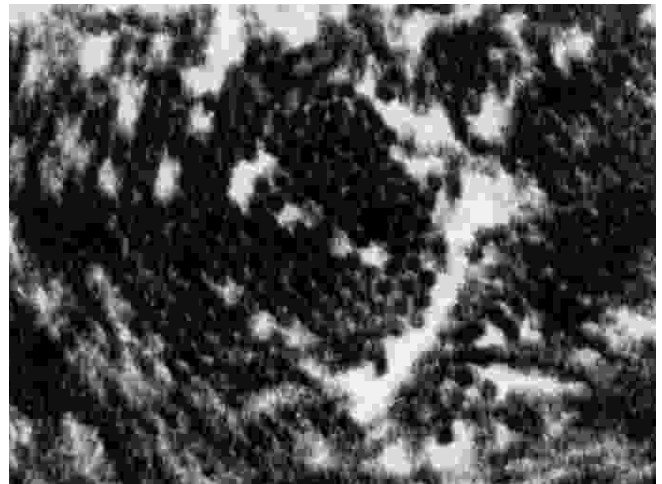
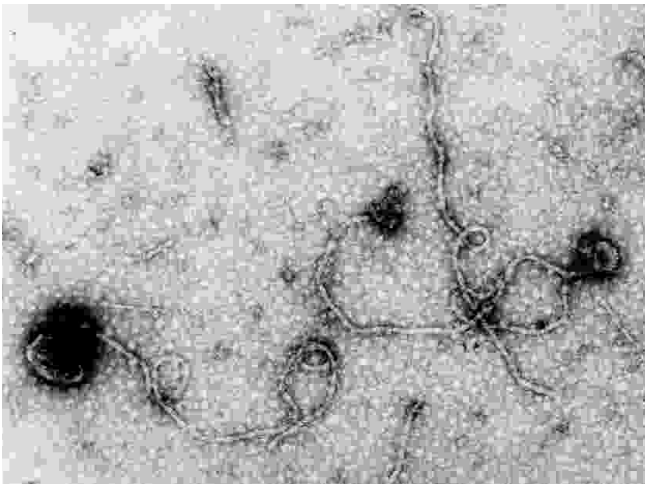
Le indagini sono diventate più numerose negli anni recenti, a seguito del rinvenimento di focolai d'infezione ed hanno permesso di accertare che nelle aree ad elevata incidenza della malattia, la velocità di diffusione del virus in campo varia tra il 2 ed il 5,7% in due anni (Davino et al., 2004).

Modelli matematici definiti sulla base dei dati delle epidemie in Spagna e Florida hanno permesso di ipotizzare che in presenza di *A. gossypii*, in assenza di *stem pitting* e di *T. citricidus*, la malattia evolva dal 5% di incidenza a livelli del 95% nel giro di 8-15 anni. In presenza di *T. citricidus* l'incremento avviene in circa 2-4 anni (Garnsey et al., 1998).

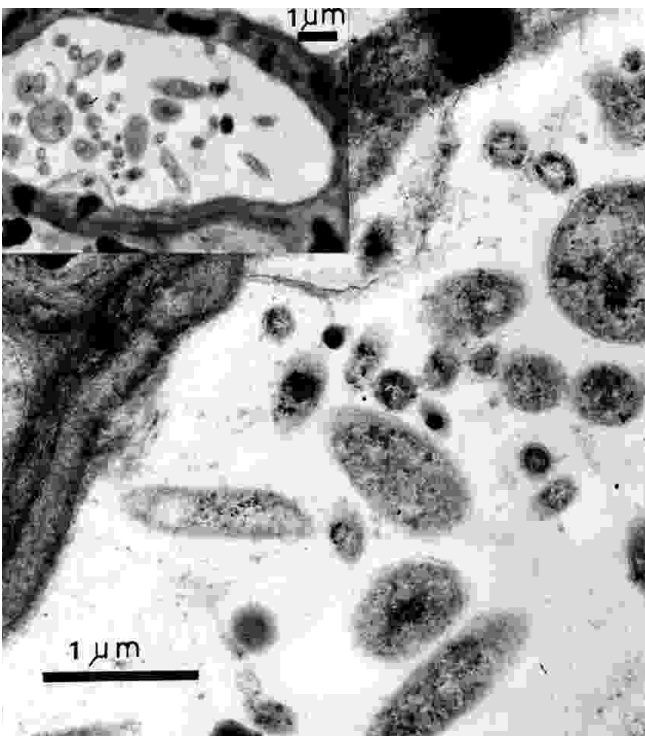
Possibili strategie di controllo

L'esperienza di altri paesi agrumicoli dimostra che l'epidemiologia della malattia è molto complessa e che il contenimento di CTV è problematico, perché complesso è il "patosistema tristezza": ceppi del virus, talvolta presenti in miscela nei diversi isolati; vettori a diversa efficienza e capaci di selezionare le componenti degli isolati presenti nella pianta; diversa suscettibilità di specie, varietà e portinnesti di agrumi; condizioni ambientali differenti.

Solo la conoscenza dei singoli fattori del patosistema e della sua evoluzione può portare all'elaborazione di una strategia di controllo dinamica, che permetta la riduzione del danno economico e la prevenzione di quadri di malattia più gravi.



5



6



7

Fig. 4 - Filamenti flessuosi di particelle del virus della tristezza (CTV, *Citrus tristeza virus*) in colorazione negativa (a sinistra) e particelle di CTV in sezione trasversale all'interno di una cellula in foglie di agrumi (a destra).

Fig. 4 - Flexuosus filaments of tristeza virus particles (CTV, *Citrus tristeza virus*) in negative staining (on the left) and cross section of particles in a citrus leaf cell (on the right).

Fig. 6 - Tubo cribroso con particelle di *Candidatus Liberobacter*

spp. di agrumi affetti da huanglongbing (greening).

Fig. 6 - *Candidatus Liberobacter* spp. in a sieve tube of citrus affected by huanglongbing (greening).

Fig. 7 - Cellule a forma di elica di *Spiroplasma citri*, agente eziologico dello stubborn degli agrumi, all'interno di un tubo cribroso.

Fig. 7 - Helical cells of *Spiroplasma citri* etiological agent of citrus stubborn, in a sieve tube.

Le strategie variano in base all'incidenza e gravità degli isolati del virus, alle cultivar e portinnesti di agrumi, ai vettori presenti. Dove l'arancio amaro è diffuso la minaccia più grave è il deperimento (QD) ma non mancano i timori per l'introduzione di ceppi

di CTV-SP, che inducono malattia anche nel caso di portinnesti tolleranti. Se l'incidenza della malattia è bassa e la diffusione tramite vettori è limitata, programmi efficienti di certificazione e quarantena, accoppiati ad eradicazione, possono risultare adeguati.

Se CTV è endemico e la diffusione tramite vettori è elevata, gli interventi dovranno necessariamente mirare a contenere le perdite di produzione.

In zone dove CTV è assente, un ruolo strategico assume l'esclusione di materiale infetto dal territorio. Ciò trova difficoltà oggettive nella delimitazione e monitoraggio delle aree virus esenti e nelle misure di controllo da applicare sul materiale di propagazione. L'esperienza dimostra che la continua ricerca di nuove cultivar spesso finisce per favorire l'introduzione e la distribuzione di materiale di propagazione non certificato. Nel caso di cultivar tolleranti a CTV, o asintomatiche, il rischio è maggiore poiché in assenza di sintomi la diffusione del materiale di propagazione avviene più rapidamente.

Se CTV è presente in aree limitate, l'approccio più efficace è rappresentato dall'eradicazione delle fonti di inoculo. Le probabilità di successo dipendono dal numero di piante infette e dell'ampiezza dei focolai presenti nel territorio. In presenza di vettori, le possibilità di successo si riducono ed il costo del programma di eradicazione aumenta, fino a poter diventare superiore al danno atteso. Pertanto, il programma di respiro pluriennale dovrà essere inserito in un piano operativo articolato che consenta di mantenere l'incidenza della malattia a livelli bassi, con un bilancio dei costi/benefici favorevole. Esso presuppone un monitoraggio efficace e continuo, effettuato su areali contigui e sufficientemente estesi, su campioni rappresentativi (per quantità e per qualità) e con il supporto della caratterizzazione biologica e molecolare dei ceppi individuati. In presenza di ceppi di CTV a diversa virulenza potrebbe risultare economicamente valida la soppressione dei ceppi più gravi.

La riconversione degli impianti colpiti con portinnesti tolleranti permette l'abbassamento delle perdite per gli agricoltori, fatte salve le misure da adottare per prevenire l'insorgere di altre malattie e problemi fitosanitari (Garnsey, 2000; Tessitori e Catara, 2006).

Numerosi sono i portinnesti tolleranti a singoli ceppi di CTV-QD in combinazione con arancio, pompelmo, mandarino, ma solo *Poncirus trifoliata* appare immune a più ceppi del virus. Tra i più utilizzati sono i suoi ibridi (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) come citrange Troyer, Carrizo, C35 e C32, il citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) (Garnsey *et al.*, 1998). Il mandarino Cleopatra (*C. reshni*), mandarino Sunki (*C. sunki*), limone rugoso (*C. jambhiri*), limone volkameriano (*C. volkameriana*), limetta di Rangpur (*C. limonia*) sono utilizzati in alcuni paesi in particolari condizioni. La scelta segue vari criteri tra cui l'adattabilità ai terreni, la compatibilità con la specie e la cultivar,

ma anche usi locali. Tra i paesi ad agrumicoltura più intensiva in Spagna e California prevale il citrange, in Florida il citrumelo Swingle, in Texas l'arancio amaro (Reforgiato Recupero, 2003).

In presenza di *T. citricidus*, in aree dove CTV-QD è diffuso, lo scopo principale degli interventi deve mirare a prevenire (o limitare) le perdite economiche, evitando l'introduzione di altri ceppi e in modo particolare CTV-SP. Quindi, oltre all'uso di portinnesti tolleranti, sarà necessario dare la preferenza a varietà meno suscettibili a CTV-SP.

Il controllo dei vettori, durante le fasi di intensa attività vegetativa, anche se di difficile attuazione, potrebbe integrare strategie di prevenzione mirate a contenere la carica di inoculo.

Protezione incrociata con ceppi blandi di CTV-SP

Nelle aree in cui sono diffusi ceppi CTV-SP la protezione incrociata con ceppi blandi del virus può dare buoni risultati. Si tratta di una tecnica che risale ai primi eventi epidemici di CTV-SP, allorché i vivaisti selezionavano varietà apparentemente tolleranti, poi risultate infette da ceppi blandi del virus. Oggi è usata come strategia di controllo nelle aree dove è diffuso CTV-SP ed è presente l'afide bruno (*T. citricidus*). Non essendo disponibili cultivar di pompelmo, limetta e arancio dolce tolleranti, essa è l'unica modalità di difesa che ha permesso di ridurre i danni economici causati da CTV-SP in Sud Africa, Australia ed in Brasile.

Allo scopo si utilizzano isolati blandi, valutati e testati contro i ceppi più diffusi, sulla base delle performance produttive e della risposta sintomatologica indotta. Tali ceppi sono quindi utilizzati per inoculare i portinnesti in vivaio, prima o contemporaneamente all'innesto. In Sud Africa il programma di certificazione prescrive, tra l'altro, l'uso di marze così trattate.

A livello teorico, l'uso della protezione incrociata appare la migliore strategia di prevenzione in aree dove la malattia è presente ma non assume una diffusione rilevante (Rocha-Pena *et al.*, 1995). La capacità di protezione dei ceppi blandi deve essere valutata nelle singole cultivar e contro tutti gli isolati di CTV-SP. Un isolato considerato blando su arancio dolce potrebbe non risultare tale su altre specie o varietà o un isolato considerato blando in Sud Africa non è detto che agisca allo stesso modo in un altro areale. "Blando" è sicuramente un concetto relativo e può assumere valore diverso nei vari paesi e per le varie cultivar.

Tra le caratteristiche richieste ad un ceppo blando è che sia dissimile da quelli verso cui dovrà esplicare la protezione. Poiché CTV è spesso presente nelle piante come miscele di ceppi differenti le potenzialità e i limiti di questa pratica risultano evidenti. Tra l'altro, occorre tener presente che l'effetto di protezione non è permanente ma potrebbe venire meno in zone ad alta pressione di inoculo. L'ampia letteratura sull'argomento registra numerosi casi di successo (Müller e Costa, 1987; Broadbent *et al.*, 1991; Van Vureen *et al.*, 1991; Dekkers e Lee, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2002), ma anche alcuni casi di insuccesso (Roistacher e Dodds, 1993; Gottwald *et al.*, 2002; van der Vyver *et al.*, 2002).

Alla luce di tali risultati, la protezione incrociata trova valore "commerciale" in quanto riesce sicuramente ad allungare il ciclo di vita produttiva delle piante, anche se non rappresenta un rimedio permanente per SP (Rocha-Pena *et al.*, 1995). Essa è consigliata in aree dove CTV-SP è già diffuso e pertanto il rischio di diffusione di nuovi ceppi appare economicamente accettabile.

Nel caso di ceppi CTV-QD i tentativi esperiti hanno messo in evidenza risultati scadenti ad eccezione di alcune esperienze con ceppi di SY ed SP precedentemente inoculati attraverso *Passiflora* spp. (Roistacher e Bar-Joseph, 1987). In prospettiva, gli studi sull'identità e sull'organizzazione genomica dei diversi ceppi lasciano sperare di poter ottenere isolati blandi, non trasmissibili da vettori (Niblett *et al.*, 1993). L'uso di ceppi di questo tipo sarebbe di più facile applicazione rispetto alla produzione di piante transgeniche tolleranti o resistenti, che mostrano maggiore complessità nella produzione e valutazione in campo.

Nuove possibilità di successo della protezione incrociata sono state prospettate a seguito della scoperta di RNAs difettivi associati alle infezioni di CTV (Mawassi *et al.*, 1995; Batuman *et al.*, 2004a, b).

Utilizzo di risorse genetiche per l'induzione di resistenza a CTV

Sulla base delle conoscenze attuali molti autori concordano nel ritenere che la soluzione a lungo termine del problema CTV sia l'ottenimento di cultivar immuni o altamente resistenti al virus. Grandi sforzi sono stati fatti utilizzando tecniche convenzionali di miglioramento genetico, ibridazione somatica ed ingegneria genetica. Diversi progetti di ricerca tendono ad ottenere ibridi che esprimano i geni di immunità del

Poncirus trifoliata e caratteristiche agronomiche soddisfacenti. Obiettivo non facile e di lungo termine, in quanto gli ibridi necessitano molti anni per perdere le caratteristiche giovanili e fruttificare.

L'uso dell'ingegneria genetica appare alternativa valida e diverse cultivar di agrumi sono state trasformate con il gene della proteina capsidica di CTV (Domínguez *et al.*, 2000). Altri geni, oggi disponibili potrebbero, in base all'esperienza derivata da altre colture, essere utili ad aumentare la tolleranza di alcune cultivar.

Tentativi recenti di applicazione dell'RMR (RNA mediated resistance) a limetta messicana per la resistenza a CTV si sono dimostrati non efficaci (Domínguez *et al.*, 2002). Risultati preliminari interessanti sono stati ottenuti, invece, trasferendo geni di resistenza di *P. trifoliata* in piante di agrumi e tabacco (Roose *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2004) ma la valutazione delle piante trasformate richiede del tempo.

Altri organismi gravemente pericolosi

Se l'avvento della "tristeza" nel nostro Paese rappresenta un complesso problema, non va sottovalutato che l'arrivo di altre gravi malattie degli agrumi tramite materiale di propagazione infetto e/o di vettori di patogeni già presenti sarebbe devastante. Decisivo sarà in proposito il rispetto del recente Decreto Legge n. 214 del 19 agosto 2005 (GU n. 248 del 24.10.2005) di attuazione della direttiva 2002/89/CE, concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali, di cui non è nota la presenza nel territorio comunitario. Fra essi sono gli insetti *Diaphorina citri* e *Trioza erytreae* (vettori dello huanglongbing) e *T. citricidus* nonché i non bene identificati "agenti della diffusione naturale della psorosi"; gli agenti dello huanglongbing e della variegatura clorotica, la leprosi, il virus del satsuma dwarf, il virus del tatter leaf, gli scopazzi (witches' broom), gli isolati non europei di CTV. In altra sezione l'allegato riporta alcuni organismi presenti in Europa ma di cui si auspica di impedire la diffusione. Fra essi sono gli isolati europei di CTV, *Spiroplasma citri* (agente dello stubborn) e i vettori *Circulifer haematocaps* e *C. tenellus*. Non sono invece riportati il blight ed il *citrus sudden death* che risultano presenti nelle liste di attenzione dell'EPPO (rispettivamente A1 ed alert list).

Di seguito, si riportano le notizie principali relativamente alla pericolosità e al quadro sintomatico di tali malattie descritte nel *Compendium of citrus diseases*

(Timmer *et al.*, 2000), al quale si rinvia per la letteratura antecedente all'anno 2000.

Variegatura clorotica

La variegatura clorotica (*Citrus variegated chlorosis*, CVC), oggi uno dei più importanti fattori limitanti la coltivazione dell'arancio dolce in Sud America, fu descritta per la prima volta nel 1984 in Brasile e successivamente in Argentina e Paraguay.

I sintomi principali, localizzati su una branca o diffusi su tutta la chioma, sono a carico delle foglie che presentano clorosi internervale, macchie brune nella pagina inferiore in corrispondenza di clorosi nella pagina superiore. Nelle fasi iniziali essi sono simili a quelli da carenza di zinco. Le piante sono di taglia ridotta e i frutti di pezzatura notevolmente inferiore, sono duri e acidi, e invaiano precocemente. La malattia è raramente letale, ma le piante diventano presto improduttive (Ayres *et al.*, 2002).

La variegatura clorotica colpisce la maggior parte delle specie e cultivar di agrumi ma l'arancio dolce appare il più suscettibile mentre pompelmo, mandarini e limette mostrano sintomi meno gravi. La lima di Rangpur, i limoni ed il cedro sono tolleranti.

L'agente eziologico della variegatura clorotica è un batterio fastidioso limitato al floema, *Xylella fastidiosa*, di cui si conoscono anche ceppi specializzati responsabili di altre malattie quali la *Pierce's disease* della vite.

X. fastidiosa è trasmissibile per innesto, anche se con efficienza variabile a causa della sua distribuzione irregolare nei tessuti delle piante infette, almeno nelle prime fasi della malattia. Altra forma di trasmissione, anche se poco efficiente (da 1,3 a 11,7%) è quella tramite insetti delle famiglie dei Cicadellidi e Cercopidi (Krügner *et al.*, 1998). In Brasile, è stata accertata una progressione delle infezioni in campo fra il 6,41% al 24,40% in sei anni (Ayres *et al.*, 2002).

Huanglongbing

Lo "huanglongbing" (HLB), è una malattia molto distruttiva, probabilmente originatasi in Cina, dove la sua trasmissibilità per innesto fu accertata già nel 1956. In Africa è nota come "greening", a Taiwan come "likubin", nelle Filippine come "leaf mottling".

La forma africana della malattia mostra sintomi con temperature di 20-25°C mentre la forma asiatica predilige temperature intorno ai 35°C. La sintomatologia e le piante ospiti sono identici per i due ceppi: emissione di foglie di colore giallo o con maculature clorotiche localizzate, ingiallimento di tutta la chioma, defogliazione e disseccamento dei rami. Le piante affette in forma cronica mostrano anche sintomi

fogliari simili a carenza di zinco. I frutti sono piccoli, ovali e di colore verde persistente (da qui il nome "greening") con semi abortiti e di gusto amaro.

Fino al 1970 HLB era attribuita ad un agente virale ma oggi è noto che l'agente eziologico è un batterio (*-Proteobacteria*) limitato al floema e non coltivabile *in vitro* (Jagoueix *et al.*, 1996) di cui si conoscono due specie: *Candidatus Liberobacter africanus*, tipico dei climi più temperati e *Candidatus Liberobacter asiaticus* tollerante al caldo (fig. 6). Più di recente sono state individuate anche una specie (o sottospecie) in Sud Africa e una *americanus* in Brasile (Teixeira *et al.*, 2004).

HLB può infettare tutte le specie e cultivar di agrumi, gli ibridi e alcune specie correlate. L'arancio dolce, il mandarino e i suoi ibridi sono quelli più gravemente colpiti.

L'agente patogeno è trasmesso per innesto e da due specie di Psillidi nello stadio di adulto. *Trioza erytreae* - presente in Africa, Yemen, Madagascar e Reunion - è responsabile della trasmissione della specie *africanus*, non tollera i climi secchi e caldi ed è specifico degli agrumi. L'altro vettore, *Diaphorina citri*, è diffuso in Asia e Sudest asiatico, India, Arabia, Centro America e di recente è stato segnalato in Florida e Iran. Anche questa specie predilige le Rutaceae.

Stubborn

Questa malattia assume importanza in zone a clima caldo secco tra cui California, Nord Africa, est del Bacino del Mediterraneo e Medio Oriente. In Israele è nota come *little leaf*.

Agente della malattia è lo *Spiroplasma citri*, un mollicute specie-tipo del genere *Spiroplasma* che include circa 40 specie. Ha forma elicoidale, può essere coltivato *in vitro*, è trasmesso per innesto (Catara e La Rosa, 1998) (fig. 7). La diffusione naturale di questo patogeno avviene a opera di cicaline come *Scaphytopius nitridus* e *Circulifer tenellus* negli Stati Uniti. Nel Mediterraneo *C. haematoceps* e *C. tenellus* sono i vettori più efficienti (Bovè *et al.*, 2002).

Lo stubborn è raramente letale ma in genere le piante mostrano taglia ridotta. La chioma è densa con internodi corti. Le foglie sono ispessite, ripiegate a coppa e con frequenti pattern di clorosi simili a carenze nutrizionali. La fioritura irregolare da luogo a frutti fuori stagione. Tipico è il ritardo di colorazione nella zona dell'apice stilare dei frutti e l'aborto dei semi. La sintomatologia è più evidente con alte temperature (30-35°C).

Molte specie e varietà di agrumi sono suscettibili allo stubborn, così come un vasto gruppo di specie

erbacee non appartenenti al genere *Citrus*, circa 18 famiglie tra mono e dicotiledoni.

Scopazzi (witches' broom)

È una grave malattia delle limette osservata inizialmente in Oman e negli Emirati Arabi. È segnalata anche in Iran (Salehi *et al.*, 2002). L'agente causale è un fitoplasma, il *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*, che è stato trasmesso sperimentalmente ad un vasto gruppo di agrumi. Su specie suscettibili il sintomo principale è quello tipico di scopazzi su uno o più rami con foglie molto piccole che disseccano. Le piante affette muoiono in circa 4-5 anni.

L'agente causale è trasmesso per innesto ma la replicazione del patogeno e l'espressione dei sintomi richiedono temperature di circa 30°C. Si assume che *Hishimonus phycitis*, una cicalina molto diffusa negli agrumeti affetti da scopazzi, abbia un ruolo nella trasmissione in campo.

Tatter leaf

La malattia, causata da *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), fu descritta intorno al 1962 negli Stati Uniti in piante di limone Meyer infette in forma latente introdotte dalla Cina. È presente anche in Giappone. Su piante di arancio dolce, pompelmo, mandarino e limone innestate su *P. trifoliata* e suoi ibridi determina riduzione di taglia e la tipica disaffinità di innesto. Un'altra malattia, originariamente denominata nanismo del citrange, è oggi ritenuta probabilmente determinata dallo stesso CTLV. L'arancio amaro è tollerante.

Leprosi

La leprosi degli agrumi induce tipiche macchie necrotiche su foglie, rametti e frutti. Le lesioni sui rami possono confluire dando una desquamazione tipo psorosi. È causata da un virus, non completamente caratterizzato e simile a *Rhabdovirus* non incapsidati, trasmesso da acari piatti del genere *Brevipalpus* (*B. phoenicis*, *B. californicus*, *B. obovatus*). Provoca gravi danni economici in Sud America ed, in particolare, in Brasile. È segnalata in Florida. L'ospite più suscettibile alla leprosi è l'arancio dolce; mandarini e arancio amaro mostrano sintomi molto meno gravi.

Satsuma dwarf

Il nanismo del satsuma, causato da *Satsuma dwarf virus* (SDV), fu descritta per la prima volta in Giappone nel 1952 dove esistono ancora diversi focolai. Una malattia simile è presente in Corea, Cina e Turchia, probabilmente introdotta tramite marze infette. Per quanto poco dannosa, la malattia desta preoc-

cupazione per l'ipotizzata trasmissione ad opera di vettori del terreno. A SDV sono collegate, a costituire il "gruppo del Satsuma dwarf virus", altre sindromi degli agrumi presenti in Giappone causate da *Citrus mosaic virus* (CiMV), *Natsudaidai dwarf virus* (NDV) e *Navel infectious mottling virus* (NIMV). Solo SDV e CiMV sono inclusi nel DL n. 214. SDV ha numerose piante ospiti tra gli agrumi ed altre specie. Nelle specie più suscettibili, quali il mandarino Satsuma, determina forte riduzione di taglia e foglie inarcate a cucchiaio.

Blight

Il *blight* degli agrumi, originariamente noto come *young tree decline*, è presente in Florida da circa 100 anni, anche se la malattia ha raggiunto forme epidemiche gravi solo a seguito dell'introduzione del limone rugoso, portinnesto tollerante a CTV, in sostituzione dell'arancio amaro. Oggi è presente in Brasile, Argentina, Venezuela, Sud Africa e Australia, ma appare assente nel Bacino del Mediterraneo ed in California (Bransky e Howd, 2002). Circa 900.000 piante affette da *blight* sono eradicte annualmente.

I sintomi della malattia si notano in piante di 6-10 anni, e consistono nel progressivo deperimento della chioma, foglie decolorate e di piccole dimensioni, morte dei nuovi getti. L'emissione della vegetazione e la fioritura sono ritardate. I frutti, di dimensioni e forma normale, sono in numero notevolmente inferiore e mostrano acidità elevata. Al progredire della malattia, le radici principali e il capillizio radicale muoiono causando la morte della pianta.

Il *blight* colpisce tutte le principali cultivar di agrumi, quale che sia il portinnesto. L'arancio amaro ed il citrumelo Swingle mostrano maggiore tolleranza, mentre il limone rugoso, l'arancio trifogliato e il citrange Carrizo sono più suscettibili.

L'agente eziologico è tuttora ignoto. Da piante affette da *blight* è stato isolato un virus ma il suo ruolo nel determinismo della malattia è ancora da provare (Bransky e Howd, 2002).

Citrus sudden death

Il *Citrus sudden death* (CSD) è una malattia, di recente segnalata in Brasile su arancio dolce innestato su lima di Rangpur, che porta le piante a morte nel giro di circa 6 mesi dalla comparsa dei primi sintomi (Romàn *et al.*, 2004). Le foglie ed i rametti disseccano, mentre i frutti restano attaccati alla pianta. Alla linea d'innesto il cambio mostra ingiallimenti a carico del portinnesto ma nessuna disaffinità.

Alcune manifestazioni sintomatiche e le modalità di diffusione della malattia (Bassanezi *et al.*, 2004)

hanno fatto ipotizzare una similarità con il quick decline da CTV (Romàn *et al.*, 2004). Recenti acquisizioni hanno dimostrato la trasmissibilità per innesto e la costante presenza di un isolato di CTV e di un altro virus associato (CSDaV, *Citrus sudden death associated virus*), probabilmente appartenente ai *Marafavirus (Tymoviridae)* (Maccheroni *et al.*, 2004a; 2004b).

Conclusioni

Non è facile stabilire quali sono state le cause della improvvisa e grave epidemia del virus della tristezza che sta mettendo a dura prova l'agrumicoltura italiana, né è al momento possibile prevedere quali sarà l'evoluzione futura. Tenuto conto che la malattia è presente in Italia da 80 anni almeno (Russo, 1956), è da ritenere che gli isolati oggi caratterizzati, la cui trasmissibilità per afidi è chiaramente dimostrata, sono diversi da quelli del tempo. E' verosimile pensare che nel corso dei vari piani di riconversione varietale essi siano stati introdotti inconsapevolmente con il materiale di propagazione. I profili genomici di tre isolati del virus finora accertati permettono di affermare che essi siano riconducibili a fonti diverse anche se tutti presenti in Spagna. Uno di essi appare più temibile perché analogo al ceppo SY californiano.

La diversa incidenza delle infezioni in cultivar diverse, ancorché presenti in appezzamenti contigui, lasciano ritenere che la diffusione della malattia è avvenuta in modo prevalente con il materiale di propagazione infetto. D'altra parte, il rilevante incremento delle infezioni, osservato in assenza di abbattimento delle piante infette, conferma che la diffusione afidica assume un ruolo decisivo anche nei nostri ambienti.

Il fatto che la malattia assume dimensioni importanti solamente in alcuni areali, mentre in altri i livelli d'infezione accertati sono modesti o molto bassi, permette di affermare che, almeno nelle aree con bassa incidenza, l'eliminazione delle piante infette consentirebbe, non solo di ridurre le fonti d'inoculo, ma anche di eradicare i focolai. Sarebbe, pertanto, opportuno ipotizzare misure d'intervento urgenti di tipo comprensoriale o aziendale, come, peraltro, prevede il decreto di lotta obbligatoria contro il virus della tristezza. Occorre, però, far presto in quanto l'esperienza di altri paesi ammonisce che i ritardi sono la prima causa di insuccesso nei programmi di eradicazione. In Israele, ad esempio, i tentativi di soppressione di CTV sono stati vanificati dalle limitate risorse allocate, dalla mancanza di regole e di cooperazione nella

rimozione delle piante infette, dalla scarsa sensibilità del metodo ELISA a quel tempo adottato (antisiero policlonale, anziché miscela di monoclonali) e dall'aumento delle popolazioni afidiche a seguito dell'introduzione della potatura meccanica. Questa esperienza negativa deve fare riflettere sulla inderogabile necessità di utilizzare metodi di saggio altamente affidabili specie nel caso di piante madri.

Allo stato attuale, un piano di monitoraggio sistematico pluriennale consentirebbe di governare la situazione e ricondurla entro livelli di tollerabilità, a condizione che i reimpianti avvengano con piante ottenute da fonti primarie certificate e innestate su portinnesti tolleranti a CTV. Come avviene in altri paesi.

Più vantaggiosa sarebbe una strategia di lotta integrata, basata sulla migliore conoscenza del patosistema a livello locale e regionale. Essa passa attraverso l'adozione di programmi di certificazione, piani di eradicazione o soppressione degli isolati più virulenti del virus, uso di portinnesti resistenti o tolleranti, valorizzazione di ospiti alternativi per i vettori, programmi di lotta integrata.

Poiché non sono state osservate evidenze della presenza di ceppi CTV-SP è da augurarsi che l'esperienza attuale serva ad evitare che essi, o altri ceppi CTV-QD, vengano introdotti. Decisiva, in tal senso, è l'interdizione dell'afide *T. citricidus*, vettore universale di tutti i ceppi di CTV, che ha già raggiunto Portogallo e Spagna, probabilmente proveniente dall'America centrale, e che avanza minaccioso. Probabilmente la prossima sfida da affrontare per la nostra agrumicoltura.

Anche altre malattie degli agrumi, attualmente considerate "minori" ancorché da quarantena, andranno ugualmente attenzionate in tutti i paesi del Bacino del Mediterraneo. E' pressante la necessità di difendersi dall'introduzione di materiale vegetale a rischio soprattutto nell'ottica di una politica di libero scambio, di cooperazione e di interazione.

Riassunto

La recente, improvvisa, epidemia del virus della tristezza ha modificato lo scenario fitopatologico della agrumicoltura italiana. Venuto meno il requisito di zona protetta fino ad ora riconosciuto all'Italia, bisogna rivedere le linee guida finora seguite nell'ottica di contenere la diffusione del virus ed i danni conseguenti. Dopo avere tracciato il quadro fitosanitario complessivo alla luce del DL n. 214 del 19 agosto 2005 e delle liste EPPO relative agli organismi nocivi, sono richiamate le conoscenze su altri patogeni da

quarantena, la cui introduzione potrebbe vanificare le misure di difesa che dovranno essere messe a punto per la tristeza.

Parole chiave: agrumi, Citrus tristeza virus, vettori del virus, altri organismi quarantena.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Virgilio Grimaldi, Dipartimento Scienze e Tecnologie Fitosanitarie dell'Università di Catania, per il materiale fotografico relativo alle osservazioni al microscopio.

Bibliografia

- ALBANESE G., LA ROSA R., TESSITORI M., 1995. *I viroidi degli agrumi: dalla diagnosi sintomatica all'analisi molecolare*. Tecnica agricola 4: 83-104.
- ALBIACH-MARTÌ M.R., MAWASSI M., GOWDA S., SATYANARAMA T., HILF M.E., SHANKER S., ALMIRA E.C., VIVES M.C., LOPEZ C., GUERRI J., FLORES R., MORENO P., GARNSEY S.M., DAWSON W.O., 2000. *Sequences of citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical*. J. Virol. 74: 6856-6865.
- AYLLÓN M.A., LÓPEZ C., NAVAS-CASTILLO J., MAWASSI M., DAWSON W.O., GUERRI J., FLORES R., MORENO P., 1999. *New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replication-driven template switching mechanism in their generation*. J. Gen. Virol. 80: 817-821.
- AYRES A.J., GIMENES-FERNANDES N., BARBOSA J.C., 2002. *Citrus variegated chlorosis (CVC): current status in commercial orange groves in the state of Sao Paulo e Minas Gerais*. In: Proc. 15th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 288-292.
- BALLESTER-OLMOS J.F., PINA J.A., CARBONELL E., MORENO P., HERMOSO DE MENDOZA A., CAMBRA M., NAVARRO L., 1993. *Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain*. Plant Pathol. 42: 219-229.
- BAR-JOSEPH M., MARCUS R., LEE R.F., 1989. *The continuous challenge of citrus tristeza virus control*. Ann. Rev. Phytopathol. 27: 291-316.
- BAR-JOSEPH M., CHE X., MAWASSI M., GOWDA S., SATYANARAYANA T., AYLLÓN M.A., ALBIACH-MARTÌ M.R., GARNSEY S.M., DAWSON W.O., 2002. *The continuous challenge of Citrus tristeza virus molecular research*. In: Proc. 15th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 1-7.
- BASSENEZI R.B., BERGAMIN FILHO A., AMORIM L., GOTTWALD T.R., 2004. *Spatial and temporal analyses of citrus sudden death in Brazil*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 62.
- BATUMAN O., CHE X., YONI M., MAWASSI M., BAR-JOSEPH M., 2004. *Interference or insurance? On the possible roles of different classes of Citrus tristeza virus defective RNAs*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 33.
- BOVÈ J.M., RENAUDIN J., FOISSAC X., GAURIVAUD P., CARLE P., LAIGRET F., SAILLARD C., GARNIER M., 2002. *Spiroplasma citri: from functional genomics to...genomics!* In: Proc. 15th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 278-287.
- BROADBENT P., BEVINGTON K.B., COOTE B.G., 1991. *Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection*. In: Proc. 11th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 64-70.
- BRLANSKY R. H., HOWD D. S., 2002. *Purification of virus-like particles from blight-affected citrus trees*. In: Proc. 15th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 297-305.
- CAMBRA M., GORRIS M.T., MARROQUIN C., ROMAN M.P., OLMOS A., MARTINEZ M.C., HERMOSO DE MENDOZA A., LOPEZ A., NAVARRO L., 2000. *Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the valencian community of Spain*. Virus Res. 71: 85-95.
- CARTIA G., BARBAGALLO S., CATARA A., 1980. *Lack of spread of citrus tristeza virus by aphids in Sicily*. In: Proc. 8th Conf. IOCV, IOCV, Univ. California, Riverside, 88-90.
- CATARA A., LA ROSA R., 1998. *Spiroplasma patogeni delle piante*. Petria 8 (2): 107-122.
- DAVINO M., RUSSO F., CARTIA G., TERRANOVA G., 1983. *Nuovi casi di tristeza degli agrumi accertati in Calabria*. Inf.tore Fitopatol., 33 (5): 51-55.
- DAVINO M., PATTI I., 1985. *Preliminary results of citrus tristeza virus transmission by aphids in Sicily*. In: Integrated Pest Control in Citrus Groves, 305-309.
- DAVINO S., DAVINO M., SAMBADE A., GUARDO M., CARUSO A., 2003. *The First Citrus tristeza virus Outbreak Found in a Relevant Citrus Producing Area of Sicily, Italy*. Plant Disease, 87 (3): 314.
- DAVINO S., COCUZZA G., SORRENTINO G., BENFATTO D., CARUSO A., DAVINO M., 2004. *Diffusione del virus della "tristeza" degli agrumi (CTV) in Sicilia*. In: Atti Giornate Fito., 2: 367-372.
- DAVINO S., RUBIO L., DAVINO M., 2005. *Molecular analysis suggests that recent Citrus tristeza virus outbreaks in Italy were originated by at least two independent introductions*. Eur. J. Plant Path., 111 (3): 289-293.
- DEKKERS M.G.H., LEE R.F., 2002. *Evaluation of recently selected mild isolates of Citrus tristeza virus for cross protection on Hamlin sweet orange on Smooth flat seville rootstock*. In: Proc. 15th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, USA, 136-150.
- DOMINGUEZ A., GUERRI J., CAMBRA M., NAVARRO L., MORENO P., PENA L., 2000. *Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus*. Plant Cell Rept. 19: 427-433.
- DOMINGUEZ A., FAGOAGA C., NAVARRO L., MORENO P., PENA L., 2002. *Constitutive expression of untranslatable versions of the p25 coat protein gene of Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime plants does not confer resistance to the virus*. In: Proc. 15th IOCV Conference, IOCV, Riverside, USA, 341-344.
- D'URSO F., AYLLÓN M.A., RUBIO L., SAMBADE A., DE MENDOZA A.H., GUERRI J., MORENO P., 2000. *Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission*. Plant Path. 49: 288-294.
- GARNSEY S.M., GOTTWALD T.R., YOKOMI R.K., 1998. *Control strategies for Citrus tristeza virus*. In: Plant virus disease control, Hadidi A., Khetrapal R. K. e Koganezawa H. Eds., APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- GARNSEY S.M., 2000. *Citrus tristeza virus: the continuing problem*. In: Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.: 960-962.
- GOTTWALD T.R., ABREU-RODRIGUEZ E., YOKOMI R.K., STANSLY P.A., RILEY T.K., 2002. *Effects on chemical control of aphid vectors and of cross-protection on increase and spread of Citrus tristeza virus*. In: Proc. 15th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 117-130.
- KARASEV A.V., BOYKO V.P., GOWDA S., NIKOLAIEVA O.V., HILF M.E., KOONIN E.V., NIBLETT C.L., KLINE K.C., GUMPF D.J., LEE R.F., GARNSEY S.M., LEWANDOWSKI D.J., DAWSON W.O., 1995. *Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome*. Virology 208: 511-520.
- KRUGNER R., LOPES M.T.V., SANTOS J.S., BERETTA M.J.G., LOPES J.R.S., 1998. *Transmission efficiency of Xylella fastidiosa to citrus by sharpshooters and identification of two new vector*

- species*. In: Proc. 14th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 423.
- MACCHERONI W., ALEGRIA M.C., GREGGIO C.C., PIAZZA J.P., KAMLA R.F., ZACHARIAS P.R.A., BAR-JOSEPH M., FERRO J.A., DA SILVA A.C.R., 2004a. *A new Tymoviridae virus associated to citrus sudden death disease in Brazil*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 63.
- MACCHERONI W., GREGGIO C.C., PIAZZA J.P., KAMLA R.F., ZACHARIAS P.R.A., KITAJIMA J.A., FERRO J.A., DA SILVA A.C.R., 2004b. *Citrus tristeza virus genome variability in citrus sudden death affected area in Brazil*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 64.
- MANJUNATH K.L., CHANDRIKA R., WARREN C., NIBLETT C.L., LEE R.F., 2004. *Complete nucleotide sequence of a new genotype of Citrus tristeza virus from an isolate having a mixed infection*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 28.
- MAWASSI M., MIETKIEWSKA, HILF M.E., ASHOULIN L., KARASEV A.V., GAFNY R., LEE R.F., GARNSEY S.M., DAWSON W.O., BAR-JOSEPH M., 1995a. *Multiple species of detective RNAs in plants infected with citrus tristeza virus*. Virology 214: 264-268.
- MAWASSI M., KARASEV A.V., GAFNY R., LEE R.F., DAWSON W.O., BAR-JOSEPH M., 1995b. *Detective RNA molecules associated with citrus tristeza virus*. Virology 208: 383-387.
- MULLER G.W., COSTA A.S., 1987. *Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by pre-immunization*. Phytophylactica 19: 197-198.
- PAPPU H.R., KARASEV A.V., ANDERSON E.J., PAPPU S.S., HILF M.E., FEBRES V.J., ECKLOFF M.G., MC CAFFREY M., BOYKO V., GOWDA S., DOLJIA V.V., KOONIN E.V., GUMPF D.J., CLINE K.C., GARNSEY S.M., DAWSON W.O., LEE R.F., NIBLETT C.L., 1994. *Nucleotide sequence and organization of eight open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome*. Virology 199: 35-46.
- REFORGIATO RECUPERO G., 2003. *Portinnesti tolleranti a tristeza*. In: Atti del convegno "Ricerche e sperimentazioni nel settore dell'agrumicoltura italiana, Piano Agrumicolo Nazionale", pp. 357-360.
- ROCHA-PENA 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 citricida*. Plant Dis. 79: 437-445.
- RODRIGUEZ A., GORRIS M.T., SERRA J., ROMAN M.P., COLLADO C., HERMOSO DE MENDOZA, CAMBRA M., 2004. *Estimation of the number of Citrus tristeza virus-viruliferous aphids landing on individual citrus seedlings and viral incidence in different citrus rootstocks in Spain*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 52.
- ROISTACHER C.N., BAR-JOSEPH M., 1987. *Transmission of citrus tristeza virus by Aphis gossypii and by graft inoculation to and from Passiflora spp*. Phytophylactica 19 (2): 179-182.
- ROMNA M.P., CAMBRA M., JUAREZ J., MORENO P., DURAN-VILA N., TANAKA F.A.O., ALVES E., KITAJIMA E.W., YAMAMOTO P.T., BASSANEZI R.B., TEIXEIRA D.C., JESUS JUNIOR W.C., AYRES A.J., GIMENES-FERNANDES N., RABENSTEIN F., GIROTTO L.F., BOVÈ J.M., 2004. *Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease*. Plant Dis. 88 (5): 453-467.
- ROOSE M.L., YE X., YANG Z.N., MIRKOV T.E., 2000. *Toward cloning the Citrus tristeza virus resistance gene(s)*. In: Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr. 2000, 972-973.
- RUBIO L., AYLLON M.A., GUERRI J., PAPPU H., NIBLETT C.L., MORENO P., 1996. *Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene*. Annals of Applied Biology, 129, 479-489.
- RUBIO L., AYLLON M.A., KONG P., FERNANDEZ 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 recombinations*. J. Gen. Virol. 75 (17) : 8054-8062.
- RUIZ-RUIZ S., MORENO P., GUERRI J., AMBROS S., 2004. *The complete genome sequence of a severe isolate of Citrus tristeza virus from Spain*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 29.
- RUSSO F., 1956. *La presenza del virus della Tristezza su limone "Dwarf Meyer" e mandarino "Satsuma" riscontrate in Sicilia*. Riv. Agrumicoltura, 1, 7-8,281-289.
- SALEHI M., IZADPANAH K., TAGHIZADEH M., 2002. *Withches' broom disease of lime in Iran: new distribution areas, experimental herbaceous hosts and transmission trials*. In: Proc. 15th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, USA, 293-296.
- SCARAMUZZI G., CATARA A., CARTIA G., GRASSO S., 1986. *Le malattie degli agrumi*. Edizioni Edagricole.
- SOUSA A.A., MULLER G.W., TARGON M.L.P.N., TAKITA M.A., MACHADO M.A., 2002. *Stability of the mild protective "PIAC" isolate of Citrus tristeza virus*. In: Proc. 15th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, USA, 131-135.
- SUASTIKA G., NATSUAKI T., TERUI H., KANO T., IEKI H., OKUDA S., 2001. *Nucleotide sequence of Citrus tristeza virus seedling yellows isolate*. J. Gen. Plant Path. 67: 73-77.
- TESSITORI M., LA ROSA R., 2002. *Un secolo di ricerche sulla psorosi degli agrumi*. Tecnica agricola, 1-2, 101-118.
- TESSITORI M., CATARA A., 2006. *La sostituzione dell'arancio amaro: gli aspetti fitopatologici da non sottovalutare*. Frutticoltura (1): 30-33.
- TEXEIRA D.C., DANET J.L., JAGOUEIX-EVEILLARD S., SAILLARD C., AYRES A.J., BOVÈ J.M., 2004. *A new liberibacter species, Candidatus Liberibacter americanus, is associated with huanglongbing in Sao Paulo, Brazil*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 81.
- TIMMER L.W., GARNSEY S.M., GRAHAM J.H., 2000. *Compendium of citrus diseases*. American Phytopathological Society, APS Press.
- VAN DER VYVER J.B., VAN VUUREN S.P., LUTTIG M., DA GRACA J.V., 2002. *Changes in the Citrus tristeza virus status of pre-immunized grapefruit field trees*. In: Proc. XVI Conf. IOCV, IOCV, Riverside, USA, 175-185.
- VAN VUUREN S.P., COLLINS R.P., DA GRACA J.V., 1991. *The performance of exotic citrus tristeza virus isolates as pre-immunizing agents for sweet orange on sour orange rootstock under natural disease pressure in South Africa*. In: Proc. 11th IOCV Conf., IOCV, Riverside, USA, 60-63.
- VIVES M.C., RUBIO L., LOPEZ C., NAVAS-CASTILLO J., ALBIACH-MARTÍ M.R., DAWSON W.O., GUERRI J., FLORES R., MORENO P., 1999. *The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza isolate*. J. Gen. Virol. 80 : 811-816.
- YANG Z.N., MATHEWS D.H., DODDS J.A., MIRKOV T.E., 1999. *Molecular characterization of an isolate of citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet orange*. Virus genes 19: 131-142.
- YE X., MIRKOV E.T., ROOSE M.L., 2004. *The transformation and expression of Citrus tristeza virus resistance gene candidates in citrus and tobacco*. In: Proc. Intl. Soc. Citricult. X Congr.: 86.
- YOKOMI R.K., JOOST P., BACKUS E., 2004. *Preliminary evaluation of two biotypes of Aphis gossypii on the transmission of Citrus tristeza virus*. Abstract. In 16th IOCV Conf., Monterrey, Mexico, 136.
- ZHOU C.Y., HAILESTONES D.L., BROADBENT P., CONNOR R., BOWYER J., 2002. *Studies on mild strain cross-protection against stem-pitting Citrus tristeza virus*. In: Proc. XVI Conf. IOCV, IOCV, Riverside, USA, 151-157.