



PROCEDURE DI INDAGINE PER:

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

Marciume anulare della patata/bacterial ring rot of potato; ring rot of potato; vascular potato wilt

2 - Nome scientifico/Scientific name

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Speckermann & Kotthoff, 1914) Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris 1984.

Sinonimi: *Corynebacterium michiganense* subsp. *sepedonicum* (Speckermann & Kotthoff 1914) Carlson & Vidaver 1982; *Corynebacterium michiganense* pv. *sepedonicum* (Speckermann & Kotthoff 1914) Dye & Kemp 1977; *Corynebacterium sepedonicum* (Speckermann & Kotthoff 1914) Skaptason & Burkholder 1942

3 – EPPO Code:

CORBSE

4 - Posizione tassonomica/Taxonomy

- Phylum: *Actinobacteria*
- Classe: *Actinobacteria*
- Subclass: *Actinobacteridae*
- Ordine: *Actinomycetales*
- Suborder: *Micrococchineae*
- Famiglia: *Microbacteriaceae*
- Genere: *Clavibacter*
- Specie: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

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

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Csm) sopravvive asintomaticamente come infezione latente nei tuberi di patata (*Solanum tuberosum*) e si diffonde principalmente con tuberi-seme infetti, anche attraverso il contatto diretto e la contaminazione delle attrezzature. È in grado di sopravvivere per lunghi periodi in ambiente secco e fresco e quindi la sua persistenza su attrezzature agricole, depositi e veicoli di trasporto è un ulteriore importante mezzo di diffusione. Persiste sul campo in tuberi di patata e piante infette dell'anno precedente migrando dal tubero seme ai fusti attraverso il tessuto vascolare.

La diffusione della malattia in campo da pianta a pianta è abbastanza trascurabile, ed è determinata dall'acqua di irrigazione o da alcuni insetti come la dorifora o l'afide verde del pesco. Il patogeno ha una temperatura di crescita ottimale bassa (21-23°C), tipica delle regioni più fresche di coltivazione della patata.

Sintomi:

Pianta: I primi sintomi si manifestano a stagione vegetativa inoltrata sulle foglie basali con avvizzimento ed arricciamento dei margini verso l'alto. In seguito, il decorso della malattia, che procede in senso acropeto, determina ingiallimenti delle aree internervali che evolveranno ad aree necrotiche e disseccamenti. Le piante gravemente infette muoiono prematuramente; è insolito che tutti i gambi di una pianta vengano colpiti, frequentemente solo uno o due steli per pianta sviluppano sintomi. Negli stadi avanzati della malattia, il tessuto vascolare degli steli infetti diviene marrone e può trasudare un essudato batterico lattiginoso con elevato significato diagnostico. Verso la fine della stagione vegetativa i batteri migrano dallo stelo verso il basso e attraverso i fasci vascolari dello stolone possono infettare in maniera latente e quindi asintomatica i tuberi, prima causa di disseminazione del patogeno.

Tuberi: i primi sintomi, facilmente confondibili con quelli causati dal marciume bruno di *Ralstonia solanacearum*, consistono in una decolorazione e vetrosità del tessuto vascolare. Dopo la raccolta la malattia continua a svilupparsi all'interno dei tuberi immagazzinati e l'alterazione del tessuto vascolare diventa sempre più evidente, dapprima come una linea scura e successivamente con la separazione dell'anello vascolare e con la fuoriuscita di gocce di essudato bianco-latteo dal tessuto, se applicata una leggera pressione. Esternamente i tuberi possono sembrare normali o si possono notare decolorazioni rossastre con eventuali fessurazioni. L'espressione sintomatica su piante e tuberi può variare notevolmente a seconda della cultivar di patata, delle condizioni ambientali e della presenza di altri organismi.

6 - Piante ospiti/Hosts

Nella regione EPPO, solo la patata (*Solanum tuberosum*) è considerata un ospite naturale significativo. La barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris*) è stata descritta come un ospite naturale asintomatico. Nei test di inoculazione, molti membri delle Solanacee, tra cui pomodori e melanzane, sono risultati suscettibili.

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

- Coltivazioni di patata
- Commercianti all'ingrosso di patate da seme (acquistati da altri paesi comunitari), soprattutto se proveniente da aree dove la malattia è endemica
- Punti di ingresso patata di importazione (tuberi per consumo), soprattutto se proveniente da aree dove la malattia è endemica
- Magazzini di stoccaggio
- Industrie di trasformazione

PARTE A – MONITORAGGIO/SURVEY

Normativa di riferimento disponibile sulle modalità di monitoraggio:

EUROPEA: non presente

NAZIONALE: non presente

Standard di riferimento:

PM EPPO:

PM 3/70 (1), Export certification and import compliance checking for potato tubers. EPPO Bulletin (2006) 36, 423-424

PM 3/71 General crop inspection procedure for potatoes. EPPO Bulletin (2007) 37, 592-597

PM 9/2 (2), *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* EPPO Bulletin (2011) 41, 385-388

EFSA card (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1569>)

Misure di monitoraggio:

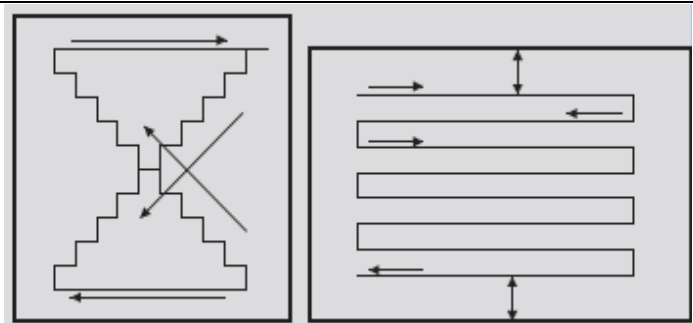
- ✓ Ispezione visiva – *Visual inspection*
- ✓ Campionamento – *Sample taking*

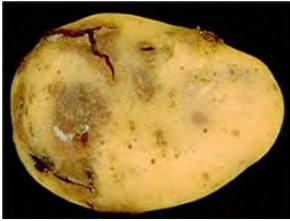




Ispezione visiva / *Visual inspection*

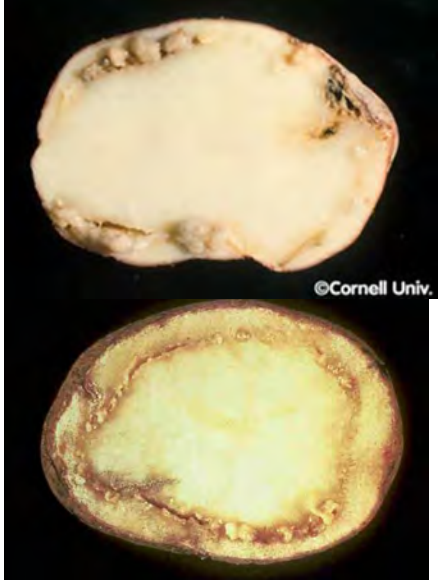
Conduzione dell'ispezione:

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 la georeferenziazione dei campi ispezionati.



Quando	Cosa guardare	Immagini
<p>prima del trapianto</p> <p>dall'emergenza all'inizio della maturazione</p>	<p>esaminare visivamente i tuberiseme (decolorazioni rossastre con eventuali fessurazioni)</p> <p>esaminare foglie basali delle piante per la presenza di avvizzimento ed arricciamento dei margini verso l'alto</p>	<div data-bbox="735 338 1026 557">  </div> <div data-bbox="1110 338 1417 566">  </div> <p data-bbox="735 589 1026 618">http://www.padil.gov.au</p> <div data-bbox="807 656 1331 1021">  </div> <p data-bbox="735 1039 1394 1093">http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/resource-hub/priority-pest-diagnostic-resources/</p> <div data-bbox="807 1122 1331 1429">  </div> <p data-bbox="735 1435 1394 1489">http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/resource-hub/priority-pest-diagnostic-resources/</p> <div data-bbox="815 1518 1337 1861">  <p data-bbox="815 1827 1007 1861">UC Statewide IPM Project © Regents, University of California</p> </div>

raccolta e post raccolta (tuberi da seme e da consumo)	<p>decolorazione dell'anello vascolare dei tuberi</p> <p>fuoriuscita di gocce di essudato</p>	<p>http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/resource-hub/priority-pest-diagnostic-resources/</p> 
--	---	---

Campionamento/Sample taking

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare
Campioni asintomatici	Il campione per i tuberi asintomatici è costituito da 200 tuberi	Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non comprimere il materiale prelevato. Contrassegnare con un ID-campione univoco e identificabile associato all'ispezione eseguita. Conservare in frigorifero a 4°C in attesa della consegna al laboratorio.
Campioni sintomatici.	Intera pianta	

PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

Inquadramento normativo disponibile

EUROPEA

- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072
- Union Quarantine pest (Anne x II B) Reg 2019/2072

NAZIONALE

- Decreto di lotta obbligatoria: DM 28 gennaio 2008 (GU n°76 del 31-3-2008)

Inquadramento EPPO

- Lista A2 dell'EPPO

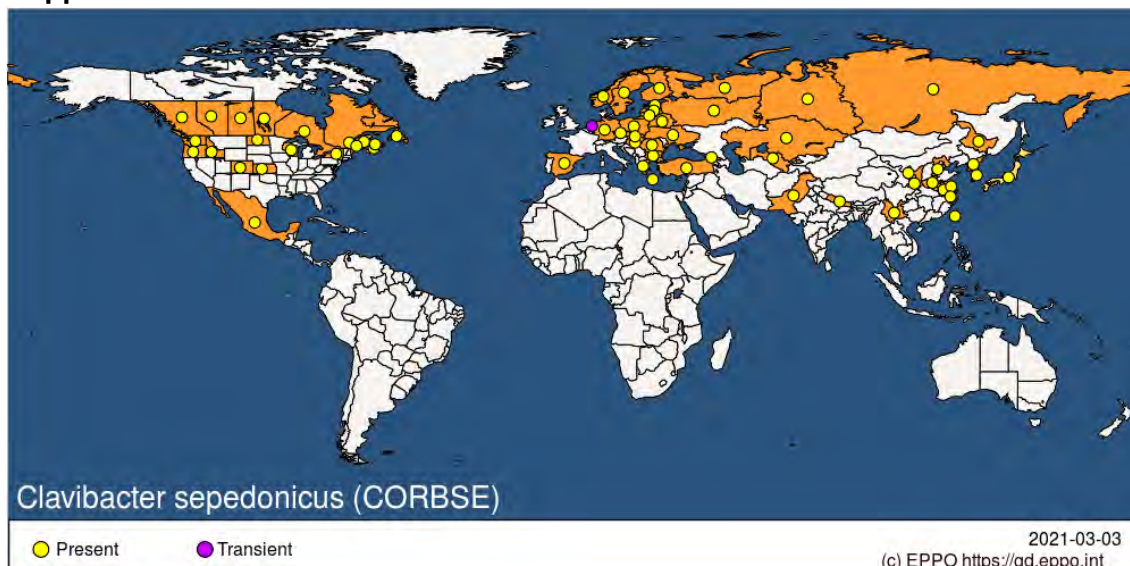
Origini:

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* è stato descritto per la prima volta in Germania nel 1905 (Appel, 1906). Nel 1932 la malattia fu segnalata in Norvegia (Jorstad, 1932), nel 1934 in Francia e nel 1940 in Russia (Belova, 1940). Nel 1931 la malattia si segnalò in Canada, nella provincia del Quebec. Negli Stati Uniti, segnalato per la prima volta nel 1932, già nel 1948 era presente in 45 stati (Baribeau, 1948).

Distribuzione

- America: Canada, Messico, Stati Uniti,
- Europa: (in aree circoscritte) Bielorussia, Bulgaria, Repubblica Ceca, Estonia, Finlandia, Georgia, Germania, Grecia, Lettonia, Lituania, Norvegia, Paesi Bassi (transiente), Polonia, Romania, Russia, Slovacchia, Spagna, Svezia, Turchia, Ucraina (diffuso), Ungheria.
- Asia: Cina, Giappone, Kazakistan, Corea del Nord, Corea del Sud, Nepal, Pakistan, Taiwan, Uzbekistan

Mappa EPPO/CABI



Legenda: Presente ■ Transente ■

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

Presenza e/o segnalazioni in Italia:

- 2000: patogeno assente (EPPO Reporting Service, 07)
- 2008: 2 intercettazioni (Servizio Fitosanitario Emilia-Romagna)
- 2009: 1 intercettazione (<http://www.citteriopatate.it/?p=1148>)

Rischio di introduzione:

Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi

Scambi commerciali di tuberi per consumo con Paesi Terzi in cui il patogeno è presente o transiente.

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

INTERCETTAZIONI *Clavibacter michiganensis*

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

Country of Export	year	Object	Plant Species (No. Of interceptions)
Turkey	2019	Other living plants: ware potatoes	<i>Solanum tuberosum</i> (1)
Israele	2018	Intended for planting: seeds	<i>Solanum lycopersicum</i> (2)
Thailandia	2018	Intended for planting: seeds	<i>Solanum lycopersicum</i> (1)
Turkey	2017	Other living plants: ware potatoes	<i>Solanum tuberosum</i> (1)
Turkey	2016	Other living plants: ware potatoes	<i>Solanum tuberosum</i> (1)

PARTE C – DIAGNOSI

Normativa di riferimento per Protocolli diagnostici:

EUROPEA:

NAZIONALE: Decreto di lotta obbligatoria DM 28 gennaio 2008 (GU n°76 del 31-3-2008)

Protocolli standard di riferimento

PM7 EPPO: PM 7/59 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

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

- (II) **Visual symptoms diagnosis** (diagnosi visiva per sintomi specifici/sospetti generalmente su stock di materiale campionato)
- (VIII) **Selective culture media** (comprende identificazione delle colonie)
- (IX) **IF Test**
- (X) **Biotest (pathogenicity test)**
- (XI) **Biochemical test**
- (XIII) **Lateral flow=Serological test 2**
- (XIV) **ELISA**
- (XV) **PCR**
- (XX) **Real Time-PCR**

Matrice (cod. IO 05 II):

Materiale asintomatico

Il campione standard da analizzare per i tuberi asintomatici è costituito da 200 tuberi, anche se il procedimento può essere applicato a campioni di dimensioni inferiori qualora non si disponesse di tale numero. (Eventuali tuberi con sintomi sospetti di marciume anulare devono essere isolati e trattati individualmente come materiale sintomatico).

Rimuovendo un nucleo di tessuto vascolare dall'ombelico di ciascun tubero seguendo il protocollo EPPO PM 7/59(1) si ottiene un concentrato batterico che viene risospeso e così suddiviso: 500 µl per il rilevamento di *C. m. subsp. sepedonicus*, 500 µl per il rilevamento di *Ralstonia solanacearum* e 500 µl trattenuto a fini di riferimento (congelando a -16/-24°C per settimane o a -68/-86°C per mesi) dopo l'aggiunta di glicerolo sterile ad una concentrazione finale di 10-25% (v / v).

Per il rilevamento del patogeno da piante asintomatiche di patata si consiglia di saggiare campioni composti comprendenti fino ad un massimo di 200 segmenti di 1-2 cm asportati dalla base di ciascun fusto, subito al di sopra del terreno. Anche in questo caso l'estratto ottenuto come indicato dal protocollo EPPO PM 7/59(1) viene suddiviso in due parti uguali. Una metà viene mantenuta a 4-10°C durante il saggio e l'altra metà viene conservata in glicerolo sterile ad una concentrazione finale di 10-25% (v / v).

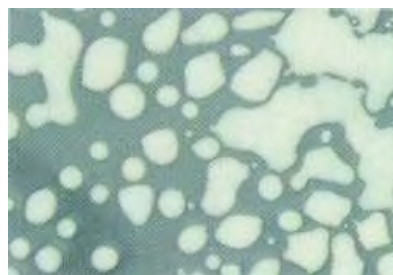
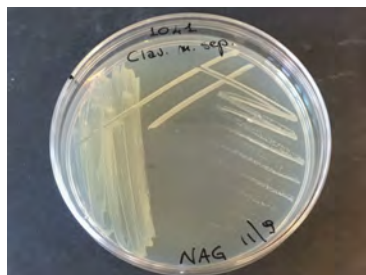
Materiale sintomatico

I metodi descritti possono essere applicati a tuberi, steli e foglie di patata sintomatici. Prelevare il materiale per l'isolamento nella zona di confine fra i tessuti sintomatici e quelli sani seguendo il protocollo EPPO PM 7/59(1) per tutti i dettagli. Per l'isolamento i terreni consigliati sono MTNA e

NCP 88. Preparare diluizioni decimali della sospensione distribuendo 100 µl delle diluizioni da 1/100 fino a 1/10000 ed incubare al buio a 21-23°C per almeno 10 giorni. Le colonie *C. m. subsp. sepedonicus* individuate in selezione preliminare vengono purificate nel terreno YGM e sottoposte ad identificazione.

Tipologia di test

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (*Cms*) è un batterio bastoncellare corto non mobile, aerobico, gram-positivo, con cellule leggermente ricurve disposte singolarmente o in coppia in formazione a L o V. Le colonie di *Cms* appaiono rotonde con margini interi irregolari, generalmente mucose e luccicanti, di colore dapprima bianco-crema e successivamente giallo pallido.



Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*: morfologia tipica del patogeno su NAG

Test di screening iniziali (Cod. IO 05 XIII e XIV)

La prima valutazione ed identificazione precoce viene realizzata mediante l'utilizzo di test diagnostici saggi sierologici come il *Lateral Flow* (cod. IO XIII) (Safenkova, I.A. et al., 2014), e/o saggio ELISA (cod IO 05 XIV).

Tuttavia, il saggio ELISA non è previsto dal protocollo EPPO in quanto fornisce esiti non affidabili con un'alta percentuale di falsi positivi (J. L. Drennan 1993).

Test di screening per infezioni latenti (cod. IO 05 IX, XV, XX):

Immunofluorescenza (IF), ibridazione *in situ* (Fish), PCR e Real time PCR eseguiti sugli estratti ottenuti sono indicati come test di screening preliminari nell' EPPO PM 7/59(1) da consultare per i dettagli. Per esprimere positività del campione, un risultato positivo ottenuto da almeno due saggi di selezione preliminare basati su principi biologici diversi, deve essere successivamente confermato da isolamento ed identificazione di una cultura pura del patogeno e dal test di patogenicità. (cod. IO 05 VIII, X):

Test di identificazione (cod. IO 05 IX, XI, XV, XX):

I principali test di identificazione da eseguire sulle presunte colonie di *C. m. subsp. sepedonicus* (isolate da materiale sintomatico e/o asintomatico) sono i seguenti: test biochimici, IF, Fish test, reazione di ipersensibilità, profilo di acidi grassi e proteine, metodi molecolari. Il metodo di PCR di Pastrik (2000) presenta buone performance di specificità, sensibilità e riproducibilità. La sensibilità è probabilmente maggiore rispetto al metodo sierologico di IF, ma i due metodi hanno una soglia di detection simile, pari a 10^3 cellule per ml.

Nell'ambito del progetto europeo EURL Bacteriology è stato svolto un TP sulla diagnosi con metodi molecolari (Real Time PCR) di *Cms* da tuber di patata. I metodi saggianti, oltre a Schaad et al., (1999) già presente nel protocollo Eppo PM 7/59 (1), sono stati Massart et al., (2014), Gudmestad et al., (2009), Vreeburg et al., (2018). I positivi dati di validazione ottenuti dimostrano che tali metodi possono essere efficacemente utilizzati sia come screening test che per l'identificazione del patogeno.

Test di patogenicità (cod. IO 05 X):

Viene realizzato per confermare l'infezione attiva da *Cms* nel caso in cui si ottengano risultati positivi con i test di identificazione. Viene eseguito su 10 piante (di 8-14 giorni allo stadio di 1-2 foglia) di ibridi suscettibili inoculate in serra e che dovranno presentare i tipici sintomi del patogeno consentendone contestualmente il reisolamento. Per i dettagli della metodica consultare l'EPPO PM 7/59(1)

Riferimenti Bibliografici

GU n°76 del 31-3-2008: Decreto di lotta obbligatoria

Drennan J.L. Comparison of a DNA Hybridization Probe and ELISA for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Field-Grown Potatoes 1993 Plant Disease 77(12):1243

EPPO Global Database EPPO (2016). EPPO Global database <https://gd.eppo.int/> |

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/15343>

Gudmestad, Mallik I., Pasche J.S., Anderson N.R., Kinzer K. (2009) A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Clavibacter mi N.C.chiganensis* subsp. *sepedonicus* Based on the Cellulase A Gene Sequence. Plant Disease / Vol. 93 No. 6: 649-659

Massart S., Nagy, C.M. Jijakli H.(2014) Development of the simultaneous detection of *Ralstonia solanacearum* race 3 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by a multiplex real-time PCR assay. (2014) Eur J Plant Pathol (2014) 138:29–37

Padil (Pests and Diseases Image Library)

Pastrik KH (2000) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. European Journal of Plant Pathology 106, 155–165.

PM 9/2 (2), *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* EPPO Bulletin (2011) 41, 385-388

PM 3/71 General crop inspection procedure for potatoes. EPPO Bulletin (2007) 37, 592-597

PM 3/70 (1), Export certification and import compliance checking for potato tubers. EPPO Bulletin (2006) 36, 423-424

PM 7/59 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* EPPO Bulletin (2006) 36, 99-109.

Safenkova I. V., Zaitsevb I. A., Pankratova G. K, Yu. A. Varitsevb. Zherdeva, A. V, and. Dzantieva B (2014). B Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Potato Ring Rot Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus*., 2014 Applied Biochemistry and Microbiology, 2014, Vol. 50, No. 6, pp. 675–682

Schaad W, Berthier-Schaad Y, Sechler A & Knorr D (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIOPCR and an automated real-time fluorescence detection system. Plant Disease 83, 1095–1100.

J. van Vaerenbergh, P. Muller, J. G. Elphinstone, R. A. M. Vreeburg and J. D. Janse (2017) Eupresco inter-laboratory comparison (2009–2012) on detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato tubers: proposal to include TaqMan real-time PCR as a primary (core) screening test in EU/EPPO standard methods. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2017) 47 (1), 24–32

Vreeburg R. A. M., Zendman A.J.W, Pol A., Verheij E, Nas M. and Kooman-Gersmann M. (2018) Validation of four real-time TaqMan PCRs for the detection of *Ralstonia solanacearum* and/or *Ralstonia pseudosolanacearum* and/ or *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers using a statistical regression approach. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2018) 48 (1), 86–96

Autori: Dott.ssa Nicoletta Pucci – CREA-DC; GdL Monitoraggio Cofinanziato - UE