



PROCEDURE DI INDAGINE PER:

1- Nome comune dell'organismo o malattia/*Common name of the pest*

Avvizzimento batterico del mais/Stewart's wilt, bacterial wilt

2 - Nome scientifico/*Scientific name*

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

Sinonimi: *Erwinia stewartii* (Smith) Dye; *Xanthomonas stewartii* (Smith) Dowson.

3 – EPPO Code:

ERWIST

4 - Posizione tassonomica/*Taxonomy*

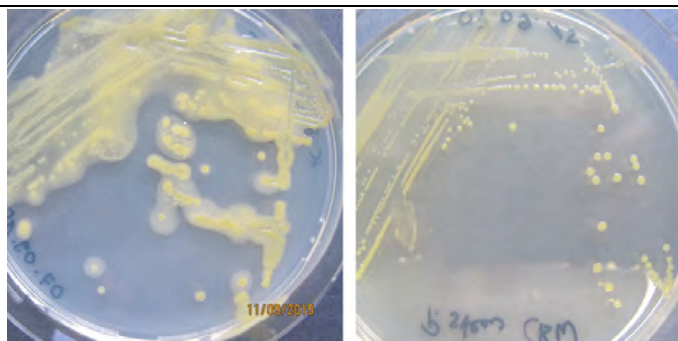
- Phylum: Proteobacteria
- Classe: Gammaproteobacteria
- Ordine: Enterobacteriales
- Famiglia: *Enterobacteriaceae*
- Genere: *Pantoea*
- Specie: *stewartii*

5 – Aspetti epidemiologici dell'organismo/*Epidemiology of the pest*

5a. Batterio

P. stewartii subsp. *stewartii* è un batterio gram-negativo, 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.



Pantoea stewartii subsp. *stewartii*
 Su King's (piastra di destra) e NB Y (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.

Sintomi:

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.

5b. Vettore



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

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

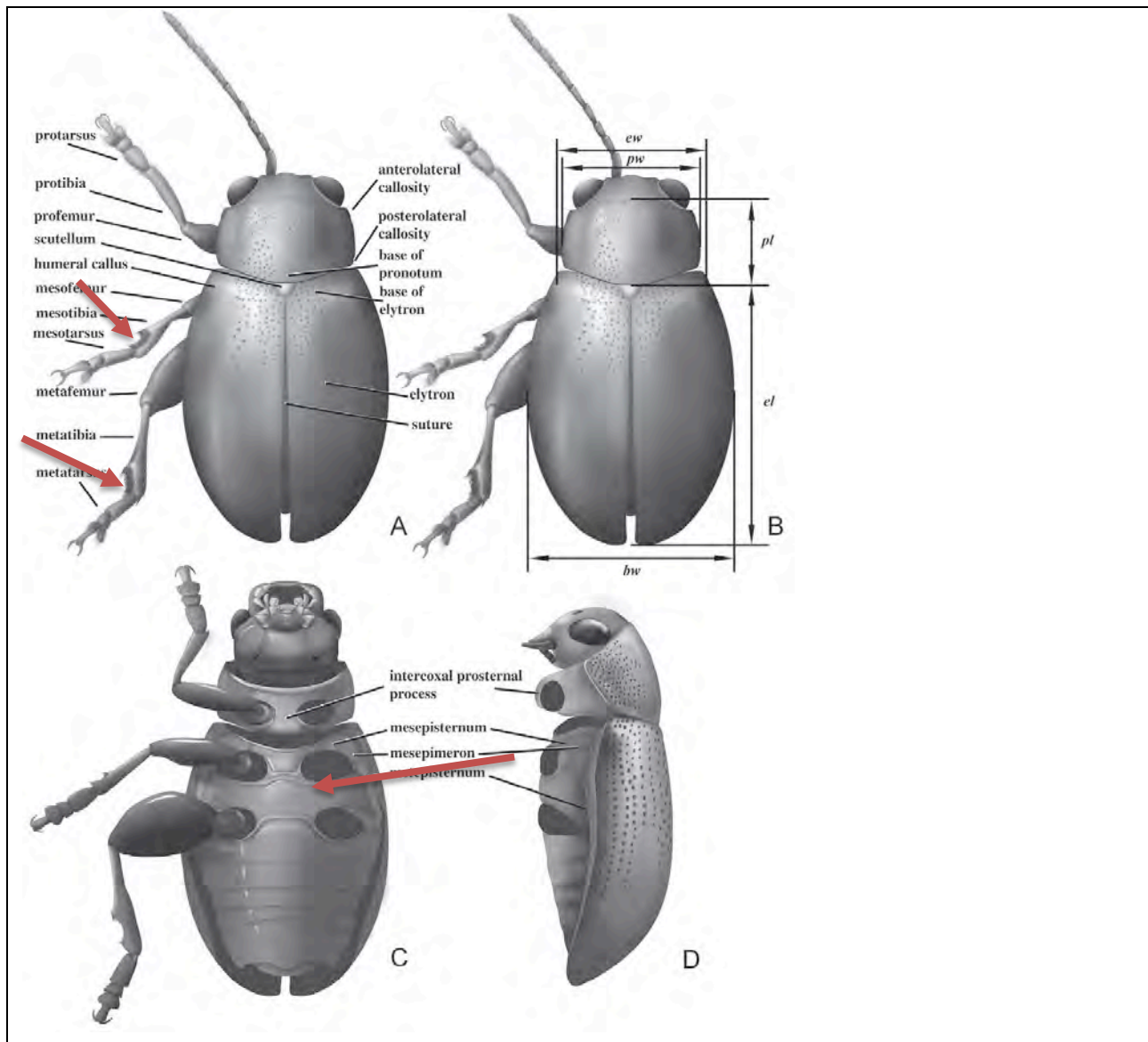
Chaetocnema Stephens 1831 è uno dei pochi generi di coleotteri alticini cosmopoliti. Le specie di *Chaetocnema* hanno caratteri molto simili e non sono facilmente distinguibili morfologicamente da parte di non esperti.

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

Tutte le specie di *Chaetocnema palearctico* condividono le seguenti due importanti caratteristiche diagnostiche:

- 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.



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 (Figura 2). 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.



Esempio di danno da alimentazione di adulto di *Chaetocnema pulicaria*

6 - Piante ospiti/Hosts

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*

7 - Siti a rischio da monitorare/Typology of location to be surveyed

- Coltivazioni di mais industriale, coltivazioni colture da seme

- Punti di ingresso per semente di mais (porti, aeroporti, transiti doganali) prevedendo il campionamento e l'analisi diagnostica per la ricerca del batterio di almeno il 15% delle spedizioni
- Le ditte sementiere si impegnano ad un autocontrollo della semente, analizzano tutti i lotti di seme di base delle linee parentali destinati alla semina di origine UE ed extra-UE per rilevare la presenza di *P. stewartii* secondo il PM 7/60 (rev. 2016) EPPO e conservano i certificati di analisi per ogni richiesta. Per maggiori dettagli si rimanda alla Nota tecnica N.0014538 del 05/05/2020.

PARTE A – MONITORAGGIO/SURVEY

Normativa di riferimento su modalità di monitoraggio:

EUROPEA:

- Union Quarantine pest (Annex II A) Reg 2019/2072
- Regolamento UE 2016/2031

NAZIONALE:

- Nota tecnica n°14023 del 24/04/2018 e successive modifica del 3/06/2019 e N.0014538 del 05/05/2020.

Standard di riferimento:

PM EPPO:

- PM 7/60 (2) *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*

EFSA card (non disponibile)

OTHER:

- ISF: PEST RISK ANALYSIS - The risk of introducing *Erwinia stewartii* in maize seed by J. Pataky and R. Ikin

NAPPO: RSPM 36 Phytosanitary Guidelines for the Movement of Seed

Misure di monitoraggio:

Ciascuna delle 3 regioni interessate alla produzione di mais da seme (Lombardia, Veneto ed Emilia-Romagna) deve effettuare, nell'ambito dei monitoraggi co-finanziati UE, l'ispezione dei campi denunciati di mais da seme su almeno il 10% dei campi dichiarati. Le ispezioni devono riguardare il 100% della relativa superficie, con le modalità ed i tempi previsti nella Nota tecnica N.0014538 del 05/05/2020.

- ✓ Ispezione visiva – *Visual Inspection*
- ✓ Campionamento – *Sample Taking*

Le ditte sementiere, al fine di poter anticipare il controllo previsto in pre-fioritura inviano una comunicazione della denuncia dei campi di produzione di seme certificato eseguita per appezzamento, nonché indicare oltre che il lotto anche l'origine della semente. Per unità minima di denuncia, si deve intendere il "rigo di denuncia". Maggiori dettagli nella Nota tecnica N.0014538 del 05/05/2020.

Ispezione visiva/*Visual inspection*

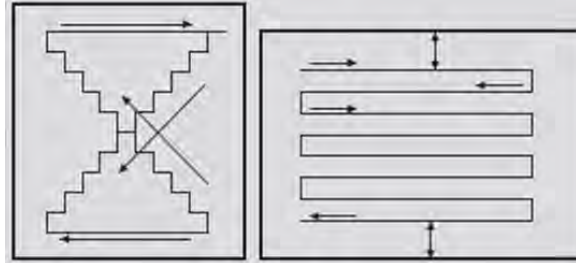
Condizione dell'ispezione:

In campo: ispezione condotta su almeno il 10% dei campi dichiarati. Le ispezioni devono riguardare il 100% della relativa superficie 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 effettuare la georeferenziazione dei campi ispezionati.

I Servizi fitosanitari regionali possono decidere di effettuare un campionamento in pre-raccolta sul restante 90% dei campi denunciati. Per le modalità operative al campionamento in pre-raccolta si fa riferimento alla Nota tecnica N.0014538 del 05/05/2020.

Per quanto riguarda il monitoraggio nei campi di produzione diversa dalle sementi, si ritiene opportuno mantenere i monitoraggi in essere, secondo il Piano di Monitoraggio Nazionale e/o il Piano di Monitoraggio Cofinanziato dall'UE ai sensi del Regolamento 652/2014.



Monitoraggi del vettore:




Chaetocnema pulicaria



Effettuare un programma di monitoraggio, mediante sfalcio, eseguendo il controllo ogni 200 ettari (1 sfalcio/200 ettari) nei campi seme e includendo il controllo anche nei campi destinati ad altra produzione, effettuando uno sfalcio ogni 20.000 ettari. Per maggiori dettagli Nota tecnica N.0014538 del 05/05/2020.





Chaetocnema pulicaria

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


Quando fare ispezione	Cosa guardare	Immagini
<p><u>Controlli in campo:</u> allo stadio fenologico di 5° - 6° foglia, altezza massima della pianta 50-70 cm, preferibilmente durante il mese di maggio</p>	<p>Rapido avvizzimento dei semenzali</p>	 <p>(Pataky, J. 2003)</p>  <p>(Pataky, J. 2003)</p>  <p>(Pataky, J. 2003)</p>

	<p>Lesioni parallele alla venatura fogliare di colore giallo/verde pallido con margini ondulati</p>	 <p>(J.K. Pataky, https://gd.eppo.int/taxon/ERWIST/photos)</p>
	<p>Presenza di cavità scure nel midollo alla base delle piante</p>	 <p>(Pataky, J. 2003)</p>

Campionamento/Sample taking

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare
<p>Campioni sintomatici</p> <p>In presenza di sintomi, prelevare l'intera pianta-comunicazione alla ditta sementiera interessata. In caso di esito positivo il Servizio Fitosanitario Regionale prescrive la conseguente misura ufficiale fitosanitaria. Dettagli Nota tecnica N.0014538 del 05/05/2020.</p>	 <p>(Pataký, J. 2003)</p>  <p>Bernardinelli I; https://gd.eppo.int/taxon/ERWIST/photos)</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>Semi di mais</p> <p>aziende sementiere/punti di entrata delle dogane aeree e portuali campionando ed analizzando con i metodi</p>	<p>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;</p>	<p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate</p>

diagnostici secondo il PM 7/60 (rev.2006) almeno il 15% delle spedizioni	all'ISTA (International Seed Testing Association) e all'International Rules for Seed Testing. Le ditte sementiere inoltre si impegnano a mantenere un'aliquota di almeno 400 semi per ulteriore analisi dei semi base, da parte dei Servizi fitosanitari di competenza in cui insistono i campi di produzione della semente. Per i lotti di semi la dimensione del campione solitamente raccomandata è di 400 semi corrispondenti al 95% di probabilità di rilevare l'1% di infezione batterica.	
--	--	--

<p style="text-align: center;">Vettori</p> <p>Il campionamento del vettore <i>Chaetocnema pulicaria</i> e cattura di specie di artropodofauna che possano avere interazioni trofiche dirette o indirette con la pianta ospite del batterio (<i>Z. mays</i>).</p> <p>Per la raccolta degli insetti presenti nelle vicinanze dei campi di mais utilizzare il metodo del retino da sfalcio secondo un procedimento standardizzato.</p> <p>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).</p> <p>Procedere nelle capezzagne circostanti i campi, evitando le ore più calde della giornata.</p> <p>Effettuare 10 sfalci continuativi tra la vegetazione a circa 50 cm dal suolo.</p> <p>Ogni serie di sfalci deve essere ripetuta per 3 volte a distanza di qualche metro a coprire una distanza di circa 100 metri lineari.</p>	 <p style="text-align: center;"><i>Chaetocnema pulicaria</i> (Quinn M.; https://bugguide.net/node/view/353196)</p>	<p>Per l'identificazione morfologica in laboratorio degli eventuali insetti vettori e successiva ricerca di <i>P. stewartii</i> in tale matrice:</p> <p>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.</p> <p>Tutti i campioni devono riportare un ID univoco e altri dati essenziali del prelievo.</p>
--	---	--

PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

Inquadramento normativo

EUROPEA

- Union Quarantine pest (Annex II A) Reg 2019/2072
- Regolamento UE 2016/2031

NAZIONALE

- Decreto legislativo 214/2005 ALLEGATO II Parte A Sezione 1
- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072

Inquadramento EPPO

EPPO list A2

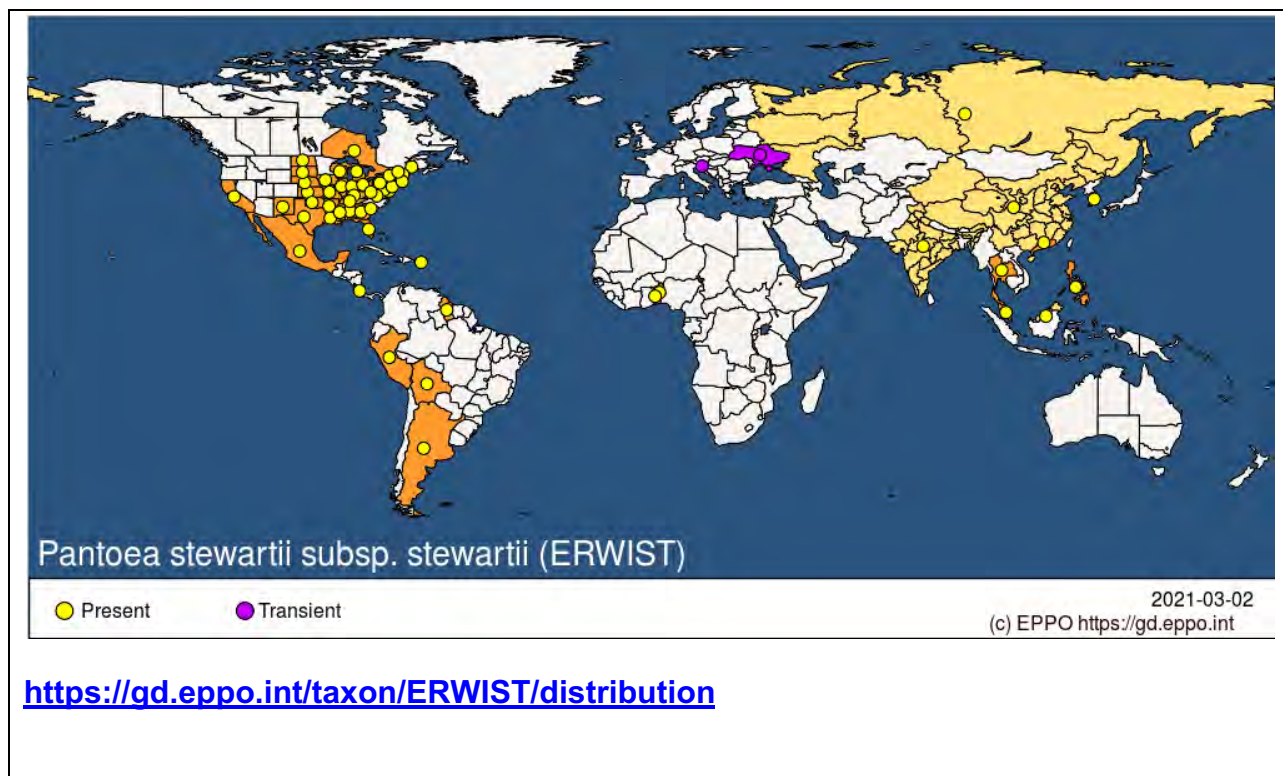
Origini:

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* è originario delle Americhe, in assenza del vettore è stato introdotto nelle altre parti del mondo con i semi di mais.

Distribuzione:

- Africa: Benin, Togo
- America: Argentina, Bolivia, , Costa Rica, Guyana, Messico, , Perù, Porto Rico, , Stati Uniti d'America (37 stati), Canada
- Asia: Cina, India, Korea, Malaysia, Philippines, Thailandia, Vietnam,,
- Europa: transiente in eradicazione in Slovenia, Russia, Ucraina

Mappa EPPO/CABI

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

- nel 2015 in Emilia-Romagna in colture di mais destinate alla produzione di semente
- nel 2016 in Emilia-Romagna in colture di mais destinate alla produzione di semente
- nel 2017 in Veneto in colture di mais destinate alla produzione di semente
- nel 2017 in Friuli Venezia Giulia in colture di mais destinate ad uso zootecnico
- nel 2018 in Emilia-Romagna, Friuli Venezia Giulia, Lombardia (2018/203) e Veneto in colture di mais
- nel 2019 in Veneto in colture di mais destinate alla produzione di semente (Eradicate – dopo controllo risultate negative)

Attualmente è considerata ufficialmente assente, eradicata (EPPO report 06/2020 – numero articolo 2020/130)

Rischio di introduzione:**Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi**

Scambi commerciali con Paesi Terzi in cui il patogeno è presente o transiente.

Negli scambi commerciali con i paesi EU verificare l'assenza del patogeno

Nota: USDA ha richiesto alla commissione europea, di rendere "più morbide" le condizioni per l'importazione di semente di mais in UE relativamente a *Pantoea stewartii* (Reg. 2016/2031).

Negli ultimi 5 anni (2016- 2020) le intercettazioni sono state le seguenti:

Country of Export	year	Object	Hosts (No. of interceptions)
Mexico	2017	Intended for planting : Seeds	Zea mays (3)

PARTE C – DIAGNOSI

Normativa di riferimento per Protocolli diagnostici:

EUROPEA:

NAZIONALE:

Protocolli standard di riferimento:

PM7 EPPO:

PM 7/60 (2), EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 226–236

Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato (riportato in IO 05)

- (IV) **Morphological identification** (per il vettore)
- (VIII) **Selective culture media** (include l'identificazione visiva delle colonie sospette)
- (IX) **IF Test**
- (X) **Biotest (pathogenicity test)**
- (XI) **Biochemical Test**
- (XIV) **ELISA**
- (XV) **PCR**
- (XIX) **PCR + Sequencing**
- (XX) **Real Time - PCR**

Matrice

- 5 - 10 foglie, brattee, spighe e/o infiorescenze maschili che presentano i sintomi della malattia.
- 400 semi suddivisi in sub-campioni fino a 100 semi ciascuno e messi in sacchetti di plastica.

Estrazione di batteri da campioni di pianta

Le parti di pianta che mostrano i sintomi sono sterilizzate con etanolo al 70% per 5–10 secondi, risciacquate con acqua sterile e tagliate al margine esterno delle lesioni. Le parti vegetali vengono quindi macerate in un sacchetto di plastica con pochi millilitri di tampone fosfato sterile (PB) o sminuzzati (leggermente frantumati) in una capsula di Petri sterile con PB sterile. L'estratto viene raccolto in un tubo monouso sterile e utilizzato immediatamente e / o conservato a circa 4-10 °C oppure in ghiaccio.

Eseguire l'isolamento su terreno selettivo immediatamente dopo la macerazione (cod. IO VIII), poiché il numero delle cellule vitali del patogeno decresce velocemente. Per i dettagli della metodica consultare il EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2).

Estrazione dei batteri dai semi (da qui denominato estratto da seme)

I semi trattati con qualsiasi prodotto fitosanitario devono essere lavati con acqua fino a quando l'acqua non risulta chiara per rimuovere il prodotto dalla superficie del seme (in questi casi, il rapporto dovrebbe menzionare che i semi sono stati trattati). Per l'ottenimento dell'estratto dai semi eseguire le fasi riportate nel EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2).

Tipologia di test per identificazione

Test di screening (cod. IO 05 IX e XX):

Immunofluorescenza (IF) e la real time PCR sono indicate come test di screening in EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2).

- Immunofluorescenza (cod. IO 05 IX). Gli estratti di pianta e di semi e le loro diluizioni 10x e 100x in PB sono utilizzati per la colorazione IF indiretta, per i dettagli della metodica consultare EPPO Bulletin(2016) PM 7/60 (2).
- Real time PCR (cod. IO 05 XX). L'agente patogeno può essere rilevato mediante PCR real-time eseguita sui macerati ottenuti da parti di piante sintomatiche o da estratti di semi secondo la metodica di Tambong et al., 2008. La metodica è descritta in EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2).

Nel caso in cui un campione risulta positivo con i test di screening si procede con l'**isolamento del patogeno su piastre con terreno selettivo** (cod. IO 05 VIII).

Si procede con l'isolamento del patogeno su piastre con terreno selettivo King's B addizionato, nutrient-broth yeast extract agar (NBYS) e/o yeast peptone glucose agar (YPGA) come riportato nel EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2)

Il numero di cellule vitali diminuisce rapidamente nei macerati, **si consiglia di eseguire l'isolamento entro 24 h dalla estrazione per il test di screening**. La sospensione deve essere conservata a -20 C° in 10-30% di glicerolo (questa tipologia di conservazione potrebbe compromettere il risultato dell'isolamento). Gli estratti da porzioni di pianta sintomatica e gli estratti di semi per effettuare l'isolamento sono trattati come riportato in EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2).

Test di identificazione sulle colonie pure dopo isolamento (cod. IO 05 IX, XI, XIV, XV, XIX e XX):

L'identificazione delle colonie pure degli isolati presunti di *P. stewartii* subsp. *stewartii* dovrebbe essere effettuata adottando almeno due test basati su due differenti principi biologici. I principali test di identificazione sono: sierologici (immunofluorescenze e ELISA), molecolari, barcoding e profilo degli acidi grassi.

Ad oggi tra i test di identificazione maggiormente utilizzati sono:

Test sierologici (cod. IO 05 XIV): saggio ELISA per isolati presunti di *P. stewartii* subsp. *stewartii* possono essere eseguiti utilizzando un kit di Agdia (Elkhart, Stati Uniti), seguendo le istruzioni del fornitore. Le istruzioni dettagliate sono fornite nel PM 7/101 ELISA (EPPO, 2010b).

Test molecolari (cod. IO 05 XV e XX): Test PCR. Due test di PCR tradizionali e real time PCR sono descritti nel EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2). A causa della bassa sensibilità della PCR convenzionale ($\leq 10^7$ cfu mL⁻¹), una sufficiente quantità di cultura pura dovrebbe essere analizzata.

- Conventional PCR con AGES primer. Con questa metodica si può analizzare il DNA estratto da coltura pura
- PCR modificata da Coplin & Majerczak (2002). Con questa metodica si può analizzare il DNA estratto da isolati batterici
- Real-time PCR come riportato da Tambong et al. (2008). Si possono analizzare acidi nucleici di tessuti sintomatici, estratti di seme e colonie sospette.

Test di patogenicità (cod. IO 05 X)

Nel caso in cui si ottengano risultati positivi con i test di identificazione in aree indenni, è necessario ottenere conferma dell'infezione attiva da *P. stewartii* subsp. *stewartii* mediante test di patogenicità inviando il materiale in centri di riferimento dotati di serre da quarantena (ad. Es CREA). Il test di

patogenicità viene eseguito su 10 piante (di 8-14 giorni/allo stadio di 1-2 foglia) di ibridi suscettibili inoculate in serra. Per i dettagli della metodica consultare EPPO Bulletin (2016) PM 7/60 (2).

Test sui vettori (cod. IO 05 IV e XX)

Al rientro in laboratorio gli insetti presenti in ogni provetta devono essere separati ad occhio nudo o con l'aiuto di un binocolare nelle famiglie, generi o specie per cui è possibile l'identificazione morfologica (Cod. IO 05 IV). Successivamente i campioni sono inseriti individualmente (una provetta per ogni specie/genere/famiglia indentificata) in una provetta etichettata contenente etanolo assoluto per consentire la conservazione.

Gli insetti così preparati possono venire conservati a temperatura ambiente fino al momento di essere processati per la ricerca di *P. stewartii* mediante real time PCR secondo la metodica di Tambog

Aggiornamenti diagnostici

Nell'ambito del progetto europeo H2020 Valitest è stato svolto un test performance study - TPS codice "Pstew-1" per *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. Sono stati determinati i performance criteri per differenti test diagnostici. Sono stati selezionati i seguenti test già inclusi nel EPPO PM 7/60 (2), Real-time PCR Tambog et al ., 2008 (Journal of Applied Microbiology 104, 1525–1537) e PCR AGES, 2016 (EPPO Bulletin 46 (2): 226-236) e nuovi test che hanno mostrato buoni parametri.

I nuovi test selezionati non presenti nel protocollo EPPO sono la Real-time PCR Thwaites et al . (FERA protocollo, EUPH05 *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* Final Report); la Real-time PCR Wensing et al ., 2010 (Applied and Environmental Microbiology, 76:6248-6256); la Real-time PCR Pal et al . 2019 (Plant Disease, accepted for publication); la PCR Gehring et al ., 2014 (Journal of Applied Microbiology 116: 1553-1562) (*galE* locus).

In particolare il test Real-time PCR Pal et al. 2019 presenta buoni valori di validazione.

Riguardo alla metodica di estrazione del DNA da matrice vegetale è stata indicata la percentuale di risultati validi ottenuti con differenti metodi di estrazione. Per l'attività del TPS sono stati utilizzati i seguenti kit non indicati nel protocollo EPPO: QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile) DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), Dneasy mericon Food Kit (Qiagen) e PREP-GS kit (AgroDiagnostica), QIASymphony mericon Bacteria Kit (Qiagen).

I dettagli sono riportati al seguente link: <https://www.valitest.eu/>

Riferimenti Bibliografici

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.

- EPP0 (2009). EPP0 Diagnostic Standard PM 7/97 (1). Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin 39, 413–416.
- EPP0 (2010a). EPP0 Diagnostic Standard PM 7/100. Rep-PCR tests for identification of bacteria. Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin 40, 365–368.
- EPP0 (2010b). EPP0 Diagnostic Standard PM 7/101 (1). ELISA tests for plant pathogenic bacteria. Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin 40, 369–372.
- EPP0 (2016). EPP0 Global database <https://gd.eppo.int/> last accessed on 07 June 2016.
- EPP0 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
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.11.4421-4426.1997>

Sitografia

www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/StewartsWilt.aspx

www.plantwise.org

www.worldseed.org

Scheda redatta con il contributo di: Dott.ssa Valeria Scala – CREA-DC; GdL per “*Pantoea stewartii*”;
GdL per “Monitoraggio cofinanziato reg. 652/2014 - EU”