

## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

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

Macchia nera degli agrumi/Citrus Black Spot (CBS)

### 2 - Nome scientifico/Scientific name

*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa

Teleomorfo:

*Guignardia citricarpa*

Sinonimi:

*Phoma citricarpa* (McAlpine)

### 3 – EPPO Code:

GUIGCI

### 4 - Posizione tassonomica/Taxonomy

- Phylum: *Pezizomycotina*
  - Classe: *Dothideomycetes*
  - Ordine: *Botryosphaerales*
  - Famiglia: *Phyllostictaceae*
  - Genere: *Phyllosticta*
  - Specie: *citricarpa*
- Riferimento: (Index Fungorum)

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

Il patogeno si diffonde prevalentemente attraverso le ascospore che possono essere trasportate dal vento o dall'acqua (infezioni primarie). La principale fonte di inoculo è rappresentata dalle foglie cadute a terra sulle quali si sviluppano gli ascocarpi (pseudotecii). La maturazione degli ascocarpi avviene per un periodo variabile tra i 23 e i 180 giorni dalla caduta delle foglie in funzione delle condizioni di temperatura ed umidità.

La malattia è presente in modo particolare nelle regioni a clima subtropicale caratterizzate da piogge estive ed elevata piovosità annuale (Kotzé 1981, 2000). Nonostante ciò, è stata rinvenuta anche in aree a clima semi-arido (Paul *et al.*, 2005). In accordo con quanto riportato da Kotzé (1963), la germinazione delle ascospore avviene tra i 15 e i 29,5°C di temperatura e necessita dalle 15 alle 38 ore di umidità.

Le infezioni secondarie avvengono per mezzo dei conidi prodotti in picnidi (fruttificazioni asessuali) che si sviluppano tipicamente sulle lesioni presenti su frutti e talvolta su rametti e foglie (Figura 1).

I conidi prodotti vengono dispersi su brevi distanze per mezzo degli schizzi d'acqua (effetto *splash*) o dilavati dall'acqua piovana infettando frutti e foglie suscettibili.

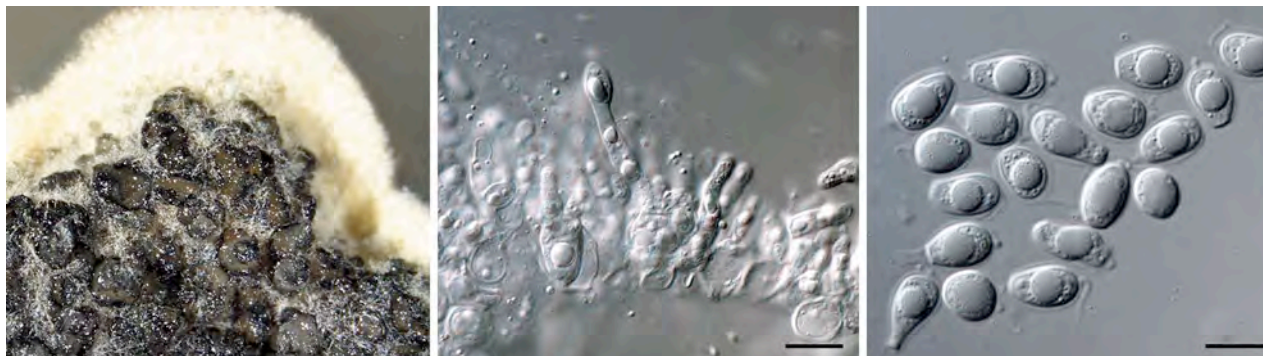


Figura 1. *Guignardia citricarpa*. a. Picnidi sviluppati su oatmeal agar (OA), con evidente pigmento giallo; b. conidiofori dai quali si originano i conidi; c. conidi (CBS H-20524 epitype). — Scale bars = 10  $\mu$ m (Glienke *et al.*, 2011).

Gli aspetti epidemiologici più critici della malattia sono legati alla suscettibilità dei frutti e al periodo di incubazione. I frutti sono infatti suscettibili all'infezione per un periodo variabile dai 4 ai 7 mesi dalla caduta dei petali (Kotzé, 1981; Brentu *et al.*, 2012; Lanza *et al.*, 2018) e manifestano i sintomi della malattia anche molti mesi dopo l'infezione (fase latente). La durata della fase latente varia dai 2 ai 12 mesi in funzione delle condizioni ambientali e dell'età e della fase fenologica delle piante (Kotzé, 1981).

### Sintomi

I sintomi più evidenti della malattia si evidenziano sui frutti causando lesioni di diverso tipo (OEPP/EPPO, 2009):

- - Macchie nere o punti neri (*hard spots*, *shot-hole spots*): lesioni di 3-10 mm di diametro, di colore variabile dal grigio al beige nella zona centrale, con il bordo tipicamente di colore marrone scuro; questo è il sintomo più comune e compare quando il frutto inizia a maturare, prima del viraggio di colore. Spesso in corrispondenza delle lesioni si possono osservare i picnidi o con l'aiuto di una lente d'ingrandimento o di uno stereomicroscopio; questi si presentano come piccoli puntini neri, leggermente rilevati.
- Macchie a lentiggini (*freckle spots*): lesioni leggermente depresse con una colorazione che può variare dal grigio chiaro al marrone chiaro o rossastro. In alcuni casi possono essere scolorite ed occasionalmente possono essere presenti i picnidi. Spesso queste lesioni compaiono sui frutti in post-raccolta e possono essere associate alle macchie nere precedentemente descritte.
- Macchie virulente (*virulent spots*): verso la fine della stagione, lesioni vicine possono unirsi e formare le cosiddette "macchie virulente". Queste sono senza dubbio le lesioni più dannose in quanto si estendono in profondità all'interno della buccia fino alla polpa del frutto. Le macchie virano dal marrone al nero, sviluppano una consistenza dura e possono coprire interamente la superficie del frutto. Hanno una forma irregolare e si formano sui frutti al momento della raccolta o ad inizio maturazione; anche queste lesioni sono talvolta associate alla presenza di picnidi. La penetrazione del fungo in tale fase provoca la caduta prematura del frutto (carpoptosi) con gravi perdite in post-raccolta.
- Falsa melanosi (*false melanose*): generalmente compare su frutti verdi in forma di piccole lesioni in rilievo che variano dal marrone scuro al nero, spesso circondate da puntini scuri. A queste lesioni non è associata la presenza di picnidi e con il progredire della stagione possono fondersi. La falsa melanosi si osserva in agrumeti dove il patogeno si è insediato da molto tempo.

A carico dei frutti esistono altre due tipologie di lesioni osservate meno frequentemente:

- Macchie frastagliate (*lacy spots*): lesioni superficiali, lisce, di colore variabile dal giallo al marrone e senza contorni definiti. Queste lesioni compaiono quando il frutto è ancora verde e possono coprire gran parte della sua superficie. Queste lesioni sono considerate una variante della falsa melanosi.
- Macchie screpolate (*cracked spots*): lesioni superficiali, leggermente rilevate, screpolate all'interno, di dimensioni variabili, con margini irregolari e non associate alla presenza di

picnidi. Appaiono sui frutti che hanno più di 6 mesi. In Brasile questo sintomo è stato associato ad infestazioni di acaro della ruggine degli agrumi (Riccioni e Valente, 2013).

I sintomi della malattia si possono talvolta osservare anche sulle foglie, sebbene nella maggior parte dei casi il patogeno determini infezioni latenti cioè non associate a sintomi evidenti (Sutton e Waterston, 1966). Quando presenti, si possono osservare piccole macchie circolari (< 3 mm) individuabili su entrambe le pagine fogliari di colore variabile dal rosso al rosso-marrone che, con il progredire dell'infezione, presentano la parte centrale più scura accompagnata dalla formazione di un anello di colore da marrone a nero e da un alone giallo. Talvolta nella parte centrale delle lesioni sviluppatesi sulla pagina superiore delle foglie è possibile osservare la presenza dei picnidi. Sintomi simili si possono osservare anche sui getti in particolare di *C. limon*.

## 6 - Piante ospiti/Hosts

Le principali specie ospiti di *G. citricarpa* appartengono al genere *Citrus*. Tutte le specie (e cultivar) commerciali di *Citrus* spp. sono considerate suscettibili ad eccezione dell'arancio amaro (*C. aurantium*) e del Tahiti lime (*C. latifolia*). Tra le più suscettibili si annoverano: limone (*C. limon*), arancio (*C. sinensis*), mandarino (*C. reticulata*), mandarino Satsuma Miyagawa (*C. unshiu*) e pompelmo (*C. paradisi*) (EFSA PLH Panel, 2014; CABI, 2019).

Altre specie considerate meno suscettibili sono: cedro (*C. medica*), lima o limetta (*C. aurantifolia*), limetta dolce (*C. limettioides*), combava (*C. hystrix*), pomelo (*C. maxima*), kumquat (*Fortunella* spp.) e arancio trifogliato o ponciro (*Poncirus trifoliata*) (EFSA PLH Panel, 2014).

Tra gli ospiti del patogeno si annoverano anche specie non appartenenti al genere *Citrus*: mandorlo (*Prunus dulcis*), avocado (*Persea americana*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), guava (*Psidium guajava*, *P. montanum*), mango (*Mangifera indica*), frutto della passione (*Passiflora edulis*) e *Rubus* spp. Sono state segnalate anche diverse specie ornamentali tra cui *Caesalpinia pulcherrima*, *Callistemon citrinus*, *Camellia japonica*, *Dendrobium speciosum*, *Ilex aquifolium*, *Magnolia* spp. e *Smilax* spp. (EPPO/CABI, undated).

In EU le aree definite a rischio dall'EFSA (2014) sono potenzialmente tutte le zone coltivate ad agrumi dell'area mediterranea ovvero Cipro, Croazia, Francia, Grecia, Italia, Malta, Portogallo e Spagna.

In particolare, come mezzo di entrata sono state definite come maggiore fonte di rischio:

- piante destinate alla messa a dimora;
- frutti.

Nel primo caso vige il divieto assoluto di importazione. Nel secondo caso, sebbene l'importazione sia consentita, è necessario non trascurare l'eventualità che talvolta il patogeno possa essere presente in frutti completamente asintomatici (infezioni latenti).

## PARTE A – MONITORAGGIO / SURVEY

### Normativa di riferimento disponibile sulle modalità di monitoraggio:

#### EUROPEA:

- ⋮ DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2019/449 DELLA COMMISSIONE del 18 marzo 2019 recante modifica della decisione di esecuzione (UE) 2016/715 della Commissione che stabilisce misure per quanto concerne taluni frutti originari di taluni paesi terzi per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione dell'organismo nocivo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa [notificata con il numero C(2019) 2024].

**NAZIONALE:** non presente

### Standard di riferimento:

#### PM EPPO:

PM 7/17 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*) - Diagnostics. 2020 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 50(3): 440-461.

PM 3/72 (2): Elements common to inspection of places of production, area-wide surveillance, inspection of consignments and lot identification

PM 3/76 (1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. – inspection of places of production

#### ISPM FAO:

ISPM 6/2018 - Surveillance

ISPM 31/2008 - Methodologies for sampling of consignment

ISPM 27/2014 (Annex 5) DP 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa on fruit. Rome, IPPC, FAO

### Misure di monitoraggio:

- ✓ ispezione visiva – *Visual inspection*
- ✓ campionamento – *Sample taking*

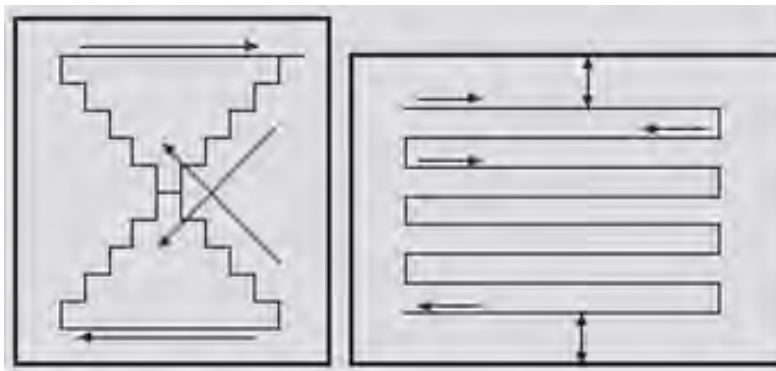
## Ispezione visiva/*Visual inspection*

### Condizione dell'ispezione:

In campo:

Ispezione condotta preferibilmente lungo le diagonali a scalare (a) per l'osservazione dei sintomi sospetti o in alternativa secondo il modello "passaggi equidistanti" (b).

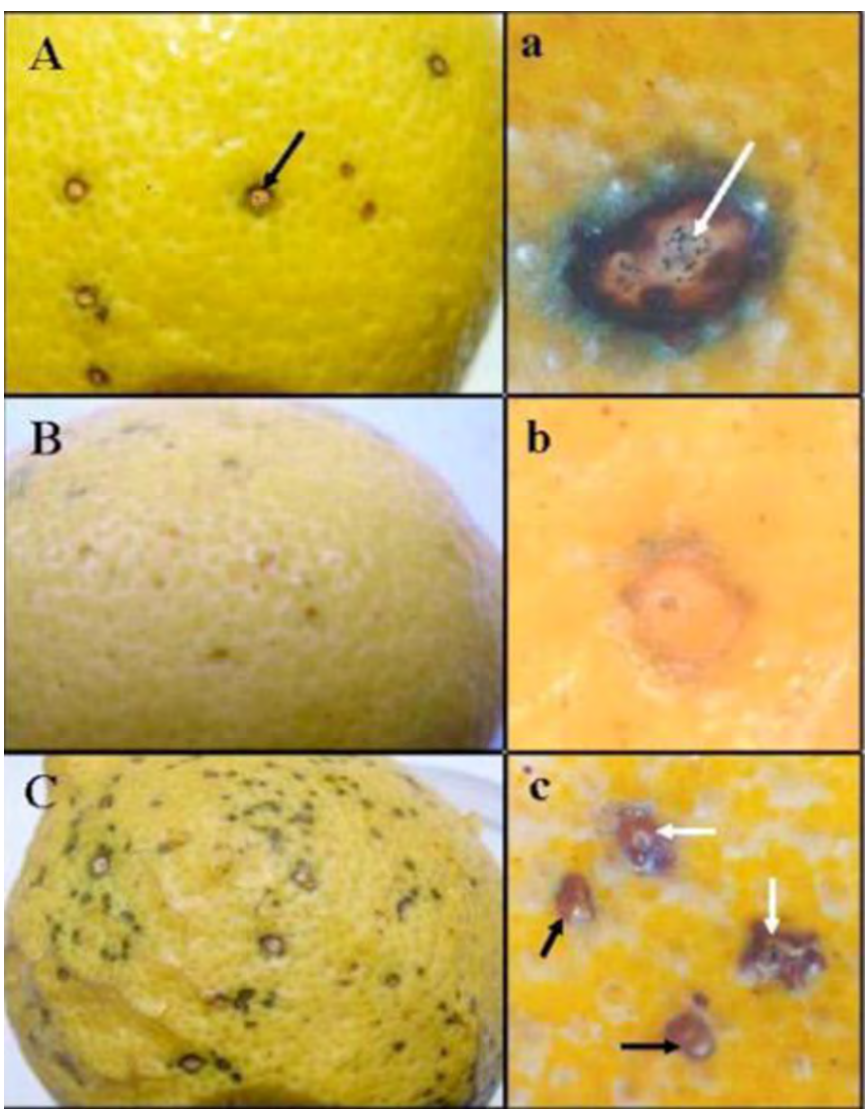
In vivaio: Ispezione preferibilmente con il modello "passaggi equidistanti" (b).

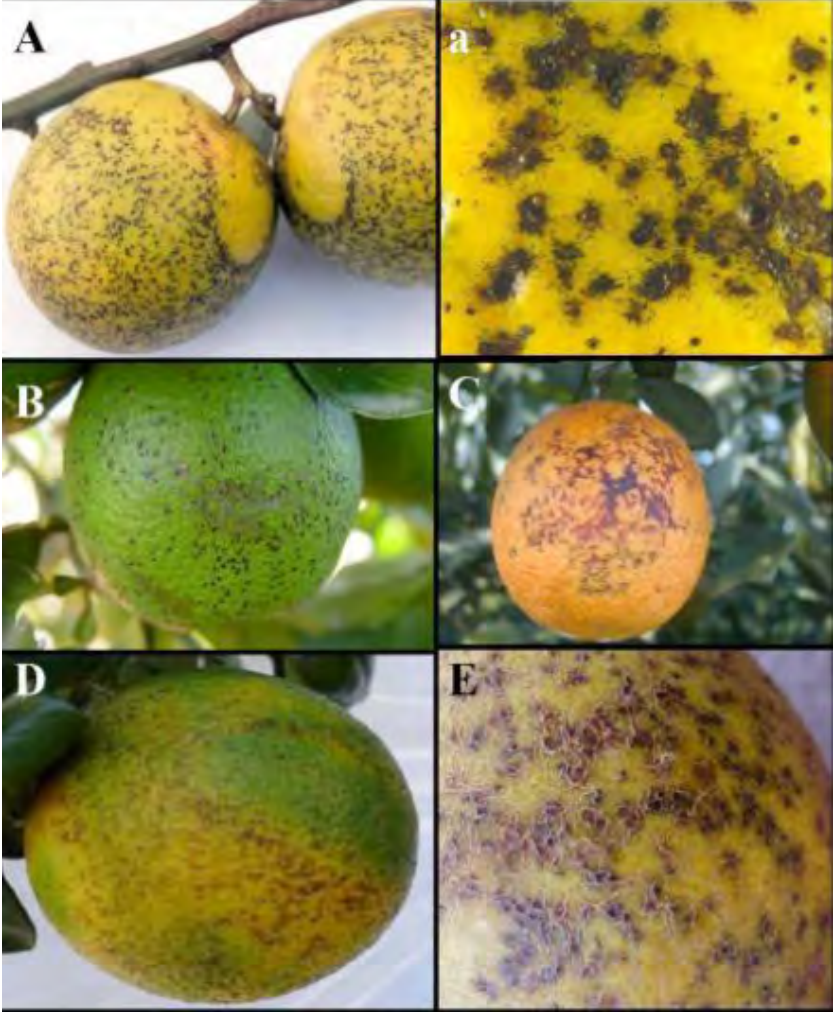


a


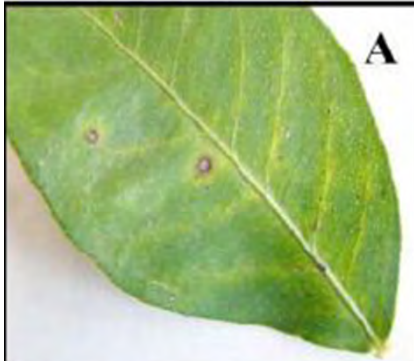


<p>Effettuare la redazione del verbale d'ispezione e la georeferenziazione dei campi ispezionati.</p>	<p style="text-align: right;">b</p> <p>Per la definizione della grandezza del campione si può fare riferimento all'ISPM31</p>
---	---

Quando	Cosa guardare	Immagini
<p>Maturazione dei frutti</p>	<p>Macchia nera o punto nero / <i>hard spot</i></p> <p>Macchie a lentiggini / <i>freckle spot</i></p>	 <p>Macchie nere (<i>hard spots</i>) e macchie a lentiggini (<i>freckle spots</i>) causati da <i>Guignardia citricarpa</i> su frutti di arancio (<i>C. sinensis</i>) e limone (<i>C. limon</i>). (A,a) Macchie nere su arancia; le frecce indicano la presenza di picnidi (fruttificazioni asessuate) all'interno delle lesioni più larghe. (B) Macchie a lentiggini su limone. (b) Macchie a lentiggini su arancia (le lesioni risultano leggermente depresse nella parte centrale e non sono associate alla presenza di picnidi). (C) Macchie nere e a lentiggini su limone. (c) Macchie a lentiggini (indicate dalle frecce nere) e stadio intermedio tra macchie a lentiggini e macchie nere su arancia; la freccia bianca indica la presenza dei picnidi.</p> <p><i>Photos courtesy E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil.</i></p>

		From Eppo PM 7/17(3)
	<p>Falsa melanosi, macchie virulente, macchie frastagliate, macchie screpolate/  <i>False melanose, virulent spots, lacy spots, cracked spots</i></p>	 <p>Falsa melanosi (<i>false melanose</i>), macchie virulente (<i>virulent spots</i>), macchie frastagliate (<i>lacy spots</i>) e macchie screpolate (<i>cracked spots</i>) causate da <i>Guignardia citricarpa</i> su frutti di arancio (<i>C. sinensis</i>). (A) Falsa melanosi su arancia matura. (a) Falsa melanosi circondata da piccole macchioline nere su arancia matura. (B) Falsa melanosi su arancia ancora verde. (C) Macchie virulente su arancia (le lesioni sono depresse e si estendono in profondità nell'albedo). (D) Macchie frastagliate su arancia ancora verde. (E) Macchie screpolate su arancia (le lesioni sono leggermente rilevate, screpolate e con margini irregolari; si noti l'assenza di picnidi).</p> <p><i>Photos courtesy FUNDECITRUS (A, B, C, D, E) and E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil (a).</i></p> <p>From Eppo PM 7/17(3)</p>

## Campionamento/*Sample taking*

Cosa prelevare	Immagini	Come conservare
Frutti sintomatici	 <p><i>EPPO Global Database (2020) - Photo courtesy: Jean Michel Mei, Benjamin Vigier, Reynaud Pascal: Border inspection post (BIP) of Marseille (FR). Jean Michel Mei, Reynaud Pascal: Border inspection post (BIP) of Marseille (FR). https://gd.eppo.int/taxon/GUIGCI/photos</i></p>	Mettere il materiale vegetale in buste di plastica a tenuta stagna e conservare in cella frigorifera (+ 4°C)
Foglie sintomatiche	 <p><i>ISPM 27/2014 (Annex 5) - Photo courtesy: E. Feichtenberger, Instituto Biológico, Sorocaba, Brazil.</i></p>	

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

**Normativa di riferimento:**

**EUROPEA:**

- : DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2019/449 DELLA COMMISSIONE del 18 marzo 2019 recante modifica della decisione di esecuzione (UE) 2016/715 della Commissione che stabilisce misure per quanto concerne taluni frutti originari di taluni paesi terzi per impedire l'introduzione e la diffusione nell'Unione dell'organismo nocivo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa [notificata con il numero C(2019) 2024].
- : Regolamento UE n. 2016/2031 del 26/10/2016; Regolamento UE n. 2019/1702 del 1/8/2019.

**NAZIONALE:** non presente

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

PM 7/17 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*) - Diagnostics. 2020 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 50(3): 440-461.

PM 1/002(28) EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019).

**Inquadramento EPPO**

PM 1/002(28) EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019)

**Origini:**

Citrus Black Spot (*P. citricarpa*) è stato segnalato per la prima volta in Australia a Sidney nel 1879 e successivamente nel 1929 in Sud Africa lungo la costa (Kotzé, 1981).

**Distribuzione:**

La presenza del patogeno è stata segnalata e confermata in numerosi paesi di quattro diversi continenti (EPPO Global Database, 2019).

**Africa:** Angola, Ghana, Kenya, Mozambico, Namibia, Sud Africa, Tunisia, Uganda, Zambia, Zimbabwe.

**America:** Argentina, Brasile, Cuba, Stati Uniti d'America, Uruguay.

**Asia:** Bhutan, Cina, India, Indonesia, Filippine, Taiwan.

**Oceania:** Australia.

In taluni casi la presenza del patogeno non è ancora stata confermata e pertanto viene indicata con la dicitura "*absent, unreliable record*" (assente, record non affidabile) (EPPO Global Database, 2019).

**Africa:** Benin, Cameroon, Guinea, Swaziland, Togo.

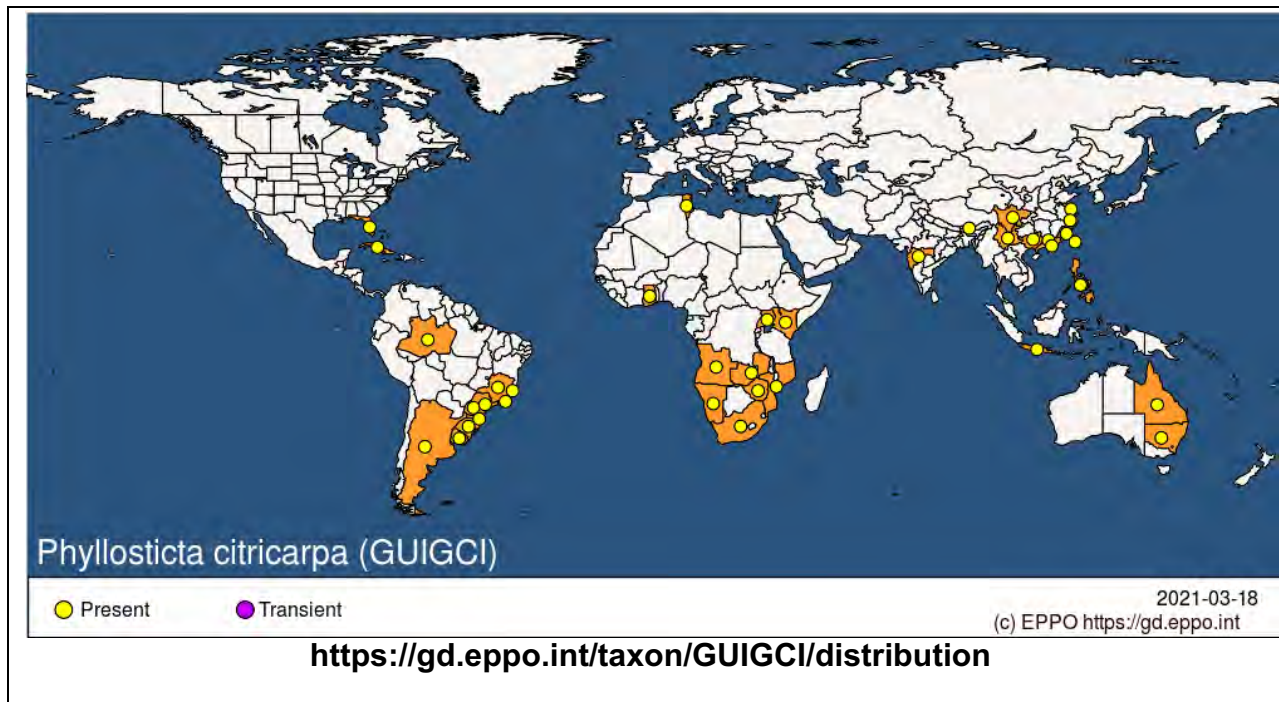
**America:** Chile, Mexico.

**Asia:** Bangladesh.

**Oceania:** Papua New Guinea, Vanuatu.

**Mappa EPPO/CABI**



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

La seguente segnalazione che riporta la presenza del patogeno in Calabria nella zona di Trebisacce (CS) al momento non è stata confermata, sulla base dell'attività di monitoraggio della Regione Calabria nel 2017/2018 e di uno studio *ad hoc* finanziato dall'EFSA nel 2019:

Guarnaccia V. *et al.*, 2017, First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Studies in mycology*, 87: 161-185:

**Rischio di introduzione****Indagini EUROPHYT – Scambi commerciali con Paesi Terzi****INTERCETTAZIONI *P. citricarpa***

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

Country of Export	Year	Object	Plant species (No of interceptions)
Argentina	2020	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon (77); Citrus sinensis (7)
Bangladesh	2020	Other living plants fruit and vegetables	Citrus (1)
Brasile	2020	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (9)
Cina	2020	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon (1); Citrus maxima (1)
South Africa	2020	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon (1); Citrus reticulata (19); Citrus sinensis (5)

Uruguay	2020	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (5)
Uruguay	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (5); Citrus reticulata(1);
Uganda	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon(1)
Tunisia	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (6); Citrus limon (1)
Swaziland	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
South Africa	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (6); Citrus limon (3)
Guinea	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
China	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus maxima (5); Citrus paradisi (1);
Argentina	2019	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (8); Citrus limon (7); Citrus reticulata (s.l.) (1); Citrus reticulata (1);
Uruguay	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
Swaziland	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
South Africa	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (2)
Brazil	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (24); Citrus reticulata (1); Citrus limon (1);
Benin	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1); Citrus maxima (1)
Argentina	2018	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (8); Citrus limon (8); Citrus reticulata (1);
Zimbabwe	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Uruguay	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
Swaziland	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (2)

South Africa	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (19); Citrus limon (4); Citrus reticulata (1);
China	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus maxima (1)
Argentina	2017	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1); Citrus reticulata (s.l.) (2); Citrus limon (2)
Zimbabwe	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Vietnam	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus limon (1)
Uruguay	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (3)
Togo	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1)
Swaziland	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (2); Citrus xtangelo (1); Citrus sinensis (1);
South Africa	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (2); Citrus limon (2)
Mexico	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (1);
Chile	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus paradisi (1);
Cameroon	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus maxima (2); Citrus sp. (1);
Brazil	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (1); Citrus limon (1)
Bangladesh	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus (1)
Argentina	2016	Other living plants fruit and vegetables	Citrus sinensis (9); Citrus limon (4); Citrus reticulata (s.l.) (1);

## PARTE C – DIAGNOSI

**Normativa di riferimento:**

**EUROPEA:**

- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072
- Union Quarantine pest (Anne x II B) Reg 2019/2072
- Reg 2019/1702 ON prioritari
- DECISIONE DI ESECUZIONE (UE) 2016/715 DELLA COMMISSIONE dell'11 maggio 2016 che stabilisce misure per quanto concerne taluni frutti originari di taluni paesi terzi per impedire l'introduzione e la diffusione nell'unione dell'organismo nocivo *Phyllosticta citricarpa* (mcalpine)

**NAZIONALE:** non presente

**Protocolli standard di riferimento:****PM EPPO:**

PM 7/76 (5) Use of EPPO Diagnostic Standards

PM 7/17 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*)

Riccioni L., Valente M. T. (2013) Protocollo diagnostico per *Guignardia citricarpa*. *Petria* 23(3): 455-618.

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

- (VIII) Selective culture media
- (XV) PCR (dopo selective culture media in caso di presenza di strutture fungine oppure direttamente da materiale vegetale)
- (XVIII) saggio LAMP = Molecular testing 3
- (XIX) PCR+Sequencing (va indicato quando si fa insieme la PCR e si invia al sequenziamento) (vedi commento)
- (XX) Real time

**Matrice**

- Frutto sintomatico (per tutte le procedure descritte).
- Foglie, piccioli e getti sintomatici (solo per l'isolamento *in vitro* su substrati colturali selettivi).

**Tipologia di test**

Il diagramma di flusso di lavoro da seguire per la diagnosi certa di *P. citricarpa* a partire da frutti sintomatici è adattato al nuovo PM 7/017(3), modificato rispetto a quello proposto dal precedente PM 7/017(2) *P. citricarpa* in seguito all'identificazione di una nuova specie, *P. paracitricarpa*

(Guarnaccia et al., 2017), non distinguibile con i metodi di diagnosi proposti nelle precedenti linee guida e nel precedente PM7/17(2). In base alle attuali linee guida, riassunte nello schema sottostante, partendo da campioni sintomatici l'identificazione di *P. citricarpa* può essere eseguita solo dal

sequenziamento del gene TEF1 (vedi PM 7/129 Appendice 3) che consentirà un'identificazione univoca di *P. citricarpa* e soprattutto la sua distinzione da *P. paracitricarpa*. Questo comporta che si deve ottenere il fungo in coltura mediante isolamento, che può essere eseguito subito (A) o dopo risultato positivo dei metodi molecolari applicati direttamente al tessuto sintomatico (B).

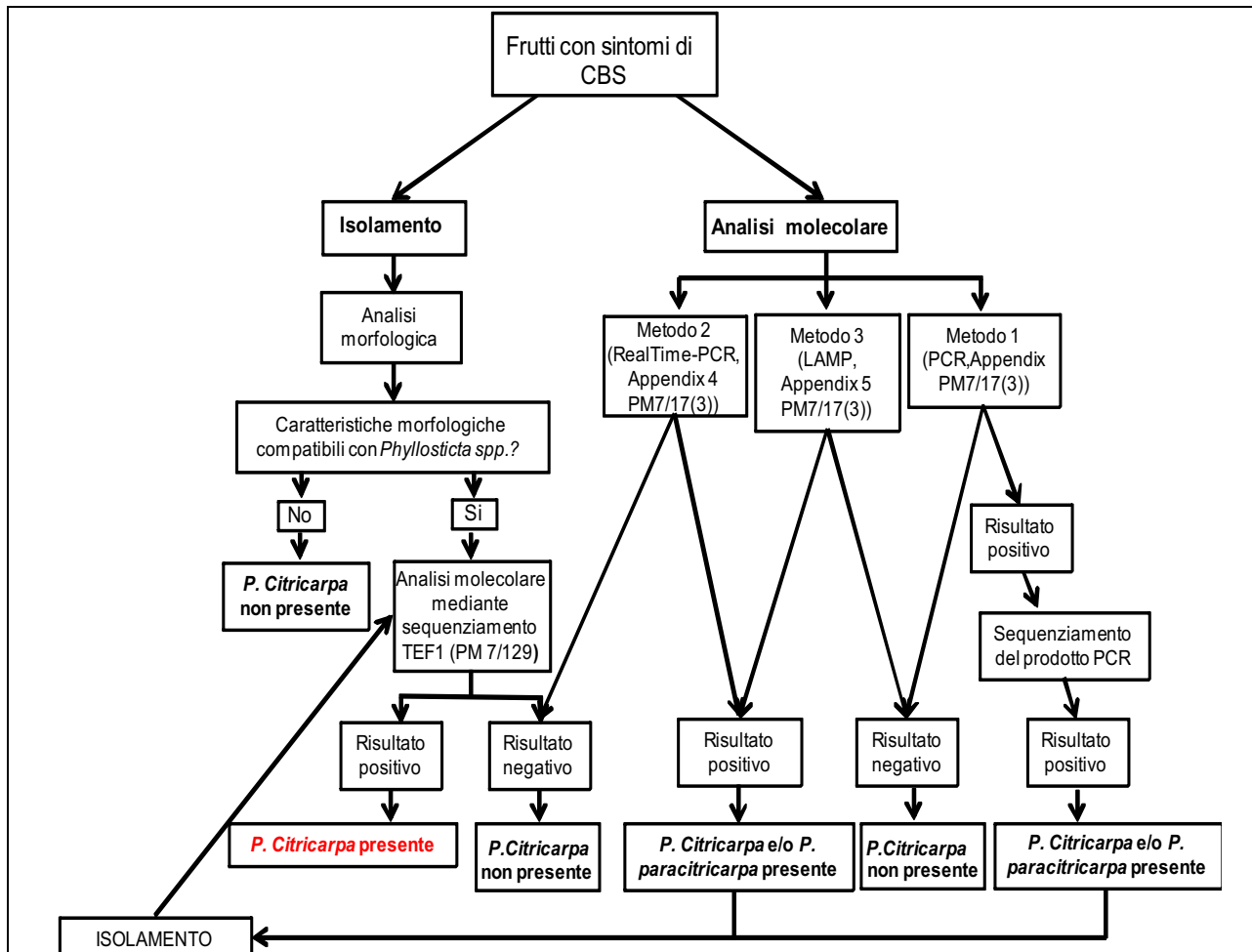
**A- Isolamento su terreno selettivo (cod. IO 05 VIII – Selective culture media)**

Partendo da frutti sintomatici, (o eventualmente da foglie, piccioli e getti sintomatici, se presenti) si può effettuare un isolamento su terreno selettivo. In particolare, secondo il protocollo EPPO specifico (PM7/17 (3)), l'isolamento può essere effettuato su Cherry decoction agar (CHA), Potato dextrose agar (PDA), Oatmeal agar (OA) e Malt extract agar (MEA), che permettono di evidenziare alcune caratteristiche morfologiche tipiche della specie. L'identificazione basata sulle sole caratteristiche morfologia non è comunque raccomandata perché la distinzione tra *P. citricarpa* e *P. paracitricarpa* sulla base dell'esame morfologico è molto difficile. Tuttavia, l'esame morfologico può consentire l'esclusione di generi e specie fungine no *target*. In caso di esito dubbio o positivo si deve confermare la presenza di *P. citricarpa* mediante il sequenziamento del gene TEF1 attraverso l'estrazione di DNA fungino, amplificazione con primer specifici per il gene TEF1 e sequenziamento dell'amplificato.:

**B - Identificazione mediante metodi molecolari (cod. IO 05 XV, XVIII, XX)**

Secondo quanto riportato nelle linee guida, a partire da campioni sintomatici l'identificazione di *P. citricarpa* può essere eseguita mediante metodi molecolari: PCR convenzionale (metodo 1 - cod IO 05 XV, XX), Real-time PCR (metodo 2 - cod. IO 05 XX) o LAMP (metodo 3 – cod IO 05 XVIII). Nessuno però dei metodi molecolari descritti è in grado di discriminare la *P. citricarpa* dalla *P. paracitricarpa*, pertanto è necessario, successivamente all'esito positivo di uno dei metodi citati, confermare la presenza di *P. citricarpa* mediante isolamento e sequenziamento del gene TEF1, secondo quanto riportato nel PM7/17(3).





Flusso di lavoro per l'identificazione di *P. citricarpa* da frutto.

**Metodo 1 (cod. IO 05 XV):** identificazione molecolare mediante PCR convenzionale basato su Bonants et al., 2003 (PM7/17(3), appendix 2)

Il metodo si basa sull'amplificazione di una regione target costituita da una sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) che genera un prodotto di amplificazione di 490 bp. I primer sono selettivi per *P. citricarpa*, *P. citriasiana* e *P. paracitricarpa* ma non sono in grado di discriminare le tre specie tra di loro.

In caso di positività è necessaria una conferma o mediante sequenziamento del prodotto di amplificazione o mediante l'applicazione del metodo 2.

Per ciascuna amplificazione PCR è necessario includere:

- Controllo positivo (1): reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *P. citricarpa* precedentemente testato e valutato per la sua amplificabilità.
- Controllo negativo (1): miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve per verificare eventuali contaminazioni.
- Controllo di amplificazione interno (IAC, *Internal Amplification Control*) (1): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR, devono essere controllate amplificando il DNA con i primer universali ITS4 e ITS5 secondo le condizioni descritte da White et al. (1990).

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo per uno dei target verrà visualizzata la corrispondente banda specifica (Figura 1).

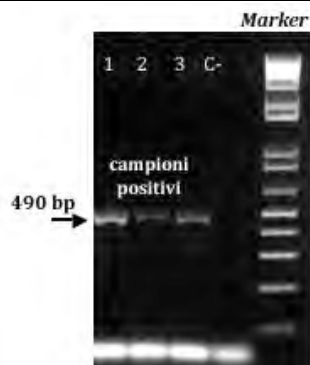


Fig. 1 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di PCR ottenuti con il protocollo di amplificazione su DNA genomico estratto da 3 isolati di *P. citricarpa* (pozzetti da 1 a 3) e relativo controllo negativo (C-).

**Metodo 2 (cod. IO 05 XX):** identificazione molecolare mediante PCR Real Time basato su van Gent-Pelzer et al., 2007 (PM7/17(3), appendix 4; Riccioni e Valente, 2013)

La regione target dell'amplificazione è costituita dalla sequenza ITS e genera un amplicone di 69 bp. Le sequenze di ciascun primer e della sonda fluorogena sono selettive per le sole specie *P. citricarpa* e *P. paracitricarpa* :

Per ogni campione sono necessarie 3 repliche tecniche.

Per ciascuna amplificazione mediante Real-time PCR è necessario includere:

- Controllo positivo Real-time PCR (1): reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *P. citricarpa* diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione.
- Controllo negativo (1): miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve per verificare eventuali contaminazioni.
- Controllo di amplificazione interno (IAC, *Internal Amplification Control*) (1): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR, devono essere controllate amplificando il DNA con i primer universali ITS4 e ITS5 secondo le condizioni descritte da White *et al.* (1990).

Valutazione dei risultati

Il campione è considerato positivo per la presenza di *P. citricarpa* se il segnale di amplificazione è rilevato in corrispondenza di un valore del ciclo soglia (Ct) inferiore al Ct del controllo positivo Real time PCR di riferimento diluito al limite di rivelazione (vedere uso dei controlli). Viceversa, se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un Ct superiore al Ct del controllo positivo di riferimento, il campione si considera negativo per la presenza di *P. citricarpa* (Figura 2)

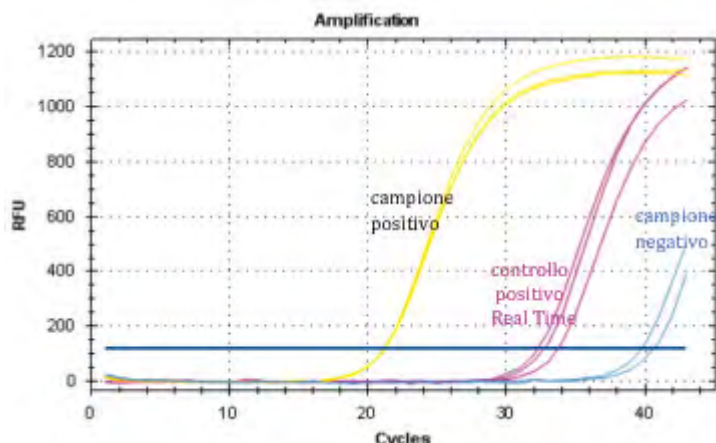


Figura 2: Curve di amplificazione in PCR Real Time confrontate con il controllo positivo.

**Metodo 3 (cod. IO 05 XVIII):** identificazione di *P. citricarpa*, basato sulla LAMP di (Tomlinson et al., 2013 (PM7/17(3), appendix 5). La regione target dell'amplificazione è costituita dalla sequenza ITS Per ciascuna amplificazione PCR è necessario includere:

- Controllo positivo (1): reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *P. citricarpa* precedentemente testato e valutato per la sua amplificabilità.

- Controllo negativo (1): miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve per verificare eventuali contaminazioni.
- Controllo di amplificazione interno (IAC, *Internal Amplification Control*) (1): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR, devono essere controllate amplificando il DNA in duplicato con l'aggiunta di DNA target

#### Conclusioni

Dato che la tassonomia dei funghi, incluso le specie all'interno di questo genere, sono in continua evoluzione, è opportuno fare una verifica continua delle prestazioni diagnostiche nei confronti di *P. citricarpa* per poter sempre garantire la massima affidabilità possibile.

#### Riferimenti bibliografici

Bonants P. J. M., Caroll G. C., de Weerd M., van Brouwershaven I. R., Baayen R. P. (2003) Development and validation of a fast PCR-based method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 503-513.

Brentu F. C., Oduro K. A., Offei S. K., Odamtten G. T., Vicent A., Peres N. A., Timmer L. W. (2012) Crop loss, aetiology, and epidemiology of citrus black spot in Ghana. *European Journal of Plant Pathology* 133(3): 657-670.

CABI (2019) *Guignardia citricarpa* (citrus black spot). Data sheet (aggiornato al 28 novembre 2019). Disponibile al link: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26154>.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) (2014) Scientific Opinion on the risk of *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) for the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal* 2014;12(2):3557, 243 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3557.

EPPO/CABI (undated) Data Sheets on Quarantine Pests. *Guignardia citricarpa*. Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003. Disponibile al link: <https://gd.eppo.int/taxon/GUIGCI/documents>.

Glienke C., Pereira O. L., Stringari D., Fabris J., Kava-Cordeiro V., Galli-Terasawa L., Cunnington J., Shivas R. G., Groenewald J. Z., Crous P. W. (2011) Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia* 26: 47-56.

Guarnaccia V., Groenewald J. Z., Li H., Glienke C., Carstens E., Hattingh V., Fourie P. H., Crous P. W. (2017) First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Studies in Mycology* 87: 161-185.

ISPM 31/2008 Methodologies for sampling of consignments. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 6/2018 Surveillance. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 27/2014 (Annex 5) DP 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa on fruit. Rome, IPPC, FAO.

Kotzé J. M. (1963) Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, with particular reference to its epiphytology and control at Letaba. University of Pretoria, 296 pp.

Kotzé J. M. (1981) Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 65: 945-950.

Kotzé J. M. (2000) Black spot. In: Compendium of citrus diseases. Eds. Timmer L. W., Garnsey S. M., Graham J. H. APS Press, St. Paul, MN, USA, 10-12. Lanza F. E., Metzker T. G., Vinhas T., Behlau F., Silva

Junior G. J. (2018) Critical fungicide spray period for citrus black spot control in Sao Paulo state, Brazil. *Plant Disease* 102: 334-340.

Paul I., van Jaarsveld A. S., Korsten L., Hattingh V. (2005) The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* Kiely: likelihood of disease establishment in the European Union. *Crop Protection* 24: 297-308.

PM 1/002 (28) EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulation as quarantine pests (2019). [https://www.eppo.int/media/uploaded\\_images/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/pm1-002-28-en.pdf](https://www.eppo.int/media/uploaded_images/ACTIVITIES/plant_quarantine/pm1-002-28-en.pdf)

PM 3/72 (2) Elements common to inspection of places of production, area-wide surveillance, inspection of consignments and lot identification. 2009 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 260-262.

PM 3/76 (1) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp. - inspection of places of production. 2016 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 46: 28-39.

PM 7/17 (3) *Phyllosticta citricarpa* (formerly *Guignardia citricarpa*) - Diagnostics. 2020 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 50(3): 440-461.

PM 7/76 (5) Use of EPPO Diagnostic Standards. 2018 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 48: 373-377.

Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio del 26 ottobre 2016 relativo alle misure di protezione contro gli organismi nocivi per le piante, che modifica i regolamenti (UE) n. 228/2013, (UE) n. 652/2014 e (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga le direttive 69/464/CEE, 74/647/CEE, 93/85/CEE, 98/57/CE, 2000/29/CE, 2006/91/CE e 2007/33/CE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 317/4 (23.11.2016).

Regolamento Delegato (UE) 2019/1702 della Commissione del 1° agosto 2019 che integra il Regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 260/8 (11.10.2019).

Riccioni L., Valente M. T. (2013) Protocollo diagnostico per *Guignardia citricarpa*. *Petria* 23(3): 455-618.

Sutton B. C., Waterston J. M. (1966) *Guignardia citricarpa*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 85. Wallingford, UK, CAB International.

Tomlinson J. A., Ostojca-Starzewska S., Webb S., Cole J., Barnes A., Dickinson M., Boonham N. (2013) A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesion. *European Journal of Plant Pathology* 136: 217-224.

van Gent-Pelzer M. P. E., van Brouwershaven I. R., Kox L. F. F., Bonants P. J. M. (2007) A Taqman PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa*. *Journal of Phytopathology* 155: 357-363.

White T. J., Burns T., Lee Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. San Diego, Academic Press, pp. 315-322.

Autori: Dr. Valentino Bergamaschi, Dr.ssa Maria Teresa Valente, Dr. Luca Riccioni CREA-DC - GdL Monitoraggio Cofinanziato - UE

