

# MINISTERO DELLE RISORSE AGRICOLE, ALIMENTARI E FORESTALI

## DECRETO 22 novembre 1996

**Lotta obbligatoria contro il virus della tristezza degli agrumi  
"Citrus Tristeza Virus".**

IL MINISTRO DELLE RISORSE AGRICOLE, ALIMENTARI E FORESTALI

Vista la legge 18 giugno 1931, n. 987, e successive modificazioni ed integrazioni, recante disposizioni per la difesa delle piante coltivate e dei prodotti agrari dalle cause nemiche e sui relativi servizi, e successive modificazioni;

Visto il regolamento per l'applicazione della predetta legge, approvato con regio decreto 12 ottobre 1933, n. 1700, e modificato con regio decreto 2 dicembre 1937, n. 2504;

Vista la direttiva n. 77/93/CEE del Consiglio del 21 dicembre 1976, concernente le misure di protezione contro l'introduzione negli Stati membri di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali, e successive modificazioni;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 24 luglio 1977, n. 616, in virtu' del quale e' stata confermata allo Stato la determinazione degli interventi obbligatori in materia fitosanitaria (art. 71, comma 1, lettera c));

Visto il decreto legislativo n. 536 del 30 dicembre 1992 che, in attuazione della direttiva 91/683/CEE, istituisce il Servizio fitosanitario nazionale;

Visto il decreto ministeriale 31 gennaio 1996, pubblicato nel supplemento ordinario n. 33 alla Gazzetta Ufficiale n. 41 del 19 febbraio 1996, concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nel territorio della Repubblica italiana di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali;

Considerato che in alcune regioni sono state segnalate infezioni del virus della tristezza degli agrumi Citrus Tristeza Virus in materiale di propagazione introdotto nel territorio nazionale;

Considerato che una seria minaccia incombe sulle coltivazioni di agrumi presenti nel territorio nazionale in quanto il virus puo' essere diffuso localmente da vettori naturali (afidi) e facilmente a distanza con il materiale di propagazione ed il commercio delle piante ornamentali;

Considerato che l'arancio amaro, portinnesto molto suscettibile al CTV e' il piu' diffuso negli agrumeti italiani;

Considerato che a tutt'oggi non esiste alcun metodo sicuro di lotta

diretta contro il CTV e che, pertanto, la difesa deve essere impostata sulla prevenzione delle infezioni;

Udito il parere n. 31/96 espresso nell'adunanza del 29 ottobre dal Consiglio superiore delle risorse agricole, alimentari e forestali sullo schema di decreto ministeriale concernente la lotta obbligatoria contro il Citrus Tristeza Virus;

Decreta:

Art. 1.

Scopo generale

La lotta contro il virus della tristezza degli agrumi Citrus Tristeza Virus e' obbligatoria nel territorio della Repubblica italiana.

Art. 2.

Ispezioni sistematiche

I servizi fitosanitari regionali devono effettuare ogni anno indagini sistematiche mirate ad accertare la presenza del virus sulle specie e ibridi coltivati a fini produttivi, su piante ornamentali e frangiventi di Citrus L., Fortunella Swingle, Poncirus Raf.

Le ispezioni ufficiali devono essere effettuate, oltre che nei vivai, negli agrumeti, nei giardini, negli orti botanici, nelle collezioni varietali, nei parchi pubblici e privati, su tutto il materiale introdotto anche per scopi scientifici secondo i criteri di cui all'allegato I.

Le indagini devono consistere in ispezioni visive delle piante ospiti e, nel caso di ospiti asintomatici, in appropriate analisi, in particolare saggi immunoenzimatici, confermati ove occorra da saggi biologici.

Detti saggi devono essere eseguiti dai servizi fitosanitari regionali che potranno avvalersi di laboratori specializzati. I saggi di conferma e di caratterizzazione dei ceppi sono demandati ai laboratori ufficiali autorizzati dal Ministero delle risorse agricole, alimentari e forestali.

I risultati di dette indagini devono essere comunicati al servizio fitosanitario centrale entro il 30 novembre di ogni anno.

Art. 3.

Denuncia dei casi sospetti

E' fatto obbligo a chiunque denunciare ogni caso sospetto di infezione da virus della tristezza al servizio fitosanitario regionale che provvede ad effettuare ispezioni visive ed eventuali analisi virologiche ufficiali.

Le regioni devono dare massima divulgazione alla conoscenza dei sintomi e della pericolosità del virus della tristezza.

In attesa di conferma o smentita di ogni caso sospetto il servizio fitosanitario regionale al fine di scongiurare la disseminazione di Citrus Tristeza Virus può attuare interventi cautelativi, commisurati al rischio stimato, incluso il divieto di trasportare in altro luogo materiali vegetali dal vivaio o dall'area in cui si è avuta la manifestazione sospetta. La pianta o le piante sospette devono essere contrassegnate, con divieto di rimozione.

#### Art. 4.

##### Accertamento ufficiale di un caso

Qualora le analisi virologiche ufficiali confermino la presenza di Citrus Tristeza Virus in un campione di materiale vegetale, il servizio fitosanitario regionale deve dichiarare contaminato il campo da cui è stato raccolto il campione e le piante a dimora, in vivaio ed in contenitori, risultate infette, devono essere immediatamente estirpate e distrutte.

Le altre piante della stessa specie e partita e quelle dei campi limitrofi per un raggio di m 500 devono essere saggiate per almeno tre anni secondo lo schema operativo di cui all'allegato 1.

Ove la percentuale di piante infette risulti uguale o superiore al 30% l'intero impianto deve essere estirpato e distrutto.

Nei vivai ove si riscontri presenza di piante infette, l'intero assortimento di piante del lotto, della varietà o del portinnesto interessati dalla malattia deve essere estirpato e distrutto.

Il servizio fitosanitario regionale deve altresì istituire una zona di sicurezza, effettuare una indagine tecnico-amministrativa per conoscere l'origine delle piante infette e denunciare immediatamente ogni caso accertato di Citrus Tristeza Virus.

L'estirpazione e la distruzione dei materiali infetti deve avvenire a cura ed a spese dei proprietari o conduttori a qualunque titolo e sotto il controllo del servizio fitosanitario regionale.

#### Art. 5.

## Campi di piante madri

Nei campi di piante madri ove si riscontri la presenza di piante infette si deve procedere alla distruzione delle stesse e sospendere il prelievo del materiale di propagazione fino a quando ripetuti saggi abbiano dato esito negativo per almeno tre anni.

Dai campi di piante madri ubicati nel raggio di m 500 da un focolaio di CTV non puo' essere prelevato materiale di propagazione sino a quando il focolaio non sara' eradicato e comunque dopo specifica autorizzazione del servizio fitosanitario regionale.

Le piante di agrumi di campi limitrofi a quelli con infezioni da CTV non possono essere utilizzate per il prelievo di materiale di propagazione fino a quando non saranno tutte preventivamente controllate per almeno tre anni e saggiate singolarmente.

### Art. 6.

#### Fonti di approvvigionamento del materiale di propagazione

E' fatto obbligo a chiunque di denunciare al servizio fitosanitario regionale l'ubicazione ed il numero delle fonti di approvvigionamento nazionali del materiale di propagazione almeno quattro mesi prima del prelievo del materiale medesimo.

Tali fonti di approvvigionamento del portinnesto e della varieta' devono essere sottoposte a controlli preventivi mediante rilievi visivi per accertare lo stato sanitario generale e saggi immunoenzimatici e ove necessario, biologici per accertare l'assenza di infezioni da CTV.

E' fatto obbligo a chiunque metta a dimora piante di agrumi, di utilizzare piante certificate esenti da CTV.

Qualora il materiale di propagazione e le piante di agrumi siano provenienti da un Paese estero e' fatto obbligo di comunicarne l'origine al servizio fitosanitario regionale prima dell'innesto e della messa a dimora.

### Art. 7.

#### Detenzione piante infette

E' vietata a chiunque la detenzione e la manipolazione di piante infette da Citrus Tristeza Virus.

E' fatto obbligo a chiunque detenga piante infette da Citrus Tristeza Virus di darne comunicazione al servizio fitosanitario

regionale che ne informera' il servizio fitosanitario centrale.

Art. 8.

D e r o g h e

Il servizio fitosanitario centrale puo' autorizzare, fatte salve le disposizioni della direttiva 77/93/CEE, deroghe alle disposizioni dell'art. 7 del presente decreto per prove o scopi scientifici, nonche' lavori di selezione varietale purché tali deroghe non compromettano il controllo dell'organismo nocivo e non creino rischio di diffusione dello stesso.

Le piante infette dal virus CTV devono essere conservate in apposite serre a rete anti-insetto, di cui all'allegato II e qualsiasi movimento del materiale deve essere registrato su apposito registro vidimato dal servizio fitosanitario regionale.

Art. 9.

Denuncia degli inadempimenti

In caso di mancata applicazione delle disposizioni di cui al presente decreto, gli inadempienti saranno denunciati all'autorita' giudiziaria a norma dell'art. 500 del codice penale.

Il presente decreto entrera' in vigore il giorno successivo alla sua pubblicazione nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 22 novembre 1996

Il Ministro: PINTO

SCHEMA DI MONITORAGGIO PER IL VIRUS DELLA TRISTEZZA DEGLI AGRUMI

A) METODOLOGIA DI CAMPIONAMENTO.

La metodologia di campionamento di seguito proposta e' mirata ad accertamenti individuali nel caso di piante madri e ad accertamenti a campione nel caso di vivai e di impianti commerciali.

Le indagini sistematiche dovranno riguardare le collezioni scientifiche e i giardini pubblici e privati; i vivai di piante di agrumi da frutto e ornamentali; gli impianti commerciali.

1. Collezioni scientifiche, giardini pubblici, privati.

\* Redigere una mappa che consenta la rapida individuazione delle piante di agrumi esistenti, specificandone la specie e la cultivar. Nel caso di specie esotiche accertarne la provenienza.

\* Prelevare dalle quattro esposizioni di ciascuna pianta un campione costituito da quattro rametti con corteccia verde (cm. 10 circa) e conservare a 4 °C fino al momento del saggio.

\* Ciascun campione dovrà essere saggiato singolarmente in due pozzetti ELISA.

\* Nel caso di infezioni da CTV:

a) estirpare e bruciare le piante infette;

b) sospendere il prelievo di marze delle altre piante presenti nel campo per un periodo di almeno tre anni ripetendo i saggi ogni anno;

c) controllare le altre piante di agrumi presenti nei campi adiacenti;

d) individuare eventuali distribuzioni di materiale di propagazione prelevato da piante infette a vivaisti, privati, ecc.

2. Vivai di piante da frutto e ornamentali.

2.1. Piante madri.

\* Redigere una mappa e saggiare individualmente tutte le piante, prelevando campioni costituiti da quattro rametti/pianta (vedi punto 1).

\* Nel caso si rinvenissero piante madri infette:

a) estirpare e bruciare le piante infette;

b) sospendere il prelievo di marze delle altre piante presenti nel campo per un periodo di almeno tre anni ripetendo i saggi ogni anno;

c) saggiare i semenzali di portinnesti e le piante in piantonaio e in nestoio ottenute per propagazione (diretta o indiretta) da piante risultate infette. Allo scopo, operare su campioni composti costituiti da cinque rametti (un rametto/pianta). Saggiare ciascun campione in un pozzetto ELISA. Nel caso di campioni infetti, estirpare e bruciare le cinque piante che costituiscono il campione;

d) individuare le aziende che hanno acquistato piante della stessa specie, cultivar e partita rinvenute infette e saggiare almeno il 10% delle piante.

2.2 Piante destinate alla vendita.

\* Effettuare controlli a campione iniziando dai lotti di piante di cui non sono identificate le piante madri.

\* Per ciascun lotto omogeneo di 2.500 piante prelevare, in modo ordinato, 25 campioni (un rametto/pianta), riunire i rametti in

gruppi di cinque e saggiare i 5 campioni ottenuti, ciascuno in un pozzetto ELISA (5 pozzetti ELISA per ciascun lotto di 2.500 piante).

\* Nel caso si dovessero accertare infezioni da CTV:

a) estirpare e distruggere l'intero lotto;

b) estendere i saggi ai lotti vicini, per accertare un'eventuale diffusione naturale.

3. Agrumeti commerciali.

\* Su una carta delle coltivazioni agrumicole individuare gli appezzamenti da saggiare (due ettari circa ogni dieci ettari di superficie).

\* Prelevare ordinatamente un rametto/pianta da 100 piante ubicate sul confine dell'appezzamento prescelto.

\* Riunire i rametti a gruppi di cinque in modo da costituire venti campioni/appezzamento, saggiare i campioni in pozzetti singoli (venti pozzetti per ciascun appezzamento di due ettari).

\* Nel caso di infezioni da CTV:

a) saggiare individualmente le cinque piante comprese nel campione infetto;

b) estirpare e bruciare le piante infette;

c) intensificare le indagini nell'appezzamento prelevando altri 50 campioni (due rametti/campione). Se le piante infette superano il 30% estirpare l'intero appezzamento.

B) DIAGNOSI DI CITRUS TRISTEZA VIRUS MEDIANTE TEST DAS-ELISA

(double antibody sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Il monitoraggio per il virus della tristezza degli agrumi (CTV) andra' eseguito sottoponendo a test immunoenzimatici (ELISA) campioni di corteccia di giovani rametti ancora verdi, prelevati nel periodi maggio-giugno e settembre-ottobre, allorché le temperature medie sono comprese fra 18 e 22 >C. I saggi immunoenzimatici saranno confermati, ove occorra, dai saggi biologici.

Per le finalita' dell'indagine si raccomanda di utilizzare antisieri policlonali di provata affidabilita'.

- Diluire l'anticorpo nel tampone (coating buffer) alla diluizione raccomandata.

- Disporre 200 (Micron) di questa preparazione per pozzetto.

- Coprire la piastra e porla ad incubare per 4 ore a 37 >C.

- Lavare la piastra con tampone di lavaggio (PBS-T) per 3 volte.

- Preparare gli estratti vegetali di ciascun campione da saggiare, piu' un campione di controllo negativo ed uno di controllo positivo come di seguito descritto:

- prelevare la corteccia verde dai giovani rametti;

- ridurre i tessuti in pezzetti minuti mediante un bisturi e porli in una provetta;
- aggiungere tampone di estrazione nel rapporto 1/10 w/v (1 g di tessuto/10 ml di tampone);
- estrarre il succo vegetale mediante un omogeneizzatore cinematico (tipo Ultraturrax);
- filtrare il succo attraverso garza.
- Disporre 200 (Micron) di estratto vegetale per ciascun pozzetto.
- Incubare per una notte a 4 °C.
- Lavare la piastra con tampone di lavaggio (PBS-T) per 3 volte.
- Diluire l'anticorpo coniugato con fosfatasi alcalina nel tampone (Conjugate buffer) alla diluizione raccomandata.
- Disporre 200 (Micron) della preparazione in ciascun pozzetto
- Coprire la piastra e porla ad incubare per 2-4 ore a 37 °C.
- Lavare la piastra con tampone di lavaggio (PBS-T) per 3 volte.
- Sciogliere il substrato PNP (para-nitro-fenilfosfato) nel tampone (substrate buffer) alla diluizione di 1 mg/1 ml.
- Disporre 200 (Micron) di questa preparazione per ciascun pozzetto
- Incubare a temperatura ambiente per 30-60 minuti.
- Aggiungere in ciascun pozzetto 50 (Micron) di NaOH 3 M.
- La valutazione dei risultati puo' essere fatta:
  - a) visivamente: entro 60 minuti dalla distribuzione della soluzione di substrato i pozzetti corrispondenti al testimone infetto assumono progressivamente una colorazione gialla, mentre quelle del testimone sano rimangono incolori;
  - b) allo spettrofotometro: entro 60 minuti dalla distribuzione del substrato si confrontano i valori di assorbanza a 405 nm.

Si considerano positivi tutti i campioni che hanno un valore di assorbanza pari al doppio del valore medio di assorbanza dei controlli sani.

Tampone di lavaggio (PBS-T).

Sciogliere in 1000 ml di acqua distillata:

- Sodio cloruro (NaCl) 8 g;
- Sodio fosfato bibasico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1,15 g;
- Sodio fosfato monobasico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,2 g;
- Potassio cloruro (KCl) 0,2 g;
- Sodio azotidrato (NaN<sub>3</sub>) 0,2 g;
- Tween - 20 0,5 g;

Correggere il pH a 7,4.

Tampone per anticorpo (coating Buffer).



Sciogliere in 1000 ml di acqua distillata:

Sodio carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1,59 g;

Sodio bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>) 2,93 g;

Sodio azotidrato (NaN<sub>3</sub>) 0,2 g.

Correggere il pH a 9,6.

Conservare a 4 °C.

Tampone di estrazione.

Sciogliere in 1000 ml di tampone di lavaggio (PBS-T):

polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40.000 20 g.

Conservare a 4 °C.

Tampone per coniugato (conjugate buffer).

Sciogliere in 1000 ml di tampone di lavaggio (PBS-T):

polivinilpirrolidone (PVP) MW 24-40.000 20 g;

albumina bovina da siero (BSA) 2 g.

Conservare a 4 °C.

Tampone per substrato (Substrate buffer).

Dietanolamina 97,0 ml.

Acqua distillata 800,0 ml.

Sodio azotidrato (NaN<sub>3</sub>) 0,2 g.

Correggere il pH a 9,8 con HCl concentrato.

Portare il volume finale a 1000 ml con acqua distillata.

Conservare a 4 °C.

C) SAGGIO BIOLOGICO.

1. Piante indicatrici.

\* Semenzali di limetta messicana (*Citrus aurantifolia* (Christm. Swing) per la diagnosi di tutti i componenti di CTV.

\* Semenzali di arancio amaro (*Citrus aurantium* L.) per la caratterizzazione di isolati di giallume dei semenzali (seedling yellows).

\* Semenzali di pompelmo (*Citrus paradisi* Macf.) o di arancio dolce (*Citrus sinensis*) (L. Osbeck) cv. Madame Vinous per la caratterizzazione di isolati di butteratura del legno (stem pitting).

2. Modalità di inoculazione.

\* Innestare nella parte basale della pianta indicatrice 2-3 porzioni di corteccia prive di gemme prelevate dalla pianta da saggiare.

\* Eliminare la maggior parte delle foglie basali.

\* Capitozzare l'indicatrice a 25-30 cm di altezza dal suolo.

\* Dopo 3 settimane dall'inoculazione accertarsi che le gemme innestate siano vive.

3. Condizioni di allevamento.

\* Le piante devono essere allevate in un terriccio idoneo ad

assicurare una crescita vigorosa e continua ed essere prive di carenze e di infezioni dell'apparato radicale che potrebbero mascherare i sintomi.

\* Per tutta la durata del saggio le piante devono essere allevate in serra termocondizionata opportunamente chiusa con rete a prova di insetto.

\* La temperatura max diurna deve essere compresa fra 24 e 28 °C.

\* La temperatura min notturna deve essere compresa fra 17 e 21 °C.

#### 4. Manifestazione dei sintomi.

\* Sull'indicatrice limetta messicana i primi sintomi compaiono dopo 3-5 settimane dall'inoculazione; la malattia si manifesta sulle foglie con aree decolorate delle nervature (vein clearing) e nei casi di isolati molto virulenti con suberificazione delle nervature (vein corking); dopo 2-3 mesi asportando la corteccia dai rametti della nuova vegetazione si osserva la butteratura del legno (stem pitting).

\* Su arancio amaro i sintomi di giallume dei semenzali si manifestano dopo 10 settimane dall'inoculazione; la malattia induce riduzione di sviluppo, nanismo, le foglie sono piu' piccole del normale e di colore giallo.

\* Su pompelmo o arancio dolce Madame Vinous la butteratura del legno si manifesta entro quattro mesi dall'inoculazione, la gravita' delle scanalature e' da correlare alla virulenza del ceppo.

#### CARATTERISTICHE TECNICHE DELLE SERRE A RETE ANTI-INSETTO NECESSARIE PER LA CONSERVAZIONE DELLE PIANTE INFETTE DA CTV.

Le serre devono garantire il massimo isolamento tra l'ambiente interno e l'esterno.

- In particolare devono essere realizzate:

\* con una doppia parete in rete, di dimensioni tali da impedire l'ingresso di insetti vettori (afidi), in tutte le sue parti (pareti laterali, tetto e doppio ingresso);

\* Ingresso con vestibolo di circa m 1 con doppia porta, possibilmente scorrevole, quella esterna munita di serratura.