



Ministero delle  
politiche agricole  
alimentari e forestali



## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

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

Tristezza degli agrumi/*Tristeza of citrus*

### 2 - Nome scientifico/Scientific name

Virus della tristezza degli agrumi/*Citrus tristeza virus* (CTV)

### 3 – EPPO Code

CTV000

### 4 - Posizione tassonomica/Taxonomy

- Kingdom: Viruses and viroids
- Category: *Riboviria*
- Family: *Closteroviridae*
- Genus: *Closterovirus*
- Species: *Citrus tristeza virus*

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

*Citrus tristeza virus* (CTV) è un virus a singolo filamento di RNA (~ 19,3 Kb) appartenente al genere *Closterovirus*, famiglia *Closteroviridae*.

Il CTV è un virus che si localizza all'interno dei tessuti floematici della pianta e si caratterizza per essere presente in natura sotto forma di numerosi ceppi che differiscono tra loro per virulenza e trasmissibilità da parte di afidi vettori. Diverse specie di afidi trasmettono il CTV in maniera semi-persistente. L'afide bruno degli agrumi, *Toxoptera citricidus* (sin. *T. citricida*), è il vettore più efficiente del virus. Nativa probabilmente dell'Asia, *T. citricidus* è oggi presente nella maggior parte dei Paesi dell'emisfero australe ed in Asia orientale. Nel 1994, la sua presenza è stata segnalata in Portogallo, nell'isola di Madeira da dove poi l'insetto è diffuso raggiungendo prima la terraferma portoghese (2004) e poi la Spagna (2005). Ad oggi, non si segnala la presenza di *T. citricidus* in altri Paesi europei e del bacino del Mediterraneo al di fuori di Portogallo e Spagna. Altre comuni specie afidiche sono, tuttavia, in grado di trasmettere in maniera efficiente il virus laddove la *T. citricidus* non è presente tra cui, in particolare, *Aphis gossypii* e *A. spirecola*. Infine, le specie *A. citricola*, *A. craccivora*, *Myzus persicae* e *T. aurantii* risultano essere vettori del CTV anche se con capacità ridotte. La trasmissione attraverso gli afidi è, generalmente, di breve distanza, responsabile per lo più della diffusione del virus all'interno del campo a partire da fonti

di inoculo giunte dall'esterno (ad esempio, con materiale di propagazione infetto). I movimenti a lunga distanza sono, invece, determinati prevalentemente dallo scambio ed utilizzo di materiale infetto. Oltre che tramite insetto vettore il CTV si trasmette meccanicamente attraverso l'innesto e ciò, unitamente all'utilizzo estensivo dell'arancio amaro come portinnesto, è da ritenersi la principale causa di diffusione del virus in tutte le maggiori aree agrumicole del mondo.

### Sintomi

La manifestazione della malattia è legata a diversi fattori quali, in particolare, la combinazione d'innesto, la suscettibilità della specie e/o della varietà e il tipo di isolato virale infettante. La complessità dei sintomi osservabili in campo ha portato a definire tre quadri sintomatologici caratteristici: il deperimento, la butteratura del legno ed il giallume dei semenzali.

Il **deperimento** si evidenzia con un aspetto sofferente e clorotico della pianta dovuto alla necrosi dei tessuti floematici al disotto del punto di innesto con conseguente alterazione del flusso linfatico dalla chioma alle radici. Questa sindrome è tipicamente legata alla combinazione di innesto e si manifesta in presenza di portinnesti suscettibili quali, l'arancio amaro (*Citrus aurantium*) e l'alemow (*C. macrophylla*). In alcuni casi, il deperimento può avere un decorso lento, con riduzioni di sviluppo della pianta accompagnato da defogliazioni, disseccamenti, proliferazione di gemme nella parte terminale dei rami, produzione di frutti scarsa e di qualità scadente. In alcune combinazioni di innesto, è tipica anche la comparsa di estroflessioni puntiformi del legno e rispettiva alveolatura della corteccia sulla faccia cambiale (*inverse pitting*) in prossimità del punto di innesto. In altri casi, invece, il deperimento può essere rapido (*quick decline*) e nel giro di pochi anni dall'infezione la pianta va incontro a morte. In presenza dell'arancio amaro come portinnesto, la maggior parte degli isolati di CTV sono in grado di causare deperimento e vengono, per questo, classificati come 'severi'. Tuttavia, sono noti isolati che infettano la pianta senza causare sintomi di deperimento e per questo definiti 'blandi'. Al contrario dell'arancio amaro e dell'alemow, l'arancio trifoliato (*Poncirus trifoliata*) manifesta resistenza nei confronti della maggior parte degli isolati di CTV ad eccezione di alcuni isolati ricombinanti (isolati RB, *resistance-breaking*) rinvenuti per la prima volta in Nuova Zelanda e, successivamente, nelle Hawaii, in Porto Rico, Repubblica Dominicana e Sud Africa ma tutt'ora assenti in Europa.

La **butteratura del legno** (*stem pitting* - SP) è una manifestazione sintomatologica che interessa in maniera più o meno diffusa ed evidente il tronco, i rami e le radici con comparsa di distorsioni e puntature alveolari (butteratura) sottocorticali. Questi sintomi possono essere osservati rimuovendo la corteccia dalle branche e dal tronco tuttavia, nelle manifestazioni più severe, possono rendersi visibili anche sulla corteccia sotto forma di aree depresse. In casi severi, la distorsione del legno va a compromettere le cellule del cambio con conseguente inibizione del sistema vascolare della pianta e, quindi, del corretto movimento dell'acqua e dei nutrienti. Ciò causa la comparsa di sintomi collaterali che si accompagnano a quelli sul legno, quali: taglia della pianta ridotta, foglie clorotiche, produzione di frutti di piccola dimensione e scarsa qualità organolettica, limitata sopravvivenza della pianta in campo. Questo quadro sintomatologico, indotto da particolari isolati severi di CTV (isolati SP), è stato osservato ad oggi solo in aree agrumicole del Sud America, Asia, Australia e Sud Africa. Contrariamente al deperimento, la cui manifestazione è legata alla combinazione d'innesto, la butteratura del legno colpisce la varietà innestata indipendentemente dal tipo di portinnesto impiegato. Il pompelmo e le lime sono particolarmente suscettibili alla butteratura ma anche l'arancio dolce può essere gravemente colpito.

Il **giallume dei semenzali** (*seedling yellows* – SY) è un quadro sintomatologico caratterizzato, principalmente, da una intensa colorazione gialla osservabile sui semenzali di pompelmo, limone Eureka e arancio amaro quando infetti da particolari isolati di CTV (isolati SY). Oltre al giallume, i semenzali infetti possono manifestare nanismo, clorosi fogliare e, in presenza di isolati particolarmente severi, anche suberificazione delle nervature e cessazione completa della crescita. Rispetto al deperimento e alla butteratura del legno, questa sintomatologia è economicamente meno importante.

**6 - Piante ospiti/Hosts**

In natura, il CTV è in grado di infettare numerose specie di piante appartenenti alla Famiglia delle Rutaceae ed in particolare al Genere Citrus. Fra quest'ultime, le specie *C. aurantium* e *C. sinensis* sono considerate ospiti maggiori. Incidentalmente, il virus può infettare anche piante appartenenti ai generi *Citroncirus*, *Clausena* e *Fortunella* e numerose altre specie, fra cui *Aeglopsis chevalieri*, *Afraegle paniculata*, *Arracacia xanthorrhiza*, *Citropsis gilletiana*, *Pamburus missionis* e *Poncirus trifoliata*.

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

- Il rischio maggiore è legato alla possibile introduzione di isolati di CTV, quali quelli SP e RB, attualmente non segnalati nel territorio europeo. Sebbene la legislazione europea (Reg. UE 2019/2072) vieta l'importazione di piante di *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* e loro ibridi da Paesi Terzi, i punti di ingresso doganali restano i principali siti a rischio in relazione alla possibilità di scambi illegali di tali materiali vegetali.
- Considerato l'uso ornamentale di diverse specie di Citrus, quali ad esempio i kumquant (*Fortunella* sp.) ed il calamondino (*Citrofortunella microcarpa*) altri possibili siti a rischio possono essere rappresentati da vivai e garden soprattutto in relazione al fatto che la diversità (biologica e genomica) degli isolati di CTV eventualmente presenti in queste specie resta tutt'oggi ancora poco indagata.

**PARTE A – MONITORAGGIO/SURVEY****Normativa di riferimento su modalità di monitoraggio:****EUROPEA:**

- non presente

**NAZIONALE:**

- DECRETO 31 ottobre 2013. Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi «Citrus Tristeza Virus» (*G.U. Serie generale - n. 23 del 29-1-2014*).

*Con questo Decreto è stato abrogato il precedente DM 22 novembre 1996 «Lotta obbligatoria contro il virus della tristezza degli agrumi "Citrus Tristeza Virus"»*

**Standard di riferimento****PM EPPO:**

- non presente





**OTHER:**

- IPPC - International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 31, Appendix 5 (2008): Methodologies for sampling of consignments.
- EFSA Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus

**Misure di monitoraggio:**

- Ispezione visiva/*Visual inspection*
- Campionamento/*Sampling*

<b>Ispezione visiva/Visual inspection</b>		
<b>Quando fare l'ispezione</b>	<b>Cosa guardare</b>	<b>Immagini</b>
Durante tutto l'anno	<p>1) <u>Se possibile, accertare sempre il tipo di portinnesto</u> Piante su portinnesti resistenti possono essere infette ma non manifestare sintomi</p> <p>2) <u>Osservare le condizioni generali della pianta</u> Piante infette (sia da isolati che inducono declino - in combinazioni di innesto suscettibili - sia da isolati SP) mostrano un deperimento generale con l'assenza di nuovi germogli sulle branche o sui rami.</p> <p>3) <u>Esaminare il tronco inclusa la zona del colletto</u> Escludere che il deperimento possa essere dovuto alla presenza di altri patogeni in grado di dare sintomi sul legno.</p> <p>4) <u>Esaminare un tassello di corteccia prelevato in corrispondenza del punto di innesto</u> Osservare se sulla faccia interna – al di sotto della linea d'innesto - sono presenti alveolature puntiformi a cui corrispondono estroflessioni sul legno; osservare se è presente una linea marrone lungo il punto d'innesto.</p>	  <p><i>Marciume radicale</i>      <i>Gommosi del colletto</i>      <i>Exocortite</i></p> <p>Da: Mario Salerno, Giuseppe Cutuli. <i>Guida illustrata di Patologia degli Agrumi</i>. Ed. Edagricole, 1992</p>  <p><a href="https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos">https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos</a></p>

	<p>5) <u>Osservare le nervature fogliari</u> Le piante infette dal virus possono manifestare decolorazione delle nervature.</p> <p>6) <u>Su rami e tronco</u> Osservare la presenza di distorsioni o malformazioni del legno o di aree depresse sulla corteccia; in casi sospetti, togliere la corteccia da una porzione di ramo per osservare il legno sottostante. Questi sintomi sono tipici di infezioni causate da isolati SP.</p>	  <p><a href="https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos">https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/photos</a></p>
<p style="text-align: center;"><b><u>Vettore</u></b></p> <p>Il monitoraggio dovrà essere rivolto, in modo particolare, all'afide <i>T. citricidus</i> unica specie afidica, fra quelle vettrici di CTV, non ancora presente in Italia e caratterizzata da elevata efficienza di trasmissione del virus.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per la sua individuazione è consigliabile ispezionare i nuovi germogli dell'anno (l'uso di trappole cromotropiche gialle può aiutare nel monitoraggio delle forme alate dando un'indicazione sulla presenza dell'afide in una determinata area ma non consente una individuazione precoce dei focolai).</li> <li>• Gli individui si presentano di taglia media (1,5 – 2,8 mm) e con una colorazione brillante, nera (forme alate) o variabile dal marrone scuro al nero (forme attere).</li> <li>• Se schiacciati su una superficie bianca, lasciano una macchia rossa; se messi in alcool colorano il liquido di un rosso intenso mentre non accade con individui appartenenti ad altre specie di <i>Toxoptera</i>.</li> </ul> <p>Tutte le identificazioni in campo vanno confermate in laboratorio mediante osservazione al microscopio ottico di esemplari montati su vetrino, utilizzando idonee chiavi tassonomiche di riconoscimento. Gli individui campionati possono essere conservati in alcool al 70 – 80%.</p>	<p>Forme alate e attere di <i>T. citricidus</i></p>   <p><a href="https://gd.eppo.int/taxon/TOXOCI/photos">https://gd.eppo.int/taxon/TOXOCI/photos</a></p>	



### Campionamento/Sampling

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
<ul style="list-style-type: none"> <li>Il campione standard per singola pianta adulta consiste in 5 germogli dell'anno o peduncoli di frutti oppure 10 foglie completamente espanse o 5 fiori o frutti. Indipendentemente dal tipo di campione, il prelievo deve essere fatto in punti diversi della chioma da ciascuna branca principale della pianta.</li> <li>Riunire i sub-campioni in un unico campione, ponendoli in una busta di plastica.</li> <li>Siglare la busta e contrassegnare la pianta campionata, in maniera corrispondente con la sigla attribuita al campione.</li> </ul> <p>Nell'areale mediterraneo, i campioni possono essere prelevati durante tutto il periodo dell'anno ad eccezione dei mesi più caldi (luglio e agosto); tuttavia, il prelievo eseguito in primavera offre maggiori garanzie per la diagnosi del virus poiché la carica virale è più alta rispetto agli altri periodi vegetativi.</p> <p>Per le modalità di campionamento, finalizzate al monitoraggio del CTV, seguire le indicazioni riportate nel <b>Decreto 31 ottobre 2013</b>, di seguito sintetizzate.</p> <p><b>1. <u>Agrumeti commerciali in zone indenni, focolaio, tampone e in regime contenimento.</u></b></p> <p>Prelevare i campioni sul 12,5% delle piante presenti nei singoli impianti, secondo il metodo «Gottwald &amp; Hughes – 2000» modificato. Le piante campionate devono essere distribuite equamente sulla superficie dell'impianto, seguendo un percorso regolare:</p>	<p>Il materiale vegetale deve essere conservato, asciutto, in buste di plastica. Durante il prelievo in campo, mantenere i campioni al fresco per evitarne la disidratazione.</p> <p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non comprimere le piante/parti vegetali campionate.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio il materiale va conservato in frigorifero a 4°C, per non più di 7 giorni (i frutti non oltre 1 mese).</p> <p>Spedizione del campione: i campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore dal loro prelievo, preferibilmente in borse termiche evitando il contatto diretto con piastra eutettica (siberino)</p>																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
<p><b>PRELIEVO DEI CAMPIONI IN AGRUMETI COMMERCIALI</b></p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 5%;">inizio</td> <td>1</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>2</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>3</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>4</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>5</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>6</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>7</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>8</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>9</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>11</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>12</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>13</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>14</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>15</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>16</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>17</td><td>x</td><td>x</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>18</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">fine</td> <td>19</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>20</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>			inizio	1	x	x																		2																				3																				4																				5	x	x																		6																				7																				8																				9	x	x																		10																				11																				12																				13	x	x																		14																				15																				16																				17	x	x																		18																			fine	19																				20																		
inizio	1	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	5	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	7																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	9	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	11																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	13	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	17	x	x																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
fine	19																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
	20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

## 2. Agrumeti commerciali in zone di insediamento.

Nelle zone di insediamento, al fine di individuare eventuali focolai di ceppi severi, il monitoraggio deve essere effettuato su piante di agrumi sintomatiche. L'indagine deve essere fatta con esame visivo e prelievo di campioni da piante sintomatiche. I campioni devono essere analizzati per la presenza del CTV e se risultano infetti deve essere avviata la caratterizzazione del ceppo.

## 3. Fonti di approvvigionamento di materiale di propagazione e vivai ubicati in zone indenni, focolaio, tampone e contenimento.

I campioni debbono essere prelevati da:

- a) il 100% delle piante madri;
- b) almeno il 10% delle piante in sezione incrementale;
- c) almeno il 5% delle piante in allevamento per ogni singolo lotto omogeneo per i vivai.

I campioni devono essere costituiti come segue:

- a) fonti di approvvigionamento: si prelevano n. 4 germogli per pianta per costituire n. 1 campione;
- b) sezioni incrementali e dei lotti di piante in allevamento: si preleva n.1 germoglio per singola pianta da piante selezionate a random. I germogli prelevati si aggregano a gruppi di n. 5 germogli per costituire n. 1 campione, oppure si analizzano singolarmente prelevando 2 germogli per pianta.

## 4. Fonti di approvvigionamento di materiale di propagazione e vivai ubicati in zone di insediamento

I campioni debbono essere prelevati da:

- a) il 100% delle piante madri;
- b) almeno il 10% delle piante in sezione incrementale;
- c) almeno il 50% delle piante in allevamento per ogni singolo lotto omogeneo per le produzioni in *screen house*;
- d) tutte le piante in allevamento per le produzioni in piena aria

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

### Inquadramento normativo

#### EUROPEA

- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione del 28 novembre 2019 che stabilisce condizioni uniformi per l'attuazione del Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante. In base a questo regolamento:
  - CTV isolati non UE, sono considerati **organismi nocivi da quarantena** di cui non è nota la presenza nel territorio dell'Unione (*ALLEGATO II*, Parte A, F5);
  - CTV isolati UE, sono considerati **organismi nocivi regolamentati non da quarantena (ORNQ)** rilevanti per l'Unione (*ALLEGATO IV*, Parte D e Parte J);
  - *T. citricidus*, è considerata **organismo nocivo da quarantena** di cui è nota la presenza nel territorio dell'Unione (*ALLEGATO II*, Parte B, C6).

**Nota:** in accordo con l'Opinione Scientifica sulla categorizzazione degli isolati non europei di CTV pubblicata dal 'Panel on Plant Health' (PLH) dell'EFSA (EFSA PLH Panel, 2017), vanno considerati **isolati non UE**:

- gli isolati in grado di causare sintomi severi di *stem-pitting* (SP) su arancio dolce;
- gli isolati ricombinanti (RB) in grado di superare la resistenza dell'arancio trifogliato (*Poncirus trifoliata*) o dei suoi ibridi.

#### NAZIONALE

- **Decreto 31 ottobre 2013**. Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi «Citrus Tristeza Virus» (*G.U. Serie generale - n. 23 del 29-1-2014*).

### Inquadramento EPPO

- **EPPO A2 List - List of pests recommended for regulation as quarantine pests (version 2019-09): pests locally present in the EPPO region.**

**Nota:** nella stessa lista è incluso l'afide vettore *T. citricidus*.

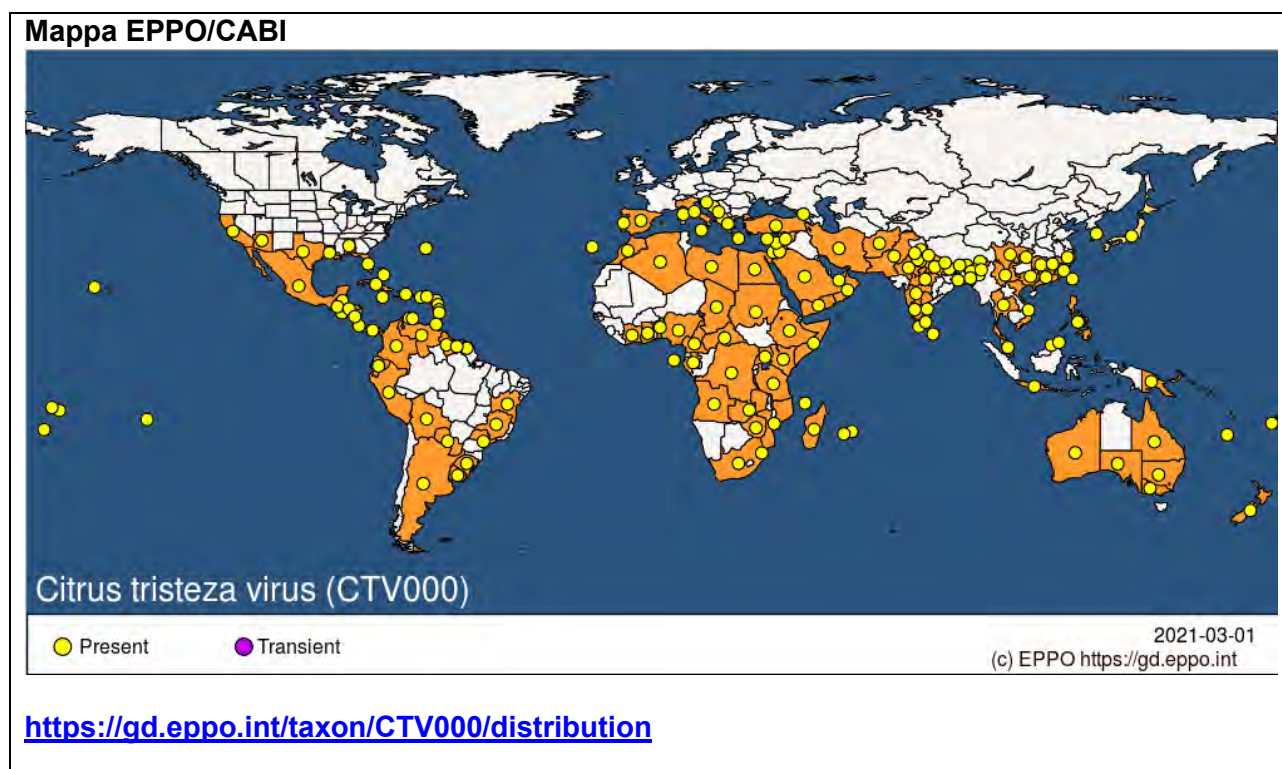
### Origini

Si assume che il CTV sia originario della Cina. Più in generale, si fa coincidere l'origine del virus con la zona di provenienza degli agrumi, ovvero zone tropicali e subtropicali dell'Asia.

### Distribuzione

La malattia è stata osservata per la prima volta alla fine dell'800 in Sud Africa ed Australia. Successivamente fu segnalata in Argentina e Brasile dove fu coniato il termine di 'tristeza' per indicare il deperimento osservato sulle piante infette. Dal Sud America si è diffusa, intorno agli anni '50, negli USA (California, Florida, Texas) per poi giungere nell'area del bacino del Mediterraneo (Israele, Spagna e Paesi Nord Africani) nei primi anni '50 ed infine in Europa e Asia.





### Presenza e/o segnalazioni in Italia

In Italia il CTV è stato segnalato per la prima volta in Sicilia (Acireale, CT) nel 1955. In seguito, sporadiche infezioni sono state segnalate in Calabria e Sardegna e, più tardi, anche in alcuni vivai della Toscana (1995). A partire dal 1996, con l'inizio dell'attività di monitoraggio conseguente all'emanazione del decreto di lotta obbligatoria, vengono individuati i primi importanti focolai di infezione in Sicilia e Puglia (2002 – 2005) e, successivamente, in Calabria (2006). Intorno ai primi anni 2000, la presenza del virus è stata riscontrata anche in alcuni vivai del Lazio in lotti di piante prodotte in altre regioni e normalmente destinate alla vendita a soggetti non professionali.

### Rischio di introduzione

Il rischio di introduzione riguarda gli isolati di CTV in grado di indurre la butteratura del legno e gli isolati RB per i quali, ad oggi, non è nota la presenza sul territorio dell'Unione Europea. La pericolosità di questi isolati è legata, non solo ai danni che causano alla pianta ma anche alla capacità che possiedono di superare la tolleranza propria di alcuni portinnesti oggi largamente impiegati per il controllo in campo delle epidemie di CTV.

Il Regolamento di esecuzione UE 2019/2072, emanato in attuazione del Regolamento UE 2016/2031, vieta l'introduzione di piante di *Citrus* L., *Fortunella* Swingle, *Poncirus* Raf., e loro ibridi da tutti i Paesi Terzi (*ALLEGATO VI*, punto 11) e pone delle restrizioni all'importazione dei relativi frutti, fra cui il fatto che debbono essere privi di peduncoli e foglie (*ALLEGATO VI*, punto 57). Pertanto, il rischio di introduzione dei suddetti isolati attraverso gli scambi commerciali con Paesi extraeuropei, che rappresenta il principale canale di ingresso, risulta scongiurato dall'attuale quadro normativo. Un rischio residuo rimane legato unicamente a:

- commercio di piante della famiglia delle Rutaceae al momento non note per essere ospiti naturali di CTV ma per le quali è stata dimostrata la possibilità di essere infettate sperimentalmente;
- ingresso accidentale di vettori viruliferi tramite piante non sottoposte a regolamentazione, prodotti di piante o spostamenti antropici;

- ingresso illegale di materiale di propagazione infetto di specie ospiti suscettibili, per uso commerciale o personale.

In tutti i Paesi dell'Unione Europea, ad eccezione di Spagna e Portogallo dove già presente, il rischio di introduzione riguarda anche l'afide vettore *T. citricidus*. In quanto organismo da quarantena è, tuttavia, sottoposto a misure di monitoraggio che tendono a mantenere basso tale rischio.

**Negli ultimi 5 anni (2016-2020) sono state registrate le seguenti intercettazioni per *Citrus tristeza virus***

Country of Export	Year	Object	Plant species (n° of interceptions)
Malta	2020	Intended for planting	<i>Citrus</i> (1)
Israele	2019	Fruit and vegetables	<i>C. medica</i> (1)

**INTERCETTAZIONI EUROPHYT *Toxoptera citricidus* ULTIMI 5 ANNI**

**Negli ultimi 5 anni (2015-2019) non sono state registrate intercettazioni**

## PARTE C – DIAGNOSI

### Normativa di riferimento per Protocolli diagnostici:

#### EUROPEA

- non presente

#### NAZIONALE

- **Decreto 31 ottobre 2013.** Misure fitosanitarie per il controllo del virus della tristezza degli agrumi «Citrus Tristeza Virus» (*G.U. Serie generale - n. 23 del 29-1-2014*).

### Standard di riferimento

#### PM7 EPPO

- PM 7/31(1), 2004 - "Diagnostic protocols for regulated pests. *Citrus tristeza closterovirus*"

#### DP IPPC (*International Plant Protection Convention*)

- International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 27, Annex 15 – Diagnostic protocols for regulated pests DP 15: *Citrus tristeza virus*

#### EFSA Pest survey card

- Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus

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

- (X) Biotest (saggio biologico su piante indicatrici)
- (XII) DTBIA=serological test 1
- (XIV) ELISA
- (XVI) RT - PCR= Molecular testing 1
- (XVIII) LAMP=Molecular testing 3
- (XIX) RT PCR+Sequencing (va indicato quando si fa insieme l'RT-PCR e si invia al sequenziamento)
- (XXI) RT-Real Time PCR - molecular testing 4

#### Caratterizzazione degli isolati di CTV (Cod. IO 05 X)

Per la discriminazione degli isolati di CTV EU e non-EU si suggerisce di seguire quanto riportato nell'opinione scientifica dell'EFSA Panel on Plant Health (2017), ovvero di combinare sempre i risultati dei saggi (molecolari e sierologici) di laboratorio con quelli del saggio biologico. Per l'esecuzione di tale saggio si può fare riferimento a quanto riportato in Garnsey et al. (2005) e Wang et al. (2013)

### Matrice

#### Preparazione del campione

Per le analisi molecolari, il materiale vegetale raccolto (tipicamente foglie) può essere preventivamente polverizzato in azoto liquido. Le polveri così ottenute possono essere conservate a -20°C anche per diversi mesi prima dell'analisi. In alternativa, il materiale fresco può essere

macerato in tampone fosfato (PBS), pH 7.2–7.4 (*NaCl*, 8 g; *KCl*, 0.2 g; *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O*, 2.9 g; *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*, 0.2 g; acqua distillata fino al volume di 1 litro) addizionato con 0.2% sodio-dietil ditiocarbammato (DIECA) o 0.2% mercaptoetanolo mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore (manuale o meccanico) e, successivamente, centrifugato. Il pellet che si ottiene dopo aver eliminato il surnatante, può essere conservato -20°C fino al momento dell'estrazione.

### Tipologia di test per identificazione

#### **Test diagnostici sierologici ELISA (cod. IO 05 XIV)**

Si prevede l'utilizzo di kit commerciali per lo più analoghi sensibilità e specificità. Per la loro esecuzione seguire le istruzioni riportate nel manuale tecnico fornito dalla Ditta produttrice. Inoltre, sono disponibili in commercio altri saggi sierologici basati su dispositivi later-flow.

Sono disponibili altri saggi sierologici paragonabili in termini di sensibilità all'ELISA, come il direct tissue immunoassay (DTBIA) - Garnesy et al., 1993 - (Cod IO 05 XII), mediante impressione di tessuti vegetali su membrana di nitro cellulosa e rilevamento tramite anticorpi specifici. Su questa metodologia sono disponibili kit commerciali (tissue-print immunoassay).

#### **Test diagnostici molecolari (cod. IO 05 XVI, XVIII, XIX e XXI):**

**Estrazione RNA totale.** L'estrazione dell'RNA totale può essere eseguita utilizzando protocolli di laboratorio, se opportunamente validati o kit commerciali di estrazione dell'RNA seguendo le istruzioni riportate nel manuale tecnico fornito dalla Ditta produttrice.

**Test molecolari.** Il virus può essere rilevato mediante un protocollo di RT-PCR adattato sulla base di quello descritto in Olmos *et al.* (1999) (cod IO 05 XVI, XIX) o tramite real-time RT-PCR, utilizzando kit commerciali 'ready-to-use' o il protocollo descritto in Saponari *et al.* (2008) (cod IO 05 XXI). Infine, una diagnosi rapida del virus può essere fatta mediante un protocollo di RT-LAMP adattato sulla base di quello descritto in Wang *et al.* (2013) (cod XVIII).

### Riferimenti Bibliografici

Chung K.-R. and Bransky R. H., 2006. Citrus Diseases Exotic to Florida: Citrus Tristeza Virus – Stem Pitting (CTV-SP). Electronic Data Information Source (EDIS) of University of Florida IFAS Extension, PP-227, <https://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/30/22/00001/PP14900.pdf>

Djelouah K., Valentini F., D'Onghia A.M. Historical review of *Citrus tristeza virus* in Italy. In: *Options Méditerranéennes, B n° 65, 2009 - Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus: a serious threat to the Mediterranean citrus industry*, 59 – 62.

EPPO, 2004. PM 7/31(1) - Diagnostic protocols for regulated pests. *Citrus tristeza closterovirus*. *EPPO/OEPP Bulletin*, **34**, 239 – 246.

EPPO, 2006. PM 7/75 (1) – Diagnostics. *Toxoptera citricidus*. *EPPO/OEPP Bulletin*, **36**, 451 – 456.

EPPO Global Database. Citrus tristeza virus (CTV000), <https://gd.eppo.int/taxon/CTV000>

EPPO Global Database. Toxoptera citricidus (TOXOCI), <https://gd.eppo.int/taxon/TOXOCI>

EFSA PLH Panel, 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of Citrus tristeza virus. *EFSA Journal* 2014;**12**(12):3923, 32 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3923>

EFSA PLH Panel, 2017. Pest categorisation of Citrus tristeza virus (non-European isolates). *EFSA Journal* 2017, **15**(10), doi:10.2903/j.efsa.2017.5031

EFSA Pest survey card, 2019. Pest survey card on non-European isolates of citrus tristeza virus. EFSA Supporting Publications, **16**(4): <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1600>

Futch S. H. and Bransky R. H., 2005. Field Diagnosis of Citrus Tristeza Virus. Electronic Data Information Source (EDIS) of University of Florida IFAS Extension, HS996, <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS24200.pdf>

- Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M., & Henderson, C. T., 1993. Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) for Detection of Citrus Tristeza Virus (CTV). *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 12(12). Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/5t45z8fb>
- Garnsey SM, Civerolo EL, Gumpf DJ, Paul C, Hilf ME, Lee RF, Brlansky R, Yokomi RK and Hartung JS, 2005. Biological characterization of an international collection of Citrus tristeza virus (CTV) Isolates. Proceedings of the 16<sup>th</sup> Conference of the International Organisation of Citrus Virologists, 2004. IOVC, Riverside, CA, USA, 491, pp. 75–93.
- Harper S.J., Dawson T.E. and Pearson M.N., 2010. Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology*, **155**, 471–480.
- IPPC, 2008. Methodologies for sampling of consignments. *International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM)* No. 31, Appendix 5, 2008.
- IPPC, 2016. Diagnostic protocols for regulated pests DP 15: *Citrus tristeza virus*. *International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM)* No. 27, Annex 15, 2016.
- Moreno P., Ambrós S., Albiach-Martí M.R., Guerri J. and Peña L., 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 251–268. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X>
- Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT & Terrada E (1999). New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research* **27**, 1564–1565.
- Saponari M., Manjunath K., Yokomi R.K., 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, **147** (2008): 43–53
- Wang Y.-J., Zhou Y., Li Z.-A., Su H.-N. Huang A.-J., Tang K.-Z., Zhou C.-Y., 2013. A RT-LAMP assay for detection of Citrus Tristeza Virus. *Scientia Agricultura Sinica*, **46**(3): 517-524.
- Wang JB, Bozan O, Kwon SJ, Dang T, Rucker T, Yokomi RK, Lee RF, Folimonova SY, Krueger RR, Bash J, Greer G, Diaz J, Serna R and Vidalakis G, 2013. Past and future of a century old Citrus tristeza virus collection: a California citrus germplasm tale. *Frontiers in Microbiology*, **4**, 366. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00366>

Autori: Dr Luca Ferretti (CREA-DC sede di Roma); GdL per “Monitoraggio cofinanziato reg. 652/2014”