



Ministero delle  
politiche agricole  
alimentari e forestali



Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

## PROCEDURE DI INDAGINE PER:

### 1- Nome comune dell'organismo e della malattia/*Common name of the pest*

**Marciume bruno della patata / Potato brown rot**

### 2 - Nome scientifico/*Scientific name*

*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al.1996 emend. Safni et al. 2014

**Synonyms:** *Bacterium solanacearum* Smith; *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hashimoto, Ezaki & Arakawa; *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith; *Xanthomonas solanacearum*(Smith) Dowson

### 3 – EPPO Codes:

RALSSL (*Ralstonia solanacearum*); RALSSO (*Ralstonia solanacearum* sensu lato); PSDMS3 (*Ralstonia solanacearum* race 3); PSDMS2 (*Ralstonia solanacearum* race 2); PSDMS1 (*Ralstonia solanacearum* race 1); RALSPS (*Ralstonia pseudosolanacearum*); RALSSY (*Ralstonia syzygii*); RALSSC (*Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*); RALSSI (*Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis*); RALSSS (*Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*); RALSSP (*Ralstonia* sp.)

### 4 - Posizione tassonomica/*Taxonomy*

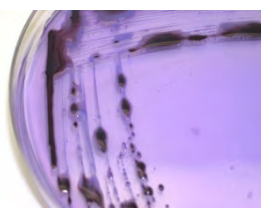
- Kingdom: *Bacteria*
- Phylum: *Proteobacteria*
- Classe: *Betaproteobacteria*
- Ordine: *Burkholderiales*
- Famiglia: *Burkholderiaceae*
- Genere: *Ralstonia*
- Specie: *R. solanacearum sensu lato*

Storicamente suddiviso in 5 razze e 5 biovar (Buddenhagen et al., 1962; Hayward, 1964, 1991), nel 2005 è stato descritto da Fegan & Prior (2005) come un complesso di specie suddiviso in quattro "phylotype". Recentemente, è stato riclassificato da Safni et al. (2014) in tre specie distinte: *R. solanacearum* (Phylotype II, infetta la patata, lista A2 per EPPO), *Ralstonia pseudosolanacearum* (Phylotype I e III, non infettano la patata, lista A2 per EPPO) e *Ralstonia syzygii* (Phylotype IV, lista A1 per EPPO). *R. syzygii* comprende 3 sottospecie, fra le quali, la subsp. *indonesiensis* è stata trovata su *Solanum tuberosum* in Indonesia (Safni et al., 2014; PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum* species complex). Ciascun "phylotype" comprende molteplici varianti filogenetiche e patogene, note come "sequevar", che differiscono per alcuni geni "barcoding".

Il genotipo di *R. solanacearum* assegnato come Phylotype IIB sequevar 1 (PIIB-1), formalmente riferito alla nota razza 3 biovar 2 di *R. solanacearum*, è l'agente causale del marciume bruno della patata.

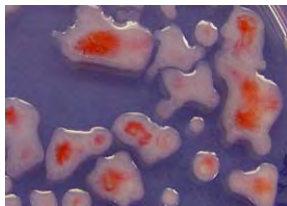
### 5 – Aspetti epidemiologici dell'organismo/*Epidemiology of the pest*

*Ralstonia solanacearum* viene definita come un complesso di specie sulla base della sua vasta gamma di ospiti, la specializzazione patogenetica, le proprietà culturali e fisiologiche, e la filogenesi. È un batterio gram-negativo, che colonizza i vasi xilematici dell'ospite determinando arresto della crescita, avvizzimento, riduzione della resa produttiva e morte della pianta. Per la sua pericolosità a danno di una vasta gamma di ospiti economicamente importanti è stato definito come un potenziale agente di bio-terrorismo.



CREA-DC Colonie di Rs su terreno SMSA

Rs= *R. solanacearum*



T. Momol and S.M. Olson; particolare di colonie di Rs su TZC



G. Cellier G (Anses, FR). Da PM 7/21 (2)  
Colonie di Rs su Sequeira medium

### Ciclo della malattia

È particolarmente adattato alle regioni a clima temperato (optimum a circa 27°C), a differenza degli altri genotipi diffusi in climi tropicali e subtropicali.

Una volta introdotto nell'ambiente di coltivazione il batterio può sopravvivere nei residui colturali e nel suolo nudo. La penetrazione può avvenire attraverso aperture naturali o ferite dell'apparato radicale (provocate ad esempio da insetti, nematodi, o dall'emissione di radici secondarie). Una volta penetrato all'interno dell'ospite vegetale il batterio si moltiplica nei tessuti corticali e si diffonde attraverso i fasci vascolari determinando un blocco dei tessuti conduttori della pianta con conseguente appassimento e morte. Come conseguenza c'è un ritorno del batterio al terreno dando luogo ad un nuovo ciclo.

La sopravvivenza del batterio è assicurata per lunghi periodi (nell'ordine di anni) nel terreno, nei residui colturali, nelle acque d'irrigazione superficiali, e per periodi ristretti (da mesi a giorni) in associazione a materiali inerti (dal legno, ai sacchi di juta, alla gomma).

La sua diffusione avviene principalmente attraverso tuberi-seme di patata infetti anche latentemente, piantine di pomodoro con infezioni latenti, terreno e acque di irrigazione contaminate, strumenti di lavorazione e di trasporto contaminati. Piogge, vento e nematodi possono contribuire alla sua diffusione nelle aree di coltivazione. Controversa è la sua capacità di disseminazione attraverso seme di pomodoro (Kelman et al., 1994; Martins et al., 2005)

### Sintomi

#### - Patata

Le piante possono essere colpite in qualsiasi stadio del loro sviluppo. I sintomi si manifestano dapprima con una perdita di turgore delle foglie che assumono un aspetto flaccido, evolvendo in un avvizzimento repentino dell'intero germoglio fino al collasso dell'intera pianta. Durante questo

processo la vegetazione presenta un viraggio della colorazione al verde pallido e in seguito al bruno, le foglie possono presentare accartocciamento della lamina. Si può osservare epinastia dei piccioli. In campo la diffusione è rapida, si osservano aree in cui le piante sono colpite alternate a piante apparentemente sane

Tuberi: I sintomi esterni, assimilabili ad una decolorazione grigiastra, possono essere visibili o non a seconda dello stadio della malattia. In corrispondenza degli 'occhi' o del punto di attacco dello stolone (ombelico) possono essere presenti gocce di essudato, cui può rimanere adeso il terreno. Intorno agli 'occhi' è possibile osservare imbrunimenti e marcescenza dei tessuti.

La sezione trasversale dei tuberi rivela imbrunimento e necrosi dell'anello vascolare e dei tessuti circostanti che possono cavitarsi. A seguito del taglio si ha fuoriuscita spontanea di essudato cremoso e fluido. Il parenchima può andare incontro a disfacimento.

#### - **Pomodoro**

Le foglie giovani manifestano per prime i sintomi di avvizzimento e in condizioni favorevoli la malattia evolve rapidamente. Quando la malattia ha una progressione più lenta, in condizioni più sfavorevoli per il patogeno, possono formarsi radici avventizie sul fusto.

#### - **Altre solanacee**

Il batterio può infettare anche la melanzana e il peperone che manifestano sintomi simili a quelli descritti per la patata e il pomodoro.

## 6 - Piante ospiti/Hosts

*R. solanacearum* specie complex presenta numerosi ospiti vegetali alcuni dei quali possono risultare asintomatici. *R. solanacearum*, Phylotype II, attacca principalmente *Solanum tuberosum* (patata), *S. lycopersicum* (pomodoro), occasionalmente *S. melongena* (melanzana) e *C. annuum* (peperone), così come alcune solanacee spontanee (es. *S. nigrum* e *S. dulcamara*). Altre specie spontanee ospiti sono *Chenopodium* spp., *Portulaca oleracea*, *Urtica dioica*, *Silene* spp., nonché altre specie vegetali come *Pelargonium zonale*.

Gli altri ospiti vegetali riportati di seguito sono affetti da specie diverse classificate all'interno del cosiddetto *R. solanacearum* specie complex (es. *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii*)

In particolare:

- patata (*Solanum tuberosum*)
- pomodoro (*S. lycopersicum*)
- melanzana (*S. melongena*)
- peperone (*Capsicum annuum*)
- tabacco (*Nicotiana tabacum*)
- cucurbitacee (es. *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* and *Cucurbita moschata*)
- banana (*Musa* spp.)
- curcuma (*Curcuma longa*)
- rosa (*Rosa* spp.)
- geranio (*Pelargonium* spp.)
- Anthurium

Il patogeno può colonizzare in forma latente, senza determinare sintomi apparenti, piante spontanee di *S. dulcamara* che rappresentano quindi un "serbatoio" pericoloso per la disseminazione del batterio. Un più ampio elenco degli ospiti è riportato in Pradhanang et al. 2000) e nel sito CABI (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/45009>).

- *Solanum dulcamara*
- *Solanum nigrum*
- *Solanum cinereum*
- *Portulaca oleracea*
- *Brassica napus* cv. *oroa*

- *Rumex sp.*
- *Tagetes sp.*
- *Ipomoea sp.*
- *Cucurbita pepo cv. melopepoa*
- *Vigna sinensis*
- *Amaranthus sp.*
- *Polygonum nepalensis*
- *Rumex abyssinicum*
- *Stellaria sennii*
- *Tagetes minuta*
- *Urtica dioica*

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

- Coltivazioni di patata, pomodoro
- 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
- Serre di coltivazione del pomodoro
- Corsi d'acqua in zone precedentemente oggetto d'infezione
- Magazzini di stoccaggio
- Industrie trasformazione

## PARTE A – MONITORAGGIO/SURVEY

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

#### EUROPEA:

#### NAZIONALE:

### Standard di riferimento:

#### PM EPPO:

- PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)
- PM 8/1 (2) Commodity-specific phytosanitary measures Potato
- PM 9/3 (2) National regulatory control systems *Ralstonia solanacearum*
- PM 3/70 (1), Export certification and import compliance checking for potato tubers
- PM 3/71 (1), General crop inspection procedure for potatoes

NOTA: Il protocollo EPPO PM3/026(1), *R. solanacearum*. Inspection and test methods, è stato ritirato nel 2011.

**EFSA card** (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1567>)

#### OTHER:

- STANDARD IPPC/FAO (2008) ISPM 31 Methodologies for Sampling of Consignments, IPPC, FAO, Rome.

### Misure di monitoraggio:

- ✓ Ispezione visiva – *Visual inspection*
- ✓ Campionamento di materiale sintomatico – *Sample taking*
- ✓ Campionamento di tuberi asintomatici – *Sample taking*

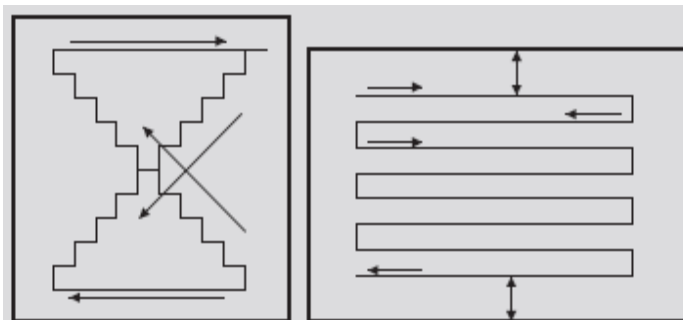
## Ispezione visiva/*Visual inspection*

### Conduzione dell'ispezione:




Si può ipotizzare il seguente schema di ispezione ipotizzato per altri patogeni batterici.

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 georeferenziazione dei campi ispezionati.



--	--

Quando	Cosa guardare	Immagini
<p>Le ispezioni possono andare da metà maggio a fine giugno in relazione all'andamento climatico</p> <p>La comparsa dei primi sintomi verso la metà di maggio in relazione al rialzo temperature</p>	<p><b>Parte aerea</b></p> <p>Avvizzimento di foglie di uno o più fusti. Le piante possono recuperare temporaneamente durante la notte per abbassamento delle temperature.</p> <p>Progressiva perdita di turgore delle foglie con viraggio del colore al verde pallido e poi al bruno.</p> <p>Rapida evoluzione dell'avvizzimento che provoca il collasso dell'intera pianta.</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;">Plant Protection Service Wageningen</p> <div style="text-align: center;">  <p style="text-align: center;"> <a href="https://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php/management-mainmenu-433/stogs-mainmenu-238/clonal-crops/protocol-">https://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php/management-mainmenu-433/stogs-mainmenu-238/clonal-crops/protocol-</a> </p> </div>

Epinastia dei piccioli.  
Presenza di striature brune lungo il fusto può (vedi freccia in Fig. b

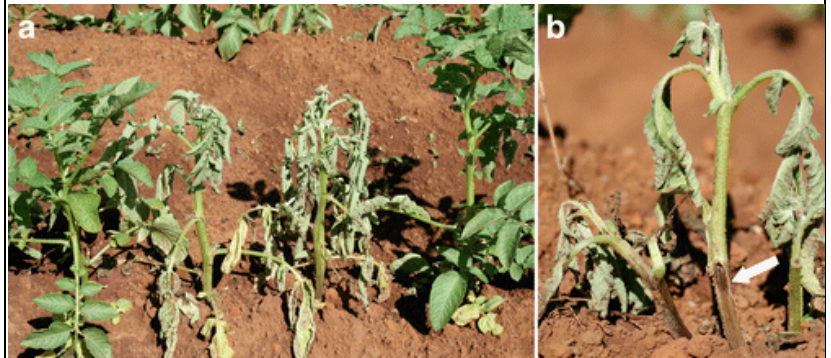


Foto: Ireland et al., 2016.

Imbrunimento interno del tessuto vascolare con possibile presenza di essudati;



Foto: CREA-DC

Fuoriuscita spontanea di essudato da sezioni trasversali di fusto immerso in soluzione liquida

Foto: Defra, Crown



Aree totalmente spoglie in campo per rapida diffusione.



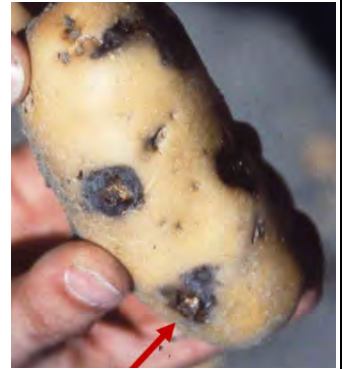
<http://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/fitosanitario/doc/avversita/avversita-per-nome/marciume-bruno-della-patata-o-avvizzimento-batterico-delle-solanacee>

**Tuberi**

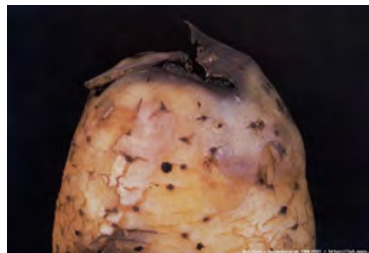
Tipico sintomo superficiale: marciume degli occhi e/o del punto di attacco dello stolone, con possibile presenza di gocce di essudato



J. Janse, PD Wageningen (NL) Romagna



Servizio fitosanitario Regione Emilia-Romagna



Plant Protection Service, Wageningen (NL). Romagna



Servizio fitosanitario Regione Emilia-Romagna

Sezione trasversale: imbrunimento e necrosi dell'anello vascolare e dei tessuti circostanti che possono disfarsi, cavitandosi.



Vascular ring



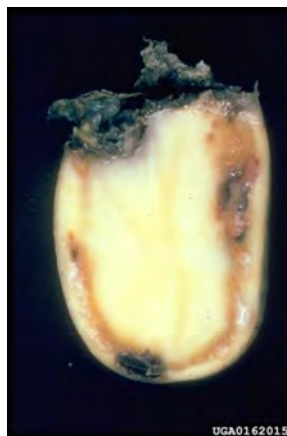
Oozing out of bacterial exudates



Rotting of vascular tissue

[http://agritech.tnau.ac.in/crop\\_protection/crop\\_prot\\_crop%20diseases\\_veg\\_potato\\_6.html](http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/crop_prot_crop%20diseases_veg_potato_6.html)

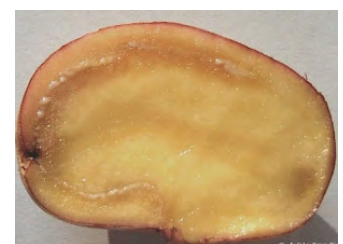
Fuoriuscita di essudato bianco-grigiastro. In corrispondenza dell'anello vascolare.









Plant Protection Service, Wageningen (NL)



Servizio fitosanitario Regione Emilia-Romagna





		<a href="http://ephytia.inra.fr/en/D/8378">http://ephytia.inra.fr/en/D/8378</a>
	<p><b>Pomodoro</b></p> <p>Le foglie giovani per prime manifestano sintomi di avvizzimento</p> <p>Radici avventizie sul fusto</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;"><a href="http://www.sardegnaagricoltura.it">http://www.sardegnaagricoltura.it</a></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;">CREA-DC</p>
<p>Per le piante coltivate all'aperto, il rilevamento del patogeno è più affidabile in condizioni di temperatura mite (&gt; 15 ° C).</p> <p>In <i>S. dulcamara</i> (che cresce nei corsi d'acqua nelle regioni temperate) il batterio è rilevabile durante tutto l'anno.</p>	<p>Altri ospiti vegetali</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <p>CREA-DC</p> <p>Nigel Cattlin</p> </div>

<b>Campionamento/Sample taking</b>	
<b>Cosa prelevare</b>	<b>Come conservare</b>

<p><b>A - Campioni di pianta sintomatici:</b> in presenza di sintomi, prelevare l'intera pianta o parti di essa. È fondamentale che le parti prelevate non siano completamente compromesse dal disseccamento ma presentino parti vegetali ancora vitali.</p> <p><b>B- Campioni di pianta asintomatici.</b></p> <p>Segmenti (1cm) di stelo di piante asintomatiche (di patata o altri ospiti) prelevati in maniera randomica da una popolazione omogenea di massimo 200 piante</p>	<p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non schiacciare le piante campionate.</p> <p>Tenere i campioni lontano da fonti di calore.</p> <p>In attesa della consegna al laboratorio conservare in frigorifero a 4°C avendo cura di consegnarlo entro 72 ore.</p>
<p><b>C- Tuberi sintomatici:</b> prelevare tuberi non completamente compromessi</p> <p><b>D - Tuberi asintomatici</b> La dimensione del campione prevede 200 tuberi per lotto omogeneo</p>	<p>Usare sacchetti di dimensioni adeguate.</p>
<p><b>Acque di superficie o di ricircolo, effluenti di acque reflue e/o industriali</b></p> <p>Da campionare preferibilmente quando le temperature dell'acqua sono pari o superiori a 15 ° C. Effettuare i prelievi ad una profondità inferiore a 30 cm e in prossimità di qualsiasi pianta ospite nota. Per gli effluenti industriali o fognari, i campioni devono essere prelevati al punto di scarico dell'effluente.</p>	<p>Raccogliere i campioni in tubi sterili o bottiglie e trasportare in condizioni di buio e di temperatura 4-10 ° C. Testare preferibilmente entro 24 ore.</p>
<p><b>Terreno</b> A causa della presenza erratica del patogeno e della sua bassa carica, non è raccomandabile l'analisi del terreno. È più affidabile testare piante spontanee /altri ospiti/patate spontanee accresciute nel terreno oggetto di analisi</p>	

## PARTE B – INFORMAZIONI SULLO STATUS del PEST

### Inquadramento normativo disponibile

#### EUROPEA

- Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072
- Union quarantine pest (Annex II B) Reg 2019/2072
- Direttiva 98.57 Concernente la lotta contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

#### NAZIONALE

- Decreto legislativo 214/2005 ALLEGATO II Parte A Sezione 1
- DECRETO 30 ottobre 2007 - Lotta obbligatoria contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) G.U. n. 43 del 20-2-2008 -Suppl. Ordinario n.40)
- Yabuuchi et al. Recepimento della direttiva della Commissione 2006/63/CE

NOTA: Il ceppo responsabile del marciume bruno della patata è stato selezionato come agente di bioterrorismo negli USA negli "US Agricultural Bioterrorism Protection Act" del 2002 (USDA, 2005).

### Inquadramento EPPO

- EPPO A2 List no. 58, EU Annex designation I/A2

### Origini:

*Ralstonia solanacearum* Phylotype IIB sequevar 1 (PIIB-1), agente causale del marciume bruno della patata, origina dal Sud America essendo stato disseminato attraverso il movimento di patate da seme infette.

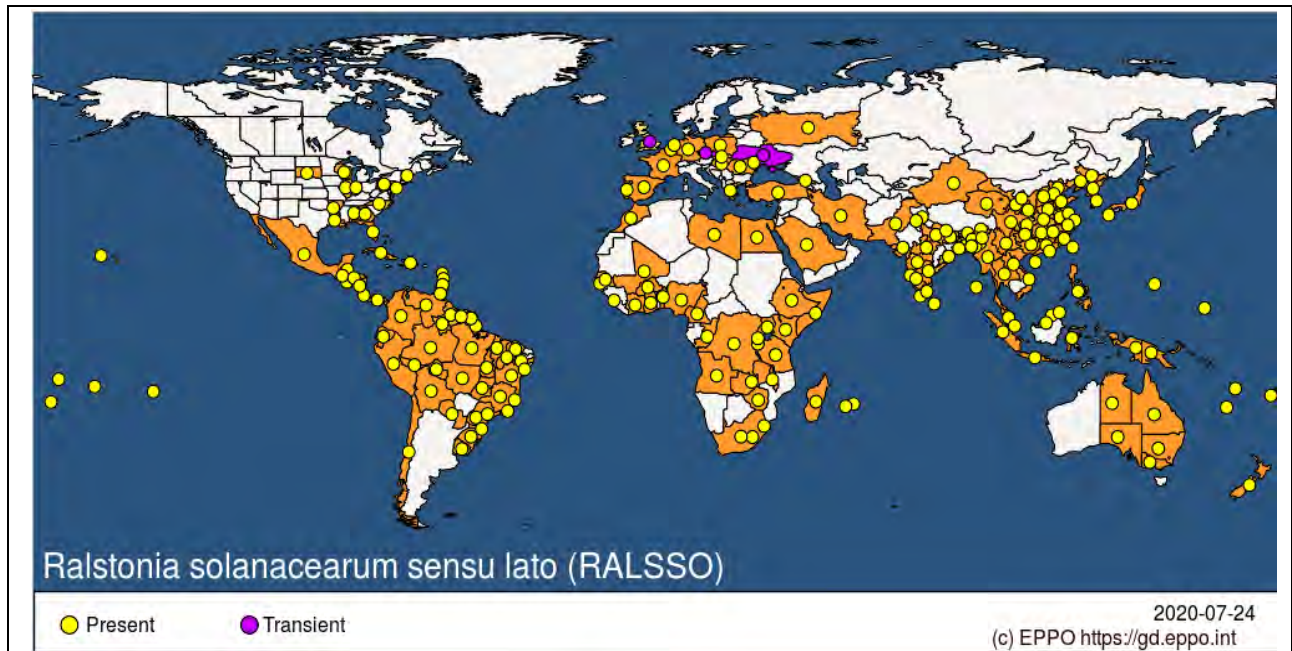
### Distribuzione:

Il batterio è diffuso in tutto il mondo, in particolare:

- Regioni EPPO: Belgio, Germania, Ungheria, Paesi Bassi, Spagna, Isole Canarie, Regno Unito, Inghilterra, Libano (CABI / EPPO, 1999)
- Asia: Bangladesh, Cina (Fujian, Guangdong Guangxi, Hebei, Jiangsu, Taiwan, Zhejiang), India (Himachal Pradesh, Madhya Pradesh, Maharashtra, Manipur, Meghalaya, Tamil Nadu, Tripura, Uttar Pradesh, Bengala occidentale), Indonesia (Giava), Iran
- Giappone (Kyushu), Nepal, Pakistan, Filippine, Sri Lanka (CABI / EPPO, 1999)
- Africa: Burundi, Egitto, Kenya, Libia, Riunione, Sudafrica, Zambia (CABI / EPPO, 1999)
- Sud America: Argentina, Bolivia, Brasile (Goias, Parana, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, San Paolo), Cile, Colombia, Perù, Uruguay (CABI / EPPO, 1999)
- America centrale e Caraibi: Costa Rica, Guadalupa, Messico (CABI / EPPO, 1999)
- Oceania: Australia (Nuovo Galles del Sud, Australia Meridionale, Victoria), Papua Nuova Guinea (CABI / EPPO, 1999)

### Mappa EPPO/CABI

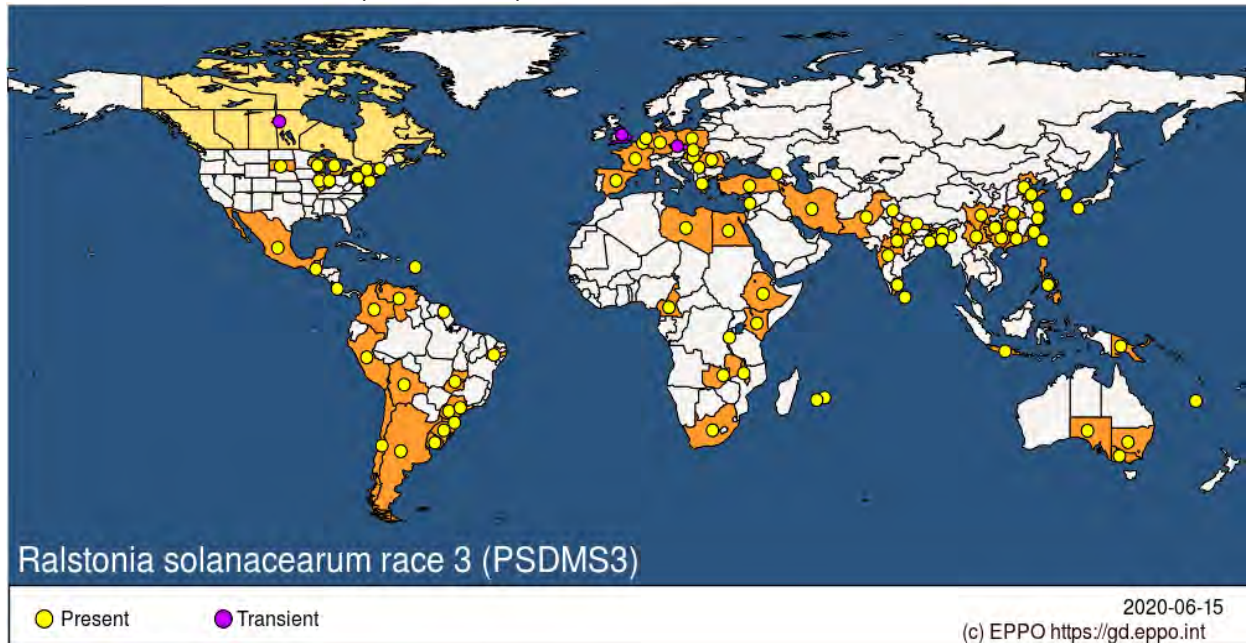
#### *Ralstonia solanacearum sensu lato* (RALSSO)



**Legenda:**

- Presente ■
- Transitorio ■

*Ralstonia solanacearum* (ex razza 3)



**Legenda:**

- Presente ■
- Transitorio ■

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

In Italia il batterio è stato rilevato occasionalmente e la conseguente applicazione di misure di eradicazione e contenimento ne hanno permesso l'eradicatione. Il recente rilevamento (2017) in Emilia-Romagna ha determinato l'attuazione di misure fitosanitarie specifiche, tutt'ora in atto. Di seguito i dettagli dei rilevamenti:

- 1995 Intercettazione, in Emilia-Romagna, di lotti di tuberi di patate infette provenienti dall'Olanda (Mazzucchi, 1995)
- 1995 Intercettazione, in Veneto, di lotti di tuberi di patate infette (Turco, 1995)
- Tra il 1995 e il 1997 sono stati intercettati, in Emilia-Romagna, di lotti di tuberi di patate infette provenienti dall'Egitto (Calzolari *et al.*, 1998)
- 2007 Individuazione, in Sardegna (Assemini), in piante di pomodoro coltivate in serra (Loreti *et al.*, 2008)
- 2008 Individuazione nel Lazio, in piante di pomodoro coltivate in serra
- 2009 Individuazione, in Sardegna (Pula), in piante di pomodoro coltivate in serra (Fiori *et al.*, 2009)
- 2017 Individuazione in Emilia-Romagna su piante di patata e pomodoro in pieno campo.

**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 EUROPHYT ULTIMI 5 ANNI**

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

<b>Country of Export</b>	<b>year</b>	<b>Object</b>	<b>Plant Species (No. of Interceptions)</b>
Egypt	Apr- 2020	Other living plants: ware potatoes	Solanum tuberosum (1)
Egypt	2019	Other living plants: ware potatoes	Solanum tuberosum (5)
Egypt	2018	Other living plants: ware potatoes	Solanum tuberosum (2)

## PARTE C – DIAGNOSI

### Normativa di riferimento:

#### EUROPEA:

#### NAZIONALE:

- DECRETO 30 ottobre 2007 - Lotta obbligatoria contro *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Recepimento della direttiva della Commissione 2006/63/CE

### Protocolli standard di riferimento

#### PM7 EPPO:

- PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)

### 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)
- (IX) **IF Test**
- (X) **Biotest (pathogenicity test)**
- (XI) **Biochemical test**
- (XIII) **Lateral flow=Serological test 2**
- (VIII) **Selective culture media** (comprende identificazione visiva delle colonie)
- (XIV) **ELISA**
- (XV) **PCR**
- (XVIII) **LAMP - molecular testing 3**
- (XX) **Real Time - PCR**

### Matrice (cod IO 05 II)

- Piante di patata o altro ospite vegetale (sintomatici o asintomatici)
- Tuberi di patata (sintomatici o asintomatici)

#### **MATERIALE ASINTOMATICO** (cod IO 05 II)

Il campione standard 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 bruno devono essere isolati e trattati individualmente come materiale sintomatico. Rimuovendo un nucleo di tessuto vascolare dall'ombelico di ciascun tubero seguendo il PM 7/21 (2), EPPO Bulletin (2018) si ottiene un concentrato batterico che viene risospeso e suddiviso come di seguito indicato: 500 µl per il rilevamento di *Ralstonia solanacearum*, 500 µl per il rilevamento di *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 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 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** (cod IO 05 II)

I metodi descritti possono essere applicati a tuberi, e piante di patata sintomatici. Prelevare il materiale per l'isolamento nella zona di confine fra i tessuti sintomatici e quelli sani seguendo il protocollo EPPO Bulletin (2018) PM 7/21 (2) per tutti i dettagli sulla metodica. Per l'isolamento possono essere usati i seguenti substrati generici: nutrient agar (NA), yeast peptone glucose agar (YPGA), sucrose peptone agar (SPA) (Lelliott & Stead, 1987); è preferibile tuttavia l'utilizzo di substrati semi-selettivi come SMSA/Sequeira e il substrato di Kelman (Kelman, 1954). Preparare almeno 2 diluizioni decimali dell'estratto e, per ciascuna, distribuire 50-100 µl su piastra; incubare 2-6 giorni a 28°C. Le colonie, aventi morfologia sospetta per *R. solanacearum*, vengono purificate nel terreno NA e sottoposte ad identificazione. Se utile, utilizzare ceppi di riferimento di *R. solanacearum* come controllo positivo.

I dettagli dell'estrazione e/o della concentrazione del patogeno dalle differenti matrici sintomatiche e asintomatiche e delle fasi di isolamento vengono descritte nel DM 30 ottobre 2007 e nel PM 7/21(2) EPPO.

#### **Tipologia di test**

I metodi utilizzati e il diagramma di flusso da seguire per il rilevamento e l'identificazione del patogeno sono descritti nel DM 30 ottobre 2007 e nel PM 7/21(2) EPPO.

Nel caso di campioni sintomatici il DM 30 ottobre 2007 prevede l'applicazione di almeno uno dei saggi diagnostici rapidi che facilitano la formulazione di una diagnosi presunta, ma non sono fondamentali in quanto un eventuale risultato negativo NON garantisce l'assenza del patogeno. Il protocollo prevede quindi l'effettuazione dell'isolamento.

#### **Saggi diagnostici rapidi** (cod IO 05 IX, XI, XIV, XV))

- fuoriuscita essudato batterico dal fusto
- saggio di rilevamento dei granuli di poli-beta-idrossibutirrato
- saggio sierologico di agglutinazione
- saggio IF, ELISA, PCR (vedi di seguito)

Il PM 7/21(2) EPPO prevede il processamento di materiale sintomatico e asintomatico secondo la stessa procedura e in linea con il DM 30 ottobre 2007 per l'analisi di materiale asintomatico. In particolare, viene prevista una prima fase di applicazione di saggi di screening preliminari:

#### **Saggi di screening preliminari:**

- Isolamento (cod IO 05 VIII)
- Immunofluorescenza (IF) (cod IO 05 IX)
- ELISA (cod IO 05 XIV)
- saggio biologico (cod IO 05 X)
- saggi molecolari (cod IO 05 XV, XVIII, XX)

Fra i saggi molecolari (cod IO 05 XV, XVIII, XX): il DM del 30/19/2007 prevede saggi di PCR [(Seal et al. (1993); Pastrik e Maiss (2000); Pastrik et al. (2002); Boudazin et al. (1999); Opina et al. (1997), Weller et al. (1999)], mentre il PM 7/21 (2) oltre alla PCR ha introdotto anche saggi LAMP (solo per materiale sintomatico) (Lenarcic et al., 2014) e real-time PCR (Weller et al., 2000).

Per esprimere positività del campione, un risultato positivo ottenuto da almeno due saggi di selezione preliminare basati su principi biologici diversi o su differenti target molecolari, deve

essere successivamente confermato da isolamento ed identificazione di una cultura pura del patogeno e dal test di patogenicità.

Il protocollo PM7/21 (2) suggerisce che qualora vengano utilizzati due test (oltre all'isolamento) è necessario che siano basati su principi biologici diversi (es. saggio biochimico e molecolare) o su target di DNA differenti se si usano saggi molecolari.

La successiva fase prevede l'identificazione di colonie sospette individuate in fase d'isolamento, attraverso l'applicazione di saggi d'identificazione.

#### **Saggi d'identificazione** (cod IO 05 XI, XV, XVIII, XX)

Possono essere applicati i saggi indicati come saggio di screening (ad esclusione dell'isolamento). Altri saggi di identificazione vengono riportati nel DM 30/10/2007 e nel PM7/21 (2). Di seguito se ne citano alcuni con i relativi protocolli di riferimento.

- saggi d'identificazione nutrizionali ed enzimatici (DM 30/10/2007) VEDI EPPO
- PCR (DM 30/10/2007)
- LAMP (EPPO PM 7/21 (2))
- Real-time PCR (EPPO PM 7/21 (2))
- Barcoding (EPPO PM 7/21 (2))
- MLST/MLSA (EPPO PM 7/21 (2))

#### **Saggi di conferma** (cod IO 05 X)

- Test di patogenicità

Il test di patogenicità viene considerato saggio di conferma della presenza del patogeno nel campione in analisi nel DM 30/10/2007), mentre viene suggerito dal PM7/21 (2) in casi critici.

### **Riferimenti Bibliografici**

Buddenhagen I. W.; Sequeira, L.; Kelman, A., 1962. Designations Of Races Of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, Saint Paul, V. 52(Supl.), P. 726.

Calzolari A., Contessi A., Mucciolini G., 1998. Monitoring of *Ralstonia solanacearum* in Egyptian potatoes imported through the port of Ravenna (Italy). *Bullettin OEPP* 28, 95-99

Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE (1998) Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara*, and associated irrigation water. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (eds Prior P, Allen C & Elphinstone J), pp. 133– 139. Springer publishing, Berlin (DE).

Fegan, M.; Prior, P., 2005. How Complex Is The "Ralstonia Solanacearum Species Complex". In: Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A. C. (Ed.). *Bacterial wilt: the disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Saint Paul: American Phytopathological Society Press. p. 449-461

Fiori M., Gallelli A., Fiori V., Ligios V. and Loreti S., 2009. A new outbreak of *Ralstonia solanacearum* on tomato in Sardinia. *Journal of Plant Pathology*, 91 (4): S4.103.

Hayward AC. (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 2:65–277.

Hayward AC. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review Phytopathology* 29:65–87.

Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693–695.

Kelman A., Hartman G. L. and Hayward A.c., 1994. Introduction. Pages 1-7 in: *Bacterial wilt: The Disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward and G.L. Hartman, eds. CAB International.

Ireland K. B., B. S. Weir, E. J. Cother, S. Phantavong, P. Phitsanoukane, K. Vongvichid, P. P. Vongphachanh, P. Songvilay, K. Chittarath, S. Sayapatha, J. Walsh, S. Turner, D. ParkL. A. Tesoriero, S. Vilavong, G. S. Duckitt, L. W. Burgess, 2016. First report of *Ralstonia pseudosolanacearum* in the Lao PDR. *Australasian Plant Disease Notes* 11: 36. <https://doi.org/10.1007/s13314-016-0224-3>



Janse JD, Arulappan FAX, Schans J, Wenneker M & Westerhuis W (1998) Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in The Netherlands. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (eds Prior P, Allen C & Elphinstone J), pp. 146–152. Springer publishing, Berlin (DE).

Lelliott RA & Stead DE (1987) *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*, p. 216. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford (GB).

Lenarcic R, Morisset D, Pirc M, Llop P, Ravnikar M & Dreo T (2014) Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen

*Ralstonia solanacearum*. PLoS ONE 9(4), e96027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096027>

Loreti S., Fiori M., De Simone D., Falchi G., Gallelli A., Schiaffino A., Ena S., 2008. Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, on tomato in Italy. *Plant Pathology* 57: 368

Martins OM, Nabizadeh-Ardeakani F, Rudolph K, 2005. Seeds from infected tomato plants appear to be free from contamination by *Ralstonia solanacearum*, when tested by PCR or microbiological assays. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial Wilt: the Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. St Paul, MN, USA: APS Press, 95–101.

Mazzucchi, 1995; *Inf. Agrario* 51, 65-68

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

PM 3/71 (1) General crop inspection procedure for potatoes. *EPPO Bulletin* (2007) 37, 592-597

PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *EPPO Bulletin* (2018) 48 (1), 32–63

Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G., and Fox, R. T. V. 2000. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathology* 19:403-413

Safni, I.; Cleenwerck, I.; De Vos, P.; Fegan, M.; Sly, L.; Kappler, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, p. 3087-3103, 2014. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>

Smith, E. F. , 1896. A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.). United States Department of Agriculture: Division of Vegetable Physiology and Pathology, *Bulletin*, v. 12, p. 1-28.

Turco , P. (1995) Attacchi di *Pseudomonas* su patata. *Informatore Agrario* 46, 66-69

Turco, B.; Saccardi, A.; Piazzini, E.; Martini, G.; Melegatti, A.; Xodo, E.; Gambin, E. (1998) Monitoring of *Ralstonia solanacearum* in the Veneto region (Italy). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 28 (1-2), 85-92.

Weller SA, Elphinstone JG, Smith N, Stead DE & Boonham N (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains using an automated and quantitative fluorescent 50 nucleotide TaqMan assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2853–2858.

Wenneker M, Verdel MSW, Van Beuningen AR, Derks JHJ & Janse JD (1999) *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105, 307–315.

Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, I.; Hotta, H.; Nishiuchi, Y. , 1996. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJBS. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46, n. 2, p. 625-626, 1996. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-46-2-625>

Autori: Dott.ssa Stefania Loreti– CREA-DC; GdL Monitoraggio Cofinanziato - UE