

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI
Documento n. 39

SCHEMA TECNICA PER
INDAGINI SULL'ORGANISMO NOCIVO:
Xylella fastidiosa

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 21-22/06/2023	13/07/2023	
1	Revisione 1	Tavolo permanente della Rete Nazionale	CFN 9-10/12/2024	07/01/2025	

Indice

Premessa	3
1. Informazioni Generali	3
1.1 Tassonomia e inquadramento	3
1.2 Normativa vigente	4
1.3 Distribuzione geografica	5
1.3.1 Presenza in Italia	6
2. Aspetti biologici dell'organismo	7
2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo	7
2.2 Sintomi/segni	9
2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)	14
3. Siti di maggiore rischio	14
3.1 Aree a rischio/ Risk areas	14
4. Indagine/survey	16
4.1 Osservazione visiva	16
4.2 Campionamento	17
4.3 Indagine con trappole	18
5. Diagnosi	20
5.1 Campione/Matrice	20
5.1.1 Matrice vegetale	20
5.1.2 Vettori	20
5.1.3 Estrazione	21
5.2 Test di screening (Rilevamento)	21
5.2.1 Test di screening previsti all'interno del monitoraggio cofinanziato	21
5.3 Test per l'identificazione delle sottospecie di <i>Xylella fastidiosa</i> (All 4 del regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 Parte B)	21
5.4 Note	21
Bibliografia	23

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

Nomi comuni: *Xylella fastidiosa* (Xylella)

Codice EPPO: XYLEFA (*Xylella fastidiosa*)

Posizione tassonomica:

Phylum: Proteobacteria (1PROBP) Classe: Gammaproteobacteria (1GAMBC) Ordine:

Lysobacterales (1LYSOO) Famiglia: Lysobacteraceae (1LYSOF) Genere: *Xylella* (1XYLEG)

Specie: *Xylella fastidiosa* (XYLEFA)

Categorizzazione

EU: Quarantine priority pest (Annex IIB - Reg. (UE) 2019/1702). EPPO: 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.;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201** della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) che abroga la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789 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.;

- **Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 24 gennaio 2022.** Adozione del Piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well *et al.*). (GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie Generale n. 64 del 17 marzo 2022;
- **Ordinanza n. 3** (prot. MASAF n. 273672 del 26/05/2023), relativa alla Definizione aree indenni dall'organismo nocivo *Xylella fastidiosa* nel territorio della Repubblica italiana.

1.3 Distribuzione geografica

Origini:

Africa: assente

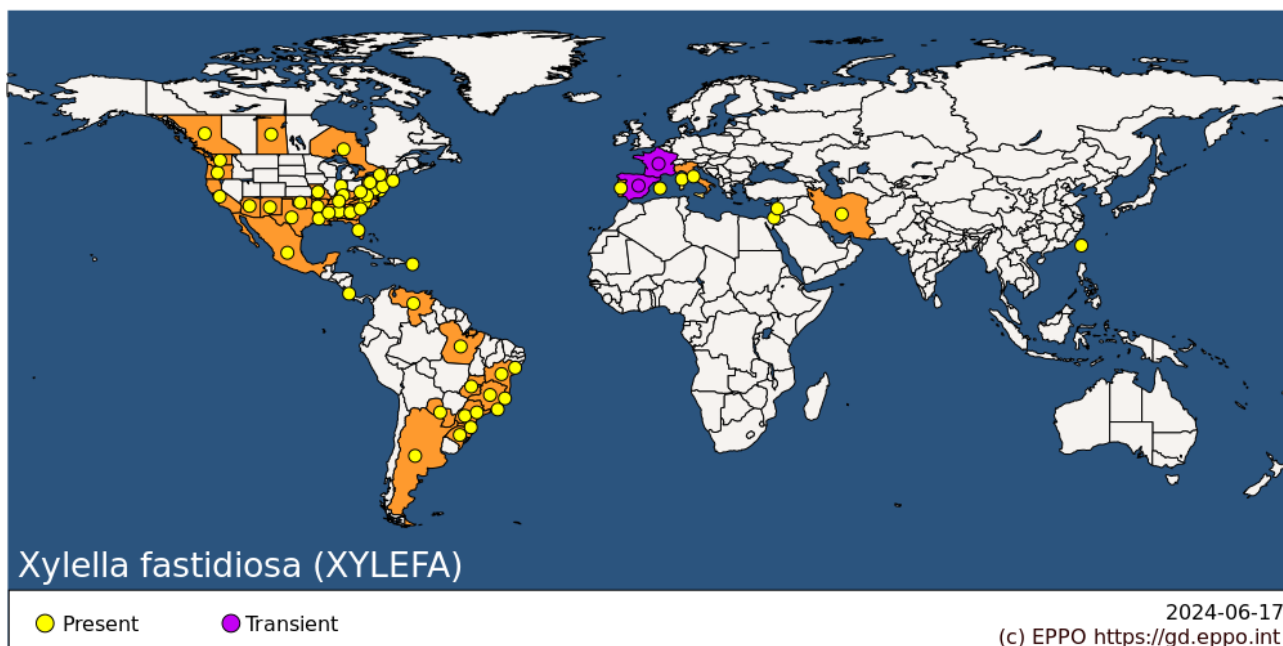
America: Argentina, Brasile, Canada, Costa Rica, Messico, Paraguay, Puerto Rico, USA, Venezuela.

Asia: Iran, Israele, Libano, Taiwan.

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

Oceania: assente

Mappa EPPO/CABI



1.3.1 Presenza in Italia:

- dal 2013 in Puglia principalmente su olivo, ma anche in altre specie vegetali fra le quali *Nerium oleander*, *Prunus dulcis*, *Prunus avium*, *Polygala myrtifolia*, *Rhamnus alaternus*, *Westringia fruticosa*, *Acacia saligna*, *Spartium junceum*, *Cistus* sp., *Salvia rosmarinus*, *Lavandula* sp., *Myrtus communis*;
- dal 2018 In Toscana su varie specie vegetali fra le quali *Polygala myrtifolia*, *Prunus dulcis*, *Rhamnus alaternus*, *Spartium junceum*, *Calicotome villosa*, *Laurus nobilis*;
- 2021 nel Lazio (Canino, VT) su *Prunus dulcis*;
- 2022 nel Lazio (Tarquinia, VT) su *Prunus dulcis* e *Spartium junceum*.
- 2024 in Puglia su *Vitis vinifera*.

2. Aspetti biologici dell'organismo

2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo

Xylella fastidiosa è un batterio gram-negativo con un ampio numero di specie vegetali ospiti (oltre 500 tra specie erbacee e legnose), alcune delle quali di grande importanza economica (vite, agrumi, piante da frutto, caffè), oltre a specie spontanee tipiche della macchia mediterranea (ginestra, alaterno, calicotome, elicriso, rosmarino, cisto, mirto, alloro, lavanda). È un batterio asporigeno che colonizza i vasi xilematici dell'ospite contribuendo, attraverso la produzione di biofilm, all'occlusione dei vasi con conseguenze che possono portare a morte la pianta. I sintomi assomigliano a quelli causati da stress idrico. Sebbene le cellule batteriche possano muoversi sistemicamente attraverso i vasi xilematici di piante sensibili infette, in alcune piante ospiti, tuttavia, la loro presenza può rimanere limitata in alcune parti della pianta (Purcell and Saunders, 1999). Il periodo di tempo tra l'inoculazione e la comparsa di sintomi (periodo di incubazione) è altamente variabile e varia da pochi mesi ad anni, a seconda del genotipo *X. fastidiosa*, la specie ospite, lo stadio fisiologico (età) della pianta e le condizioni di crescita (EFSA 2018, 2019a). D'altra parte, alcune specie vegetali potrebbero anche non esprimere alcun sintomo, in alcuni casi anche in base alle condizioni di crescita (EFSA, 2019). Il batterio è trasmesso da emittenti fitomizi (Fig.1) 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 *P. italosignus* (Cavaleri *et al.*, 2019). *P. spumarius* è presente in tutta Europa ed è una specie polifaga, con un gran numero di piante ospiti. *P. italosignus* è una specie autoctona in Italia diffusa soprattutto nelle regioni meridionali e in Sicilia. *N. campestris* è presente soprattutto in Europa occidentale e compie il proprio ciclo vitale su piante erbacee. A livello europeo altre specie su cui è posta attenzione sono *Aphrophora* spp. (Casarin *et al.*, 2022), *Draeculacephala robinsoni* (Rösch *et al.*, 2022) e *Cicadella viridis* (Bodino *et al.*, 2022). Per quest'ultima, è stato escluso il ruolo nella trasmissione di *X. fastidiosa* da olivo a olivo (Bodino *et al.*, 2022).

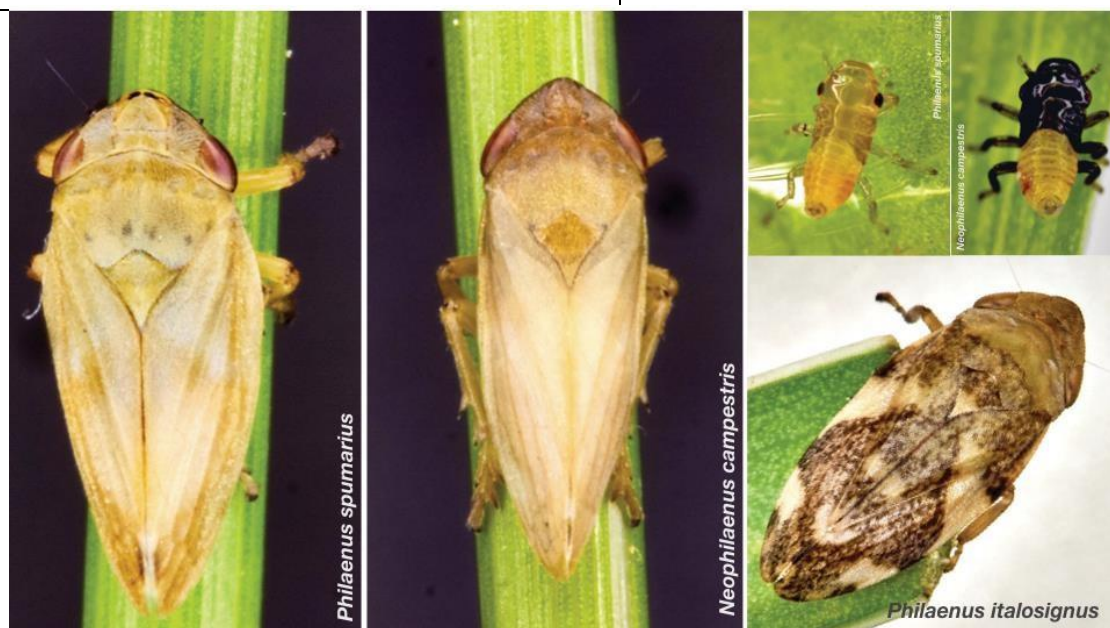


Fig.1 - Tratto da: <https://olivoeolio.edagricole.it/agrofarmaci-difesa/vettori-della-xylella-monitoraggio-e-controllo>

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).

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 della linfa xilematica 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 perdano 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. Una volta infettivi, i vettori adulti invece rimangono capaci di trasmettere il batterio per tutta la loro vita (Almeida *et al.*, 2005). Inoltre, il batterio non viene trasmesso per via transovarica alla progenie del vettore (Freitag, 1951). Gli adulti alati, grazie alla loro elevata mobilità e alla capacità del batterio di moltiplicarsi e persistere all'interno di essi, 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*. Di seguito è rappresentato il ciclo vitale di *P. spumarius* nella regione Puglia (Italia) (tratto da EFSA, 2019). (Fig. 2)

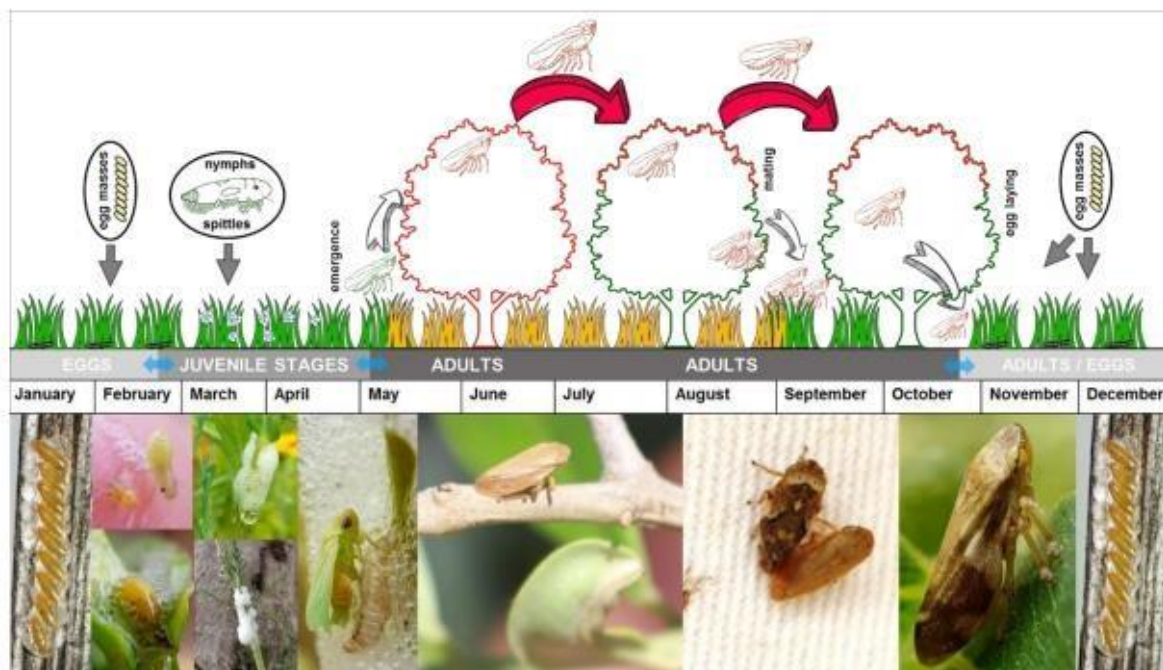


Fig. 2 - Tratto da EFSA, 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*.

2.2 Sintomi/segni

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 (Fig. 3) 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.



Fig.3 - Sintomi di disseccamento rapido dell'olivo in piante di olivo. Foto Donato Boscia, CNR, Istituto Protezione Sostenibile Piante (IPSP), Bari

Vite

Il sintomo principale su vite è la bruscatura fogliare (Fig. 4). I margini fogliari disseccano rapidamente accompagnati da un alone clorotico, l'intera lamina fogliare può disseccare. I tessuti infetti possono maturare irregolarmente mostrando parti non lignificate (verdi) su tralci lignificati (livello internodi). È possibile il disseccamento dei grappoli che rimangono attaccati al tralcio, mentre il tronco non presenta alterazioni.

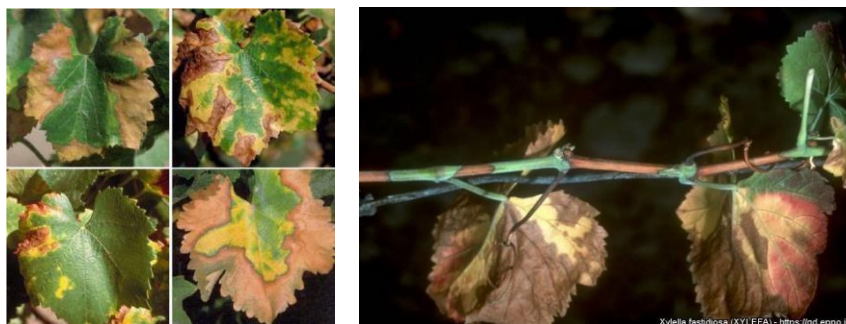


Fig. 4 - Brusatura fogliare e maturazione irregolare dei tessuti su vite. Foto: J. Clark, University of California, Berkeley (US) (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>).

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 (Fig. 5). 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 infetti si presentano deboli e la chioma va incontro a defogliazione e deperimento di rami e branche.

Fioritura e allegagione hanno un decorso classico, ma nelle piante colpite non si verifica un normale diradamento dei frutti che rimangono piccoli, maturano in anticipo con una consistenza cuoiosa. Le piante di solito non muoiono, ma la resa e la qualità del frutto sono

Servizio fitosanitario nazionale

Documento tecnico ufficiale n. 39

Schede tecniche organismi nocivi

Scheda tecnica per indagini su: *Xylella fastidiosa*

Pag. 10 di 26

fortemente ridotte (Donadio & Moreira, 1998).



Fig. 5 - Clorosi variegata degli agrumi: sintomi di clorosi internervale su foglia e maturazione anticipata dei frutti. Foto: M. Scortichini, CREA-OFA Roma (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>) e Alexander Purcell, University of California (<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1262026>)

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 (Fig. 6). 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 piante infette di caffè mostravano sintomi di crescita irregolare con un aspetto arricciato atipico della vegetazione al quale è stato associato il termine spagnolo di “crespera”.



Fig. 6 - Arricciamento dei margini fogliari, clorosi e deformazione delle foglie (asimmetria). Foto Bruno Legendre, Anses, Plant Health Laboratory, Angers (FR) e Maria Bergsma-Vlami, NPPO (NL). (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>)

Pesco

Le piante infette presentano internodi raccorciati, incrementata ramificazione laterale, foglie affastellate e di colore verde più scuro del normale, fioritura anticipata, permanenza su rami di fiori e foglie, pezzatura ridotta di frutti e maturazione anticipata (Fig. 7). 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.



Fig. 7 - Foto: M. Scortichini, CREA-OFA Roma (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>)

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 (Fig. 8). Nelle piante appena infettate si osserva un ingiallimento dei tessuti 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.



Fig. 8 - Crescita stentata della pianta con vegetazione più scura rispetto alla sana. Foto: R.E. Davis and M.J. Davis, APS image data base
<https://imagedatabase.apsnet.org/search.aspx?publicationId=229&ps=1>

Varie specie vegetali (verde urbano, foreste, macchia mediterranea, materiale vivaistico) Molte specie vegetali presentano il caratteristico sintomo della bruscatura fogliare (Fig. 9). 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 a quelle più giovani e, con il progredire della malattia, i rami seccano e la pianta può presentare un aspetto spoglio, fino ad andare incontro a morte (Fig. 9).



Polygala myrtifolia



Nerium oleander



Lavandula angustifolia



Rosmarinus officinalis



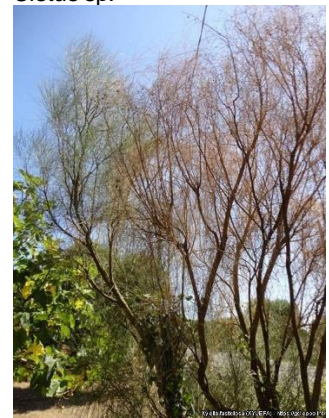
Myrtus communis



Cistus sp.



Acacia saligna



Spartium junceum

Fig. 9 Tutte le foto in questa sezione, se non diversamente indicato sono fornite da: Donato Boscia, CNR, Istituto Protezione Sostenibile Piante (IPSP), Bari

2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)

Secondo l'ultimo rapporto EFSA (EFSA, 2023) sono 696 le specie vegetali ospiti di *X. fastidiosa* di cui 307 generi e 88 famiglie. Questo rapporto EFSA riporta circa 15 specie vegetali in più rispetto al precedente rapporto del 2020 (EFSA, 2023). 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 e sono indicate dalla Commissione Europea ed in continuo aggiornamento.

Il Regolamento (UE) 2020/1201 elenca, in allegato I, tutte le piante da impianto, escluse le sementi, "ospiti" di *X. fastidiosa* e individua, in allegato II, le "piante specificate", ossia quelle notoriamente sensibili a sottospecie specifiche dell'organismo nocivo. Le piante ospiti vengono sottoposte a controlli ufficiali al momento dell'introduzione nell'Unione e sono previsti controlli annuali sulle piante specificate anche nella fase di primo spostamento all'interno del territorio dell'UE o al momento della loro esportazione, in base ai requisiti fitosanitari dei diversi Paesi Terzi. In particolare, per le piante da impianto, escluse le sementi, di *Coffea*, *Lavandula dentata* L., *Nerium oleander* L., *Olea europaea* L., *Polygala myrtifolia* L. e *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb è previsto un controllo rafforzato, in quanto considerate maggiormente sensibili alle diverse sub-specie europee di *X. fastidiosa*.

3. Siti di maggiore rischio

3.1 Aree a rischio/ Risk areas

Fondamentale è monitorare tutte le attività correlate ai pathway di introduzione del batterio: commercio, movimentazione, 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 principali vie di comunicazione a causa della possibile diffusione del vettore tramite i mezzi di trasporto (hitchhiking) e rilascio involontario del vettore.

Sono fattori di rischio:

- Movimento involontario di insetti vettori infetti associati alla movimentazione di materiale vegetale da aree in cui *X. fastidiosa* è presente verso aree indenni.
- 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).
- Distanza dalla zona costiera (fattore).
- Altitudine (fattore).

Sono siti a rischio:

- Percorsi turistici (trasporto di veicoli e imbarcazioni dalle aree in cui è presente il batterio verso aree indenni idonee alla sua stabilizzazione); zone di transito da rientro vacanziero, come aree ristoro e/o tratti autostradali e aree di sosta camper.
- Punti di ingresso portuali e/o transfrontalieri.
- Campi e frutteti/vigneti trascurati e abbandonati nelle aree rurali.
- Nuovi impianti di specie arboree.
- Impianti di piante specificate che presentino sintomi di deperimento.
- Aree naturali o naturalizzate specialmente nella zona costiera coperte da vegetazione spontanea e macchia mediterranea.

I siti a maggiore rischio secondo la codifica Europhyt:

All'aperto: 1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 1.2 frutteto/vigneto; 1.3 vivaio; 1.4 foresta; 2.2 siti pubblici; 2.5.2 centro giardinaggio.

Al chiuso: 3.1 serra

Le indagini sono effettuate utilizzando le linee guida per indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio (EFSA, 2020b); si applicano sia alle aree demarcate che indenni, con modalità definite dai regolamenti.

4. Indagine/survey

Modalità di indagine previste

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

4.1 Osservazione visiva

Aspetti generali: al fine di superare le criticità rappresentate dal periodo di latenza e l'assenza di sintomi, il Regolamento (UE) 2020/1201 prevede la realizzazione di indagini statisticamente valide e basate sul rischio (EFSA 2023), che si basano sul prelievo di campioni vegetali per l'analisi di laboratorio (vedi paragrafo successivo). A solo titolo informativo nel paragrafo 2.2 sono riportati alcuni esempi di sintomo indotto da *X. fastidiosa*.

4.2 Campionamento

Aspetti generali: durante il campionamento l'ispezione visiva supporta l'individuazione del quadro sintomatologico causato da *X. fastidiosa*. Come noto, infezioni da *X. fastidiosa* comportano l'insorgenza di sintomi aspecifici, analoghi a quelli causati da patogeni vascolari di diversa origine (es. fungina) o da diversi fattori abiotici (stress ambientali, carenze idriche, inquinanti atmosferici, problemi nutrizionali, scottature solari). Il lungo periodo di latenza che intercorre tra l'infezione e la comparsa dei sintomi rappresenta un ulteriore fattore di criticità, influenzando significativamente la possibilità di una intercettazione precoce delle infezioni tramite le sole ispezioni visive. Il periodo asintomatico varia significativamente in conseguenza dei molteplici processi biologici coinvolti nell'interazione ospite/sottospecie/ambiente. Il campionamento prevede la raccolta di campioni di materiale vegetale sintomatico e/o asintomatico e/o insetti vettori.


Le linee guida sull'ispezione sono fornite nel PM 3/81 "*Inspection of consignments for Xylella fastidiosa*" (EPPO, 2022a) e PM 3/82 "*Inspection of places of production for Xylella fastidiosa*" (EPPO, 2022b). L'ISPM 31 (IPPC, 2008) fornisce indicazioni sul numero di piante da campionare in casi specifici (es. vivai).

Lo strumento statistico RIPEST supporta la definizione del numero di campioni da prelevare, utilizzando un approccio basato sull'inserimento di vari parametri come input (dimensioni della popolazione target, il numero di unità epidemiologiche e la percentuale di piante per ciascuna di esse, i fattori di rischio, l'efficacia dei metodi di campionamento e la sensibilità dei metodi di diagnosi). I campioni per il laboratorio devono essere composti da rami/talee se possibile con foglie attaccate o foglie con picciolo integro. Il campione dovrebbe includere foglie mature evitando giovani germogli in crescita. Studi recenti condotti nell'ambito del progetto XF-ACTORS hanno dimostrato che negli olivi infetti il batterio è stato rilevato in modo più consistente nei rametti semi-lignificati di un anno di età che nelle foglie, soprattutto quando i campioni provengono da cultivar di olivo resistenti (ovvero con bassa popolazione batterica).

Per le piante piccole si può inviare al laboratorio l'intera pianta.

La concentrazione batterica *in planta* dipende da fattori ambientali, dai ceppi e dall'ospite vegetale. Il campionamento dovrebbe preferibilmente essere eseguito durante il periodo di crescita attiva della pianta per massimizzare la probabilità di rilevamento (Hopkins, 1981).


Dopo che i campioni sono stati prelevati, devono essere inviati al laboratorio il prima possibile.

Tipologia campione	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare	Immagini
<p>Campioni da piante sintomatiche e/o asintomatiche</p>	<p>Piante sintomatiche: rami/talee, 10 - 25 foglie.</p> <p>Piante asintomatiche: 4 - 10 rami ai quattro punti cardinali della chioma.</p>	<p>Piante al chiuso: campionamenti tutto l'anno</p> <p>Piante all'aperto: tutto l'anno. Per dettagli vedi paragrafo 3.2.1.1 EPPO PM 7/24 (5).</p>	<p>Durante il trasporto: mantenere i campioni lontano da fonti di calore. Verifica dell'assenza di vettori nei sacchetti dei campioni</p>	 <p>Tratto da: https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf</p> <p>Tratto da: https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf</p>

4.3 Indagine con trappole

Aspetti generali:

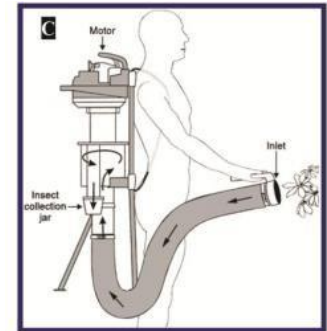
Sono di seguito riportate le modalità di campionamento degli insetti vettori.

Sito di indagine	Tipologia di trappola	Posizionamento trappola	Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli	Immagini
<p>Vedi sezione 3, con particolare riferimento a: campi, frutteti/vigneti, aree naturali o naturalizzate, vie di trasporto principale.</p>	<p>Trappola cromotropica gialla</p>	<p>- Tarda primavera – inizio estate e tarda estate-autunno: posizionamento a livello della vegetazione spontanea;</p> <p>- Giugno-fine agosto: posizionamento in chioma.</p>	<p>Variabile in base al contesto geografico: dalla tarda primavera all'autunno. Le trappole devono essere sostituite ogni 10-15 giorni (al massimo ogni 21 giorni).</p>	

Retino da sfalcio (A); tecnica del frappage su arboree (B); aspiratori a motore (C).

Il campionamento degli insetti adulti deve essere effettuato sulle erbacee nei periodi aprile-maggio e settembre-novembre e sulle arboree nel periodo giugno-settembre.

Variabile in base al contesto geografico: dalla tarda primavera all'autunno.



Tratto da: [WORKSHOP-MANUAL-INSECTS-web.pdf](#)

5. Diagnosi

L'attività di diagnosi di *Xylella fastidiosa* è delineata dal Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 24 gennaio 2022. "Adozione del Piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well et al.) (GU Serie generale - n. 64 del 17-3-2022.)" e dal Regolamento di esecuzione (UE) 2021/1688 della Commissione del 20 settembre 2021 che modifica il Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 per quanto riguarda gli elenchi delle piante ospiti e delle piante specificate e i metodi di prova per l'identificazione della *Xylella fastidiosa*.

Protocolli ufficiali di riferimento

PM 7/24 *Xylella fastidiosa* (ultima versione)

PM7/141 *Philaenus spumarius*, *Philaenus italosignus* and *Neophilaenus campestris* (ultima versione)

ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 25: *Xylella fastidiosa* (ultima versione)

5.1 Campione/Matrice

Il campione può essere costituito da vettore (insetto) o da matrici vegetali sintomatiche o asintomatiche.

5.1.1 Materiale vegetale

La tipologia di materiale (campioni singoli o campioni multipli) deve essere trattata secondo quanto indicato nello standard EPPO PM7/24 (3.2 Sampling of plant material and sample preparation in the laboratory). Le specifiche riguardanti il materiale asintomatico sono indicate nella tabella 1, 2 e 3 dello standard EPPO PM7/24 dove vengono inserite tutte le indicazioni per la preparazione del campione.

Tutte le specifiche riguardanti la conservazione del materiale prelevato e il suo mantenimento sono riportate nel protocollo EPPO PM7/24.

5.1.2 Vettori

La tipologia di prelievo degli insetti vettori, la preparazione del campione e la sua conservazione è indicata nello standard EPPO PM7/24 (3.3 Sampling of vectors and sample preparation in the laboratory).

Lo standard EPPO PM7/141 fornisce invece la descrizione morfologica dei diversi stadi vitali (uova, stadi giovanili e adulto) di *P. spumarius* e dei principali caratteri distintivi degli adulti di *P. italosignus* e *N. campestris*, specie di insetti riconosciute come vettori di *X. fastidiosa* in Europa.

5.1.3 Estrazione

L'estrazione del DNA da campioni vegetali e insetti vettori per le analisi molecolari può essere ottenuta utilizzando kit commerciali o mediante il metodo basato su tampone CTAB.

Le specifiche riguardanti i kit di estrazione oltre che la descrizione della procedura di estrazione degli acidi nucleici a partire da insetto o da matrice vegetale sono descritte nel protocollo standard EPPO PM7/24 Appendix 3.

5.2 Test di screening (Rilevamento)

5.2.1 Test di screening previsti all'interno del monitoraggio cofinanziato

Secondo il Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 e sue successive modifiche i metodi di prova per l'identificazione della *Xylella fastidiosa*, i test da utilizzare sono:

- Morphological identification (per i vettori) EPPO PM7/141 (sezione 4.1)
- PCR EPPO PM 7/24 Appendice 4 (sulla base di Minsavage et al. 1994);
- Real Time PCR EPPO PM 7/24 Appendice 5 (sulla base di Harper et al., 2010, erratum 2013) e Appendice 7 (sulla base di Ouyang et al., 2013)
- LAMP EPPO PM 7/24 Appendice 12 (sulla base di primer sviluppati da Harper et al. 2010).

5.3 Test per l'identificazione delle sottospecie di *Xylella fastidiosa* (All 4 del regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 Parte B)

- MLST EPPO PM7/24 Appendice 16 (sulla base di Yuan et al., 2010);
- PCR EPPO PM7/24 Appendice 18 (sulla base di Pooler & Hartung, 1995) per la determinazione della sottospecie *pauca*
- PCR EPPO PM7/24 Appendice 19 (sulla base di Hernandez-Martinez et al., 2006) per la determinazione delle sottospecie *fastidiosa*, *multiplex* e *sandyi*;
- Real time PCR PM 7/24 Appendice 10 (sulla base di Dupas et al., 2019);
- Real time PCR PM 7/24 Appendice 11 (sulla base di Hodgetts et al., 2021);

L'esecuzione delle prove sopra riportate (5.2 test di screening e 5.3 test di identificazione) sono riportate nello standard EPPO PM 7/24.

I diagrammi di flusso che descrivono la procedura diagnostica per *X. fastidiosa* sono presentati nelle figure 1 e 2 (Introduction) nello standard EPPO PM 7/24.

5.4 Note:

Secondo quanto indicato dal Decreto 24 gennaio 2022 “Adozione del Piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well et al.) (22A01653) (GU Serie Generale n.64 del 17-03-2022)”

Nel caso di indagini condotte in **area indenne**, il risultato positivo delle analisi deve essere confermato da un laboratorio nazionale di riferimento con un'ulteriore analisi molecolare tra quelle elencate dal regolamento, diretta a parti diverse del genoma.

Le analisi sono effettuate sullo stesso campione vegetale o, se pertinente per l'analisi molecolare utilizzata a fini di conferma, sullo stesso estratto vegetale.

L'identificazione delle sottospecie di *Xylella fastidiosa* è effettuata su ogni specie vegetale risultata infetta dall'organismo nocivo specificato nell'area delimitata interessata.

In particolare, il DM 24/12/2022 definisce che nell'ambito della Rete nazionale, sono riconosciuti come laboratori nazionali di riferimento per *X. fastidiosa*, conformemente a quanto previsto dall'art. 101 del Reg. (UE) 2017/625, il Centro di ricerca Difesa e Certificazione del CREA e il l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR.

Per campioni provenienti da **aree delimitate** non è richiesto alcun saggio di conferma.

Indipendentemente dalla zona di provenienza del campione, il metodo di prova può produrre risultati inconclusivi o dubbi; in tali casi è necessario procedere alla ripetizione dell'analisi utilizzando lo stesso metodo di prova.

Qualora il risultato della seconda analisi sia:

- positivo, l'analisi deve essere confermata applicando un metodo di prova diretto a parti diverse del genoma;
- negativo, il campione viene assegnato con “*X. fastidiosa* non rilevata/assente”;
- inconclusivo, si procede ove possibile ad un nuovo campionamento, oppure ad una nuova analisi sullo stesso campione vegetale o, se pertinente per l'analisi molecolare utilizzata a fini di conferma, sullo stesso estratto vegetale; pertanto, è necessaria la conservazione di un'aliquota di ciascun campione o estratto vegetale.

Qualora il risultato delle analisi producesse nuovamente un risultato inconclusivo il campione sarà considerato come “*X. fastidiosa* non rilevata/assente”.

In quest'ultimo caso il Servizio Fitosanitario competente per territorio valuterà l'eventualità di effettuare ulteriori indagini.

Bibliografia

- 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.
- Bodino N., Cavalieri V., Saponari M., Dongiovanni C., Altamura G., Bosco D., 2022. Transmission of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST53 by the sharpshooter *Cicadella viridis* from different source plants and artificial diets. *Journal of Economic Entomology*, 115 (6), 1852-1858.
- Casarin N., Hasbroucq S., Carestia G., Glibert A., Bragard C., et. al. Investigating dispersal abilities of Aphrophoridae in European temperate regions to assess the threat of potential *Xylella fastidiosa*-based pathosystems. 2022. *Journal of Pest Science* <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01562-9>
- Cavalieri V., Altamura G., Fumarola G., di Carolo M., Saponari M., Cornara D., Bosco D., Dongiovanni C., 2019. Transmission of *Xylella fastidiosa* Subspecies *Pauca* Sequence Type 53 by different insect species. *Insects*, 29, 10(10):324.
- 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.
- Davis MJ, Purcell AH & Thomson SV (1980) Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 70, 425–429.
- Donadio LC & Moreira CS (1998) Citrus variegated chlorosis. Bebedouro, SP, Brazil, FUNDECITRUS/FAPESP 166 p.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Scientific report on the update of the *Xylella* spp. Host plant database. *EFSA Journal* 2018;16(9): 5408, 87 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5408>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal* 2019; 53pp. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1667.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2019a. Update of the Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory. *EFSA Journal* 2019;17(5):5665, 200 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5665>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2020a. Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2019. *EFSA Journal* 2020;18(4): 6114, 61 pp. <http://doi:10.2903/j.efsa.2020.6114>.
- EFSA (European Food Safety Authority), Lázaro E, Parnell S, Vicent Civera A, Schans J, Schenk M, Schrader G, Cortiñas Abrahantes J, Zancanaro G and Vos S, 2020b.

Guidelines for statistically sound and risk-based surveys of *Xylella fastidiosa*. EFSA supporting publication 2020:EN-1873. 76 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1873.

EFSA (European Food Safety Authority), Gibin D., Gutierrez Linares A., Fasanelli E., Pasinato L., & Delbianco A. (2023). Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2023. EFSA Journal, 21(12), e8477. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8477>.

EPPO 2023. PM 7/24 (5) *Xylella fastidiosa*. EPPO Bulletin 53:205–276.

EPPO 2020. PM 7/141 (1) *Philaenus spumarius*, *Philaenus italosignus* and *Neophilaenus campestris*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2020) 50 (1), 32–40.

EPPO 2021. PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2021) 51 (1), 100–143.

EPPO 2022. PM 3/81 (3) Inspection of consignments for *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2022) 52, 544–556.

EPPO 2022. PM 3/82 (3) Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2022) 52, 557–571.

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

Gould, AB and Lashomb, JH (2007) Bacterial leaf scorch (BLS) of shade trees. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/BacterialLeafScorch.aspx>.

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

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

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

Hopkins D L (1981) Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. Phytopathology 71, 415-418.

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.

IPPC, 2008. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 31 Methodologies for sampling of consignments

Lantero E, Matallanas BM, Pascual S & Callejas C (2018) PCR species-specific primers for

molecular gut content analysis to determine the contribution of generalist predators to the biological control of the vector of *Xylella fastidiosa*. Sustainability 2018, 2207.

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.

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.

Rösch V, Marques E, Miralles-Núñez AD, Zahniser JN, Wilson MR (2022) *Draeculacephala robinsoni* Hamilton, 1967 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae), a newly introduced species and genus in Europe with comments on its identification. Zootaxa 5116(3), 439-448.

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.

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