



Direzione Agricoltura e Sviluppo Rurale

**Settore Servizio Fitosanitario Regionale e di Vigilanza e Controllo
Agroforestale.**

**Linee guida 2023 per la realizzazione di campionamenti per
l'effettuazione della sorveglianza annuale nell'area indenne
per Xylella fastidiosa (Reg. (UE) 2020/1201)**

Versione 1.0 del 10/05/2023

Indice generale

Introduzione.....	3
1 Aree di indagine.....	3
2 Obiettivi delle indagini.....	4
3 Oggetto delle indagini.....	4
4 Indagini e metodologie di campionamento da adottare nella zona indenne.....	5
4.1 Ambito territoriale delle indagini.....	5
4.2 Specie da indagare.....	6
4.3 Quantificazione del numero di campioni da prelevare per l'anno 2023.....	7
4.4 Organizzazione delle indagini.....	10
4.5 Preparazione delle ispezioni.....	11
4.6 Modalità operative per la realizzazione del campionamento.....	11
5 Modalità operative generali.....	12
5.1 Modalità di individuazione delle piante da campionare.....	12
5.2 Modalità di prelievo dei campioni.....	13
5.3 Misure di profilassi.....	15
5.4 Misure di sicurezza sul lavoro.....	16
6 Specifiche per le attività di monitoraggio della presenza di insetti vettori di <i>Xylella fastidiosa</i> in area indenne.....	16

Introduzione

Le presenti Linee Guida (LG), a cura del Servizio fitosanitario regionale della Toscana (SFR) hanno la finalità di definire le modalità operative per le indagini nelle aree indenni da *Xylella fastidiosa*. L'attività si svolge ai sensi del Reg. (UE) di esecuzione 2020/1201 della Commissione del 14 agosto 2020 e ss.mm.ii, relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa*, tenendo conto anche di quanto riportato nel DM del 24/1/2022 relativo all'Adozione del Piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well et al.), nella Pest survey card on *Xylella fastidiosa* ultimo aggiornamento 02.07.2021 (Version 2) della European Food Safety Authority (EFSA), nelle 'Guidelines for statistically sound and risk-based surveys of *Xylella fastidiosa*' pubblicate nel 2020 e nelle Procedure standard EPPO PM 7/24 Diagnostic Protocol, EPPO PM 3/82 Inspection of places of production for *Xylella fastidiosa*.

Nella predisposizione delle presenti LG si è tenuto conto dei dati tecnici e scientifici disponibili, della biologia dell'organismo specificato e dei suoi vettori, della presenza e della biologia delle piante specificate o di piante verosimilmente ospiti dell'organismo specificato.

1 Aree di indagine

Ai sensi dell'art 2 comma 3 Reg. (UE) 2020/1201 le indagini in area indenne sono eseguite in base al livello di rischio del sito o del tipo di attività economica svolta.

Inoltre come previsto dagli artt. 2 e 38 del Reg. (UE) n.2020/1201 si applicano a decorrere dal 1° gennaio 2023 le linee guida per le indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio relative alla *Xylella fastidiosa*. Pertanto al fine di applicare validi principi statistici per la definizione del numero dei campioni da analizzare, si utilizza lo strumento di supporto statistico dell'EFSA "RiBESS+".

Seguendo tale metodo, il territorio interessato dall'indagine è stato quindi suddiviso in unità epidemiologiche sulla base delle caratteristiche del territorio toscano. L'unità epidemiologica è un'area del territorio in cui vi sono condizioni vegetazionali omogenee (per esempio con la prevalenza di una certa tipologia piante) e in cui vi è pertanto pari probabilità di trovare un'infezione in una singola pianta e pertanto in tutte quelle presenti.

Le indagini si svolgono all'aperto, i siti a maggior rischio individuati per l'anno 2023 sono: i vivai olivicoli e vivai ornamentali e garden centre che coltivano piante ospiti e specificate sensibili a *Xylella fastidiosa*, le aree verdi esterne ai vivai, i frutteti, in particolare i nuovi impianti di olivi realizzati negli ultimi 5 anni, le aree verdi e di sosta lungo la viabilità principale sud-nord, aree verdi in zone di transito da e verso la Corsica e la Puglia, le aree verdi in zone di transito presso gli aeroporti di Firenze e Pisa, l'interporto di Prato e i porti di Piombino e Livorno e altri piccoli porti, le aree verdi intorno a stabilimenti che utilizzano vegetali provenienti anche dalle zone delimitate (per es. frantoi che lavorano olive provenienti dalla Puglia), le aree verdi e turistiche lungo la costa toscana coperte da macchia mediterranea e altra vegetazione spontanea, la zona di sorveglianza rinforzata (definita con il decreto dirigenziale n.

2746 del 15/02/2023), in particolare nei tratti di collegamento dell'Argentario con la terraferma, le aree verdi nei Comuni di Manciano (GR) e limitrofi, lungo la SR74 in corrispondenza delle zone delimitate al confine con il Comune di Canino (VT), e gli altri comuni della provincia di Viterbo al confine con la Toscana, le isole dell'Arcipelago toscano.

L'area indenne oggetto di indagine si trova all'interno del territorio della regione Toscana, escludendo l'area delimitata per il focolaio di *Xylella fastidiosa* di Monte Argentario (GR). L'area delimitata è stata definita in ultimo con il decreto dirigenziale n. 2746 del 15/2/2023.

2 Obiettivi delle indagini

La realizzazione delle indagini annuali, da svolgersi nei periodi più adatti e conformemente a quanto disposto nell'articolo 2 (comma 5) del Reg. (UE) 2020/1201, ha per obiettivo la rilevazione della eventuale presenza di *Xylella fastidiosa* nel territorio indenne della Regione Toscana e può portare all'eventuale istituzione di ulteriori zone delimitate.

3 Oggetto delle indagini

Ai sensi dell'art.2 (comma 1) del Reg (UE) 2020/1201, le indagini si svolgono mediante campionamento ed analisi di laboratorio sulle piante ospiti di Xf, come pure sulle altre piante che presentano sintomi indicativi della possibile infezione da parte di Xf o che si sospetta siano infette da tale organismo nocivo.

Ai sensi dell'art. 1 del Reg (UE) 2020/1201 le 'piante ospiti' sono tutte le piante da impianto, escluse le sementi, appartenenti ai generi o alle specie elencati nell'allegato I al regolamento e ss.mm.ii. (Reg. (UE) 2021/2130). In molti casi le indagini saranno estese anche a piante spontanee, non da impianto, appartenenti alle stesse specie elencate nell'allegato I.

Le indagini si svolgono anche mediante campionamento ed analisi di laboratorio di insetti potenzialmente vettori di Xf presenti sul territorio della zona indenne.

4 Indagini e metodologie di campionamento da adottare nella zona indenne

4.1 Ambito territoriale delle indagini

Il territorio della zona indenne della regione Toscana viene suddiviso in 5 unità epidemiologiche (UE) sulla base delle linee guida EFSA all'applicazione del RiBESS+. Sono state aggiunte una UE "Vivai", in modo che all'interno di tali siti possano essere

applicati separatamente i campionamenti secondo l'art. 25 del REG. (UE) 2020/1201 e una UE "sorveglianza rafforzata" al confine con l'area delimitata per Xylella f.

Pertanto le unità epidemiologiche in cui è stato suddiviso il territorio toscano indenne da Xf sono le seguenti:

- 1) UE zone agricole
- 2) UE zone naturali
- 3) UE zone urbane
- 4) UE zona a sorveglianza rinforzata (da D.D. 2746 del 15/2/2023)
- 5) UE vivai

Le aree potenzialmente a maggior rischio all'interno delle 5 unità epidemiologiche sono state individuate sulla base delle indicazioni contenute nella "Pest Survey Card on Xylella fastidiosa" 2021', in cui vengono definite le attività a rischio e i siti a rischio, e sulla base delle caratteristiche del territorio della Toscana.

All'interno di ciascuna UE, le indagini vengono effettuate individuando i siti in cui viene effettuato il campionamento.

Le tipologie di siti a rischio individuate nell'applicativo 'FitoSIRT' sono le seguenti:

-sito "Aree coltivate -codice Fitosirt 1.1" (che comprende colture erbacee, colture industriali, pascoli, orti, colture floricole ecc..)

-sito "Altri frutteti -1.2" in cui vi è la possibilità di scegliere fra la tipologia: Vigneto , Oliveto, Pruneto o Altri frutteti)

- sito "Altre aree naturali- codice Fitosirt 2.3" in cui vi è la possibilità di scegliere fra: Aree a prato, Foresta (Macchia mediterranea)

- sito "Aree marginali incolte, vegetazione spontanea, siepi in zone agricole, alberi isolati -codice Fitosirt 2.4"(che comprende per esempio siti con presenza di vegetazione spontanea ed ex aree agricole o singoli alberi)

- sito "Aeroporti, porti, strade, ferrovie - codice Fitosirt 2.5.6" (che comprende siti con vegetazione spontanea o coltivata nelle zone di transito verso gli aeroporti, porti, interporti e lungo la viabilità regionale, sui bordi strada e nelle aree di sosta)

- sito "Aree verdi pubbliche -codice Fitosirt 2.5.10" in cui vi è la possibilità di scegliere fra:parchi, alberatura (che comprende siti con vegetazione spontanea o coltivata sia nelle zone urbane, extraurbane, che nei siti di interesse turistico)

-sito "area a sorveglianza rinforzata - codice Fitosirt 2.5.13" (che comprende siti con vegetazione spontanea o coltivata prospicienti l'area delimitata di Monte Argentario)

La zona di sorveglianza rinforzata è delimitata con la mappa allegata al Decreto Dirigenziale n. 2746 del 15/02/2023.

Per 'UE zone agricole' le indagini con campionamento si svolgono prioritariamente nei siti 1.2 oliveti (in particolare nuovi impianti di oliveti realizzati negli ultimi 5 anni) e secondariamente nelle altre tipologie di sito.

Per 'UE zone naturali' le indagini con campionamento si svolgono prioritariamente nei siti 2.3 macchia mediterranea e secondariamente nelle altre tipologie di sito.

Per 'UE zone urbane' le indagini con campionamento si svolgono prioritariamente nei siti 2.5.6 "Aeroporti, porti, strade, ferrovie" e nei siti 2.5.10 aree verdi pubbliche in ambiente urbano o turistico o secondariamente nelle altre tipologie di sito.

Per la 'UE sorveglianza rinforzata' le indagini con campionamento più intensivo si svolgono prioritariamente nei siti 2.5.13 "area a sorveglianza rinforzata" e si svolgono nelle zone con vegetazione spontanea o coltivata prospicienti l'area delimitata di Monte Argentario ai sensi del Decreto Dirigenziale n. 2746 del 15/02/2023 in particolare concentrandosi nelle zone di collegamento di uscita dai due tomboli Giannella e Feniglia e nella terraferma al di fuori dell'area delimitata per prevenire la diffusione dell'organismo nocivo nelle aree indenni.

Per la 'UE vivai' le ispezioni con campionamento saranno effettuate nei vivai olivicoli e vivai ornamentali che coltivano o detengono piante ospiti sensibili a *Xylella fastidiosa* e garden centres. In particolare le indagini sono svolte ai sensi dell'art. 25 del Reg. (UE) 2020/1201 con ispezioni:

- in siti di coltivazione di piante specificate che appartengono ad un operatore professionale registrato conformemente all'articolo 65 del regolamento (UE) 2016/2031
- in siti che appartengono ad un operatore professionale registrato conformemente all'articolo 65 del regolamento (UE) 2016/2031 in cui le piante da impianto di *Coffea*, *Lavandula dentata* L., *Nerium oleander* L., *Olea europaea* L., *Polygala myrtifolia* L. e *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb devono essere spostate per la prima volta.

4.2 Specie da indagare

Le indagini sul territorio si svolgono su piante ospiti appartenenti ai generi o alle specie elencati in allegato I del Reg. (UE) 2020/1201 e ss.mm.ii.

Considerato però che in Italia sono presenti due sottospecie di *Xylella fastidiosa*: la sottospecie *Pauca* in Puglia e la sottospecie *Multiplex* nella zona delimitata dell'Argentario (GR) e nelle zone delimitate di Canino e di Tarquinia nella provincia di Viterbo in Lazio, si ritiene opportuno campionare, in tutte le unità epidemiologiche (UE) preferenzialmente le piante specificate che si sono dimostrate più sensibili alle due sottospecie sopra richiamate:

- in particolare si intende indagare le specie sensibili alla ssp. *Pauca* perché che possono avere un pesante impatto economico e paesaggistico, campionando prioritariamente la specie: *Olea europaea*. Secondariamente *Prunus dulcis* (*amygdalus*), *Laurus nobilis*, *Nerium oleander*, *Citrus*, ecc.
- Per la ssp. *Multiplex* si intende indagare le specie sensibili: *Spartium junceum*, *Rhamnus alaternus*, *Cistus sp*, *Prunus dulcis* (*amygdalus*), *Polygala myrtifolia*.

Ai sensi del Reg. (UE) 2020/1201 e ss.mm.ii. si definiscono 'piante specificate' le 'piante ospiti da impianto, escluse le sementi, appartenenti ai generi o alle specie elencati nell'allegato II del regolamento e notoriamente sensibili a sottospecie specifiche dell'organismo nocivo specificato'. In generale, i controlli e il prelievo campioni sono eseguiti, ove possibile su piante che presentano sintomi specifici per *Xylella fastidiosa* o, in assenza di questi, su piante asintomatiche.

Le indagini nei vivai si svolgono prelevando campioni preferibilmente da piante sintomatiche. In assenza di piante sintomatiche, i campioni dovranno essere presi da piante specificate appartenenti alle specie *Coffea*, *Lavandula dentata*, *Nerium oleander*, *Olea europaea*, *Polygala myrtifolia* e *Prunus dulcis*, se presenti. Secondariamente dovranno essere campionate piante appartenenti ai generi delle sei specie di cui sopra (*Lavandula* spp., *Prunus* spp. etc.), oppure altre piante specificate di cui all'allegato II del Reg. (UE) 2021/2130 che modifica l'elenco delle piante specificate del Reg. (UE) 2020/1201.

4.3 Quantificazione del numero di campioni da prelevare per l'anno 2023

Il fattore di rischio scelto è la distanza dalla costa: alto rischio con una distanza inferiore a 20 km (RF1= rischio relativo valore 2) e basso rischio con una distanza superiore a 20 km dalla costa (RF2= rischio relativo valore 1).

Tenuto conto delle linee guida per indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio relative alla *Xylella fastidiosa*, per il 2023 lo strumento "RiBESS+" ha previsto un numero minimo totale di 891 campioni. Il totale dei campioni è suddiviso per le diverse unità epidemiologiche territoriali, nelle zone con una distanza inferiore a 20 km dalla costa un totale di n.144 campioni, nelle zone con una distanza superiori a 20 km dalla costa un totale di n. 287 campioni e i restanti n. 460 campioni suddivisi fra aree urbane e area a sorveglianza rinforzata, all'interno di queste, in ogni porzione a diverso rischio, escludendo i vivai per i quali si applicano i criteri previsti dall'art. 25 del Reg. (UE) 2020/1201.

Per la distribuzione omogenea del campione l'intero territorio della regione Toscana è stato diviso in quadranti di misura 1 kmx1km, siglati e numerati per unità epidemiologica e per fattore di rischio.

La ripartizione omogenea dei campioni sul territorio, si realizza, stabilendo una "cadenza" di campionamento fra i quadranti. A tale scopo il calcolo matematico è il rapporto tra il numero dei quadranti presenti per ciascuna UE e il numero di campioni stabiliti per quella specifica UE/RF.

Verrà data priorità ai campionamenti nei quadranti posizionati ad un'altitudine inferiore ai 600 m s.l.m. dove, a causa delle condizioni climatiche e vegetazionali si prevede un possibile insediamento dell'organismo nocivo.

La distribuzione dei campioni nei quadranti (visibili nella tabella riassuntiva) e le modalità di dettaglio saranno comunicate dal SFR agli affidatari durante la riunione preliminare come riportato nel paragrafo successivo 4.4.

Le indagini sul territorio si svolgeranno pertanto nelle seguenti unità epidemiologiche con un campionamento così suddiviso:

- UE zone agricole con distanza minore 20 km dalla costa= 73 campioni (cod. quadrante: AC...)
- UE zone agricole con distanza maggiore 20 km dalla costa= 146 campioni (cod. quadrante: AI...)

- UE zone naturali con distanza minore 20 km dalla costa= 71 campioni (cod. quadrante: BC...)
- UE zone naturali con distanza maggiore 20 km dalla costa= 141 campioni (cod. quadrante: BI...)
- UE zone urbane= 230 campioni (cod. quadrante: U...)
- UE zona a sorveglianza rinforzata (da D.D. 2746 del 15/02/2023)= 230 campioni (cod. quadrante: R...)

Inoltre è stato stabilito di prelevare 30 campioni anche sul territorio dell'Isola d'Elba.

Sul portale Fitosirt ogni quadrante è contraddistinto da un codice formato da 3 lettere e da 1 numero che va da 1 a 4 cifre (per esempio BIM1180):

-la prima lettera corrisponde all'unità epidemiologica:

A=zone agricole

B=zone naturali

R=zona a sorveglianza rinforzata

U=zone urbane

-la seconda lettera corrisponde fattore di rischio scelto "distanza dalla costa":

C=distanza < 20 km dalla costa

I=distanza > 20 km dalla costa.

-la terza lettera corrisponde all'altitudine (utile solo ai fini della distribuzione del campione):

"B"= altitudine <300 m

"M" = altitudine >300m <600m

"A"= altitudine > 600m

- il numero da 1 a 4 cifre è un numero progressivo per individuare il quadrante.

Di seguito la tabella riassuntiva:

Unità epidemiologica	Fattore di rischio	n° quadranti	n° quadranti di quota < 600 m (M e B) (codice Fitosirt altitudine "M" medio <600m >300m "B" basso <300 m "A" alta > 600m)	n° campioni	cadenza media prelievo campioni nei quadranti
zone agricole (1° codice quadrante "A")	< 20 km dalla costa (codice quadrante costa "C")	2178	2177	73	30
zone agricole (codice quadrante "A")	> 20 km dalla costa (codice quadrante interno "I")	6004	5832	146	40
zone naturali (codice quadrante "B")	< 20 km dalla costa (codice quadrante costa "C")	3371	3014	71	42
zone naturali (codice quadrante "B")	> 20 km dalla costa (codice quadrante costa "C")	11166	7224	141	51
zone urbane (codice quadrante "U")	-----	945	935	230	4
zona a sorveglianza rinforzata (codice quadrante "R")	-----	55	55	230	0,23 (4 campioni per quadrante in tutti i 55 quadranti)
vivai (centri aziendali)				circa 5000	
isole Arcipelago				30	
Totale	-----	23.719	19.974	5.921	

-Le indagini nei vivai sono svolte ai sensi dell'art. 25 del Reg. (UE) 2020/1201 con ispezioni e prelievo campioni:

-in siti di coltivazione di piante specificate che appartengono ad un operatore professionale registrato conformemente all'articolo 65 del regolamento (UE) 2016/2031 con centro aziendale con superficie inferiore a 15 ettari, (siti di coltivatori di taglia S e M) prelevando almeno un campione pool (composto da almeno 5 piante specificate della stessa specie), con massimo 2 campioni per centro aziendale.

- in siti di coltivazione di piante specificate condotti da un operatore professionale registrato conformemente all'articolo 65 del regolamento (UE) 2016/2031 con centri aziendali con superficie del centro aziendale uguale o superiore ai 15 ettari (siti di coltivatori di taglia L e XL) prelevando i campioni utilizzando una schema di campionamento contenuto nello Standard Internazionale ISPM n. 31, con un tasso di presenza di piante infette del 5% e con un livello di confidenza almeno dell'80% che prevede il prelievo da un minimo di 4 ad un massimo di 7 di campioni pool .

- in siti condotti da un operatore professionale registrato conformemente all'articolo 65 del regolamento (UE) 2016/2031 in cui le piante da impianto, di *Coffea*, *Lavandula dentata* L., *Nerium oleander* L., *Olea europaea* L., *Polygala myrtifolia* L. e *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb devono essere spostate per la prima volta (siti di produttori primari) utilizzando uno schema di campionamento in grado di rilevare un tasso di presenza di piante infette dell'1 % con un livello di confidenza almeno dell'80 % di cui all'art.25 Reg.UE 2020/1201.

- in siti di coltivazione di piante specificate condotti da un operatore professionale registrato conformemente all'articolo 65 del Regolamento (UE) 2016/2031 ubicati nel territorio provinciale di Grosseto, nelle aree a sorveglianza rinforzata. I siti sono sottoposti a campionamento con l'utilizzo uno schema di campionamento in grado di rilevare un tasso di presenza di piante infette del 5% con un livello di confidenza almeno dell'80%. Lo schema di campionamento è contenuto nello Standard Internazionale ISPM n. 31 Methodologies for sampling of consignments (Appendix 5 - Table 2)

Le indagini con catture degli insetti vettori saranno effettuate sul territorio della Toscana nei siti a maggior rischio. Saranno raccolti circa n. 600 campioni di insetti xilemofili potenziali vettori appartenenti principalmente alle specie: *Philaenus* sp, *Neophilaenus* sp., *Lepyronia coleoptrata*, *Cicadella viridis*, ecc.

4.4 Organizzazione delle indagini

Le indagini nelle zone indenni saranno effettuate dal personale del SFR e dal personale qualificato di ditte esterne sotto la sorveglianza del SFR.

Prima dell'inizio delle operazioni sono previste riunioni organizzative con le ditte esterne al fine di coordinare le modalità di lavoro e la ripartizione dei compiti e il perseguimento degli obiettivi.

Ad ogni ditta sarà assegnato un certo numero di quadranti e di campioni da prelevare come da indicazione al paragrafo 4.3.

Le indagini sugli insetti vettori saranno effettuate dal DAGRI dell'Università di Firenze, nell'ambito dell'accordo di collaborazione scientifica stipulato con tale Dipartimento.

Si stima di completare la realizzazione delle indagini entro la fine del mese di dicembre 2023.

4.5 Preparazione delle ispezioni

Per la preparazione delle indagini occorre:

- dotarsi della normativa essenziale: Reg. di esecuzione (UE) 2020/1201 e ss.mm.ii. della Commissione del 14 agosto 2020 'relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della Xylella fastidiosa';
- dotarsi degli strumenti necessari per il campionamento (buste sigillo, fascette a strozzo, forbici, disinfettante, ecc.).

Le mappe necessarie sono disponibili sull'applicazione 'FitoSIRT' del SFR; tutti gli operatori avranno accesso a tale app. Gli operatori possono quindi consultare l'atlante cartografico della Toscana suddiviso in quadranti corrispondenti alle unità epidemiologiche sopra riportate, predisposto dal SFR, e accedere alle mappe relative ai quadranti.

4.6 Modalità operative per la realizzazione del campionamento

Il campionamento deve essere effettuato rispettando il periodo di prelievo indicato dal SFR. In caso di problemi per l'accesso ai quadranti o di non idoneità di alcuni al campionamento, si dovrà passare al quadrante più vicino. Procedere quindi al campionamento delle piante ospiti o dalle piante specificate, effettuando possibilmente per ogni quadrante da campionare, le seguenti operazioni:

- posizionarsi sul quadrante, scegliere il sito dove effettuare il campionamento, possibilmente in una zona facilmente raggiungibile. Effettuare il prelievo del numero di campioni previsto per quel quadrante da piante preferibilmente sintomatiche o sospette, in assenza di queste, da piante asintomatiche appartenenti preferenzialmente a piante specificate sensibili a Xylella fastidiosa subsp. Pauca nelle zone interne e preferenzialmente a Xylella fastidiosa susp. Multiplex nelle zone costiere. I campioni devono essere sempre prelevati da una singola pianta;
- applicare a ciascuna pianta campionata una fascetta numerata e inserire il campione nella busta nastro sigillo;
- registrazione dell'operazione con l'applicativo FitoSIRT in dotazione, nel quale vengono acquisite tra le altre informazioni anche le coordinate geografiche.

Registrare come segue le operazioni svolte su FitoSIRT :

- aprire un verbale di "Monitoraggio Xylella zona indenne" . Indicare nel verbale la tipologia di sito. Le piante devono essere classificate e registrate con genere e specie, evitando di inserire solo il genere o indicazioni generiche (sp.).
- Nel corso dell'ispezione, creare un rilievo per ciascuna specie vegetale. Nel caso di campionamento di più specie vegetali nello stesso sito aprire un nuovo rilievo per ciascuna specie vegetale.
- Effettuare la registrazione sull'applicativo Fitosirt di ciascun campione prelevato all'interno del rilievo indicando il numero della fascetta e il numero della busta nastro sigillo corrispondente.

- Verificare sempre il corretto posizionamento geografico riportato su FitoSIRT. Nel caso di scarsa precisione si potrà attivare il posizionamento in modalità "manuale". In caso di quadranti inaccessibili coprire comunque la zona intensificando o spostando il campionamento nei quadranti adiacenti.

-

5 Modalità operative generali

I campioni prelevati dovranno essere portati ai laboratori di riferimento del SFR di Pistoia, Firenze, Livorno e Orbetello (GR). La consegna nei laboratori dovrà essere sempre concordata con il Responsabile del laboratorio. I campioni dovranno essere conservati dal prelievo fino alla consegna a una temperatura non superiore ai 5 gradi centigradi. Previo accordo i campioni raccolti in zona di sorveglianza rafforzata potranno essere portati nel laboratorio di Orbetello.

5.1 Modalità di individuazione delle piante da campionare

L'individuazione delle piante da cui prelevare campioni dovrà tenere conto della presenza/assenza di sintomi sulle piante ospiti, orientando la scelta su piante sintomatiche.

L'unità di base per il campionamento è la pianta singola.

La concentrazione batterica nella pianta dipende da vari fattori ambientali e biologici, poiché il batterio è confinato nei tessuti dello xilema, normalmente i tessuti legnosi, i piccioli e le nervature centrali delle foglie sono le parti con le più alte concentrazioni batteriche. A tale proposito le osservazioni dovranno essere rivolte in particolare sulle foglie "formate" (non più erbacee) presenti su rametti lignificati.

Negli arbusti e nelle piante erbacee la ricerca della eventuale presenza di sintomi dovrà essere rivolta su tutta la chioma delle piante ispezionate.

Nel caso di piante arboree le osservazioni dovranno essere rivolte alla parte alta della chioma.

Nel caso di specie a foglia caduca l'ispezione visiva e l'eventuale campionamento dovranno essere realizzati solo in presenza di fogliame dell'anno sviluppatosi su rametti lignificati con accrescimento definitivo.

Al fine di individuare le piante da campionare dovranno essere cercate le sintomatologie aspecifiche di solito assimilabili a bruscatura fogliare (leaf scorch) che in genere caratterizzano precocemente la presenza di infezioni di *Xylella fastidiosa*. Le foglie infette di solito presentano disseccamento della parte apicale o marginale della lamina, disseccamenti che in tempi più o meno rapidi vanno ad interessare le foglie dell'intero rametto, uno o più rametti di una branca, l'intera branca, parte della chioma fino al completo interessamento della chioma e al disseccamento parziale o totale della pianta infetta.

In base ai campionamenti realizzati nel focolaio di Monte Argentario la sintomatologia iniziale sopra descritta è stata riscontrata in particolare su *Polygala myrtifolia* e *Prunus dulcis*. Su alcune delle specie vegetali riscontrate infette con maggiore frequenza sono

invece state riscontrate alcune differenze significative rispetto alla sintomatologia riportata in bibliografia. In particolare su *Rhamnus alaternus* l'infezione si manifesta inizialmente con ingiallimento fogliare prima localizzato su alcune foglie e poi diffuso su parte della chioma. Talvolta sono state ritrovate piante asintomatiche positive al batterio. *Spartium junceum* presenta ingiallimento o imbrunimento delle parti apicali di uno o più rametti. La sintomatologia si evolve in disseccamento dei rametti e successivamente di parte della chioma. *Calicotome villosa* presenta ingiallimento delle foglioline su limitate porzioni di rametti che successivamente si espandono e portano al disseccamento dei rametti interessati. I sospetti maggiori comunque sono dati da disseccamenti parziali o totali della chioma. *Cistus creticus* e *Cistus monspeliensis* presentano ingiallimenti o arrossamenti fogliari, disseccamento parziale o totale delle foglie, disseccamento di rametti singoli o di parti della chioma. *Rosmarinus officinalis* e *Lavandula angustifolia* di solito presentano avvizzimento parziale delle foglioline aghiformi di alcuni rametti che si evolvono in disseccamento parziale o totale dei rametti interessati fino al disseccamento parziale o totale dell'arbusto.

5.2 Modalità di prelievo dei campioni

Il campione deve essere prelevato da rami/branche situati in prossimità delle parti sintomatiche e composto da porzioni di tessuto xilematico. Il campione da prelevare dovrebbe contenere rametti o foglie singole nella ragione di 5 a 25 foglie (a seconda delle dimensioni). È necessario che il laboratorio abbia almeno 0.5 - 1 g di piccioli e/o nervature centrali. Al riguardo vedasi la seguente tabella:

Tipologia del campione	Host plants/tipologia di tessuto	Numero minimo di foglie per campione di laboratorio	Peso approssimativo del campione di laboratorio
Campioni da piante con foglie (sintomatiche o asintomatiche)	Parti basali delle foglie a lamina larga (<i>Coffea</i> , <i>Ficus</i> , <i>Vitis</i> , <i>Nerium oleander</i>) con picciolo	5	0.5-1 grammo
	Piccioli, parti basali di foglie di piccola taglia e sezioni di intersezioni di rametti legnosi (<i>Polygala myrtifolia</i> , <i>Olea</i> sp)	25	0.5-1 grammo
	Parti basali di foglie di piccola taglia e con poco picciolo. Sezioni di intersezioni di rametti legnosi (<i>Prunus dulcis</i>)	25	0.5-1 grammo
Piante dormienti o talee dormienti	Tessuto xilematico	-	1 grammo

Il prelievo dei campioni si effettua sulle piante sintomatiche o asintomatiche. Le caratteristiche del campione e la tipologia delle matrici vegetali da prelevare possono variare a seconda delle caratteristiche della specie vegetale campionata:

- Specie arboree a foglia caduca: preferibilmente 8 rametti di 15-20 cm con foglie, in alternativa, da settembre in poi, 10-12 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati;
- Specie arboree sempreverdi: preferibilmente 8 rametti di 15-20 cm con foglie, in alternativa 10-12 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati;
- Piante erbacee e specie a ciclo annuale: porzioni di fusto/cauli con foglie basali; laddove possibile prelevare l'intera pianta, compresa eventualmente la/e radice/i principale/i.
- Piante arbustive: rametti di 15-20 cm con foglie, ovvero fino a 25 foglie mature con picciolo, prelevate da rami ben lignificati;

I risultati dei test analitici sono fortemente dipendenti dalla qualità e tipologia del materiale vegetale oggetto di indagine. Per cui occorre che i prelievi dei campioni vegetali siano fatti in modo omogeneo e puntuale. Di seguito vengono definiti i parametri minimi legati al tipo di campioni prelevati per il laboratorio per le analisi di verifica.

Nel caso di piante arboree i campioni non dovrebbero essere prelevati da giovani germogli perché in tali matrici le colonie batteriche sono tendenzialmente basse. Il campione dovrebbe contenere almeno da 4 a 10 rami a seconda delle dimensioni della pianta.

Le piante oggetto di campionamento dovranno essere contrassegnate con una fascetta numerata per poterle ritrovare con certezza in caso di positività,

A titolo di esempio si riportano le caratteristiche dei campioni da prelevare in funzione della tipologia delle piante

Piante arboree: (*Olea europea*, *Prunus dulcis*, *Cercis siliquastrum*, *Ficus carica*, ecc..)

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
3-5 rametti/pianta di 10-15 cm con foglie oppure 5-8 foglie mature con picciolo prelevate da rami ben lignificati. È preferibile prelevare parti legnose immediatamente sottostanti i rametti sintomatici.	1 - 2 g (piccioli/nervature centrali/parti apicali germogli/sezioni legnose)	

Piante arbustive: (*Nerium oleander*, *Calicotome spinosa*, *Rhamnus alaternus*, *Spartium junceum*, *Cytisus scoparius*, ecc.)

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
5-8 foglie mature con picciolo/pianta	1 - 2 g (piccioli/nervature centrali)	

Polygala myrtifolia

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
3-5 rametti/pianta	1 - 2 g (piccioli/parti apicali germogli/sezioni legnose)	

Piccoli arbusti e piante erbacee: (*Lavandula sp.*, *Cistus sp.*, *Rosmarinus officinalis*, *Elichrisum italicum*, *Asparagus* ecc.)

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione	Peso approssimativo del campione da laboratorio
3-5 parti di pianta	1 - 2 g (parti di pianta)

5.3 Misure di profilassi

Al fine di prevenire qualsiasi diffusione dei batteri ad altre piante, è necessario che forbici coltelli o altri attrezzi da taglio vengano disinfettati dopo ogni prelievo di campioni. Tale disinfezione può avvenire con etanolo o con altri disinfettanti di comprovata efficacia e seguita da successiva asciugatura con carta assorbente. È importante scuotere il campione prima di inserirlo nelle buste con nastro sigillo del SFR per garantire l'assenza di vettori.

Sempre al fine di scongiurare il rischio di trasporto passivo dei vettori è assolutamente necessario che gli operatori impegnati nelle operazioni di campionamento prima di uscire dalla zona a sorveglianza rinforzata scuotano gli abiti da lavoro, le scarpe, le borse da lavoro e quelle per il trasporto dei campioni al fine di eliminare gli eventuali insetti presenti. Stessa operazione di bonifica dovrà essere realizzata anche all'interno dei mezzi di trasporto spesso utilizzati come rifugio da numerosi insetti fra cui i vettori di *Xylella fastidiosa*.

5.4 Misure di sicurezza sul lavoro

I componenti delle squadre di rilevamento dovranno disporre dell'attrezzatura, della strumentazione e delle dotazioni che gli consentano lo svolgimento delle attività

secondo i migliori standard qualitativi e di sicurezza in conformità alla normativa vigente.

L'area è caratterizzata da varie tipologie di zone da ispezionare, ciascuna con asperità e fattori di pericolo differenti che comunque possono rappresentare un rischio per la incolumità degli operatori. A tale proposito è assolutamente necessario prevenire gli eventuali incidenti che possano causare infortuni nel corso delle operazioni di campionamento pertanto tutti gli operatori coinvolti sono tenuti a rispettare tutte le norme di prevenzione degli infortuni sul lavoro.

Si ricorda che è obbligatorio utilizzare scarpe antinfortunistiche, guanti di pelle o rinforzati, occhiali infrangibili, e nella zone a maggior rischio o nelle operazioni su piante arboree è necessario l'uso del casco protettivo. Poiché le operazioni si svolgono nel periodo primaverile/estivo/autunnale è necessario utilizzare abbigliamento che copra la pelle (gambe e braccia coperte). A protezione della testa e del viso dai raggi solari, quando non è necessario l'uso del casco, è consigliato l'uso di un cappello con tesa. A protezione dalle eventuali punture di insetti è opportuno dotarsi di *stick* anti-insetti, a prevenzione di colpi di calore è opportuno portare sempre almeno una bottiglia di acqua e una crema solare contro le scottature.

6 Specifiche per le attività di monitoraggio della presenza di insetti vettori di *Xylella fastidiosa* in area indenne

AMBITO DELLE INDAGINI: Le aree individuate a maggior rischio riguardano gli eventuali punti entrata del batterio soprattutto a causa del trasporto passivo dei vettori da parte dell'uomo. Quindi, oltre alle zone fortemente turistiche, saranno monitorate le aree di servizio e di sosta lungo le strade, gli interporti, aeroporti e porti, le aree intorno ai vivai e ai grandi frantoi, le aree marginali incolte, le aree a macchia mediterranea, l'area a sorveglianza rinforzata.

SPECIE DA INDAGARE: I generi da monitorare saranno principalmente *Philaenus sp.*, *Neophilaenus sp.*, in quanto vettori certi del batterio. Non potendo però escludere la possibilità di altre specie di essere vettrici si prevede la possibile cattura anche degli altri Aphrophoridi.

NUMERO DI CAMPIONI DA PRELEVARE: Si prevede di raccogliere un numero totale di 600 esemplari. Dovranno essere verbalizzati tutti i tentativi di cattura anche quelli infruttuosi.

ORGANIZZAZIONE DELLE INDAGINI: Prima dell'inizio delle operazioni sono previste delle riunioni organizzative fra il SFR e il DAGRI, al fine di coordinare le modalità di lavoro e la ripartizione dei compiti e il perseguimento degli obiettivi. Una volta individuati i siti, si procederà alla cattura degli insetti tramite retini entomologici e il prelievo dagli stessi tramite aspirazione. Gli esemplari andranno quindi inseriti in provetta con liquido di conservazione ed inviati al laboratorio di analisi.

SOGGETTI INTERESSATI: Le indagini saranno effettuate dal personale del DAGRI-Università di Firenze mentre le analisi saranno effettuate nel Laboratorio del SFR di Pistoia. Il personale del SFR potrà essere di supporto alle attività previste.