

Servizio fitosanitario nazionale

DOCUMENTI TECNICI UFFICIALI

Documento n. 45

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

Tomato leaf curl New Delhi virus

REV.	DESCRIZIONE REVISIONE	COMPILAZIONE	APPROVAZIONE	DATA DI ADOZIONE	FIRMA
0	Revisione 0	GDL per il Programma di indagine sugli organismi nocivi delle piante	CFN 26-27/07/2023	27/07/2023.	

Indice

Premessa	3
1. Informazioni Generali	3
1.1 Tassonomia e inquadramento	3
1.2 Normativa vigente	4
1.3 Distribuzione geografica	5
1.3.1 Presenza in Italia	5
2. Aspetti biologici dell'organismo	6
2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo	6
2.2 Sintomi/segni	7
2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)	8
3. Siti di maggiore rischio	8
3.1 Aree a rischio/ Risk areas	8
4. Indagine/survey	9
4.1 Osservazione visiva	10
4.2 Campionamento	13
4.3 Indagine con trappole	15
5. Diagnosi	16
5.1 Campione/Matrice	16
5.2 Test per l'identificazione	16
Bibliografia	19

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: *Tomato leaf curl New Delhi virus*

Nome comune: Accartocciamento fogliare del pomodoro New Delhi

Codice EPPO: TOLCND

Posizione tassonomica:

Phylum: Cressdnaviricota (1CREVP)

Classe: Repensiviricetes (1REPVC)

Ordine: Geplafuvirales (1GEPVO)

Famiglia: Geminiviridae (1GEMIF)

Genere: *Begomovirus* (1BEGOG)

Specie: Tomato leaf curl New Delhi virus (TOLCND)

Categorizzazione

EU: Quarantine Pest (Annex II B), Reg.(UE) 2019/2072)

EPPO: List 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.

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.

1.3 Distribuzione geografica

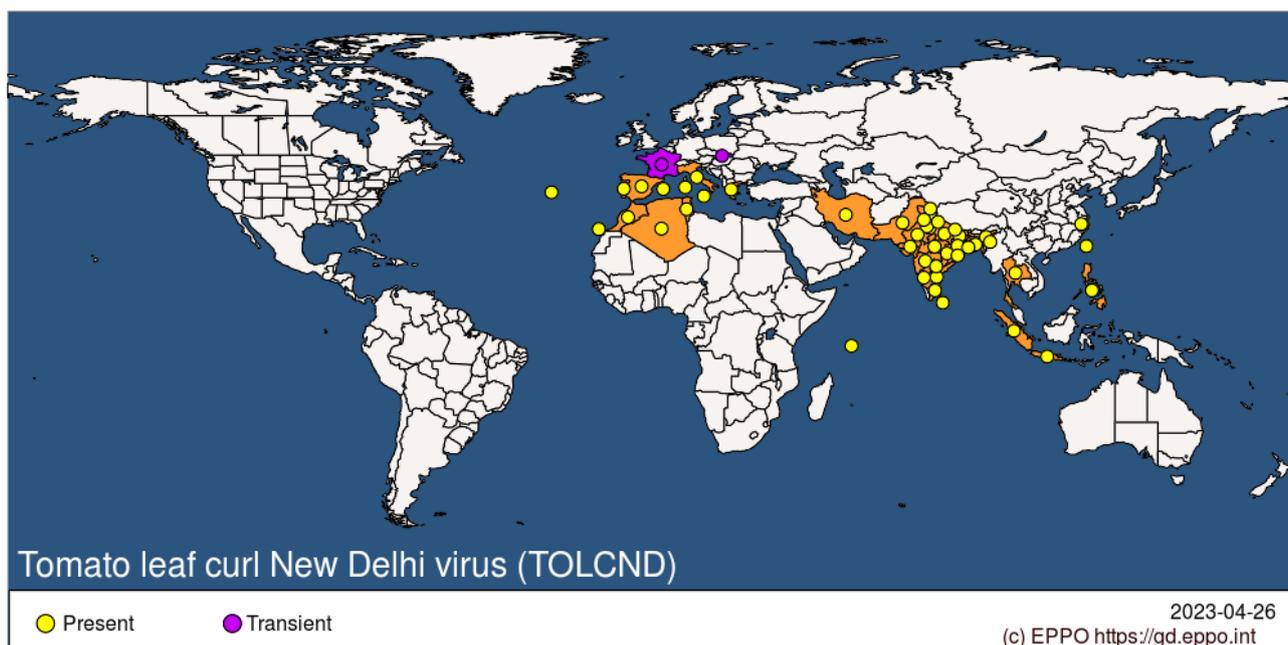
Africa: Algeria; Marocco; Seychelles; Tunisia

America: assente

Asia: Bangladesh; Cina; Filippine; India; Indonesia; Iran; Nepal; Pakistan; Sri Lanka; Taiwan; Thailandia

Europa: Francia; Grecia; Italia; Portogallo; Slovacchia; Spagna

Oceania: assente



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

1.3.1 Presenza in Italia:

2015: Prima segnalazione nel 2015 in Sicilia in pieno campo (*Cucurbita pepo*) - EPPO:2016/040,

2016: Sardegna nel 2016 (*Cucurbita pepo*) – EPPO 2017/182; Campania (*Cucurbita moschata* cv. Lunga di Napoli e *Solanum melongena*) – EPPO 2018/068 2020/091;

2017: Lazio (*Cucurbita pepo*) – EPPO 2019/092

2. Aspetti biologici dell'organismo

2.1 Morfologia e biologia dell'organismo nocivo e del vettore

ToLCNDV è un virus composto da un genoma a DNA a singolo filamento circolare bipartito (DNA A e B) (Fondong, 2013; Zaidi, Briddon, et al., 2017). Sebbene sia stato descritto per la prima volta in India nel 1995 (Padidam et al., 1995) e da lì in diverse altre regioni asiatiche, è stato ritrovato in Europa solo nel 2012 (Juárez et al., 2014). Dopo il ritrovamento in Spagna, il virus è stato segnalato anche in Italia, Tunisia, Marocco, Grecia e Portogallo. ToLCNDV ha una ampia specificità d'ospite che comprende alcune specie di importanza economica in Italia e Europa come pomodoro, cucurbitacee, patata, peperone e melanzana. Analisi molecolari hanno evidenziato che esistono diversi ceppi di ToLCNDV (identità < 94% nt, Moriones et al., 2017). Il ceppo di ToLCNDV (ToLCNDV-ES; Fortes et al., 2016; Ruiz et al., 2017) ritrovato in Europa è estremamente uniforme, ha delle sequenze distintive che lo separano dai ceppi individuati in Asia, indicando un'introduzione recente e un'origine comune. Questa particolarità può anche spiegare come mai il ceppo europeo predilige essenzialmente come ospite le cucurbitacee e sembra invece male adattarsi al pomodoro e altre solanacee (EFSA, 2020).

ToLCNDV è trasmesso dall'aleirodide *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in maniera persistente circolativa, ovvero circola nell'emolinfa dell'insetto senza replicarsi in esso. Il vettore, dopo aver acquisito il virus nutrendosi nel floema di pianta infetta, attraversa un periodo di latenza di diverse ore durante il quale non è infettivo; superato tale periodo l'insetto è in grado di trasmettere il virus a nuove piante ospiti durante le successive punture di suzione e mantiene la propria infettività per il resto della propria vita.

Il ciclo biologico di *B. tabaci* ha inizio con la deposizione da parte delle femmine adulte delle uova, solitamente disposte in semicerchio sulla pagina inferiore delle foglie delle piante ospiti. Si succedono poi quattro stadi giovanili. Le ninfe sono di forma ellittica (0.55–0.87 mm in lunghezza e 0.35–0.64 mm in larghezza), hanno colore crema-giallo pallido, sono privi di ali e compiono solo brevi spostamenti sulla stessa foglia in cerca di nuovi siti di nutrizione. Dall'ultimo stadio giovanile (pupario) emerge l'adulto (0.8-1 mm), caratterizzato da un corpo di colore giallo chiaro con le ali che quando sono in posizione di riposo assumono una forma appuntita "a tenda" (carattere spesso utile per distinguere in campo gli individui di *B. tabaci* da *Trialeurodes vaporariorum*, l'altro aleirodide molto comune nei nostri ambienti).

Bemisia tabaci è una specie estremamente polifaga, che conta diverse centinaia di piante ospiti coltivate e non, che possono quindi rappresentare importanti reservoir per individui viruliferi. Questo aleirodide è ormai presente a tutte le latitudini in ambiente protetto, mentre l'insediamento in pieno campo è limitato alle fasce tropicali, sub-tropicali e alle zone temperate più calde a causa della sua sensibilità alle basse temperature (EFSA, 2013). In Italia, *B. tabaci* è diffusa principalmente nelle

regioni meridionali e insulari, dove le temperature ricadono nell'intervallo ottimale per il ciclo biologico dell'insetto (10°C – 35°C, con un ottimo compreso tra 25°C e 27°C) e consentono lo sviluppo di numerose generazioni all'anno. Insempiamenti stabili dell'aleirodide sono stati osservati di recente in pieno campo anche in regioni dell'Italia centrale (es: area dell'Agropontino laziale), come conseguenza dell'innalzamento termico. A parte sporadiche segnalazioni provenienti da Liguria e Emilia-Romagna, l'insediamento stabile di *B. tabaci* nelle regioni del Nord Italia non è al momento nota. Tuttavia, la sua presenza nelle coltivazioni serricole non può essere esclusa, anche se solo transitoria durante il periodo estivo (Bertin et al., 2021).

Bemisia tabaci è una specie caratterizzata da un'elevata variabilità genetica intrinseca, tanto che è oggi considerata un complesso di 40 specie criptiche (o biotipi), ovvero specie che sono indistinguibili dal punto di vista morfologico ma differiscono oltre che per i tratti genici anche da alcuni tratti biologici, come il range di piante ospiti e l'invasività. In Italia, le specie criptiche più diffuse sono MEAM1 e MED, note a livello globale per la loro elevata capacità di adattamento e la resistenza agli insetticidi. Per entrambe è stata accertata la capacità di trasmissione di ToLCNDV.

ToLCNDV può essere anche trasmesso per via meccanica, ma sembrerebbe che questa modalità di trasmissione, sebbene usata in condizioni sperimentali, sia piuttosto inefficiente nelle normali pratiche agricole (EFSA, 2020).

La trasmissibilità di ToLCNDV tramite semi è un argomento ancora dibattuto. Alcuni studi hanno dimostrato che questa possibilità esiste (Kil et al., 2020; Sangeetha et al., 2018) ma l'utilizzo di piante certificate per la produzione di seme e il trattamento dei semi prodotti fanno sì che l'infezione di sementali provenienti da semi infetti/contaminati sia poco comune nelle produzioni commerciali (EFSA, 2020).

2.2 Sintomi/segni

La maggior parte delle specie vegetali risponde all'infezione da ToLCNDV sviluppando sintomi, questi però sono generalmente indicativi di un'infezione da Begomovirus e non sono specifici di una specie particolare. I sintomi dell'infezione appaiono circa 10-14 giorni dopo che è avvenuta la trasmissione tramite vettore. Compaiono prima sulle parti più giovani della pianta, le foglie apicali appaiono curvate e distorte, nelle cucurbitacee possono comparire anche decolorazione, macchie clorotiche e vene in rilievo. La presenza dei Begomovirus interferisce anche con lo sviluppo della pianta, con la fioritura e la fruttificazione. Le piante mostrano nanismo, e riduzione nel numero di fiori e frutti. I frutti risultano più piccoli, meno saporiti e con decolorazioni e bollosità che li rendono invendibili (EFSA, 2020).

2.3 Piante ospiti (ospiti principali/minori)

Le piante indicate come ospiti naturali del ToLCNDV comprendono specie appartenenti alle famiglie: Solanaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae e Malvaceae (Anwar et al., 2020; Ashwathappa et al., 2020; Fortes et al., 2016; Juárez et al., 2019; Nagendran et al., 2017; Pant et al., 2018; Venkataravanappa et al., 2018, 2019; Zaidi, Martin, et al., 2017, EPPO website).

ToLCNDV infetta pomodoro (*Solanum lycopersicum*), melanzana (*Solanum melongena*), peperone (*Capsicum annuum*, *C. frutescens*) e patata (*Solanum tuberosum*). Specialmente nella zona mediterranea infetta: melone (*Cucurbita melo*), zucca (*Cucurbita maxima*), zucchina (*Cucurbita pepo*) e cetriolo (*Cucumis sativus*). In Asia è riportato anche su un gran numero di specie di cucurbitacee come: zucca di cera o invernale (*Benincasa hispida*), cocomero (*Citrullus lanatus*), zucca muschiata (*Cucurbita moschata*), *Lagenaria siceraria* (zucca a fiasco), luffa (*Luffa cylindrica*), zucca di creata (*Luffa acutangula*), zucca amara (*Momordica charantia*), zucca di edera (*Coccinia grandis*), zucca spinosa (*Momordica dioica*) e chayote (*Sechium edule*) (EFSA, 2020).

Come ospiti minori si possono includere specie appartenenti alle famiglie Malvaceae, Caricaceae, Apiaceae e Fabaceae come: cotone (*Gossypium hirsutum*), kenaf (*Hibiscus cannabinus*), papaia (*Carica papaya*), carota (*Daucus carota*), fagiolo mungo verde (*Vigna radiata*), Okra (*Abelmoschus esculentus*) e soia (*Glycine max*) (EFSA, 2020). Inoltre, il ToLCNDV è riportato anche su diverse specie ornamentali appartenenti alle famiglie Asteraceae, Acanthaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Phyllanthaceae e Solanaceae (EFSA, 2020) e specie spontanee appartenenti alle famiglie Amaranthaceae, Asteraceae, Commelinaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Phyllanthaceae, Polygonaceae, Solanaceae come: *Chenopodium album*, *Ageratum* spp., *Eclipta prostrata*, *Parthenium hysterophorus* e *Sonchus oleraceus*; *Commelina benghalensis*, *Convolvulus arvensis*; *Cucurbita foetidissima*, *Cucurbita fraterna* (*C. pepo* var. *fraterna*), *Cucurbita lundelliana*, *Cucurbita okechobeensis* e *Ecballium elaterium*, *Acalypha indica*, *Chrozophora hierosolymitana* (syn. *Chrozophora tinctoria*) e *Euphorbia hirta*; *Phyllanthus niruri*; *Rumex dentatus*; *Solanum nigrum* e *Datura stramonium* (EFSA, 2020).

Tutte le piante ospiti di ToLCNDV sono anche ospiti del vettore *B. tabaci*.

3. Siti di maggiore rischio

3.1 Aree a rischio/ Risk areas

I siti di maggior rischio sono:

- Punti di ingresso doganali dove ispezionare piantine, laddove consentita l'importazione (paesi europei), frutti di importazione provenienti da paesi in cui il virus è presente o supposto (paesi mediterranei).
- Areali produttivi (coltivazione protetta e non)

- Vivai

I siti a maggiore rischio secondo la codifica Europhyt sono:

1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 2.1 giardini privati; 2.5.2 centro giardinaggio; 3.1 serra; 3.4.2 centro per il giardinaggio

4. Indagine/survey

Modalità di indagine previste

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

4.1 Osservazione visiva

Aspetti generali: L'obiettivo dell'ispezione visiva è quello di identificare il quadro sintomatologico causato da ToLCNDV. L'osservazione andrebbe condotta su pomodoro e cucurbitacee, ma se l'obiettivo è di focalizzarsi sul ceppo più temibile (ToLCNDV-ES), quest'ultime dovrebbero essere ispezionate primariamente.

L'ispezione visiva delle foglie delle piante ospiti può essere utile anche per individuare adulti e forme giovanili del vettore *B. tabaci*.

Sito di Indagine	Cosa guardare	Periodo di osservazione	Immagini
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 3.1 serra;</p> <p>Vivai (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p>Foglie:</p> <p>arricciamento fogliare, con riduzione internodi, ispessimento delle nervature su giovani foglie e un severo mosaico su giovani foglie</p> <p>Bollosità ispessimento</p>	<p>Cucurbitacee</p> <p>piante nelle prime fasi vegetative, fioritura e fruttificazioni.</p> <p>In queste fasi iniziali, la sintomatologia è più evidente.</p> <p>È possibile osservare sintomi anche sui frutti in caso di infezioni precoci.</p> <p>In pieno campo può esserci un fenomeno di "recovery"</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Sintomi su pianta di zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>) Fonte: CREA-DC</p>  <p>Sintomi su pianta di cetriolo (<i>Cucumis sativus</i>) Fonte: CREA-DC</p> </div>

	<p>Frutti:</p> <p>i primi frutti soprattutto in caso di infezioni precoci, presentano una riduzione della taglia e un ispessimento della superficie esterna, con leggera deformazione ed alterazione della forma del frutto</p>		
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 3.1 serra;</p>	<p>Foglie:</p> <p>arricciamento e/o deformazione fogliare; ingiallimenti anche delle nervature</p>	<p>Pomodoro:</p> <p>su foglie sintomatologia molto simile ad altri begomovirus, che non consente una chiara identificazione</p>	<p>Sintomi su frutto di zucchini (<i>Cucurbita pepo</i>) Fonte: CREA-DC</p>

<p>Vivai (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>			
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 3.1 serra;</p> <p>Vivai (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p>Pagina inferiore delle foglie di cucurbitacee e solanacee per la presenza sia di forme giovanili sia di adulti di <i>B. tabaci</i></p>	<p>Vettori: L'ispezione per la presenza dell'insetto vettore può essere concomitante all'ispezione del patogeno</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p style="text-align: center;">forme giovanili di <i>B. tabaci</i>) Fonte: CREA-DC</p>  <p style="text-align: center;">forme adulte di <i>B. tabaci</i>) Fonte: CREA-DC</p>

4.2 Campionamento

Aspetti generali:

La concentrazione del virus può variare significativamente a seconda delle diverse parti delle piante, si consiglia dove possibile di utilizzare sempre campioni fogliari sintomatici.

Se si vuole verificare la presenza del virus anche nell'insetto vettore, è possibile catturare individui adulti di *B. tabaci*.

Sito di Indagine	Cosa prelevare	Periodo di Prelievo	Come conservare
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 3.1 serra;</p> <p>Vivai (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p><u>Campioni sintomatici:</u> In presenza di sintomi sospetti, prelevare porzioni di getti, foglie (almeno 3 e preferibilmente dalla porzione apicale) con preferenza alle giovani foglie appena espanse rispetto alle foglie più vecchie</p> <p><u>Campioni asintomatici:</u> per i campioni fogliari in assenza di sintomi evidenti, prelevare le prime foglie apicali (penultima e terzultima foglia o intero getto ascellare) in quanto di solito la concentrazione virale è maggiore nei tessuti in accrescimento.</p> <p><u>Campioni pool di più piante (fino a 5 piante) da saggiare con test molecolari.</u></p>	<p>Durante tutto il periodo produttivo</p>	<p>Il materiale vegetale deve essere asciutto, posto in buste di plastica da conservare a basse temperature o in luoghi freschi per evitare disidratazione. Usare sacchetti di dimensioni adeguate a non comprimere le piante/parti vegetali campionate. In attesa della consegna al laboratorio il materiale va conservato in frigorifero a 4°C</p> <p><u>Spedizione del campione:</u> i campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore dal loro prelievo, preferibilmente in borse termiche evitando il contatto diretto con piastra eutettica (siberino)</p>

<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 3.1 serra;</p> <p>Vivai (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p><u>Campioni di <i>B. tabaci</i>:</u></p> <p>Individui adulti di <i>B. tabaci</i> potenzialmente viruliferi possono essere catturati mediante aspiratore entomologico direttamente dalla pagina inferiore delle piante ospiti.</p>	<p>Durante tutto il periodo produttivo</p>	<p>Conservare gli individui di <i>B. tabaci</i> in etanolo assoluto o al 70% per lunghi periodi o a -20°C per brevi periodi.</p>
--	--	---	--

4.3 Indagine con trappole

Aspetti generali:

Gli individui adulti di *B. tabaci* possono essere intercettati durante la loro fase di volo mediante l'utilizzo di trappole cromotropiche gialle.

Sito di indagine	Tipologia di trappola	Posizionamento trappola	Periodo di esposizione - frequenza consigliabile dei controlli	Immagini
<p>Tutti i siti ritenuti a maggior rischio, con particolare attenzione a:</p> <p>Areali produttivi (1.1 campo (a seminativo, a pascolo); 3.1 serra;</p> <p>Vivai (2.5.2 centro giardinaggio; 3.4.2 centro per il giardinaggio).</p>	<p>Cromotropiche gialle</p>	<p>Al di sopra delle coltivazioni</p>	<p><u>In pieno campo:</u> dalla primavera all'autunno.</p> <p><u>In serra</u> (potenzialmente tutta Italia): durante tutto il periodo di coltivazione delle piante ospiti.</p> <p>Le trappole vengono sostituite ogni 10-15 giorni.</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <p>Presenza di individui di <i>B. tabaci</i> su trappole cromotropiche</p> <p>Fonte: http://innovabioscience.com/</p>

5. Diagnosi

Protocolli ufficiali SFN:

- non disponibili

Standard di riferimento:

- PM7/152(1) – Begomovirus

5.1 Campione/Matrice

Il campionamento per la ricerca di ToLCNDV può essere fatto sia su piante sintomatiche sia asintomatiche, sia campionando *B. tabaci*. Per quanto riguarda la matrice vegetale si ricorda che campionare piante sintomatiche è sempre preferibile. Per piante sintomatiche il campione deve essere composto da almeno 3 foglioline della parte apicale della pianta dove il virus si ritrova in concentrazioni maggiori. Per campioni asintomatici è importante campionare diverse parti della pianta in modo da sopperire ad eventuali distribuzioni non omogenee del virus nella pianta.

Per quanto riguarda *B. tabaci* i campioni possono essere composti da insetti singoli o raggruppati (per un massimo di 5 individui/campione). Dopo il campionamento è consigliato conservare gli insetti a -20°C per brevi periodi o in etanolo (assoluto o al 70%) per conservazioni più lunghe.

5.2 Test per l'identificazione

Tipologie diagnostiche previste all'interno del monitoraggio cofinanziato:

- **Morphological identification** (per il vettore)
- **ELISA**
- **PCR**
- **LAMP=Molecular testing 3**
- **Real time RT-qPCR**

I campioni fogliari e di frutti provenienti da coltivazione possono essere saggiati mediante ELISA; attualmente sono disponibili due kit commerciali sierologici per ToLCNDV (Agdia; DSMZ) che hanno mostrato buone performance diagnostiche durante un test performance study (TPS) organizzato dal Laboratorio Europeo di Riferimento di Virologia (EURL-Virology) nell'ambito della sua attività nel 2020. Entrambi i kit però evidenziano sporadiche reazioni di positività ad altri Begomovirus; quindi, se ne consiglia l'utilizzo come saggio preliminare di screening ma in caso di positività si deve procedere ad un'identificazione molecolare.

Per effettuare i test molecolari, è necessario prima ottenere un estratto di DNA totale. Questo può essere ottenuto utilizzando diversi metodi di estrazione:

- Metodi di estrazione del DNA con kit a biglie magnetiche (si possono usare sia manualmente che accoppiati ad estrattori automatici):
 - QuickPick™ SML Plant DNA kit (Bio-Nobile).
 - Nucleomag Plant Kit (Macherey-Nagel)
- Metodo di estrazione home made – CTAB
- Metodi di estrazioni basati su kit a colonnine
 - DNeasy mericon Food Kit (Qiagen)

Per quanto riguarda *B. tabaci*, l'estrazione del DNA può essere eseguita su individui adulti singoli o raggruppati (per un massimo di 5 individui/campione). L'estrazione del DNA è stata validata per il momento con i kit Xpert directXtract Lysis Buffer (GriSP) e QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile); questo non esclude che altri metodi di estrazione possono essere utilizzati dopo la loro messa a punto.

Diversi metodi molecolari sono disponibili per la diagnosi del ToLCNDV:

- PCR:
 - Gawande S.J. et al., 2007– Dati di validazioni ottenuti nell'ambito del TPS – EURL-Vir
 - Mizutani T. et al., 2011– Dati di validazioni ottenuti nell'ambito del TPS – EURL-Vir
- LAMP:
 - Jeevalatha et al., 2018 – test raccomandato per la diagnosi di ToLCNDV sia in materiale vegetale che su *B. tabaci*
- Real time RT-qPCR:
 - Luigi et al., 2020– test raccomandato per la diagnosi di ToLCNDV sia in materiale vegetale che su *B. tabaci*
 - Simón et al., 2018– test raccomandato per la diagnosi di ToLCNDV sia in materiale vegetale che su *B. tabaci*

Identificazione di *B. tabaci*

L'identificazione dell'insetto vettore può essere attuata secondo le linee guida del PM7/35(1) (EPPO) che riportano per la descrizione morfologica del pupario e dell'adulto di *B. tabaci*. Nel documento si presta particolare attenzione ai caratteri morfologici che permettono la distinzione di *B. tabaci* da *Trialeurodes vaporariorum*, l'altro aleirodide molto comune nei nostri ambienti.

L'identificazione molecolare di *B. tabaci* avviene amplificando (mediante PCR convenzionale) regioni note del gene Cytochrome c oxidase I (COX1) con conseguente sequenziamento Sanger 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/>). Questo approccio consente anche l'identificazione delle specie criptiche all'interno del complesso *B. tabaci*. Un protocollo di DNA barcoding basato sul gene COX1 è descritto in PM 7/129 (DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests; EPPO, 2016).

Alcuni test per l'identificazione di ToLCNDV sopra riportati sono anche inclusi nell'EPPO standard PM 7/152 (1) per la diagnosi semi-specifica dei Begomvirus e per l'identificazione del ToLCNDV. In particolare, la RealTime RT-qPCR di Simon et al., 2018 (Appendix 7) e di Luigi et al., 2020 (Appendix 8), e la LAMP di Jeevalatha et al., 2018 (Appendix 9) sono descritti nello standard EPPO includendo anche dati di validazione.

Bibliografia

- Anwar, I., Bukhari, H. A., Nahid, N., Rashid, K., Amin, I., Shaheen, S., Hussain, K., & Mansoor, S. (2020). Association of cotton leaf curl Multan betasatellite and Ageratum conyzoides symptomless alphasatellite with tomato leaf curl New Delhi virus in *Luffa cylindrica* in Pakistan. *Australasian Plant Pathology*, 49(1). <https://doi.org/10.1007/s13313-019-00668-6>
- Ashwathappa, K. v., Venkataravanappa, V., Reddy, C. N. L., & Reddy, M. K. (2020). Association of Tomato leaf curl New Delhi virus with mosaic and leaf curl disease of *Chrysanthemum* and its whitefly cryptic species. *Indian Phytopathology*, 73(3). <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00214-1>
- Bertin, S., Parrella, G., Nannini, M., Guercio, G., Troiano, E., & Tomassoli, L. (2021). Distribution and genetic variability of *bemisia tabaci* cryptic species (Hemiptera: Aleyrodidae) in Italy. *Insects*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/insects12060521>
- Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M. A., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H. H., van der Werf, W., Vicent Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., ... Bottex, B. (2020). Pest categorisation of tomato leaf curl New Delhi virus. *EFSA Journal*, 18(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6179>
- EPPO standard on diagnostic – PM7/152 (1) Begomovirus. 2022. EPPO Bulletin 00:1-22. DOI: 10.1111/epp.12887
- Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>
- Fortes, I. M., Sánchez-Campos, S., Fiallo-Olivé, E., Díaz-Pendón, J. A., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. (2016). A novel strain of tomato leaf curl New Delhi virus has spread to the Mediterranean basin. *Viruses*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/v8110307>
- Gawande S.J., Kaundal P., Kaushal N., & Garg I.D. (2007). Print Capture PCR – a simple technique for the detection of tomato leaf curl New Delhi virus – causal agent of potato apical leaf curl disease in India. *Potato Journal*, 34(1–2), 87–88.
- Jeevalatha, A., Kaundal, P., Kumar, R., Raigond, B., Kumar, R., Sharma, S., & Chakrabarti, S. K. (2018). Optimized loop-mediated isothermal amplification assay for Tomato leaf curl New Delhi virus-[potato] detection in potato leaves and tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 150(3). <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1300-z>
- Juárez, M., Rabádan, M. P., Martínez, L. D., Tayahi, M., Grande-Pérez, A., & Gómez, P. (2019). Natural hosts and genetic diversity of the emerging tomato leaf curl New Delhi virus in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00140>

- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M. A., Gosálvez, B., Castillo, P., Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2014). First detection of tomato leaf curl New Delhi virus infecting Zucchini in Spain. In *Plant Disease* (Vol. 98, Issue 6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1050-PDN>
- Kil, E. J., Bich Vo, T. T., Fadhila, C., Thi Ho, P., Lal, A., Troiano, E., Parrella, G., & Lee, S. (2020). Seed transmission of tomato leaf curl new delhi virus from zucchini squash in Italy. *Plants*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/plants9050563>
- Luigi, M., Manglli, A., Bertin, S., Donati, L., Tomassoli, L., Ferretti, L., & Faggioli, F. (2020). Development and validation of a specific real-time PCR protocol for the detection of tomato leaf curl New Delhi virus. *European Journal of Plant Pathology*, 157(4). <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02038-1>
- Mizutani T., Daryono B. S., Ikegami M., & Natsuaki K. T. (2011). First Report of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Cucumber in Central Java, Indonesia. *Disease Note*.
- Moriones, E., Praveen, S., & Chakraborty, S. (2017). Tomato leaf curl new delhi virus: An emerging virus complex threatening vegetable and fiber crops. In *Viruses* (Vol. 9, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/v9100264>
- Nagendran, K., Mohankumar, S., Aravintharaj, R., Balaji, C. G., Manoranjitham, S. K., Singh, A. K., Rai, A. B., Singh, B., & Karthikeyan, G. (2017). The occurrence and distribution of major viruses infecting cucurbits in Tamil Nadu state, India. *Crop Protection*, 99. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.006>
- Padidam, R., Beachy, R. N., & Fauquet, C. M. (1995). Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *Journal of General Virology*, 76(1). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-1-25>
- Pant, R. P., Bhatnagar, A., & Lal, M. (2018). Role of alternate host plants in the transmission of apical leaf curl disease of potato caused by tomato leaf curl New Delhi virus –potato (ToLCNDV-pot.) in Northern India. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 88(8).
- Ruiz, L., Simon, A., Velasco, L., & Janssen, D. (2017). Biological characterization of Tomato leaf curl New Delhi virus from Spain. *Plant Pathology*, 66(3). <https://doi.org/10.1111/ppa.12587>
- Sangeetha, B., Malathi, V. G., Alice, D., Suganthy, M., & Renukadevi, P. (2018). A distinct seed-transmissible strain of tomato leaf curl New Delhi virus infecting Chayote in India. *Virus Research*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.10.009>
- Scientific Opinion on the risks to plant health posed by Bemisia tabaci species complex and viruses it transmits for the EU territory. (2013). *EFSA Journal*, 11(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3162>
- Simón, A., Ruiz, L., Velasco, L., & Janssen, D. (2018). Absolute quantification of Tomato leaf curl New Delhi virus Spain strain, ToLCNDV-ES: Virus accumulation in a host-specific manner. *Plant Disease*, 102(1). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0840-RE>

- Venkataravanappa, V., Lakshminarayana Reddy, C. N., Shankarappa, K. S., & Reddy, M. K. (2019). Association of tomato leaf curl new delhi virus, betasatellite, and alphasatellite with mosaic disease of spine gourd (*Momordica dioica* roxb. willd) in india. *Iranian Journal of Biotechnology*, 17(1). <https://doi.org/10.21859/ijb.2134>
- Venkataravanappa, V., Reddy, L. R. C. N., Saha, S., Subbanna, S. K., & Manem, K. R. (2018). Detection and characterization of tomato leaf curl New Delhi virus association with mosaic disease of ivy gourd (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) in North India. *Archives of Biological Sciences*, 70(2). <https://doi.org/10.2298/ABS170616051V>
- Zaidi, S. S. E. A., Briddon, R. W., & Mansoor, S. (2017). Engineering Dual Begomovirus-Bemisia tabaci Resistance in Plants. In *Trends in Plant Science* (Vol. 22, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.005>
- Zaidi, S. S. E. A., Martin, D. P., Amin, I., Farooq, M., & Mansoor, S. (2017). Tomato leaf curl New Delhi virus: a widespread bipartite begomovirus in the territory of monopartite begomoviruses. *Molecular Plant Pathology*, 18(7). <https://doi.org/10.1111/mpp.12481>