

REPUBBLICA ITALIANA



*Regione Siciliana*  
**ASSESSORATO REGIONALE DELL'AGRICOLTURA, DELLO  
SVILUPPO RURALE  
E DELLA PESCA MEDITERRANEA  
DIPARTIMENTO REGIONALE DELL'AGRICOLTURA**



## DOCUMENTI TECNICI

Linee guida per la predisposizione del piano di controllo dei punti critici e di gestione dei rischi connessi agli organismi nocivi - Reg. 827/2019

**PROCEDURA OPERATIVA STANDARD – POS**

## **AGRUMI e AGRUMI ORNAMENTALI**

**Allegato II**

### **Schede tecniche Organismi Nocivi**

Rev.1.0

## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

### 1- Nome comune dell'organismo/Common name of the pest

MOSCA ORIENTALE DELLA FRUTTA/ORIENTAL FRUIT FLY

### 2 - Nome scientifico/Scientific name

*Bactrocera dorsalis* (Hendel)

Synonyms (EFSA, 2019): among others *Bactrocera ferruginea* Bezzi, 1913; *Bactrocera invadens* Drew, Tsuruta &

White, 2005; *Bactrocera papayae* Drew & Hancock, 1994; *Bactrocera philippinensis* Drew & Hancock, 1994; *Bactrocera (Bactrocera) variabilis* Lin & Wang, 2011; *Chaetodacus ferrugineus* Bezzi, 1916; *Chaetodacus ferrugineus* var. *dorsalis* Hendel, 1915; *Chaetodacus ferrugineus dorsalis* Bezzi, 1916; *Chaetodacus ferrugineus* var. *okinawanus* Shiraki, 1933; *Dacus ferrugineus* (Fabricius, 1805); *Dacus dorsalis* Hendel, 1912; *Dacus (Bactrocera) semifemoralis* Tseng, Chen & Chu, 1992; *Dacus (Bactrocera) yilanensis* Tseng, Chen & Chu, 1992; *Musca ferruginea* Fabricius, 1794; *Strumeta dorsalis* Hering, 1956; *Strumeta ferruginea* Hering, 1956; *Strumeta dorsalis okinawana* Shiraki, 1968.

### 3 – EPPO Code:

DACUDO

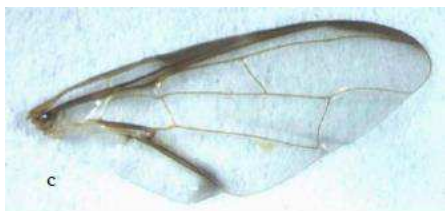
### 4 - Posizione tassonomica / Taxonomy

- Phylum: Arthropoda
- Subphylum: Hexapoda
- Classe: Insecta
- Ordine: Diptera
- Famiglia: Tephritidae
- Genere: *Bactrocera*
- Specie: *Bactrocera dorsalis*

### 5 - Morfologia e biologia dell'organismo/*Morphology and biology of the pest*



Gli adulti hanno una lunghezza di circa 6-8 mm. La femmina ha un ovopositore affusolato che è di solito tra 1,4 e 1,6 mm di lunghezza.



Le ali di entrambi i sessi hanno una lunghezza di circa 6-7 mm e sono contrassegnate da una banda sottile e marrone lungo il margine e una banda marrone diagonale dalla base dell'ala al bordo posteriore.

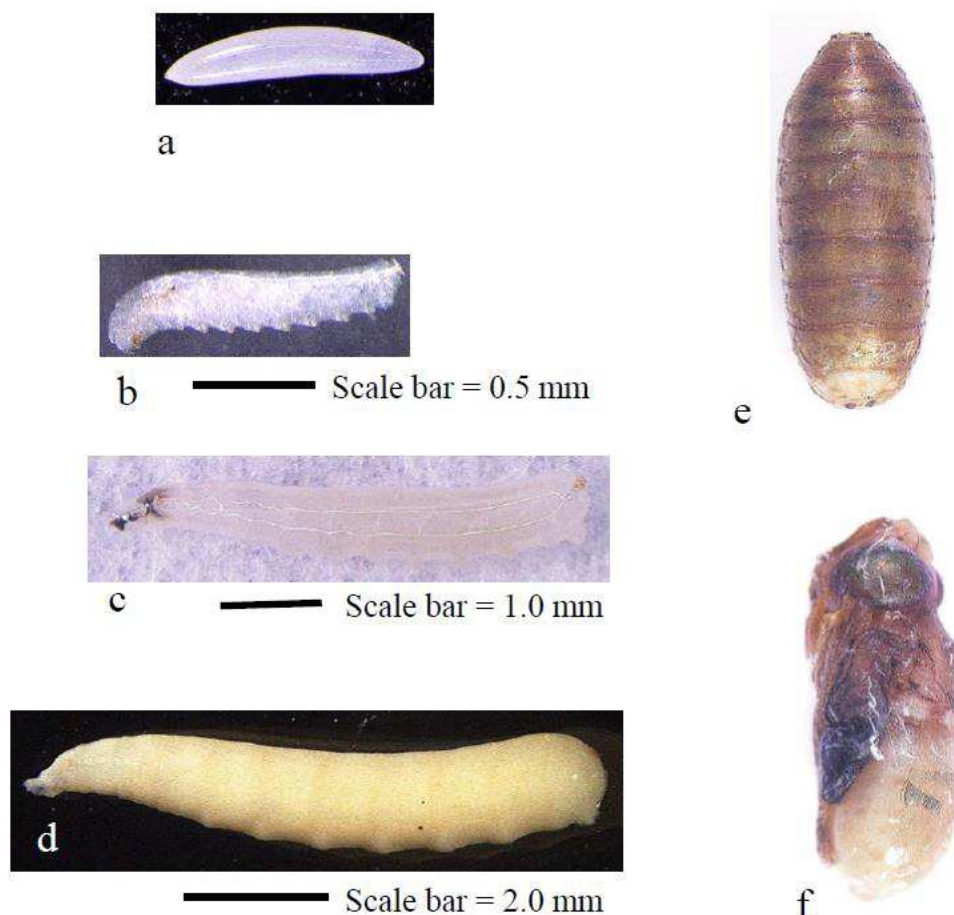


Dorsalmente il torace ha un colore di base scuro e due strisce gialle brillanti chiamate vitte e la parte posteriore (scutello) anch'essa gialla. Anche lateralmente il torace presenta delle altre macchie / strisce gialle. L'addome è giallastro /brunastro e medialmente è presente un tipico disegno nero a forma di T.

Gli stadi immaturi sono larve dal color crema al giallastro che raggiungono 7,5-10,0 mm di lunghezza e vivono a spese della polpa dei frutti.

Gli stadi pupali sono marroncino chiaro o scuro.

Molte volte la diagnostica non è di facile applicazione in quanto sono state riportate evidenze di ibridazione tra specie diverse di *Bactrocera* in condizioni di laboratorio (McInnis et al., 1999; Ebina and Ohto, 2006; Schutze et al., 2013) e alcune di queste hanno corroborato i lavori successivi di sinonimia tra *B. invadens* e *B. dorsalis* (Delomen et al., 2013; Jalani et al., 2014, Schutze et al., 2014).



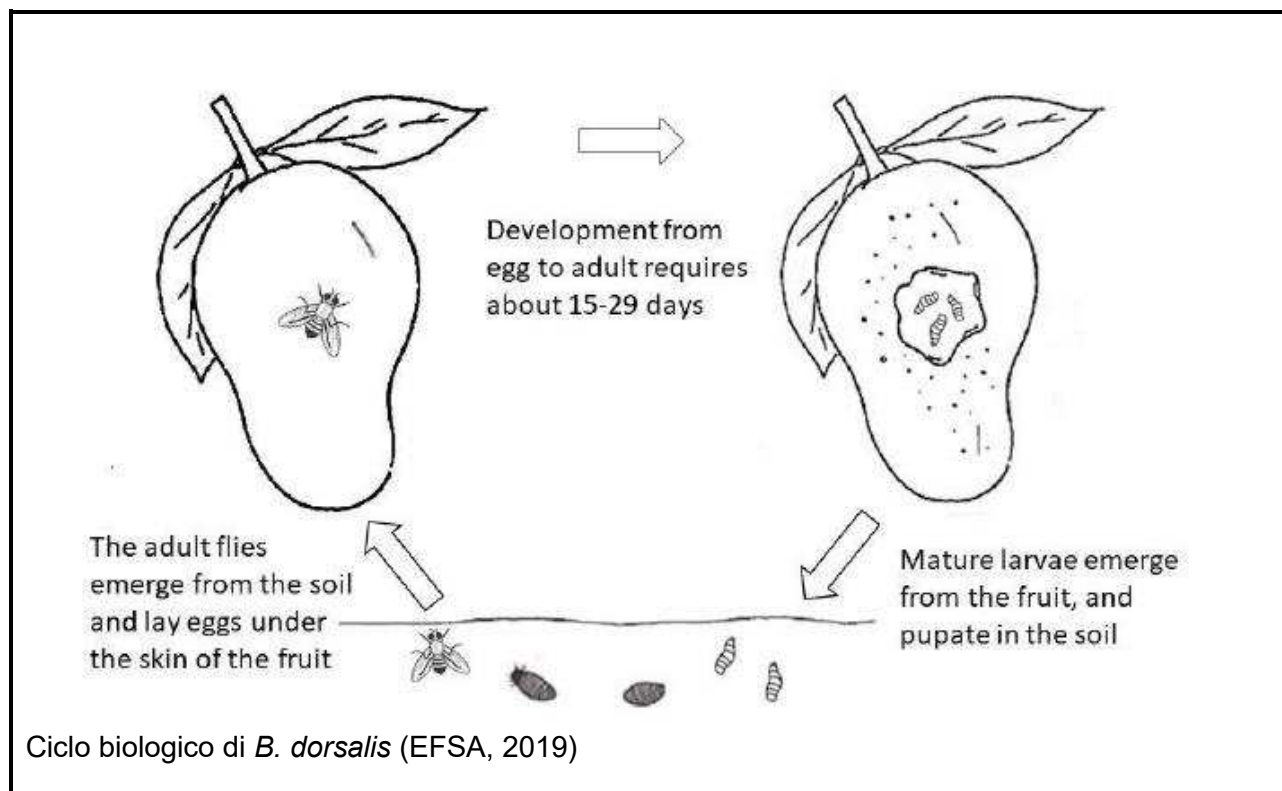
**Stadi preimmaginali di *Bactrocera dorsalis*:** (a) uovo; (b) larva di prima età; (c) larva di seconda età; (d) larva di terza età; (f) pupa. **Pupario di *B. dorsalis*** (e)

(Foto: ISPM 27 - Diagnostic protocols for regulated pests - DP 29: *Bactrocera dorsalis*. Adopted 2019; published 2019)

Gli adulti sono presenti tutto l'anno in habitat tropicali dove i frutti ospiti sono continuamente presenti. In condizioni naturali, lo stadio di uovo dura in genere 1-3 giorni, lo stadio larvale 9-16 giorni, il periodo pupale 10-12 giorni o più, e il periodo di riproduzione pre-riproduttiva 8-12 giorni. La durata della vita di un adulto è in genere di 1-3 mesi, sebbene siano stati notati individui più longevi. Compie 6-7 generazioni all'anno alle Hawaii. Il ciclo di vita in Florida è indicativamente di circa 30 giorni durante i mesi caldi. Le femmine depongono gruppi di 3-15 uova nei frutti dell'ospite. La fecondità femminile media è tra 1.200 e 1.500 uova, con un massimo di 3.000 uova. Le temperature minime e massime di sviluppo dei diversi stadi di *B. dorsalis* sono quelle appresso riportate in tabella (Samayoa et al. 2018)

Parametri	Stadi di sviluppo		
	Uovo	Larva	Pupa
T <sub>Min</sub>	9,75	10,24	12,00
T <sub>Max</sub>	36,22	36,40	79,48

Gli adulti della mosca orientale della frutta iniziano ad emergere dai pupari svernanti quando la temperatura del suolo è superiore a 16°C, la temperatura ottimale è di 19 - 22°C.



## 6 - Piante ospiti/Hosts

*Bactrocera dorsalis* attacca i frutti di oltre 400 diverse specie vegetali. Alle Hawaii, i frutti in grado di ospitare l'ovideposizione del dittero includono fico, nespolo, mango, arancia, pesca, prugna, sapote, annona (soursop), ciliegio del Suriname, mandarino, mandorla tropicale e guava.

In studi cinesi è descritto che l'adulto di *B. dorsalis* danneggia, frutti con il seguente ordine decrescente:

guava > carambola > pesco > mango > nespolo (dato non confermato nella regione di Suzhou) > arancio > giuggiola (*Ziziphus jujuba*) > pera > cedro > papaia > melograno (CHEN Jing-yun et al. 2011).

In Italia, nel piano di sorveglianza nazionale, sono state considerate come specie ospiti a maggior rischio fitosanitario: *Citrus paradisi*; *Citrus reticulata*; *Citrus sinensis*; *Citrus x paradisi*; *Citrus x tangelo*; *Diospyros kaki*; *Eriobotrya japonica*; *Ficus carica*; *Fortunella japonica*; *Prunus persica* (fra gli ospiti principali); *Phaseolus vulgaris*; *Prunus avium*; *Prunus domestica*; *Prunus salicina*; *Punica granatum*; *Pyrus communis*; *Pyrus pyrifolia*; *Solanum lycopersicum*; *Solanum melongena*; *Vitis vinifera*; *Capsicum annum*; *Citrullus lanatus*; *Citrus aurantiifolia*; *Citrus limon*; *Citrus maxima*; *Cucumis melo*; *Cucumis sativus*; *Cucurbita maxima*; *Cucurbita pepo*; *Lycopersicon esculentum*; *Malus domestica*; *Morus alba*; *Morus nigra* (fra gli ospiti secondari)

L'elenco completo delle specie vegetali i cui frutti ospitano gli stadi preimmaginali della mosca orientale della frutta è riportato in allegato 1 ed è stato redatto integrando elementi acquisiti da diverse banche dati e dalla consultazione di articoli di recente pubblicazione, riportati nella bibliografia dello stesso allegato.

**7 - Siti a rischio da monitorare/Typology of location to be surveyed**

Il rischio maggiore d'introduzione di *B. dorsalis* deriva dall'importazione di frutta infestata contenente uova e/o larve del tefritide, come parte di un carico proveniente da un Paese in cui la mosca è presente e diffusa.

Le intercettazioni avvenute in Italia hanno riguardato sia prodotti ortofrutticoli appartenenti a spedizioni commerciali, sia frutti introdotti sul territorio nazionale all'interno di bagagli a seguito di passeggeri provenienti da Paesi quali il Bangladesh e lo Sri Lanka.

Le aree a rischio devono essere stabilite dai SFR ponderando diversi fattori tra i quali aree potenzialmente sensibili:

- aree di produzione di frutti sensibili;
- aree marginali alle aree di produzione;
- aree urbane a elevato rischio d'introduzione per la presenza di comunità originarie di Paesi terzi in cui la mosca è presente;
- punti d'ingresso (porti ed aeroporti e magazzini doganali di primo stoccaggio della frutta importata);
- altre aree a elevato rischio come i mercati ortofrutticoli, magazzini che trattano frutta esotica, ecc.

## PARTE A - MONITORAGGIO/SURVEY

### Normativa di riferimento su modalità di monitoraggio:

- **EUROPEA:** Regolamento delegato (UE) 2019/1702 della Commissione del 1 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **NAZIONALE:** Piano di azione nazionale approvato da CFN nella seduta del 22 marzo 2019 – composto da : PIANO DI SORVEGLIANZA NAZIONALE, PIANO DI EMERGENZA e PIANO D'AZIONE.

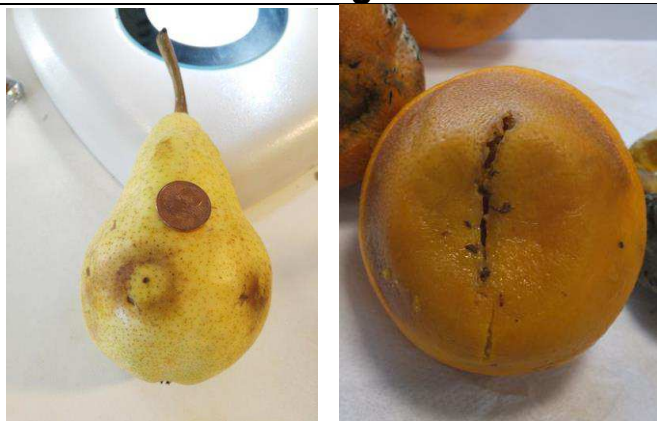
### Standards di riferimento su modalità di monitoraggio:

- **FAO - ISPM:** ISPM 26: Establishment of pest free areas for fruit flies (Tephritidae)

### Misure di monitoraggio:

- ✓ Ispezione visiva – *Visual inspection*
- ✓ Monitoraggio con trappole - *Trapping*
- ✓ Campionamento – *Sample taking*

### Ispezione visiva/*Visual inspection*

Quando	Cosa guardare	Immagini
<p>- TUTTO L'ANNO</p> <p>Nei Punti di Ingresso Frontalieri o in aree considerate a rischio fitosanitario per l'ingresso di questo pest.</p> <p>- TARDA PRIMAVERA – AUTUNNO</p> <p>In campo, durante il periodo di maturazione della frutta.</p>	<p>Danni su frutti in via di maturazione provocati dalla puntura di ovideposizione effettuata dalle femmine che provoca marcescenze acute dall'ingresso di microrganismi fungini.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Foro di ovideposizione con inizio marcescenza della polpa</li> <li>• Frutti in marcescenza con larve interne</li> </ul>	

### Monitoraggio con Trappole/*Trapping*

Il monitoraggio con trappole è alla base del Piano di sorveglianza nazionale per *Bactrocera dorsalis*.

Così come previsto dal Piano di Sorveglianza Nazionale, nelle aree libere da mosca orientale della frutta, il monitoraggio dovrà essere effettuato principalmente attraverso l'utilizzo di trappole attrattive. Le trappole, tipo *McPhail*, attivate con il metileugenolo risultano efficaci nell'individuazione precoce dell'organismo alieno - "Early detection" (EPPO database - PRA record for *Bactrocera invadens*).

Densità delle trappole suggerita per *Bactrocera dorsalis* (ISPM 26)

Tipologia di monitoraggio	Tipo di trappola	Attrattivo	Densità trappole /km <sup>2</sup>			
			Area produttiva	Area marginale	Area urbana	Punti d'ingresso
Indagini per la Sorveglianza del territorio	ChamP trap Easy trap Jackson trap Lynfield trap <b>McPhail trap</b> Multilure trap Maghreb-Med or Morocco trap Steiner trap	Cuelure <b>Methyl eugenol</b> Attrattivi alimentari proteici	0,25-1,00	0,2-0,5	0,2-0,5	0,2-0,5



Quando	Cosa guardare	Immagini
<p>APRILE - NOVEMBRE</p>	<p>Adulti, sia maschi che femmine, catturati da trappola innescata con paraferomone Metileugenolo e attrattivo alimentare (es Torula, lieviti vari)</p>	<div data-bbox="858 264 1385 900" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="1018 974 1268 1003">TRAPPOLA McPhail</p> <div data-bbox="866 1048 1417 1720" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="1050 1758 1236 1787">REBELL TRAP</p>

**Modalità di gestione campioni biologici presenti nella trappola (da all.3 Piano sorveglianza nazionale):**

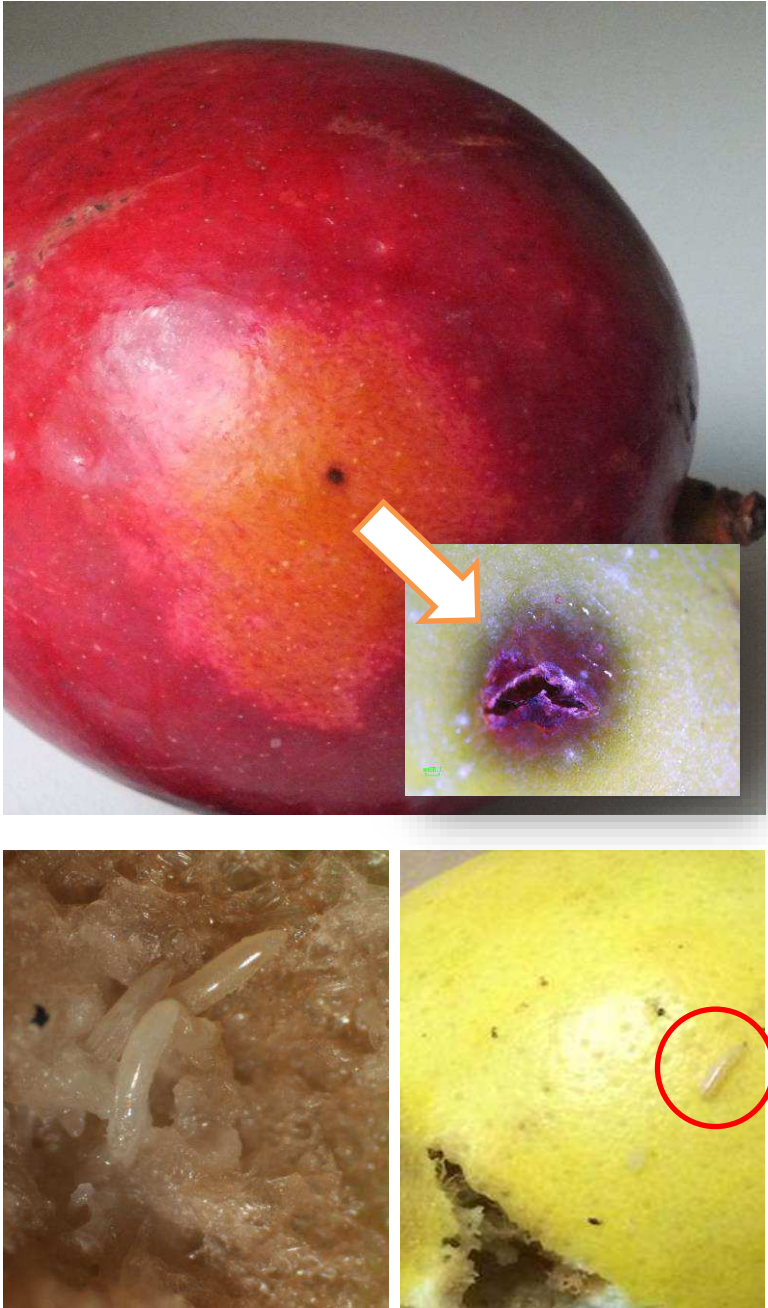
1) In presenza di SOLI individui MORTI all'interno della trappola

- ruotare il fondo al fine di separarlo dal coperchio superiore;
- recuperare delicatamente ogni campione con l'ausilio di una pinzetta morbida, al fine di evitare danni;
- inserire ogni campione in un singolo contenitore a chiusura ermetica (tipo eppendorf o falcon);
- scrivere sul contenitore il codice del campione, il numero o codice della trappola, luogo, data con un pennarello indelebile;
- posizionare i contenitori in busta di plastica chiusa;
- riportare le informazioni dei campioni anche sulla busta- contenitore (il numero o codice della trappola, luogo, data, numero di campioni contenuti nella busta);
- conservare la busta in borsa frigo o frigorifero (se in dotazione) e trasportarla presso il laboratorio di riferimento;
- in laboratorio i campioni dovranno essere conservati a -20°C sino al loro utilizzo avendo cura di staccare da ogni insetto catturato almeno la zampa anteriore destra (o in mancanza un'altra zampa) per conservarla in alcool assoluto a -20°C.

## 2) In presenza di individui VIVI all'interno della trappola

- staccare la trappola dal supporto e spruzzare attraverso il foro inferiore una leggera quantità di ghiaccio spray;
- verificare l'immobilità degli individui, in caso contrario spruzzare nuovamente una leggera quantità di ghiaccio spray;
- ruotare il fondo al fine di separarlo dal coperchio superiore;
- recuperare delicatamente ogni campione con l'ausilio di una pinzetta morbida, al fine di evitare danni;
- inserire ogni campione in un singolo contenitore a chiusura ermetica (tipo eppendorf o falcon);
- scrivere sul contenitore il codice del campione, il numero o codice della trappola, luogo, data con un pennarello nero indelebile;
- posizionare i contenitori in busta di plastica chiusa;
- riportare le informazioni dei campioni anche sulla busta-contenitore (il numero o codice della trappola, luogo, data, numero di campioni contenuti nella busta);
- conservare la busta in borsa frigo o frigorifero (se in dotazione) e trasportarla presso il laboratorio di riferimento;
- in laboratorio i campioni dovranno essere conservati a -20°C sino al loro utilizzo avendo cura di staccare almeno la zampa anteriore destra (o in mancanza un'altra zampa) per conservarla in alcool assoluto a -20°C.

CONSULTARE INOLTRE FAO/IAEA. 2018

<b>Campionamento/Sample taking</b>		
<b>Cosa prelevare</b>	<b>Immagini</b>	<b>Come conservare</b>
<p>Frutti maturi con sintomi di ovideposizione di dittero tephritidae da cui isolare:</p> <p>➤ <b>Uova/Larve</b></p>	 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>UOVA</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>LARVE</p> </div> </div>	<p>Conservare le uova o le larve di dittero raccolte dai frutti ispezionati, singolarmente in alcool puro per l'identificazione molecolare.</p>

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

### Inquadramento normativo

- **EUROPEA:**

Direttiva UE 29/2000 – Allegato 1 – Organismo di quarantena fitosanitaria per il territorio europeo;

*Bactrocera dorsalis* – organismo prioritario UE – stabilito dal Regolamento delegato (UE) 2019/1702 della Commissione del 1 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;

### Inquadramento EPPO

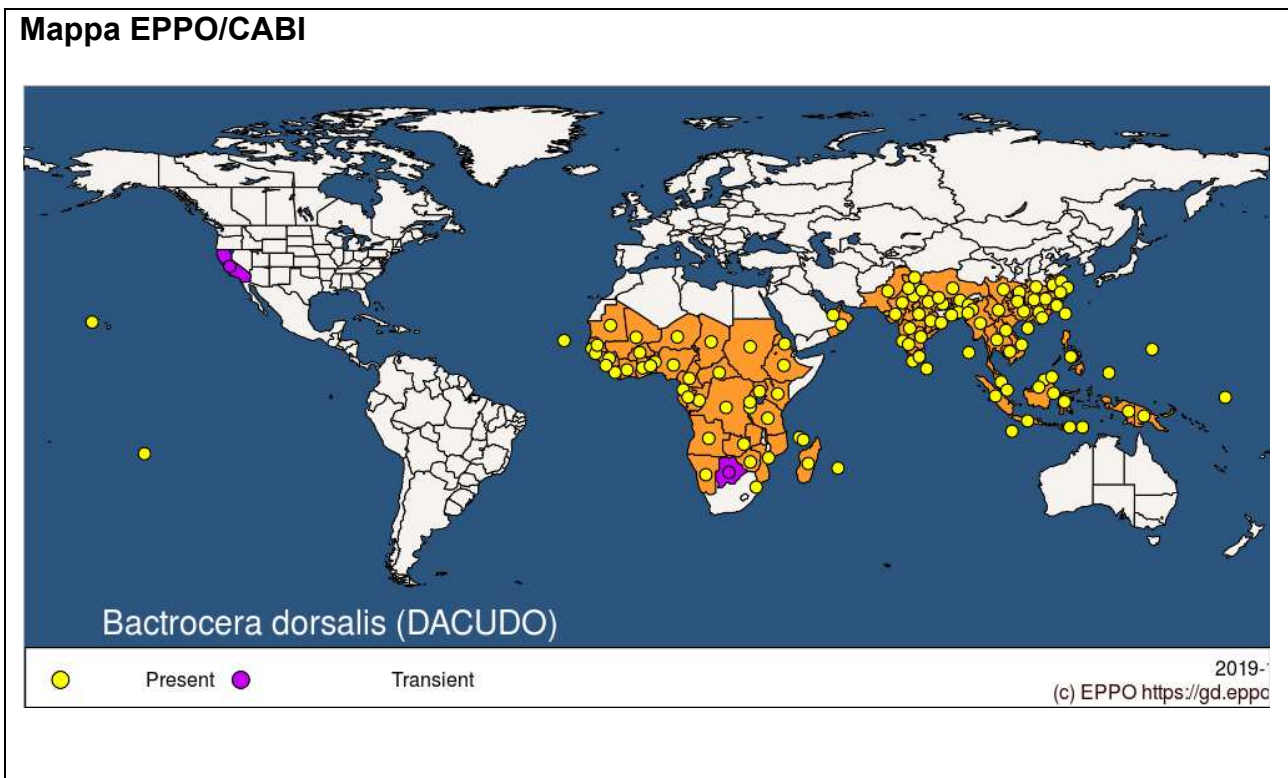
EPPO – Lista A1 - List of pests recommended for regulation as quarantine pests

### Origini:

L'areale d'origine di *B. dorsalis* è sud est asiatico

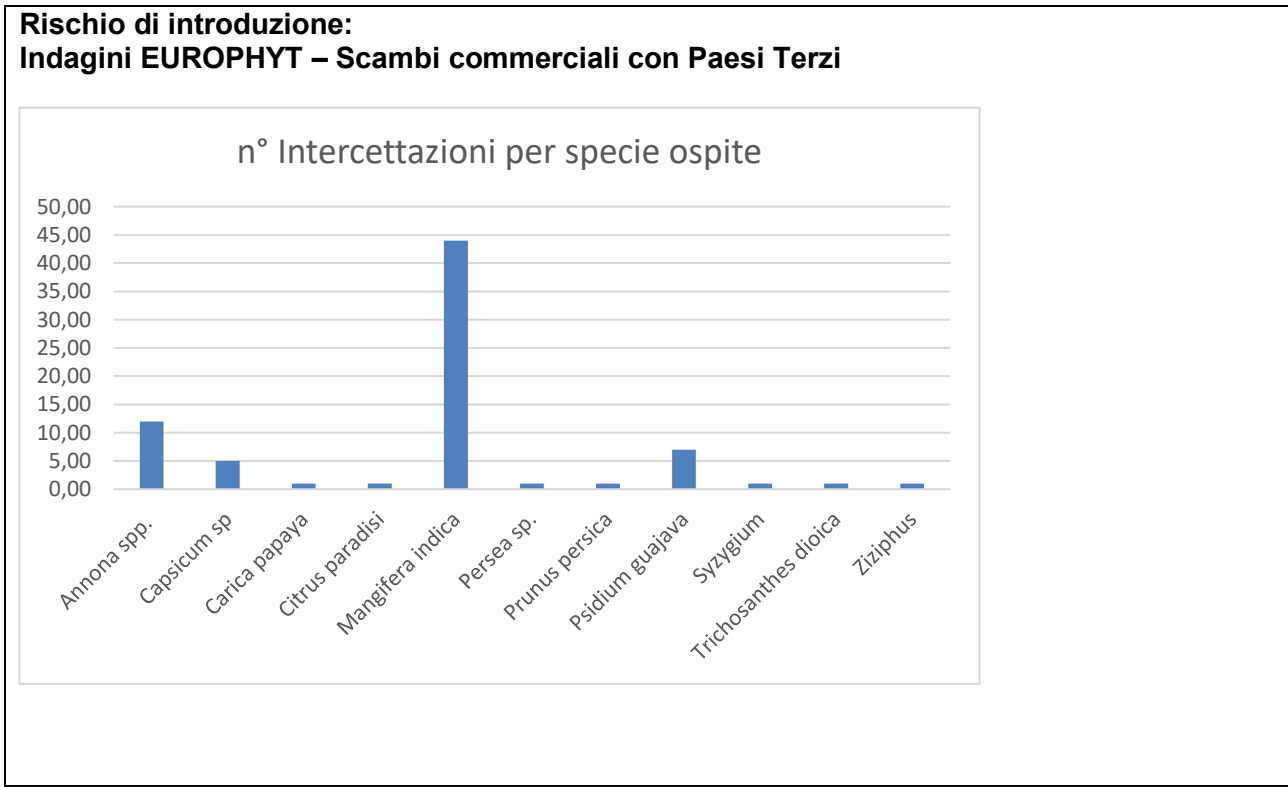
### Distribuzione:

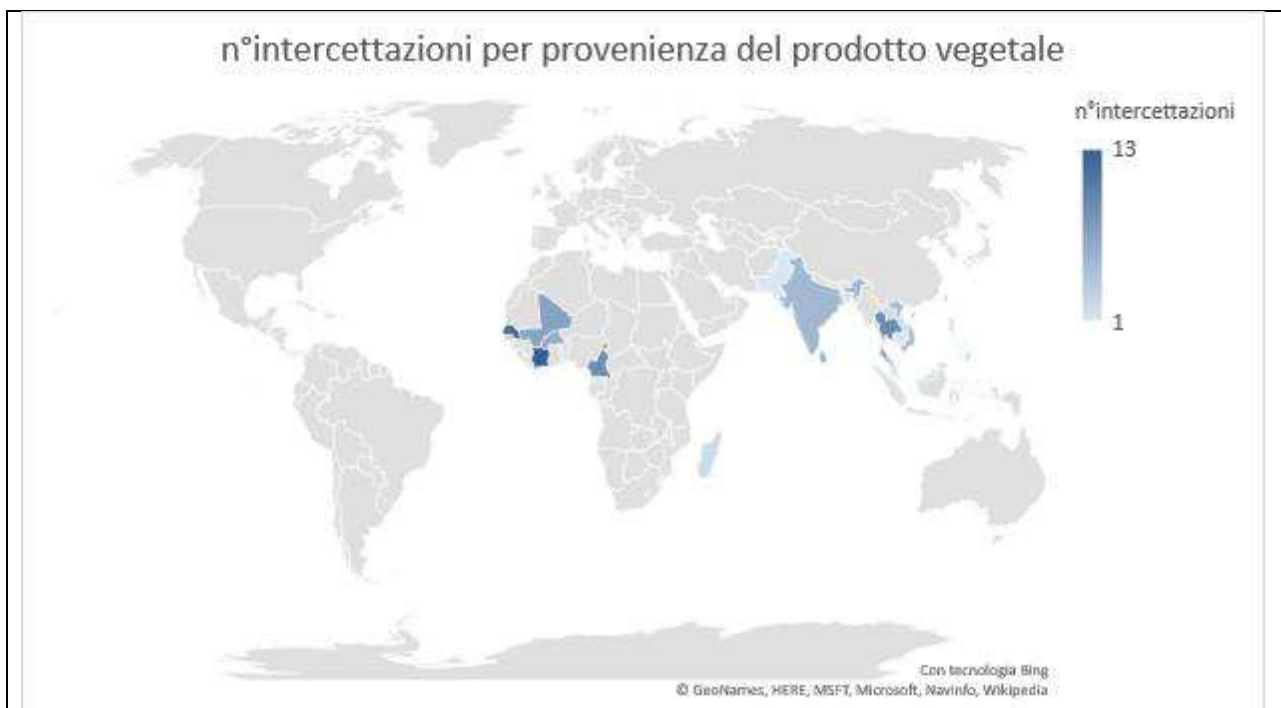
- Area EPPO: assente
- EU: Assente
- Asia: Bangladesh, Bhutan, Cambogia, Cina (Sud: Fujian, Guangdong, Guangxi, Guizhou, Hainan, Hunan, Sichuan, Yunnan), Hong Kong, India (principalmente nord: Assam, Bihar, Delhi, Haryana, Jammu e Kashmir, Karnataka, Maharashtra, Manipur, Orissa, Punjab, Rajasthan, Sikkim, Tamil Nadu, Uttar Pradesh, West Bengal), Giappone (Ryukyu Arcipelago, eradicata nel 1985), Lao, Myanmar, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, Taiwan, Thailand (nord), Emirati Arabi Uniti, Viet Nam.
- Nord America: Focolai in USA (California, Florida), eradicato (FAO, 1987) ma nuovi focolai ancora in California e in Florida nel 1989 e in anni successivi. Riportato nelle Hawaii dal 1945.
- Oceania: Guam (1947, eradicated), Nauru. Un focolaio nel Northern Mariana Islands (Rota) che è stato eradicato (Nakagawa et al., 1968) e Polinesia Francese (1996).
- Africa: Kenya (2003), in pochi anni *B. dorsalis* si è sviluppata attraverso tutta la regione subsahariana.



**Presenza e/o segnalazioni in Italia:**

Non insediata; Transiente (EPPO status) – intercettati adulti maschi 2018 – 2019





### INTERCETTAZIONI ULTIMI 5 ANNI *BACTROCERA DORSALIS*

Country of Export	Year	Object	Plant Species
Uganda	2019	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1)
Philippines	2019	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1); <i>Annona muricata</i> (1)
Burkina faso	2019	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1)
Bangladesh	2019	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1)
Thailandia	2018	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1)
Sri Lanka	2018	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Syzygium</i> (1)
Mali	2018	Plant products: others	<i>Mangifera indica</i> (1)
Cote D'Ivoire	2018	Plant products: others	<i>Mangifera indica</i> (1)
Cote D'Ivoire	2018	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (3)
Vietnam	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Psidium guajava</i> (1); <i>Annona</i> (1)

Thailandia	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Annona squamosa</i> (2)
Senegal	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (12)
Pakistan	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Manilkara zapota</i> (1)
Mali	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (5)
Malaysia	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Psidium guajava</i> (1)
Lao People's democratic republic	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Annona muricata</i> (1)
India	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Ziziphus</i> (1)
Burkina faso	2017	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (5)
Vietnam	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Syzygium samrangense</i> (1); <i>Syzygium jambos</i> (1); <i>Annona</i> (1)
Togo	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1)
Thailandia	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (3)
Thailandia	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Annona squamosa</i> (1)
Senegal	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (3)
Mali	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (14)
Indonesia	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Psidium guajava</i> (1)
Camerun	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (3); <i>Citrus</i> <i>maxima</i> (1)
Burkina faso	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (4)
Bangladesh	2016	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1)
Vietnam	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (2)
Thailandia	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (1); <i>Capsicum</i> <i>sp</i> (1)

Philippines	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Annona muricata</i> (1)
Madagascar	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Mangifera indica</i> (2)
Lao People's democratic republic	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Capsicum sp</i> (1)
India	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Psidium guajava</i> (1) <i>Prunus persica</i> (1)
Camerun	2015	Other living plants: fruits and vegetables	<i>Psidium guajava</i> (1); <i>Persea sp.</i> (1); <i>Mangifera indica</i> (1); <i>Carica papaya</i> (1); <i>Capsicum sp</i> (1)

## PARTE C – DIAGNOSI

<p><b>Normativa di riferimento per protocolli diagnostici:</b></p> <p><b><u>EUROPEA:</u></b></p> <p><b><u>NAZIONALE:</u></b></p>
<p><b>Protocolli standard di riferimento</b></p> <p><b><u>ISPM:</u></b> ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests - DP 29: <i>Bactrocera dorsalis</i></p>

<p><b>Tipologia di test per identificazione (riportato in IO 05)</b></p> <p><b>(IV) Morphological identification</b></p> <p>- <b>(XV) PCR</b></p> <p>- <b>(XIX) PCR+Sequencing</b> (va indicato quando si fa insieme la PCR e si invia al sequenziamento)</p> <p>- <b>(XX) Real Time PCR</b></p> <p>L'identificazione è comunemente basata sull'esame degli adulti e si effettua tramite analisi morfologica e molecolare.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Identificazione morfologica (cod. IO 05 IV):</u> richiede un'analisi attenta degli adulti catturati oppure ottenuti dall'allevamento delle larve raccolte da frutti infestati. Si consiglia di consultare le chiavi presenti nel documento FAO ISPM 27 - Diagnostic protocols for regulated pests - DP 29: <i>Bactrocera dorsalis</i></li> <li>- <u>Identificazione molecolare (cod. IO 05 XV, XIX, XX):</u> Le tecniche di identificazione molecolare possono fornire informazioni utili per supportare le identificazioni morfologiche. Il sequenziamento del DNA delle regioni 1 (ITS1) o 2 (ITS2) è stato proposto come un modo affidabile per distinguere tra le specie <i>B. carambolae</i> e <i>B. dorsalis</i> s.l. (Boykin et al., 2014; Schutze et al., 2015a). Plant Health Australia (2016) ha pubblicato un protocollo</li> </ul>
---



diagnostico per l'identificazione delle specie di *Bactrocera* usando i metodi biomolecolari (cod. IO 05 XIX). Tale documento riassume tre opzioni molecolari per l'identificazione:

1. PCR convenzionale e polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) della regione ITS1 (Plant Health Australia, 2016) (cod. IO 05 XV),
2. analisi PCR-RFLP di un segmento di matrice ribosomiale del DNA, comprese le regioni geniche ITS1 e 18S (Armstrong et al., 1997; Armstrong e Cameron, 2000). (cod. IO 05 XV)
3. DNA barcoding del gene della citocromo ossidasi I (COI) (Armstrong and Ball, 2005) (cod. IO 05 XV)

Si consiglia anche in questo caso di consultare i protocolli indicati nel documento ufficiale FAO - FAO ISPM 27 - Diagnostic protocols for regulated pests - DP 29: *Bactrocera dorsalis*

### Riferimenti Bibliografici

**Boykin, L.M., Schutze, M.K., Krosch, M.N., Chomic, A., Chapman, T.A., Englezou, A., Armstrong, K.F. et al.** 2014. Multi-gene phylogenetic analysis of the south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. *Journal of Applied Entomology*, 138: 235–253.

**Plant Health Australia.** 2016. *The handbook for the identification of fruit flies*, version 2.1. Canberra, Plant Health Australia. 314 pp.

**Armstrong, K.F., Cameron, C.M. & Frampton, E.R.** 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: A rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. *Bulletin of Entomological Research*, 87: 111–118.

**Armstrong, K.F. & Cameron, C.M.** 2000. Species identification of tephritids across a broad taxonomic range. In: K.H. Tan, ed. *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*, pp. 703–710. Penang, Malaysia, CABI Publishing.

**Armstrong, K.F. & Ball, S.L.** 2005. DNA barcodes for biosecurity: Invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1813–1823.

**Chen J Y, Cai P, Zhang G B, Sun Z J.** 2011. Research progress of occurrence and comprehensive control of oriental fruit fly [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)]. *Plant Diseases and Pests*, 2, 42–47.

**Delomen, MLC, Mendioro, MS, Diaz, MGQ.** 2013. Morphometric analysis and DNA barcoding of fruit flies *Bactrocera occipitalis* (Bezzi) and *B. philippinensis* Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae) from Cavite and Davao del Norte. *Philippine Journal of Science*, 142: 69–76.

**Ebina T, Ohto K.** 2006. Morphological characters and PCR-RFLP markers in the interspecific hybrids between *Bactrocera carambolae* and *B. papayae* of the *B. dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). *Research Bulletin of Plant Protection Japan*. 42: 23–34.

**EFSA (European Food Safety Authority), Loomans A, Diakaki M, Kinkar M, Schenk M and Vos S,** 2019. Pest survey card on *Bactrocera dorsalis*. EFSA supporting publication 2019: EN-1714. 24 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1714

**FAO 1987.** Outbreaks and new records. USA. Eradication of Oriental fruit fly. *FAO Plant Protection Bulletin*. 35: 166.

**FAO/IAEA.** 2018. Trapping guidelines for area-wide fruit fly programmes, Second edition, by Enkerlin, W.R. and Reyes-Flores, J. (eds). Rome, Italy. 65 pp. URL: [http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/Trapping-guideline-\(002\).pdf](http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/Trapping-guideline-(002).pdf) (last accessed 6 March 2018).

**Jalani GSP, Laude RP, Diaz MGQ, Medina CdR, Velasco LRI.** 2014. Genetic diversity of natural populations of *Bactrocera occipitalis* (Bezzi) and *B. philippinensis* Drew and Hancock (Diptera: Tephritidae) in selected mango producing areas in the Philippines using microsatellites. *Agrivita*: 36: 217–228.

**McInnis DO, Rendon P, Jang, E, Van Sauers-Muller, A, Sugayama R, Malavasi A.** 1999. Interspecific mating of introduced, sterile *Bactrocera dorsalis* with wild *B. carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Suriname: A potential case for cross-species Sterile Insect Technique. *Annals of the Entomological Society of America*. 92: 758–765.

**Nakagawa S, Farias GJ, Urago T.** 1968. Newly recognized hosts of the Oriental fruit fly, melon fly, and Mediterranean fruit fly. *Journal of Economic Entomology*, 61: 339-340.

**Samayoa AC, Choi KS, Wang Y-S, Hwang S-Y, Huang Y-B, Ahn JJ.** 2018. Thermal effects on the development of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) and model validation in Taiwan. *Phytoparasitica*. 46: 265–376.

**Schutze MK, Jessup A, Ul-Haq I, Vreysen MJB, Wornoayporn V, Vera MT, Clarke AR.** 2013. Mating compatibility among four pest members of the *Bactrocera dorsalis* fruit fly species complex (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 106: 695–707.

**Schutze MK, Aketarawong N, Amornsak W, Armstrong KF, Augustinos A, Barr N, Bo W, Bourtzis K, Boykin LM, Cáceres C, et al.** 2014. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): Taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoecological data. *Systematic entomology*. 40: 456–471.

**Schutze, M.K., Aketarawong, N., Amornsak, W., Armstrong, K.F., Augustinos, A.A., Barr, N., Bo, W. et al.** 2015a. Synonymization of key pest within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): Taxonomic changes based on a review of 20 years of the integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural, and chemoecological data. *Systematic Entomology*, 40: 456–471.

Autori: Dr. Leonardo Marianelli – CREA-DC; GdL Monitoraggio Cofinanziato - UE



Ministero delle  
politiche agricole  
alimentari e forestali



## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

### 1- Nome comune dell'organismo o malattia/Common name of the pest

Tristezza degli agrumi/*Tristeza of citrus*

### 2 - Nome scientifico/Scientific name

Virus della tristezza degli agrumi/*Citrus tristeza virus* (CTV)

### 3 – EPPO Code

CTV000

### 4 - Posizione tassonomica/Taxonomy

- Kingdom: Viruses and viroids
- Category: *Riboviria*
- Family: *Closteroviridae*
- Genus: *Closterovirus*
- Species: *Citrus tristeza virus*

### 5 – Aspetti epidemiologici dell'organismo/Epidemiology of the pest

*Citrus tristeza virus* (CTV) è un virus a singolo filamento di RNA (~ 19,3 Kb) appartenente al genere *Closterovirus*, famiglia *Closteroviridae*.

Il CTV è un virus che si localizza all'interno dei tessuti floematici della pianta e si caratterizza per essere presente in natura sotto forma di numerosi ceppi che differiscono tra loro per virulenza e trasmissibilità da parte di afidi vettori. Diverse specie di afidi trasmettono il CTV in maniera semi-persistente. L'afide bruno degli agrumi, *Toxoptera citricidus* (sin. *T. citricida*), è il vettore più efficiente del virus. Nativa probabilmente dell'Asia, *T. citricidus* è oggi presente nella maggior parte dei Paesi dell'emisfero australe ed in Asia orientale. Nel 1994, la sua presenza è stata segnalata in Portogallo, nell'isola di Madeira da dove poi l'insetto è diffuso raggiungendo prima la terraferma portoghese (2004) e poi la Spagna (2005). Ad oggi, non si segnala la presenza di *T. citricidus* in altri Paesi europei e del bacino del Mediterraneo al di fuori di Portogallo e Spagna. Altre comuni specie afidiche sono, tuttavia, in grado di trasmettere in maniera efficiente il virus laddove la *T. citricidus* non è presente tra cui, in particolare, *Aphis gossypii* e *A. spirecola*. Infine, le specie *A. citricola*, *A. craccivora*, *Myzus persicae* e *T. aurantii* risultano essere vettori del CTV anche se con capacità ridotte. La trasmissione attraverso gli afidi è, generalmente, di breve distanza, responsabile per lo più della diffusione del virus all'interno del campo a partire da fonti

di inoculo giunte dall'esterno (ad esempio, con materiale di propagazione infetto). I movimenti a lunga distanza sono, invece, determinati prevalentemente dallo scambio ed utilizzo di materiale infetto. Oltre che tramite insetto vettore il CTV si trasmette meccanicamente attraverso l'innesto e ciò, unitamente all'utilizzo estensivo dell'arancio amaro come portinnesto, è da ritenersi la principale causa di diffusione del virus in tutte le maggiori aree agrumicole del mondo.

### Sintomi

La manifestazione della malattia è legata a diversi fattori quali, in particolare, la combinazione d'innesto, la suscettibilità della specie e/o della varietà e il tipo di isolato virale infettante. La complessità dei sintomi osservabili in campo ha portato a definire tre quadri sintomatologici caratteristici: il deperimento, la butteratura del legno ed il giallume dei semenzali.

Il **deperimento** si evidenzia con un aspetto sofferente e clorotico della pianta dovuto alla necrosi dei tessuti floematici al disotto del punto di innesto con conseguente alterazione del flusso linfatico dalla chioma alle radici. Questa sindrome è tipicamente legata alla combinazione di innesto e si manifesta in presenza di portinnesti suscettibili quali, l'arancio amaro (*Citrus aurantium*) e l'alemow (*C. macrophylla*). In alcuni casi, il deperimento può avere un decorso lento, con riduzioni di sviluppo della pianta accompagnato da defogliazioni, disseccamenti, proliferazione di gemme nella parte terminale dei rami, produzione di frutti scarsa e di qualità scadente. In alcune combinazioni di innesto, è tipica anche la comparsa di estroflessioni puntiformi del legno e rispettiva alveolatura della corteccia sulla faccia cambiale (*inverse pitting*) in prossimità del punto di innesto. In altri casi, invece, il deperimento può essere rapido (*quick decline*) e nel giro di pochi anni dall'infezione la pianta va incontro a morte. In presenza dell'arancio amaro come portinnesto, la maggior parte degli isolati di CTV sono in grado di causare deperimento e vengono, per questo, classificati come 'severi'. Tuttavia, sono noti isolati che infettano la pianta senza causare sintomi di deperimento e per questo definiti 'blandi'. Al contrario dell'arancio amaro e dell'alemow, l'arancio trifoliato (*Poncirus trifoliata*) manifesta resistenza nei confronti della maggior parte degli isolati di CTV ad eccezione di alcuni isolati ricombinanti (isolati RB, *resistance-breaking*) rinvenuti per la prima volta in Nuova Zelanda e, successivamente, nelle Hawaii, in Porto Rico, Repubblica Domenicana e Sud Africa ma tutt'ora assenti in Europa.

La **butteratura del legno** (*stem pitting* - SP) è una manifestazione sintomatologica che interessa in maniera più o meno diffusa ed evidente il tronco, i rami e le radici con comparsa di distorsioni e puntature alveolari (butteratura) sottocorticali. Questi sintomi possono essere osservati rimuovendo la corteccia dalle branche e dal tronco tuttavia, nelle manifestazioni più severe, possono rendersi visibili anche sulla corteccia sotto forma di aree depresse. In casi severi, la distorsione del legno va a compromettere le cellule del cambio con conseguente inibizione del sistema vascolare della pianta e, quindi, del corretto movimento dell'acqua e dei nutrienti. Ciò causa la comparsa di sintomi collaterali che si accompagnano a quelli sul legno, quali: taglia della pianta ridotta, foglie clorotiche, produzione di frutti di piccola dimensione e scarsa qualità organolettica, limitata sopravvivenza della pianta in campo. Questo quadro sintomatologico, indotto da particolari isolati severi di CTV (isolati SP), è stato osservato ad oggi solo in aree agrumicole del Sud America, Asia, Australia e Sud Africa. Contrariamente al deperimento, la cui manifestazione è legata alla combinazione d'innesto, la butteratura del legno colpisce la varietà innestata indipendentemente dal tipo di portinnesto impiegato. Il pompelmo e le lime sono particolarmente suscettibili alla butteratura ma anche l'arancio dolce può essere gravemente colpito.

Il **giallume dei semenzali** (*seedling yellows* – SY) è un quadro sintomatologico caratterizzato, principalmente, da una intensa colorazione gialla osservabile sui semenzali di pompelmo, limone Eureka e arancio amaro quando infetti da particolari isolati di CTV (isolati SY). Oltre al giallume, i semenzali infetti possono manifestare nanismo, clorosi fogliare e, in presenza di isolati particolarmente severi, anche suberificazione delle nervature e cessazione completa della crescita. Rispetto al deperimento e alla butteratura del legno, questa sintomatologia è economicamente meno importante.

**6 - Piante ospiti/Hosts**

In natura, il CTV è in grado di infettare numerose specie di piante appartenenti alla Famiglia delle Rutaceae ed in particolare al Genere Citrus. Fra quest'ultime, le specie *C. aurantium* e *C. sinensis* sono considerate ospiti maggiori. Incidentalmente, il virus può infettare anche piante appartenenti ai generi *Citroncirus*, *Clausena* e *Fortunella* e numerose altre specie, fra cui *Aeglopsis chevalieri*, *Afraegle paniculata*, *Arracacia xanthorrhiza*, *Citropsis gilletiana*, *Pamburus missionis* e *Poncirus trifoliata*.

**7 - Siti a rischio da monitorare/Typology of location to be surveyed**

- Il rischio maggiore è legato alla possibile introduzione di isolati di CTV, quali quelli SP e RB, attualmente non segnalati nel territorio europeo. Sebbene la legislazione europea (Reg. UE 2019/2072) vieta l'importazione di piante di *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* e loro ibridi da Paesi Terzi, i punti di ingresso doganali restano i principali siti a rischio in relazione alla possibilità di scambi illegali di tali materiali vegetali.
- Considerato l'uso ornamentale di diverse specie di Citrus, quali ad esempio i kumquant (*Fortunella* sp.) ed il calamondino (*Citrofortunella microcarpa*) altri possibili siti a rischio possono essere rappresentati da vivai e garden soprattutto in relazione al fatto che la diversità (biologica e genomica) degli isolati di CTV eventualmente presenti in queste specie resta tutt'oggi ancora poco indagata.

**PARTE A – MONITORAGGIO/SURVEY****Normativa di riferimento su modalità di monitoraggio:****EUROPEA:**

- non presente

**NAZIONALE:**

- DECRETO 31 ottobre 2013. Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi «Citrus Tristeza Virus» (*G.U. Serie generale - n. 23 del 29-1-2014*).

*Con questo Decreto è stato abrogato il precedente DM 22 novembre 1996 «Lotta obbligatoria contro il virus della tristezza degli agrumi "Citrus Tristeza Virus"»*

**Standard di riferimento****PM EPPO:**

- non presente





**OTHER:**

- IPPC - International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 31, Appendix 5 (2008): Methodologies for sampling of consignments.
- EFSA Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus

**Misure di monitoraggio:**

- Ispezione visiva/*Visual inspection*
- Campionamento/*Sampling*

<b>Ispezione visiva/Visual inspection</b>		
<b>Quando fare l'ispezione</b>	<b>Cosa guardare</b>	<b>Immagini</b>
Durante tutto l'anno	<p>1) <u>Se possibile, accertare sempre il tipo di portinnesto</u>            Piante su portinnesti resistenti possono essere infette ma non manifestare sintomi</p> <p>2) <u>Osservare le condizioni generali della pianta</u>            Piante infette (sia da isolati che inducono declino - in combinazioni di innesto suscettibili - sia da isolati SP) mostrano un deperimento generale con l'assenza di nuovi germogli sulle branche o sui rami.</p> <p>3) <u>Esaminare il tronco inclusa la zona del colletto</u>            Escludere che il deperimento possa essere dovuto alla presenza di altri patogeni in grado di dare sintomi sul legno.</p> <p>4) <u>Esaminare un tassello di corteccia prelevato in corrispondenza del punto di innesto</u>            Osservare se sulla faccia interna – al di sotto della linea d'innesto - sono presenti alveolature puntiformi a cui corrispondono estroflessioni sul legno; osservare se è presente una linea marrone lungo il punto d'innesto.</p>	  <p><i>Marciume radicale</i>      <i>Gommosi del colletto</i>      <i>Exocortite</i></p> <p>Da: Mario Salerno, Giuseppe Cutuli. <i>Guida illustrata di Patologia degli Agrumi</i>. Ed. Edagricole, 1992</p>  <p><a href="https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos">https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos</a></p>

	<p>5) <u>Osservare le nervature fogliari</u> Le piante infette dal virus possono manifestare decolorazione delle nervature.</p> <p>6) <u>Su rami e tronco</u> Osservare la presenza di distorsioni o malformazioni del legno o di aree depresse sulla corteccia; in casi sospetti, togliere la corteccia da una porzione di ramo per osservare il legno sottostante. Questi sintomi sono tipici di infezioni causate da isolati SP.</p>	  <p><a href="https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos">https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos</a></p>
<p style="text-align: center;"><b><u>Vettore</u></b></p> <p>Il monitoraggio dovrà essere rivolto, in modo particolare, all'afide <i>T. citricidus</i> unica specie afidica, fra quelle vettrici di CTV, non ancora presente in Italia e caratterizzata da elevata efficienza di trasmissione del virus.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per la sua individuazione è consigliabile ispezionare i nuovi germogli dell'anno (l'uso di trappole cromotropiche gialle può aiutare nel monitoraggio delle forme alate dando un'indicazione sulla presenza dell'afide in una determinata area ma non consente una individuazione precoce dei focolai).</li> <li>• Gli individui si presentano di taglia media (1,5 – 2,8 mm) e con una colorazione brillante, nera (forme alate) o variabile dal marrone scuro al nero (forme attere).</li> <li>• Se schiacciati su una superficie bianca, lasciano una macchia rossa; se messi in alcool colorano il liquido di un rosso intenso mentre non accade con individui appartenenti ad altre specie di <i>Toxoptera</i>.</li> </ul> <p>Tutte le identificazioni in campo vanno confermate in laboratorio mediante osservazione al microscopio ottico di esemplari montati su vetrino, utilizzando idonee chiavi tassonomiche di riconoscimento. Gli individui campionati possono essere conservati in alcool al 70 – 80%.</p>	<p>Forme alate e attere di <i>T. citricidus</i></p>   <p><a href="https://gd.eppo.int/taxon/TOXOCI/photos">https://gd.eppo.int/taxon/TOXOCI/photos</a></p>	

### Campionamento/Sampling

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
<ul style="list-style-type: none"> <li>Il campione standard per singola pianta adulta consiste in 5 germogli dell'anno o peduncoli di frutti oppure 10 foglie completamente espanse o 5 fiori o frutti. Indipendentemente dal tipo di campione, il prelievo deve essere fatto in punti diversi della chioma da ciascuna branca principale della pianta.</li> <li>Riunire i sub-campioni in un unico campione, ponendoli in una busta di plastica.</li> <li>Siglare la busta e contrassegnare la pianta campionata, in maniera corrispondente con la sigla attribuita al campione.</li> </ul> <p>Nell'areale mediterraneo, i campioni possono essere prelevati durante tutto il periodo dell'anno ad eccezione dei mesi più caldi (luglio e agosto); tuttavia, il prelievo eseguito in primavera offre maggiori garanzie per la diagnosi del virus poiché la carica virale è più alta rispetto agli altri periodi vegetativi.</p> <p>Per le modalità di campionamento, finalizzate al monitoraggio del CTV, seguire le indicazioni riportate nel <b>Decreto 31 ottobre 2013</b>, di seguito sintetizzate.</p> <p><b><u>1. Agrumeti commerciali in zone indenni, focolaio, tampone e in regime contenimento.</u></b></p> <p>Prelevare i campioni sul 12,5% delle piante presenti nei singoli impianti, secondo il metodo «Gottwald &amp; Hughes – 2000» modificato. Le piante campionate devono essere distribuite equamente sulla superficie dell'impianto, seguendo un percorso regolare:</p>	<p>Il materiale vegetale deve essere conservato, asciutto, in buste di plastica. Durante il prelievo in campo, mantenere i campioni al fresco per evitarne la disidratazione.</p> <p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non comprimere le piante/parti vegetali campionate.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio il materiale va conservato in frigorifero a 4°C, per non più di 7 giorni (i frutti non oltre 1 mese).</p> <p>Spedizione del campione: i campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore dal loro prelievo, preferibilmente in borse termiche evitando il contatto diretto con piastra eutettica (siberino)</p>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
<p><b>PRELIEVO DEI CAMPIONI IN AGRUMETI COMMERCIALI</b></p> <p style="text-align: center;">1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 5%;">inizio</td> <td style="width: 5%;">1</td> <td>x</td> <td>x</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>5</td> <td>x</td> <td>x</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>7</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>9</td> <td>x</td> <td>x</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>10</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>11</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>12</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>13</td> <td>x</td> <td>x</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>14</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>16</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>17</td> <td>x</td> <td>x</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>18</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>19</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">fine</td> <td>20</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			inizio	1	x	x																			2																					3																					4																					5	x	x																			6																					7																					8																					9	x	x																			10																					11																					12																					13	x	x																			14																					15																					16																					17	x	x																			18																					19																				fine	20																			
inizio	1	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	5	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	9	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	13	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	17	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
	18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
	19																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
fine	20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					



## 2. Agrumeti commerciali in zone di insediamento.

Nelle zone di insediamento, al fine di individuare eventuali focolai di ceppi severi, il monitoraggio deve essere effettuato su piante di agrumi sintomatiche. L'indagine deve essere fatta con esame visivo e prelievo di campioni da piante sintomatiche. I campioni devono essere analizzati per la presenza del CTV e se risultano infetti deve essere avviata la caratterizzazione del ceppo.

## 3. Fonti di approvvigionamento di materiale di propagazione e vivai ubicati in zone indenni, focolaio, tampone e contenimento.

I campioni debbono essere prelevati da:

- a) il 100% delle piante madri;
- b) almeno il 10% delle piante in sezione incrementale;
- c) almeno il 5% delle piante in allevamento per ogni singolo lotto omogeneo per i vivai.

I campioni devono essere costituiti come segue:

- a) fonti di approvvigionamento: si prelevano n. 4 germogli per pianta per costituire n. 1 campione;
- b) sezioni incrementali e dei lotti di piante in allevamento: si preleva n.1 germoglio per singola pianta da piante selezionate a random. I germogli prelevati si aggregano a gruppi di n. 5 germogli per costituire n. 1 campione, oppure si analizzano singolarmente prelevando 2 germogli per pianta.

## 4. Fonti di approvvigionamento di materiale di propagazione e vivai ubicati in zone di insediamento

I campioni debbono essere prelevati da:

- a) il 100% delle piante madri;
- b) almeno il 10% delle piante in sezione incrementale;
- c) almeno il 50% delle piante in allevamento per ogni singolo lotto omogeneo per le produzioni in *screen house*;
- d) tutte le piante in allevamento per le produzioni in piena aria

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

### Inquadramento normativo

#### EUROPEA

- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione del 28 novembre 2019 che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante. In base a questo regolamento:
  - CTV isolati non UE, sono considerati **organismi nocivi da quarantena** di cui non è nota la presenza nel territorio dell'Unione (*ALLEGATO II*, Parte A, F5);
  - CTV isolati UE, sono considerati **organismi nocivi regolamentati non da quarantena (ORNQ)** rilevanti per l'Unione (*ALLEGATO IV*, Parte D e Parte J);
  - T. citricidus, è considerata **organismo nocivo da quarantena** di cui è nota la presenza nel territorio dell'Unione (*ALLEGATO II*, Parte B, C6).

**Nota:** in accordo con l'Opinione Scientifica sulla categorizzazione degli isolati non europei di CTV pubblicata dal 'Panel on Plant Health' (PLH) dell'EFSA (EFSA PLH Panel, 2017), vanno considerati **isolati non UE**:

- gli isolati in grado di causare sintomi severi di *stem-pitting* (SP) su arancio dolce;
- gli isolati ricombinanti (RB) in grado di superare la resistenza dell'arancio trifogliato (*Poncirus trifoliata*) o dei suoi ibridi.

#### NAZIONALE

- **Decreto 31 ottobre 2013**. Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi «Citrus Tristeza Virus» (*G.U. Serie generale - n. 23 del 29-1-2014*).

### Inquadramento EPPO

- **EPPO A2 List - List of pests recommended for regulation as quarantine pests (version 2019-09): pests locally present in the EPPO region.**

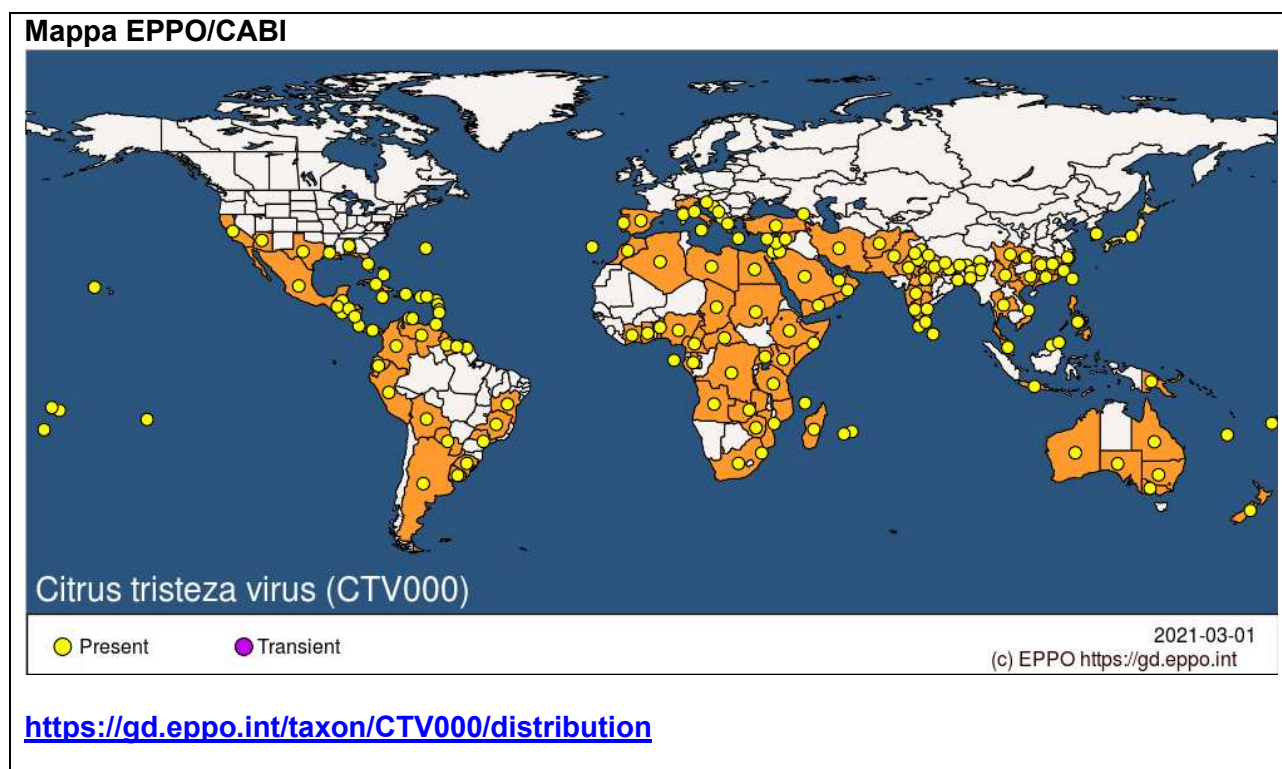
**Nota:** nella stessa lista è incluso l'afide vettore *T. citricidus*.

### Origini

Si assume che il CTV sia originario della Cina. Più in generale, si fa coincidere l'origine del virus con la zona di provenienza degli agrumi, ovvero zone tropicali e subtropicali dell'Asia.

### Distribuzione

La malattia è stata osservata per la prima volta alla fine dell'800 in Sud Africa ed Australia. Successivamente fu segnalata in Argentina e Brasile dove fu coniato il termine di 'tristeza' per indicare il deperimento osservato sulle piante infette. Dal Sud America si è diffusa, intorno agli anni '50, negli USA (California, Florida, Texas) per poi giungere nell'area del bacino del Mediterraneo (Israele, Spagna e Paesi Nord Africani) nei primi anni '50 ed infine in Europa e Asia.



### Presenza e/o segnalazioni in Italia

In Italia il CTV è stato segnalato per la prima volta in Sicilia (Acireale, CT) nel 1955. In seguito, sporadiche infezioni sono state segnalate in Calabria e Sardegna e, più tardi, anche in alcuni vivai della Toscana (1995). A partire dal 1996, con l'inizio dell'attività di monitoraggio conseguente all'emanazione del decreto di lotta obbligatoria, vengono individuati i primi importanti focolai di infezione in Sicilia e Puglia (2002 – 2005) e, successivamente, in Calabria (2006). Intorno ai primi anni 2000, la presenza del virus è stata riscontrata anche in alcuni vivai del Lazio in lotti di piante prodotte in altre regioni e normalmente destinate alla vendita a soggetti non professionali.

### Rischio di introduzione

Il rischio di introduzione riguarda gli isolati di CTV in grado di indurre la butteratura del legno e gli isolati RB per i quali, ad oggi, non è nota la presenza sul territorio dell'Unione Europea. La pericolosità di questi isolati è legata, non solo ai danni che causano alla pianta ma anche alla capacità che possiedono di superare la tolleranza propria di alcuni portinnesti oggi largamente impiegati per il controllo in campo delle epidemie di CTV.

Il Regolamento di esecuzione UE 2019/2072, emanato in attuazione del Regolamento UE 2016/2031, vieta l'introduzione di piante di *Citrus* L., *Fortunella* Swingle, *Poncirus* Raf., e loro ibridi da tutti i Paesi Terzi (*ALLEGATO VI*, punto 11) e pone delle restrizioni all'importazione dei relativi frutti, fra cui il fatto che debbono essere privi di peduncoli e foglie (*ALLEGATO VI*, punto 57). Pertanto, il rischio di introduzione dei suddetti isolati attraverso gli scambi commerciali con Paesi extraeuropei, che rappresenta il principale canale di ingresso, risulta scongiurato dall'attuale quadro normativo. Un rischio residuo rimane legato unicamente a:

- commercio di piante della famiglia delle Rutaceae al momento non note per essere ospiti naturali di CTV ma per le quali è stata dimostrata la possibilità di essere infettate sperimentalmente;
- ingresso accidentale di vettori viruliferi tramite piante non sottoposte a regolamentazione, prodotti di piante o spostamenti antropici;

- ingresso illegale di materiale di propagazione infetto di specie ospiti suscettibili, per uso commerciale o personale.

In tutti i Paesi dell'Unione Europea, ad eccezione di Spagna e Portogallo dove già presente, il rischio di introduzione riguarda anche l'afide vettore *T. citricidus*. In quanto organismo da quarantena è, tuttavia, sottoposto a misure di monitoraggio che tendono a mantenere basso tale rischio.

**Negli ultimi 5 anni (2016-2020) sono state registrate le seguenti intercettazioni per *Citrus tristeza virus***

Country of Export	Year	Object	Plant species (n° of interceptions)
Malta	2020	Intended for planting	<i>Citrus</i> (1)
Israele	2019	Fruit and vegetables	<i>C. medica</i> (1)

**INTERCETTAZIONI EUROPHYT *Toxoptera citricidus* ULTIMI 5 ANNI**

**Negli ultimi 5 anni (2015-2019) non sono state registrate intercettazioni**

## PARTE C – DIAGNOSI

### Normativa di riferimento per Protocolli diagnostici:

#### EUROPEA

- non presente

#### NAZIONALE

- **Decreto 31 ottobre 2013.** Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi «Citrus Tristeza Virus» (*G.U. Serie generale - n. 23 del 29-1-2014*).

### Standard di riferimento

#### PM7 EPPO

- PM 7/31(1), 2004 - "Diagnostic protocols for regulated pests. *Citrus tristeza closterovirus*"

#### DP IPPC (*International Plant Protection Convention*)

- International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 27, Annex 15 – Diagnostic protocols for regulated pests DP 15: *Citrus tristeza virus*

#### EFSA Pest survey card

- Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus

### Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato (riportato in IO 05)

- (X) Biotest (saggio biologico su piante indicatrici)
- (XII) DTBIA=serological test 1
- (XIV) ELISA
- (XVI) RT - PCR= Molecular testing 1
- (XVIII) LAMP=Molecular testing 3
- (XIX) RT PCR+Sequencing (va indicato quando si fa insieme l'RT-PCR e si invia al sequenziamento)
- (XXI) RT-Real Time PCR - molecular testing 4

#### Caratterizzazione degli isolati di CTV (Cod. IO 05 X)

Per la discriminazione degli isolati di CTV EU e non-EU si suggerisce di seguire quanto riportato nell'opinione scientifica dell'EFSA Panel on Plant Health (2017), ovvero di combinare sempre i risultati dei saggi (molecolari e sierologici) di laboratorio con quelli del saggio biologico. Per l'esecuzione di tale saggio si può fare riferimento a quanto riportato in Garnsey et al. (2005) e Wang et al. (2013)

### Matrice

#### Preparazione del campione

Per le analisi molecolari, il materiale vegetale raccolto (tipicamente foglie) può essere preventivamente polverizzato in azoto liquido. Le polveri così ottenute possono essere conservate a -20°C anche per diversi mesi prima dell'analisi. In alternativa, il materiale fresco può essere

macerato in tampone fosfato (PBS), pH 7.2–7.4 ( $\text{NaCl}_2$ , 8 g;  $\text{KCl}$ , 0.2 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2.9 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g; acqua distillata fino al volume di 1 litro) addizionato con 0.2% sodio-dietil ditiocarbammato (DIECA) o 0.2% mercaptoetanolo mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore (manuale o meccanico) e, successivamente, centrifugato. Il pellet che si ottiene dopo aver eliminato il surnatante, può essere conservato  $-20^\circ\text{C}$  fino al momento dell'estrazione.

### Tipologia di test per identificazione

#### **Test diagnostici sierologici ELISA (cod. IO 05 XIV)**

Si prevede l'utilizzo di kit commerciali per lo più analoghi sensibilità e specificità. Per la loro esecuzione seguire le istruzioni riportate nel manuale tecnico fornito dalla Ditta produttrice. Inoltre, sono disponibili in commercio altri saggi sierologici basati su dispositivi later-flow.

Sono disponibili altri saggi sierologici paragonabili in termini di sensibilità all'ELISA, come il direct tissue immunoassay (DTBIA) - Garnesy et al., 1993 - (Cod IO 05 XII), mediante impressione di tessuti vegetali su membrana di nitro cellulosa e rilevamento tramite anticorpi specifici. Su questa metodologia sono disponibili kit commerciali (tissue-print immunoassay).

#### **Test diagnostici molecolari (cod. IO 05 XVI, XVIII, XIX e XXI):**

**Estrazione RNA totale.** L'estrazione dell'RNA totale può essere eseguita utilizzando protocolli di laboratorio, se opportunamente validati o kit commerciali di estrazione dell'RNA seguendo le istruzioni riportate nel manuale tecnico fornito dalla Ditta produttrice.

**Test molecolari.** Il virus può essere rilevato mediante un protocollo di RT-PCR adattato sulla base di quello descritto in Olmos *et al.* (1999) (cod IO 05 XVI, XIX) o tramite real-time RT-PCR, utilizzando kit commerciali 'ready-to-use' o il protocollo descritto in Saponari *et al.* (2008) (cod IO 05 XXI). Infine, una diagnosi rapida del virus può essere fatta mediante un protocollo di RT-LAMP adattato sulla base di quello descritto in Wang *et al.* (2013) (cod XVIII).

### Riferimenti Bibliografici

Chung K.-R. and Bransky R. H., 2006. Citrus Diseases Exotic to Florida: Citrus Tristeza Virus – Stem Pitting (CTV-SP). Electronic Data Information Source (EDIS) of University of Florida IFAS Extension, PP-227, <https://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/30/22/00001/PP14900.pdf>

Djelouah K., Valentini F., D'Onghia A.M. Historical review of *Citrus tristeza virus* in Italy. In: *Options Méditerranéennes, B n° 65, 2009 - Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry*, 59 – 62.

EPPO, 2004. PM 7/31(1) - Diagnostic protocols for regulated pests. *Citrus tristeza closterovirus*. *EPPO/OEPP Bulletin*, **34**, 239 – 246.

EPPO, 2006. PM 7/75 (1) – Diagnostics. *Toxoptera citricidus*. *EPPO/OEPP Bulletin*, **36**, 451 – 456.

EPPO Global Database. Citrus tristeza virus (CTV000), <https://gd.eppo.int/taxon/CTV000>

EPPO Global Database. Toxoptera citricidus (TOXOCI), <https://gd.eppo.int/taxon/TOXOCI>

EFSA PLH Panel, 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of Citrus tristeza virus. *EFSA Journal* 2014;**12**(12):3923, 32 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3923>

EFSA PLH Panel, 2017. Pest categorisation of Citrus tristeza virus (non-European isolates). *EFSA Journal* 2017, **15**(10), doi:10.2903/j.efsa.2017.5031

EFSA Pest survey card, 2019. Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus. EFSA Supporting Publications, **16**(4): <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1600>

Futch S. H. and Bransky R. H., 2005. Field Diagnosis of Citrus Tristeza Virus. Electronic Data Information Source (EDIS) of University of Florida IFAS Extension, HS996, <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS24200.pdf>

- Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M., & Henderson, C. T., 1993. Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) for Detection of Citrus Tristeza Virus (CTV). *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 12(12). Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/5t45z8fb>
- Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Paul C, Hilf ME, Lee RF, Brlansky R, Yokomi RK and Hartung JS, 2005. Biological characterization of an international collection of Citrus tristeza virus (CTV) Isolates. Proceedings of the 16<sup>th</sup> Conference of the International Organisation of Citrus Virologists, 2004. IOVC, Riverside, CA, USA, 491, pp. 75–93.
- Harper S.J., Dawson T.E. and Pearson M.N., 2010. Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology*, **155**, 471–480.
- IPPC, 2008. Methodologies for sampling of consignments. *International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM)* No. 31, Appendix 5, 2008.
- IPPC, 2016. Diagnostic protocols for regulated pests DP 15: *Citrus tristeza virus*. *International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM)* No. 27, Annex 15, 2016.
- Moreno P., Ambrós S., Albiach-Martí M.R., Guerri J. and Peña L., 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 251–268. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X>
- Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT & Terrada E (1999). New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research* **27**, 1564–1565.
- Saponari M., Manjunath K., Yokomi R.K., 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, **147** (2008): 43–53
- Wang Y.-J., Zhou Y., Li Z.-A., Su H.-N. Huang A.-J., Tang K.-Z., Zhou C.-Y., 2013. A RT-LAMP assay for detection of Citrus Tristeza Virus. *Scientia Agricultura Sinica*, **46**(3): 517-524.
- Wang JB, Bozan O, Kwon SJ, Dang T, Rucker T, Yokomi RK, Lee RF, Folimonova SY, Krueger RR, Bash J, Greer G, Diaz J, Serna R and Vidalakis G, 2013. Past and future of a century old Citrus tristeza virus collection: a California citrus germplasm tale. *Frontiers in Microbiology*, **4**, 366. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00366>

Autori: Dr Luca Ferretti (CREA-DC sede di Roma); GdL per “Monitoraggio cofinanziato reg. 652/2014”



## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

### 1- Nome comune dell'organismo/*Common name of the pest*

#### Batteri agenti causali di Huanglongbing (di seguito batteri HLB)

- a) *Liberibacter asiaticus*
- b) *Liberibacter americanus*
- c) *Liberibacter africanus*

#### Insetti vettori

- d) Asian citrus psyllid
- e) Citrus psyllid; two-spotted citrus psyllid

#### Nome della malattia/*Disease name*

Citrus greening, huanglongbing (dal cinese malattia del drago giallo), HLB, yellow-shoot-disease

### 2 - Nome scientifico/*Scientific name*

#### Batteri HLB

- a) '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'
- b) '*Candidatus Liberibacter americanus*'
- c) '*Candidatus Liberibacter africanus*'

**Sinonimi/Synonyms:** Citrus greening bacterium, huanglongbing bacterium, HLB bacterium

**Acronimi/ Acronym:** a) Las, b) Lam, c) Laf

#### Insetti vettori

- d) *Diaphorina citri* Kuwayana  
Sinonimi: *Euphalerus citri* Kuwayana

- e) *Trioza erythrae* Del Guercio  
Sinonimi: *Spanioza erythrae* Del Guercio; *Trioza merwei* Pettey

### 3 – EPPO Code:

1LIBEG

#### Batteri HLB

rispettivamente:

- a) LIBEAS,
- b) LIBEAM,
- c) LIBEAF



### Insetti vettori

- d) DIAACI
- e) TRIZER

## 4 - Posizione tassonomica/Taxonomy

### Batteri HLB

- Regno: Bacteria
- Phylum: Proteobacteria
- Classe: Alphaproteobacteria
- Ordine: Rhizobiales
- Famiglia: Phyllobacteriaceae
- Genere: '*Candidatus Liberibacter*'
- Specie: a) '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'  
b) '*Candidatus Liberibacter americanus*'  
c) '*Candidatus Liberibacter africanus*'

### Insetti vettori

- d) Phylum: Arthropoda  
Classe: Insecta  
Ordine: Hemiptera  
Sottordine: Sternorrhyncha  
Superfamiglia: Psylloidea  
Famiglia: Liviidae  
Genere: *Diaphorina*  
Specie: *Diaphorina citri*
  
- e) Phylum: Arthropoda  
Classe: Insecta  
Ordine: Hemiptera  
Sottordine: Sternorrhyncha  
Superfamiglia: Psylloidea  
Famiglia: Triozidae  
Genere: *Trioza*  
Specie: *Trioza erytreae*

## 5 Aspetti epidemiologici dell'organismo/Epidemiology of the pest

### a, b, c - Batteri HLB

Le specie di *Candidatus Liberibacter* (Las, Lam e Laf) agenti causali della malattia huanglongbing (HLB) degli agrumi, sono batteri Gram-negativi non coltivabili *in vitro*, parassiti obbligati limitati al floema di piante ed emolinfa di psille (*Psyllidae*).

In natura sono trasmessi in maniera persistente - propagativa da diverse specie di psille (ordine Homoptera, famiglia *Psyllidae*). Possono essere trasmessi anche per innesto. I batteri sono stati identificati nei semi e nelle plantule di Citrus, ed anche se la trasmissione per seme è stata considerata come una potenziale via di disseminazione dei patogeni una cospicua serie di pubblicazioni non la ritiene significativa. I batteri HLB possono essere introdotti in nuove aree attraverso materiale infetto ma per la successiva diffusione è necessaria la presenza del vettore. Quando un vettore infetto si nutre su una pianta sana le trasmette il batterio che diffonde poi sistemicamente all'interno dell'ospite. Il periodo di latenza (periodo dopo il quale le giovani foglie inoculate dalle psille possono divenire infettive) può essere anche di soli 15 giorni, mentre il

periodo di incubazione (il periodo che va dall'inoculazione all'espressione dei sintomi) è compreso tra 1 e 2,5 anni anche se in alcuni casi è arrivato sino a 6 anni.

La trasmissione di HLB da parte degli psillidi vettori è di tipo persistente-propagativo: una volta acquisito (periodo di acquisizione: 1 ora), il batterio raggiunge l'emocele e viene veicolato attraverso l'emolinfa a tutti gli organi, incluse le ghiandole salivari. Da queste, il batterio verrà inoculato attraverso la saliva in una nuova pianta durante l'attività trofica del vettore (periodo di inoculazione: inferiore a 1 ora). Il periodo di latenza (intervallo di tempo che intercorre tra l'acquisizione del batterio e il suo successivo rilascio nelle secrezioni salivari) varia da 8 a 18 giorni. Una volta acquisito il batterio, l'insetto vettore mantiene la propria infettività per tutta la vita e tutti gli stadi di sviluppo sono in grado di trasmettere HLB. Il batterio inoltre si moltiplica all'interno dell'insetto. La possibile trasmissione di HLB per via transovarica è stata dimostrata per via sperimentalmente solo occasionalmente e in basse percentuali (2-6%) (Haapalainen, 2014; EFSA, 2019).

Le tre specie di *Ca. Liberibacter* hanno diversa distribuzione geografica (v. paragrafo distribuzione) e prendono il nome dal continente dove sono stati isolati per la prima volta. Las, trasmesso da *Diaphorina citri*, è presente principalmente in Asia e nelle Americhe. Lam, anch'esso trasmesso da *D. citri*, ad oggi è stato rinvenuto solo in Brasile. Laf, trasmesso da *Trioza erythrae*, è presente fondamentalmente in Africa. Inoltre, è stato osservato che entrambi gli psillidi *D. citri* e *T. erythrae* sono in grado di trasmettere tutte e tre le specie di batteri HLB in condizioni sperimentali.

Rispetto alle esigenze termiche, Laf produce sintomi nell'ospite a 20-24°C mentre è sensibile alle alte temperature al contrario di Las che è più tollerante al calore. Poco è noto relativamente a Lam.

Secondo uno studio, nel caso in cui i batteri HLB si dovessero insediare in Europa, la distanza di diffusione dovuta agli insetti vettori ed all'attività dell'uomo sarebbe di 20 km/anno.

#### 5d - *Diaphorina citri*

##### **Morfologia e biologia dell'organismo / Morphology and biology of the pest**

**Adulto** – Il maschio ha dimensioni comprese tra 1.53 e 1.66 mm; la femmina tra 1.90 e 2.06 mm. L'adulto è generalmente di colore bruno. Il capo è leggermente più ristretto del torace, con vertice di colore grigiastro-bianco. Le antenne sono costituite da 10 segmenti filiformi e sono inserite alla base dei cono-frontali (questi ultimi sono caratteri distintivi degli psillidi in generale). Le antenne presentano i primi due segmenti basali di colore bruno, mentre dal terzo all'ottavo segmento il colore è giallastro con gli apici del quarto, sesto, ottavo di colore nero così come gli ultimi due segmenti. Occhi di colore scuro. Pronoto arrotondato e leggermente sinuoso nella parte anteriore, con due depressioni laterali (fovea) evidenti su ciascun lato. Scutello di colore dal bruno al bruno scuro con striature nere. Femore di colore bruno scuro, tibia e tarsi di colore dal bianco-giallastro al marrone. Le zampe posteriori sono ben sviluppate e atte al salto. L'addome è nero nella parte dorsale e bianco-verdastro nella parte ventrale. Le ali anteriori sono trasparenti (ialine) con maculature sparse e sono lunghe 2.4 volte la loro larghezza; sono ristrette alla base e si allargano verso l'apice, che si presenta arrotondato. Le ali posteriori sono lunghe e sottili; la loro lunghezza è pari a 0.9 volte quella delle ali anteriori e a 3 volte la propria larghezza (Fig. 1).

**Uovo** – Lunghezza pari a circa 0.3 mm, larghezza pari a 0.15 mm. Di colore giallo chiaro quando appena deposto, poi tende all'arancione brillante quando raggiunge la maturità (Fig. 2).

**Neanide di 1° età** – Lunghezza compresa tra 0.33 e 0.35 mm. Corpo allungato di colore generalmente giallo. Le antenne presentano due segmenti di lunghezza relativa 1:5. Le zampe sono segmentate, con il tarso che presenta due unghie finali. L'addome presenta 7 paia di setae ai margini (Fig. 3).

**Neanide di 2° età** - Lunghezza compresa tra 0.49 e 0.53 mm. Corpo di colore generalmente giallo. Le antenne presentano due segmenti di lunghezza relativa 1:2.8. Gli abbozzi alari sono già presenti e appaiono ben sperati. Il tarso tibiale presenta una seta con la forma di mazza da golf. Addome con scleriti alla base e una larga placca apicale che porta ai margini 7-8 paia di setae (Fig. 3).

**Neanide di 3° età** - Lunghezza compresa tra 0.69 e 0.72 mm. Corpo di colore generalmente giallo, con antenne e addome talvolta scuri. Le antenne presentano due segmenti di lunghezza relativa

1:4.5. Gli abbozzi alari sono sviluppati e sovrapposti. Il tarso tibiale presenta una seta con la forma di mazza da golf. La placca apicale dell'addome porta ai margini 15-17 paia di setae (Fig. 3).

**Ninfa di 1° età** - Lunghezza compresa tra 0.98 e 1.05 mm. Corpo di colore generalmente dal giallo al giallastro scuro. Le antenne presentano tre segmenti di lunghezza relativa 1.5:1:6 con tre sensilli e due spine. La placca apicale dell'addome porta ai margini 27-30 paia di setae (Fig. 3).

**Ninfa di 2° età** - Lunghezza compresa tra 1.45 e 1.58 mm. Corpo di forma ovale (lungo circa 1.2 volte la propria larghezza) e di colore generalmente dal giallo al giallastro scuro con il terzo segmento antennale nero. Le zampe sono relativamente corte, con 4 segmenti; il tarso presenta due unghie e una seta con la forma di mazza da golf. Addome con scleriti alla base e una larga placca apicale che porta ai margini 25-29 paia di sete (Fig. 3, 4). (EPPO PM 7/52, 2005).



Fig. 1 – Adulto di *Diaphorina citri*  
(<https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/photos>).



Fig. 2 – Uova di *Diaphorina citri*  
(<https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/photos>).



Fig. 3 – Stadi giovanili di *Diaphorina citri*  
(<https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/photos>).



Fig. 4 – Ninfa di 2° età di *Diaphorina citri*  
(<https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/photos>).

**Biologia** – Questa specie è multivoltina (arriva a compiere fino a 10 generazioni l'anno) e il periodo di sviluppo da uovo a adulto dura dai 14 ai 48 giorni. Le femmine possono vivere circa 30-60 giorni e sono molto feconde, producendo fino a 800 uova durante il loro ciclo vitale. Nei Paesi di origine della specie, l'ovideposizione avviene tra marzo e maggio; le uova sono deposte individualmente dentro i germogli in formazione o nelle gemme ascellari o comunque nelle parti giovani e tenere della pianta. La specie sverna come adulto e l'adulto svernante può sopravvivere fino a sei mesi. Gli adulti sono molto attivi e tendono a saltare appena vengono disturbati. Gli stadi giovanili si spostano raramente: sono prevalentemente sedentari e vivono raggruppati. La temperatura ottimale per lo sviluppo della popolazione è compresa tra 25 e 28°C, ma la specie è nota per essere tollerante anche a temperature più elevate. (EPPO PM 7/52, 2005; EPPO PM 9/27, 2020)

### 5e - *Trioza erytrae*

#### Morfologia e biologia dell'organismo / Morphology and biology of the pest

**Adulto** – Ha dimensioni di circa 4 mm; il maschio è più piccolo della femmina. L'adulto è generalmente di colore bruno chiaro con il tegumento ricoperto da corte setae. Il capo si presenta largo come il mesoscutello, con il margine occipitale arrotondato, il vertice di forma pentagonale e il margine anteriore profondamente inciso da una sutura mediana. Le antenne sono di lunghezza circa 2-3 volte la larghezza del capo e sono inserite alla base dei coni geno-frontali (questi ultimi sono caratteri distintivi degli psillidi in generale). L'antennomero apicale presenta una lunga seta appuntita e una seta troncata posta sull'apice. Il torace è fortemente arcuato con il pronoto visibile solo dall'alto. Le ali anteriori sono trasparenti (ialine), con venature visibilmente scure e sono allungate in una forma ovale che si restringe verso l'apice arrotondato. Sono lunghe circa 3 volte la loro larghezza e presentano corte setae in corrispondenza delle venature. Le ali posteriori hanno lunghezza pari a 1.6-1.8 volte quella delle ali anteriori e presentano fino a due setae sulla parte prossimale e due gruppi di setae sulla parte distale. Le zampe posteriori sono ben sviluppate e presentano un evidente meracanto sulla coxa, mentre la tibia ha spine nella parte basale con uno sperone apicale e due-tre speroni esterni. L'addome presenta delle sete sul secondo e terzo tergite nel maschio e sul terzo e quarto tergite nella femmina. Inoltre, sull'addome del maschio è presente una tipica punta arrotondata che nella femmina è invece affilata (Fig. 5, 6).

**Uovo** – Lunghezza pari a circa 0.3 mm. Di colore giallo chiaro quando appena deposto, poi tende all'arancione scuro quando raggiunge la maturità. Di forma cilindrica, con la parte anteriore appuntita all'insù e un corto stelo posteriore che corrisponde al punto di inserzione nei tessuti vegetali (Fig. 7).

**Forme giovanili dalla 1° alla 4° età** – Vi sono 5 stadi post-embryonari, di cui solamente l'ultimo ha caratteri distintivi evidenti. Gli altri quattro stadi giovanili si presentano appiattiti in visione dorso-ventrale e leggermente allungati, con una frangia di filamenti bianchi e setosi posta sui margini. Il colore varia dal giallo al verde oliva al grigio scuro. Le dimensioni dei primi quattro stadi giovanili sono rispettivamente: 0.25–0.41, 0.44–0.56, 0.63–0.75 e 0.94–1.13 mm (Fig. 8).

**Ninfa di 5° età** – Forma ovale, di lunghezza (1.38–1.66 mm) pari a circa 1.5 volte la larghezza (0.87–1.12 mm). Le antenne hanno 4-5 antennomeri. Il cefaloprototrace è separato dal resto del torace, che è intero. Gli abbozzi delle ali anteriori sono lunghi circa 0.8 mm con il lobo che si estende anteriormente oltre il margine anteriore dell'occhio. Setae di firma tronca e tubulare formano frange poste ai margini di ciascun lato del capo, degli abbozzi alari e dell'addome (Fig. 8). (EPPO PM 7/57, 2005)



Fig. 5 – Adulto maschio di *Trioza erytrae* (Cocuzza et al., 2017).



Fig. 6 – Adulto femmina di *Trioza erytrae* (Cocuzza et al., 2017).

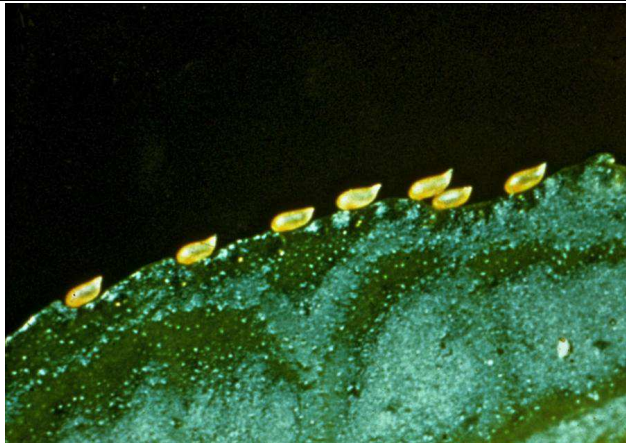


Fig. 7 – Uova di *Trioza erytreae*  
(<https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos>).



Fig. 8 – Stadi giovanili di *Trioza erytreae*  
(<https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos>).

**Biologia** – Questa specie è multivoltina (arriva a compiere fino a 6-8 generazioni l'anno). In campo si osservano fluttuazioni nelle popolazioni di maschi e femmine, ma le femmine sono sempre predominanti. Il periodo di sviluppo dell'uovo è di 6-15 giorni e il completo sviluppo dei cinque stadi giovanili dura da 17 a 43 giorni, per un ciclo vitale completo stimato tra 11 e 43 giorni. La vita della femmina adulta dura circa 28-48 giorni, ma può essere più lunga in assenza di tessuti vegetali freschi. L'ovideposizione può avvenire immediatamente dopo l'accoppiamento e le uova sono deposte con lo stelo posteriore piantato nel tessuto fogliare per mantenere le migliori condizioni di idratazione interna. Le femmine raggiungono il picco massimo della fertilità verso la metà del loro ciclo vitale e possono arrivare a deporre fino a 2000 uova. Gli adulti sono molto attivi e saltano o volano se disturbati. Gli stadi giovanili si spostano solo se disturbati, ma normalmente sono sedentari e vivono raggruppati formando colonie molto numerose sulla pagina inferiore della foglia della pianta ospite. La soglia di temperatura per lo sviluppo degli stadi giovanili è di circa 10-12°C. La specie è nota per essere molto sensibile alle temperature estremamente alte, mentre è favorita nelle aree fresche e umide sopra i 500-600 m (EPPO PM 9/27, 2020; Cocuzza *et al.*, 2017).

## 6 Piante ospiti/Hosts

### a, b, c - Batteri HLB

Tutte le varietà delle specie di citrus coltivate, a prescindere dal portinnesto, sono suscettibili ai batteri. La seguente tabella è tratta dalla Pest survey card dell'EFSA (2019):

Ospite	Nome scientifico	Nome comune
<b>Principali ospiti (agrumi)</b>	<i>Citrus reticulata</i>	Mandarino
	<i>Citrus x sinensis</i>	Arancio dolce
	<i>Citrus x tangelo</i>	Mapo
<b>Ospiti minori (agrumi)</b>	<i>Citrus x aurantiifolia</i>	Limetta
	<i>Citrus x jambhiri</i>	Limone rugoso
	<i>Citrus x limettioides</i>	Limetta dolce di Palestina
	<i>Citrus x limon</i>	Limone
	<i>Citrus maxima</i>	Pummelo
	<i>Citrus medica</i>	Cedro
	<i>Citrus x paradisi</i>	Pompelmo
	<i>Citrus x limonia</i>	Rangpur
	<i>Fortunella</i>	Kumquat
	<i>margarita</i>	Arancio trifogliato
<i>Poncirus trifoliata</i>		
<b>Altri ospiti</b>	<i>Murraya paniculata</i>	Gelsomino arancio
	<i>Clausena lansium</i>	Wampi
	<i>Severinia buxifolia</i>	Severinia a foglia di bosso
	<i>x Citrofortunella</i>	Calamondino
	<i>microcarpa</i>	

HLB. La pervinca (*Catharanthus roseus*) è stata vista essere ospite in condizioni sperimentali.

### Sintomi

Le tre specie batteriche (Las, Lam e Laf) causano sintomi simili.

Tipica della malattia è la presenza di rami gialli, dovuta all'ingiallimento delle foglie, visibili all'interno della chioma verde. I sintomi più caratteristici della malattia a livello fogliare sono le maculature clorotiche posizionate in maniera asimmetrica rispetto alla nervatura mediana. Altri sintomi includono ingiallimento delle nervature che possono ingrossarsi, gonfiarsi e suberificare o clorosi simili a quelle dovute alla carenza di zinco. Nelle fasi avanzate della malattia è possibile osservare foglie più spesse e coriacee dovute all'accumulo di amido. Indici di un'infezione grave e avanzata sono anche la presenza di foglie piccole, appuntite ed erette, conosciute come "orecchie di coniglio" e le "isole verdi", dove le aree verdi sulla foglia sono ridotte a piccole macchie circolari. Le piante con malattia avanzata manifestano inoltre, deperimento generale con defogliazione e cascola.

I frutti colpiti da HLB sono piccoli e asimmetrici. Nella fase di invaiatura non si colorano correttamente mostrando inversione di colore: la parte dello stilo tende a rimanere verde, mentre quella prossima al peduncolo diventa gialla o arancione. All'interno dei frutti possono essere presenti i resti scuri e avvizziti di semi abortiti, e la columella vascolare può mostrare una colorazione arancio-marrone. Il succo dei frutti infetti da HLB è stato descritto come salato e amaro o semplicemente privo di gusto.

### **6d - *Diaphorina citri***

Specie del genere *Citrus*:

- *Citrus aurantiifolia*
- *Citrus aurantium*
- *Citrus jambhiri*
- *Citrus limon*
- *Citrus medica*
- *Citrus paradisi*
- *Citrus reticulata*
- *Citrus sinensis*

O ibridi intergenerici (x *Citroncirus*, x *Citrifortunella*)

Altre specie appartenenti alla famiglia *Rutaceae*, tra cui:

- *Fortunella* spp.
- *Murraya paniculata*
- *Murraya koenigii*
- *Poncirus trifoliata*
- *Serverinia buxifolia*

*Ficus carica* come ospite accidentale.

#### **Sintomi**

Durante la loro attività trofica, gli insetti vettori di *Candidatus Liberibacter* spp. possono causare danni diretti alla pianta ospite. In particolare, *D. citri* è responsabile di distorsioni fogliari e defoliazioni. Inoltre, in caso di forti infestazioni, la pianta ospite presenta una crescita anomala dei nuovi germogli (aspetto a rosetta), che sono poi suscettibili a caduta. L'attività trofica del vettore ha anche come effetto collaterale la produzione di melata attraverso la formazione di tubuli cerosi, che ricoprono tutte le parti aeree della pianta e favoriscono a loro volta la formazione di fumaggini. (EPPO PM 9/27, 2020).

### **6e - *Trioza erytrae***

Specie del genere *Citrus*:

- *Citrus aurantiifolia*
- *Citrus limon*
- *Citrus jambhiri*
- *Citrus maxima*
- *Citrus medica*
- *Citrus paradisi*
- *Citrus reticulata*
- *Citrus unshiu*

O ibridi intergenerici (x *Citrifortunella*)

Altre specie appartenenti alla famiglia *Rutaceae*, tra cui:

- *Fortunella* spp.
- *Choisya* spp.
- *Poncirus* spp.
- *Clausena anisata*

#### **Sintomi**

Durante la loro attività trofica, gli insetti vettori di *Candidatus Liberibacter* spp. possono causare danni diretti alla pianta ospite. In particolare, *T. erytrae* è responsabile di severi sintomi fogliari quali arricciamenti, distorsioni, clorosi e arresto della crescita (Cocuzza *et al.*, 2017). L'attività trofica delle ninfe è inoltre responsabile della formazione di galle aperte a forma di coppa sulla superficie fogliare. L'attività trofica del vettore ha anche come effetto collaterale la produzione di melata, così che le foglie appaiono ricoperte di piccoli granuli bianchi e appiccicosi somiglianti a piccole uova. A sua volta la melata favorisce la formazione di fumaggini (EPPO PM 9/27, 2020).

**7 - Siti a rischio da monitorare/Typology of location to be surveyed**

Agrumeti. Sebbene la normativa impedisca l'importazione di piante di agrumi per la messa a dimora (plant for planting) dalle zone dove è presente HLB, la filiera delle piante per la messa a dimora deve comunque essere controllata e quindi andranno controllati i vivai (soprattutto quelli che importano le Rutaceae ornamentali che sono ospiti dei batteri HLB) e le zone contigue.

Nei piani di monitoraggio e sorveglianza è importante includere anche le piante che si trovano nei cortili e nei giardini visto che in USA e Brasile la malattia vi è stata spesso rinvenuta. Ad esempio, in California attualmente HLB è rinvenuta solo negli alberi delle residenze e non nelle aree di produzione.



## PARTE A – MONITORAGGIO/SURVEY

### Normativa di riferimento su modalità di monitoraggio:

#### EUROPEA:

- Regolamento UE 2016/2031

NAZIONALE: D. lgs. 19 agosto 2005 n. 214.

### Standard di riferimento:

**PM EPPO:** PM 9/27 (1) 'Candidatus Liberibacter' species that are causal agents of Huanglongbing disease of citrus and their vectors: procedures for official control.

#### ALTRE:

EFSA (European Food Safety Authority), Parnell, S., Camilleri, M., Diakaki, M., Schrader, G., & Vos, S. (2019). Pest survey card on Huanglongbing and its vectors. *EFSA Supporting Publications*, 16(4), 1574E.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Bragard C, Dehnen-Schmutz K, Di Serio F, Gonthier P, Jacques M-A, Jaques Miret JA, Justesen AF, Magnusson CS, Milonas P, Navas-Cortes JA, Parnell S, Potting R, Reignault PL, Thulke H-H, Van der Werf W, Civera AV, Yuen J, Zappalà L, Kertesz V, Streissl F and MacLeod A, 2021. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Diaphorina citri*. *EFSA Journal* 2021;19(1):6357, 37 pp.

### Misure di monitoraggio:

- ✓ Ispezione visiva – *Visual Inspection*
- ✓ Trapping degli insetti vettori - *Trapping*
- ✓ Campionamento – *Sample Taking*

### Ispezione visiva/*Visual inspection*

#### **Conduzione dell'ispezione:**




L'ispezione visiva riguarda principalmente gli agrumeti (campi in produzione e vivai). Dovrebbero essere controllate anche le piante nei cortili e nei giardini privati.

Devono essere controllate tutte le piante della famiglia Rutaceae presenti nel sito di ispezione.

Le piante devono essere esaminate sia per identificare:  
- i sintomi da HLB  
- i sintomi causati dalle psille

Per i sintomi e gli insetti vettori vedere foto nel resto del documento

<p>- la presenza delle psille.</p> <p>Le ispezioni visive devono essere condotte preferenzialmente lungo il perimetro dell'agrumeto, poiché le popolazioni degli insetti vettori tendono ad accumularsi sui bordi più esterni, di conseguenza anche la malattia HLB avrà più probabilità di essere lì presente.</p> <p>In campo: Effettuare la redazione del verbale d'ispezione con mappatura dei campi e delle piante ispezionate.</p>	
--	--

Quando	Cosa guardare	Immagini
<u>Sintomi da HLB:</u>		
<p>Sempre ma più evidenti in autunno e inverno</p>	<p><b>Visione d'insieme</b></p> <p>Presenza di Ingiallimenti (yellow shoots) e, negli stadi avanzati della malattia, defogliazione</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Foto: T.R. Gottwald e S.M. Garsey</p> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Foto: Florida DOACS</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Foto: M. E. Rogers, UFL</p> </div> </div>

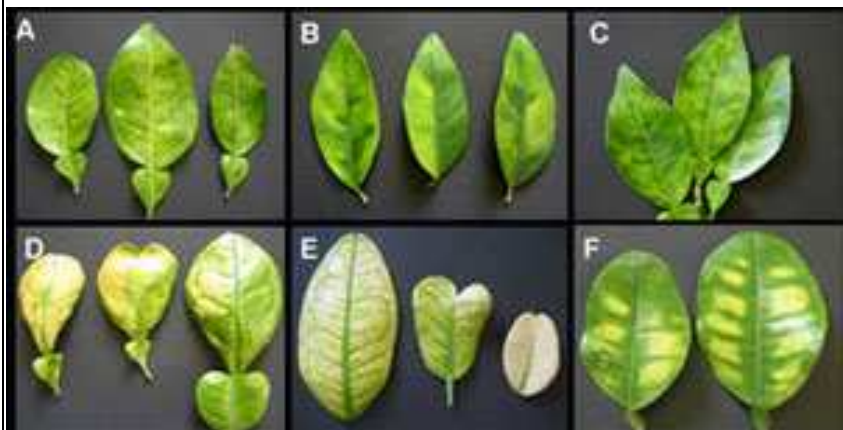


©Matthew Weinert/AQIS

**Sintomi Foglie**

**Ingiallimenti:**

- maculatura a chiazze asimmetriche
- ingiallimento delle nervature
- sintomi simili a carenza di zinco













Sintomi in A) arancio acido ( *Citrus aurantium* ) ; B) Lime (*Citrus aurantifolia* ) ; D) Citrus sp; C, E, ed F) Pummelo (*C. maxima*). Foto: Xiaolan Sun, Florida DOACS, Division of Plant Industry.







Maculatura a chiazze (blotchy mottle) asimmetrica

INRA Centre de Recherches de Bordeaux, Bugwood.org






			<p><b>Ingiallimento delle nervature</b> Foto: Florida DOACS, Division of Plant Industry</p>
			<p><b>Sintomi simili a quelli indotti dalla carenza di zinco</b> ©Matthew Weinert/AQIS</p>
	<p><b>Altri sintomi:</b></p>		<p><b>Ispessimento e suberificazione delle nervature</b> Foto: Pitino M</p>
	<p>- ispessimento e suberificazione delle nervature</p> <p>- Isole verdi (Green islands)</p>		<p><b>Maculatura a chiazze</b> Foto: Hilda Gomez, USDA</p>


	<p>- Orecchio di coniglio</p>	<p>Green islands su arancio dolce (<i>Citrus sinensis</i>). Ingiallimento quasi totale della pagina fogliare con la presenza di isole verdi</p>  <p>Hilda Gomez, USDA</p> <p><b>Sintomi Frutti</b></p> <p>- Inversione di colore e riduzione della pezzatura</p> <p>Nuovi germogli con foglie a "orecchio di coniglio". Foto: Xavier Isaac Funez Euceda (OIRSA) (SV)</p>   <p>- Deformazione dei frutti, asimmetria dell'asse carpellare, semi abortiti e</p>  <p>Foto: Bové</p>  <p>Foto: Hilda Gomez, USDA</p>  <p>Foto: T.R. Gottwald e S.M. Garsey</p>
--	-------------------------------	--

	<p>columella vascolare color arancione</p>	 <p>Foto: Catara V</p> <p>columella vascolare arancione</p>  <p>Florida Division of Plant Industry Archive, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Bugwood.org</p>  <p>Foto: Lomez</p>  <p>Foto: Bové</p>
--	--	---

Presenza di psille e rispettivi sintomi:

<p>L'ispezione per la presenza di psillidi vettori deve essere condotta tutto l'anno.</p> <p>I sintomi fogliari causati dall'attività trofica dell'insetto vettore sono maggiormente evidenti in primavera.</p>	<p>Le piante selezionate devono essere ispezionate per la presenza di tutti gli stadi di sviluppo degli insetti vettori (uova, forme giovanili e adulti). L'ispezione deve essere condotta a livello della chioma, con particolare attenzione alla pagina</p>	 <p>Infestazione di giovani e adulti di <i>D. citri</i> su foglie di lime. Evidenti le distorsioni fogliari e di presenza di melata. (<a href="https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/photos">https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/photos</a>)</p>
---	---	--

<p>inferiore delle foglie.</p> <p>Sintomi legati all'attività trofica degli insetti vettori:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>D. citri</i>: distorsioni fogliari e defoliazioni; aspetto a rosetta dei nuovi germogli.</li> <li>- <i>T. erytrae</i>: arricciamenti, distorsioni, clorosi fogliari e arresto della crescita; presenza di galle a coppa. Valutare anche la presenza di melata (e di conseguenti fumaggini) che potrebbe essere indicativa della presenza di entrambi i vettori.</li> </ul>		
	<p>Produzione di melata attraverso la formazione di tubuli cerosi da parte di giovani di <i>D. citri</i>. (Pitino M.)</p>	
		
	<p>Galle fogliari causate dall'attività trofica delle ninfe di <i>T. erytrae</i>.  <a href="https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos">https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos</a></p>	<p>Infestazione precoce di <i>T. erytrae</i> su germoglio di una pianta di limone.  <a href="https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos">https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos</a>.</p>
		
<p>Sintomi di deformazione fogliare causati da <i>T. erytrae</i> su una pianta di limone. (<a href="https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos">https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos</a>)</p>		

		
<p>Pianta di arancio infestata da <i>T. erythraea</i>. (<a href="https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos">https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/photos</a>)</p>		

### Trappolaggio/*Trapping*

Tipologia trappole	Quando	Dove
Trappole cromotattiche gialle da controllare ogni 14 giorni.	Gli insetti vettori non hanno diapausa e quindi gli adulti possono potenzialmente essere presenti tutto l'anno. Tuttavia, le trappole devono essere poste in almeno tre periodi, quando le popolazioni di psillidi raggiungono i livelli massimi con maggior probabilità: primavera, mezza estate e tarda estate-inizio autunno.	Ad altezza di uno-due metri lungo i bordi dell'agrumeto.

### Campionamento/*Sample taking*

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare
<u>Campioni vegetali per HLB:</u>		
<p><b>Piante sintomatiche</b> Da rami di un anno prelevare 5-10 foglie sintomatiche dalla parte superiore di ogni quadrante della pianta.</p> <p><b>Piante asintomatiche</b> Prelevare 10 foglie mature tutt' intorno alla chioma.</p>	Vedi sopra	<p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate ad evitare schiacciamento, compressione dei campioni.</p> <p>Tenere i campioni lontano da fonti di calore.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio conservare in frigorifero a 4°C.</p>
<u>Individui di psillidi vettori:</u>		



Adulti vivi rilevati sulle foglie delle piante ospiti possono essere campionati mediante retino e aspiratore entomologico.

Le forme giovanili possono essere campionate raccogliendo le foglie su cui sono state rilevate e poi trasferendo gli esemplari in provette con alcool mediante pennellino.

Gli adulti possono essere campionati anche con trappole cromotattiche.



In provette con alcool al 70% a temperatura ambiente.

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

### Batteri HLB

#### Inquadramento normativo

##### **EUROPEA**

I batteri HLB sono microrganismi da Quarantena

- Regolamento UE 2016/2031

PM7/121(1): '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'

**NAZIONALE** D. Lgs 19 agosto 2005 n. 214

#### Inquadramento EPPO:

PM1/002(27): EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2018)

**ALTRO:** CABI <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16567>

**Origini:** La malattia HLB è stata descritta per la prima volta nel sud della Cina nel XIX secolo. Per molti decenni è stata presente nelle maggiori aree produttive di agrumi in Asia ed Africa, più recentemente in America.

**Distribuzione:** La malattia HLB è presente in più di cinquanta paesi tra Asia, Africa, Oceania ed America. Ad oggi non sono state fatte segnalazioni nel bacino del mediterraneo.

#### Mappa EPPO/CABI

**LIBEAS**

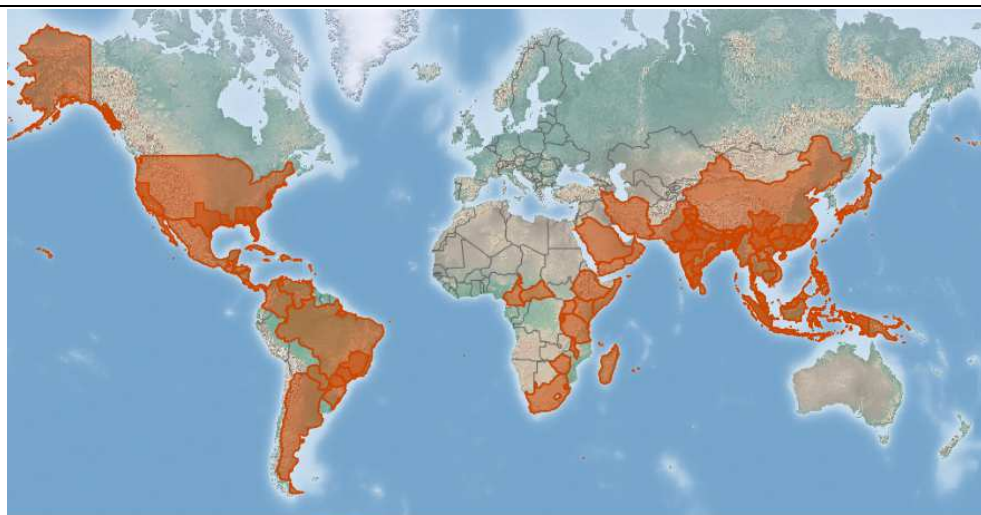
<https://gd.eppo.int/taxon/LIBEAS/distribution>  
**LIBEAM**

<https://gd.eppo.int/taxon/LIBEAM/distribution>

**LIBEAF**

<https://gd.eppo.int/taxon/LIBEAF/distribution>

**Mappa CABI:**



CABI, 2021. citrus huanglongbing (greening) disease. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc>

● CABI Summary Data

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/16567#toDistributionMaps>

**Presenza e/o segnalazioni in Italia:**

Nessuna segnalazione.

**Rischio di introduzione:**

**Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi**

**Negli ultimi 5 anni (2016-2020) non sono state segnalate intercettazioni**

## ***Diaphorina citri***

**Inquadramento normativo**

**Inquadramento EPPO:**

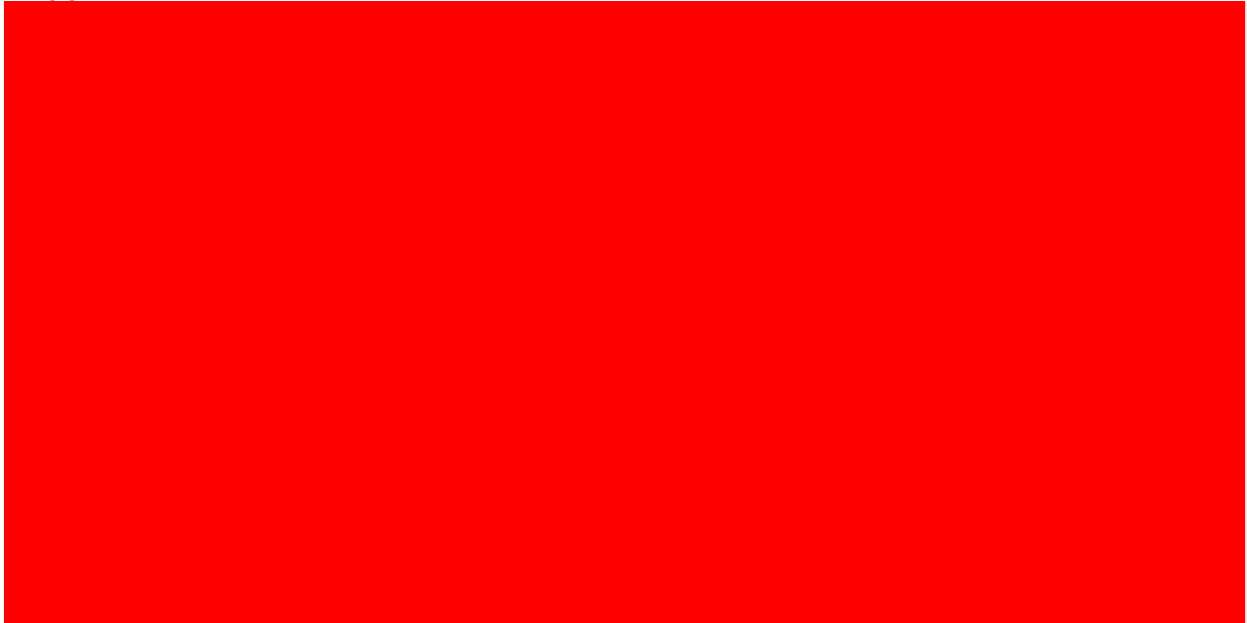
La specie è inserita nella lista A1 dell'EPPO.

**Origini:** Asia

**Distribuzione:** Asia: la specie è diffusa in tutto il continente asiatico, dall'Arabia Saudita al Giappone. Africa: la specie ha una diffusione ristretta a Kenya, Tanzania, Réunion e Mauritius. Oceania: la specie è segnalata sull'Isola di Guam, nell'arcipelago delle Marianne Settentrionali, sulle Isole Samoa e in Papua Nuova Guinea. Nord America: la specie è presente in Messico e negli U.S.A. Centro America e Caraibi: la specie è presente in Belize, Costa Rica, Porto Rico, Bahamas, Isole Cayman, Cuba, Giamaica, Rep. Dominicana, Guadalupe, Isole Vergini, Haiti, Martinica e Dominica. Sud America: la specie è presente in Brasile, Colombia, Paraguay, Uruguay e Venezuela e in una ristretta area dell'Argentina.

Non vi sono ad oggi segnalazioni nel Bacino Mediterraneo.

### Mappa EPPO/CABI



<https://gd.eppo.int/taxon/DIAACI/distribution>

Presenza e/o segnalazioni in Italia ad oggi: nessuna

#### Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi

Negli ultimi 5 anni (2016-2020) le intercettazioni sono state le seguenti:

Country of Export	YEAR	Object	Plant Species No. of Interceptions
Vietnam	2016	Other living plants: fruits and vegetables	Murraya koenigii (1)

## *Trioza erytreae*

Inquadramento normativo

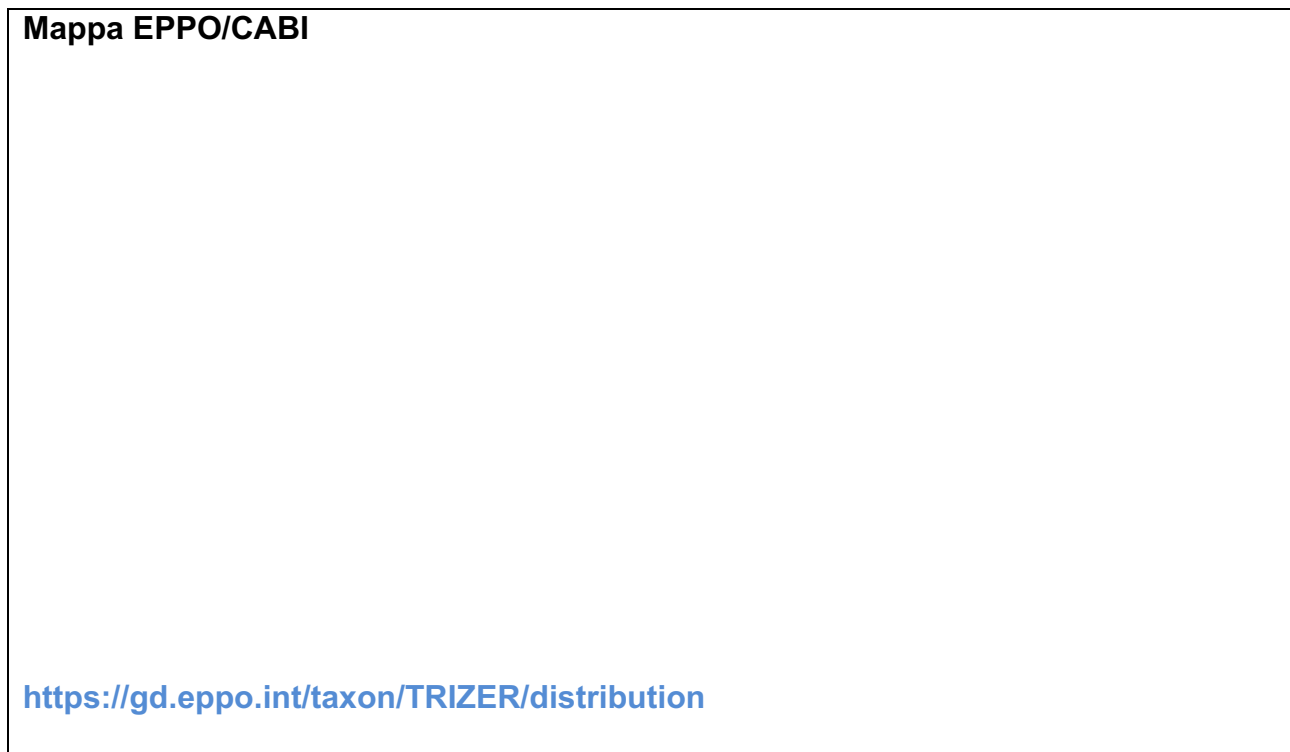
Inquadramento EPPO:

La specie è inserita nella lista A2 dell'EPPO.

Origini: Africa

**Distribuzione:** Africa: la specie è diffusa in gran parte continente, in particolare nei Paesi meridionali, centrali e nord-orientali. Asia: la specie la specie è diffusa in Arabia Saudita e Yemen. Europa e Bacino Mediterraneo: la specie è stata segnalata per la prima volta sull'Isola di Madeira (1994). In seguito si è diffusa anche nel Portogallo continentale (segnalazione a Porto nel 2015, Lisbona 2018), sulle Isole Canarie (Tenerife, La Gomera, La Palma and El Hierro) e nella Spagna continentale (segnalazione in Galizia nel 2014). Attualmente la presenza della specie in Spagna e Portogallo è oggetto di interventi di eradicazione ed è limitata a zone costiere nel nord dei due Paesi, lontano da agrumeti in produzione e vivai.

**Mappa EPPO/CABI**



<https://gd.eppo.int/taxon/TRIZER/distribution>

**Presenza e/o segnalazioni in Italia ad oggi:** nessuna

**Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi**

**Negli ultimi 5 anni (2016-2020) le intercettazioni sono state le seguenti:**

Country of Export	year	Object	Plant Species (No. Of Interceptions)
Uganda	2017	Other living plants: fruits and vegetables	Murraya koenigii (2)
Uganda	2016	Other living plants: fruits and vegetables	Murraya koenigii (6)

## PARTE C – DIAGNOSI

### Normativa di riferimento:

**EUROPEA:** -

**NAZIONALE:** -

### Protocolli standard di riferimento

#### PM7 EPPO:

- PM7/121(1) '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. 2014
- PM 7/52 (1) *Diaphorina citri*
- PM 7/57 (1) *Trioza erytreae*

#### Altro:

NAPPO DIAGNOSTIC PROTOCOL DP 02: Citrus Huanglongbing

CABI <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16567#todiagnosis>

Cellier, G., Redondo, C., Cubero, J., Roselló, M., de Andrade, E., Cruz, L., ... & Giovani, B. (2020). Comparison of the performance of the main real-time and conventional PCR detection tests for '*Candidatus Liberibacter*' spp., plant pathogenic bacteria causing the Huanglongbing disease in Citrus spp. *European Journal of Plant Pathology*, 157(4), 919-941.

### Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato (riportato in IO 05)

- **(IV) Morphological identification** (stereoscopio sia trappole che foglie per *Diaphorina citri*, *Trioza erytreae*)
- **(V) Microscopically identification** (per *Diaphorina citri*, *Trioza erytreae* su singoli preparati degli individui)
- **(XV) PCR**
- **(XIX) PCR+Sequencing** (va indicato quando si fa insieme la PCR e si invia al sequenziamento)
- **(XX) Real Time - PCR** (per *Candidatus Liberibacter* spp)

### Matrice

#### Diagnosi di HLB:

I test di laboratorio per verificare la presenza dei batteri HLB devono essere effettuati sia sui campioni di citrus che sui vettori

Matrici vegetali: foglie (nervature)

Insetti vettori: individui raccolti vivi e conservati in alcool (e non individui catturati con le trappole cromotattiche).

#### Identificazione di psillidi vettori:

L'identificazione delle specie di psillidi vettori di HLB viene eseguita su individui adulti e eventualmente stadi giovanili. L'identificazione è eseguita preferibilmente su individui adulti catturati freschi (non da trappole cromotattiche) i cui caratteri distintivi sono più evidenti.

### Tipologia di test

#### Diagnosi di HLB (cod IO 05 XV, XIX, XX):

Non essendo coltivabile *in vitro* la diagnosi è essenzialmente molecolare con real-time PCR e/o end-point PCR; la prima consigliata per la maggiore sensibilità e minor possibilità di contaminazione da DNA amplificato.

Diagnosi su matrici vegetali: il test viene effettuato sul DNA totale estratto dalla matrice vegetale (0.5-1 gr di nervature fogliari) con i metodi indicati in EPPO PM7/121 (1) seguendo il diagramma di flusso riportato:

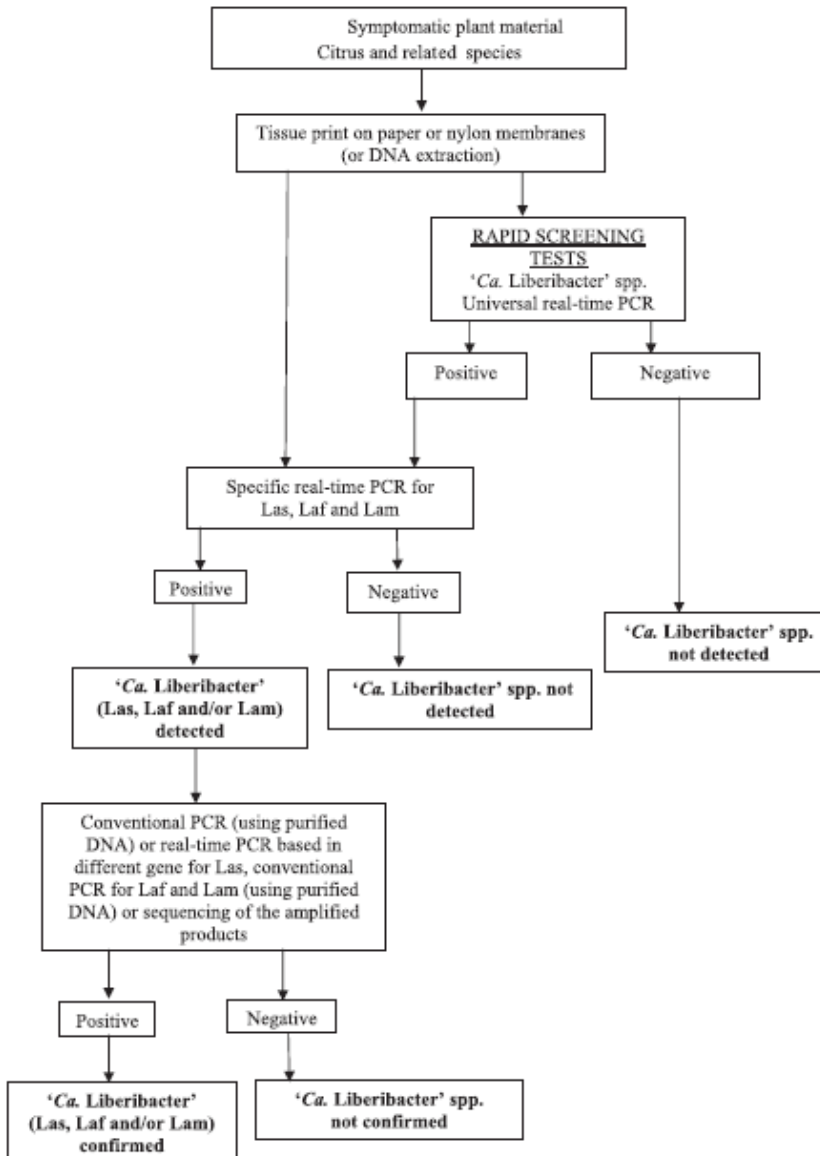
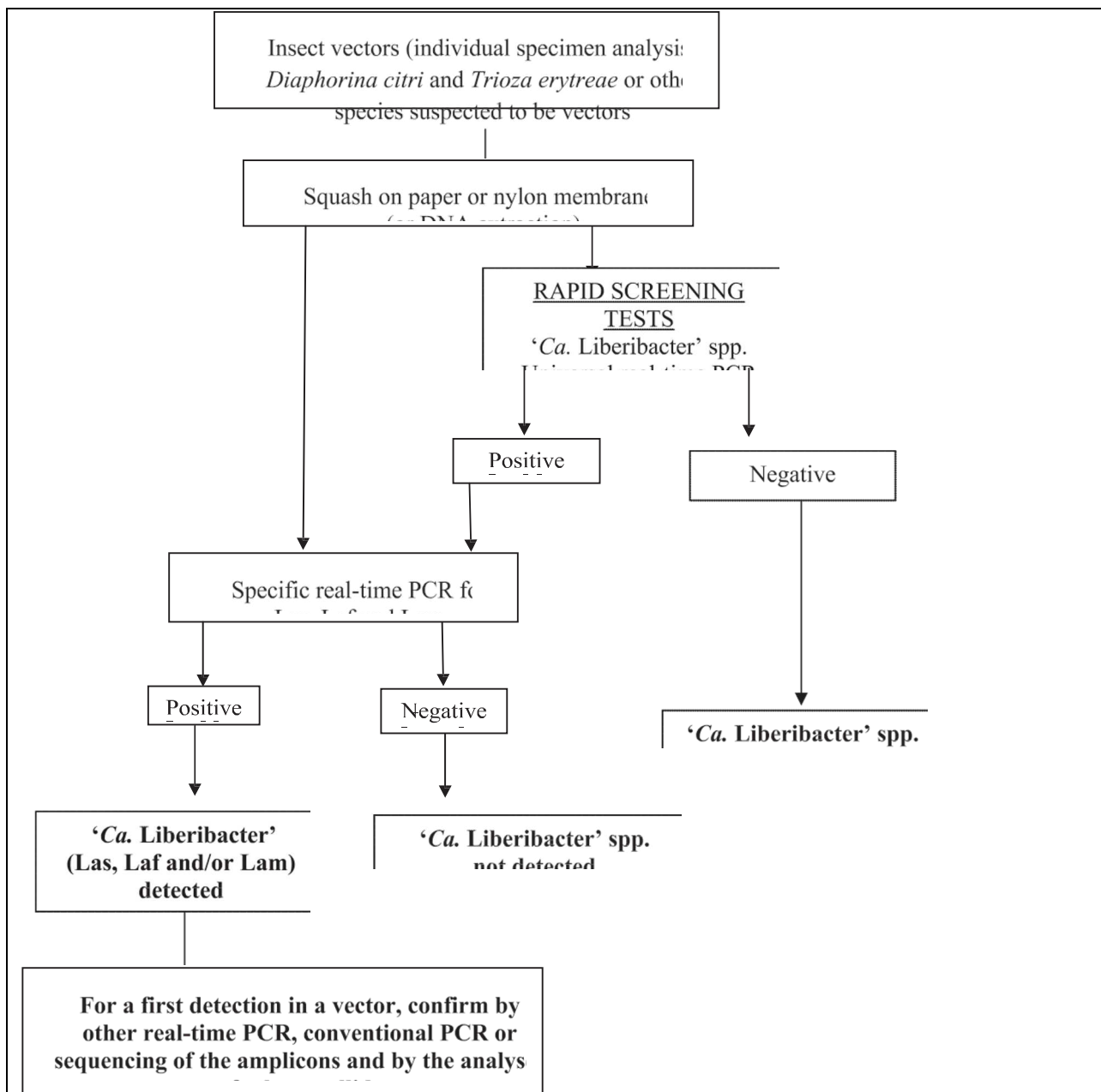


Fig. 1 Flow diagram for the detection of 'Ca. Liberibacter' spp. in plant material. Laf = 'Ca. Liberibacter africanus', Lam = 'Ca. Liberibacter americanus' and Las = 'Ca. Liberibacter asiaticus'.

#### Diagnosi su insetti vettori (cod IO 05 XV, XX):

il test viene effettuato sul DNA totale estratto da singoli individui adulti di psillidi vettori con i metodi indicati in EPPO PM7/121 (1) seguendo il diagramma di flusso riportato:





Identificazione di psillidi vettori (cod IO 05 IV, V, XV, XIX):

I protocolli EPPO prevedono che l'identificazione di entrambi gli insetti vettori venga effettuata su base morfologica. La conferma può essere effettuata con identificazione molecolare amplificando regioni note del Cytochrome c oxidase I (COX1) con conseguente sequenziamento delle regioni di DNA amplificate e confronto con le sequenze di riferimento di ciascuna specie depositate nei database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org/>).

**Riferimenti Bibliografici**

Cellier, G., Redondo, C., Cubero, J., Roselló, M., de Andrade, E., Cruz, L., ... & Giovani, B. (2020). Comparison of the performance of the main real-time and conventional PCR detection tests for '*Candidatus Liberibacter*' spp., plant pathogenic bacteria causing the Huanglongbing disease in Citrus spp. *European Journal of Plant Pathology*, 157(4), 919-941.

---

Cocuzza GEM, Alberto U, Hernández-Suárez E, Siverio F, Di Silvestro S, Tena A, and Carmelo R, 2017. A review on *Trioza erytreae* (African citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of Huanglongbing (HLB) in citrus. *Journal of Pest Science*, 90(1), 1-17.

EFSA (European Food Safety Authority), Parnell, S., Camilleri, M., Diakaki, M., Schrader, G., & Vos, S., 2019. Pest survey card on Huanglongbing and its vectors. *EFSA Supporting Publications*, 16(4), 1574E.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Bragard C, Dehnen-Schmutz K, Di Serio F, Gonthier P, Jacques M-A, Jaques Miret JA, Justesen AF, Magnusson CS, Milonas P, Navas-Cortes JA, Parnell S, Potting R, Reignault PL, Thulke H-H, Van der Werf W, Civera AV, Yuen J, Zappalà L, Kertesz V, Streissl F and MacLeod A, 2021. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Diaphorina citri*. *EFSA Journal* 2021;19(1):6357, 37 pp.

EPPO PM 7/121 (1), 2014. '*Candidatus Liberibacter africanus*', '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Bulletin OEPP/EPPO* 44(3), 376–389 e bibliografia citata nel documento.

EPPO PM 7/52 (1), 2005. *Diaphorina citri*. *Bulletin OEPP/EPPO* 35: 331–333 e bibliografia citata nel documento.

EPPO PM 7/57 (1), 2005. *Trioza erytreae*. *Bulletin OEPP/EPPO* 35: 271–273 e bibliografia citata nel documento.

EPPO PM 9/27 (1), 2020. '*Candidatus Liberibacter*' species that are causal agents of Huanglongbing disease of citrus and their vectors: procedures for official control. *OEPP/EPPO* 50: 122–141 e bibliografia citata nel documento.

Haapalainen, 2014. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology* 165: 172-198.

#### Autori:

Vincenza Ilardi per i batteri HLB; Sabrina Bertin per gli psillidi vettori. GdL Monitoraggio

Cofinanziato - UE



Ministero delle  
politiche agricole  
alimentari e forestali



## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

### 1- Nome comune dell'organismo e della malattia/ *Common name of the pest*

*Xylella fastidiosa* / malattia di Pierce della vite (Pierce's disease of grapevine); mal del pennacchio del pesco (phony peach disease); clorosi variegata degli agrumi (citrus variegated chlorosis); scottatura fogliare del susino (plum leaf scald); bruscatura fogliare (leaf scorch) di varie specie vegetali (mandorlo, olivo, olmo, platano, *Acer* spp., *Morus* spp., *Quercus* spp.), sindrome del disseccamento rapido dell'olivo (olive quick decline syndrome)

### 2 - Nome scientifico /*Scientific name*

*Xylella fastidiosa* Wells *et al.* (1987)

### 3 – EPPO Code:

XYLEFA (*Xylella fastidiosa*)

### 4 - Posizione tassonomica/*Taxonomy*

- Kingdom: Bacteria
- Phylum: Proteobacteria
- Class: Gammaproteobacteria
- Order: Xanthomonadales
- Family: Xanthomonadaceae
- Genus: *Xylella*
- Species: *Xylella fastidiosa*

All'interno della specie *Xylella fastidiosa* sono state individuate dall'EFSA Panel on Plant Health (2018) sei sottospecie di seguito elencate:

- ❖ *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*
- ❖ *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex*
- ❖ *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*
- ❖ *Xylella fastidiosa* subsp. *sandyi*
- ❖ *Xylella fastidiosa* subsp. *tashkei*
- ❖ *Xylella fastidiosa* subsp. *morus*

L'International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria (ISPP-CTPPB) ha riconosciuto ufficialmente valide le sottospecie *multiplex* e *fastidiosa*. Tuttavia, sulla base di studi di ibridazione DNA-DNA e di analisi di genomica comparativa (Schaad *et al.*, 2002; Marcelletti and Scortichini, 2016; Denancé *et al.*, 2019), le sottospecie formalmente accettate di Xf, sono *fastidiosa*, *pauca* e *multiplex*. Inoltre, ciascuna sottospecie include diversi *Sequence Type* (ST) determinati dall'analisi MLST (Multi Locus Sequence Typing) basata sulla tecnologia di sequenziamento Sanger di sette geni *housekeeping* (Yuan *et al.*, 2010; Nunney *et al.*, 2012).

## 5 – Aspetti epidemiologici dell'organismo/*Pest epidemiology*

*Xylella fastidiosa* è un batterio gram-negativo con un ampio numero di specie vegetali ospiti (oltre 500 tra specie erbacee e legnose), alcune delle quali di grande importanza economica (vite, agrumi, piante da frutto, caffè), oltre a specie spontanee tipiche della macchia mediterranea (ginestra, alaterno, calicotome, elicriso, rosmarino, cisto, mirto, alloro, lavanda). È un batterio asporigeno che colonizza i vasi xilematici dell'ospite contribuendo, attraverso la produzione di biofilm, all'occlusione dei vasi con conseguenze che possono portare a morte la pianta. I sintomi assomigliano a quelli causati da stress idrico. Sebbene le cellule batteriche possano muoversi sistemicamente attraverso i vasi xilematici di piante sensibili infette, in alcune piante ospiti, tuttavia, la loro presenza può rimanere limitata in alcune parti della pianta (Purcell and Saunders, 1999). Il periodo di tempo tra l'inoculazione e la comparsa di sintomi (periodo di incubazione) è altamente variabile e varia da pochi mesi ad anni, a seconda del genotipo *X. fastidiosa*, la specie ospite, lo stadio fisiologico (età) della pianta e le condizioni di crescita (EFSA 2018, 2019a). D'altra parte, alcune specie vegetali potrebbero anche non esprimere alcun sintomo, che può anche dipendere dalle condizioni di crescita (EFSA, 2019).

Il batterio è trasmesso da insetti emitteri che si nutrono succhiando la linfa dei vasi xilematici. In Italia l'insetto vettore più comune è *Philaenus spumarius* e in misura minore *Neophilaenus campestris* e *Philaenus italosignus*. *Philaenus spumarius* è presente in tutta Europa ed è una specie polifaga, con un gran numero di piante ospiti. *Philaenus italosignus* è una specie endemica in Italia e la sua presenza è ristretta all'Italia meridionale e alla Sicilia. *Neophilaenus campestris* è presente soprattutto in Europa occidentale ed è infeudato su piante erbacee.

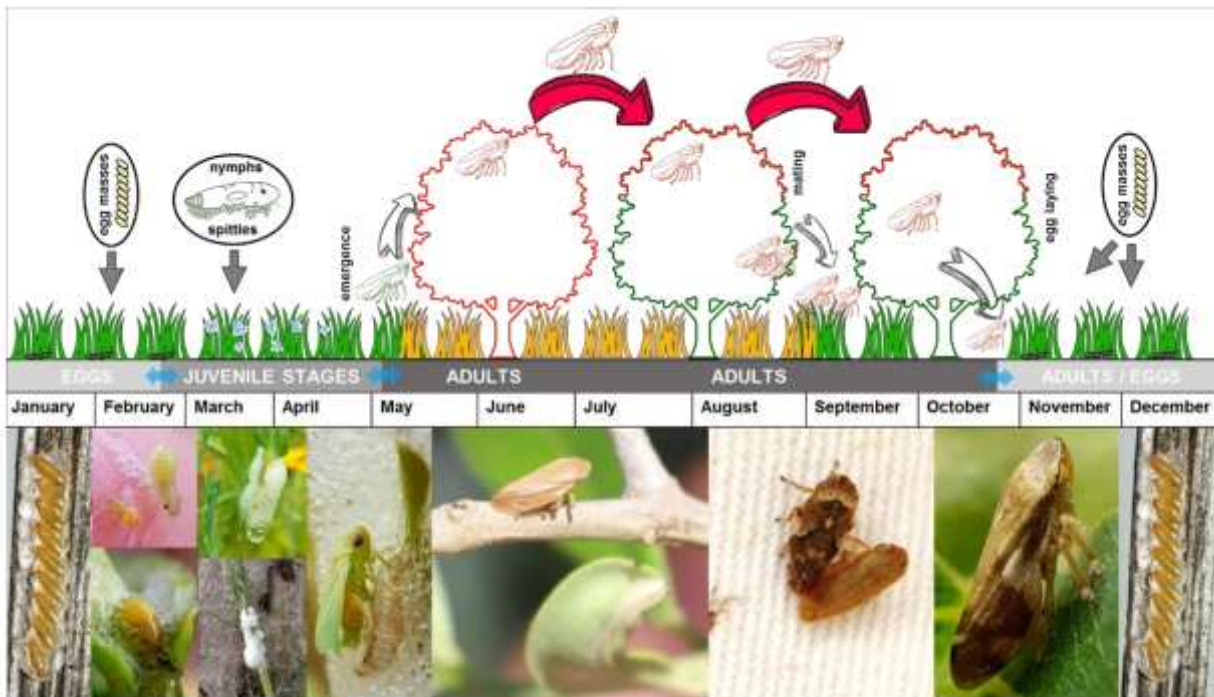


Le malattie causate da *X. fastidiosa* derivano dall'interazione tra il batterio, le piante ospiti, comprese le piante ospiti asintomatiche (che fungono da serbatoi), gli insetti vettori e le condizioni ambientali (EFSA, 2018; Chatterjee *et al.*, 2008).

### Trasmissione

Il batterio viene trasmesso in modo persistente senza un periodo di latenza dopo l'acquisizione (Almeida *et al.*, 2005). I vettori (sia ninfe che adulti) acquisiscono i batteri nutrendosi nello xilema dell'ospite e possono inoculare l'agente patogeno in piante sane immediatamente dopo l'acquisizione. Nell'insetto i batteri restano limitati al canale alimentare e non colonizzano il resto del corpo in maniera sistemica. Aderiscono e si moltiplicano in parti dell'intestino quali il *precibarium* e il *cibarium*; ciò implica che i vettori perdono infettività con la muta, in quanto durante questa fase l'intestino si rinnova. Pertanto, gli adulti appena emersi devono acquisire nuovamente *X. fastidiosa* per diventare infettivi e diffonderlo. Una volta infettivi, i vettori adulti invece possono trasmettere il batterio per tutta la loro vita (Almeida *et al.*, 2005). Il batterio non viene trasmesso per via transovarica alla progenie del vettore (Freitag, 1951). Gli adulti alati, a causa della loro elevata mobilità e della loro infezione persistente, sono i principali responsabili della diffusione di *X. fastidiosa*. La trasmissione di *X. fastidiosa* a nuove piante ospiti avviene anche in presenza di pochissime cellule batteriche vive nell'intestino del vettore (Hill e Purcell, 1995). L'efficienza della trasmissione varia sostanzialmente a seconda della specie di insetto, della pianta ospite e del genotipo *X. fastidiosa*. Tutti gli insetti che si nutrono della linfa dello xilema sono considerati potenziali vettori (EFSA, 2019).

Di seguito è rappresentato il ciclo vitale di *Philaenus spumarius* nella regione Puglia (Italia) (tratto da EFSA, 2019).



Il batterio può essere trasmesso anche per attività antropica mediante la movimentazione di piante infette, materiale di propagazione vegetativo e l'innesto (EFSA PHL Panel, 2015).

### Sintomi

La tipologia di sintomo dipende dalla combinazione fra la specie vegetale ospite e il ceppo di *X. fastidiosa*. I sintomi sulle specie ospiti principali (per impatto della malattia e interesse commerciale) sono riportati di seguito.

#### Olivo

Sintomi di bruscatura fogliare e deperimento (*dieback*) su olivo sono stati descritti in California (Krugner *et al.*, 2014) in associazione a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*. Tuttavia, non è stata soddisfatta la prova di patogenicità, non essendo certa la correlazione fra la presenza di *X. fastidiosa* e i sintomi.

In Puglia (sud Italia) la sindrome del disseccamento rapido dell'olivo è stata associata a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Saponari *et al.*, 2013). La malattia si manifesta con brusature fogliari, disseccamento della porzione apicale e marginale della foglia e repentino disseccamento di rami e drupe in accrescimento. La chioma presenta disseccamenti a carico di rami e/o branche in maniera irregolare ('pelle di leopardo').

Il decorso della malattia porta le piante a morte.



(Foto Donato Boscia, CNR, Istituto Protezione Sostenibile Piante (IPSP), Bari)

Piante di olivo infette da *X. fastidiosa* sono state individuate in Spagna, Francia, Argentina e Brasile (Landa *et*

*al.*, 2017; EPPO Reporting Service no. 09 – 2019; Haelterman *et al.*, 2015; Colletta-Filho *et al.*, 2016).

### **Varie specie vegetali (verde urbano, foreste, macchia mediterranea, materiale vivaistico)**

Molte specie vegetali presentano il caratteristico sintomo della bruscatura fogliare. Esempi sono il mandorlo, il ciliegio, il mirtillo e varie specie presenti nel verde urbano come *Acer spp.*, *Cornus florida*, *Celtis occidentalis*, *Liquidambar styraciflua*, *Morus alba*, *Platanus spp.*, *Quercus spp.* e *Ulmus americana* (Gould & Lashomb, 2007), *Polygala myrtifolia*, oleandro, mimosa e specie tipiche della macchia mediterranea come rosmarino, lavanda, mirto, cisto e ginestra. Nelle specie a foglia espansa, le foglie colpite hanno una necrosi marginale talora circondata da un alone clorotico (giallo) o rosso. Nelle altre specie si osservano sintomi di disseccamento irregolari nella pianta. In generale, i sintomi progrediscono dalle foglie più vecchie alle più giovani e, con il progredire della malattia, i rami muoiono e la pianta può presentare un aspetto spoglio. Le piante possono andare incontro a morte.

### **Vite**

Il sintomo principale su vite è la bruscatura fogliare. I margini fogliari disseccano rapidamente accompagnati da un alone clorotico, l'intera lamina fogliare può disseccare. I tessuti infetti possono maturare irregolarmente mostrando tessuti non lignificati (verdi) su tralci lignificati (livello internodi). È possibile il disseccamento dei grappoli che rimangono attaccati al tralcio, mentre il tronco non presenta alterazioni.

### **Agrumi**

I primi sintomi fogliari appaiono come piccole macchie clorotiche sulla superficie superiore che corrispondono a macchie brune dall'aspetto gommoso sul lato inferiore della foglia. I sintomi si rendono più evidenti sulle foglie completamente espanse indipendentemente dall'età della pianta e principalmente sulle cultivar di arancio dolce. La clorosi internervale fogliare è somigliante alla carenza di zinco.

Gli alberi affetti sono stentati e la chioma va incontro a defogliazione e deperimento di rami e branche.

Fioritura e allegagione hanno un decorso normale, ma nelle piante colpite non si verifica un normale diradamento dei frutti che rimangono piccoli, maturano in anticipo e presentano una consistenza cuoiosa. Le piante di solito non muoiono, ma la resa e la qualità del frutto sono fortemente ridotte (Donadio & Moreira, 1998).

### **Caffè**

Sintomi di bruscatura fogliare sono presenti come imbrunimenti della lamina fogliare a partire dai margini. Le foglie infette cadono prematuramente. I germogli hanno una crescita stentata e le foglie apicali appaiono clorotiche e di taglia ridotta. I margini fogliari possono essere più o meno arricciati (curling) e le piante presentano raccorciamento degli internodi e crescita stentata. I sintomi possono progredire col deperimento dei germogli. In Costa Rica sono stati riportati i cosiddetti sintomi di "crespera" in associazione a piante infette di caffè.

### **Pesco**

Le piante infette presentano internodi raccorciati, incrementata ramificazione laterale, foglie affastellate (verde più scuro del normale), fioritura anticipata, permanenza su rami di fiori e foglie, pezzatura ridotta di frutti e maturazione anticipata. Lo sviluppo dei sintomi è lento (fino a 18 mesi). La chioma assume un aspetto compatto e arrotondato. Non si manifestano i sintomi di bruscatura fogliare.

### **Erba medica**

La pianta mostra una crescita stentata che può non essere evidente per molti mesi dopo l'infezione. Le giovani foglie sono più piccole e spesso presentano una colorazione più scura rispetto alle piante sane. Il fittone è di dimensioni normali, ma il legno ha un colore insolitamente giallastro, con sottili strisce scure di tessuto morto. Nelle piante appena infettate si osserva un ingiallimento del legno al di sotto dello strato corticale esterno, mentre gli strati più interni non presentano alterazioni. I sintomi di nanismo peggiorano progressivamente,

eventualmente portando la pianta a morte.

## 6 - Piante ospiti/ Hosts

Nella letteratura scientifica (EFSA, 2019) vengono riportate un totale di 595 piante ospiti. Di queste, 343 sono state confermate con l'ausilio di almeno due diversi test molecolari per il rilevamento di *X. fastidiosa* e sono 192 le specie individuate infette in condizioni naturali o sperimentali. Ai sensi della Decisione 2015/789/EU, le seguenti specie sono a maggior rischio di infezione: *Coffea* spp., *Lavandula dentata* L., *Nerium oleander* L., *Olea europaea* L., *P. myrtifolia* L. e *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb.

In considerazione dell'elevato numero di specie ospiti di *X. fastidiosa*, è possibile trovare informazioni sulle piante ospiti e sulle sottospecie di *X. fastidiosa* in grado di infettarle, nel database delle piante ospiti dell'EFSA (EFSA, 2018; EFSA, 2020). Secondo l'ultimo rapporto EFSA del 6/4/2020 sono 595 le specie vegetali ospiti di *Xylella fastidiosa* di cui 275 generi e 85 famiglie. Il rapporto EFSA del 2020 riporta circa 37 specie vegetali in più rispetto al precedente rapporto del 2018. Il database in oggetto include tutte le specie di piante ospiti in cui l'agente patogeno è stato rilevato e segnalato. Le specie maggiormente attenzionate sono quelle ritrovate positive sul territorio Europeo che sono indicate nell'elenco della Commissione Europea soggetto a costante aggiornamento.

([https://ec.europa.eu/food/plant/plant\\_health\\_biosecurity/legislation/emergency\\_measures/xylella-fastidiosa/susceptible\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency_measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en))

## 7 - Siti a rischio da monitorare/ Typology of location to be surveyed

### Siti a rischio/Location

Fondamentale è monitorare tutte le attività correlate ai pathway di introduzione del batterio: commercio, movimentazione di materiale, importazione e preparazione di materiale di moltiplicazione delle piante. Di conseguenza rappresentano siti a rischio i vivai, i centri di giardinaggio, i porti, gli aeroporti, i centri di vendita di materiale vegetale di importazione da Paesi in cui è presente la malattia e le vie di comunicazione tra questi siti per il rilascio involontario del vettore.

Sono anche fattori di rischio:

- Movimento involontario di insetti vettori infetti associato al movimento di materiale vegetale da aree in cui *X. fastidiosa* è presente verso aree indenni.
- Percorsi turistici (trasporto di veicoli e imbarcazioni dalle aree in cui è presente il batterio verso aree indenni idonee alla sua stabilizzazione).
- Spostamento intenzionale di materiale vegetale da parte dei cittadini, in particolare dei collezionisti di piante.
- Attività in aree urbane correlate ad acquisto/movimentazione di piante da parte di cittadini (mercati, vivai, centri di giardinaggio).
- Campi e frutteti trascurati e abbandonati nelle aree rurali.

La tabella seguente riassume quanto sopra:

Attività a rischio	Siti a rischio
--------------------	----------------

Produzione, stoccaggio e movimentazione di piantine ospiti	Vivai e centri di giardinaggio che producono, moltiplicano e allevano piante ornamentali, piante agrarie o alberi per verde urbano, etc.
Trasporto di materiale di propagazione	- Blocchi lungo le arterie stradali principali e le ferrovie (ad es. parcheggi per camion) per i percorsi collegati alle aree infette - Aeroporti e porti con movimento di materiale vegetale da paesi in cui è presente il patogeno
Turismo	Piante ospiti vegetali, giardini e parchi in vicinanza di siti turistici

(Tratto da EFSA, 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*.)

### Aree a rischio/ Risk areas

Le aree a rischio possono essere definite come le unità epidemiologiche contigue ai luoghi a rischio. La definizione delle aree a rischio intorno ad una determinata località a rischio tiene conto della capacità di diffusione del vettore e della disponibilità di piante ospiti. Sulla base dei valori indicativi di distanza per la diffusione annuale di *P. spumarius*, possono essere definite diverse aree a rischio.

1. Nel caso di un'indagine di rilevamento, vale a dire quando non è stato ancora segnalato alcun caso positivo, l'obiettivo dell'indagine è quello di comprovare l'assenza del parassita o di individuare il batterio, nel caso in cui il parassita sia presente. Per *X. fastidiosa*, che è in grado di effettuare salti a lungo raggio, è importante coprire un gran numero di aree a rischio. Supponendo che in un ambiente adatto una pianta ospite infetta rimanga persistentemente infetta e che siano presenti vettori competenti, il raggio dal luogo a rischio in cui è più probabile che si trovi il parassita dovrebbe essere di circa 150 m (EFSA, 2019a).
2. Nel caso di una attività di delimitazione di un'area in cui sia stato già effettuato un primo ritrovamento del batterio, la prima azione dovrebbe essere quella di risalire al sito di introduzione dell'organismo nocivo (ubicazione del rischio). Nell'indagine di delimitazione l'obiettivo è di individuare l'area più ristretta in cui è contenuto il patogeno attraverso la delimitazione di cerchi concentrici intorno al sito a rischio, dalla periferia verso l'interno dell'area a rischio fino al sito di rischio stesso.  
Nel primo e secondo anno di introduzione del batterio, il modello di diffusione mostra che la diffusione è trascurabile (Figura 5) (gruppo di esperti scientifici PLH dell'EFSA, 2019a). Tuttavia, per i primi due anni si può considerare una distanza precauzionale di 150 m all'anno. Da anni 3 a 5, il modello di diffusione a corto raggio mostra distanze fino a 1500 m in seguito all'introduzione di *X. fastidiosa*

La tabella indica le bande intorno alle località a rischio tenendo conto del tempo trascorso dall'ultima indagine di rilevamento.

Anni dall'ultima indagine di rilevamento nel sito	Distanza dal luogo di rischio
1	0-150m
2	150-300m
3	300-500m
4	500-1000m
5	1000-1500m

(Tratto da EFSA, 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*.)

Una volta delimitata l'area in cui il parassita è in circolazione, si dovrebbe definire una zona cuscinetto intorno all'area infetta. Nel gruppo di esperti scientifici PLH dell'EFSA (2019a, tabella A.5.) l'intervallo del 95% della diffusione a lunga distanza va da circa 8 a 20 km con una media di circa 10 km all'anno.



## PARTE A – MONITORAGGIO / SURVEY

### Normativa di riferimento su modalità di monitoraggio:

#### EUROPEA:

- Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) che abroga la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789.
- IPPC (2008) ISPM 31 Methodologies for Sampling of Consignments, IPPC, FAO, Rome
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 9 ottobre 2018 n. 1511 Modifica della decisione di esecuzione (UE) 2015/789 relativa alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells et al.)

e precedenti:

- Decisione di Esecuzione della Commissione del 27 giugno 2018 n. 927
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 14 dicembre 2017 n. 2352
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 12 maggio 2016 n. 764
- Rettifica della Decisione di Esecuzione (UE) 2015/789 della Commissione, del 18 maggio 2015
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 17 dicembre 2015 n. 2417
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 18 maggio 2015 n. 789
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 23 luglio 2014, n. 497
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 13 febbraio 2014 n. 87

#### NAZIONALE:

- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali e del Turismo del 5 ottobre 2018. Modifica del decreto ministeriale 13 febbraio 2018, concernente le misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di *Xylella fastidiosa* (Wells et al. ) nel territorio della Repubblica italiana. (G.U. n. 271 del 21-11-2018)
- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 13 febbraio 2018. Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) nel territorio della Repubblica italiana. (G.U. n. 80 del 06-04-2018) e precedenti.
- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 18 febbraio 2016. Definizione delle aree indenni dall'organismo nocivo *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) nel territorio della Repubblica italiana. (G.U. n. 54 del 05-03-2016)

**Standard di riferimento:****PM EPPO:**

- PM3/081(1) Inspection of consignments for *Xylella fastidiosa*
- PM3/082(1) Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*
- PM3/085(1) Inspection of places of production – *Vitis* plants for planting
- PM3/076(1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. – inspection of places of production
- PM1/002(28) EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019)
- PM8/005(1) *Quercus*

**ALTRO:**

- Linee Guida della Commissione Europea (Guidelines for the survey of *Xylella fastidiosa* Wells et al. in the Union Territory -2015)  
[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph\\_biosec\\_legis\\_guidelines\\_xylella-survey.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_guidelines_xylella-survey.pdf)
- EFSA pest survey card su *Xylella* - <https://www.efsa.europa.eu/it/supporting/pub/en-1667>

**Misure di monitoraggio:**

- ✓ Ispezione visiva – *Visual Inspection*
- ✓ Campionamento\* – *Sample Taking*

\* materiale vegetale sintomatico e asintomatico (aree a maggior rischio di introduzione dell'organismo, vedi di seguito) e/o insetti vettori.

Secondo le linee guida della Commissione Europea, il campionamento per analisi di laboratorio dovrebbe essere effettuato allo stesso momento delle ispezioni visive

Le indagini devono concentrarsi in aree considerate a maggiore rischio di introduzione dell'organismo specificato. Le aree a maggior rischio di introduzione dell'organismo nocivo devono essere individuate tenendo conto di condizioni ambientali e climatiche, siti di produzione e pratiche agronomiche proprie del territorio. In particolare, sono considerate a rischio le seguenti aree:

- Impianti di piante specificate che presentino sintomi di deperimento;
- Vie di comunicazione che utilizzano piante specificate come alberature stradali;
- Aree di produzione e commercio di piante specificate;
- Aree non coltivate o abbandonate, parchi, aree turistiche;
- Stabilimenti che utilizzano vegetali provenienti dalla zona delimitata.

Inoltre, come riportato nelle linee guida ufficiali di monitoraggio negli stati membri dell'UE ([Guidelines for the survey of \*Xylella fastidiosa\* Wells et al. in the Union Territory](#)), è necessario tener conto dei sistemi commerciali esistenti in relazione ai punti di entrata principali;

- Introduzione da Paesi terzi (rischio correlato allo stato sanitario del Paese in oggetto);

- traffico commerciale all'interno dell'UE (in relazione alle aree demarcate);
- dimensioni, stagionalità, tipologia di specie vegetali, potenziale presenza di vettori associati al materiale soggetto a scambi commerciali.

In prossimità delle aree demarcate è necessario tener conto di vie principali di comunicazione, aeroporti e porti.

In relazione ai vivai è opportuno considerare, oltre alla tipologia delle specie vegetali importate, anche l'origine del materiale, i siti in cui sono collocate le piante madri, produzioni in pieno campo, siti di produzione in ambiente protetto.

Riguardo ai siti in cui vengono coltivate o mantenute piante provenienti da aree a rischio, si deve tener conto di impianti di recente costituzione, come frutteti commerciali, parchi e aree paesaggistiche; rivenditori (vivai); Garden center; mercati (in base ad una valutazione delle loro pratiche commerciali); collezioni di piante (basata sulla valutazione del rischio di importazione e di scambio di vegetali).

## Ispezione visiva/*Visual inspection*

### Conduzione dell'ispezione:

- PM3/081(1) Inspection of consignments for *Xylella fastidiosa*
- PM3/082(1) Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*
- PM3/085(1) Inspection of places of production – Vitis plants for planting
- Determinazione del Dirigente Sezione Osservatorio Fitosanitario 23 novembre 2018, n. 727 (Regione Puglia)
- Linee Guida della Commissione Europea (Guidelines for the survey of *Xylella fastidiosa* Wells et al. in the Union Territory -2015)

Il numero delle ispezioni visive deve essere definito in proporzione al rischio esistente.

Campi aperti: piante annuali e perenni devono essere ispezionate durante la stagione vegetativa (periodo ottimale tarda estate - inizio autunno)


Siti di produzione protetti: controlli durante tutto l'anno

- Vivai e centri giardino: le ispezioni dovrebbe essere effettate secondo i cicli produttivi; campi e strutture dove crescono le piante madri dovrebbero essere ispezionate prima della raccolta del materiale di propagazione. (NB: tenere conto dei tempi di commercializzazione: fruttiferi in inverno, piante da giardino da Febbraio a Giugno)

### Norme generali da prendere in considerazione:





- il batterio si moltiplica nell'ospite preferibilmente a temperature medio-alte
- tessuto ideale per specie arboree perenni e specie a foglia caduca: foglie mature con picciolo e tessuto lignificato ([specie per specie a foglia caduca](#))
- ciclo biologico di specie arboree e delle infestanti
- andamento climatico dell'area

Data la grande diversità nell'espressione dei sintomi, l'esame visivo dei sintomi di *X. fastidiosa* è caratterizzato da una bassa specificità.

Quando	Cosa guardare	Immagini
Epoca di ispezione e campionamento  <b>Olivo:</b>  <u>i prelievi possono effettuarsi per tutto l'arco dell'anno</u>	Bruscatura fogliare	



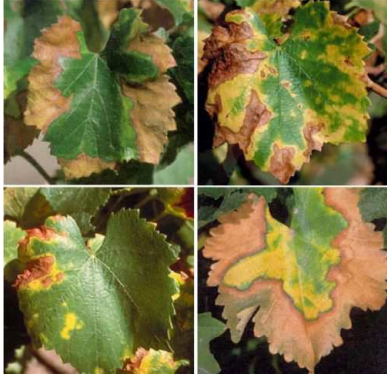










<p>Per specie a foglia caduca es. mandorlo e ciliegio e nelle condizioni presenti in Puglia (LE) il batterio è rilevabile dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p>	<p>Bruscatura fogliare</p>	 <p><i>Acacia saligna</i></p>  <p><i>Spartium junceum</i></p>  <p>Mandorlo</p> 
---	----------------------------	--







<p>dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p>	<p>Bruscatura fogliare</p>	  <p>(Foto: John Hartman, University of Kentucky, Bugwood.org e Brian Eshenaur, Cornell Universtiy IPM, Bugwood.org) - <a href="https://www.ipmimages.org/index.cfm">https://www.ipmimages.org/index.cfm</a></p>
<p><b>Vite:</b> dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p>	<p>Disseccamento fogliare con alone necrotico</p>	
<p><b>Agrumi:</b> dall'estate inoltrata fino alla</p>	<p>Maturazione irregolare dei tessuti</p> <p>Bruscatura fogliare</p>	 <p>Foto: Regents, Univ. California, USA <a href="https://www.ilvo.vlaanderen.be/">https://www.ilvo.vlaanderen.be/</a>)</p>

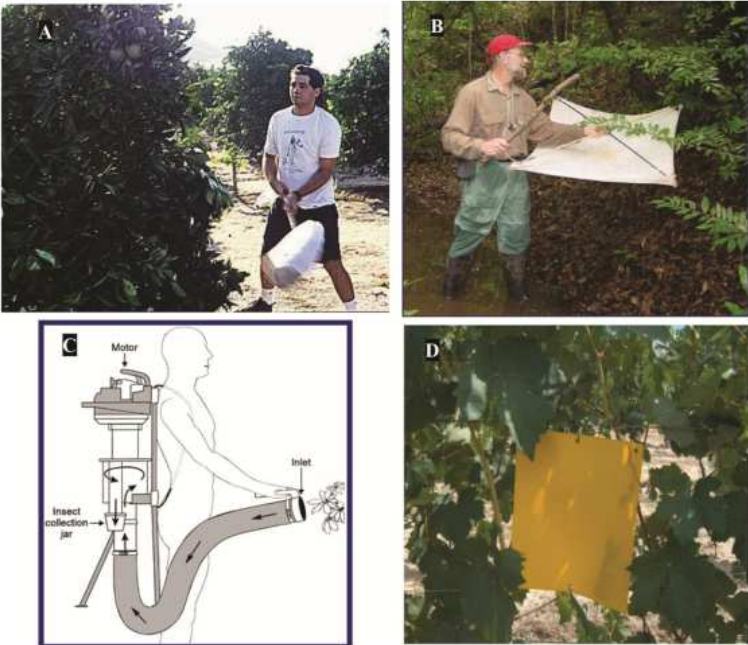
<p>caduta delle foglie</p> <p><b>Caffè:</b> dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p>	<p>Maturazione irregolare ed anticipata dei frutti (piccole dimensioni)</p> <p>Bruscatura fogliare a partire dai margini</p>	  <p>(Foto: M. Scortichini, CREA-OFA Roma e Alexander Purcell, University of California, Bugwood.org - <a href="https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos">https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos</a>)</p>
<p><b>Erba medica:</b> dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p>	<p>Margini fogliari più o meno arricciati (curling)</p> <p>Crescita stentata con giovani foglie più piccole e più scure rispetto alle sane</p>	  <p>Foto Donato Boscia CNR, IPSP Bari) e Maria Bergsma-Vlami, NPPO (NL). Foto tratte da <a href="https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos">https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos</a>)</p>

		 <p>Foto: R.E. Davis and M.J. Davis, APS image data base  <a href="https://imagedatabase.apsnet.org/search.aspx?publicationId=229&amp;ps=1">https://imagedatabase.apsnet.org/search.aspx?publicationId=229&amp;ps=1</a></p> <p>Tutte le foto in questa sezione, se non diversamente indicato sono fornite da: Donato Boscia, CNR, Istituto Protezione Sostenibile Piante (IPSP), Bari</p>
--	--	---

**Campionamento / *Sample taking***

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare
<p><b>Campioni di pianta sintomatici.</b></p> <p>Il campione dovrebbe includere foglie mature evitando di campionare i giovani germogli in crescita perché in questa fase i batteri potrebbero non essere rilevati (EPPO, 2019a).</p> <p>Per le piante piccole può essere inviata l'intera pianta al laboratorio.</p> <p>Campione specie sempreverdi: 8 rametti di 15-20 cm</p>	<p>Come riportato nel <i>X. Fastidiosa</i> survey card – EFSA, la guida sul campionamento e sulla tipologia di campione di laboratorio da utilizzare per le analisi è riportata nel protocollo EPPO PM7/24 (4) nelle tabelle 1 di pag. 185 e tabella 2 pag. 186 riferite rispettivamente al campionamento di campioni multipli e singoli.</p> <p><b>Per ragioni di spazio si ritiene utile visualizzare le tabelle alla fonte</b></p>  <p>(Tratto da: <a href="https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf">https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf</a>)</p>	<p>Assicurarsi che nei campioni vegetali non siano presenti insetti vettori: scuotere energicamente il campione e/o effettuare lavaggio al fine di assicurarsi di non movimentare il vettore (aspetto fondamentale in aree infette)</p> <p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate al fine di non schiacciare le piante campionate.</p> <p>Tenere i campioni lontano da fonti di</p>

<p>alternativamente foglie mature da rami lignificati (10-25 foglie). In piante con sintomi evidenti prelevare rami vitali adiacenti alle parti sintomatiche; in piante con sintomi lievi o assenti prelevare gli 8 rametti ai quattro punti cardinali della chioma.</p> <p>Campioni foglie caduche: come sopra in presenza di foglie; nel periodo invernale porzioni di rametti lignificati.</p> <p>Piante erbacee a ciclo annuale: porzioni di fusto/caule basali o intera pianta comprese le radici</p> <p>Arbustive: rametti 15-20 cm con foglie o foglie da rami lignificati</p>	 <p>(Tratto da: <a href="https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf">https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf</a>)</p>	<p>calore.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio conservare in frigorifero a 4°C avendo cura di consegnarlo entro 48, massimo 72 ore.</p>
<p><b>Campioni di pianta asintomatici</b></p> <p>Il campione deve essere rappresentativo dell'intera chioma. Recenti dati sperimentali</p>	<p>Una guida sul campionamento e sulla tipologia di campione di laboratorio da utilizzare per le analisi è riportata nel protocollo EPPO PM7/24 (4) nelle tabelle 1 di pag. 185 e tabella 2 pag. 186 riferite rispettivamente al campionamento di campioni multipli e singoli.</p> <p><b>Per ragioni di spazio si ritiene utile visualizzare le tabelle alla</b></p>	<p>vedi sopra</p>

<p>hanno mostrato che il rilevamento è più affidabile quando si campiona la parte medio-alta della chioma. Per testare singole piante asintomatiche, raccogliere da 4 a 10 rametti (a seconda dell'ospite e delle dimensioni della pianta) ai quattro punti cardinali della chioma.</p>	<p><b>fonte:</b>  <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12575">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12575</a></p>	
<p><b>Insetti vettori</b></p> <p>Obiettivi adatti per il monitoraggio sono gli insetti adulti, al contrario delle ninfe. I vettori adulti dovrebbero essere raccolti mediante: (A) retino entomologico (sweeping net); (B) tecnica del frapping che consiste nel collocare un telo (beat tray o beat sheet) sotto la pianta, scuoterla energicamente e raccogliere gli insetti che vi cadono; (C) aspiratori a motore. (D) le trappole adesive gialle non sono efficaci quanto il campionamento attivo, ma gli insetti possono essere</p>	 <p><b>Figure 1.</b> (A) sweeping net; (B) beat tray; (C, D) vac aspirator; (D) yellow sticky trap.</p> <p>(Tratto da: <a href="https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/03/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-INSECTS-web.pdf">https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/03/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-INSECTS-web.pdf</a>)</p>	<p>Se gli insetti non possono essere analizzati immediatamente dopo la raccolta, devono essere conservati in etanolo al 95-99% per lunghi periodi o a - 20°C o - 80°C per brevi periodi. Le trappole adesive possono anche essere conservate a - 20°C. Alternativamente possono essere mantenute a 4°C per brevi periodi avendo cura di staccare gli insetti e trasferirli come sopra riportato per la conservazione.</p>

<p>intrappolati accidentalmente e i campioni raccolti possono essere utilizzati per le analisi. I vettori possono essere rimossi dalle trappole usando piccole pinzette e un solvente adatto. Dopo la rimozione gli insetti devono essere sciacquati con etanolo (95-99%). Il campionamento per gli insetti dovrebbe essere preferibilmente effettuato dalla tarda primavera fino all'inizio dell'autunno per massimizzare la probabilità di rilevamento del batterio.</p>		
--	--	--

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO *STATUS* del PEST

### Inquadramento normativo

#### EUROPEA

- Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) che abroga la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789.
- Decisione 789/2015 Relativa alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells et al.)
- Regolamento (EU) 2016/2031 Annex 2 (parte A)

- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072
- Union Quarantine pest (Anne x II B) Reg 2019/2072

### **NAZIONALE**

- DM 06.06.2019 PFA Xylella
- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali 1785 del 14/02/2019 Piano d'intervento per il rilancio del settore agricolo e agroalimentare nei territori agricoli colpiti da *Xylella*
- Decisione di Esecuzione della Commissione del 9 ottobre 2018 n. 1511 Modifica della decisione di esecuzione (UE) 2015/789 relativa alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) e precedenti (vedi sopra sez. Normativa monitoraggio)
- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali e del Turismo del 5 ottobre 2018. Modifica del decreto ministeriale 13 febbraio 2018, concernente le misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) nel territorio della Repubblica italiana. (G.U. n. 271 del 21-11-2018)
- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 13 febbraio 2018. Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) nel territorio della Repubblica italiana. (G.U. n. 80 del 06-04-2018) e precedenti.
- Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 18 febbraio 2016. Definizione delle aree indenni dall'organismo nocivo *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*) nel territorio della Repubblica italiana. (G.U. n. 54 del 05-03-2016)
- Decreto legislativo 214/2005 ALLEGATO II Parte A Sezione 1

### **Inquadramento EPPO:**

- EPPO A2 List

### **Origini:**

I primi sintomi della malattia a carico della vite risalgono al 1880. Intorno ai primi del '900 si segnalano le malattie dell'erba medica (alfalfa dwarf disease) e del pesco (phony peach), mentre la malattia di Pierce della vite si diffonde negli USA. Nel 1970 viene individuato un batterio (*Xylella fastidiosa*) come agente delle malattie sopra citate. Successivamente viene segnalata in Brasile in associazione alla necrosi variegata degli agrumi.

### **Mappa EPPO**

<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/distribution>

#### Distribuzione nel mondo

**America:** Argentina, Brasile, Canada, Costa Rica, Messico, Paraguay, Puerto Rico, USA, Venezuela

**Asia:** Iran, Israele, Taiwan

**Europa:** Francia (transiente, ma presente in Corsica), Italia, Spagna (transiente, ma presente nelle Isole Baleari), Portogallo (transiente)

#### Presenza e/o segnalazioni in Italia:

In Italia il batterio è stato rilevato:

- nel 2013 in Puglia principalmente su olivo, ma anche in altre specie vegetali (oleandro, mandorlo, ciliegio, *Polygala myrtifolia*, *Ramnus alaternus*, *Westringia fruticosa*, mimosa, ginestra, cisto, rosmarino, lavanda, mirto etc.);
- nel 2018 In Toscana su *Calicotome spinosa*, *Cercis siliquastrum*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus salviifolius*, *Cytisus scoparius*, *Elaeagnus angustifolia*, *Ficus carica*, *Helichrysum*, *Lavandula angustifolia*, *Polygala myrtifolia*, *Prunus dulcis*, *Rhamnus alaternus*, *Rosmarinus officinalis*, *Spartium junceum*;
- 2019 nel Lazio (*Vinca* sp.).

#### Rischio di introduzione:

##### Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi

Scambi commerciali con Paesi terzi in cui il patogeno è presente o transiente.  
Negli scambi commerciali con i paesi UE verificare l'assenza del patogeno.

#### INTERCETTAZIONI EUROPHYT

**Negli ultimi 5 anni (2016-2020) le intercettazioni sono state le seguenti:**

Country of Export	Year	Object	Plant Species (No. of interceptions)



USA	2018	Intended for planting: not yet planted	<i>Rubus idaeus</i> (2)
USA	2018	Intended for planting: not yet planted	<i>Rubus fruticosus</i> (1)
USA	2017	Intended for planting: not yet planted	<i>Juglans</i> (1)
Mexico	2016	Intended for planting: cuttings	<i>Pelargonium x hortorum</i> (1)

## PARTE C – DIAGNOSI

### Normativa di riferimento:

#### **EUROPEA:**

Commission database of validated tests for the identification of the *Xylella fastidiosa* and its subspecies as referred to in article 3(2) of commission implementing decision (UE) 2015/789

[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph\\_biosec\\_legis\\_emergency\\_comm-db-xylella-validated-tests.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_emergency_comm-db-xylella-validated-tests.pdf)

#### **NAZIONALE:**

DM 13-02-2018 Piano nazionale di emergenza per la gestione di *Xylella fastidiosa* in Italia Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana Serie generale - n. 80 (6/4/2018)

### Protocolli standard di riferimento:

#### **PM7 EPPO:**

PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12575>

#### **IPPC:**

ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 25: *Xylella fastidiosa*

### Matrice

Materiali vegetali sintomatici e asintomatici  
Insetti vettori

#### **TIPOLOGIA DI CAMPIONE**

Come riportato nel *X. fastidiosa* survey card – EFSA, la guida sul campionamento e sulla tipologia di campione di laboratorio da utilizzare per le analisi è riportata nel protocollo EPPO PM7/24 (4), sezione 3.3. nelle tabelle 1 di pag. 185 e tabella 2 pag. 186 riferite rispettivamente al campionamento di campioni multipli e singoli.

**Per ragioni di spazio si ritiene utile visualizzare le tabelle alla fonte.**

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12575>

### Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato

(riportato in IO 05)

- (IV) Morphological identification (per vettori)
- (VII) Plating su terreno non selettivo
- (VIII) Selective culture media
- (IX) IF test
- (XII) DTBIA - serological test 1
- (XIV) ELISA
- (XV) PCR
- (XVIII) LAMP=Molecular testing 3
- (XIX) PCR/RT-PCR + Sequencing

**- (XX) Real Time – PCR**

Viene di seguito indicata la (1) procedura di diagnosi di *X. fastidiosa* secondo il PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* (EPPO) e a seguire (2) i test diagnostici per l'identificazione di *X. fastidiosa* e la sua subspecie secondo l'articolo 3 (2) della Decisione (EU) 2015/789.

**(1) PM 7/24 (4) XYLELLA FASTIDIOSA (EPPO)**

Il PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* (EPPO) prevede il processamento di campioni vegetali e di insetti vettori secondo due diversi diagrammi di flusso per il rilevamento e l'identificazione del patogeno. In particolare, una volta estratto il DNA dai campioni vegetali /insetti vettori viene prevista una prima fase di applicazione di saggi di screening preliminari.

**1.1. Estrazione del DNA**

L'estrazione del DNA da **materiale vegetale** può essere effettuata a partire dal campione di laboratorio secondo le procedure riportate nel PM7/24 (4) Appendice 3 sezione 1

L'estrazione del DNA da **insetti vettori** può essere effettuata a partire dal campione di laboratorio secondo le procedure riportate nel PM7/24 (4) Appendice 3 sezione 1

**1.2. Saggi di screening preliminare (Cod. IO 05 IX, XII, XIV, XV, XVIII, XX):**

- Saggi sierologici: saggio IF (Cod. IO 05 IX), ELISA (Cod. IO 05 XIV), DTBIA (Cod. IO 05 XII)
- Saggi molecolari\*: end-point PCR (Cod. IO 05 XV), real-time PCR (Cod. IO 05 XX), LAMP (Cod. IO 05 XVIII) (vedi di seguito).

L'analisi di campioni vegetali sintomatici può essere effettuata utilizzando uno o più metodi fra quelli indicati. Se vengono utilizzati due metodi, questi devono essere basati su principi biologici differenti o, per i test molecolari, su target genomici diversi. In particolare, in caso di analisi di materiale asintomatico in un'area indenne deve essere utilizzato uno (o più) saggi molecolari mentre nel caso di analisi di campioni prelevati da piante sintomatiche in un'area infetta o in zona tampone può essere applicato un saggio sierologico (es. ELISA). L'isolamento non è inserito fra i test di screening per la oggettiva difficoltà ad isolare il batterio. I campioni devono essere considerati come campioni con "presenza di *X. fastidiosa*" quando sono positivi almeno due saggi basati su principi biologici diversi (es. molecolare e sierologico) o con target molecolari differenti (metodi basati su diverse regioni del genoma). Per le aree in cui è presente il batterio o nelle zone tampone è sufficiente un test positivo per considerare il campione con "presenza di *X. fastidiosa*".

\*Fra i saggi molecolari sono previsti i seguenti:

- End-point PCR: Minsavage *et al.* (1994) (Cod. IO 05 XV);
- Real-time PCR: simplex o duplex Harper *et al.* (2010; erratum 2013); Francis *et al.*, (2006) versioni SYBR Green e TaqMan; Ouyang *et al.* (2013); Li *et al.* (20013); Triplex real-time PCR (Bonants *et al.*, 2019) (Cod. IO 05 XX).
- LAMP Harper *et al.* (2010; erratum 2013) modificato secondo Yaseen *et al.* (2015) (Cod. IO 05 XVIII).

Qualora il risultato dell'analisi di screening preliminare produca risultati inconsistenti è raccomandata la ripetizione dell'analisi e/o un nuovo campionamento.

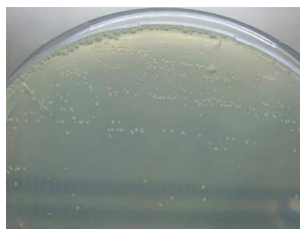
Qualora due saggi di screening preliminari, basati su principi biologici diversi o su target genomici differenti, risultino positivi, il campione viene determinato positivo ovvero con "presenza di *Xylella fastidiosa*" ed è necessario procedere con l'isolamento sui seguenti mezzi di coltura agarizzati riportati nel PM 7/24 (4), Appendice 12, sez. B pag. 215: (Cod. IO 05 VII, VIII)

- PD2 (Davis *et al.*, 1980)
- BCYE modificato
- PWG modificato

Le colonie hanno lunghi tempi di crescita (1-3 settimane) a 28°C e presentano un diametro variabile tra 1-1,5 mm e morfologia variabile. In particolare, su tutti i mezzi appaiono circolari e lievemente convesse; in PD2 e BYCE appaiono opache e biancastre. In BYCE le colonie contrastano con la colorazione scura del terreno agarizzato.



*Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*  
(CoDiRO) su BYCE



*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*  
su PD2



*X. fastidiosa* subsp.  
*fastidiosa* su PWG

(Foto: BYCE, M. Saponari (IPSP CNR Bari); PWG Anses (tratte da PM7/24 (4), 2019))

### 1.3. Saggi d'identificazione

Questa fase prevede l'identificazione delle colonie individuate in fase d'isolamento attraverso l'applicazione di saggi d'identificazione. Possono essere utilizzati i seguenti saggi fra quelli sopra descritti per le analisi di screening preliminare:

- Saggi sierologici (Cod. IO 05 IX, XII, XIV): saggio IF, ELISA, DTBIA
- Saggi molecolari\* (Cod. IO 05 XV, XX): end-point PCR, real-time PCR.

Una volta confermata l'identità delle colonie è necessario procedere con l'assegnazione della sottospecie e del Sequence Type. L'assegnazione della sottospecie può essere effettuata direttamente da materiale vegetale o da insetti vettori nel caso l'isolamento non vada a buon fine. In questo caso la caratterizzazione può essere resa difficoltosa, rispetto alla procedura applicata su coltura pura, a causa della minore concentrazione del batterio nelle suddette matrici (pianta e vettore) e della presenza di inibitori che ostacolano le amplificazioni.

### 1.4. Assegnazione sottospecie e Sequence Type (ST)

L'assegnazione della sottospecie e del ST è particolarmente suggerita nel caso di un nuovo ritrovamento del batterio (in aree precedentemente indenni) o in associazione a nuovi ospiti vegetali. Allo scopo possono essere utilizzati i seguenti metodi:

- End-point PCR (Pooler & Hartung, 1995): identificazione della sola sottospecie *pauca* (Cod. IO 05 XV).
- Conventional simplex PCR (Hernandez-Martinez *et al.*, 2006): identificazione delle sottospecie *multiplex*, *sandyi*, *fastidiosa* (scarsa l'esperienza a partire da DNA di insetti vettori) (Cod. IO 05 XV).
- Conventional multiplex PCR (Hernandez-Martinez *et al.*, 2006): identificazione delle sottospecie *multiplex*, *sandyi*, *fastidiosa* (Cod. IO 05 XV).
- Multilocus sequence typing (MLST) (Yuan *et al.*, 2010): l'identificazione della sottospecie prevede l'amplificazione e il sequenziamento di due geni: *cysG* e *malF* oppure *rpoD* e *malF*; l'identificazione del ST prevede l'amplificazione e il sequenziamento dei seguenti sette geni "housekeeping", *cysG*, *malF*, *gltT*, *holC*, *leuA*, *nuoL*, *petC* (EPPO Standard PM7/24(4). Permette l'identificazione di tutte le subspecie. (Cod. IO 05 XIX).

## (2) ARTICOLO 3(2) DELLA DECISIONE (EU) 2015/789 (IL PRESENTE DOCUMENTO È IN CORSO DI REVISIONE)

([https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph\\_biosec\\_legis\\_emergency\\_comm-db-xylella-validated-tests.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_emergency_comm-db-xylella-validated-tests.pdf))

La commissione Europea elenca i seguenti metodi per l'identificazione di *Xylella fastidiosa* e la subspecie.

### 2.1 Test per lo screening e l'identificazione della presenza di *Xylella fastidiosa*

#### 2.1.1 in aree demarcate e siti di produzione riferiti all'Art. 9(8) della decisione 2015/789

- PCR (Minsavage *et al.*, 1994) (Cod. IO 05 XV);
- Real time PCR (Francis *et al.*, 2006) (Cod. IO 05 XX);

- Real time PCR (Harper *et al.*, 2010; erratum 2013) (Cod. IO 05 XX);
- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Harper *et al.*, 2010, erratum 2013) (Cod. IO 05 XVIII);
- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), utilizzando anticorpi policlonali in grado di identificare tutte le sottospecie di *X. fastidiosa*; (Cod. IO 05 XIV)
- Immunofluorescenza (IF), utilizzando anticorpi policlonali in grado di identificare tutte le sottospecie di *X. fastidiosa*; (Cod. IO 05 IX)

2.1.2 In altre aree rispetto alle aree demarcate e in altri siti di produzione rispetto a quelli riferiti all'Art. 9(8) della decisione 2015/789

- Real time PCR (Harper *et al.*, 2010; erratum 2013) (Cod. IO 05 XX);
- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Harper *et al.*, 2010, erratum 2013) (Cod. IO 05 XVIII);

## 2.2 Test molecolari per l'identificazione delle sottospecie di *Xylella fastidiosa*

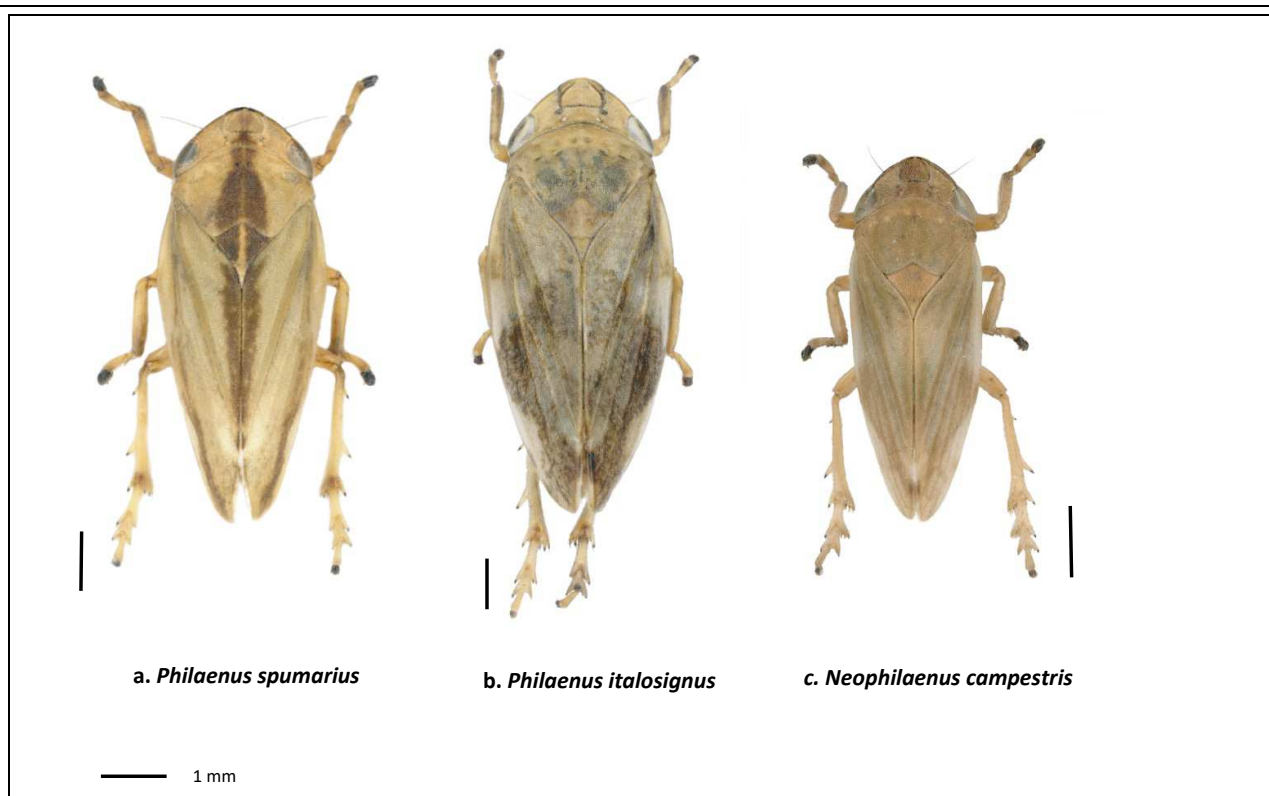
- Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Yuan *et al.*, 2010) in grado di determinare tutte le sottospecie (Cod. IO 05 XIX);
- PCR (Hernandez-Martinez *et al.*, 2006): identificazione delle sottospecie *fastidiosa*, *multiplex* e *sandyi* (Cod. IO 05 XV)
- PCR (Pooler & Hartung 1995): identificazione della sottospecie *pauca* (Cod. IO 05 XV).

### Identificazione degli insetti vettori di *X. fastidiosa* in Europa (cod. IO 05 IV)

L'identificazione di *Philaenus spumarius*, *P. italosignus* e *Neophilaenus campestris*, le specie di insetti riconosciuti come vettori di *X. fastidiosa* in Europa, si basa sulla morfologia degli individui adulti, considerando sia caratteri che sono visibili esternamente sia caratteri relativi all'apparato genitale maschile che possono essere identificati solamente previa dissezione e osservazione al microscopio. L'identificazione morfologica degli stadi giovanili è difficile e si consiglia in questo caso di ricorrere all'identificazione molecolare

Di seguito sono riportate le caratteristiche morfologiche principali delle tre specie:

- Adulto di *P. spumarius*: i maschi (5.3-6 mm) sono più piccoli delle femmine (5.4-6.9 mm). La forma del corpo è più arrotondata rispetto alle specie del genere *Neophilaenus*. Il colore è molto variabile, dal giallo chiaro al nero, e non può quindi essere considerato un carattere distintivo della specie.
- Adulto di *P. italosignus*: può essere distinto con certezza da *P. spumarius* solamente attraverso l'osservazione al microscopio dell'apparato genitale maschile. Il maschio ha dimensioni di 6.4-7.2 mm, la femmina ha dimensioni 7-8.1 mm.
- Adulto di *N. campestris*: il maschio ha dimensioni di 5-6.3 mm, la femmina ha dimensioni di 5.4-5.7 mm. La forma del corpo è più snella rispetto alle specie del genere *Philaenus*. Il colore varia dal grigio-giallo al grigio-marrone, spesso con venature rossastre e con una striscia longitudinale scura che si estende dal vertice verso lo scutello. Il margine esterno delle ali anteriori presenta due macchie puntiformi chiare.



L'identificazione degli insetti vettori su base molecolare può essere effettuata su tutti gli stadi di sviluppo. L'identificazione molecolare (Cod. IO 05 XIX) avviene amplificando (mediante PCR convenzionale) regioni note del gene Cytochrome c oxidase I (COX1) con conseguente sequenziamento Sanger delle regioni di DNA amplificate e confronto con le sequenze di riferimento di ciascuna specie depositate nei database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org/>). Un protocollo di DNA barcoding basato sul gene COX1 è descritto in PM 7/129 (DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests; EPPO, 2016).

Il PM7 EPPO relativo all'identificazione morfologica e molecolare di *P. spumarius*, *P. italosignus* e *N. campestris* è in preparazione.

#### Riferimenti Bibliografici

Almeida RPP, Blua MJ, Lopes JR and Purcell AH, 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America*, 98, 775–786.

Bonants P, Griekspoor Y, Houwers I, Krijger M, van der Zouwen P, van der Lee TAJ & van der Wolf J (2019) *Plant Disease* 103, 645–655. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1433-RE>.

Chatterjee S, Almeida RP and Lindow S, 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 243–271.

Coletta-Filho HD, Francisco CS, Lopes JRS, De Oliveira AF & Da Silva LFO (2016) First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. *Phytopathologia Mediterranea*. [https://doi.org/10.14601/phytopathol\\_mediterr-17259](https://doi.org/10.14601/phytopathol_mediterr-17259)

Davis MJ, Purcell AH & Thomson SV (1980) Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 70, 425–429.

Denancé, N., Briand, M., Gaborieau, R., Gaillard, S., and Jacques, M.A. (2019) Identification of genetic relationships and subspecies signatures in *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* 20: 239.

Donadio LC & Moreira CS (1998) Citrus variegated chlorosis. Bebedouro, SP, Brazil, FUNDECITRUS/FAPESP 166 p.

EFSA (European Food Safety Authority), 2015. Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal*

2015;13(1):3989, 262 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989>

EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Scientific report on the update of the *Xylella* spp. Host plant database. EFSA Journal 2018;16(9): 5408, 87 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5408>

EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*. EFSA Journal 2019; 53pp. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1667

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2019a. Update of the Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory. EFSA Journal 2019;17(5):5665, 200 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5665>

EFSA (European Food Safety Authority), 2020. Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2019. EFSA Journal 2020;18(4): 6114, 61 pp. <http://doi:10.2903/j.efsa.2020.6114>

EPPO 2019. PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2019) 49 (2), 175–227.

Francis M, Lin H, Cabrera-La Rosa J, Doddapaneni H & Civerolo EL (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. European Journal of Plant Pathology 115, 203–213.

Freitag JH, 1951. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. Phytopathology, 41, 10.

Haelterman RM, Tolocka PA, Roca ME, Guzman FA, Fernandez FD & Otero ML (2015) First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina. Journal of Plant Pathology 97, 393

Harper SJ, Ward LI & Clover GRG (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. Phytopathology 100, 1282–1288.

Hernandez-Martinez R, Costa HS, Dumenyo CK & Cooksey DA (2006) Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay. Plant Disease 90, 1382–1388.

Hill BL & Purcell AH (1995) Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. Phytopathology 85, 209–212.

Krugner R, Sisterson MS, Chen JC, Stenger DC & Johnson MW (2014) Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. Plant Disease 98, 1186–1193.

Li W, Teixeira DC, Hartung JS, Huang Q, Duan Y, Zhou L *et al.* (2013) Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Journal of Microbiological Methods 92, 79–89.

Linee Guida della Commissione Europea (Guidelines for the survey of *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* in the Union Territory -2015)

[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph\\_biosec\\_legis\\_guidelines\\_xylella-survey.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_guidelines_xylella-survey.pdf)

Landa B (2017) Emergence of *Xylella fastidiosa* in Spain: current situation. Presentation made at the European Conference on *Xylella* 2017, <https://www.efsa.europa.eu/en/events/event/171113>

Marcelletti, S. and Scortichini, M. (2016) Genome-wide comparison and taxonomic relatedness of multiple *Xylella fastidiosa* strains reveal the occurrence of three subspecies and a new *Xylella* species. Arch Microbiol 198: 803–812.

Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC & Stall RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopathology 84, 45, 6–461.

Nunney, L., Elfekih, S., and Stouthamer, R. (2012) The importance of multilocus sequence typing: Cautionary tales from the bacterium *Xylella fastidiosa*. Phytopathology 102: 456–462.

Ouyang P, Arif M, Fletcher J, Melcher U & Ochoa Corona FM (2013) Enhanced reliability and accuracy for field deployable bioforensic detection and discrimination of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, causal agent of citrus variegated chlorosis using Razor Ex technology and TaqMan Quantitative PCR. PLoS ONE 8, e81647.

Pooler MR & Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Current Microbiology 31, 377–381.

Purcell AH and Saunders SR, 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. Plant Disease, 83(9), 825–830.

Saponari M, Boscia D, Nigro F & Martelli GP (2013) Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). Journal of Plant

Pathology 95, 668

Schaad, N.W., Opgenorth, D., and Gauth, P. (2002) Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology* 92: 721–728.

Wells JM, Raju BC, Nyland G & Lowe SK (1981) Medium for isolation and growth of bacteria associated with Plum leaf scald and Phony peach diseases. *Applied Environmental Microbiology* 42, 357–363.

Yaseen T, Drago S, Valentini F, Elbeaino T, Stampone G, Digiario M *et al.* (2015) On-site detection of *Xylella fastidiosa* in host plants and in "spy insects" using the real-time loop-mediated isothermal amplification method. *Phytopathologia Mediterranea* 54, 488–496.

Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R., and Nunney, L. (2010) Multilocus Sequence Typing of *Xylella fastidiosa* Causing Pierce's Disease and Oleander Leaf Scorch in the United States . *Phytopathology* 100: 601–611.

Autori: Dott.ssa Stefania Loreti, Dott.ssa Sabrina Bertin– CREA-DC; GdL Monitoraggio  
Cofinanziato - UE

## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

### 1- Nome comune dell'organismo o malattia/ Common name of the pest

Citrus Black Spot (CBS)

### 2 - Nome scientifico/Scientific name

*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa

Teleomorfo:

***Guignardia citricarpa***

Sinonimi:

*Phoma citricarpa* (McAlpine)

### 3 – EPPO Code:

GUIGCI

### 4 - Posizione tassonomica/Taxonomy

- Phylum: *Pezizomycotina*
  - Classe: *Dothideomycetes*
  - Ordine: *Botryosphaerales*
  - Famiglia: *Phyllostictaceae*
  - Genere: *Phyllosticta*
  - Specie: *citricarpa*
- Riferimento: (Index Fungorum)

### 5 – Aspetti epidemiologici dell'organismo/Epidemiology of the pest

Il patogeno si diffonde prevalentemente attraverso le ascospore che possono essere trasportate dal vento o dall'acqua (infezioni primarie). La principale fonte di inoculo è rappresentata dalle foglie cadute a terra sulle quali si sviluppano gli ascocarpi (pseudotecii). La maturazione degli ascocarpi avviene per un periodo variabile tra i 23 e i 180 giorni dalla caduta delle foglie in funzione delle condizioni di temperatura ed umidità.

La malattia è presente in modo particolare nelle regioni a clima subtropicale caratterizzate da piogge estive ed elevata piovosità annuale (Kotzé 1981, 2000). Nonostante ciò, è stata rinvenuta anche in aree a clima semi-arido (Paul *et al.*, 2005). In accordo con quanto riportato da Kotzé (1963), la germinazione delle ascospore avviene tra i 15 e i 29,5°C di temperatura e necessita dalle 15 alle 38 ore di umidità.

Le infezioni secondarie avvengono per mezzo dei conidi prodotti in picnidi (fruttificazioni asessuali) che si sviluppano tipicamente sulle lesioni presenti su frutti e talvolta su rametti e foglie (Figura 1).



I conidi prodotti vengono dispersi su brevi distanze per mezzo degli schizzi d'acqua (effetto *splash*) o dilavati dall'acqua piovana infettando frutti e foglie suscettibili.



Figura 1. *Guignardia citricarpa*. a. Picnidi sviluppati su oatmeal agar (OA), con evidente pigmento giallo; b. conidiofori dai quali si originano i conidi; c. conidi (CBS H-20524 epitype). — Scale bars = 10  $\mu$ m (Glienke *et al.*, 2011).

Gli aspetti epidemiologici più critici della malattia sono legati alla suscettibilità dei frutti e al periodo di incubazione. I frutti sono infatti suscettibili all'infezione per un periodo variabile dai 4 ai 7 mesi dalla caduta dei petali (Kotzé, 1981; Brentu *et al.*; 2012; Lanza *et al.*, 2018) e manifestano i sintomi della malattia anche molti mesi dopo l'infezione (fase latente). La durata della fase latente varia dai 2 ai 12 mesi in funzione delle condizioni ambientali e dell'età e della fase fenologica delle piante (Kotzé, 1981).

### Sintomi

I sintomi più evidenti della malattia si evidenziano sui frutti causando lesioni di diverso tipo (OEPP/EPPO, 2009):

- - Macchie nere o punti neri (*hard spots*, *shot-hole spots*): lesioni di 3-10 mm di diametro, di colore variabile dal grigio al beige nella zona centrale, con il bordo tipicamente di colore marrone scuro; questo è il sintomo più comune e compare quando il frutto inizia a maturare, prima del viraggio di colore. Spesso in corrispondenza delle lesioni si possono osservare i picnidi o con l'aiuto di una lente d'ingrandimento o di uno stereomicroscopio; questi si presentano come piccoli puntini neri, leggermente rilevati.
- Macchie a lentiggini (*freckle spots*): lesioni leggermente depresse con una colorazione che può variare dal grigio chiaro al marrone chiaro o rossastro. In alcuni casi possono essere scolorite ed occasionalmente possono essere presenti i picnidi. Spesso queste lesioni compaiono sui frutti in post-raccolta e possono essere associate alle macchie nere precedentemente descritte.
- Macchie virulente (*virulent spots*): verso la fine della stagione, lesioni vicine possono unirsi e formare le cosiddette "macchie virulente". Queste sono senza dubbio le lesioni più dannose in quanto si estendono in profondità all'interno della buccia fino alla polpa del frutto. Le macchie virano dal marrone al nero, sviluppano una consistenza dura e possono coprire interamente la superficie del frutto. Hanno una forma irregolare e si formano sui frutti al momento della raccolta o ad inizio maturazione; anche queste lesioni sono talvolta associate alla presenza di picnidi. La penetrazione del fungo in tale fase provoca la caduta prematura del frutto (carpoptosi) con gravi perdite in post-raccolta.
- Falsa melanosi (*false melanose*): generalmente compare su frutti verdi in forma di piccole lesioni in rilievo che variano dal marrone scuro al nero, spesso circondate da puntini scuri. A queste lesioni non è associata la presenza di picnidi e con il progredire della stagione possono fondersi. La falsa melanosi si osserva in agrumeti dove il patogeno si è insediato da molto tempo.

A carico dei frutti esistono altre due tipologie di lesioni osservate meno frequentemente:

- Macchie frastagliate (*lacy spots*): lesioni superficiali, lisce, di colore variabile dal giallo al marrone e senza contorni definiti. Queste lesioni compaiono quando il frutto è ancora verde e possono coprire gran parte della sua superficie. Queste lesioni sono considerate una variante della falsa melanosi.
- Macchie screpolate (*cracked spots*): lesioni superficiali, leggermente rilevate, screpolate all'interno, di dimensioni variabili, con margini irregolari e non associate alla presenza di

picnidi. Appaiono sui frutti che hanno più di 6 mesi. In Brasile questo sintomo è stato associato ad infestazioni di acaro della ruggine degli agrumi (Riccioni e Valente, 2013).

I sintomi della malattia si possono talvolta osservare anche sulle foglie, sebbene nella maggior parte dei casi il patogeno determini infezioni latenti cioè non associate a sintomi evidenti (Sutton e Waterston, 1966). Quando presenti, si possono osservare piccole macchie circolari (< 3 mm) individuabili su entrambe le pagine fogliari di colore variabile dal rosso al rosso-marrone che, con il progredire dell'infezione, presentano la parte centrale più scura accompagnata dalla formazione di un anello di colore da marrone a nero e da un alone giallo. Talvolta nella parte centrale delle lesioni sviluppatesi sulla pagina superiore delle foglie è possibile osservare la presenza dei picnidi. Sintomi simili si possono osservare anche sui getti in particolare di *C. limon*.

## 6 - Piante ospiti/Hosts

Le principali specie ospiti di *G. citricarpa* appartengono al genere *Citrus*. Tutte le specie (e cultivar) commerciali di *Citrus* spp. sono considerate suscettibili ad eccezione dell'arancio amaro (*C. aurantium*) e del Tahiti lime (*C. latifolia*). Tra le più suscettibili si annoverano: limone (*C. limon*), arancio (*C. sinensis*), mandarino (*C. reticulata*), mandarino Satsuma Miyagawa (*C. unshiu*) e pompelmo (*C. paradisi*) (EFSA PLH Panel, 2014; CABI, 2019).

Altre specie considerate meno suscettibili sono: cedro (*C. medica*), lima o limetta (*C. aurantifolia*), limetta dolce (*C. limettioides*), combava (*C. hystrix*), pomelo (*C. maxima*), kumquat (*Fortunella* spp.) e arancio trifogliato o ponciro (*Poncirus trifoliata*) (EFSA PLH Panel, 2014).

Tra gli ospiti del patogeno si annoverano anche specie non appartenenti al genere *Citrus*: mandorlo (*Prunus dulcis*), avocado (*Persea americana*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), guava (*Psidium guajava*, *P. montanum*), mango (*Mangifera indica*), frutto della passione (*Passiflora edulis*) e *Rubus* spp. Sono state segnalate anche diverse specie ornamentali tra cui *Caesalpinia pulcherrima*, *Callistemon citrinus*, *Camellia japonica*, *Dendrobium speciosum*, *Ilex aquifolium*, *Magnolia* spp. e *Smilax* spp. (EPPO/CABI, undated).

In EU le aree definite a rischio dall'EFSA (2014) sono potenzialmente tutte le zone coltivate ad agrumi dell'area mediterranea ovvero Cipro, Croazia, Francia, Grecia, Italia, Malta, Portogallo e Spagna.

In particolare, come mezzo di entrata sono state definite come maggiore fonte di rischio:

- piante destinate alla messa a dimora;
- frutti.

Nel primo caso vige il divieto assoluto di importazione. Nel secondo caso, sebbene l'importazione sia consentita, è necessario non trascurare l'eventualità che talvolta il patogeno possa essere presente in frutti completamente asintomatici (infezioni latenti).

## PARTE A – MONITORAGGIO / SURVEY

### Normativa di riferimento disponibile sulle modalità di monitoraggio:

**EUROPEA:** non presente

**NAZIONALE:** non presente

### Standard di riferimento:

#### PM EPPO:

PM 7/17 (2) *Guignardia citricarpa* - Diagnostics. 2009 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 318-327 (in via di revisione).

PM 3/72 (2): Elements common to inspection of places of production, area-wide surveillance, inspection of consignments and lot identification

PM 3/76 (1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. – inspection of places of production

#### ISPM FAO:

ISPM 6/2018 - Surveillance

ISPM 31/2008 - Methodologies for sampling of consignment

ISPM 27/2014 (Annex 5) DP 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa on fruit. Rome, IPPC, FAO

### Misure di monitoraggio:

- ✓ ispezione visiva – *Visual inspection*
- ✓ campionamento – *Sample taking*

## Ispezione visiva/*Visual inspection*

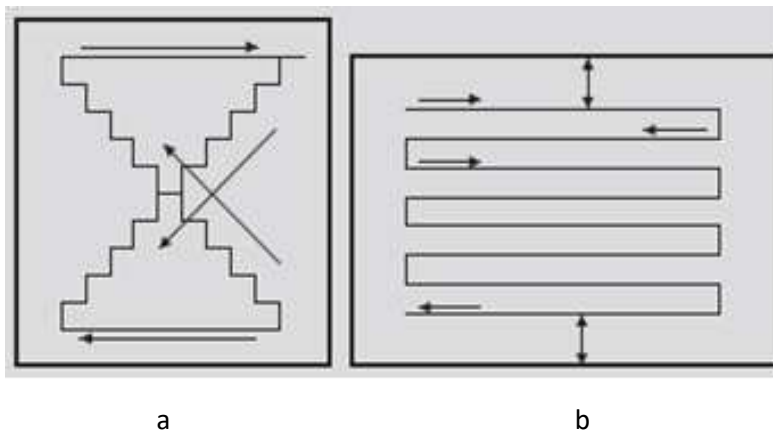
### Condizione dell'ispezione:

In campo:

Ispezione condotta preferibilmente lungo le diagonali a scalare (a) per l'osservazione dei sintomi sospetti o in alternativa secondo il modello "passaggi equidistanti" (b).

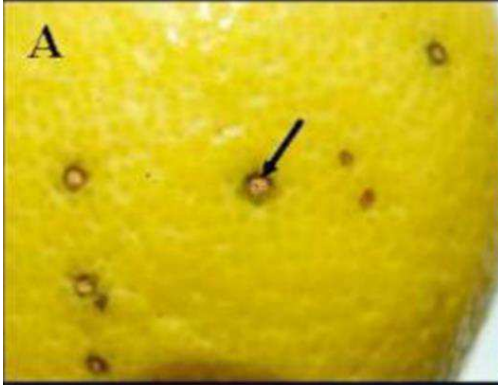
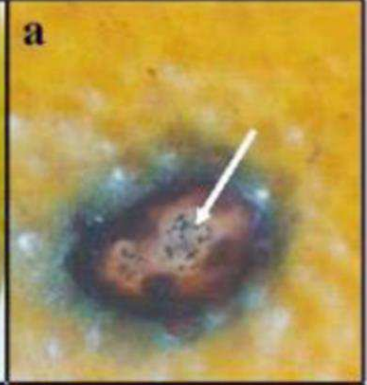

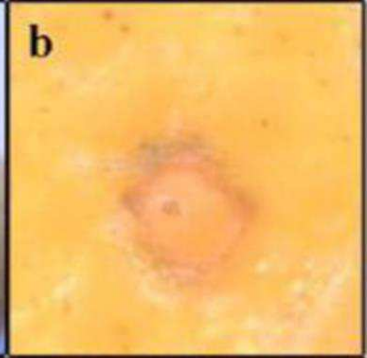

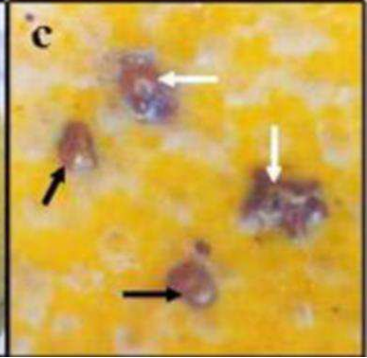
In vivaio: Ispezione preferibilmente con il modello "passaggi equidistanti" (b).

Effettuare la redazione del verbale d'ispezione e la georeferenziazione dei campi ispezionati.

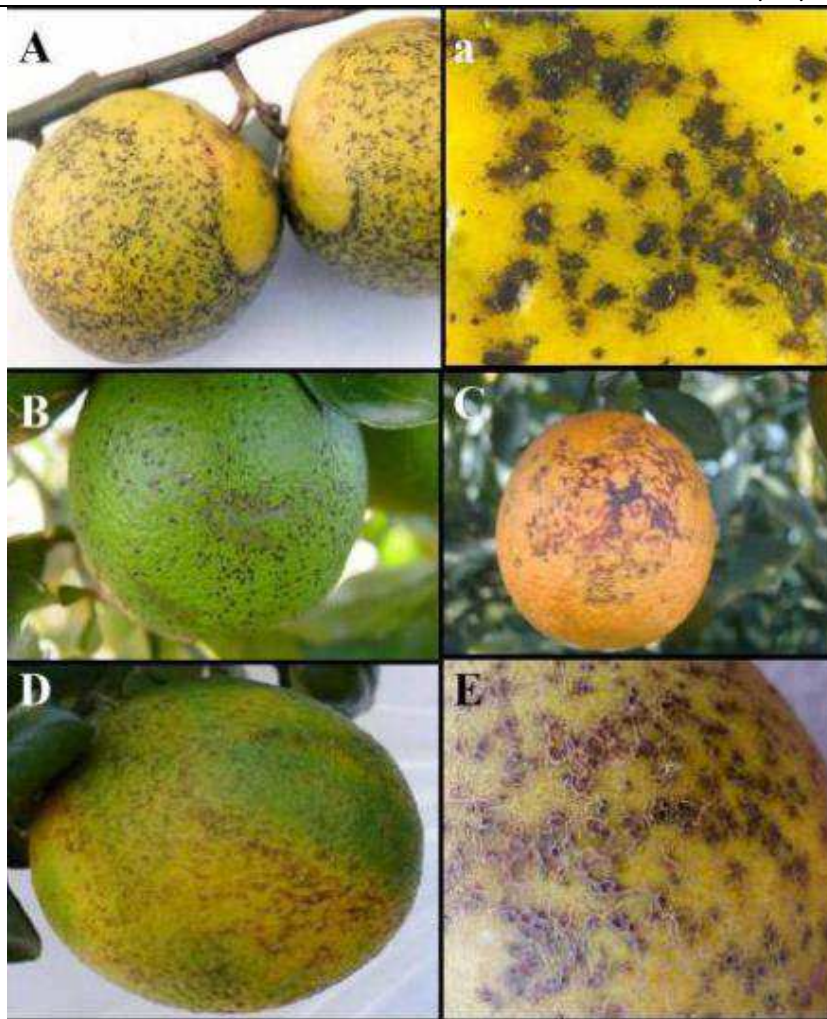


Per la definizione della grandezza del campione si può fare riferimento all'ISPM31

--	--

Quando	Cosa guardare	Immagini
Maturazione dei frutti	Macchia nera o punto nero / <i>hard spot</i>	 
	Macchie a lentiggini / <i>freckle spot</i>	    <p data-bbox="563 1541 1430 1787">Macchie nere (<i>hard spots</i>) e macchie a lentiggini (<i>freckle spots</i>) causati da <i>Guignardia citricarpa</i> su frutti di arancio (<i>C. sinensis</i>) e limone (<i>C. limon</i>). (A,a) Macchie nere su arancia; le frecce indicano la presenza di picnidi (fruttificazioni asessuate) all'interno delle lesioni più larghe. (B) Macchie a lentiggini su limone. (b) Macchie a lentiggini su arancia (le lesioni risultano leggermente depresse nella parte centrale e non sono associate alla presenza di picnidi). (C) Macchie nere e a lentiggini su limone. (c) Macchie a lentiggini (indicate dalle frecce nere) e stadio intermedio tra macchie a lentiggini e macchie nere su arancia; la freccia bianca indica la presenza dei picnidi.</p> <p data-bbox="563 1800 1430 1832"><i>Photos courtesy E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil.</i></p> <p data-bbox="563 1883 1430 1915">From Eppo PM 7/17(2)</p>

Falsa melanosi, macchie virulente, macchie frastagliate, macchie screpolate/  
*False melanose, virulent spots, lacy spots, cracked spots*


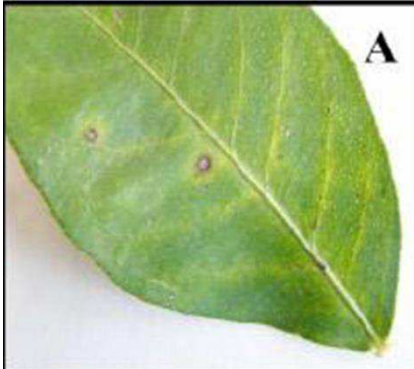


Falsa melanosi (*false melanose*), macchie virulente (*virulent spots*), macchie frastagliate (*lacy spots*) e macchie screpolate (*cracked spots*) causate da *Guignardia citricarpa* su frutti di arancio (*C. sinensis*). (A) Falsa melanosi su arancia matura. (a) Falsa melanosi circondata da piccole macchioline nere su arancia matura. (B) Falsa melanosi su arancia ancora verde. (C) Macchie virulente su arancia (le lesioni sono depresse e si estendono in profondità nell'albedo). (D) Macchie frastagliate su arancia ancora verde. (E) Macchie screpolate su arancia (le lesioni sono leggermente rilevate, screpolate e con margini irregolari; si noti l'assenza di picnidi).

*Photos courtesy FUNDECITRUS (A, B, C, D, E) and E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil (a).*

From Eppo PM 7/17(2)

**Campionamento/Sample taking**

<b>Cosa prelevare</b>	<b>Immagini</b>	<b>Come conservare</b>
Frutti sintomatici	 <p data-bbox="408 981 1137 1115"><i>EPP0 Global Database (2020) - Photo courtesy: Jean Michel Mei, Benjamin Vigier, Reynaud Pascal: Border inspection post (BIP) of Marseille (FR). Jean Michel Mei, Reynaud Pascal: Border inspection post (BIP) of Marseille (FR). <a href="https://gd.eppo.int/taxon/GUIGCI/photos">https://gd.eppo.int/taxon/GUIGCI/photos</a></i></p>	Mettere il materiale vegetale in buste di plastica a tenuta stagna e conservare in cella frigorifera (+ 4°C)
Foglie sintomatiche	 <p data-bbox="408 1592 1137 1641"><i>ISPM 27/2014 (Annex 5) - Photo courtesy: E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil.</i></p>	

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

### Normativa di riferimento:

#### **EUROPEA:**

Regolamento UE n. 2016/2031 del 26/10/2016; Regolamento UE n. 2019/1702 del 1/8/2019.

**NAZIONALE:** non presente

**PM EPPO:**PM 7/017(2) *Guignardia citricarpa* (in via di revisione)**Standard di riferimento****PM EPPO:**PM 7/17 (2) *Guignardia citricarpa* - Diagnostics. 2009 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 318-327 (in via di revisione).

PM 1/002(28) EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019).

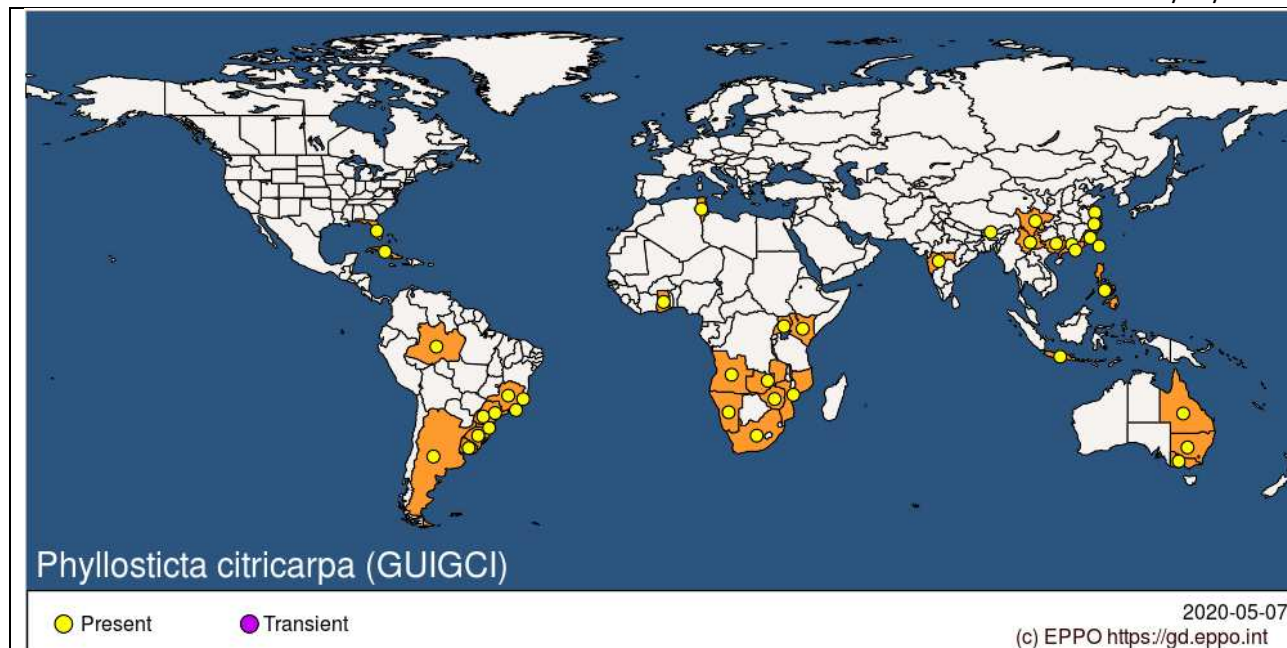
**Inquadramento EPPO**

PM 1/002(28) EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019)

**Origini:**Citrus Black Spot *P. citricarpa* è stato segnalato per la prima volta in Australia a Sidney nel 1879 e successivamente nel 1929 in Sud Africa lungo la costa (Kotzé, 1981).**Distribuzione:**

La presenza del patogeno è stata segnalata e confermata in numerosi paesi di quattro diversi continenti (EPPO Global Database, 2019).

**Africa:** Angola, Ghana, Kenya, Mozambico, Namibia, Sud Africa, Tunisia, Uganda, Zambia, Zimbabwe.**America:** Argentina, Brasile, Cuba, Stati Uniti d'America, Uruguay.**Asia:** Bhutan, Cina, India, Indonesia, Filippine, Taiwan.**Oceania:** Australia.In taluni casi la presenza del patogeno non è ancora stata confermata e pertanto viene indicata con la dicitura "*absent, unreliable record*" (assente, record non affidabile) (EPPO Global Database, 2019).**Africa:** Benin, Cameroon, Guinea, Swaziland, Togo.**America:** Chile, Mexico.**Asia:** Bangladesh.**Oceania:** Papua New Guinea, Vanuatu.**Mappa EPPO/CABI**



### Presenza e/o segnalazioni in Italia ad oggi:

La seguente segnalazione che riporta la presenza del patogeno in Calabria nella zona di Trebisacce (CS) al momento non è stata confermata, sulla base dell'attività di monitoraggio della Regione Calabria nel 2017/2018 e di uno studio *ad hoc* finanziato dall'EFSA nel 2019:

Guarnaccia V. *et al.*, 2017, First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Studies in mycology*, 87: 161-185:

### Rischio di introduzione

#### Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi

#### INTERCETTAZIONI *P. citricarpa*

Negli ultimi 5 anni (2015-2019) le intercettazioni sono state le seguenti:

Country of Export	Year	Object	Plant species (No of interceptions)
Uruguay	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (5); Citrus reticulata(1);
Uganda	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon(1)
Tunisia	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (6); Citrus limon (1)
Swaziland	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
South Africa	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (6); Citrus limon (3)



Guinea	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
China	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus maxima (5); Citrus paradisi (1);
Argentina	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (8); Citrus limon (7); Citrus reticulata (s.l.) (1); Citrus reticulata (1);
Uruguay	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
Swaziland	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
South Africa	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (2)
Brazil	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (24); Citrus reticulata (1); Citrus limon (1);
Benin	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1); Citrus maxima (1)
Argentina	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (8); Citrus limon (8); Citrus reticulata (1);
Zimbabwe	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Uruguay	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
Swaziland	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (2)
South Africa	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (19); Citrus limon (4); Citrus reticulata (1);
China	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus maxima (1)
Argentina	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1); Citrus reticulata (s.l.) (2); Citrus limon (2)
Zimbabwe	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Vietnam	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon (1)
Uruguay	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)

Togo	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Swaziland	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (2); Citrus xtangelo (1); Citrus sinensis (1);
South Africa	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (2); Citrus limon (2)
Mexico	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (1);
Chile	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (1);
Cameroon	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus maxima (2); Citrus sp. (1);
Brazil	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1); Citrus limon (1)
Bangladesh	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus (1)
Argentina	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (9); Citrus limon (4); Citrus reticulata (s.l.) (1);
Uruguay	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (67); Citrus reticulata sensu stricto (2); Citrus reticulata (s.l.) (1);
Swaziland	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (2)
South Africa	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (11); Citrus limon (3); Citrus reticulata sensu stricto (1);
Cote d'ivoire	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Cameroon	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus medica var. ethrog (1); Citrus maxima (1)
Brazil	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (13)
Bangladesh	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (1); Citrus macroptera (1)
Argentina	2015	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon (11); Citrus sinensis (4); Citrus reticulata sensu stricto (2);

## PARTE C – DIAGNOSI

### Normativa di riferimento:

#### EUROPEA:

- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072
- Union Quarantine pest (Anne x II B) Reg 2019/2072
- Reg 2019/1702 ON prioritari
- DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2016/715 DELLA COMMISSIONE dell'11 maggio 2016 che stabilisce misure per quanto concerne taluni frutti originari di taluni paesi terzi per impedire l'introduzione e la diffusione nell'unione dell'organismo nocivo *Phyllosticta citricarpa* (mcalpine)

NAZIONALE: non presente

### Protocolli standard di riferimento:

#### PM EPPO:

PM 7/76 (5) Use of EPPO Diagnostic Standards  
PM 7/17(2) *Guignardia citricarpa*

### Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato (riportato in IO 05)

- (VIII) Selective culture media
- (XV) PCR (dopo selective culture media in caso di presenza di strutture fungine oppure direttamente da materiale vegetale)
- (XVIII) saggio LAMP = Molecular testing 3
- (XIX) PCR+Sequencing (va indicato quando si fa insieme la PCR e si invia al sequenziamento) (vedi commento)
- (XX) Real time

### Matrice

- Frutto sintomatico (per tutte le procedure descritte).
- Foglie, piccioli e getti sintomatici (solo per l'isolamento *in vitro* su substrati colturali selettivi).

### Tipologia di test

Il diagramma di flusso di lavoro da seguire per la diagnosi certa di *P. citricarpa* a partire da frutti sintomatici è qui sotto riportato (Riccioni e Valente, 2013).  
criprendendo i test presenti nel PM 7/017(2) *P. citricarpa* (in via di revisione).

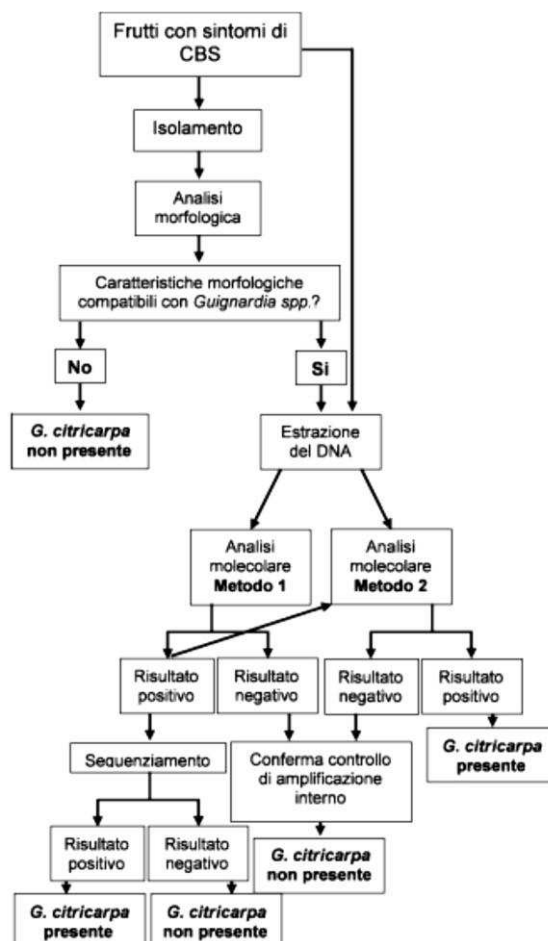
In base alle linee guida, riassunte nello schema sottostante, partendo da campioni sintomatici l'identificazione di *P. citricarpa* è confermata mediante metodi molecolari (metodo 1 -cod IO 05 XV, XX) in particolare mediante il metodo basato su Real Time (metodo 2 – cod. IO 05 XX).

### Isolamento su terreno selettivo (cod. IO 05 VIII – Selective culture media)

In via preliminare e sempre partendo da frutti sintomatici, (o eventualmente da foglie, piccioli e getti sintomatici, se presenti) si può in via preliminare effettuare un primo screening mediante isolamento su terreno selettivo, in particolare, secondo il protocollo EPPO specifico (PM7/17 (2)) l'isolamento può essere effettuato su Cherry decoction agar (CHA), Potato dextrose agar (PDA), Oatmeal agar (OA) e Malt extract agar (MEA). In caso di esito positivo si deve confermare la presenza di *G. citricarpa* mediante metodi molecolari previa estrazione di DNA:

### Identificazione mediante metodi molecolari (cod. IO 05 XV, XVIII, XX)

Secondo quanto riportato nelle linee guida, a partire da campioni sintomatici l'identificazione di *P. citricarpa* deve essere confermata mediante metodi molecolari: PCR convenzionale (metodo 1 - cod IO 05 XV, XX; Bonants *et al.*, 2003) o Real-time PCR (metodo 2 - cod. IO 05 XX; van Gent-Pelzer *et al.*, 2007).



Flusso di lavoro per l'identificazione di *P. citricarpa* da frutto.

**Metodo 1 (cod. IO 05 XV):** identificazione molecolare mediante PCR convenzionale (Bonants *et al.*, 2003)

Il metodo si basa sull'amplificazione di una regione target costituita da una sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) che genera un prodotto di amplificazione di 490 bp. I primer sono selettivi per *P. citricarpa* e *P. citriasiana* ma non sono in grado di discriminare le due specie tra di loro.

In caso di positività è necessaria una conferma o mediante sequenziamento del prodotto di amplificazione o mediante l'applicazione del metodo 2.

Per ciascuna amplificazione PCR è necessario includere:

- Controllo positivo (1): reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *P. citricarpa* precedentemente testato e valutato per la sua amplificabilità.
- Controllo negativo (1): miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve per verificare eventuali contaminazioni.
- Controllo di amplificazione interno (IAC, *Internal Amplification Control*) (1): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR, devono essere controllate amplificando il DNA con i primer universali ITS4 e ITS5 secondo le condizioni descritte da White *et al.* (1990).

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo per *P. citricarpa* verrà visualizzata la corrispondente banda specie-specifica (Figura 1).

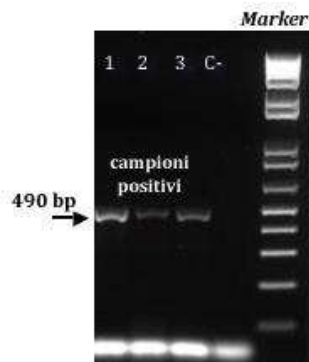


Fig. 1 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di PCR ottenuti con il protocollo di amplificazione su DNA genomico estratto da 3 isolati di *P. citricarpa* (pozzetti da 1 a 3) e relativo controllo negativo (C-).

**Metodo 2 (cod. IO 05 XX):** identificazione molecolare mediante PCR Real Time (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007)

La regione target dell'amplificazione è costituita dalla sequenza ITS e genera un amplicone di 69 bp. Le sequenze di ciascun primer e della sonda fluorogenica sono selettive per la sola specie *P. citricarpa* e sono riportate di seguito (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007):

Per ogni campione preparare 3 repliche tecniche.

Per ogni campione sono necessarie 3 repliche tecniche.

Per ciascuna amplificazione mediante Real-time PCR è necessario includere:

- Controllo positivo Real-time PCR (1): reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *P. citricarpa* diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione.
- Controllo negativo (1): miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve per verificare eventuali contaminazioni.
- Controllo di amplificazione interno (IAC, *Internal Amplification Control*) (1): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR, devono essere controllate amplificando il DNA con i primer universali ITS4 e ITS5 secondo le condizioni descritte da White *et al.* (1990).

Valutazione dei risultati

Il campione è considerato positivo per la presenza di *P. citricarpa* se il segnale di amplificazione è rilevato in corrispondenza di un valore del ciclo soglia (Ct) inferiore al Ct del controllo positivo Real time PCR di riferimento diluito al limite di rivelazione (vedere uso dei controlli). Viceversa, se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un Ct superiore al Ct del controllo positivo di riferimento, il campione si considera negativo per la presenza di *P. citricarpa* (Figura 2)

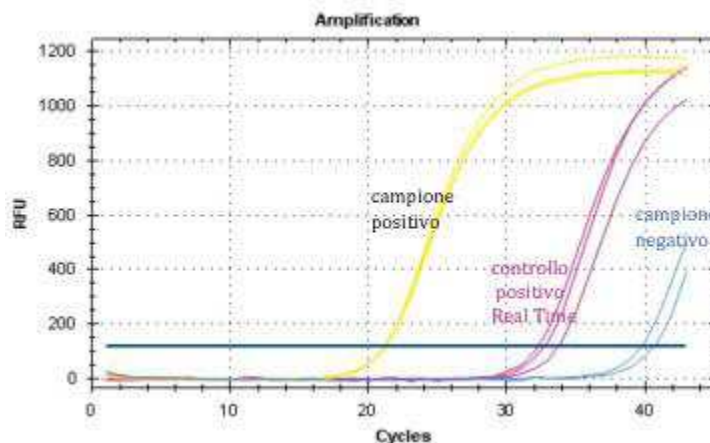


Figura 2: Curve di amplificazione in PCR Real Time confrontate con il controllo positivo.

E' disponibile in letteratura un protocollo diagnostico molecolare (**cod. IO 05 XVIII**) per l'identificazione di *P. citricarpa*, basato sulla LAMP (A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesion. J.A. Tomlinson et al., 2013. Eur. J. Plant Pathology 136: 217-224). Tuttavia, il test non è stato validato su tessuto vegetale (buccia di agrume).

#### Conclusioni

Dato che la tassonomia dei funghi, incluso le specie all'interno di questo genere, sono in continua evoluzione, è opportuno fare una verifica continua delle prestazioni diagnostiche nei confronti di *P. citricarpa* per poter sempre garantire la massima affidabilità possibile.

Autori: Valentino Bergamaschi, Maria Teresa Valente, Luca Riccioni

#### Riferimenti bibliografici

Bonants P. J. M., Caroll G. C., de Weerd M., van Brouwershaven I. R., Baayen R. P. (2003) Development and validation of a fast PCR-based method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus *Guignardia citricarpa*. European Journal of Plant Pathology 109: 503-513.

Brentu F. C., Oduro K. A., Offei S. K., Odamtten G. T., Vicent A., Peres N. A., Timmer L. W. (2012) Crop loss, aetiology, and epidemiology of citrus black spot in Ghana. European Journal of Plant Pathology 133(3): 657-670.

CABI (2019) *Guignardia citricarpa* (citrus black spot). Data sheet (aggiornato al 28 novembre 2019). Disponibile al link: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26154>.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) (2014) Scientific Opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. EFSA Journal 2014;12(2):3557, 243 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3557.

EPPO/CABI (undated) Data Sheets on Quarantine Pests. *Guignardia citricarpa*. Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003. Disponibile al link: <https://gd.eppo.int/taxon/GUIGCI/documents>.

Glienke C., Pereira O. L., Stringari D., Fabris J., Kava-Cordeiro V., Galli-Terasawa L., Cunningham J., Shivas R. G., Groenewald J. Z., Crous P. W. (2011) Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. Persoonia 26: 47-56.

Guarnaccia V., Groenewald J. Z., Li H., Glienke C., Carstens E., Hattingh V., Fourie P. H., Crous P. W. (2017) First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Studies in Mycology* 87: 161-185.

ISPM 31/2008 Methodologies for sampling of consignments. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 6/2018 Surveillance. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 27/2014 (Annex 5) DP 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa on fruit. Rome, IPPC, FAO.

Kotzé J. M. (1963) Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, with particular reference to its epiphytology and control at Letaba. University of Pretoria, 296 pp.

Kotzé J. M. (1981) Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 65: 945-950.

Kotzé J. M. (2000) Black spot. In: Compendium of citrus diseases. Eds. Timmer L. W., Garnsey S. M., Graham J. H. APS Press, St. Paul, MN, USA, 10-12. Lanza F. E., Metzker T. G., Vinhas T., Behlau F., Silva Junior G. J. (2018) Critical fungicide spray period for citrus black spot control in Sao Paulo state, Brazil. *Plant Disease* 102: 334-340.

OEPP/EPPO (2009) PM 7/17 (2) *Guignardia citricarpa* - Diagnostics. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 318-327.

Paul I., van Jaarsveld A. S., Korsten L., Hattingh V. (2005) The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* Kiely: likelihood of disease establishment in the European Union. *Crop Protection* 24: 297-308.

PM 1/002 (28) EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019). [https://www.eppo.int/media/uploaded\\_images/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/pm1-002-28-en.pdf](https://www.eppo.int/media/uploaded_images/ACTIVITIES/plant_quarantine/pm1-002-28-en.pdf)

PM 3/72 (2) Elements common to inspection of places of production, area-wide surveillance, inspection of consignments and lot identification. 2009 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 260-262.

PM 3/76 (1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. - inspection of places of production. 2016 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 46: 28-39.

PM 7/17 (2) *Guignardia citricarpa* - Diagnostics. 2009 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 318-327.

PM 7/76 (5) Use of EPPO Diagnostic Standards. 2018 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 48: 373-377.

Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio del 26 ottobre 2016 relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 317/4 (23.11.2016).

Regolamento Delegato (UE) 2019/1702 della Commissione del 1° agosto 2019 che integra il Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 260/8 (11.10.2019).

Riccioni L., Valente M. T. (2013) Protocollo diagnostico per *Guignardia citricarpa*. *Petria* 23(3): 455-618.

Sutton B. C., Waterston J. M. (1966) *Guignardia citricarpa*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford, UK, CAB International.

Tomlinson J. A., Ostojka-Starzewska S., Webb S., Cole J., Barnes A., Dickinson M., Boonham N. (2013) A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesion. *European Journal of Plant Pathology* 136: 217-224.

van Gent-Pelzer M. P. E., van Brouwershaven I. R., Kox L. F. F., Bonants P. J. M. (2007) A Taqman PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa*. *Journal of Phytopathology* 155: 357-363.

White T. J., Burns T., Lee Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. San Diego, Academic Press, pp. 315-322.