

## 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. *tashke*
- ❖ *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 Scottichini, 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 300 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.

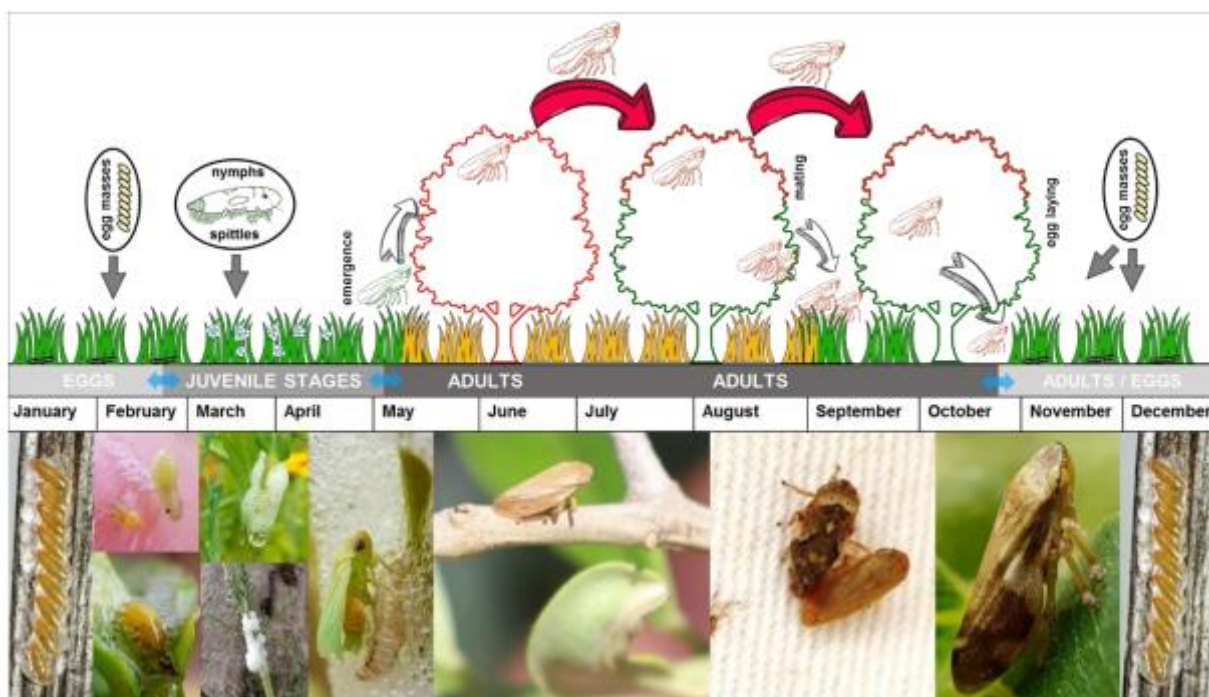


Le malattie causate da *X. fastidiosa* derivano dall'interazione tra il batterio, le piante ospiti, comprese le piante ospiti asintomatiche (che fungono da serbatoi), gli insetti vettori e le condizioni ambientali (EFSA, 2018; Chatterjee *et al.*, 2008).

### 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 Xylella (EFSA, 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:

- 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 effettuate 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.



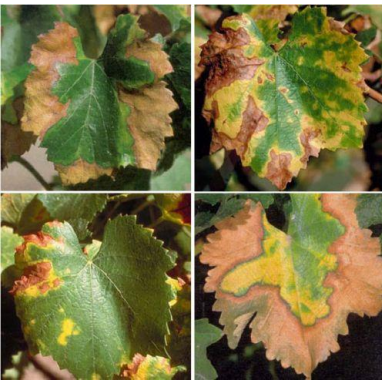

Quando	Cosa guardare	Immagini
Epoca di ispezione e campionamento  <b>Olivo:</b>  <u>i prelievi possono effettuarsi per tutto l'arco dell'anno</u>	Bruscatura fogliare	





<p><b><i>Polygala myrtifolia:</i></b></p> <p><u>i prelievi possono effettuarsi per tutto l'arco dell'anno</u></p> <p><b>Oleandro:</b></p> <p><u>i prelievi possono effettuarsi per tutto l'arco dell'anno</u></p> <p>Altre sempreverdi presenti nel verde urbano e nella macchia</p>	<p>Repentino disseccamento di rami e drupe in accrescimento</p> <p>Disseccamenti a carico di rami e/o branche in maniera irregolare</p> <p>Bruscatura fogliare con necrosi marginale, talora circondata da un alone clorotico (giallo) o rosso</p> <p>Disseccamenti irregolari nella pianta</p> <p>Bruscatura fogliare con necrosi marginale, talora circondata da un alone clorotico (giallo) o rosso</p>	   <p><i>Polygala myrtifolia</i></p>  <p><i>Polygala myrtifolia</i></p>  <p>Oleandro</p>
--	--	--




<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><b>Pesco:</b> dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p>	<p>Chioma compatta, con permanenza di fiori e foglie, foglie affastellate ma <b>non bruscatura</b></p>		<p>Ciliegio</p>	
<p><b>Platano:</b> dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p> <p><b>Acero:</b></p>	<p>Chioma compatta, con permanenza di fiori e foglie, foglie affastellate ma <b>non bruscatura</b></p>		<p>(Foto: M. Scortichini, CREA-OFA Roma tratta da <a href="https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos">https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos</a>)</p>	
				
				
		<p>(Foto: John Hartman, University of Kentucky, Bugwood.org) - <a href="https://www.ipmimages.org/index.cfm">https://www.ipmimages.org/index.cfm</a>)</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>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><b>Agrumi:</b> dall'estate inoltrata fino alla</p>		


<p>caduta delle foglie</p> <p><b>Caffè:</b> dall'estate inoltrata fino alla caduta delle foglie</p> <p><b>Erba medica:</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>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: M. Scortichini, CREA-OFA Roma e Alexander Purcell, Bugwood.org - <a href="https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos">https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos</a>) University of California, Bugwood.org - <a href="https://www.ipmimages.org/index.cfm">https://www.ipmimages.org/index.cfm</a>)</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

<p><b>Inquadramento normativo</b></p> <p><b><u>EUROPEA</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Decisione 789/2015 Relativa alle misure per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della <i>Xylella fastidiosa</i> (Wells et al.)</li><li>- Regolamento (EU) 2016/2031 Annex 2 (parte A)</li><li>- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072</li></ul>
---

- 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.

### **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)

-

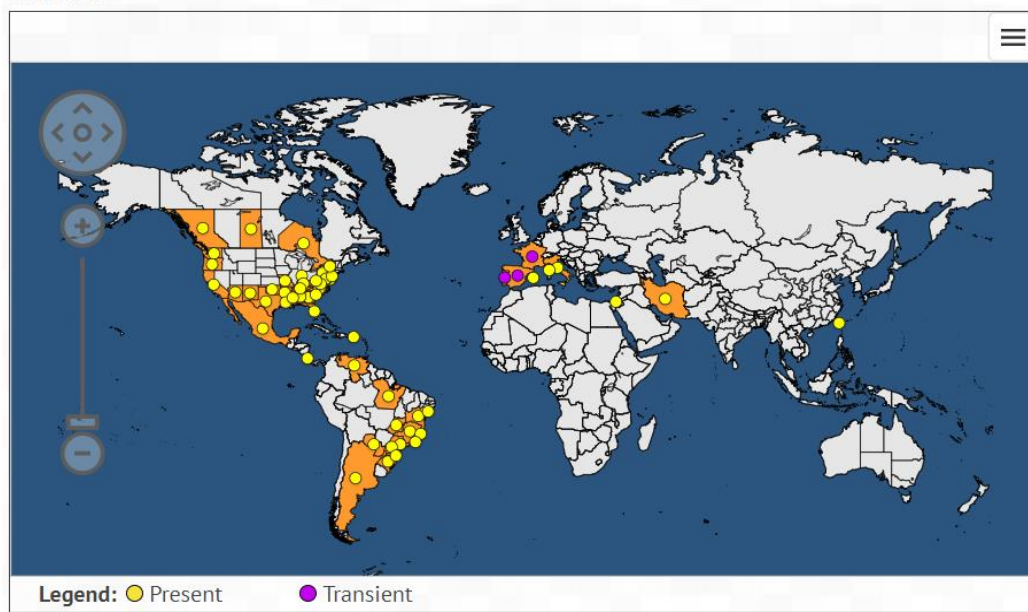
### **Presenza e/o segnalazioni in Italia:**

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.).

## Distribution

Last updated: 2019-11-21

(Fonte: EPPO Global Database <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/distribution>)**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 (2015-2019) le intercettazioni sono state le seguenti:**

Country of Export	Year	Object	Plant Species (No. of interceptions)
USA	2019	/	/
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)
Brazil	2015	Intended for planting: cuttings	<i>Mandevilla sanderi</i> (1)
Honduras	2015	Intended for planting: already planted	<i>Coffea arabica</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).

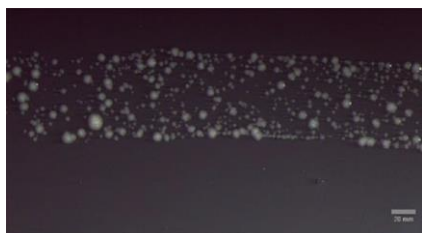
Qualora il risultato dell'analisi di screening preliminare produca risultati inconsistenti è raccomandata la ripetizione dell'analisi e/o un nuovo campionamento.

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)

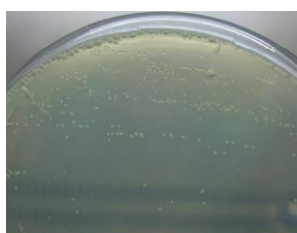
- PD2 (Davis *et al.*, 1980)
- BCYE modificato
- PWG modificato

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*, *hoC*, *leuA*, *nuoL*, *petC* (EPP0 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*

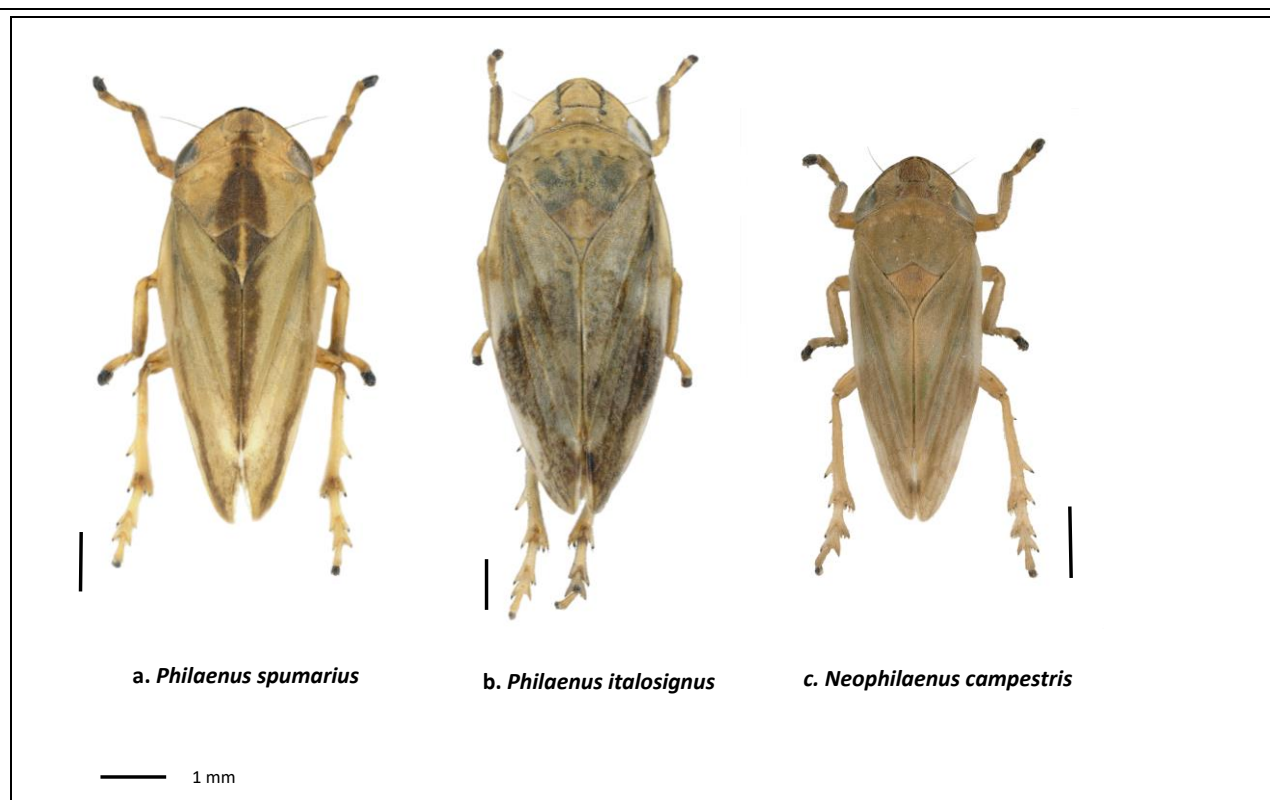
- Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Yuan *et al.*, 2010) in grado di determinare tutte le sottospecie (Cod. IO 05 XIX);
- PCR (Hernandez-Martinez *et al.*, 2006): identificazione delle sottospecie *fastidiosa*, *multiplex* e *sandyi* (Cod. IO 05 XV)
- PCR (Pooler & Hartung 1995): identificazione della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

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, Dumeno 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