

*Servizio fitosanitario nazionale*

**DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI**

**Documento n. 39**

**SCHEDA TECNICA PER  
INDAGINI SULL'ORGANISMO NOCIVO:  
*Xylella fastidiosa***

<b>REV.</b>	<b>DESCRIZIONE REVISIONE</b>	<b>COMPILAZIONE</b>	<b>APPROVAZIONE</b>	<b>DATA DI ADOZIONE</b>	<b>FIRMA</b>
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 21-22/06/2023	13/07/2023	

**Indice**

<b>Premessa</b>	<b>3</b>
<b>1. Informazioni Generali</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Tassonomia e inquadramento</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Normativa vigente</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Distribuzione geografica</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Presenza in Italia</b>	<b>6</b>
<b>2. Aspetti biologici dell'organismo</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Sintomi/segni</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)</b>	<b>14</b>
<b>3. Siti di maggiore rischio</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Aree a rischio/ Risk areas</b>	<b>14</b>
<b>4. Indagine/survey</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Osservazione visiva</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Campionamento</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Indagine con trappole</b>	<b>17</b>
<b>5. Diagnosi</b>	<b>19</b>
<b>5.1 Campione/Matrice</b>	<b>19</b>
<b>5.2 Test per l'identificazione</b>	<b>19</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>24</b>

## Premessa

La scheda tecnica di indagine per un organismo nocivo o gruppo di organismi nocivi affini riporta le informazioni sull'inquadramento tassonomico e normativo, la diffusione a livello mondiale e nazionale, gli aspetti di carattere generale sul ciclo biologico, le istruzioni su come condurre e quando rilievi visivi e campionamenti sulla base di ampie illustrazioni dei sintomi o danni causati sulle specie ospiti e, nel caso di insetti, le modalità di indagine attraverso l'uso di trappole. La scheda riporta anche le informazioni sulle metodologie diagnostiche per l'identificazione del singolo organismo nocivo o gruppo affine.

La scheda tecnica di indagine tiene conto dei **regolamenti comunitari** e/o **decreti nazionali**, dell'esperienza dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) nel controllo del territorio, degli standard internazionali (**EPPO**, ISPM etc.). La scheda è uno strumento funzionale al riconoscimento dell'organismo nocivo in dotazione al personale tecnico impegnato nell'esecuzione delle indagini (Ispettori fitosanitari, Agenti fitosanitari, Assistenti fitosanitari, Tecnici rilevatori)

La scheda tecnica di indagine viene elaborata da un gruppo di lavoro di esperti (**SFR** e **CREA-DC**) per l'organismo nocivo considerato, con l'eventuale coinvolgimento di altri esperti di Enti di Ricerca e Università. La scheda di indagine viene approvata dal **Comitato Fitosanitario Nazionale** (CFN) e revisionata periodicamente per gli aggiornamenti normativi, distribuzione geografica e procedure di indagine.

## 1. Informazioni Generali

### 1.1 Tassonomia e inquadramento

**Nome scientifico:** *Xylella fastidiosa* Wells et al. (1987)

**Nomi comuni:** Bruscatura fogliare di varie specie vegetali, malattia di Pierce della vite, mal del pennacchio del pesco, clorosi variegata degli agrumi, sindrome del disseccamento rapido dell'olivo.

**Codice EPPO:** XYLEFA (*Xylella fastidiosa*)

#### Posizione tassonomica:

Phylum: Proteobacteria (1PROBP)

Classe: Gammaproteobacteria (1GAMBC)

Ordine: Lysobacterales (1LYSOO)

Famiglia: Lysobacteraceae (1LYSOF)

Genere: *Xylella* (1XYLEG)

Specie: *Xylella fastidiosa* (XYLEFA)

#### Categorizzazione

EU: Quarantine priority pest (Annex IIB - Reg. (UE) 2019/1702).

EPPO: A2

## **1.2 Normativa vigente**

### EUROPEA:

- **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;
- **Regolamento (UE) 2017/625** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017, relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari, recante modifica dei regolamenti (CE) n. 999/2001, (CE) n. 396/2005, (CE) n. 1069/2009, (CE) n. 1107/2009, (UE) n. 1151/2012, (UE) n. 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio, dei regolamenti (CE) n. 1/2005 e (CE) n. 1099/2009 del Consiglio e delle direttive 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE e 2008/120/CE del Consiglio, e che abroga i regolamenti (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE del Consiglio e la decisione 92/438/CEE del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali);
- **Regolamento delegato (UE) 2019/1702** della Commissione del 10 agosto 2019 che integra il regolamento (UE) 2016/2031 del Parlamento europeo e del Consiglio stabilendo l'elenco degli organismi nocivi prioritari;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072** della Commissione 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 e che abroga il regolamento (CE) n. 690/2008 della Commissione e modifica il regolamento di esecuzione (UE) 2018/2019 della Commissione e ss.mm.ii.;
- **Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201** della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa* (Wells et al.) che abroga la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789 e ss.mm.ii..

### NAZIONALE:

- **Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 19.** "Norme per la protezione delle piante dagli organismi nocivi in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031

e del regolamento (UE) 2017/625" (GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie generale n.48 del 26 febbraio 2021) e s.m.i.;

- **Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 24 gennaio 2022.** Adozione del Piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well *et al.*). (GU Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Serie Generale n. 64 del 17 marzo 2022);
- **Ordinanza n. 3** (prot. MASAF n. 273672 del 26/05/2023), relativa alla Definizione aree indenni dall'organismo nocivo *Xylella fastidiosa* nel territorio della Repubblica italiana.

### 1.3 Distribuzione geografica

#### Origini:

**Africa:** assente

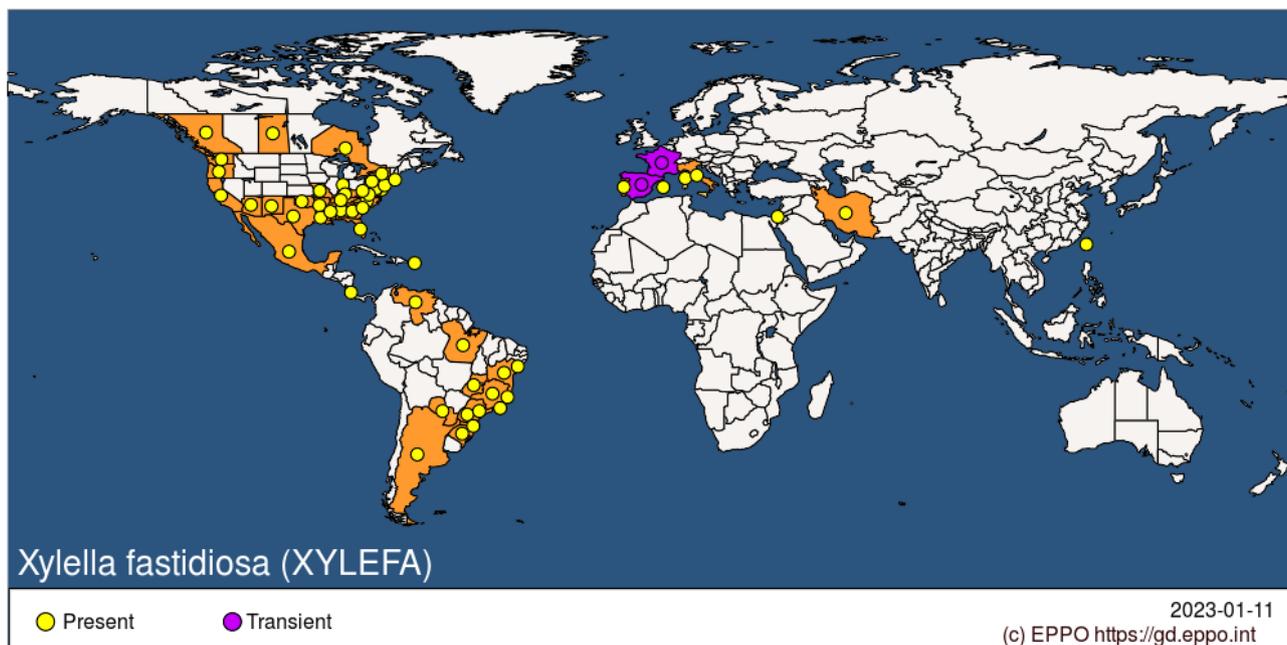
**America:** Argentina, Brasile, Canada, Costa Rica, Messico, Paraguay, Puerto Rico, USA, Venezuela.

**Asia:** Iran, Israele, Taiwan.

**Europa:** Francia (transiente, ma presente in Corsica), Italia, Spagna (transiente, ma presente nelle Isole Baleari), Portogallo.

**Oceania:** assente

#### Mappa EPPO/CABI



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

**1.3.1 Presenza in Italia:**

- dal 2013 in Puglia principalmente su olivo, ma anche in altre specie vegetali fra le quali *Nerium oleander*, *Prunus dulcis*, *Prunus avium*, *Polygala myrtifolia*, *Rhamnus alaternus*, *Westringia fruticosa*, *Acacia saligna*, *Spartium junceum*, *Cistus* sp., *Salvia rosmarinus*, *Lavandula* sp., *Myrtus communis*;
- dal 2018 In Toscana su varie specie vegetali fra le quali *Polygala myrtifolia*, *Prunus dulcis*, *Rhamnus alaternus*, *Spartium junceum*, *Calicotome villosa*, *Laurus nobilis*;
- 2021 nel Lazio (Canino, VT) su *Prunus dulcis*;
- 2022 nel Lazio (Tarquinia, VT) su *Prunus dulcis* e *Spartium junceum*.

## 2. Aspetti biologici dell'organismo

### 2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo

*Xylella fastidiosa* è un batterio gram-negativo con un ampio numero di specie vegetali ospiti (oltre 500 tra specie erbacee e legnose), alcune delle quali di grande importanza economica (vite, agrumi, piante da frutto, caffè), oltre a specie spontanee tipiche della macchia mediterranea (ginestra, alaterno, calicotome, elicriso, rosmarino, cisto, mirto, alloro, lavanda). È un batterio asporigeno che colonizza i vasi xilematici dell'ospite contribuendo, attraverso la produzione di biofilm, all'occlusione dei vasi con conseguenze che possono portare a morte la pianta. I sintomi assomigliano a quelli causati da stress idrico. Sebbene le cellule batteriche possano muoversi sistemicamente attraverso i vasi xilematici di piante sensibili infette, in alcune piante ospiti, tuttavia, la loro presenza può rimanere limitata in alcune parti della pianta (Purcell and Saunders, 1999). Il periodo di tempo tra l'inoculazione e la comparsa di sintomi (periodo di incubazione) è altamente variabile e varia da pochi mesi ad anni, a seconda del genotipo *X. fastidiosa*, la specie ospite, lo stadio fisiologico (età) della pianta e le condizioni di crescita (EFSA 2018, 2019a). D'altra parte, alcune specie vegetali potrebbero anche non esprimere alcun sintomo, che può anche dipendere dalle condizioni di crescita (EFSA, 2019). Il batterio è trasmesso da emittenti fitomizi (Fig.1) che si nutrono succhiando la linfa dei vasi xilematici. In Italia l'insetto vettore più comune è *Philaenus spumarius* e in misura minore *Neophilaenus campestris* e *P. italosignus* (Cavalieri *et al.*, 2019). *P. spumarius* è presente in tutta Europa ed è una specie polifaga, con un gran numero di piante ospiti. *P. italosignus* è una specie autoctona in Italia, ma è diffuso per lo più nelle regioni meridionali e in Sicilia. *N. campestris* è presente soprattutto in Europa occidentale e compie il proprio ciclo vitale su piante erbacee. È stato invece escluso il ruolo di *Cicadella viridis* nella trasmissione di *X. fastidiosa* da olivo a olivo (Bodino *et al.*, 2022).



Fig.1 - Tratto da: <https://olivoelio.edagricole.it/agrofarmaci-difesa/vettori-della-xylella-monitoraggio-e-controllo>

Le malattie causate da *X. fastidiosa* derivano dall'interazione tra il batterio, le piante ospiti, comprese le piante ospiti asintomatiche (che fungono da serbatoi), gli insetti vettori e le condizioni ambientali (EFSA, 2018; Chatterjee *et al.*, 2008).

Il batterio viene trasmesso in modo persistente senza un periodo di latenza dopo l'acquisizione (Almeida *et al.*, 2005). I vettori (sia ninfe che adulti) acquisiscono i batteri nutrendosi della linfa xilematica dell'ospite e possono inoculare l'agente patogeno in piante sane immediatamente dopo l'acquisizione. Nell'insetto i batteri restano limitati al canale alimentare e non colonizzano il resto del corpo in maniera sistemica. Aderiscono e si moltiplicano in parti dell'intestino quali il *precibarium* e il *cibarium*; ciò implica che i vettori perdono infettività con la muta, in quanto durante questa fase l'intestino si rinnova. Pertanto, gli adulti appena emersi devono acquisire nuovamente *X. fastidiosa* per diventare infettivi e diffonderlo. Una volta infettivi, i vettori adulti invece possono trasmettere il batterio per tutta la loro vita (Almeida *et al.*, 2005). Il batterio non viene trasmesso per via transovarica alla progenie del vettore (Freitag, 1951). Gli adulti alati, a causa della loro elevata mobilità e della loro infezione persistente, sono i principali responsabili della diffusione di *X. fastidiosa*. La trasmissione di *X. fastidiosa* a nuove piante ospiti avviene anche in presenza di pochissime cellule batteriche vive nell'intestino del vettore (Hill e Purcell, 1995). L'efficienza della trasmissione varia sostanzialmente a seconda della specie di insetto, della pianta ospite e del genotipo *X. fastidiosa*. Di seguito è rappresentato il ciclo vitale di *P. spumarius* nella regione Puglia (Italia) (tratto da EFSA, 2019). (Fig. 2)

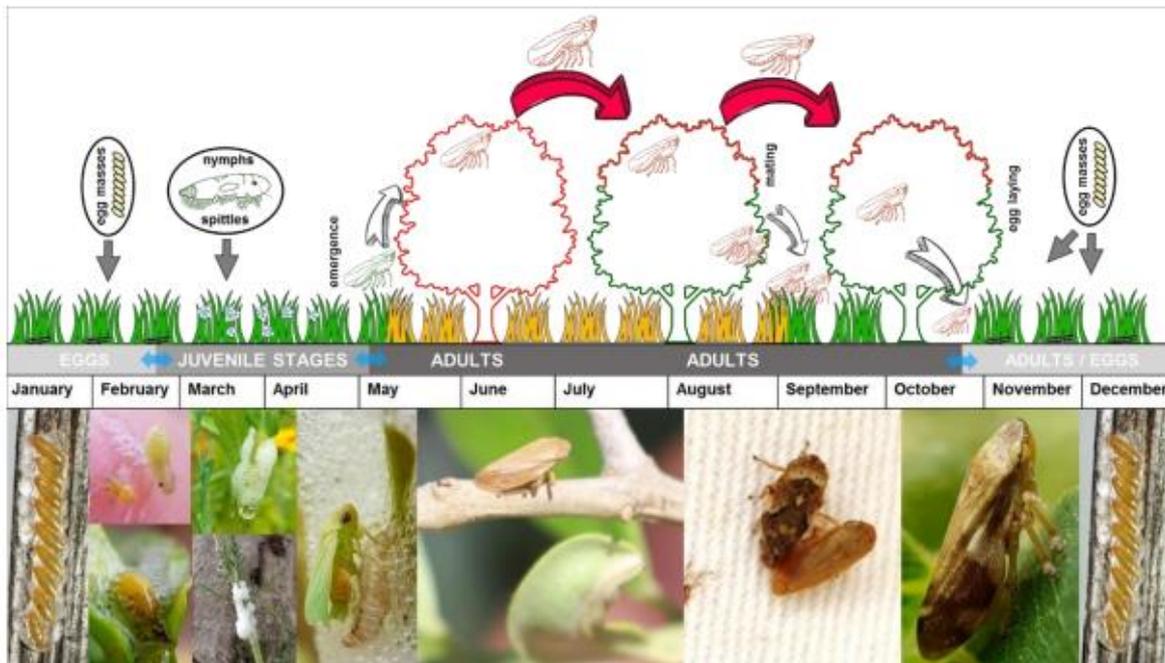


Fig. 2 - Tratto da EFSA, 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*.

## 2.2 Sintomi/segni

La tipologia di sintomo dipende dalla combinazione fra la specie vegetale ospite e il ceppo di *X. fastidiosa*. I sintomi sulle specie ospiti principali (per impatto della malattia e interesse commerciale) sono riportati di seguito.

### Olivo

Sintomi di bruscatura fogliare e deperimento (*dieback*) su olivo sono stati descritti in California (Krugner *et al.*, 2014) in associazione a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*. Tuttavia, non è stata soddisfatta la prova di patogenicità, non essendo certa la correlazione fra la presenza di *X. fastidiosa* e i sintomi. In Puglia (sud Italia) la sindrome del disseccamento rapido dell'olivo è stata associata a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Saponari *et al.*, 2013). La malattia si manifesta (Fig. 3) con brusature fogliari, disseccamento della porzione apicale e marginale della foglia e repentino disseccamento di rami e drupe in accrescimento. La chioma presenta disseccamenti a carico di rami e/o branche in maniera irregolare ('pelle di leopardo'). Il decorso della malattia porta le piante a morte.



Fig.3 - Sintomi di disseccamento rapido dell'olivo in piante di olivo. Foto Donato Boscia, CNR, Istituto Protezione Sostenibile Piante (IPSP), Bari

### **Vite**

Il sintomo principale su vite è la bruscatatura fogliare (Fig. 4). I margini fogliari disseccano rapidamente accompagnati da un alone clorotico, l'intera lamina fogliare può disseccare. I tessuti infetti possono maturare irregolarmente mostrando parti non lignificate (verdi) su tralci lignificati (livello internodi). È possibile il disseccamento dei grappoli che rimangono attaccati al tralcio, mentre il tronco non presenta alterazioni.



Fig. 4 - Bruscatatura fogliare e maturazione irregolare dei tessuti su vite. Foto: J. Clark, University of California, Berkeley (US) (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>).

### **Agrumi**

I primi sintomi fogliari appaiono come piccole macchie clorotiche sulla superficie superiore che corrispondono a macchie brune dall'aspetto gommoso sul lato inferiore della foglia (Fig. 5). I sintomi si rendono più evidenti sulle foglie completamente espanse indipendentemente dall'età della pianta e principalmente sulle cultivar di arancio dolce. La clorosi internervale fogliare è somigliante alla carenza di zinco.

Gli alberi infetti si presentano deboli e la chioma va incontro a defogliazione e deperimento di rami e branche.

Fioritura e allegagione hanno un decorso classico, ma nelle piante colpite non si verifica un normale diradamento dei frutti che rimangono piccoli, maturano in anticipo con una consistenza cuoiosa. Le piante di solito non muoiono, ma la resa e la qualità del frutto sono fortemente ridotte (Donadio & Moreira, 1998).



Fig. 5 - Clorosi variegata degli agrumi: sintomi di clorosi internervale su foglia e maturazione anticipata dei frutti. Foto: M. Scortichini, CREA-OFA Roma (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>) e Alexander Purcell, University of California (<https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1262026>)

### **Caffè**

Sintomi di bruscatatura fogliare sono presenti come imbrunimenti della lamina fogliare a partire dai margini. Le foglie infette cadono prematuramente. I germogli hanno una crescita stentata e le foglie apicali appaiono clorotiche e di taglia ridotta (Fig. 6). I margini fogliari possono essere più o meno arricciati (curling) e le piante presentano raccorciamento degli internodi e crescita stentata. I sintomi possono progredire col deperimento dei germogli. In Costa Rica sono stati riportati i cosiddetti sintomi di “crespera” in associazione a piante infette di caffè.



Fig. 6 - Arricciamento dei margini fogliari, clorosi e deformazione delle foglie (asimmetria). Foto Bruno Legendre, Anses, Plant Health Laboratory, Angers (FR) e Maria Bergsma-Vlami, NPPO (NL). (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>)

### **Pesco**

Le piante infette presentano internodi raccorciati, incrementata ramificazione laterale, foglie affastellate (verde più scuro del normale), fioritura anticipata, permanenza su rami di fiori e foglie, pezzatura ridotta di frutti e maturazione anticipata (Fig. 7). Lo sviluppo dei sintomi è lento (fino a 18 mesi). La chioma assume un aspetto compatto e arrotondato. Non si manifestano i sintomi di bruscatatura fogliare.



Fig. 7 - Foto: M. Scortichini, CREA-OFA Roma (<https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/photos>)

### ***Erba medica***

La pianta mostra una crescita stentata che può non essere evidente per molti mesi dopo l'infezione. Le giovani foglie sono più piccole e spesso presentano una colorazione più scura rispetto alle piante sane. Il fittone è di dimensioni normali, ma il legno ha un colore insolitamente giallastro, con sottili strisce scure di tessuto morto (Fig. 8). Nelle piante appena infettate si osserva un ingiallimento del legno al di sotto dello strato corticale esterno, mentre gli strati più interni non presentano alterazioni. I sintomi di nanismo peggiorano progressivamente, eventualmente portando la pianta a morte.



Fig. 8 - Crescita stentata della pianta con vegetazione più scura rispetto alla sana. Foto: R.E. Davis and M.J. Davis, APS image data base <https://imagedatabase.apsnet.org/search.aspx?publicationId=229&ps=1>

### ***Varie specie vegetali (verde urbano, foreste, macchia mediterranea, materiale vivaistico)***

Molte specie vegetali presentano il caratteristico sintomo della bruscuratura fogliare (Fig. 9). Esempi sono il mandorlo, il ciliegio, il mirtillo e varie specie presenti nel verde urbano come *Acer* spp., *Cornus florida*, *Celtis occidentalis*, *Liquidambar styraciflua*, *Morus alba*, *Platanus* spp., *Quercus* spp. e *Ulmus americana* (Gould & Lashomb, 2007), *Polygala myrtifolia*, oleandro, mimosa e specie tipiche della macchia mediterranea come rosmarino, lavanda, mirto, cisto e ginestra. Nelle specie a foglia espansa, le foglie colpite hanno una necrosi marginale talora circondata da un alone clorotico (giallo) o rosso. Nelle altre specie si osservano sintomi di disseccamento irregolari nella pianta. In generale, i sintomi progrediscono dalle foglie più vecchie a quelle più giovani e, con il progredire della malattia, i rami seccano e la pianta può presentare un aspetto spoglio, fino ad andare incontro a morte (Fig. 9).



*Polygala myrtifolia*



*Nerium oleander*



*Lavandula angustifolia*



*Rosmarinus officinalis*



*Myrtus communis*



*Cistus sp.*



*Acacia saligna*



*Spartium junceum*

Fig. 9 Tutte le foto in questa sezione, se non diversamente indicato sono fornite da: Donato Boscia, CNR, Istituto Protezione Sostenibile Piante (IPSP), Bari

### **2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)**

Secondo l'ultimo rapporto EFSA (EFSA, 2023) sono 679 le specie vegetali ospiti di *X. fastidiosa* di cui 304 generi e 88 famiglie. Questo rapporto EFSA riporta circa 15 specie vegetali in più rispetto al precedente rapporto del 2020 (EFSA, 2020a). Il database in oggetto include tutte le specie di piante ospiti in cui l'agente patogeno è stato rilevato e segnalato. Le specie maggiormente attenzionate sono quelle ritrovate positive sul territorio europeo che sono indicate nell'elenco della Commissione Europea soggetto a costante aggiornamento.

Il Regolamento (UE) 2020/1201 elenca, in allegato I, tutte le piante da impianto, escluse le sementi, "ospiti" di *X. fastidiosa* e individua, in allegato II, le "piante specificate", ossia quelle notoriamente sensibili a sottospecie specifiche dell'organismo nocivo. Le piante ospiti vengono sottoposte a controlli ufficiali al momento dell'introduzione nell'Unione e sono previsti controlli annuali sulle piante specificate anche anteriormente il loro primo spostamento all'interno del territorio dell'UE o al momento della loro esportazione, in base ai requisiti fitosanitari dei diversi Paesi Terzi. In particolare, per le piante da impianto, escluse le sementi, di *Coffea*, *Lavandula dentata* L., *Nerium oleander* L., *Olea europaea* L., *Polygala myrtifolia* L. e *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb è previsto un controllo rafforzato, in quanto considerate maggiormente sensibili alle diverse sub-specie europee di *X. fastidiosa*.

## **3. Siti di maggiore rischio**

### **3.1 Aree a rischio/ Risk areas**

Fondamentale è monitorare tutte le attività correlate ai pathway di introduzione del batterio: commercio, movimentazione, importazione e preparazione di materiale di moltiplicazione delle piante. Di conseguenza rappresentano siti a rischio i vivai, i centri di giardinaggio, i porti, gli aeroporti, i centri di vendita di materiale vegetale di importazione da Paesi in cui è presente la malattia e le principali vie di comunicazione a causa della possibile diffusione del vettore tramite i mezzi di trasporto (hitchhiking) e rilascio involontario del vettore.

Sono fattori di rischio:

- Movimento involontario di insetti vettori infetti associati alla movimentazione di materiale vegetale da aree in cui *X. fastidiosa* è presente verso aree indenni.
- Spostamento intenzionale di materiale vegetale da parte dei cittadini, in particolare dei collezionisti di piante.
- Attività in aree urbane correlate ad acquisto/movimentazione di piante da parte di cittadini (mercati, vivai, centri di giardinaggio).
- Distanza dalla zona costiera (fattore).
- Altitudine (fattore).

Sono siti a rischio:

- Percorsi turistici (trasporto di veicoli e imbarcazioni dalle aree in cui è presente il batterio verso aree indenni idonee alla sua stabilizzazione); zone di transito da rientro vacanziero, come aree ristoro e/o tratti autostradali e aree di sosta camper.
- Punti di ingresso portuali e/o transfrontalieri.
- Campi e frutteti/vigneti trascurati e abbandonati nelle aree rurali.
- Impianti di nuovi frutteti.
- Impianti di piante specificate che presentino sintomi di deperimento.
- Aree naturali o naturalizzate specialmente nella zona costiera coperte da vegetazione spontanea e macchia mediterranea.

I siti a maggiore rischio secondo la codifica Europhyt:

All'aperto: 1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 1.2 frutteto/vigneto; 1.3 vivaio; 1.4 foresta; 2.2 siti pubblici; 2.5.2 centro giardinaggio.

Al chiuso: 3.1 serra

Le indagini sono effettuate utilizzando le linee guida per indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio (EFSA, 2020b); si applicano sia alle aree demarcate che indenni, con modalità definite dai regolamenti.

## 4. Indagine/survey

### Modalità di indagine previste

- ✓ Osservazione visiva – *Visual Inspection*
- ✓ Campionamento – *Sample Taking*
- ✓ Indagine con trappole – *Trapping*

#### 4.1 Osservazione visiva

**Aspetti generali:** al fine di superare le criticità rappresentate dal periodo di latenza e l'assenza di sintomi, il Regolamento (UE) 2020/1201 prevede la realizzazione di indagini statisticamente valide e basate sul rischio, che si basano sul prelievo di campioni vegetali per l'analisi di laboratorio (vedi paragrafo successivo). Al solo titolo informativo nel paragrafo 2.2 sono riportati alcuni esempi di sintomo indotto da *X. fastidiosa*.

## **4.2 Campionamento**

**Aspetti generali:** durante il campionamento l'ispezione visiva supporta l'individuazione del quadro sintomatologico causato da *X. fastidiosa*. Come noto, infezioni da *X. fastidiosa* comportano l'insorgenza di sintomi aspecifici, analoghi a quelli causati da patogeni vascolari di diversa origine (es. fungina) o da diversi fattori abiotici (stress ambientali, carenze idriche, inquinanti atmosferici, problemi nutrizionali, scottature solari). Il lungo periodo di latenza che intercorre tra l'infezione e la comparsa dei sintomi rappresenta un ulteriore fattore di criticità, influenzando significativamente la possibilità di una intercettazione precoce delle infezioni tramite le sole ispezioni visive. Il periodo asintomatico varia significativamente in conseguenza dei molteplici processi biologici coinvolti nell'interazione ospite/sottospecie/ambiente. Il campionamento prevede la raccolta di campioni di materiale vegetale sintomatico e/o asintomatico e/o insetti vettori.

Le linee guida sull'ispezione sono fornite nel PM 3/81 "*Inspection of consignments for Xylella fastidiosa*" (EPPO, 2022a) e PM 3/82 "*Inspection of places of production for Xylella fastidiosa*" (EPPO, 2022b). L'ISPM 31 (IPPC, 2008) fornisce indicazioni sul numero di piante da campionare in casi specifici (es. vivai).

Lo strumento statistico RiBESS+ valuta il sample size utilizzando un approccio basato sull'inserimento di vari parametri come input (dimensioni della popolazione target, il numero di unità epidemiologiche e la percentuale di piante per ciascuna di esse, i fattori di rischio, l'efficacia dei metodi di campionamento e la sensibilità dei metodi di diagnosi). I campioni per il laboratorio devono essere composti da rami/talee con foglie attaccate o foglie con picciolo integro. Il campione dovrebbe includere foglie mature evitando giovani germogli in crescita. Studi recenti condotti nell'ambito del progetto XF-ACTORS hanno dimostrato che negli ulivi infetti il batterio è stato rilevato in modo più consistente nei ramoscelli che nelle foglie, soprattutto quando i campioni provengono da cultivar di ulivo resistenti (ovvero con bassa popolazione batterica).

Per le piante piccole si può inviare al laboratorio l'intera pianta.

La concentrazione batterica *in planta* dipende da fattori ambientali, dai ceppi e dall'ospite vegetale. Il campionamento dovrebbe preferibilmente essere eseguito durante il periodo di crescita attiva della pianta per massimizzare la probabilità di rilevamento (Hopkins, 1981).

Dopo che i campioni sono stati prelevati, devono essere inviati al laboratorio il prima possibile.

Tipologia campione	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare	Immagini
<p><b>Campioni da piante</b> sintomatiche e/o asintomatiche</p>	<p><b>Piante sintomatiche:</b> rami/talee, 10 - 25 foglie.</p> <p><b>Piante asintomatiche:</b> 4 - 10 rami ai quattro punti cardinali della chioma.</p>	<p><b>Piante al chiuso:</b> campionamenti tutto l'anno</p> <p><b>Piante all'aperto:</b> tutto l'anno. Per dettagli vedi paragrafo 3.2.1.1 EPPO PM 7/24 (4).</p>	<p><b>Durante il trasporto:</b> mantenere i campioni lontano da fonti di calore. Verifica dell'assenza di vettori nei sacchetti dei campioni</p>	 <p>Tratto da: <a href="https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf">https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf</a></p> <p>Tratto da: <a href="https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf">https://www.ponteproject.eu/wp-content/uploads/2017/05/XYLELLA-WORKSHOP-MANUAL-DETECTION-ENG-web.pdf</a></p>

### 4.3 Indagine con trappole

#### Aspetti generali:

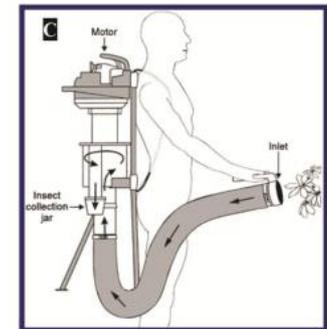
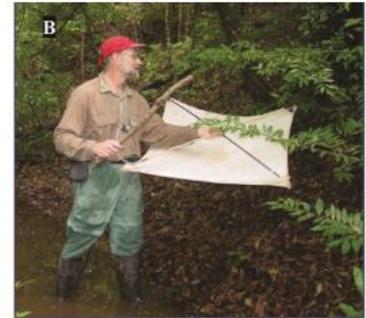
Sono di seguito riportate le modalità di campionamento degli insetti vettori.

Sito di indagine	Tipologia di trappola	Posizionamento trappola	Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli	Immagini
<p>Vedi sezione 3, con particolare riferimento a: campi, frutteti/vigneti, aree naturali o naturalizzate, vie di trasporto principale.</p>	<p>Trappola adesiva gialla</p>	<p>- Tarda primavera – inizio estate e tarda estate-autunno: posizionamento a livello della vegetazione spontanea;</p> <p>- Giugno-fine agosto: posizionamento in chioma.</p>	<p>Variabile in base al contesto geografico: dalla tarda primavera all'autunno. Le trappole devono essere sostituite ogni 10-15 giorni (al massimo ogni 21 giorni).</p>	

Retino entomologico (A); tecnica del frappage su arboree (B); aspiratori a motore (C).

Il campionamento degli insetti adulti deve essere effettuato sulle erbacee nei periodi aprile-maggio e settembre-novembre e sulle arboree nel periodo giugno-settembre.

Variabile in base al contesto geografico: dalla tarda primavera all'autunno.



Tratto da: [WORKSHOP-MANUAL-INSECTS-web.pdf](#)

## 5. Diagnosi

### Protocolli ufficiali SFN

Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 24 gennaio 2022. Adozione del Piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well et al.). (GU Serie generale - n. 64 del 17-3-2022.)

### Standard di riferimento

PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12575>

PM7/141 (1) *Philaenus spumarius*, *Philaenus italosignus* and *Neophilaenus campestris*

### IPPC:

ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 25: *Xylella fastidiosa*

### 5.1 Campione/Matrice

Alcune specifiche sulla tipologia del campione da prelevare in campo sono riportate nella tabella del paragrafo 4.2. La tipologia di campione di laboratorio da utilizzare per le analisi è riportata nel protocollo EPPO PM7/24 (4). Nel caso di campioni compositi (multipli) seguire le indicazioni delle tabelle 1 di pag. 185 e tabella 2 pag. 186. Per ragioni di spazio si ritiene utile visualizzare le tabelle alla fonte. (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12575>).

I campioni vegetali devono essere ispezionati prima di iniziare le analisi e, se presenti, le foglie sintomatiche devono essere selezionate ed analizzate rimuovendo le parti necrotiche. Qualora nel sacchetto siano presenti vettori, mantenere i campioni 12 ore in frigorifero. I campioni sporchi devono essere puliti prima dell'inizio dell'analisi. Se il campione è asintomatico, le foglie da cui prelevare il campione di laboratorio devono essere rappresentative dell'intero campione ricevuto. Ai fini dell'isolamento i campioni possono essere conservati in frigorifero per un massimo di 3 giorni. Per l'esecuzione di test molecolari i campioni possono essere conservati a - 20°C o a - 80°C per mantenimento a lungo termine.

Per quanto riguarda i campioni di insetti vettori, questi devono essere conservati in etanolo al 95-99% per lunghi periodi o a - 20°C o - 80°C per brevi periodi. Se il campione è fornito su trappole adesive, queste possono essere conservate a -20°C o a 4°C per brevi periodi, prima di rimuovere gli individui di interesse e trasferirli in etanolo.

### 5.2 Test per l'identificazione

La procedura di seguito riportata si articola in una fase di screening preliminare ed una successiva fase di identificazione. L'estrazione del DNA da campioni vegetali e insetti vettori per le analisi

molecolari può essere ottenuta utilizzando kit commerciali standard e il metodo basato su tampone CTAB. I seguenti kit commerciali sono ampiamente utilizzati e sono stati convalidati in diversi laboratori dell'Unione Europea (UE) per processare campioni di diverse specie di piante: DNeasy Plant Mini Kit-based kit di estrazione (Qiagen), DNeasy® Mericon™ Food Standard Protocol modificato (Qiagen), Estrazione basata su QuickPick™ SML Plant DNA Kit (Bio-Nobile). E' stato evidenziato che l'aggiunta di un passaggio di ultrasonicazione (1 min a 35–40 kHz) sull'estratto vegetale prima dell'estrazione del DNA (estrazione basata su CTAB o estrazione basata su QuickPick™ SML Plant DNA Kit, Bio-Nobile) incrementa la sensibilità analitica dei test. La descrizione delle procedure di estrazione degli acidi nucleici è descritta nell'allegato 3 del protocollo PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* (EPPO) (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12575>).

**Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato:**

- Morphological identification (per vettori)
- PCR
- LAMP=Molecular testing 3
- PCR/RT-PCR + Sequencing
- Real Time - PCR

Vengono di seguito indicati i test diagnostici per il rilevamento di *X. fastidiosa* e la identificazione della sottospecie secondo il Regolamento di esecuzione (UE) 2020/1201 della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa*.

(<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R1201&from=EN>).

Tale regolamento prevede esclusivamente metodi di diagnosi molecolari come PCR, LAMP e Real Time - PCR.

**Test per il rilevamento o individuazione della presenza di *Xylella fastidiosa***

- PCR (Minsavage *et al.*, 1994)
- Real Time - PCR (Harper *et al.*, 2010; erratum 2013)
- Real Time - PCR (Ouyang *et al.*, 2013)
- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Harper *et al.*, 2010, erratum 2013)

In particolare, l'analisi di campioni vegetali sintomatici può essere effettuata scegliendo i metodi fra quelli sopra indicati. I metodi utilizzati (almeno in numero di due) devono essere basati su principi biologici differenti o, per i test molecolari, su target genomici diversi. E' possibile utilizzare un solo

test fra quelli ammessi dal regolamento (UE) 2020/1201 nel caso di analisi di materiale asintomatico in un'area indenne o per l'analisi di campioni prelevati da piante sintomatiche in un'area infetta o in zona tampone. L'isolamento non è inserito fra i test di screening per la oggettiva difficoltà ad isolare il batterio. I campioni devono essere considerati come campioni con "presenza di *X. fastidiosa*" quando sono positivi almeno due saggi. Per le aree in cui è presente il batterio o nelle zone tampone è sufficiente un test positivo per considerare il campione con "presenza di *X. fastidiosa*".

Qualora il risultato dell'analisi di rilevamento preliminare produca risultati inconsistenti è raccomandata la ripetizione dell'analisi e/o un nuovo campionamento.

Qualora il campione venga determinato positivo ovvero con "presenza di *Xylella fastidiosa*" è possibile procedere con l'isolamento sui seguenti mezzi di coltura agarizzati riportati nel PM 7/24 (4), Appendice 12, sez. B pag. 215)

- PD2 (Davis *et al.*, 1980)
- BCYE modificato
- PWG modificato

Le colonie hanno lunghi tempi di crescita (1-3 settimane) a 28°C e presentano un diametro variabile tra 1-1,5 mm e morfologia variabile. In particolare, su tutti i mezzi appaiono circolari e lievemente convesse; in PD2 e BYCE appaiono opache e biancastre. In BYCE le colonie contrastano con la colorazione scura del terreno (Fig. 10).



*Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (CoDiRO) su BYCE



*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* su PD2



*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* su PWG

Fig.10 - Foto: BYCE, M. Saponari (IPSP CNR Bari); PWG Anses (tratte da PM 7/24 (4), 2019)

### Test per l'identificazione delle sottospecie di *Xylella fastidiosa*

- Multi Locus Sequence Typing (MLST) (Yuan *et al.*, 2010) in grado di determinare tutte le sottospecie;
- PCR (Hernandez-Martinez *et al.*, 2006): identificazione delle sottospecie *fastidiosa*, *multiplex* e *sandyi*;
- PCR (Pooler & Hartung 1995): identificazione della sottospecie *pauca*.

Questa fase prevede l'identificazione della sottospecie e la determinazione della sequenza tipo (ST) a partire dalla coltura pura di *X. fastidiosa* isolata. A causa della difficoltà della procedura di isolamento e della lunga tempistica per la sua esecuzione, l'assegnazione della sottospecie può

essere effettuata anche direttamente da materiale vegetale o da insetti vettori. In questo caso la caratterizzazione può essere resa difficoltosa, rispetto alla procedura applicata su coltura pura, a causa della minore concentrazione del batterio nelle suddette matrici (pianta e vettore) e della presenza di inibitori che ostacolano le amplificazioni. L'assegnazione della sottospecie e del ST è necessaria nel caso di un nuovo ritrovamento del batterio (in aree precedentemente indenni) o in associazione a nuovi ospiti vegetali.

L'intera procedura di diagnosi per *X. fastidiosa* viene descritta nel protocollo PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* (EPPO) (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/epp.12575>), che prevede il processamento di campioni vegetali e di insetti vettori secondo due diversi diagrammi di flusso per il rilevamento e l'identificazione del patogeno.

La prima identificazione di *X. fastidiosa* in nuova area o in associazione ad un nuovo ospite vegetale può avvalersi della collaborazione con il laboratorio nazionale di riferimento. Le analisi di secondo livello per la conferma del risultato dell'analisi di primo livello sono in capo al laboratorio nazionale di riferimento. In particolare, il DM 24/12/2022 definisce che nell'ambito della Rete nazionale, sono riconosciuti come laboratori nazionali di riferimento per *X. fastidiosa*, conformemente a quanto previsto dall'art. 101 del Reg. (UE) 2017/625, il Centro di ricerca Difesa e Certificazione del CREA e il l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR.

### **Identificazione degli insetti vettori di *X. fastidiosa* in Europa**

Il PM7/141(1) (EPPO) fornisce la descrizione morfologica dei diversi stadi vitali (uova, stadi giovanili e adulto) di *P. spumarius*, *P. italosignus* e *N. campestris*, le specie di insetti riconosciuti come vettori di *X. fastidiosa* in Europa. Nel documento si presta particolare attenzione sui caratteri di *P. spumarius* di cui si dispongono maggiori informazioni.

Di seguito sono riportate le caratteristiche morfologiche principali degli adulti delle tre specie (Fig. 11):

- Adulto di *P. spumarius*: i maschi (5.3-6 mm) sono più piccoli delle femmine (5.4-6.9 mm). La forma del corpo è più arrotondata rispetto alle specie del genere *Neophilaenus*. Il colore è molto variabile, dal giallo chiaro al nero, e non può quindi essere considerato un carattere distintivo della specie.
- Adulto di *P. italosignus*: può essere distinto con certezza da *P. spumarius* solamente attraverso l'osservazione al microscopio dell'apparato genitale maschile. Il maschio ha dimensioni di 6.4-7.2 mm, la femmina ha dimensioni 7-8.1 mm.
- Adulto di *N. campestris*: il maschio ha dimensioni di 5-6.3 mm, la femmina ha dimensioni di 5.4-5.7 mm. La forma del corpo è più snella rispetto alle specie del genere *Philaenus*. Il colore varia dal grigio-giallo al grigio-marrone, spesso con venature rossastre e con una striscia

longitudinale scura che si estende dal vertice verso lo scutello. Il margine esterno delle ali anteriori presenta due macchie puntiformi chiare.

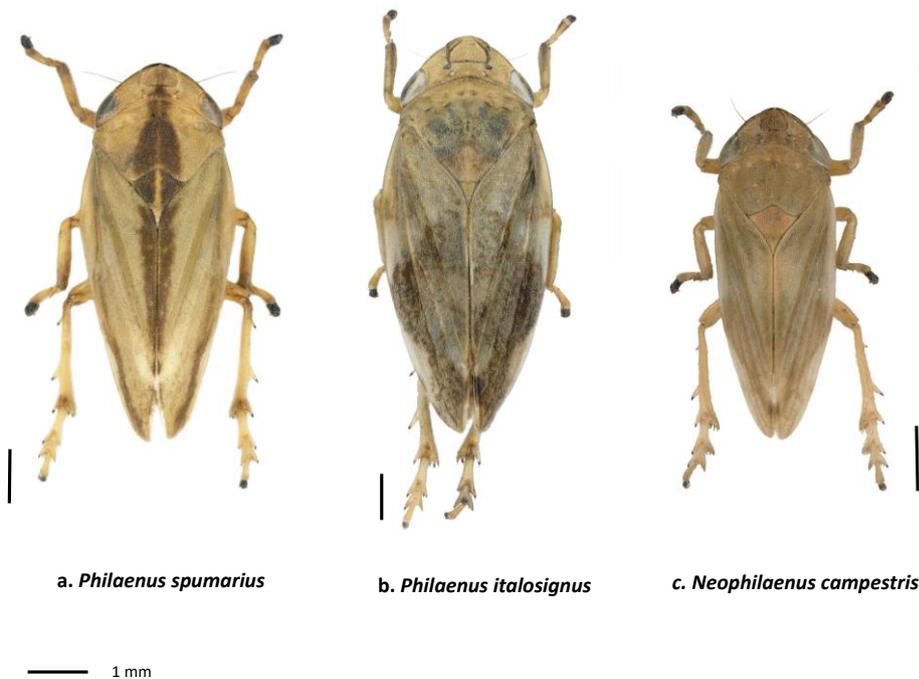


Fig. 11 - Tratto da: EPPO 2020. PM 7/141 (1)

Oltre a considerare queste caratteristiche esterne, l'identificazione morfologica dei vettori di *X. fastidiosa* si basa anche sui caratteri relativi all'apparato genitale maschile che possono essere identificati solamente previa dissezione e osservazione al microscopio. Il PM7/141(1) fornisce sia la chiave dicotomica sia una chiave visiva per l'identificazione morfologica dei maschi adulti delle tre specie. L'identificazione morfologica degli stadi giovanili è difficile e si consiglia in questo caso di ricorrere all'identificazione molecolare, che può essere effettuata su tutti gli stadi di sviluppo. L'identificazione molecolare (Cod. IO 05 XIX) avviene amplificando (mediante PCR convenzionale) regioni note del gene Cytochrome C oxidase I (COX1) con conseguente sequenziamento delle regioni di DNA amplificate e confronto con le sequenze di riferimento di ciascuna specie depositate nei database GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o BOLDSYSTEMS (<http://www.boldsystems.org/>). Un protocollo di DNA barcoding basato sul gene COX1 è descritto in PM 7/129(2) (DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests; EPPO, 2016). Il PM7/141(1) riporta altri test molecolari che sono stati sviluppati per l'identificazione diretta *P. spumarius* mediante PCR convenzionale (Lantero *et al.*, 2018) e Real Time PCR (Lester *et al.*, unpublished). Tuttavia, questi test non garantiscono la discriminazione tra *P. spumarius* e altre specie congeneriche.

## Bibliografia

- Almeida RPP, Blua MJ, Lopes JR and Purcell AH, 2005. Vector transmission of *Xylella fastidiosa*: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. *Annals of the Entomological Society of America*, 98, 775–786.
- Bodino N., Cavalieri V., Saponari M., Dongiovanni C., Altamura G., Bosco D., 2022. Transmission of *Xylella fastidiosa* subsp. pauca ST53 by the sharpshooter *Cicadella viridis* from different source plants and artificial diets. *Journal of Economic Entomology*, 115 (6), 1852-1858.
- Cavalieri V., Altamura G., Fumarola G., di Carolo M., Saponari M., Cornara D., Bosco D., Dongiovanni C., 2019. Transmission of *Xylella fastidiosa* Subspecies *Pauca* Sequence Type 53 by different insect species. *Insects*, 29, 10(10):324.
- Chatterjee S, Almeida RP and Lindow S, 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 243–271.
- Davis MJ, Purcell AH & Thomson SV (1980) Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. *Phytopathology* 70, 425–429.
- Donadio LC & Moreira CS (1998) Citrus variegated chlorosis. Bebedouro, SP, Brazil, FUNDECITRUS/FAPESP 166 p.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2018. Scientific report on the update of the *Xylella* spp. Host plant database. *EFSA Journal* 2018;16(9): 5408, 87 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5408>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*. *EFSA Journal* 2019; 53pp. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1667.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2019a. Update of the Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory. *EFSA Journal* 2019;17(5):5665, 200 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5665>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2020a. Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2019. *EFSA Journal* 2020;18(4): 6114, 61 pp. <http://doi:10.2903/j.efsa.2020.6114>.
- EFSA (European Food Safety Authority), Lázaro E, Parnell S, Vicent Civera A, Schans J, Schenk M, Schrader G, Cortiñas Abrahantes J, Zancanaro G and Vos S, 2020b. Guidelines for statistically sound and risk-based surveys of *Xylella fastidiosa*. EFSA supporting publication 2020:EN-1873. 76 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1873.
- EFSA (European Food Safety Authority), Delbianco A, Gibin D, Pasinato L, Boscia D, Morelli M, 2023. Update of the *Xylella* spp. host plant database – systematic literature search up to 30 June 2022. *EFSA Journal* 2023;21(1):7726, 90 pp. Doi: 10.2903/j.efsa.2023.7726l.
- EPPO 2019. PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* (2019) 49 (2), 175–227.

- EPPO 2020. PM 7/141 (1) *Philaenus spumarius*, *Philaenus italosignus* and *Neophilaenus campestris*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2020) 50 (1), 32–40.
- EPPO 2021. PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2021) 51 (1), 100–143.
- EPPO 2022. PM 3/81 (3) Inspection of consignments for *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2022) 52, 544–556.
- EPPO 2022. PM 3/82 (3) Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2022) 52, 557–571.
- Freitag JH, 1951. Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology*, 41, 10.
- Gould, AB and Lashomb, JH (2007) Bacterial leaf scorch (BLS) of shade trees. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/BacterialLeafScorch.aspx>.
- Harper SJ, Ward LI & Clover GRG (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology* 100, 1282–1288.
- Hernandez-Martinez R, Costa HS, Dumenyo CK & Cooksey DA (2006) Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay. *Plant Disease* 90, 1382–1388.
- Hill BL & Purcell AH (1995) Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. *Phytopathology* 85, 209–212.
- Hopkins D L (1981) Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. *Phytopathology* 71, 415-418.
- Krugner R, Sisterson MS, Chen JC, Stenger DC & Johnson MW (2014) Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. *Plant Disease* 98, 1186–1193.
- IPPC, 2008. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No. 31 Methodologies for sampling of consignments.
- Lantero E, Matallanas BM, Pascual S & Callejas C (2018) PCR species-specific primers for molecular gut content analysis to determine the contribution of generalist predators to the biological control of the vector of *Xylella fastidiosa*. *Sustainability* 2018, 2207.
- Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC & Stall RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84, 45, 6–461.
- Ouyang P, Arif M, Fletcher J, Melcher U & Ochoa Corona FM (2013) Enhanced reliability and accuracy for field deployable bioforensic detection and discrimination of *Xylella fastidiosa*

subsp. *pauca*, causal agent of citrus variegated chlorosis using Razor Ex technology and TaqMan Quantitative PCR. PLoS ONE 8, e81647.

Pooler MR & Hartung JS (1995) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Current Microbiology 31, 377–381.

Purcell AH and Saunders SR, 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. Plant Disease, 83(9), 825-830.

Saponari M, Boscia D, Nigro F & Martelli GP (2013) Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). Journal of Plant Pathology 95, 668.

Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R., and Nunney, L. (2010) Multilocus Sequence Typing of *Xylella fastidiosa* Causing Pierce's Disease and Oleander Leaf Scorch in the United States . Phytopathology 100: 601–611.