

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 28

Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	Gruppo di lavoro Normativa fitosanitaria agrumi	CFN 28/09/2022	23/12/2022	

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 2 di 14

Sommario

1. PREMESSA	3
2. RIFERIMENTI NORMATIVI.....	3
3. DIVERSITA' MOLECOLARE E BIOLOGICA DEGLI ISOLATI DI CTV UNIONE.....	5
4. CATEGORIZZAZIONE DEGLI ISOLATI DI CTV E PRESENZA IN ITALIA E NEL TERRITORIO DELL'UNIONE	6
5. CONTROLLI NEI VIVAI E NELLE FONTI DI APPROVVIGIONAMENTO DEI MATERIALI DI PROPAGAZIONE	7
6. INDAGINI NEGLI AGRUMETI COMMERCIALI	8
7. DIAGNOSI DI CTV E IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI	8
7.1 Diagnosi	8
7.2 Identificazione degli isolati di CTV.....	9
.....	10
9. BIBLIOGRAFIA	13

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 3 di 14

1. PREMESSA

Il Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072 della Commissione, così come modificato dal Regolamento di esecuzione (UE) 2021/2285, istituisce un elenco degli organismi nocivi da quarantena rilevanti per l'Unione, degli organismi nocivi da quarantena rilevanti per le zone protette e degli organismi nocivi regolamentati non da quarantena rilevanti per l'Unione («ORNQ»). Esso stabilisce inoltre prescrizioni relative all'introduzione o allo spostamento nell'Unione di talune piante, di determinati prodotti vegetali e altri oggetti al fine di prevenire l'ingresso, l'insediamento e la diffusione di tali organismi nocivi nel territorio dell'Unione.

In base a questo regolamento, gli isolati di CTV vengono distinti in non europei (isolati non UE) ed europei (isolati UE), normati come di seguito specificato:

- 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* del suddetto regolamento);
- CTV isolati UE, sono considerati organismi nocivi regolamentati non da quarantena (ORNQ) rilevanti per l'Unione (*ALLEGATO IV, Parte D e J* del suddetto regolamento).

Allo stesso tempo, il Decreto del Ministro delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali del 6 dicembre 2021, concernente l'abrogazione di provvedimenti di lotte obbligatorie e misure fitosanitarie nazionali, ha disposto l'abrogazione del decreto del Ministro delle risorse agricole, alimentari e forestali 31 ottobre 2013, recante «*Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi "Citrus Tristeza Virus"*», tenuto conto dell'ampia diffusione di tale organismo nocivo nel territorio nazionale e che ad esso si applicano direttamente le relative misure di emergenza o i rispettivi regolamenti di esecuzione adottati a livello europeo.

Pertanto, considerata la necessità di monitorare la presenza di CTV sul territorio italiano, derivante dagli obblighi imposti dalla normativa vigente il presente documento tecnico-ufficiale ha lo scopo di definire le procedure diagnostiche da adottare per l'identificazione di isolati di CTV (EU e non-EU). Questo al fine di favorire una uniforme applicazione sul territorio nazionale di protocolli armonizzati in grado di fornire risultati affidabili, omogenei e confrontabili.

2. RIFERIMENTI NORMATIVI

- 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.
- Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/ 2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/ 2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE,

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 4 di 14

96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali).

- 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 e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione.
- Decreto legislativo 2 febbraio 2021, n. 18, recante "Norme per la produzione e la commercializzazione dei materiali di moltiplicazione e delle piante da frutto e delle ortive in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625" Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19 recante norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625.
- Decreto del Ministro delle politiche agricole alimentari e forestali del 6 dicembre 2021 inerente all'abrogazione di provvedimenti recanti lotte obbligatorie e misure fitosanitarie nazionali.
- Regolamento di esecuzione (UE) 2021/2285 della Commissione del 14 dicembre 2021 che modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072 per quanto concerne la redazione degli elenchi di organismi nocivi, i divieti e le prescrizioni per l'introduzione e lo spostamento nell'Unione di piante, prodotti vegetali e altri oggetti e che abroga le decisioni 98/109/CE e 2002/757/CE e i regolamenti di esecuzione (UE) 2020/885 e (UE) 2020/12922.
- EFSA PLH 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 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 on non-European isolates of citrus tristeza virus. EFSA Supporting Publications, 16(4): <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1600>
- EPPO Standard PM 7/31(1) - Diagnostic protocols for regulated pests. Citrus tristeza closterovirus. EPPO/OEPP Bulletin, 34 (2014), 239 – 246.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Organi sussidiari
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 5 di 14

3. DIVERSITA' MOLECOLARE E BIOLOGICA DEGLI ISOLATI DI CTV UZIONE

Il sequenziamento dell'intero genoma virale di isolati di riferimento di CTV ha permesso di definire le caratteristiche molecolari di sei principali genotipi di CTV (T3, T30, T36, T68, VT, RB), rappresentativi di altrettanti gruppi filogenetici (Harper, 2013), in cui ricadano la maggioranza degli isolati di CTV oggi noti. Accanto a questi, altri genotipi con caratteristiche genomiche uniche e distintive, sono stati identificati nel corso degli anni quali, HA16-5 (Melzer et al., 2010) nelle Hawaii e l'S1 (Yokomi et al., 2018), in California (USA); tuttavia, tali genotipi sembrano avere una bassa incidenza in campo e/o una diffusione geografica limitata.

Allo stesso tempo, attraverso l'esecuzione di saggi biologici basati sull'osservazione dei sintomi indotti su specifiche piante indicatrici (Roistacher, 1991; Ballester-Olmos et al., 1993; Garnsey et al., 2005) è stato possibile accertare il comportamento biologico di isolati di CTV ascrivibili ai gruppi filogenetici sopra richiamati. In particolare attraverso questi saggi è stato possibile evidenziare una diversa aggressività degli isolati di CTV che ha permesso di distinguere biotipi aggressivi e blandi. Fra le caratteristiche biologiche associate ai biotipi aggressivi si annovera, tipicamente, la capacità di indurre una o più delle seguenti sindromi:

- butteratura del legno (*stem pitting* - SP) su pompelmo Duncan (*Citrus paradisi*) e/o su arancio dolce (*C. sinensis*) e mandarino (*Citrus reticulata*); questa caratteristica si riscontra, principalmente, in isolati di tipo T3, T68 e, occasionalmente, VT;
- giallume dei semenzali (*seedling yellow* - SY) su semenzali di arancio amaro (*C. aurantium*), limone (*C. limon*) o pompelmo (*C. paradisi*); questa caratteristica si riscontra in isolati di tipo T3, T36 e VT;
- deperimento (*tristeza sensu stricto*) su combinazioni di innesto arancio dolce (*C. sinensis*)/arancio amaro (*C. aurantium*); questa caratteristica si riscontra nella gran parte degli isolati ascrivibili sia a biotipi aggressivi (T3, VT, T36, T68) sia a biotipi blandi (in particolare agli isolati con genotipo T30) .

Oltre che su specifiche piante indicatrici, la butteratura del legno è una sindrome osservabile anche in campo su piante naturalmente infette da CTV. Inoltre, contrariamente al deperimento che si manifesta solo in presenza di piante innestate su arancio amaro, la butteratura del legno si può osservare anche in combinazioni di innesto con portinnesti tolleranti a CTV. Allo stato attuale, la butteratura non è mai stata segnalata in agrumeti commerciali europei.

Il giallume dei semenzali, invece, non si osserva normalmente in campo e, pertanto, la capacità di un isolato di causare SY è verificabile soltanto attraverso l'esecuzione di saggi biologici di laboratorio.

Caratteristica dei biotipi blandi è, invece, quella di indurre sintomi scarsamente notabili o del tutto assenti in saggi biologici, su specifici indicatori (Limetta messicana).

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 6 di 14

4. CATEGORIZZAZIONE DEGLI ISOLATI DI CTV E PRESENZA IN ITALIA E NEL TERRITORIO DELL'UNIONE

Sulla base di quanto riportato nell'Opinione Scientifica dell'EFSA sulla categorizzazione degli isolati non europei di CTV (EFSA PLH Panel, 2017), sono da ritenersi isolati non-EU:

- gli isolati di CTV in grado di causare sintomi di butteratura del legno (*stem pitting* - SP) su arancio dolce in campo, anche in combinazione d'innesto con portinnesti tolleranti o resistenti;
- gli isolati di CTV in grado di superare la resistenza del *Poncirus trifoliata* e dei suoi ibridi (isolati *resistance breaking* - RB).

Poiché non si conoscono i determinanti genetici responsabili della diversa virulenza dei ceppi di CTV, non vi sono marcatori molecolari specifici in grado di differenziare in maniera univoca i ceppi in relazione alle proprietà biologiche. Pur tuttavia, diversi saggi molecolari ceppo-specifici sono stati sviluppati nel corso degli anni e risultano molto utili per ottenere indicazioni predittive sul comportamento biologico degli isolati. Il saggio biologico resta pertanto uno strumento diagnostico fondamentale per confermare o integrare i saggi molecolari. Con riferimento alla distinzione degli isolati di CTV in EU e non-EU, considerando che non vi sono strumenti diagnostici in grado di differenziare gli isolati su base geografica, la identificazione/differenziazione può avvenire sulla base del genotipo associato alle infezioni di CTV, facendo quindi riferimento a genotipi già segnalati o mai segnalati in Europa.

A tal fine, nella tabella successiva, sono riportati i genotipi di riferimento sinora noti in letteratura, la diffusione sul territorio europeo e italiano, unitamente alle principali caratteristiche biologiche.

Ceppi noti a livello internazionale		Presenza in EU	Presenza in IT
Genotipo	Comportamento biologico		
T30	Variabile: da blando a sintomi di deperimento in combinazioni di innesto con arancio amaro/portainnesti suscettibili	Presenti	Segnalati nelle principali regioni agrumicole
T36	Ceppi molto rari a livello internazionale che inducono per lo più SY	Non segnalati.	Non segnalati
VT, T3	Alcuni in grado di dare SP in arancio dolce in campo;	Genotipi di CTV strettamente correlati agli isolati trovati in altre parti	Isolati che hanno prodotto sintomi di SY nel saggio biologico

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 7 di 14

	Nel saggio biologico determinano sintomi severi su diversi indicatori	del mondo associati a gravi sintomi di SP, sono stati riportati in Sicilia, Spagna, Creta, Grecia, Croazia e Montenegro. (EFSA 2017)	segnalati in alcune regioni agrumicole.
T68	In grado di produrre SP su pompelmo ma con diverso grado di severità in funzione degli isolati	Non segnalati	Non segnalati
RB	Blandi o severi a seconda delle segnalazioni; in grado di replicarsi in <i>Poncirus trifoliata</i> e portainnesti resistenti	Segnalati in Grecia; in corso di eradicazione	Non segnalati
HA16-5, S1	Blandi	Non segnalati.	Non segnalati

5. CONTROLLI NEI VIVAI E NELLE FONTI DI APPROVVIGIONAMENTO DEI MATERIALI DI PROPAGAZIONE

Il Reg. di esecuzione (UE) 2019/2072 del 28 novembre 2019, così come modificato dal Reg. di esecuzione (UE) 2021/2285 del 14 dicembre 2021, fissa allo 0 % la soglia di tolleranza degli isolati UE di CTV per:

- i materiali di moltiplicazione di piante ornamentali e di altre piante da impianto destinate a scopi ornamentali (*Allegato IV, Parte D*);
- i materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e le piante da frutto destinate alla produzione di frutti (*Allegato IV, Parte J*).

In linea con la normativa europea, il Decreto legislativo 2 febbraio 2021, n. 18 che fissa le Norme per la produzione e la commercializzazione dei materiali di moltiplicazione e delle piante da frutto e delle ortive, include il CTV isolati UE fra gli ORNQ la cui presenza va rilevata attraverso l'ispezione visiva e, se del caso, il campionamento e l'analisi (*Allegato II, Parte 2*).

Sulla base di quanto sopra, i controlli nei vivai dovranno essere finalizzati sia, al rilevamento di CTV isolati non-UE (in quanto organismi da quarantena) sia, di CTV isolati UE (in quanto ORNQ la cui presenza non è ammessa nei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e nelle piante da frutto destinate alla produzione di frutti).

Qualora il campionamento e l'analisi si rendessero necessari, i campioni devono essere costituiti come segue:

- a) piante madri: si prelevano n. 4 germogli per pianta per costituire n. 1 campione pool;

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 8 di 14

b) piante in allevamento: si preleva n.1 germoglio per singola pianta da piante selezionate random. I germogli prelevati si riuniscono in gruppi di n. 5 germogli per costituire n. 1 campione pool.

L'autorità competente, o l'operatore professionale sotto la sorveglianza ufficiale dell'autorità competente, effettua controlli e adotta ogni altra misura atta a garantire il rispetto delle prescrizioni previste dalla normativa europea e nazionale vigente.

Indipendentemente dalle prescrizioni da adottare, in caso di rilevamento della presenza di CTV tutti i campioni positivi o, almeno, un numero rappresentativo di questi dovrà essere sottoposto a identificazione dell'isolato infettante per escludere l'eventuale presenza di CTV isolati-non UE.

6. INDAGINI NEGLI AGRUMETI COMMERCIALI

La presenza di CTV non-EU in Italia non è nota, pertanto, il territorio nazionale è da considerarsi zona indenne per quanto riguarda gli isolati di CTV non-EU.

I Servizi Fitosanitari Regionali svolgono, annualmente, adeguati programmi di indagine volti all'identificazione precoce di isolati di CTV non-EU per prevenirne la loro introduzione e diffusione sul territorio di propria competenza. In caso di ritrovamento si applicano le misure previste dal regolamento (UE) 2016/2031.

In generale, al fine di ricercare gli isolati di CTV non-EU, l'indagine negli agrumeti commerciali prevede ispezioni visive, il campionamento e l'analisi di campioni prelevati da piante che manifestano sintomi riferibili a buttratura del legno su piante di arancio dolce e pompelmo, in particolare in impianti realizzati con portinnesti tolleranti o resistenti a CTV, o sospetti tali.

Ai fini della ricerca di isolati di tipo RB, che generalmente non manifestano sintomi in campo, si prevede il prelievo di almeno 20 campioni per agrumeto omogeneo asintomatico in un congruo numero di agrumeti commerciali.

I campioni raccolti devono essere analizzati seguendo una delle procedure di laboratorio descritte al successivo paragrafo 7. Le piante eventualmente risultate positive a *Citrus tristeza virus* isolati non-EU, devono essere eradicate e, contestualmente, vanno attivate le procedure previste dalla regolamentazione europea e nazionale di riferimento.

Ad esclusione dei materiali destinati alla moltiplicazione di piante da frutto di agrumi e alle piante da frutto di agrumi destinate alla produzione di frutti nei vivai, non si applicano misure obbligatorie di eradicazione in caso di rinvenimento di *Citrus tristeza virus* isolati EU negli agrumeti commerciali.

7. DIAGNOSI DI CTV E IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI

7.1 Diagnosi

La diagnosi generica di CTV nei campioni prelevati nel corso dei controlli e delle indagini secondo le modalità descritte ai precedenti paragrafi, potrà essere eseguita utilizzando test diagnostici sierologici (ELISA, DTBIA, Lateral-flow) o molecolari (RT-PCR, Real-time RT-PCR, RT-LAMP).

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 9 di 14

Per i test sierologici si possono utilizzare i kit disponibili in commercio, per lo più analoghi in termini di sensibilità e specificità. Per la loro esecuzione seguire le istruzioni riportate nel manuale tecnico fornito dalla Ditta produttrice.

Per i test molecolari si suggerisce l'utilizzo di metodi validati, quali:

- RT-PCR basata sul protocollo descritto in Olmos *et al.* (1999);
- Real-time RT-PCR, con l'impiego di kit commerciali 'ready-to-use' o basata su protocolli quali quelli descritti in Saponari *et al.* (2008) o Bertolini *et al.* (2008);
- RT-LAMP basata sul protocollo descritto in Wang *et al.* (2013).

Per l'estrazione dell'acido nucleico totale (TNA) dai tessuti della pianta, su cui eseguire i test molecolari finalizzati alla diagnosi e alla identificazione degli isolati di CTV, si suggerisce l'utilizzo del metodo basato sull'impiego del CTAB, così come descritto in Saponari *et al.*, 2013.

E', comunque, possibile l'utilizzo di kit di estrazione dell'RNA totale disponibili in commercio, seguendo la procedura descritta nel manuale del produttore

7.2 Identificazione degli isolati di CTV

In caso di ritrovamento di CTV in campioni provenienti dai controlli eseguiti all'interno di fonti di approvvigionamento di materiale di moltiplicazione e nei vivai e nel corso dell'attività di indagine svolte in agrumeti commerciali o comunque nel territorio, si deve procedere con l'identificazione del tipo di isolato al fine di rilevare l'eventuale presenza di isolati di CTV non-EU.

A tal fine, vengono di seguito descritte tre procedure operative alternative, da adottare in funzione delle competenze interne al laboratorio e della dotazione di specifiche strumentazioni.

NOTA

Non esistono ad oggi metodi molecolari in grado di identificare in maniera specifica gli isolati di CTV che inducono SP su arancio dolce. L'unica possibilità per accertare questa proprietà dell'isolato virale è legata alla esecuzione di un saggio biologico. Attraverso questo saggio, la capacità di indurre SP su arancio dolce è stata verificata in alcuni isolati con genotipo VT e T3 identificati nel territorio dell'Unione ma mai associata alla presenza di sintomi visibili in campo.

*Sulla base di quanto riportato dall'EFSA, sono da considerarsi non-UE e, pertanto, soggetti a eradicazione, gli isolati di CTV in grado di indurre sintomi di SP su arancio dolce **in campo**. In accordo con tale indicazione, nelle procedure operative di seguito descritte non è stato inserito il saggio biologico, ritenendo la presenza/assenza di sintomi di SP in campo, criterio discriminante necessario e sufficiente. Tuttavia, considerato il periodo di latenza che può intercorrere tra l'infezione in atto e la comparsa del sintomo (soprattutto nel caso di campioni da vivaio) e l'elevato grado di pericolosità dei ceppi SP, **in caso di ritrovamento di isolati severi riferibili ai genotipi VT e T3 l'esecuzione di un saggio biologico di conferma resta l'unico metodo diagnostico in grado di individuare in maniera univoca isolati in grado di indurre il sintomo di SP, tipico di alcuni ceppi di CTV non-EU**. In tal senso, si rimanda alle autorità competenti per territorio la decisione di eseguire o meno tale saggio, sulla base di valutazioni che tengano conto del rischio, della situazione epidemiologica regionale e degli eventuali sintomi di SP sulla pianta.*

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 10 di 14

Nota. Il parere scientifico dei partecipanti al Gruppo di lavoro resta, comunque, quello di fare il saggio biologico nella situazione sopra evidenziata.

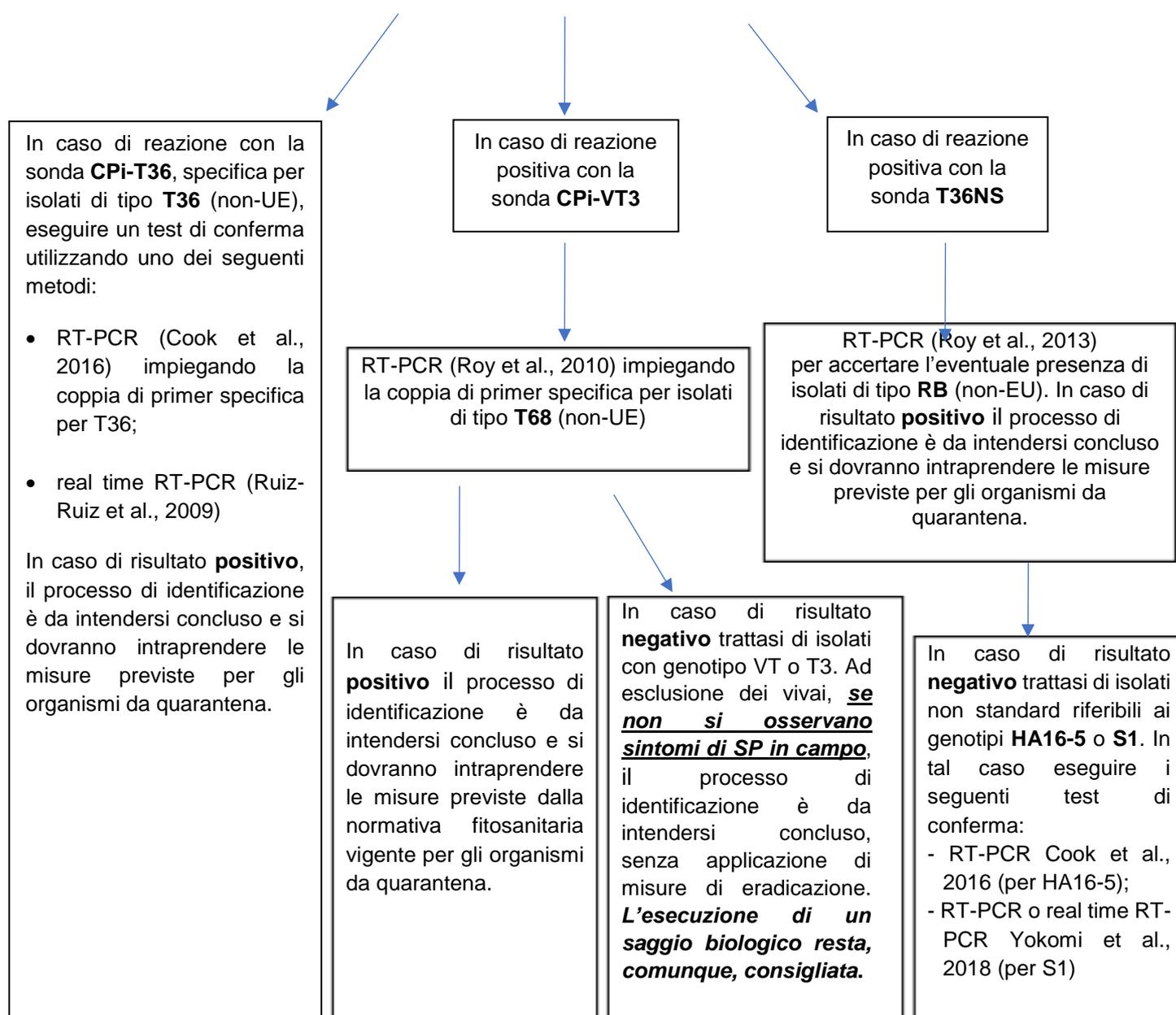
8. PROCEDURE PER L'IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI DI CTV

Procedura 1

Prevede l'esecuzione preliminare del test di Multiplex Real time RT-PCR descritto in Yokomi et al. (2010) **basato sull'impiego simultaneo, in un'unica reazione, di quattro sonde (CP25-CY5, CPi-T36, CPi-VT3, T36NS) che consentono la discriminazione di isolati con genotipo riferibile ai tipi T30, T36, T3-VT e di isolati non standard (NS) fra cui ricadono gli isolati RB, S1 e HA16-5.**

Nota: la sonda **CP25-CY5** è universale e, pertanto, reagisce con tutti gli isolati di CTV, indipendentemente dal genotipo di appartenenza; solo nel caso di reazione unica con questa sonda (e non con le altre tre) l'isolato è da ritenersi di tipo T30.

Multiplex real time RT-PCR (Yokomi et al., 2010)



<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 11 di 14

Procedura 2

In alternativa al test di real time RT-PCR, si può eseguire un'analisi dei marker genetici mediante test RT-PCR (Hilf et al., 2005) che consente di discriminare isolati blandi (genotipo T30) da isolati aggressivi di tipo T36 (non-EU), T3 e VT. In base ai risultati del test, procedere come segue.

A. In presenza di isolati con genotipo **T36** (in combinazione singola o mista ai genotipi T3, VT e/o T30) eseguire un test di conferma utilizzando il seguente metodo:

- RT-PCR (Cook et al., 2016) impiegando la coppia di primer specifica per T36;

In caso di risultato positivo il processo di identificazione è da intendersi concluso e si dovranno intraprendere le misure di eradicazione previste dalla normativa fitosanitaria vigente per gli organismi da quarantena;

B. in presenza di isolati con genotipo **T3** o **VT** (in combinazione singola o mista al genotipo T30) eseguire il test di RT-PCR (Roy et al., 2010) per escludere l'eventuale presenza di isolati di tipo T68 (non-UE). Ad esclusione dei vivai, in caso di risultato negativo ed ***in assenza di sintomi di SP in campo***, il processo di identificazione è da intendersi concluso, senza applicazione di misure di eradicazione. ***L'esecuzione di un saggio biologico resta, comunque, consigliata.***

C. in presenza di isolati con genotipo **T30** o con genotipo non assegnato eseguire il test di RT-PCR (Roy et al., 2013) per escludere l'eventuale presenza di isolati di tipo RB (non-UE).

In caso di risultato positivo il processo di identificazione è da intendersi concluso e si dovranno intraprendere le misure di eradicazione previste dalla normativa fitosanitaria vigente per gli organismi da quarantena

In caso di risultato negativo potrebbe trattarsi di isolati non standard riferibili ai genotipi HA16-5 o S1. In tal caso eseguire i seguenti test di conferma:

- RT-PCR Cook et al., 2016 (per HA16-5);
- RT-PCR o real time RT-PCR Yokomi et al., 2018 (per S1)

Procedura 3

Si basa sull'esecuzione del test di multiplex RT-PCR descritto in Roy et al., 2010 che prevede l'impiego di sei coppie di primers di cui una, generica in grado di amplificare tutti gli isolati di CTV e cinque, genotipo-specifiche in grado di reagire con isolati appartenenti ai gruppi filogenetici rappresentati, rispettivamente, dai genotipi VT, T3, T30, T36, B165 (T68).

Nota:

Per la coppia di primer specifica per il genotipo T36 è nota la possibilità di una reazione crociata con alcuni isolati riferibili al genotipo RB. Pertanto, in caso di positività con questa coppia di primer si raccomanda di confermare il risultato eseguendo uno dei test indicati al successivo punto C.

Sulla base del risultato del test di multiplex RT-PCR, procedere come di seguito descritto:

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 12 di 14

- A. in caso di risultato positivo soltanto con la coppia di primer CTV-generica eseguire il test di RT-PCR (Roy et al., 2013) per accertare l'eventuale presenza di isolati di tipo RB.
 In caso di risultato positivo il processo di identificazione è da intendersi concluso e si dovranno intraprendere le misure di eradicazione previste dalla normativa fitosanitaria vigente per gli organismi da quarantena
- In caso di risultato negativo potrebbe trattarsi di isolati non standard riferibili ai genotipi HA16-5 o S1. In tal caso eseguire i seguenti test di conferma:
 - RT-PCR Cook et al., 2016 (per HA16-5);
 - RT-PCR o real time RT-PCR Yokomi et al., 2018 (per S1);
- B. ad esclusione dei vivai, in caso di risultato positivo con le coppie di primer specifiche per VT e T3 ed ***in assenza di sintomi di SP in campo***, il processo di identificazione è da intendersi concluso, senza applicazione di misure di eradicazione. ***L'esecuzione di un saggio biologico resta, comunque, consigliata.***
- C. in caso di risultato positivo con la coppia di primer specifica per T36 confermare il risultato eseguendo il test di real time RT-PCR (Yokomi et al., 2010) o il test di simplex RT-PCR (Cook et al., 2016).

Procedura 4

Prevede il sequenziamento completo del genoma virale mediante tecnologia HTS (*High-Throughput sequencing*). A questo test si dovrebbe far sempre seguire un'analisi filogenetica che includa le sequenze genomiche complete rappresentative dei gruppi filogenetici di CTV ad oggi noti (T30, T3, VT, T36, T68, RB, H16-5 e S1), al fine di una corretta attribuzione della sequenza ottenuta ad uno dei suddetti gruppi.

- A. In funzione dell'esito dell'analisi filogenetica, eseguire uno dei test richiamati nelle procedure 1, 2 e 3 per confermare il risultato ottenuto. In particolare, nel caso di isolati di CTV attribuiti sulla base del sequenziamento ai gruppi filogenetici VT e T3 eseguire un test di conferma utilizzando uno dei seguenti metodi di real time PCR: Ruiz-Ruiz et al., 2009 oppure Yokomi et al., 2010 con sonda VT3. Ad esclusione dei vivai, ***in assenza di sintomi di SP in campo***, il processo di identificazione è da intendersi concluso, senza applicazione di misure di eradicazione. ***L'esecuzione di un saggio biologico resta, comunque, consigliata.***

Nota:

Qualora le procedure di identificazioni sopra descritte, portino a rilevare la presenza di qualche ceppo afferente ai genotipi non-EU occorre eseguire un'indagine in campo intorno alla positività per poter procedere agli adempimenti di legge.

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 13 di 14

9. **BIBLIOGRAFIA**

- Ballester-Olmos JF, Pina JA, Carbonell E, Moreno P, Hermoso de Mendoza A, Cambra M and Navarro L (1993). Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology* 42: 219– 229.
- Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, de Luis A, Vidal A, E, Pérez-Panadés J & Cambra M (2008). Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 120: 177–188.
- Cook, G., van Vuuren, S.P., Breytenbach, J.H.J., Burger, J.T. and Maree, H.J. (2016), Expanded Strain-Specific RT-PCR Assay for Differential Detection of Currently Known Citrus Tristeza Virus Strains: A Useful Screening Tool. *J Phytopathol*, 164: 847-851. <https://doi.org/10.1111/jph.124541873>.
- EFSA PLH (EFSA Panel on Plant Health), Jeger M, Bragard C, Caffier D, Dehnen-Schmutz K, Gilioli G, Gregoire J-C, Jaques Miret JA, MacLeod A, Navajas Navarro M, Niere B, Parnell S, Potting R, Rafoss T, Rossi V, Urek G, Van Bruggen A, Van der Werf W, West J, Chatzivassiliou E, Winter S, Catara A, Duran-Vila N, Hollo G & Candresse T, 2017. Scientific Opinion on the pest categorisation of Citrus tristeza virus (non-European isolates). *EFSA Journal* 2017; 15(10): 5031, 29 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5031>
- Garnsey S, Civerolo E, Gumpf D, Paul C, Hilf M, Lee R, Brlansky R, Yokomi R & Hartung J (2005). Biological Characterization of an International Collection of Citrus tristeza virus (CTV) Isolates. *Proceeding Conference of the International Organization of Citrus Virology*, 16. <https://doi.org/10.5070/C53nj1r1gt>
- Hilf ME, Mavrodieva VA, Garnsey SM (2005). Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology*, 95:909–917.
- 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.
- Roistacher CN (1991). *Graft-transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis*. FAO, Rome (IT).
- Roy A, Ananthakrishnan G, Hartung JS & Brlansky RH (2010). Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of Citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 100 (10), 1077-88.
- Roy A, Choudhary N, Hartung JS, Brlansky RH (2013). The prevalence of the Citrus tristeza virus trifoliolate resistance breaking genotype among Puerto Rican isolates. *Plant Dis* 97:1227–1234.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, Ambrós S (2009). Discrimination between mild and severe Citrus tristeza virus isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology*. 2009 Mar;99(3):307-15. doi: 10.1094/PHYTO-99-3-0307.
- Saponari M, Giampetruzzi A, Selvaraj V, Maheshwari Y, Yokomi R. (2019). Identification and Characterization of Resistance-Breaking (RB) Isolates of Citrus tristeza virus. In "Citrus Tristeza Virus, Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology* (Catara, Antonino F., Bar-Joseph, Moshe, Licciardello, Grazia, Eds.), Springer Protocols. ISBN 978-1-4939-9558-5. pp 105-126

<i>Servizio fitosanitario nazionale</i>	
Documento tecnico ufficiale n.28	Linee guida
Indicazioni applicative per le modalità di campionamento, la diagnosi e l'identificazione di isolati di CTV non europei ed europei	Pag. 14 di 14

Saponari M, Loconsole G, Liao HH, Jiang B, Savino V, Yokomi RK (2013). Validation of high-throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *J Virol Methods*. 2013 Nov;193(2):478-86. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.07.002. Epub 2013 Jul 23. PMID: 2389

Saponari M, Manjunath K & Yokomi RK (2008). Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription PCR (TaqMan). *Virology Methods* 147(1), 43-53.

Wang Y, Zhou Y, Li Z, Su H, Huang A, Tang K & Zhou C (2013). A RT-LAMP assay for detection of Citrus tristeza virus. *Scientia Agricultura Sinica* 46, 517-524.

Yokomi R, Selvaraj V, Maheshwari Y, Chiumenti M., Saponari M, Giampetruzzi A., Weng Z., Xiong Z., Hajeri S. (2018) Molecular and biological characterization of a novel mild strain of Citrus tristeza virus in California. *Arch Virology*, 163:1795–1804.

Yokomi RK, Saponari M and Sieburth PJ (2010). Rapid Differentiation and Identification of Potential Severe Strains of Citrus tristeza virus by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Virology* 100(4):319-327.