

**DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI**

**Documento n. 49**

**SCHEDA TECNICA PER**

**INDAGINI SULL'ORGANISMO NOCIVO:**

*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith, 1898)

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 13/12/2023	11/01/2024	
1	Revisione 1	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 04/11/2024	07/01/2025	

## **Indice**

<b>Premessa</b>	<b>3</b>
<b>1. Informazioni Generali</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Tassonomia e inquadramento</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Normativa vigente</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Distribuzione geografica</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Presenza in Italia</b>	<b>5</b>
<b>2. Aspetti biologici dell'organismo</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Sintomi/segni</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)</b>	<b>10</b>
<b>3. Siti di maggiore rischio</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Aree a rischio/ Risk areas</b>	<b>10</b>
<b>4. Indagine/survey</b>	<b>11</b>
<b>4.1 Osservazione visiva</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Campionamento</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Indagine con trappole</b>	<b>17</b>
<b>5. Diagnosi</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Campione/Matrice</b>	<b>18</b>
<b>5.2 Test per l'identificazione</b>	<b>18</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>22</b>

## Premessa

La scheda tecnica di indagine per un organismo nocivo o gruppo di organismi nocivi affini riporta le informazioni sull'inquadramento tassonomico e normativo, la diffusione a livello mondiale e nazionale, gli aspetti di carattere generale sul ciclo biologico, le istruzioni su come condurre e quando rilievi visivi e campionamenti sulla base di ampie illustrazioni dei sintomi o danni causati sulle specie ospiti e, nel caso di insetti, le modalità di indagine attraverso l'uso di trappole. La scheda riporta anche le informazioni sulle metodologie diagnostiche per l'identificazione del singolo organismo nocivo o gruppo affine.

La scheda tecnica di indagine tiene conto dei **regolamenti comunitari** e/o **decreti nazionali**, dell'esperienza dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) nel controllo del territorio, degli standard internazionali (**EPPO**, ISPM etc.). La scheda è uno strumento funzionale al riconoscimento dell'organismo nocivo in dotazione al personale tecnico impegnato nell'esecuzione delle indagini (Ispettori fitosanitari, Agenti fitosanitari, Assistenti fitosanitari, Tecnici rilevatori)

La scheda tecnica di indagine viene elaborata da un gruppo di lavoro di esperti (**SFR** e **CREA-DC**) per l'organismo nocivo considerato, con l'eventuale coinvolgimento di altri esperti di Enti di Ricerca e Università. La scheda di indagine viene approvata dal **Comitato Fitosanitario Nazionale** (CFN) e revisionata periodicamente per gli aggiornamenti normativi, distribuzione geografica e procedure di indagine.

## 1. Informazioni Generali

### 1.1 Tassonomia e inquadramento

**Nome scientifico:** *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith, 1898) Mergaert et al. (1993)

**Nome comune:** Avvizzimento batterico del mais/Stewart's wilt, bacterial wilt

**Codice EPPO:** ERWIST

#### Posizione tassonomica:

Phylum: Proteobacteria (1PROBP)

Classe: Gammaproteobacteria (1GAMBC)

Ordine: Enterobacteriales (1ENTEO)

Famiglia: *Erwiniaceae* (1ERWIF)

Genere: *Pantoea* (1PNTOG)

Specie: *stewartii* (ERWIST)

#### Categorizzazione

EU: A1 Quarantine pest (Annex II part A - Reg. (UE) 2019/2072).

EPPO: List A2

## 1.2 Normativa vigente

### EUROPEA:

- **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, 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 delegato (UE) 2019/1702** della Commissione del 10 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione 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 e ss.mm.ii.;

### NAZIONALE:

- **Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19.** "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"(GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie generale n.48 del 26 febbraio 2021) e s.m.i;
- **DTU n. 67** - Procedure operative e misure fitosanitarie da adottare in caso di ritrovamento dell'organismo nocivo.

### 1.3 Distribuzione geografica

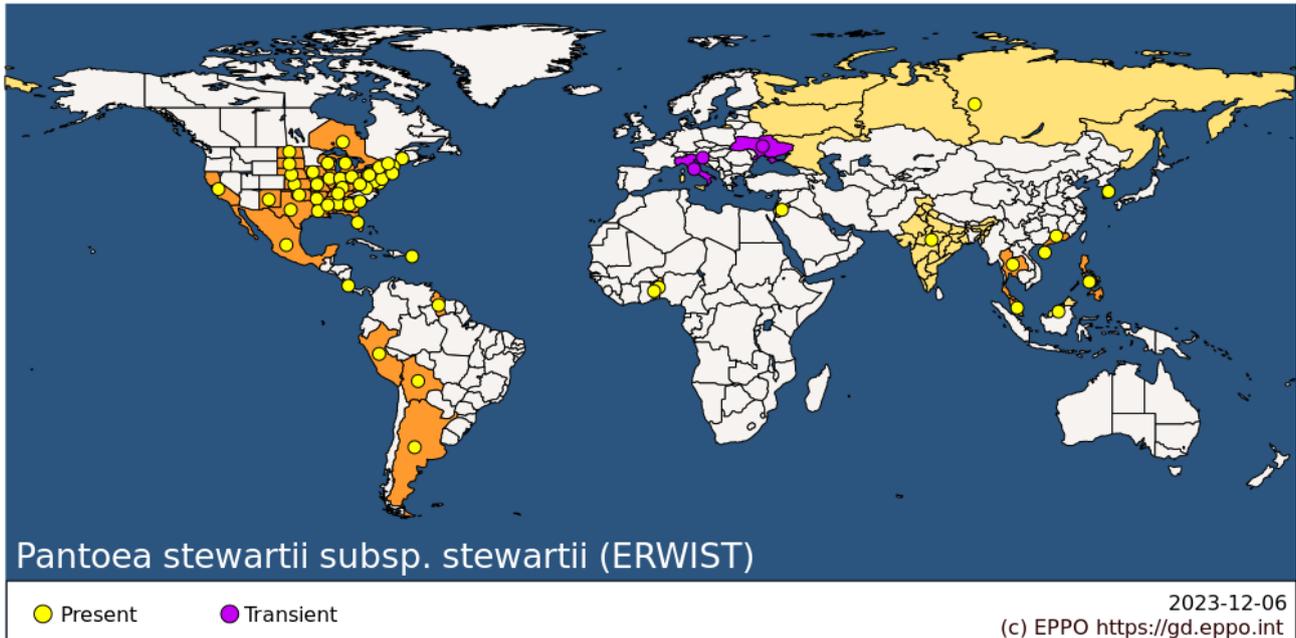
**Africa:** Benin; Togo

**America:** Argentina; Bolivia; Canada; Costa Rica; Guyana; Mexico; Perù; Porto Rico; USA.

**Asia:** Cina; India; Giordania; Filippine; Malaysia; Repubblica di Corea; Thailandia;

**Europa:** Russia

**Oceania:** assente



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

#### 1.3.1 Presenza in Italia:

Pest status dichiarato dal NPPO: Transiente (2023-09)

## 2. Aspetti biologici dell'organismo

### 2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo e del vettore

*P. stewartii* subsp. *stewartii* è un batterio gram-negativo (Fig. 1), si diffonde sistemicamente nella pianta attraverso il sistema vascolare. Si può trovare su/in semi di mais; i semi infetti non presentano sintomi caratteristici. La malattia causata da questo batterio può presentarsi nelle diverse fasi di crescita della pianta:

i) post emergenza; ii) fase di accrescimento della pianta; iii) fase tardiva con presenza della spiga.

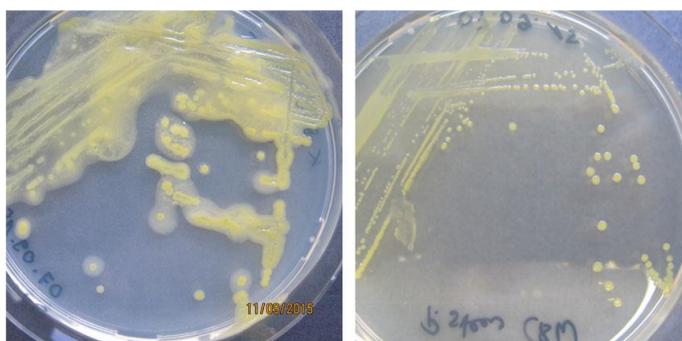


Figura 1. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Su King's (piastra di destra) e NBY (piastra di sinistra) (morfologia tipica del patogeno) (Müller P.; <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIST/photos>).

Il patogeno sopravvive nei semi e viene veicolato dal vettore da foglia a foglia. Le larve di diversi insetti consentono la sopravvivenza del patogeno durante i mesi invernali. Il batterio può sopravvivere nel suolo, nei residui colturali del mais e nel letame. Le condizioni ottimali per il patogeno sono temperature intorno ai 30 °C in presenza di notevole umidità.

#### Vettore

Il batterio si trasmette tramite vettori, di cui il principale è il coleottero crisomelide *Chaetocnema pulicaria* attualmente non presente in Italia ed in Europa (Fig. 2);



Figura 2. *Chaetocnema pulicaria* (Quinn M.; <https://bugguide.net/node/view/353196>)

*Chaetocnema* Stephens 1831 è uno dei pochi generi di coleotteri alticini cosmopoliti. Le specie di *Chaetocnema* hanno caratteri molto simili e non sono facilmente distinguibili morfologicamente da parte di non esperti. Gli adulti del genere si presentano come piccoli coleotteri neri lucidi, lunghi circa 0,16 cm, con le zampe posteriori caratterizzate da femori ingrossati. Se disturbati, gli adulti sono capaci di saltare per lunghe distanze.

*Chaetocnema pulicaria* Melsheimer è riconosciuto come il principale vettore di *P. stewartii* subsp. *stewartii* negli USA (Esker and Nutter 2002). Ad oggi la specie non è presente in Europa. Facendo riferimento alla Fauna Europea ([www.fauna-eu.org](http://www.fauna-eu.org)), sono 39 le specie appartenenti al genere *Chaetocnema* presenti in EU, ma di queste solo *C. conducta* si trova elencato tra le piante ospiti del mais (Kostantinov et al., 2011). Fra le altre specie vettrici di *P. stewartii* subsp. *stewartii*, accertate nel Nord America, solo il Dittero Anthomyiidae *Delia platura* (Meigen, 1826) risulta viceversa presente sul territorio europeo.

Tutte le specie di *Chaetocnema* *palaearcticum* condividono le seguenti due importanti caratteristiche diagnostiche (Fig. 3):

- primo e secondo ventrite fusi
- tibie medie e posteriori con dente ottuso oltre la parte mediale, seguito da un rientro avente una fila marginale di sete rigide.

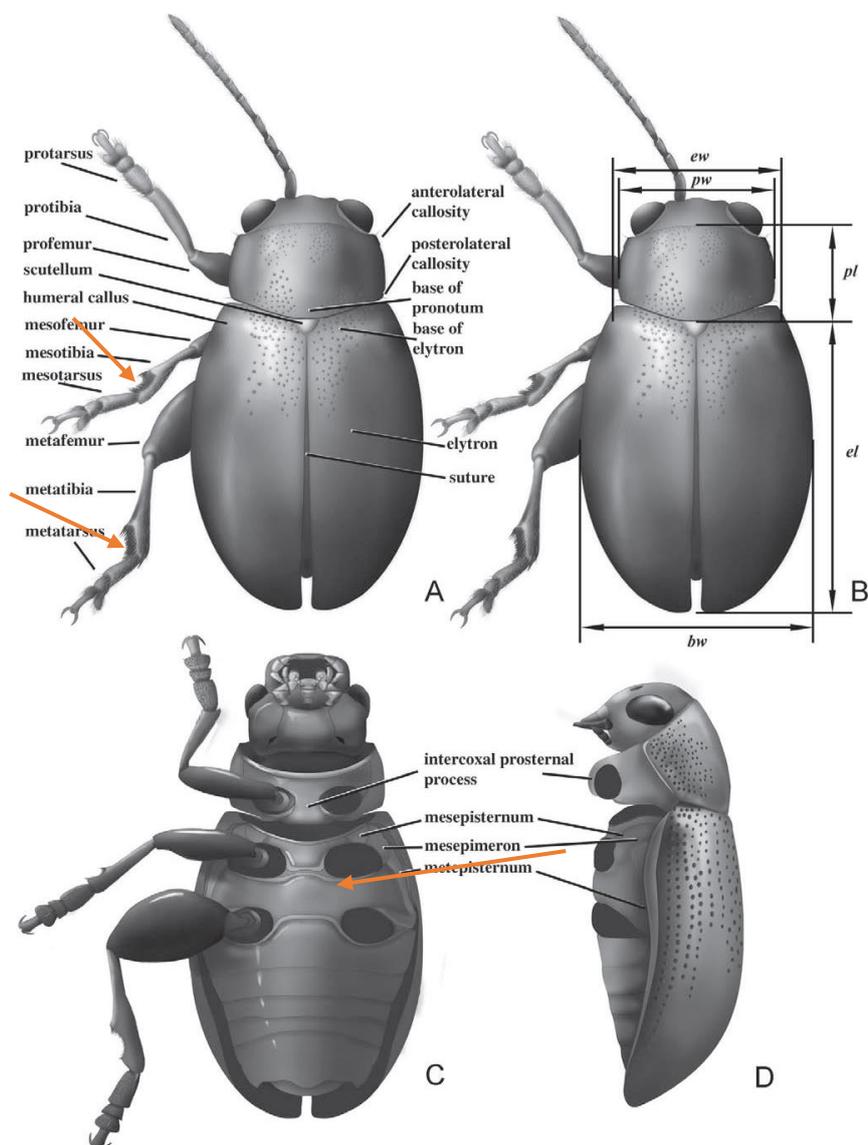


Figura 3. Morfologia e misure di *Chaetocnema*; A, habitus, dorsale; B, habitus, dorsale, misurazioni; C, habitus, ventrale; D, habitus laterale. Abbreviazioni: bw, body width; el, lunghezza elitre; ew, larghezza elitre; pl, lunghezza del pronoto; pw, larghezza del pronoto (ex Kostantinov et al., 2011)

Questi tratti distinguono *Chaetocnema* da tutti gli altri generi di coleotteri Alticini della regione paleartica (Konstantinov e Vandenberg 1996).

D'altra parte, tutte le specie di *Chaetocnema* sono molto simili per cui è importante ricorrere anche ad analisi tipo molecolare. *Chaetocnema pulicaria* sverna da adulto, nel terreno e nei detriti, sui bordi delle strade o ai margini dei boschi. Diventa attivo all'inizio della primavera quando le temperature risalgono a 18-20 °C, anche se possono essere visti nutrirsi sulle erbe nelle giornate calde durante l'inverno. Il mais è l'ospite principale, ma gli adulti e le larve si nutrono anche di una serie di ospiti secondari come grano, orzo, avena. In primavera, gli adulti si nutrono di mais e altri ospiti, si accoppiano e depongono le uova sulle foglie delle piante, nel terreno o alla base delle piante vicino

a steli e radici sotterranee. Non si sa molto delle larve, ma queste si nutrono delle radici delle piante erbacee per circa due settimane prima di impuparsi. Il tempo di una generazione è di circa un mese negli USA. Tuttavia, temperature più elevate comportano tassi di sviluppo più rapidi. Le larve completano il loro sviluppo e originano le pupe, quindi gli adulti emergono a giugno. Gli adulti continuano a nutrirsi delle piante ospiti disponibili e depongono le uova per un'altra generazione. Gli adulti di seconda generazione compaiono all'inizio di agosto e si nutrono fino alla fine dell'autunno prima di svernare. Le generazioni estive possono sovrapporsi e in alcune circostanze, nelle aree più meridionali possono iniziare una terza generazione. Poco si sa sui danni causati dalle larve, ma il danno da parte degli adulti è molto evidente. L'adulto erode le piante di mais rimuovendo il tessuto fogliare e trasmettendo batteri patogeni. La lesione degli adulti appare sotto forma di graffi sulle superfici superiore e inferiore della foglia (Fig. 4). Si nutrono sia dell'epidermide superiore che di quella inferiore delle foglie di mais, ma non erodono completamente la foglia. Densità elevate possono provocare la scheletrizzazione delle foglie e la morte della piantina. Le foglie delle piante gravemente danneggiate appaiono biancastre o argentee. Nei mesi di giugno e agosto, quando compaiono gli adulti appena emersi, le foglie di mais possono essere parzialmente coperte dalle loro cicatrici di alimentazione.



Figura 4. Esempio di danno da alimentazione di adulto di *Chaetocnema pulicaria*

## **2.2 Sintomi/segni**

I sintomi possono essere riassunti come segue:

Plantula: la giovane pianta può avvizzire completamente.

Foglie: striature longitudinali parallele ai fasci vascolari, prima idropiche poi clorotiche con bordo irregolare ondulato, che possono estendersi a tutta la lunghezza della foglia. Le lesioni successivamente disseccano ed imbruniscono deformando la foglia.

Infiorescenze maschili: si formano in anticipo, risultano decolorate, si deformano e spesso non fioriscono.

**Spiga:** presenta imbrunimento dei fasci vascolari, avvizzimento e annerimento delle cariossidi. Sulle brattee possono presentarsi macchie idropiche e il batterio può trasudare in goccioline giallastre nella parte interna delle brattee stesse.

**Fusto:** si osservano cavità midollari a volte associate a marciumi vicino al colletto. Effettuando una sezione trasversale si possono osservare imbrunimenti dei fasci vascolari da cui può fuoriesce un essudato viscoso di colore giallo. In queste piante i batteri si possono diffondere attraverso i vasi e raggiungere anche le cariossidi.

In genere i mais dolci e gli ibridi precoci sono più suscettibili, ma anche alcuni ibridi di mais dentato possono mostrare sintomi gravi. I sintomi causati da questo patogeno possono essere confusi con i sintomi causati da altre malattie fogliari batteriche oppure fungine che causano clorosi o imbrunimento fogliare tra cui: *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Burkholderia andropogonis*, *Setosphaeria turcica*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus carbonum*. Le piante attaccate da *P. stewartii* subsp. *stewartii* che avvizziscono rapidamente si presentano simili a quelle sofferenti per siccità, carenze nutrizionali o danni da insetti.

### **2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)**

L'ospite principale è il mais (*Zea mays*). In America attacca anche altre specie di *Poaceae* coltivate per il foraggio, di cui alcune specie possono risultare asintomatiche.

In particolare: *Agrostis gigantea*; *Coix lacryma-jobi*; *Dactylis glomerata*; *Digitaria* spp.; *Dracaena sanderiana*; *Oryza sativa*; *Panicum capillare*; *Panicum dichotomiflorum*; *Poa pratensis*; *Setaria lutescens*; *Sorghum sudanense*; *Tripsacum dactyloides*; *Triticum aestivum*.

## **3. Siti di maggiore rischio**

### **3.1 Aree a rischio/ Risk areas**

I siti di maggior rischio sono:

- Coltivazioni di mais ad uso sementiero e destinate ad altri usi,
- Punti di ingresso per semente di mais (porti, aeroporti, transiti doganali)

I siti a maggiore rischio secondo la codifica Europhyt sono:

All'aperto:

1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 2.4 piante spontanee in zone diverse dalle zone di conservazione;

Al chiuso:

3.2 sito privato, diverso da una serra; 3.4.4 aeroporti, porti

## 4. Indagine/survey

Ciascuna regione interessata alla produzione di mais ad uso sementiero e non, e con punti di ingresso per semente di mais (porti, aeroporti, transiti doganali) deve effettuare le indagini per la ricerca di *P. stewartii* come quantificato nel DTU n. 67 "Procedure operative e misure fitosanitarie da adottare in caso di ritrovamento dell'organismo nocivo" e come di seguito descritta.

### Modalità di indagine previste

- ✓ Osservazione visiva – *Visual Inspection*
- ✓ Campionamento – *Sample Taking*
- ✓ Indagine con trappole – *Trapping*

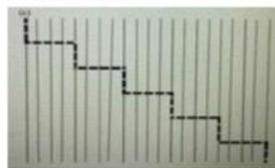
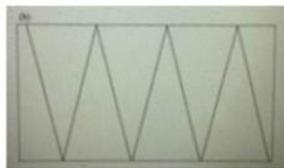
#### 4.1 Osservazione visiva

##### Aspetti generali:

In campo le ispezioni devono essere condotte preferibilmente lungo le diagonali a scalare per l'osservazione dei sintomi sospetti o in alternativa secondo il modello "passaggi equidistanti".

Effettuare la georeferenziazione dei campi ispezionati.

Il campionamento in campo può essere effettuato basandosi sui seguenti schemi:



Sito di Indagine	Cosa guardare	Periodo di osservazione	Immagini
<p><b>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</b></p> <p><b>Areali produttivi</b> (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 2.4 piante spontanee in</p>	<p>Rapido avvizzimento dei semenzali</p>		<div style="text-align: center;">  <p>(Pataky, J. 2003)</p> </div>

zone diverse dalle zone di conservazione) (vedi sezione 3.1)

Controlli in campo:  
allo stadio fenologico di 5° - 6° foglia, altezza massima della pianta 50-70 cm.



(Pataky, J. 2003)



(Pataky, J. 2003)

Lesioni parallele alla venatura fogliare di colore giallo/verde pallido con margini ondulati



(J.K. Pataky, <https://gd.eppo.int/taxon/ERWIST/photos>)

Presenza di  
cavità scure  
nel midollo  
alla base  
delle piante



(Pataky, J. 2003)

**Tutti i siti  
ritenuti a  
maggior  
rischio, con  
particolare  
attenzione a:**

**Areali  
produttivi** (1.1  
campo (a  
seminativo, a  
pascolo); 2.4  
piante  
spontanee in  
zone diverse  
dalle zone di  
conservazione;  
3.2 sito privato,  
diverso da una  
serra) (vedi  
sezione 3.1)

*Chaetocnema  
pulicaria*

Effettuare un  
programma di  
monitoraggio,  
mediante  
sfalcio



*Chaetocnema pulicaria*

(Quinn M.; <https://bugguide.net/node/view/353196>)

## 4.2 Campionamento

### Aspetti generali:

Sito di Indagine	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare
<p><b>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</b></p> <p><b>Areali produttivi</b>                      (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 2.4 piante spontanee in zone diverse dalle zone di conservazione) (vedi sezione 3.1)</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Campioni sintomatici</u></b></p> <p>In presenza di sintomi, prelevare l'intera pianta</p>	<p style="text-align: center;"><b>Controlli in campo:                      allo stadio fenologico di 5° - 6° foglia, altezza massima della pianta 50-70 cm,</b></p>	<p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non schiacciare le piante campionate.</p> <p>Tenere i campioni lontano da fonti di calore.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio conservare in frigorifero a 4°C</p>
<p><b>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio</b>                      (vedi sezione 3.1)</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Semi di mais:</u></b></p> <p>aziende sementiere/punti di entrata delle dogane aeree e portuali campionando ed analizzando con i metodi diagnostici secondo il PM 7/60 (rev.2006).</p>		<p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate. Per le modalità operative al campionamento si rimanda alla consultazione dei Metodi ufficiali analisi sementi del DM 22/12/1992 - All. 1 - Art. 1 (parte 1) Campionamento; all'ISTA (International Seed Testing Association) e all'International Rules for Seed Testing.</p>

**Vettori**

Il campionamento del vettore *Chaetocnema pulicaria* e cattura di specie di artropodofauna che possano avere interazioni trofiche dirette o indirette con la pianta ospite del batterio (*Z. mays*).

Per la raccolta degli insetti presenti nelle vicinanze dei campi di mais utilizzare il metodo del retino da sfalcio secondo un procedimento standardizzato.

Retino entomologico di dimensioni cm 30 X 100 e rete di tulle (a maglie sufficientemente fitte da trattenere gli insetti più piccoli come afidi e cicaline).

Procedere nelle capezzagne circostanti i campi, evitando le ore più calde della giornata.

Effettuare 10 sfalci continuativi tra la vegetazione a circa 50 cm dal suolo.

Ogni serie di sfalci deve essere ripetuta per 3 volte a distanza di qualche metro a coprire una

**Si prevede di effettuare un controllo per stagione/campo, indicativamente tra fine maggio e luglio compatibilmente con il ciclo biologico del vettore e della coltura**

Per l'identificazione morfologica in laboratorio degli eventuali insetti vettori e successiva ricerca di *P. stewartii* subsp. *stewartii* in tale matrice:

porre gli individui in tubi da 50 ml (tipo Falcon) a cui si aggiunge etanolo al 70% in quantità sufficiente ad annegare gli insetti raccolti.

Tutti i campioni devono riportare un ID univoco e altri dati essenziali del prelievo.

**Tutti i siti ritenuti a maggior rischio**  
(vedi sezione 3.1)

distanza di circa 100 metri  
lineari

### **4.3 Indagine con trappole**

**Aspetti generali:** non applicabile

<b>Sito di indagine</b>	<b>Tipologia di trappola</b>	<b>Posizionamento trappola</b>	<b>Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli</b>	<b>Immagini</b>

## 5. Diagnosi

**Metodi ufficiali riconosciuti internazionalmente per la diagnosi di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* da pianta:**

- Standard EPPO PM 7/60 (2),  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12303>

**Metodo ufficiale del SFN per la diagnosi di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* da semi:**

- Documento tecnico ufficiale del Servizio Fitosanitario Nazionale N° 27 – Metodi diagnostici: “Protocollo diagnostico per l’identificazione di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*”  
[https://www.protezionedellepiante.it/wp-content/uploads/2022/12/doctec-27\\_met-p.stewarti-sbp-stewartifirmato.pdf](https://www.protezionedellepiante.it/wp-content/uploads/2022/12/doctec-27_met-p.stewarti-sbp-stewartifirmato.pdf)

### 5.1 Campione/Matrice

Il campione può essere costituito dal vettore (insetto) o da due tipologie di matrici vegetali diverse,

- intera pianta (sintomatica)
- semente (campione costituito da almeno 400 semi per ogni lotto).

#### 5.1.1 Estrazione da campioni da pianta

Per l’ottenimento di un concentrato batterico da utilizzare successivamente sia per l’isolamento del batterio sia per l’estrazione del suo acido nucleico seguire quanto riportato nel paragrafo 3.4 dello Standard EPPO PM 7/60 (2).

Isolamento del batterio su terreno selettivo: seguire paragrafo 3.5.3 dello standard EPPO PM 7/60 (2).

Estrazione del DNA totale dal concentrato batterico: seguire una procedura validata all’interno del laboratorio favorendo ove possibile l’utilizzo di kit di estrazione commerciali.

#### 5.1.2 Estrazione da seme

Per l’ottenimento dell’estratto di concentrato batterico da semi eseguire le fasi riportate nel paragrafo 3.4 dello standard EPPO PM 7/60 (2). Nel caso di semi trattati con qualsiasi prodotto fitosanitario, per rimuovere il prodotto dalla superficie questi devono essere preventivamente lavati con acqua fino a quando quest’ultima non risulti chiara (in questi casi, il rapporto di prova dovrà menzionare che i semi analizzati erano trattati).

Isolamento del batterio su terreno selettivo: l’isolamento va eseguito immediatamente dopo la macerazione poiché il numero delle cellule vitali del patogeno decresce velocemente. Per i dettagli della metodica consultare il paragrafo 3.5.3 dello standard EPPO PM 7/60 (2).

Estrazione del DNA totale dal concentrato batterico: seguire uno dei cinque metodi di estrazione riportati nel paragrafo 2.2 del DTU 27.

#### 5.1.3 Estrazione da insetto vettore:

Gli insetti catturati e conservati come riportato nel paragrafo 4.2 vengono separati ad occhio nudo o con l'aiuto di un binocolare nelle famiglie, e classificate mediante opportune chiavi dicotomiche specifiche legate al genere dell'insetto stesso o mediante DNA barcoding. I campioni così classificati possono essere utilizzati per estrazione del DNA del batterio o conservati in una provetta etichettata contenente etanolo assoluto.

Estrazione del DNA totale da insetto vettore: seguire una procedura validata all'interno del laboratorio favorendo ove possibile l'utilizzo di kit di estrazione commerciali.

#### **5.2 Test di screening (detection)**

I test che possono essere effettuati per lo screening dei campioni sono quelli riportati nel:

- paragrafo 3.5 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- DTU del Servizio Fitosanitario Nazionale N° 27 – Metodi diagnostici: “Protocollo diagnostico per l'identificazione di *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* da effettuare per l'analisi di campioni vegetali asintomatici costituiti da semi di mais;

Nel caso in cui un campione risulti positivo con i test di screening si procede con l'identificazione.

#### **5.3 Test per l'identificazione (Tipologie diagnostiche di riferimento da utilizzare per la relazione annuale Europhyt):**

- *IF Test* paragrafo 4.1.1.1 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- *ELISA* paragrafo 4.1.1.2 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- *PCR* paragrafo 4.1.2.1 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- *Real-time – PCR* paragrafo 4.1.2.1 dello standard EPPO PM 7/60 (2) e DTU 27 per i semi
- *Sequencing*: paragrafo 4.1.2.2 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- *Biochemical analysis*: paragrafo 4.1.3 e 4.2 4.1.2.1 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- *Pathogenicity assessment*: paragrafo 4.3 dello standard EPPO PM 7/60 (2).
- *Morphological Identification* (per il solo vettore vedi paragrafo 5.1.3)

## Bibliografia

- Alamy.de/stockfoto-schaden-an-mais-oder-mais-ernte-verursacht-durch-stewarts-willst-erwinia-stewartii-usa-39443737.html
- Barioni E, Manzali D, Alessandrini A, Gozzi R (2017) Redazione del verbale d'ispezione e mappatura dei campi ispezionati.
- Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Vancanneyt M, Swings J & Coutinho T (2008). Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 447–460.
- Coplin DL & Majerczak DR (2002). Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. *Plant Disease* 86, 304–311
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Jeger M, Bragard C, Candresse T, Chatzivassiliou E, 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, Winter S, Manceau C, Pautasso M and Caffier D, 2018b. Scientific opinion on the pest categorisation of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *EFSA Journal* 2018;16(7):5356, 27 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5356>
- EPPO/CABI (1997). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, pp. 1031–1035. CAB International, Wallingford (GB).
- EPPO (2006). EPPO Diagnostic Standard PM 7/77 (1). Documentation and reporting on a diagnosis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36, 459–460.
- EPPO (2009). EPPO Diagnostic Standard PM 7/97 (1). Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 39, 413–416.
- EPPO (2010a). EPPO Diagnostic Standard PM 7/100. Rep-PCR tests for identification of bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 40, 365–368.
- EPPO (2010b). EPPO Diagnostic Standard PM 7/101 (1). ELISA tests for plant pathogenic bacteria. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 40, 369–372.
- EPPO (2016). EPPO Global database <https://gd.eppo.int/> last accessed on 07 June 2016.
- EPPO Bulletin (2016). PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. 46 (2), 226–236
- Esker PD and Nutter FW, 2002. Assessing the risk of Stewart's disease of corn through improved knowledge of the role of the corn flea beetle vector. *Phytopathology*, 92, 668–670. *Fauna Europaea*.
- Gehring, I., Wensing, A., Gernold, M., Wiedemann, W., Coplin, D.L., Geider, K., 2014. Molecular differentiation of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* from subspecies *stewartii* and identification of new isolates from maize seeds. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1553–1562. <https://doi.org/10.1111/jam.12467>

- Euphresco (2010). Ring test on diagnostic methods for *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*, maize bacterial blight (PANTOEA) unpublished report.
- Janse JD (1991). Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 335–345.
- Konstantinov AS, Vandenberg NJ (1996) Handbook of Palearctic flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). *Contributions on Entomology, International* 1(3): 235–439.
- Konstantinov AS, Baselga A, Grebennikov VV, Prena J and Lingafelter SW, 2011. Revision of the Palearctic *Chaetochema* species (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae: Alticini). *Pensoft Series Faunistica No 95, 363 pp.* Available online: [https://doc.rero.ch/record/29321/files/Pensoft\\_Series\\_faunistica\\_95.pdf](https://doc.rero.ch/record/29321/files/Pensoft_Series_faunistica_95.pdf)
- King ED, Ward MK & Raney DE (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301–307.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT & de Bruijn FJ (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2286–2295.
- Mergaert J, Verdonck L & Kersters K (1993). Transfer of *Erwinia ananas* and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. As *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. & *Pantoea stewartia* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 43, 162–173.
- Pal, N., Block, C.C., Gardner, C.A.C., 2019. A real-time PCR differentiating *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* from *P. stewartii* subsp. *indologenes* in corn seed. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0936-RE>
- Pataky J & Ikin R (2003). The risk of introducing *Erwinia stewartii* in maize seed. Pest risk analysis, prepared for The International Seed Federation, Chemin du Reposoir 7 1260 Nyon, Switzerland
- Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2018 Edition. Document OGM17-06
- Schaad NW, Jones JB & Chun W (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edn. APS Press, St Paul (US).
- Scortichini M (1995). *Malattie batteriche delle colture agrarie*. Edagricole.
- Stead DE, Sellwood JE, Wilson J & Viney I (1992). Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid accurate identification of plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 315–321
- Tambong JT, Mwange KN, Bergeron M, Ding T, Mandy F, Reid LM et al. (2008). Rapid detection and identification of the bacterium *Pantoea stewartii* in maize by TaqMan\_ real-time PCR assay targeting the cpsD gene. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1525–1537.
- Thwaites et al. (FERA protocol, EUPH05 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* Final Report 2009).

Wensing, A., Zimmermann, S., Geider, K., 2010. Identification of the Corn Pathogen *Pantoea stewartii* by Mass Spectrometry of Whole-Cell Extracts and Its Detection with Novel PCR Primers. Appl Environ Microbiol 76, 6248–6256. <https://doi.org/10.1128/AEM.01032-10>

Zhang Y & Geider K (1997). Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 63, 4421–4426.ong et al. (2008).

[www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/StewartsWilt.aspx](http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/StewartsWilt.aspx)

[www.plantwise.org](http://www.plantwise.org)

[www.worldseed.org](http://www.worldseed.org)