

Candidatus Liberibacter solanacearum

Posizione tassonomica:

- Regno: Bacteria
- Phylum: Proteobacteria
- Classe: Alphaproteobacteria
- Ordine: Rhizobiales
- Famiglia: Phyllobacteriaceae
- Genere: 'Candidatus Liberibacter'
- Specie: *Candidatus Liberibacter solanacearum*
- Aplotipi: A, B, C, D, E, F, G, U, H

Origini: Africa, America del Nord, America Centrale, America del Sud, Asia, Europa, Oceania

Dove è stato segnalato:

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

Africa: Marocco; Tunisia

Nord America: Canada (Alberta); USA (Arizona, California, Colorado, Idaho, Kansas, Nebraska, Nevada, New Mexico, Oregon, Texas, Washington, Wyoming),

America Centrale: Guatemala, Honduras, Messico Nicaragua, El Salvador

America del Sud: Ecuador

Asia: Israele

Oceania: Nuova Zelanda

Europa: in carota - Austria (qui anche in sedano), Belgio, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Norvegia, Portogallo; Regno Unito (semi di prezzemolo), Spagna continentale (qui anche in sedano, prezzemolo e pastinaca) e isole Canarie, Svezia,

Gli aplotipi A, B, F e G (quelli rinvenuti in Solanaceae) non sono presenti in Europa

- In Europa e nel bacino del mediterraneo sono stati rinvenuti gli aplotipi C, D ed E
- L'aplotipo U in Finlandia

Presenza e/o segnalazioni in Italia: In Italia è stato rinvenuto in carota in Sicilia (Catara et al., 2017) ed in semi di carota, prezzemolo e sedano commercializzati nel nostro paese ma non necessariamente prodotti in Italia (Ilardi et al., 2016a; Ilardi et al., 2016b). Nel 2018 è stato trovato in Emilia-Romagna e Marche

Presente, distribuzione limitata

Diffusione in Campania: Assente

Categorizzazione fitosanitaria: Organismo nocivo regolamentato non da quarantena

Biologia Sintomatologia e Danni:

Candidatus Liberibacter solanacearum' (CaLsol) è un batterio Gram-negativo non coltivabile *in vitro*, parassita obbligato limitato al floema di piante (Solanaceae e Apiaceae) ed emolinfa di psille (*Psyllidae*). Recentemente è stato rinvenuto anche in Urticaceae.

In natura CaLsol è trasmesso in maniera persistente - propagativa da diverse specie di psille (ordine Homoptera, famiglia *Psyllidae*). Può essere trasmesso anche per innesto e attraverso la cuscuta (Haapalainen, 2014). Può essere introdotto in nuove aree piantando materiale infetto (es. tuberi di patata, piante di pomodoro), ma per la successiva diffusione è necessaria la presenza del vettore. Nelle solanacee non sembra essere trasmesso da seme vero (Munyaneza, 2012), mentre Bertolini e coautori (2014) hanno dimostrato la trasmissibilità di CaLsol per seme in carota. Tuttavia, studi francesi non hanno riprodotto la trasmissione per seme del patogeno (Loiseau *et al.*, 2015; Loiseau *et al.*, 2017).

In base a polimorfismi a livello del singolo nucleotide (SNP) di porzioni del gene 16S, della regione intergenica ISR16S/23S e dei geni 50SrpIJ/L di CaLsol, sono riconosciuti cinque aplotipi principali: A, B, C, D, E (Nelson *et al.*, 2013; Teresani *et al.*, 2014). A e B, trasmessi da *Bactericera cockerelli*, infettano le Solanaceae, mentre C, D ed E sono stati associati ad infezioni delle Apiaceae. L'aplotipo C, rinvenuto in nord Europa, è trasmesso da *Trioza apicalis*, mentre nel bacino del mediterraneo sono stati rinvenuti gli aplotipi D e/o E trasmessi da *Bactericera trigonica*. Recentemente sono stati individuati due nuovi aplotipi in USA, F su un tubero di patata e G in *Solanum umbelliferum*, un altro U in Finlandia in ortica e *Trioza urticae* ed infine dei nuovi aplotipi chiamati H su Polygonaceae e Apiaceae (Finlandia) e Convolvulaceae in America del nord.

I sintomi indotti dall'infezione di CaLsol possono essere confusi con quelli dovuti a fitoplasmi o a disordini fisiologici. I sintomi possono presentarsi in tutta la pianta o anche solo in porzioni di questa. Nelle solanacee si ha arresto della crescita, clorosi e/o arrossamento del fogliame, arrotolamento delle foglie, accorciamento e rigonfiamento degli internodi (pianta a rosetta), presenza di rami ascellari o tuberi aerei (nel caso della patata), disseccamento fogliare, difficoltà di allegagione, produzione di numerosi frutti piccoli, deformi e di scarsa qualità. I sintomi del tubero di patata sono caratteristici (zebra chip) e consistono nell'imbrunimento del tessuto vascolare con punteggiature necrotiche dei tessuti interni e striature dei tessuti dei raggi midollari. Con la frittura, questi sintomi diventano più pronunciati ed il prodotto trasformato diviene commercialmente inaccettabile.



Sintomi su chips di patata prima e dopo la frittura Foto: <https://gd.eppo.int/taxon/LIBEPS/photos>

I sintomi in carota, simili a quelli associati a fitoplasmi e *Spiroplasma citri*, comprendono arricciatura fogliare, giallume, bronzature e scolorimento violaceo delle foglie, arresto della crescita dei germogli e del fittone, proliferazione di radici secondarie. L'arrossamento fogliare può essere confuso con i sintomi indotti da carrot red leaf virus.

Nel sedano, disturbi vegetativi associati al patogeno comprendono un numero anomalo di germogli e ripiegamento degli steli

Piante ospiti:

- **Aplotipi A e B** → **Solanaceae**: patata (*Solanum tuberosum*), pomodoro (*S. lycopersicum*), peperone (*Capsicum annuum*), melanzana (*S. melongena*), tabacco (*Nicotiana tabacum*), tamarillo (*S. betaceum*), alchechengio peruviano (*Physalis peruviana*), goji (*Lycium barbarum*) e le infestanti *S. ptychanthum* e *S. elaeagnifolium*.
- **Aplotipo F** → **Solanaceae**: rinvenuto in patata (*S. tuberosum*)
- **Aplotipo G** → **Solanaceae**: rinvenuto in *S. umbelliferum* (essiccato in erbario)
- **Aplotipi C, D ed E** → **Apiaceae**: carota (*Daucus carota*), sedano (*Apium graveolens*), prezzemolo (*Petroselinum crispum*) e pastinaca (*Pastinaca sativa*).
- **Aplotipo U** → **Urticaceae**: rinvenuto in ortica (*Urtica dioica*)
- **Aplotipi H** → Polygonaceae e Apiaceae; Convolvulaceae

Siti a rischio da ispezionare:

- Coltivazioni di campo di solanacee (soprattutto, nell'ordine, patata, pomodoro e peperone) per Aplotipi A, B ed F, G
- Coltivazioni di campo commerciali e per produzione del seme di Apiaceae (soprattutto, nell'ordine, carota, sedano, prezzemolo e finocchio) per Aplotipi C, D ed E
- Punti d'ingresso (porti, aeroporti, transiti doganali) di materiale di importazione soprattutto se proveniente da aree dove la malattia è endemica, per patate da seme e piante di *Solanaceae* da trapianto (plants for planting)

Le importazioni di tuberi di patata sono vietate nei paesi in cui sono presenti gli aplotipi A, B o F, come stabilito nell'allegato III della direttiva 2000/29 / CE del Consiglio. Pertanto, l'importazione di patate non è considerata un'attività a rischio. Tuttavia, l'importazione di piante da trapianto di pomodoro, peperone e melanzana dalle aree in cui sono presenti gli aplotipi A, B, F e / o il loro vettore *B. cockerelli* può essere considerata un possibile *pathway* di ingresso. I vivai, e altri luoghi in cui tali solanacee vengono scambiate, immagazzinate o ulteriormente distribuite possono essere definiti come luoghi a rischio, così come le coltivazioni di solanacee contigue a questi luoghi.

Cosa controllare: Pianta da trapianto, Ramo; Germoglio, Foglia, Ramo, Frutti

Misure di Monitoraggio

- Ispezioni visive
- Campionamento
- Trappole cromotropiche

Ispezioni visive, campionamenti e trappolaggio:

In campo: ispezione condotta preferibilmente lungo le diagonali a scalare per l'osservazione dei sintomi sospetti o in alternativa secondo il modello “passaggi equidistanti”. Effettuare la redazione del verbale d'ispezione e mappatura dei campi ispezionati.

La rilevazione di CaLsol dovrebbe essere eseguita su piante sintomatiche. Può anche essere eseguita su piante asintomatiche (foglie e steli) mentre non è raccomandata su tuberi di patata perché qui sarebbe meno affidabile.

Ispezioni visive

<i>Cosa guardare</i>	<i>Quando</i>
<p>Carota pianta</p> <ul style="list-style-type: none"> • arricciatura fogliare • giallume, bronzature e scolorimento violaceo delle foglie • arresto della crescita dei germogli e del fittone • proliferazione di radici secondarie <p>Sedano pianta</p> <p>disturbi vegetativi comprendenti un numero anomalo di germogli e ripiegamento degli steli</p> <p>Solanaceae</p> <ul style="list-style-type: none"> • arresto della crescita • clorosi e arrossamento del fogliame • arrotolamento delle foglie • accorciamento e rigonfiamento degli internodi • presenza di rami ascellari o tuberi aerei (nel caso della patata) • disseccamento fogliare • arricciatura della nervatura centrale (nel caso del pomodoro) • produzione di numerosi frutti piccoli, deformi e di scarsa qualità <p>I sintomi del tubero di patata consistono nell'imbrunimento del tessuto vascolare con punteggiature necrotiche dei tessuti interni e striature dei tessuti dei raggi midollari</p>	<p>Tutto l'anno</p>

Campionamenti

<i>Cosa prelevare</i>	<i>Come conservare</i>	<i>Note</i>
<p>Campioni sintomatici</p> <p>In caso di sintomi prelevare in base alla coltura:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pianta intera • Foglie con piccioli (da tre a cinque 	<p>Conservare il materiale vegetale in buste di plastica di dimensioni adeguate per evitare lo schiacciamento/compressione del materiale. Tenere lontano da fonti di calore. Conservare a 4°C fino alla consegna al laboratorio di riferimento</p>	

per pianta) • Fittone con radici secondarie (carota) Tubero sintomatico (patata)		
<p style="text-align: center;">Semi</p> <p style="text-align: center;"><u>Dimensione del campione</u></p> <p style="text-align: center;">Secondo l'<i>International Seed Federation</i> (ISF):</p> <p>un campione: 20.000 semi (\approx 20 gr per semi di carota); da esso si costituiscono due sub-campioni di 10.000 semi da sottoporre ad analisi</p> <p>Tuttavia, qualora non fosse disponibile un campione di tali dimensioni, è possibile usare campioni più piccoli (500 semi \approx 0.5 gr)</p>	Usare sacchetti di dimensioni adeguate che vanno poi chiusi ermeticamente	

Attività di Monitoraggio Vettori

In natura CaLsol è trasmesso in maniera persistente - propagativa da diverse specie di psille (ordine Homoptera, famiglia *Psyllidae*). Può essere trasmesso anche per innesto e attraverso la cuscuta (Haapalainen, 2014). Può essere introdotto in nuove aree piantando materiale infetto (es. tuberi di patata, piante di pomodoro), ma per la successiva diffusione è necessaria la presenza del vettore. Nelle solanacee non sembra essere trasmesso da seme vero (Munyaneza, 2012), mentre Bertolini e coautori (2014) hanno dimostrato la trasmissibilità di CaLsol per seme in carota. Tuttavia, studi francesi non hanno riprodotto la trasmissione per seme del patogeno (Loiseau *et al.*, 2015; Loiseau *et al.*, 2017).

Test diagnostici

I test diagnostici sono effettuati presso laboratori fitopatologici a tanto abilitati secondo standard, procedure interne o protocolli ufficialmente riconosciuti.

Protocolli standard di riferimento:

PM7/143 (1) 'Candidatus Liberibacter solanacearum'

- (XV) PCR
- (XIX) PCR+Sequencing (va indicato quando si fa insieme la PCR e si invia al sequenziamento)
- (XX) Real Time - PCR

Campione/Matrice

I tuberi di patata sintomatici devono essere testati individualmente.

Prima dell'estrazione del DNA, il materiale vegetale deve essere lavorato in modo da contenere quanto più tessuto vascolare possibile:

- nervatura fogliare e picciolo,
- tubero (cambio, cono ombelicale, anello vascolare)
- fittone,
- radici secondarie,
- seme.

Tipologia di test per l'identificazione

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

Il test viene effettuato sul DNA totale estratto dalla matrice vegetale seguendo uno dei metodi indicati in: IPPC-ISPM 27, EFSA Survey card 2019- 1632, ISF e Ilardi et al 2017. (cod. IO 05 XV)

Descrizione del protocollo, primer/probe per real time PCR e primer per end-point PCR: IPPC- ISPM 27 Annex 21 - DP "Candidatus Liberibacter solanacearum" (cod. IO 05 XX)

Se il campione risulta positivo e si vuole identificarne l'aplotipo si amplificano e sequenziano le regioni 16S rRNA, l'intergenica 16/23S rRNA ed i geni per le proteine ribosomali 50S rpIJ e rpIL come indicato in: IPPC-ISPM 27 ed in particolare, con i test rispettivamente di Li et al. (2009), Munyaneza et al. (2009); e Ravindran et al. (2011) (cod. IO 05 XIX).

Il requisito minimo di identificazione per CaLsol è un risultato positivo da uno dei test di PCR.

La conferma è raccomandata per i casi critici, soprattutto se è stato utilizzato un test di screening rapido. In tal caso dovrebbe essere eseguita una seconda tipologia di PCR. Per la end-point PCR, il prodotto deve essere sequenziato.

La sequenza nucleotidica dovrebbe essere $\geq 98\%$ identica alla sequenza dell'isolato di riferimento (numero di accesso GenBank EU834130) perché il batterio possa essere considerato CaLsol.

Normativa di riferimento:

Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072 (ALLEGATO IV, PARTE G - ORNQ su tuberi-seme di patate" e ALLEGATO VII, PARTE F)

Standard di riferimento:

PM EPPO:

PM 9/25 (1) *Bactericera cockerelli* and 'Candidatus Liberibacter solanacearum' National Regulatory Control Systems

PM7/143 (1) 'Candidatus Liberibacter solanacearum'

OTHER:

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1632>

- EPPO: Report of a Pest Risk Analysis for *Candidatus Liberibacter solanacearum* in Solanaceae and its vector *Bactericera cockerelli*
- EPPO: Data Sheets on pests recommended for regulation 'Candidatus Liberibacter solanacearum' (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013) 43 (2), 197–201)

- ISF: Detection of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' on carrot seeds
- IPPC: ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 21: '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'



