

Innovazione nella filiera Agrumicola: Competitività e sostenibilità delle produzioni agrumicole Calabresi” (IFAC) - Relazione finale sulle attività svolte dal CREA-OFA

Il CREA OFA è stato coinvolto nell'azione n. 3 – Innovazione varietale e di portainnesto. In particolare, ha svolto attività le seguenti attività di ricerca e trasferimento alle aziende del GO-PEI:

1. Ottenimento di cloni virus controllati di arancio e limone per il loro inserimento nel sistema di certificazione volontaria
2. Distribuzione di cloni virus controllati di interesse per la filiera agrumicola calabrese
3. Distribuzione di nuovi portinnesti

Ottenimento di cloni virus controllati di arancio e limone per il loro inserimento nel sistema di certificazione volontaria

Il CREA- OFA ha provveduto a selezionare, anche grazie al supporto di altri membri del GO-PEI, alcuni cloni di limone ed arancio tipici dell'agrumicoltura calabrese al fine di operare il risanamento dei materiali di propagazione attraverso la tecnica del microinnesto. Sono stati selezionati due differenti cloni di arancio Ovale, reperiti a Siracusa (clone Dammuso) e Corigliano (clone Cucchiarone), e due cloni di limone tipo 'Femminello' tipici della limonicoltura di Rocca Imperiale ('Lauretta' e 'Favale' - fig.1).



Figura 1. Limone di Rocca Imperiale , clone Favale

CREA - Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura

CREA - Research Centre for Olive, Fruit and Citrus Crops

Via Settimio Severo, 83 - 87036 Rende (CS) Sede amministrativa

Via di Fioranello, 52 - 00134 Roma

Via Torrino, 3 - 81100 Caserta

Via La Canapona, 1bis - 47121 Forlì

Corso Savoia, 190 - 95024 Acireale (CT)

Via Nursina, 2- 06049 Spoleto (PG)

@ ofa@crea.gov.it | ofa@pec.crea.gov.it

W www.crea.gov.it

T +39 0984 4052

T +39 06 7934811

T +39 0823 256201

T +39 0543 89428

T +39 095 7653111

T +39 0743 49743

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1**C.F.** 97231970589 **P.I.** 08183101008

A seguito della propagazione di tali materiali sono stati effettuati dei saggi sierologici e molecolari per verificare lo stato fitosanitario delle piante madri. Dalle analisi è emerso che tutti i cloni reperiti erano positivi almeno ad uno degli organismi nocivi elencati nel Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 18. Per tale motivo si è reso necessario procedere all'esecuzione dei microinnesti.

La tecnica del microinnesto prevede la preliminare coltura *in vitro* di portinnesti, realizzata utilizzando terreni di coltura solidi, e il prelievo di apici meristematici direttamente dal campo o allevati in ambiente controllato. Nel caso specifico sono stati utilizzati terreni di coltura MS (Murashige e Skoog): il substrato solido, ottenuto addizionando agar, è stato utilizzato per la coltura in provetta dei semi del portinnesto.

Per realizzare il terreno di coltura MS solido è stato necessario utilizzare:

- Polvere di terreno MS;
- Zucchero (saccarosio);
- Soluzione A (contenente i macroelementi, ovvero nitrato di ammonio e nitrato di potassio, cloruro di calcio, solfato di magnesio, potassio fosfato monobasico);
- Soluzione B (contenente i microelementi, ovvero acido borico, manganese solfato, zinco solfato, potassio ioduro, sodio molibdato, rame solfato e cobalto cloruro);
- Fe EDTA (contenente ferro solfato e acido etilendiammitetracetico);
- Inositolo;
- Estratto di malto;
- Vitamine (acido nicotinico, piridossina HCl e tiamina);
- Glicocola;
- Adenina;
- BAP (acido 6 benzil-ammino-purina);
- Kinetina;
- NAA (acido naftalenacetico);
- Agar.

La soluzione di MS deve essere autoclavata. Il protocollo di preparazione del substrato MS solido prevede anche una preliminare sterilizzazione del materiale tecnico da utilizzare, per evitare eventuali contaminazioni del materiale vegetale. Per questo motivo sono stati autoclavati pinze, carta da filtro, piastre Petri, portabisturi, provette con i relativi tappi, acqua distillata, contemporaneamente alla sterilizzazione delle beute contenenti il substrato. Alla fine della sterilizzazione è necessario lavorare sotto cappa a flusso laminare per garantire sterilità, quindi il substrato deve essere versato nelle provette in vetro, riempiendole con circa 20 ml di soluzione. Quando si sarà raffreddato è possibile proseguire alla fase di semina dei portinnesti. I semi vengono estratti direttamente dai frutti preventivamente sterilizzati su fiamma libera. Successivamente i semi sono posti a crescere al buio per garantire al portinnesto di eziolare, allungarsi e rimanere di consistenza acquosa. Il momento ottimale per utilizzare i portinnesti seminati è quando raggiungono circa i 3-4 cm di lunghezza (figura 2).

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1

C.F. 97231970589 ∫ P.I. 08183101008



figura 2. Portinnesto eziolato allevato *in vitro*

Relativamente invece al prelievo degli apici meristematici, le possibili opzioni sono 2: possono essere prelevati direttamente da una pianta in pieno campo o allevata in vaso (figura 3) oppure si può anche decidere di prelevare delle talee da allevare in ambiente controllato e successivamente prelevare gli apici da quest'ultime.



figura 3. Apice meristematico a prelevare per l'esecuzione dei microinnesti

Nel primo caso si prelevano direttamente gli apici meristematici da utilizzare, avendo cura di mantenere un buon tasso di umidità per evitare che si disidratino, e successivamente si sterilizzano utilizzando della candeggina commerciale preventivamente diluita (1:10). Nel secondo caso si può

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1

C.F. 97231970589 **P.I.** 08183101008

decidere di realizzare delle microtalee da 2-3 cm, da allevare in provetta su substrato solido (figura 4 A) (preventivamente sterilizzate utilizzando candeggina diluita e Tween 20), oppure delle talee più lunghe da allevare in cella climatica utilizzando come substrato della perlite umida (Figura 4 B). Dopo circa 2 settimane si saranno sviluppati gli apici meristematici che potranno essere utilizzati per le successive fasi di microinnesto.



figura 4. Micro talea allevata in vitro (A) e talee allevate su perlite (B)

Per realizzare il microinnesto sono necessari gli apici vegetativi e i portinnesti acquosi ed eziolati. Il microinnesto viene eseguito utilizzando un binoculare, dentro una cappa a flusso laminare in condizioni di assoluta sterilità, avendo cura di sterilizzare spesso i bisturi e le pinze su fiamma libera. La prima cosa da fare è preparare il portinnesto, eliminando i cotiledoni, capitozzando la radice e il fusto, e preparando un'ansa triangolare su cui successivamente poggiare la gemma della varietà da risanare. Contemporaneamente alla preparazione del portinnesto si prepara l'apice, tirando fuori dal tubo di coltura la talea con tutti i germogli che si sono formati, si pulisce il germoglio eliminando tutte le foglie laterali, lasciando solamente il cono gemmario. Successivamente il meristema apicale viene tagliato e viene poggiato nell'ansa triangolare del portinnesto. La pianta bimembre viene posta (sempre in sterilità) dentro un tubo di coltura con un substrato liquido. Per porre sul substrato liquido la pianta si utilizzano dei ponti di carta per assicurarsi che non affondi. Dopodiché il tubo si chiude con il parafilm e si pone in una camera di crescita con temperatura controllata di 25°C con un fotoperiodo di 16 ore di luce, e dopo un certo periodo di tempo dopo che la gemma avrà attecchito cominceranno a differenziarsi nuove foglioline dal punto di innesto. I portinnesti utilizzati per il risanamento sono stati citrange Carrizo. I microinnesti andati a buon fine sono stati trapiantati in vasetti, e le piante sono state poste ad acclimatare per effettuare i successivi saggi e valutare se effettivamente il materiale vegetale fosse stato risanato. Sono stati Eseguiti circa 25 microinnesti per ciascuna accessione, con un numero microinnesti attecchiti variabile da 4 a 11. Una volta ottenute le piante microinnestate, le attività di ricerca hanno previsto la valutazione dello stato fitosanitario del materiale vegetale. Per fare ciò sono stati effettuati dei saggi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1**C.F.** 97231970589 **P.I.** 08183101008

Assay), che permettono di rilevare il virus della tristeza (CTV). L'ELISA sfrutta la reazione antigene-anticorpo per rilevare la presenza di patogeni attraverso una reazione cromogenica: l'enzima, catalizzando la reazione, produce un cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione del patogeno nel campione. L'intensità del colore è misurata con uno spettrofotometro, permettendoci di stabilire, in base ai valori del controllo positivo e negativo, se i campioni che si sono colorati sono effettivamente positivi.

È possibile procedere con un test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich), oppure con un TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich): la differenza sostanziale tra i due metodi riguarda esclusivamente la presenza di un terzo anticorpo nel TAS-ELISA, per aumentare la sensibilità e rilevare basse concentrazioni di patogeni.

La metodologia di laboratorio prevede l'utilizzo dei seguenti materiali e reagenti:

- Campione vegetale fresco (foglie, ad esempio);
- Buffer di estrazione (GEB – General Extract Buffer, PBST (Phosphate Buffered Saline, con aggiunta di Tween-20);
- Kit ELISA specifico per il patogeno da rilevare, con anticorpo di cattura specifico, anticorpo rilevatore coniugato ad enzima e substrato cromogenico per l'enzima;
- Piastra ELISA;
- Spettrofotometro.

Innanzitutto, bisogna effettuare la raccolta dei campioni e conservarli in frigorifero fino al momento dell'analisi, e successivamente passare alla preparazione della piastra rivestendo ogni singolo pozzetto con l'anticorpo di cattura specifico diluito in buffer, e incubare la piastra per 1-2 ore a temperatura ambiente o overnight a 4°C. Al termine dell'incubazione lavare i pozzetti tre volte con il buffer di lavaggio (PBST), per rimuovere l'anticorpo non legato. Dopo il lavaggio si possono aggiungere i campioni precedentemente macinati utilizzando il buffer GEB, e i controlli (anch'essi reidratati con GEB): si aggiungono 100 µL di estratto dei campioni da analizzare in ogni pozzetto rivestito e 100 µL di controllo positivo e negativo. Anche per questo passaggio è prevista un'incubazione di 1-2 ore a temperatura ambiente per far sì che l'antigene si leghi all'anticorpo di cattura. Alla fine si lavano i pozzetti almeno 3-4 volte con buffer di lavaggio per rimuovere il materiale non legato. Successivamente si aggiungono 100 µL di anticorpo rilevatore coniugato con enzima in ogni pozzetto e si mette ad incubare la piastra per 1 ora a temperatura ambiente, lavando i pozzetti almeno 5 volte con buffer di lavaggio al termine dell'incubazione. L'ultimo passaggio ha previsto l'aggiunta di 100 µL di substrato cromogenico in ciascun pozzetto e una finale incubazione per 10-30 minuti a temperatura ambiente o comunque fino a quando non si sviluppa un colore (Figura 5). A questo punto si passa alla lettura della piastra misurando l'assorbanza a 450 nm utilizzando uno spettrofotometro. I valori dei campioni sono quindi confrontati con i valori di controllo positivo e negativo: i campioni con assorbanza significativamente superiore al controllo negativo sono considerati positivi per il patogeno target, mentre quelli con assorbanza simile o inferiore al controllo negativo sono considerati privi del patogeno.

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1

C.F. 97231970589 J P.I. 08183101008

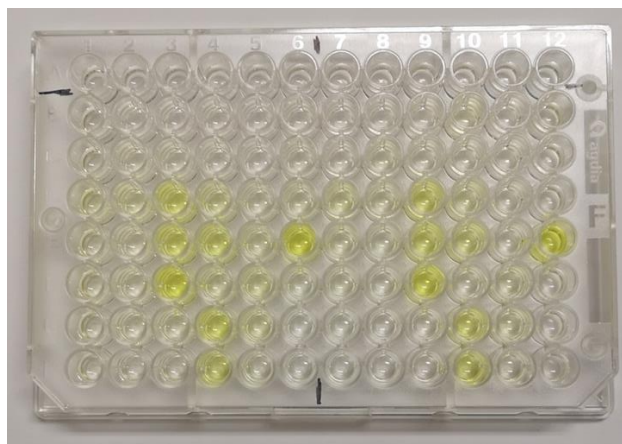


Figura 5. Test ELISA

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti dai test ELISA condotti per verificare la presenza del virus del CTV (Tabella 1):

Limone Laurotta	CTV	Limone Favale	CTV	Ovale Cucchiaron	CTV
Limone Laurotta m 1	Neg	Limone Favale m 2	Neg	Ovale Cucchiaron m 2	Neg
Limone Laurotta m 2	Neg	Limone Favale m 5	Neg	Ovale Cucchiaron m 5	Neg
Limone Laurotta m 4	Neg	Limone Favale m 6	Neg	Ovale Cucchiaron m 6	Neg
Limone Laurotta m 5	Neg	Limone Favale m 7	Neg	Ovale Cucchiaron m 7	Neg
Limone Laurotta m 7	Neg	Limone Favale m 8	Neg	Ovale Cucchiaron m 8	Neg
Limone Laurotta m 8	Neg	Limone Favale m 1	Neg	Ovale Cucchiaron m 9/2023	Neg
Limone Laurotta m 9	Neg			Ovale Cucchiaron m 11/2023	Neg
Limone Laurotta m 10	Neg			Ovale Cucchiaron m 12/2023	Neg
Limone Laurotta m 1/2023	Neg	Ovale Dammuso	CTV	Ovale Cucchiaron m 13/2023	Neg
Limone Laurotta m 2/2023	Neg	Ovale Dammuso m 1	Neg	Ovale Cucchiaron m 5/2023	Neg
Limone Laurotta m 3/2023	Neg	Ovale Dammuso m 2	Neg	Ovale Cucchiaron m 7/2023	Neg
		Ovale Dammuso m 3	Neg	Ovale Cucchiaron m 8/2023	Neg
		Ovale Dammuso m 4	Neg	Ovale Cucchiaron m 12/2023	Neg

Tabella 1. Risultati dei test ELISA per il CTV

Dopo aver accertato la negatività al CTV, le piante sono state analizzate mediante test molecolari per tutti gli altri organismi nocivi elencati nella normativa di riferimento (Decreto legislativo 2 febbraio 2021 n.18) per poter qualificare i materiali di propagazione con gli standard della Certificazione Europea. Di seguito vengono riportati i saggi molecolari e sierologici che sono stati condotti sulle piante che sono state risanate con successo e che sono state consegnate all'azienda vivaistica per procedere alle propagazioni (tabella 2):

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1

C.F. 97231970589 J P.I. 08183101008

varietà	CTV (Citrus Tristeza virus)	CEVd (Citrus exocortis viroid)	HSVd (Hop stunt viroid)	CPsV (Citrus psorosis virus)	CLBV (Citrus leaf blotch virus)	CVV (Citrus variegation virus)	CCGA V	CiVA	CDVd
Limone Lauretta m2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Limone Favale M1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Arancio Ovale Dammuso 1 M4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabella 2. Cloni risanati e lista di organismi nocivi saggiati

Le candidate piante madri di pre-base sono state trapiantate in mastelli da 50 litri e conservate presso le strutture della certificazione volontaria dell'azienda S. Salvatore del CREA-OFA di Acireale. Nel caso delle varietà di limone Favale e arancio Ovale, la richiesta formale di inserimento delle varietà nel sistema di certificazione volontaria avverrà nel momento in cui le piante propagate produrranno i primi frutti e potranno essere effettuate le analisi di rispondenza varietale sulle piante in produzione. Nel caso del limone Lauretta, dovrà essere richiesta l'iscrizione al registro nazionale delle varietà.

Distribuzione di cloni virus controllati di interesse per la filiera agrumicola calabrese

Il materiale di propagazione di Interdonato M8 e Biondo di Caulonia L4529 M4 precedentemente risanato da CREA è stato consegnato all'azienda vivaistica del GO PEI per la successiva propagazione su diversi portinnesti. Al contempo il CREA ha provveduto ad inserire le due varietà nel sistema di certificazione volontaria categoria "Certificato Europeo" (protocollo MASAF-DISRV 0010204 del 10/01/2024). Le due selezioni hanno tuttora un interesse commerciale nel territorio calabrese. Il materiale risanato potrà essere quindi distribuito in futuro per la realizzazione di nuovi impianti commerciali.

Distribuzione di nuovi portinnesti

Il CREA-OFA ha consegnato alla ditta vivaistica del GO PEI (Vivai Milone) i semi di F6P12, VXP, C22 e C57 per ottenere piante da utilizzare per prove di portinnesti. Questi portinnesti rappresentano importanti innovazioni che possono in prospettiva aumentare la produttività e la qualità dei frutti in ambienti pedoclimatici non ottimali per la coltivazione degli agrumi.

La Ditta Vivai Milone ha provveduto ad innestare e consegnare piante di:

- Biondo di Caulonia L4529 M4 innestate su 4 portinnesti (Citrumelo Swingle, citrange Carrizo, citrange C35, e citrandarin C22) a: ARSAC di Gioia Tauro, Locri, S. Pietro Lametino, Mirto Crosia, e Istituto Tecnico Agrario di Caulonia. In questo modo sarà possibile verificare la risposta della varietà in combinazione con diversi portinnesti in 5 ambienti pedoclimatici della Regione.
- Clementine SRA63 innestate su F6P12, C22, e C57 alla Società Agricola Gallo

SEDE LEGALE

Via della Navicella, 2/4 - 00184 Roma (Italy)

T +39 06 47836.1

C.F. 97231970589 **P.I.** 08183101008

Risorse umane utilizzate per la realizzazione delle attività

Le attività scientifiche sono state svolte dal seguente personale strutturato, come indicato nella Determina Direttoriale prot. 29598 del 27/03/2023:

Dott. Marco Caruso	Primo Ricercatore II livello	Responsabile Scientifico di IFAC per il CREA
Dott.ssa Grazia Licciardello	Ricercatore II livello	Partecipante all'Azione 3 - Innovazione varietale e di portainnesto
Dott.ssa Donata Pietro Paolo	Collaboratore Tecnico VI Livello	Partecipante all'Azione 3 - Innovazione varietale e di portainnesto
Dott.ssa Maria Guardo	Collaboratore Tecnico VI Livello	Partecipante all'Azione 3 - Innovazione varietale e di portainnesto

Inoltre, è stata reclutata la dott.ssa Desiree Porrello in quanto vincitrice di una Borsa di Studio bandita in quota parte su IFAC per il trimestre maggio-luglio 2024.

Il Responsabile del progetto IFAC per il CREA
Dott. Marco Caruso

IL DIRETTORE
Dott. Enzo Perri