

## **Identificazione d'indici di vegetazione di alberi infetti da *Citrus tristeza virus* attraverso l'uso di uno spettroradiometro**

F. Santoro<sup>1</sup>, M. G. Angelini<sup>2</sup>, M. Bouneb<sup>1</sup>, S. Gualano<sup>1</sup>, A. M. D'Onghia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (CIHEAM) Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano (BA), Italy;

<sup>2</sup> DIASS, Facoltà di Ingegneria di Taranto, Via A. De Gasperi, s.n., 74100 Taranto

### **Riassunto**

In Italia si effettua annualmente il monitoraggio al *Citrus tristeza virus*, il virus più aggressivo per gli agrumi che, dal 2002, sta gravemente colpendo l'agrumicoltura in Sicilia, Puglia e Calabria. Al fine di individuare tempestivamente aree infette per poter limitare la diffusione del virus, nel presente lavoro si propone di mettere a punto l'acquisizione dei dati spettro radiometrici affinché possano essere di supporto all'utilizzo di dati ancillari e di immagini satellitari ad alta risoluzione. In particolare, al fine di acquisire la verità a terra, sia quella spettro radiometrica che sanitaria, nel periodo primaverile-estivo si è proceduto all'acquisizione delle firme spettrali di piante risultate positive e negative al CTV attraverso test sierologici (ELISA, DTBIA) e molecolari (PCR). Lo studio è stato condotto su due agrumeti commerciali (clementine 'Precoce di Massafra' e arancio 'Navelina') localizzati nelle aree focolaio CTV del comune di Massafra (Ta). I risultati della PCA (Principal Component Analysis), applicata alle firme spettrali e ad appropriati indici di vegetazione, evidenziano una possibile distinzione tra le piante CTV-negative e CTV-positive ed una discriminazione anche in funzione delle diverse specie.

### **Abstract**

In application of the national decree for the mandatory control of *Citrus tristeza virus* (CTV), since 2002 the citrus orchards and nurseries of Southern Italy (Sicily, Apulia and Calabria regions) are annually subjected to monitoring activity. In order to promptly identify infected areas and limit the disease spread, a remote sensing technique was set up, based on the use of captured radiometric spectrum data, ancillary data and high resolution satellite images. In particular, in order to obtain the correct spectral information at ground level, during spring and summer time the spectral radiometric signatures of several CTV-infected and healthy plants were acquired, the sanitary status of which was assessed by serological (ELISA, DTBIA) and molecular (PCR) tests. The study was conducted in two commercial citrus orchards located in CTV outbreaks at Massafra area. PCA (Principal Component Analysis) applied to the spectral signatures and to proper vegetation indices showed to be discriminative for CTV-infected and CTV-free plants and for plants of different species.

### **Introduzione**

Il *Citrus tristeza closterovirus* è una delle principali cause di perdita e distruzione degli agrumeti nel mondo, soprattutto se innestati sul portinnesto suscettibile, l'arancio amaro (Roistacher, 1991). La sua diffusione su larga scala, ad opera di afidi vettori, impone l'adozione di misure di prevenzione e controllo molto restrittive e ben regolamentate. In ottemperanza alla normativa vigente per la lotta obbligatoria al CTV in Italia (DM 22 novembre, 1996), ogni anno le regioni attuano il programma di monitoraggio al virus per l'identificazione ed eradicazione dei focolai di infezione. A seguito di queste attività, nel 2002 furono rinvenuti i primi focolai di CTV in campo nelle principali regioni

agrumicole. In Puglia, l'attività di controllo al virus è stata potenziata e, nel corso di questi anni, altri focolai della malattia sono stati individuati ed eradicati (Djelouah *et al.*, 2009). L'individuazione immediata dei focolai del virus e la conoscenza dell'evolvere temporale e spaziale dell'infezione, sin dal suo primo ritrovamento, è di fondamentale importanza a supporto di un programma di controllo del virus. A tal fine, le fotografie aeree e le immagini satellitari sono state già largamente impiegate con successo nelle attività di monitoraggio di altri patogeni e su altre colture, prevalentemente erbacee. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, il loro impiego non è supportato da un'adeguata conoscenza della verità a terra, ed i risultati ottenuti non sono del tutto attendibili. In questo lavoro, s'intende acquisire la conoscenza della verità a terra nei focolai di CTV attraverso le firme spettrali di alberi con stato sanitario accertato.

### Materiali e metodi

Nell'area focolaio del comune di Massafra (TA) sono stati scelti due campi commerciali infetti da CTV in percentuali differenti, rispettivamente di clementina 'Precoce di Massafra' e arancio dolce 'Navelina'. Per la raccolta dei campioni da analizzare in laboratorio è stato condotto un campionamento di tipo gerarchico (Gottwald *et al.*, 2000) (figura 1).

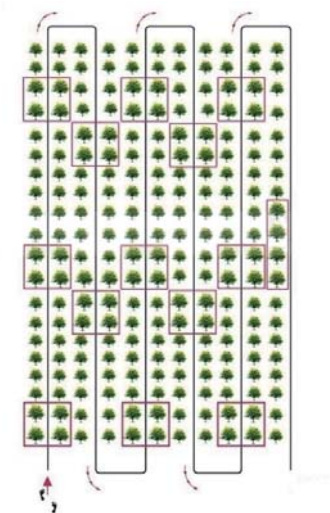


Figura 1 - Campionamento Gottwald gerarchico

Per valutare la percentuale d'infezione sono state effettuate analisi sierologiche di tipo massale, quali il DTBIA (*Direct Tissue Blot ImmunoAssay*) (Garnsey *et al.*, 1993) e il DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Bar Joseph *et al.*, 1979). Inoltre, è stata applicata la IC-RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) (Nolasco *et al.*, 1993) su tutti i campioni che sono risultati sierologicamente negativi al CTV, per accertare, con maggior sensibilità, l'assenza del virus.

In ogni campo oggetto di studio la firma spettrale è stata rilevata su 24 alberi (12 CTV-positivi e 12 CTV-negativi) saggiati con DTBIA e/o DAS ELISA. A livello di chioma, la firma spettrale è stata acquisita con lo spettroradiometro ("FieldSpec® HandHeld" della ASD), mentre a livello di foglia con l'accessorio Plant Probe collegato allo spettroradiometro tramite fibra ottica.

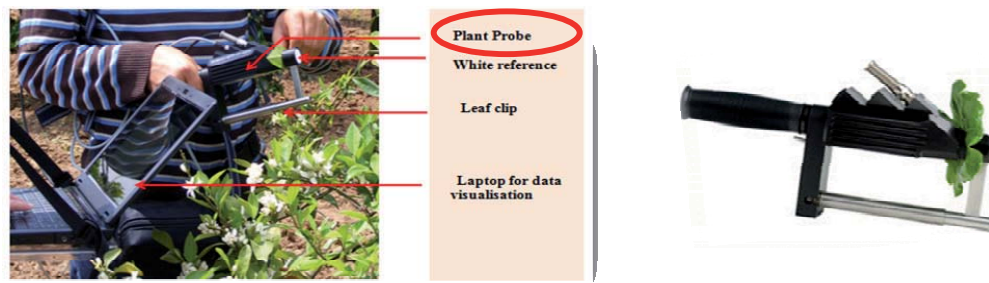


Figura 2 – Plant Probe ASD

Per misurare la riflettanza a livello di chioma, lo spettroradiometro è stato posizionato ad un'altezza compresa tra i 2 e i 5 m (figura 3a), impiegando un supporto meccanico periscopico (figura 3b).

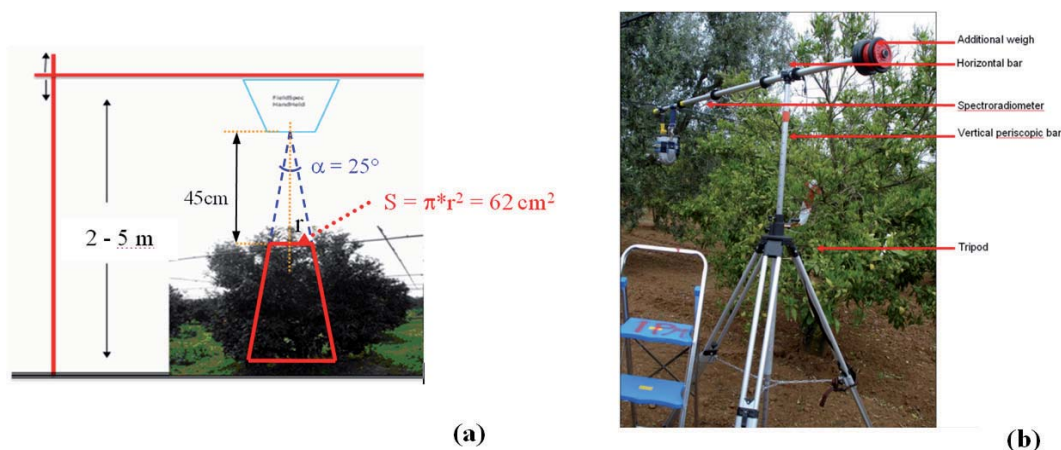


Figura 3 - a) Schema geometrico delle misure spettroradiometriche e supporto meccanico b)

Al fine di limitare gli effetti della BRDF (figura 4a), le misure sono state condotte tra le 9:00 e le 12:00 al nadir, seguendo 3 steps principali:

1. operazione di *white reference* con l'ausilio di un pannello di riferimento (spectralon a riflettanza del 98%);
2. posizionamento dello strumento nel piano *sole-target* ad un'altezza di circa 45 cm dalla chioma;
3. rilievo spettrale dell'intera chioma (circa 8-14 punti di misura per albero), includendo le misure del suolo nudo (flag di riferimento) (figura 4b).

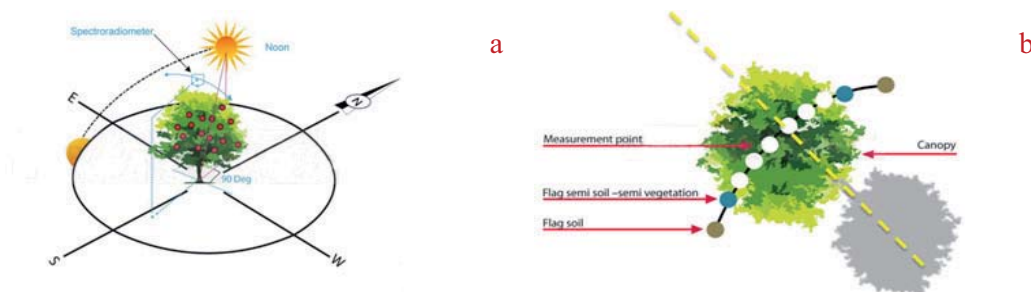


Figura 4 - Spectroradiometro e scelta dei punti di misura

Le firme spettrali acquisite in DN (Digital Number) sono state pre-processate eliminando quelle relative ai flags di controllo; successivamente sono state convertite in curve di riflettanza e mediate per ciascuna chioma. Per confrontare i dati ancillari ed individuare le possibili differenze, non solo fra le specie d'agrume ma anche tra gli alberi CTV-positivi e CTV-negativi, è stato generato il dataset delle firme spettrali su cui è stata applicata la tecnica di analisi statistica multivariata PCA (Principal Component Analysis) (Jolliffe, 2002), che ha individuato 27 componenti principali (significative e non). Inoltre, per quantificare e valutare le differenze spettrali tra alberi CTV-positivi e negativi, sono stati valutati alcuni indici di vegetazione (Jensen, 2000). In particolare, relativamente ai sintomi della malattia, è stato valutato il Chlorophyll Normalized Difference Index (ChlNDI) (Gitelson *et al.*, 1996), il Photochemical Reflectance Index (PRI) (Gamon *et al.*, 1997), il Water Band Normalized Index (WBNI) (Penuelas *et al.*, 1997), il Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) ed il modified Chlorophyll Absorption Index (mCAI) (Oppelt *et al.*, 2001) con i suoi derivati (mNCAI e mNhCAI).

### Risultati

L'analisi PCA applicata al dataset contenente le due specie, ha evidenziato 13 componenti principali significative e la migliore visualizzazione dei *cases* è stata ottenuta nel piano PC1 (88.91% delle informazioni totali) e PC2 (4.77%), ottenendo una evidente discriminazione tra le due specie (figura 5).

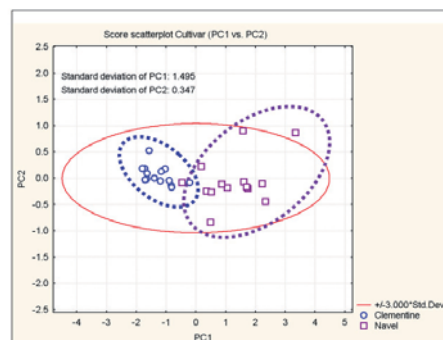


Figura 5 - Projection by PCA for the classification of species

L'esito della PCA applicata al dataset della singola specie, sia a livello di foglia che di chioma, ha evidenziato 6 componenti principali significative nel piano PC1 e PC2 per l'arancio, e 6 componenti principali significative nel piano PC5 e PC6 per le clementine, evidenziando la discriminazione tra alberi CTV-negativi e CTV-positivi (figura 6).

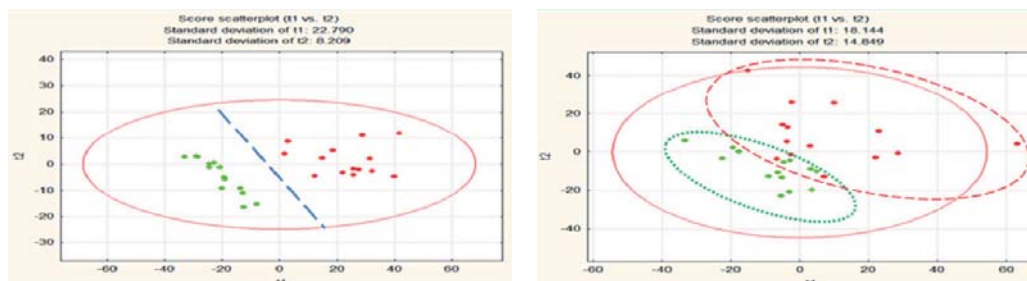


Figura 6 – Visualizzazione della PCA per l'arancio dolce a livello di leaf (sx) e canopy (dx)

La valutazione degli indici di vegetazione hanno confermato i risultati ottenuti dall'applicazione dell'analisi PCA (figura 7 e 8).

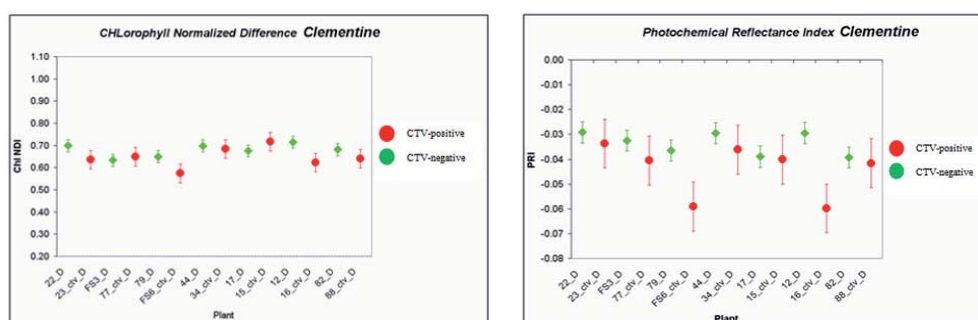


Figura 7 – Indici di vegetazione ChlNDI e PRI per le clementine

Per le clementine i valori degli indici calcolati mostrano una differenziazione tra le piante CTV-positive, anche mostrando uno stato asintomatico, e CTV-negative. In particolare, il WBNI presenta un valore medio più basso per le piante infette evidenziando una insufficienza di acqua, mentre il PRI, indicatore dell'efficienza fotosintetica, mostra un valore medio più alto rispetto a quello delle piante sane.

Per l'arancio dolce gli indici WBNI, ChlNDI e mNhCAI evidenziano, nelle piante infette, un basso contenuto di acqua e di clorofilla (valore medio basso), mentre il PRI, come per le clementine, mostra un valore medio più alto.

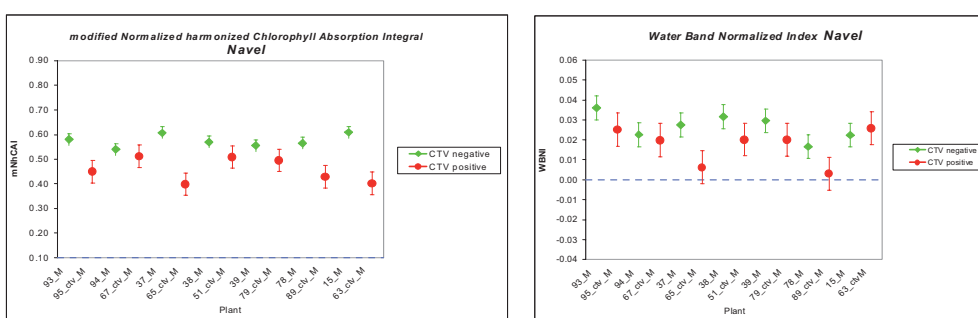


Figura 8 - Indici di vegetazione mhCAI e WBNI per l'arancio dolce

## Conclusioni

L'analisi dei dati di riflettanza acquisiti con spettroradiometro ha evidenziato l'applicabilità della tecnica di proximal sensing all'identificazione di piante infette da CTV. I dati di riflettanza analizzati statisticamente consentono una netta discriminazione tra specie di agrumi, mentre gli indici di vegetazione consentono di rilevare lo stato di stress a livello di foglia e di chioma, in particolare quelli relativi al contenuto idrico, all'assorbimento di clorofilla e all'attività fotochimica. Il ChINDI, il WBNI, l'NDVI, l'mCAI e il PRI, infatti, mostrano una variabilità relativa in funzione della presenza e l'assenza dell'infezione. Nel caso dell'arancio dolce tali indici discriminano completamente gli alberi CTV-positivi da CTV-negativi. Nel caso del clementine, invece, solo il WBNI e il PRI consentono una separazione fra le piante CTV-positive e CTV-negative. Pertanto, questi parametri indicano uno stato di stress a livello di foglia e di chioma in relazione alla presenza del CTV. Sulla base di questi risultati preliminari si concretizza la possibilità di identificare l'infezione da CTV anche in alberi apparentemente asintomatici (clementine). Sviluppi futuri mirano all'integrazione dei dati di riflettanza con dati derivanti dall'analisi di immagini satellitari ad alta risoluzione al fine di mettere a punto uno strumento a supporto del monitoraggio della malattia e della sua epidemiologia su larga scala.

## Bibliografia

- Bar Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F. e Loebenstein, G. (1979). The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190-194.
- Djelouah, K., Valentini, F., Birisk, N., Yahiaoui, D., Percoco, A., Addante, R., D'Onghia, A. M. (2009). Occurrence, distribution and characterization of citrus tristeza virus (CTV) and relative vectors in Apulia region, South-East Italy, 17<sup>th</sup> Conf. IOCV, Turkey – 2007 (in press).
- Gamon J.A., Serrano L. and Surfus J.S (1997). The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia*, 112(4):492-501.
- Garnsey S.M., Permar T.A., Cambra M. and Henderson C.T. (1993). Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: Moreno P., da Garca J.V. and Timmer L.W. (eds.). *Proceeding of the XII Conference of the International Organization of Citrus Virologist, New Delhi, India, 1992*. IOCV, Riverside, pp. 39-50.
- Gitelson A.A. and Merzlyak M.N. (1996). Signature analysis of leaf reflectance spectra: Algorithm development for remote sensing of chlorophyll. *Journal of Plant Physiology*, 148(3): 494-500.
- Gottwald T.R. and Hughes G. (2000). A new survey method for citrus Tristeza virus disease assessment. In: da Garca J.V., Lee R.F. and Yokomi R.K. (eds.). *Proceedings of the XIV conference of the International Organization of Citrus Virologist, Sao Paulo, Brazil, 1998*. IOCV, Riverside, pp. 77-87.
- Jensen J.R. (2000). *Remote Sensing of the Environment: an Earth Resource Perspective*. Prentice Hall, New Jersey.
- Jolliffe, I.T. (2002). *Principal component analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York, USA.
- Nolasco G, de Blas C, Torres V e Ponz F (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* 45, 201-218.
- Oppelt N. and Mauser W. (2001). The chlorophyll content of maize (zea mays) derived with the Airborne Imaging Spectrometer AVIS. In: ISPRS (ed.). *Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Symposium of Physical measurements and signatures in remote sensing, Aussois, France, January 8-12 2001*. CNES, Toulouse pp. 407-412.
- Penuelas J., Filella I., Gamon J.A. and Field C. (1997). Assessing photosynthetic radiation-use efficiency of emergent aquatic vegetation from spectral reflectance. *Aquatic Botany*. 58(3): 307-315.
- Roistacher C.N. (1991). *Graft-transmissible diseases of citru: handbook for detection and diagnosis*. FAO Edition, Rome.