



# ANNALI

DELLA FACOLTA' DI AGRARIA DELL' UNIVERSITA'  
SASSARI

**studi sassaresi**

Sezione III

1980 - 81 Volume XXVIII

# ANNALI

DELLA FACOLTA' DI AGRARIA DELL' UNIVERSITA'  
SASSARI

*DIRETTORE:* G. RIVOIRA

*COMITATO DI REDAZIONE:* M. DATILO - F. FATICHENTI - C. GESSA - L. IDDA  
F. MARRAS - A. MILELLA - P. PICCAROLO - A. PIETRACAPRINA - R. PROTA  
R. SATTA - G. TORRE - A. VODRET

## studi sassaresi

ORGANO UFFICIALE  
DELLA SOCIETÀ SASSARESE DI SCIENZE MEDICHE E NATURALI



Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Sassari

(Direttore: Prof. F. Marras)

**A. FODDAI, P. CORDA, G. IDINI**

### IL RISANAMENTO DEGLI AGRUMI DAL VIROIDE DELL'EXOCORTITE MEDIANTE IL MICROINNESTO \*

E' già da molti anni che questo Istituto ha messo in evidenza come in Sardegna siano presenti tutte le principali malattie da virus degli Agrumi (SERVAZZI *et al.*, 1973). Tra queste, l'Exocortite merita indubbiamente un'attenzione particolare. Ed infatti, tutte le numerose piante di Agrumi di vecchio clone (« old line ») da noi esaminate sono risultate infette dal viroide responsabile della malattia. Per fortuna, essa non si rende manifesta grazie al fatto che il portinnesto impiegato nell'Isola — come d'altronde nel resto d'Italia e nella maggioranza dei Paesi agrumicoli del Mediterraneo — è quasi esclusivamente l'Arancio amaro, tollerante. Senonché, il dilagare del virus della Tristezza, cui questo portinnesto è notoriamente molto sensibile, in alcuni Paesi del Mediterraneo, in particolare nella vicina Spagna — nel 1972 risultavano colpiti ben 82.000 ha di Agrumi (GUARDIOLA, 1974) — è motivo di non poche apprensioni per il costante pericolo di contaminazione cui sono esposti i nostri agrumeti. Nella malaugurata eventualità che si scatenasse anche in Italia un'improvvisa epidemia di Tristezza e, di conseguenza, si rendesse indispensabile la sostituzione dell'Arancio amaro con altri portinnesti, sarebbe proprio il problema dell'Exocortite ad affiorare in tutta la sua gravità.

E' stato soprattutto questo il motivo che ci ha indotto, da tempo, ad occuparci della selezione sanitaria degli Agrumi. Diciamo subito che, di proposito, non si è voluto far ricorso alla termoterapia — che pure ha avuto un certo successo nel risanamento di piante infette da alcuni importanti virus (Tristezza, Psorosi A, « Concave gum », « Infectious variegation ») — proprio perché nei confronti

\* Lavoro eseguito con un contributo finanziario del C.N.R.

Ha collaborato alle ricerche Speranza Migheli, Operatore T.P. del C.N.R.

del viroide dell'Exocortite ha dato ripetutamente risultati negativi (ROSSETTI *et al.*, 1965; CATARA *et al.*, 1968; CALAVAN *et al.*, 1972). Abbiamo invece seguito, in un primo momento, la via della selezione nucellare (SERVAZZI *et al.*, *l.c.*, 1973). Tuttavia, anche questa tecnica ha dimostrato, com'è ben noto, limiti piuttosto notevoli. Intanto non è semplice applicarla ai tipi di agrumi monoembrionici o privi di semi. E poi, in ogni caso, le piantine nucellari, pur avendo lo stesso genotipo delle piante madri, sono purtroppo caratterizzate dall'insorgenza di caratteri « giovanili » molto accentuati che tendono ad attenuarsi solamente con l'età della pianta e, soprattutto, dopo reiterate propagazioni vegetative mediante innesto. Ne deriva che per disporre di discendenze nucellari adatte alla propagazione occorrono parecchi anni, non meno di 12-15.

Proprio per ovviare a questi inconvenienti, si è ritenuto necessario ricorrere alla più recente tecnica del microinnesto messa a punto da ricercatori californiani e spagnoli (cfr., tra gli altri, MURASHIGE *et al.*, 1972; BITTERS *et al.*, 1972; NAVARRO, 1975; NAVARRO *et al.*, 1975). Per quanto riguarda l'Italia, questa tecnica è stata già impiegata (RUSSO e STARRANTINO, 1973; TUSA *et al.*, 1979) ma, a quel che ci consta, non è stato ancora fornito alcun dato circa il risanamento da infezioni virali delle piantine ottenute.

## MATERIALI E METODI

La metodica seguita per il microinnesto non si discosta sostanzialmente da quella descritta da NAVARRO *et al.*, (*l.c.*, 1975).

*Portinnesti* - E' stato impiegato il Citrange « Troyer » i cui germogli, grazie al carattere « trifogliato », differiscono nettamente da quelli degli apici microinnestati e sono quindi agevolmente asportabili.

I semi, liberati dal tegumento e opportunamente sterilizzati, sono stati posti a germinare in tubi di coltura contenenti terreno nutritivo agarizzato a pH 5,7. I tubi sono stati tenuti costantemente al buio a 27° C.

*Germogli* - Sono stati prelevati da piante di pieno campo, innestate su Arancio amaro, di Arancio dolce (« Belladonna », « Moro », « Tarocco » e « Washington Navel »), Mandarino « Avana », Clementine « Comune », Pompelmo « Marsh » e Limone (« Lisbon » e « Rifiorante »). Tutte le piante erano ovviamente infette dal viroide dell'Exocortite.

*Microinnesto* - Dopo 2 settimane dalla semina, i semenzali di Citrange « Troyer »

sono stati capitozzati e sul fusticino è stata praticata un'incisione della corteccia a forma di T rovesciata.

Contemporaneamente, al microscopio binoculare a 40 x e con l'ausilio di idonei strumenti di dissezione, dai germogli delle piante da risanare, accuratamente disinfettati, sono stati excisi gli apici, di dimensioni inferiori a 0,5 mm, costituiti dalla cupola meristemica e dal primo paio di abbozzi fogliari.

In corrispondenza dell'incisione praticata sul semenzale, i lembi della corteccia venivano sollevati e al disotto si inseriva l'apice del germoglio con la superficie basale a contatto con la regione cambiale del portinnesto.

I semenzali così innestati sono stati allevati in tubi di coltura contenenti terreno nutritivo liquido a pH 5,7 e mantenuti in cella climatica a 27° C, con un'umidità relativa del 70-80%, un fotoperiodo giornaliero di 16 ore ed un'intensità luminosa intorno a 2.000 lux. Essi venivano controllati periodicamente al fine di asportare i germogli emessi dal portinnesto.

Le piantine bimembri, allo stadio di 3-4 foglioline, sono state trasferite in vasetti contenenti un terriccio idoneo ed allevate in serra sino al momento del saggio biologico. Questo è stato eseguito in serra calda (27° C) impiegando, come « indicatrice », il Cedro « Etrog » Arizona 861, secondo le modalità da noi precedentemente descritte (SERVAZZI *et al.*, 1964).

Tutte le operazioni di inoculo e quelle successive di potatura sono state effettuate con coltelli e forbici accuratamente disinfettati con ipoclorito di sodio all'1% (ROISTACHER *et al.*, 1969; GARNSEY e WEATHERS, 1972).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Il numero di microinnesti eseguiti è stato diverso a seconda della specie e della cultivar. Comunque, la percentuale di attecchimento è stata, nel complesso, soddisfacente. Infatti, come si può rilevare dalla tabella n. 1, essa ha variato da un minimo del 25% per l'Arancio dolce « Moro » ad un massimo del 60% per il Mandarino « Avana » e il Limone « Lisbon ».

Qualche giorno dopo il trasferimento in serra, diverse piantine, mostrando di risentire delle mutate condizioni climatiche, hanno cominciato a manifestare un graduale disseccamento delle foglioline e, lentamente, sono morte.

Le piantine sopravvissute sono state complessivamente 75, e precisamente: n. 28 Aranci dolci (17 « Belladonna », 4 « Moro », 5 « Tarocco » e 2 W. Navel ), n. 11 Mandarini « Avana », n. 9 Clementine « Comune », n. 7 Pompelmi « Marsh » e n. 20 Limoni (9 « Lisbon » e 11 « Rifiorante »). Per il momento sono state già saggiate, in tempi diversi, 42 piantine: 14 Aranci dolci « Belladonna », 7 Cle-

Tab. 1 - Percentuale di microinnesti attecchiti.

Specie e cultivar	%
Arancio dolce « Belladonna »	40,8
Arancio dolce « Moro »	25,7
Arancio dolce « Tarocco »	43,1
Arancio dolce « W. Navel »	45,6
Mandarino « Avana »	60,4
Clementine « Comune »	40,3
Pompelmo « Marsh »	39,8
Limone « Lisbon »	60,5
Limone « Rifiorante »	49,6

mentine « Comune », 5 Pompelmi « Marsh » e 16 Limoni (7 « Lisbon » e 9 « Rifiorante »). Tutti i saggi hanno dato sinora, a distanza di un anno dall'ultima inoculazione, esito negativo.

Alla luce di questi risultati, e in accordo con quelli ottenuti altrove (cfr. MURASHIGE *et al.*, *I.c.*, 1972; NAVARRO *et al.*, *I.c.*, 1975; ROISTACHER *et al.*, 1976; ROISTACHER e KITTO, 1977), riteniamo che anche per l'Italia la tecnica del microinnesto rappresenti oggi il metodo più valido per costituire piante di Agrumi esenti dal viroide dell'Exocortite.

#### RIASSUNTO

Le piante di Agrumi di vecchio clone coltivate in Sardegna sono pressoché tutte infette, in forma latente, dal viroide dell'Exocortite.

Con l'intento di ottenere materiale agrumicolo esente da detto viroide è stata applicata, con successo, la tecnica del microinnesto.

#### SUMMARY

*Elimination of citrus exocortis viroid by shoot-tip grafting.*

Nearly all old line citrus trees growing in Sardinia (Italy) are infected by citrus exocortis viroid (CEV).

The technique of shoot-tip grafting has proved effective in recovering various citrus cultivars free of this viroid.

## BIBLIOGRAFIA

- BITTERS W.P., MURASHIGE T., RANGAN T.S., NAUER E.M., ROISTACHER C.N. e HOLLIDAY P.B., 1972 — Healthy trees from the test tube. *Citrograph*, 57, 85-86, 106.
- CALAVAN E.C., ROISTACHER C.N. e NAUER E.M., 1972 — Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Dis. Repr.*, 56, 976-980.
- CATARA A., GRASSO S. e PERROTTA G., 1968 — Influenza delle gibberelline nei rapporti virus-pianta ospite in virosi degli Agrumi, e tentativi di una loro utilizzazione, abbinata alla terapia, per ottenere materiale esente da « exocortite ». *Notiz. Mal. Piante*, 80-81, 93-109.
- GARNSEY S.M. e WEATHERS L.G., 1972 — Factors affecting mechanical spread of exocortis virus. In W.C. Price (ed.), *Proc. 5th Conf. Intern. Organization Citrus Virol.*, Univ. Florida Press, Gainesville, 105-111.
- GUARDIOLA J.L., 1974 — Selección de material de injerto en loro agrios. *ITEA*, 16, 56-59.
- MURASHIGE T., BITTERS W.P., RANGAN T.S., NAUER E.M., ROISTACHER C.N. e HOLLIDAY P.B., 1972 — A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *Hort-Science*, 7 (2), 118-119.
- NAVARRO L., 1975 — Nueva técnica para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Microinjerto de ápices caulinares « in vitro ». *Levante Agrícola*, 159, 5-10.
- NAVARRO L., ROISTACHER C.N. e MURASHIGE T., 1975 — Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100 (5), 471-479.
- ROISTACHER C.N., CALAVAN E.C. e BLUE R.L., 1969 — Citrus exocortis virus - chemical inactivation on tools, tolerance to heat and separation of isolates. *Plant Dis. Repr.*, 53, 333-336.
- ROISTACHER C.N. e KITTO S.L., 1977 — Elimination of additional citrus viruses by shoot-tip grafting in vitro. *Plant Dis. Repr.*, 61 (7), 594-596.
- ROISTACHER C.N., NAVARRO L. e MURASHIGE T., 1976 — Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting in vitro. In E.C. Calavan (ed.), *Proc. 7th Conf. Intern. Organization Citrus Virol.*, Univ. California, Riverside, 186-193.
- ROSSETTI V., NAKADAIRA J.T. e ROESSING C., 1965 — Experiments on heating budwood to eliminate exocortis virus. In W.C. Price (ed.), *Proc. 3d Conf. Intern. Organization Citrus Virol.*, Univ. Florida Press., Gainesville, 268-271.
- RUSSO F. e STARRANTINO A., 1973 — Ricerche sulla tecnologia dei microinnesti nel quadro del miglioramento genetico-sanitario degli agrumi. *Ann. Ist. Sper. Agrumicoltura*, Acireale (CT), VI, 209-222.
- SERVAZZI O., MARRAS F. e FODDAI A., 1964 — L'«Exocortite» degli Agrumi in Sardegna. *Studi Sass.*, Sez. III, *Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari*, XII, 287-298.
- SERVAZZI O., MARRAS F. e FODDAI A., 1973 — Malattie da virus e virosi-simili e selezione sanitaria degli Agrumi in Sardegna. Attività svolta e risultati conseguiti dall'Istituto di Patologia vegetale dell'Università di Sassari. *Studi Sass.*, Sez. III, *Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari*, XXI (2), 655-704.
- TUSA N., DE PASQUALE F. e RADOGNA L., 1979 — Ricerche sulla tecnologia del microinnesto dei Citrus. Atti dell'Incontro su « Tecniche di colture « in vitro » per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticole », Pistoia, 6 ottobre, 229-234.