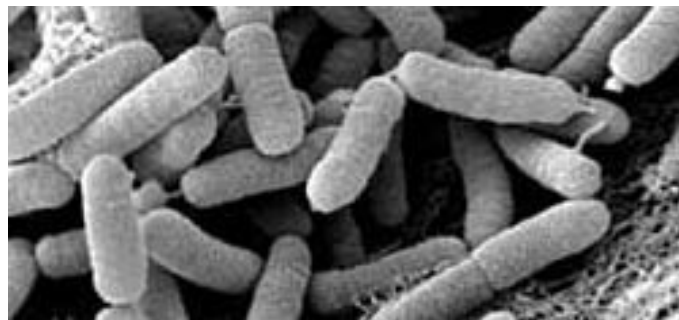
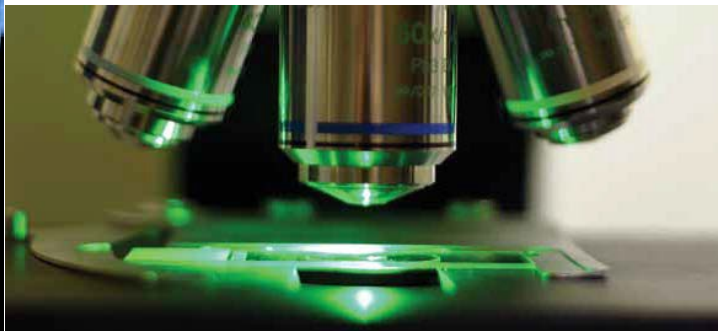


REGIONE TOSCANA



Laboratorio Multisito Fitopatologico del Servizio Fitosanitario della Regione
Toscana

RELAZIONE ATTIVITA' ANNO 2023

a cura di

Domenico Rizzo

Servizio Fitosanitario Regionale

Introduzione.....	3
Attività effettuate presso il Laboratorio di Guasticce (LI) del punto di entrata del porto di Livorno.....	15
Serie Storiche delle attività di Diagnostica Fitopatologia del Laboratorio - periodo 2013-2023.....	16
Collaborazioni e Convenzioni con altri Enti e Istituzioni Scientifiche.....	18
Metodiche e Protocolli Diagnostici del Laboratorio del SFR.....	21
Costi e Investimenti per il Laboratorio.....	21
Conclusioni.....	23
Allegati.....	24
Tabella 1 - Elenco completo delle specie oggetto d'indagine nel 2023 dal Laboratorio SFR.....	24

Introduzione

Nel corso del 2023 il laboratorio fitopatologico multi sito del Servizio Fitosanitario della Regione Toscana (di seguito Lab) con sede a Pistoia in via Ciliegiole 99 c/o GEA (sede principale) e in Via delle Colline, loc. Guasticce, Collesalveti (LI), ha effettuato le analisi, prove e diagnosi ordinarie previste nel piano annuale di attività del Servizio Fitosanitario accompagnando le attività di indagine in aree indenni e in area delimitata per *Xylella fastidiosa* (a seguito del ritrovamento avvenuto nel mese di novembre 2018) oltre che le indagini territoriali per la verifica della presenza di Flavescenza Dorata (*Phytoplasma vitis*). Nel corso del 2023 il laboratorio ha conservato l'accreditamento ISO 17025 rilasciato da ACCREDIA per le quattro prove diagnostiche relative a *Xylella fastidiosa*, ToBRFV, *Anoplophora chinensis* e *Phyllosticta citricarpa*/*P. paracitricarpa* già acquisito nel corso del 2022, e ha ulteriormente sviluppato e validato ulteriori metodi di prova interni per la verifica diagnostica di *Bursaphelenchus xylophilus*. Sono state inoltre migliorate le prove per *Xylella fastidiosa*, differenziando i metodi estrattivi disponibili. Allo stato attuale il laboratorio è accreditato per dieci prove diagnostiche.

Anche nel corso del 2023 (al pari del 2022) vi sono state diverse modifiche legate all'organizzazione interna del laboratorio. Infatti a metà gennaio è stato assegnato al lab una nuova unità lavorativa e sono state attivate due nuove borse di studio dell'Università di Pisa.

Il LIMS, ovvero il software gestionale delle attività del laboratorio e all'ottimizzazione dei processi estrattivi, è stato ulteriormente , sfruttando al massimo le potenzialità delle attrezzature del laboratorio.

Attività complessive svolte dal laboratorio SFR nel corso del 2023

Andando ad esaminare le diverse attività del lab nel corso del 2023, possiamo fare alcune distinzioni nell'attività complessiva del laboratorio.

Una prima caratterizzazione può essere evidenziata considerando il numero/tipologia di richieste/verbali di prelievo con il relativo numero di campioni e analisi effettuate complessivamente nel corso del 2023.

Richieste / Campioni / Analisi	
Parametro	Generale

Richieste	3.853
Campioni processati	15.107
Patogeni ricercati	134
Metodi diagnostici	145
Specie vegetali	200
Prove di amplificabilità	15.907
Analisi	18.555
Analisi complessive	34.462

Tab. 1 – Richieste/Campioni/Analisi

A fronte di 3.853 richieste o verbali di campionamento/prelievo, sono stati prelevati 15.107 campioni per un numero complessivo di 18.555 analisi effettuate. A tali analisi vanno aggiunte le verifiche di amplificabilità o prove di amplificabilità sugli estratti di acidi nucleici (DNA) o cDNA (RNA) per la valutazione della integrità e qualità degli acidi nucleici estratti al fine delle analisi biomolecolari successive specifiche per i vari target (ON).

Considerando anche quest'ultimo tipo di attività analitica, complessivamente nel corso del 2023 sono state effettuate da parte del Lab 34.462 analisi.

Si tratta di numeri notevoli con un sensibile aumento rispetto all'anno precedente (3.577 campioni e 7.449 analisi in più nel corso del 2023 rispetto al 2022) A maggior ragione è da rimarcare il considerevole lavoro svolto da parte di tutti coloro che, partecipando alle attività di laboratorio (anche parzialmente) che hanno contribuito a tale risultato nel corso del 2023.

Un altro aspetto importante da prendere in considerazione è il numero di organismi nocivi (ON) che sono stati indagati nel corso del 2022, pari a 134 oltre che le tecniche/protocolli biomolecolari utilizzate/i risultanti su 145 tipologie di campioni vegetali da 200 specie vegetali oggetto di indagine.

La tipologia di utenza relativa alle attività analitiche svolte.

Come si può notare, la maggior parte delle attività ha riguardato campioni provenienti dai vivai di operatori autorizzati all'emissione del passaporto delle piante.

Tipo Utente	Generale	% Totale
Autorizzati	1030	66,3
Non Autorizzati	96	6,2
Importatori	3	0,2
Altri Soggetti	1	0,1
Territorio	423	27,2

Tab. 2 – tipo utente

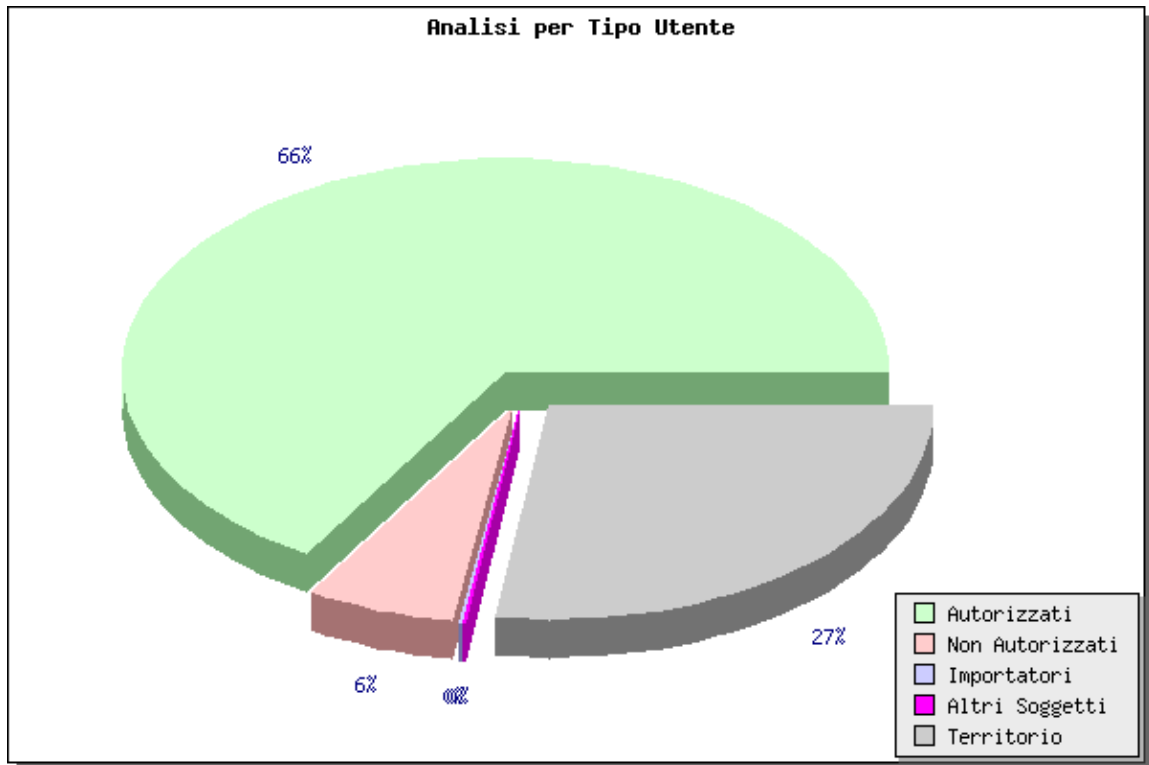


Fig 1 – Analisi per tipo utente (attività complessive del lab)

Come si può vedere in tabella, l'8.4% dei campioni pervenuti in lab è risultato positivo all'ON target oggetto di indagine.

Risultati		
Parametro	Generale	% Totale
Risultati Positivi	1557	8,4
Risultati Negativi	16696	90
Risultati Indeterminati	302	1,6

Tab. 3 – Risultati analitici

Nel 2023, in una ottica di qualità/miglioramento continuo, sono stati presi in considerazione anche tutti i risultati "nd" (non determinabili) a causa di non conformità relative alla matrice di partenza (deteriorata, secca, ecc.), oppure a difficoltà estrattive con verifiche di amplificabilità che non hanno dato esito valido, o ancora ad errori in sede di prelievo campioni e relativa assegnazione dei target (ON) di cui richiedere le verifiche analitiche.

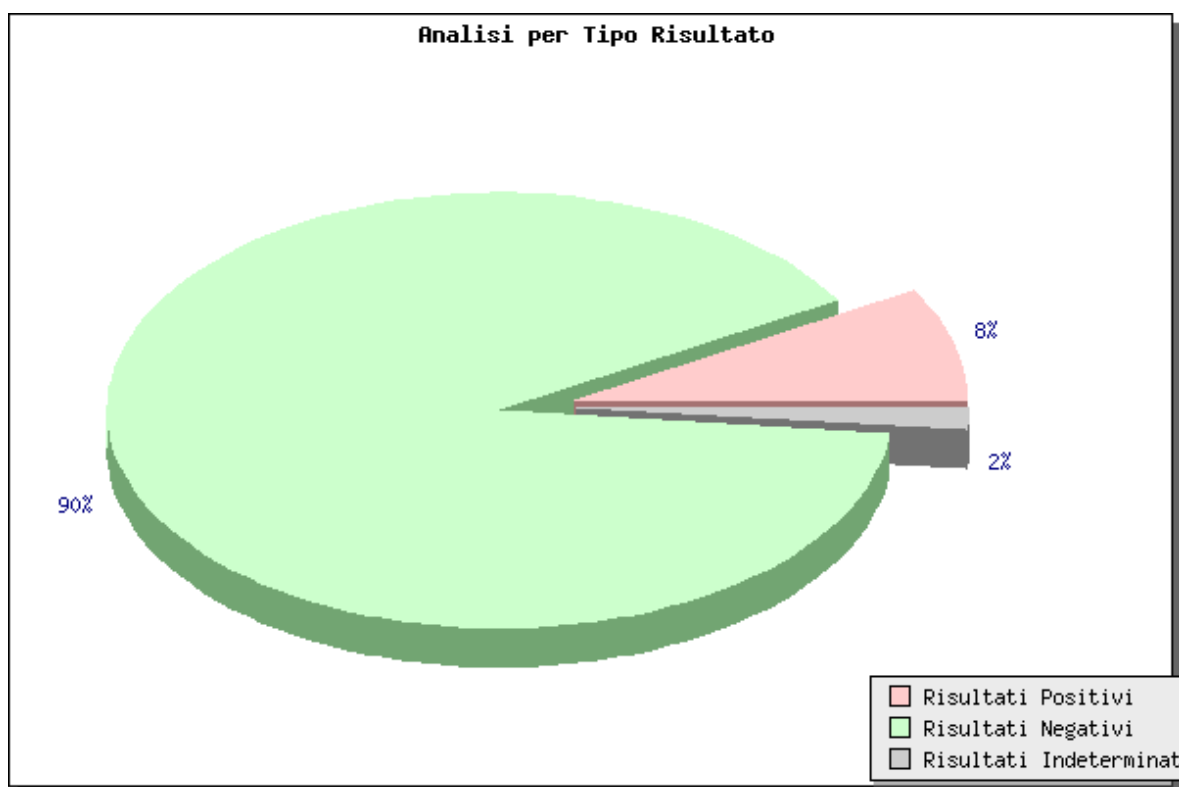


Fig 2 – Analisi per tipo risultato (attività complessive del lab)

Per fortuna si tratta di valori residuali rispetto ai totali. Costituiscono, comunque indicatori a livello qualitativo del servizio svolto sia livello di analisi sia a livello di prelievo in campo.

Di seguito una differenziazione in funzione del tipo di tecnica/ metodologia/protocollo utilizzati nel corso dell'anno per far fronte alla complessità delle analisi:

Tecnica Analisi	Generale	% Totale
PCR real-time SYBR Green	1068	5,8
PCR real-time Probe	16653	89,7
Amplificazione isoterma LAMP	20	0,1
PCR end point	812	4,4
Analisi Morfologica	2	0

Tab. 4 – Tecnica analitica

Dai dati si denota che quasi il 96% di tutte le attività è svolto tramite tecniche di Real Time PCR o qPCR con sonde TaqMan o in SybrGreen. Si tratta di tecniche complesse ma, allo stesso tempo, sensibili, specifiche e accurate per garantire un risultato analitico affidabile.

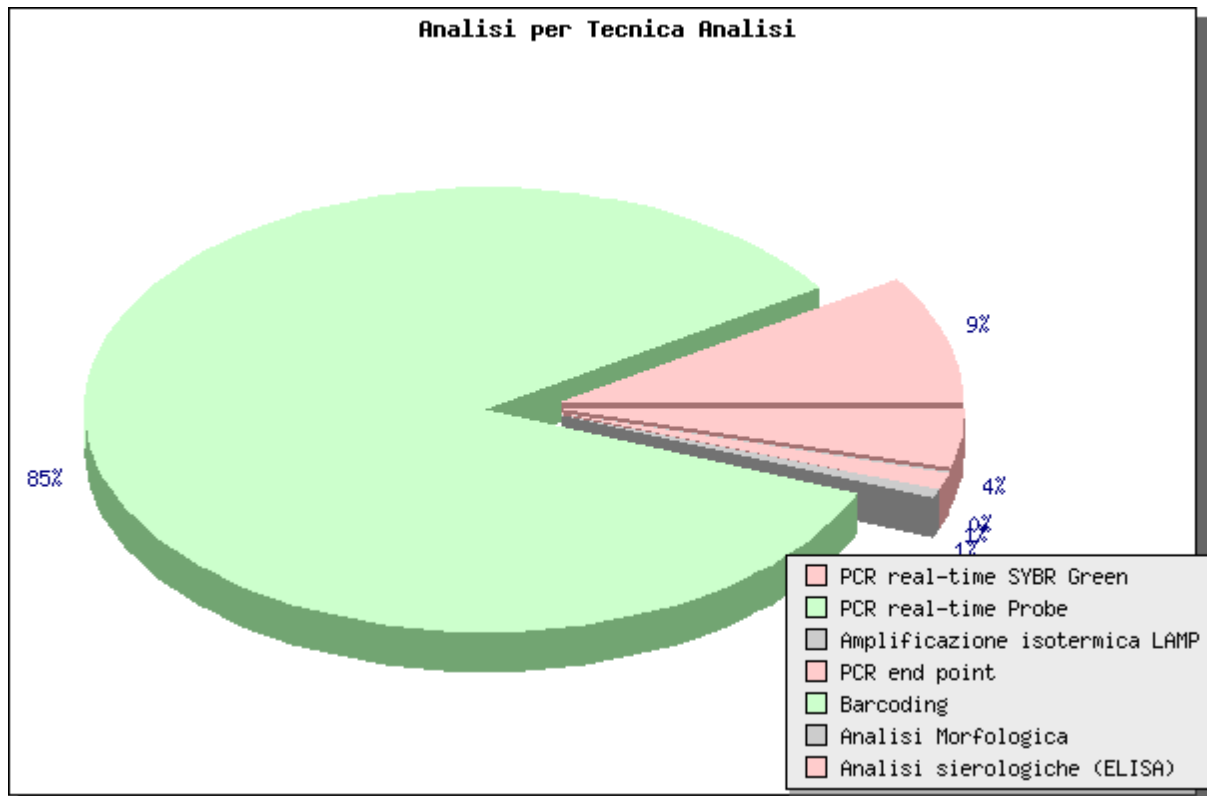


Fig 3 – analisi per tecnica (attività complessive del lab)

Analizzando i campioni pervenuti in lab in relazione alla specie vegetale oltre che per i vari ON di cui è stata richiesta o effettuata la verifica analitica si possono avere le seguenti rappresentazioni grafiche (Fig. 4 e 5) che danno un quadro di insieme esaustivo.

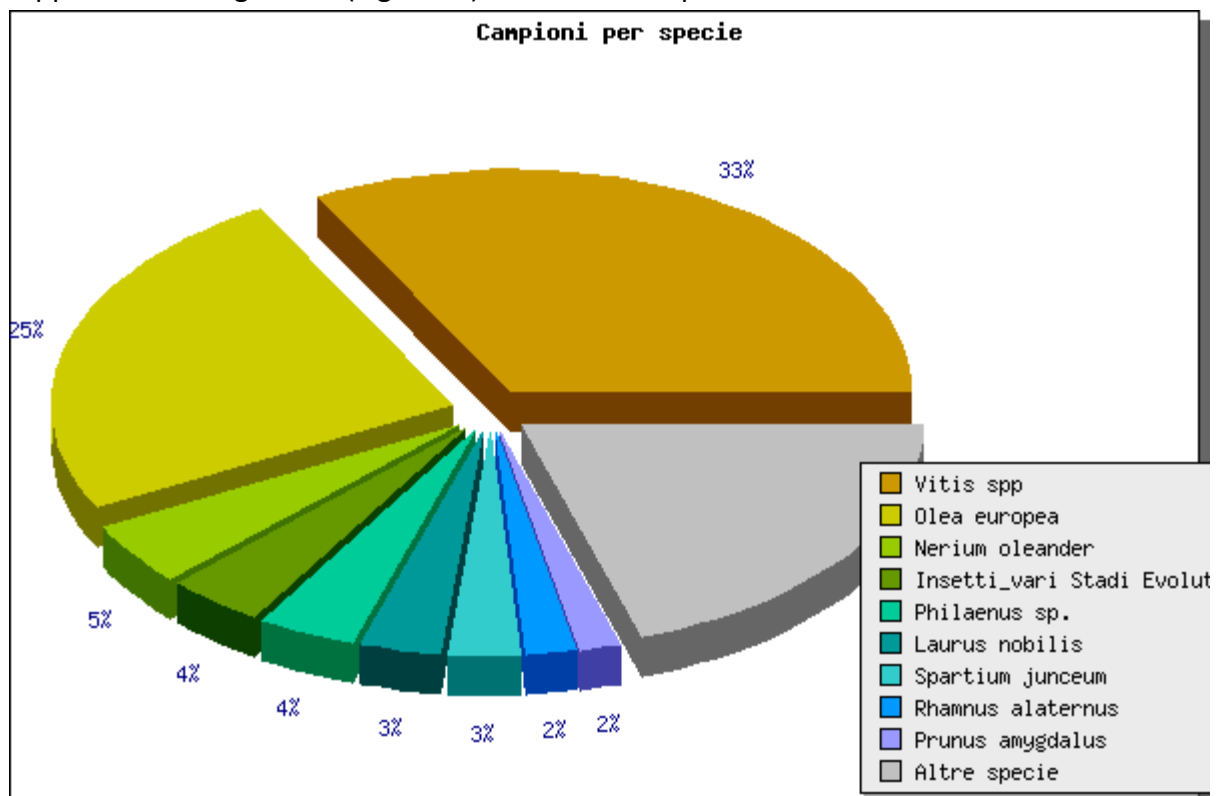


Fig. 4 - % campioni per specie (attività complessive del lab)

L'olivo e la vite sono le specie maggiormente rappresentate, anche in considerazione dell'importanza che tali specie assumono a livello regionale. Il gran numero di indagini è concentrato sulla ricerca di "Flavescenza Dorata" (Grapevine Flavescence Doree_EPPO), per la certificazione vivaistica del materiale prodotto nei vivai viticoli e, per quanto riguarda l'olivo, le indagini per *Xylella fastidiosa* in aree indenni ed in area delimitata.

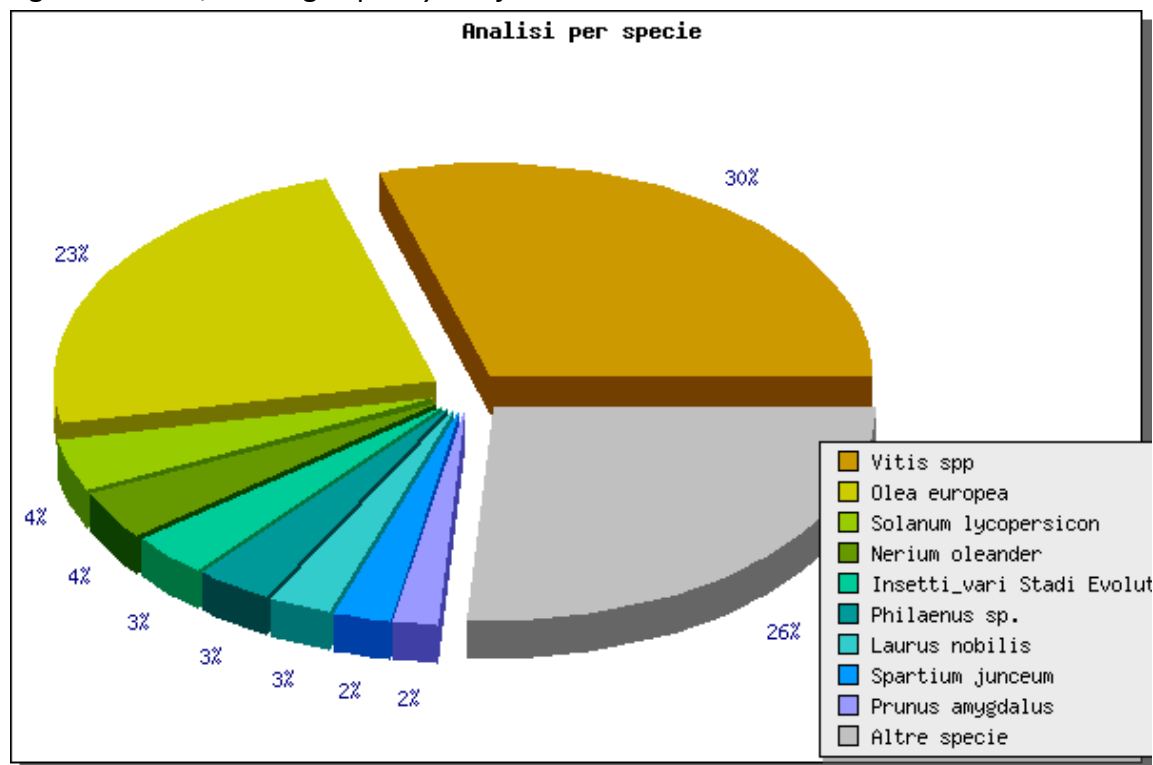


Fig. 5 - analisi per specie (attività complessive del lab)

Di seguito le tabelle ed i grafici relativi ai principali ON investigati nel 2023:

Patogeno	Analisi	Negativi	Positivi	Indeterminati
<i>Xylella fastidiosa</i>	9165	9079	83	3
Grapevine flavescence dorée phytoplasma	3211	2468	528	215
Candidatus phytoplasma solani	1969	1288	681	0
Citrus Tristeza Virus (CTV)	212	163	49	0
Tomato ring spot virus (ToRSV)	210	210	0	0
Arabis Mosaic virus (ArMV)	208	208	0	0
Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)	181	155	26	0
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	133	121	1	11
Candidatus liberibacter africanus	121	121	0	0
Candidatus liberibacter americanum	121	121	0	0
Candidatus liberibacter asiaticus	121	121	0	0
Cherry leaf roll virus (CLRv)	120	120	0	0
Strawberry latent ring spot virus (SLRSV)	120	120	0	0
Tomato leaf curl New Daehli Virus (ToLNDV)	119	119	0	0
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>savastanoi</i>	116	116	0	0
<i>Verticillium dahliae</i>	116	116	0	0
Grapevine leaf roll associated virus - 3 (GLRaV-3)	102	83	19	0

Patogeno	Analisi	Negativi	Positivi	Indeterminati
Plum pox virus (PPV)	101	101	0	0
Grapevine leaf roll associated virus - 1 (GLRaV-1)	100	94	6	0
Grapveine virus A (GVA)	99	90	9	0
American plum line pattern virus (APLPV)	97	97	0	0
Cherry rasp leaf virus (CRLV)	97	97	0	0
Peach mosaic virus (PCMV)	97	97	0	0
Peach rosette mosaic virus (PRMV)	97	97	0	0
Grapevine fan leaf virus (GFLV)	96	92	4	0
Grapevine red blotch associated virus	84	84	0	0
Phytoplasma phoenicium	72	72	0	0
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	64	64	0	0
Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	62	62	0	0
Aromia bungii	51	21	30	0
Erwinia amylovora	49	38	11	0
Ceratocystis platani	42	36	6	0
Grapevine fleck virus (GFkV)	39	39	0	0
Xanthomonas euvesicatoria pv euvesicatoria	35	32	3	0
Xanthomonas gardneri	35	35	0	0
Xanthomonas perforans	35	35	0	0
Xanthomonas vesicatoria	35	35	0	0
Potato spindle tuber viroid (PSTVd)	35	35	0	0
Phytophthora ramorum	30	21	8	1
Meloidogyne enterolobii	29	28	1	0
Globodera pallida	27	22	0	5
Globodera rostochiensis	26	22	0	4
Xanthomonas arboricola pv pruni	25	14	11	0
Trichodorus cedarus	21	7	14	0
Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus	20	14	0	6
Epitrix tuberis	20	4	0	16
Meloidogyne chitwoodi	20	15	0	5
Meloidogyne fallax	20	15	0	5
Pantoea stewartii	19	17	0	2
Synchytrium endobioticum	19	14	0	5
Pityophthorus juglandis	18	12	6	0
Clavibacter michiganensis subsp. Insidiosus	16	16	0	0
Pseudomonas syringae pv. morsprunorum	14	14	0	0
Pseudomonas syringae pv persicae	14	14	0	0
Pepino Mosaic virus (PepMV)	14	14	0	0
Arkansas Fig Closterovirus 1	13	13	0	0
Arkansas Fig Closterovirus 2	13	13	0	0
Fig badnavirus-1	13	0	13	0
Fig Cryptic virus 1	13	13	0	0
Fig fleck-associated virus	13	13	0	0
Fig mosaic virus	13	7	6	0
Phyllosticta citricarpa	13	8	5	0
Candidatus liberibacter solanacearum	12	7	0	5
Ralstonia solanacearum	12	7	0	5
Ripersiella hibisci	12	4	8	0
Meloidogyne graminicola	12	12	0	0
Citrus leaf blotch virus	12	12	0	0
Ralstonia syzygii	11	6	0	5
Xylophylus ampelinus	11	11	0	0
Aleurocanthus spiniferus	11	4	7	0
Radopholus similis	10	10	0	0

Patogeno	Analisi	Negativi	Positivi	Indeterminati
Xyleborinus saxesenii	9	9	0	0
Xylosandrus compactus	9	9	0	0
Xylosandrus crassiusculus	9	8	1	0
Ditylenchus dipsaci	9	9	0	0
Meloydogine incognita	9	9	0	0
Xiphinema index	9	9	0	0
Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV)	9	5	4	0
Geosmithia morbida	9	5	4	0
Pseudomonas syringae pv actinidiae	8	8	0	0
Xanthomonas axonopodis pv phaseoli	8	8	0	0
Xanthomonas axonopodis pv phaseoli var fuscans	8	8	0	0
Aleurocanthus camelliae	8	6	2	0
Aleurocanthus woglumi	8	8	0	0
Dendrolimus sibiricus	8	8	0	0
Popillia japonica	7	4	1	2
Bursaphelenchus xylophylus	7	5	2	0
Bactrocera dorsalis	5	5	0	0
Bactrocera zonata	5	5	0	0
Fig latent virus 1	5	5	0	0
Fig leaf mottle-associated virus 1	5	0	5	0
Fig leaf mottle-associated virus 2	5	5	0	0
Fig Leaf Mottle associated Virus 3	5	5	0	0
Fig mild mottle-associated virus	5	5	0	0
Phytophthora sp	5	5	0	0
Daktulosphaera vitifoliae	4	3	0	1
Cucumber Mosaic Virus (CMV)	4	4	0	0
Verticillium spp	4	4	0	0
Anoplophora chinensis	3	3	0	0
Ditylenchus destructor	3	3	0	0
Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)	3	3	0	0
Xanthomonas citri pv. aurantifolii	2	2	0	0
Anguina	2	2	0	0
Aphelenchoides besseyi	2	2	0	0
Aphelenchoides fragariae	2	2	0	0
Aphelenchoides ritzemabosi	2	2	0	0
Cactodera cacti	2	2	0	0
Longidorus	2	2	0	0
Meloidogyne sp	2	2	0	0
Pratylenchus sp	2	2	0	0
Ceratocystis fagacearum	2	2	0	0
Chryphonectria parasitica	2	2	0	0
Cronartium	2	0	0	2
Gibberella circinata	2	2	0	0
Tilletia indica	2	0	0	2
Candidatus phytoplasma pyri	1	1	0	0
Ips sexdentatus	1	1	0	0
Ips typographus	1	0	1	0
Planococcus longispinus	1	0	0	1
Thaumetopoea processionea	1	0	0	1
Meloidogyne arenaria	1	1	0	0
Universali per Nematodi	1	1	0	0
Tobacco mosaic virus (TMV)	1	1	0	0
Tobacco ringspot virus (TRSV)	1	1	0	0
Alternaria alternata	1	1	0	0

Patogeno	Analisi	Negativi	Positivi	Indeterminati
Armillariella mellea	1	0	1	0
Biscognauxia mediterranea	1	0	1	0
Botrytis aclada, allii e byssoidea	1	1	0	0
Eutypa lata	1	1	0	0
Heterobasidion annosum	1	1	0	0
Melampsora medusae	1	1	0	0
Pseudocercospora angolensis	1	1	0	0
Scirrhia acicola	1	1	0	0
Scirrhia pini	1	1	0	0

Tab. 5 – Organismi nocivi analizzati nel corso del 2023. Tali dati sono comprensivi anche delle varie prove interne effettuate per la ottimizzazione e validazione di protocolli diagnostici specifici per un dato organismo nocivo.

Dal punto di vista grafico:

Fig 6 – analisi per patogeno (analisi complessive del lab)

La distinzione delle analisi in funzione degli ON indagati evidenzia come le analisi per *Xylella fastidiosa* siano prevalenti rispetto alla totalità delle attività del lab.

Si tratta di numeri notevoli che hanno evidenziato un sensibile aumento rispetto all'anno precedente (3.577 campioni e 7.449 analisi in più nel corso del 2023 rispetto al 2022); tale incremento si è originato dall'aumento delle indagini del SFR e dall'aumento del personale tecnico dedicato alle attività analitiche. Ricordiamo che tutto ciò è avvenuto compatibilmente con il carico di lavoro finalizzato al mantenimento dell'accreditamento alla norma ISO 17025 del lab oltre che dalle attività di validazione per le nuove prove portate in accreditamento.

I prelievi dei campioni pervenuti in laboratorio nel corso del 2023 hanno avuto la seguente distribuzione territoriale.

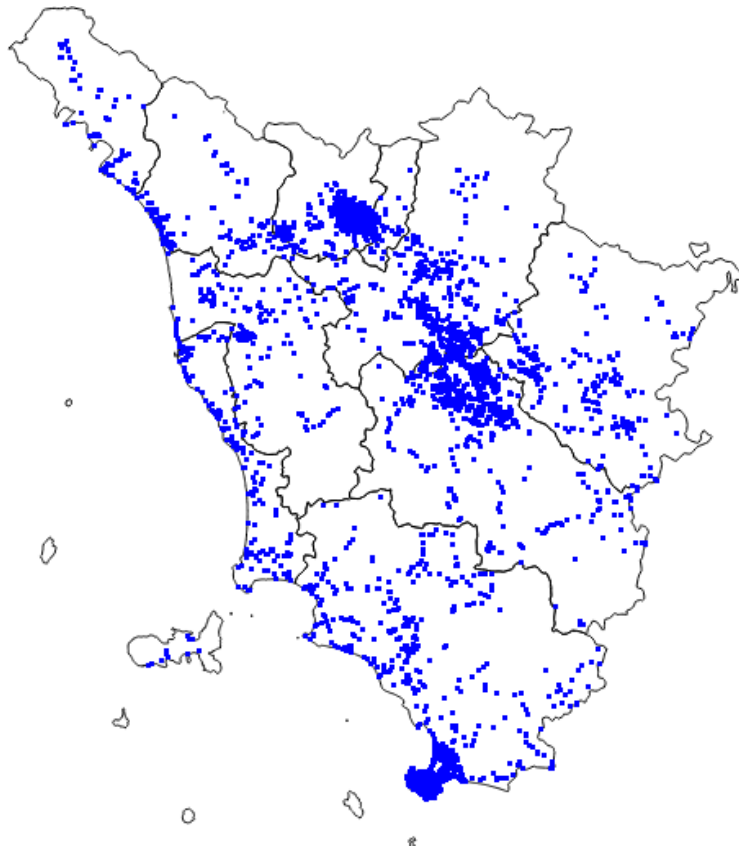


Fig. 7 - distribuzione territoriale dei campioni prelevati (blu)

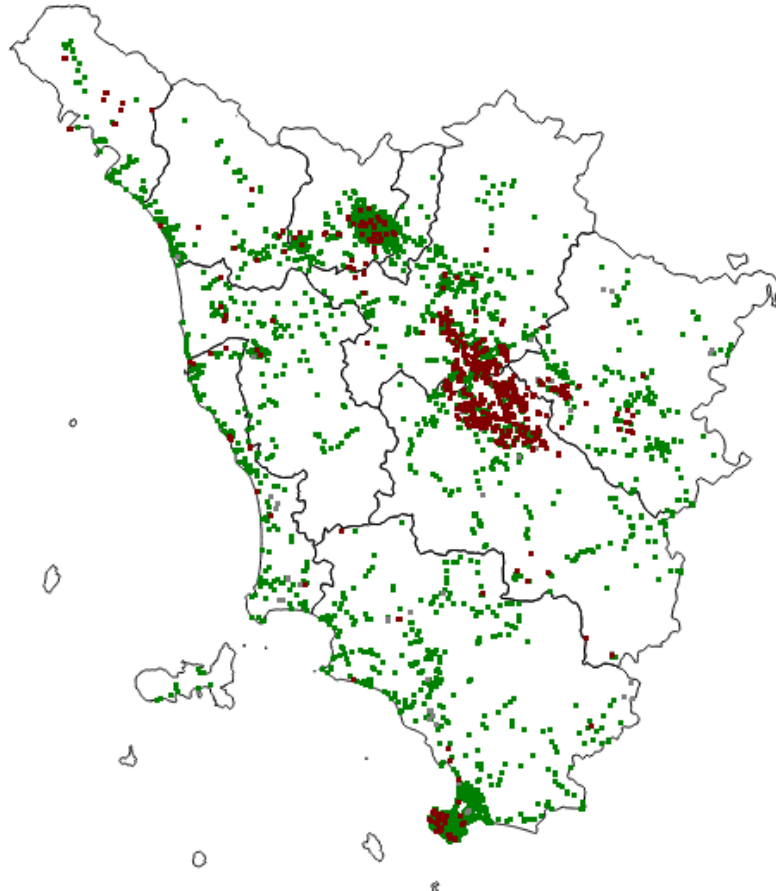


Fig. 8 distribuzione territoriale dei risultati analitici (verde = negativo, rosso = positivo).

Come si può osservare dalla distribuzione territoriale dei campioni prelevati, le aree maggiormente rappresentate sono costituite dal polo vivaistico della provincia di Pistoia, dal focolaio di *Xylella fastidiosa* del Monte Argentario (GR) e dalle aree interne del Chianti senese e fiorentino in relazione alle indagini per la verifica della presenza di *Grapevine Flavescence doree phytoplasma*.

Analizzando il carico di lavoro mensile possiamo schematizzare in questo modo la distribuzione del carico e intensità lavorativa del laboratorio SFR nel corso del 2023.

Mese	Richieste	Rapporti	Campioni	Analisi	Analisi Totali	Positivi
Gennaio	92	55	326	548	874	31
Febbraio	111	156	335	887	1222	23
Marzo	150	101	525	322	847	17
Aprile	58	96	360	521	881	7
Maggio	192	108	756	419	1175	23
Giugno	252	256	949	1484	2433	31
Luglio	378	191	1259	704	1963	26
Agosto	207	333	1013	1754	2767	43
Settembre	932	483	2817	2069	4886	78
Ottobre	588	700	3592	2705	6297	216
Novembre	737	721	2634	4333	6967	695

Tab. 6 – Intensità lavorativa nel corso del 2023

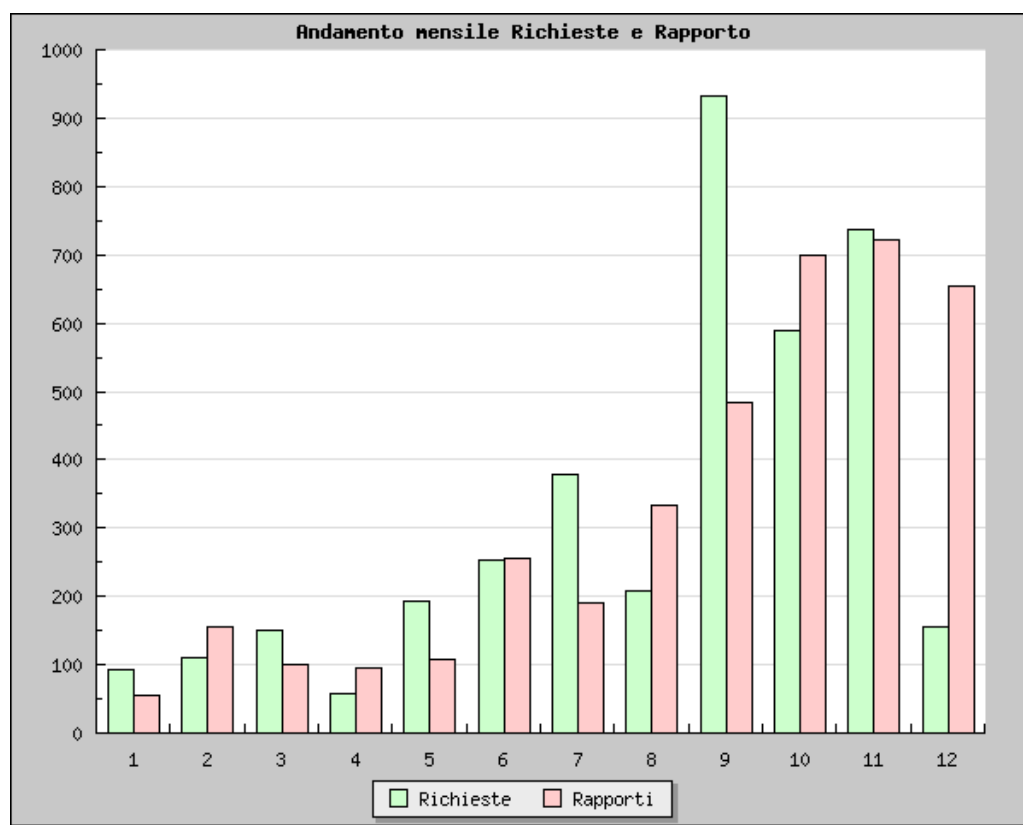


Fig. 10 - carico di lavoro per mese. Andamento mensile delle richieste di analisi e dei referti diagnostici emessi.

Fig. 11 - carico di lavoro per mese. Andamento mensile dei campioni pervenuti in laboratorio e numero di analisi effettuate e di analisi totali (con verifiche di amplificabilità), con il numero delle positività riscontrate.

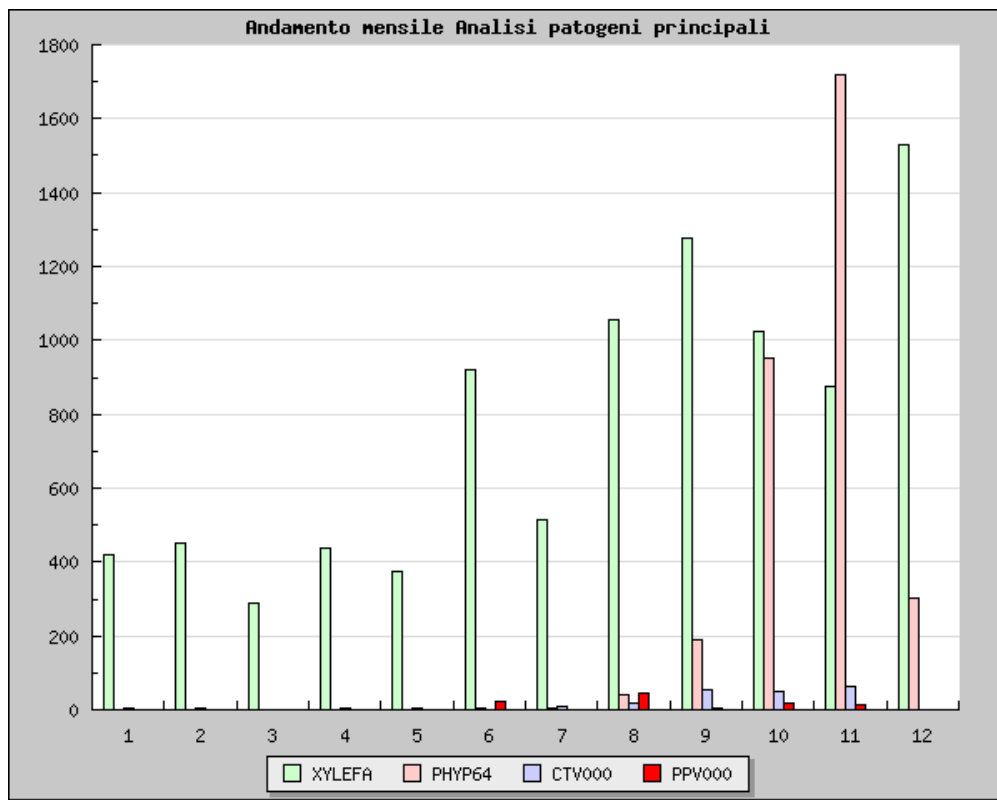


Fig. 12 -carico di lavoro per mese. Distribuzione mensile delle analisi effettuate per i principali ON oggetto di indagine da parte del SFR in Toscana. XYLEFA = Xylella fastidiosa, PHYP64 = Grapevine Flavescence dooree phytoplasma, CTV000 = Citrus Tristeza Virus, PPV000 = Plum Pox Virus.

Attività effettuate presso il Laboratorio di Guasticce (LI) del punto di entrata del porto di Livorno

Un altro sito del laboratorio del SFR si trova presso la sede di Guasticce - Collesalveti (LI), che svolge i controlli all'importazione nel punto di entrata del porto di Livorno.

Nel corso del 2023 anche questo laboratorio è stato accreditato in conformità della norma ISO 17025 per una prova diagnostica per *Xylella fastidiosa* ed è stato integrato nel laboratorio multi sito del Servizio Fitosanitario della Regione Toscana.

Il laboratorio nel corso del 2023 è stato completamente ristrutturato e potenziato con personale dedicato. La sezione dedicata alla biologia molecolare, con termociclatori, materiale ed attrezzature per estrazioni acidi nucleici, etc è operativa e funzionale alle attività previste ai fini dei controlli su piante e vegetali *Importati*.

Nel 2023 complessivamente sono state effettuate 83 analisi (relative a 45 campioni). Si tratta di numeri residuali rispetto a quelli afferenti al laboratorio della sede di Pistoia, ma tali valori sono destinati ad aumentare considerevolmente nel corso del 2024 alla luce dell'avvenuta ristrutturazione oltre che dell'accreditamento ISO 17025 da parte della sede di Guasticce – Collesalveti (LI).

Serie Storiche delle attività di Diagnostica Fitopatologia del Laboratorio - periodo 2013-2023

Per evidenziare la dimensione delle attività svolte dal laboratorio nel corso degli ultimi 11 anni, a partire dal 2013, sono stati messi a confronto dati annuali più significativi, così rappresentati:

Anno	Richieste Ricevute	Campioni processati	Analisi Effettuate
2013	564	2.036	2.036
2014	559	4.216	4.224
2015	1.451	10.193	10.520
2016	1.238	6.591	6.611
2017	2.214	13.559	29.236
2018	2.113	15.974	25.372
2019	4.944	21.708	45.009
2020	4.283	16.854	38.730
2021	3.668	11.627	27.827
2022	2.818	11.530	27.013
2023	3.853	15.107	34.462

Tab. 7 – serie storica di richieste ricevute, campioni processati e analisi effettuate

L'andamento dei campioni lavorati e delle analisi effettuate dà un'idea di come l'attività del laboratorio si è evoluta negli ultimi 11 anni:

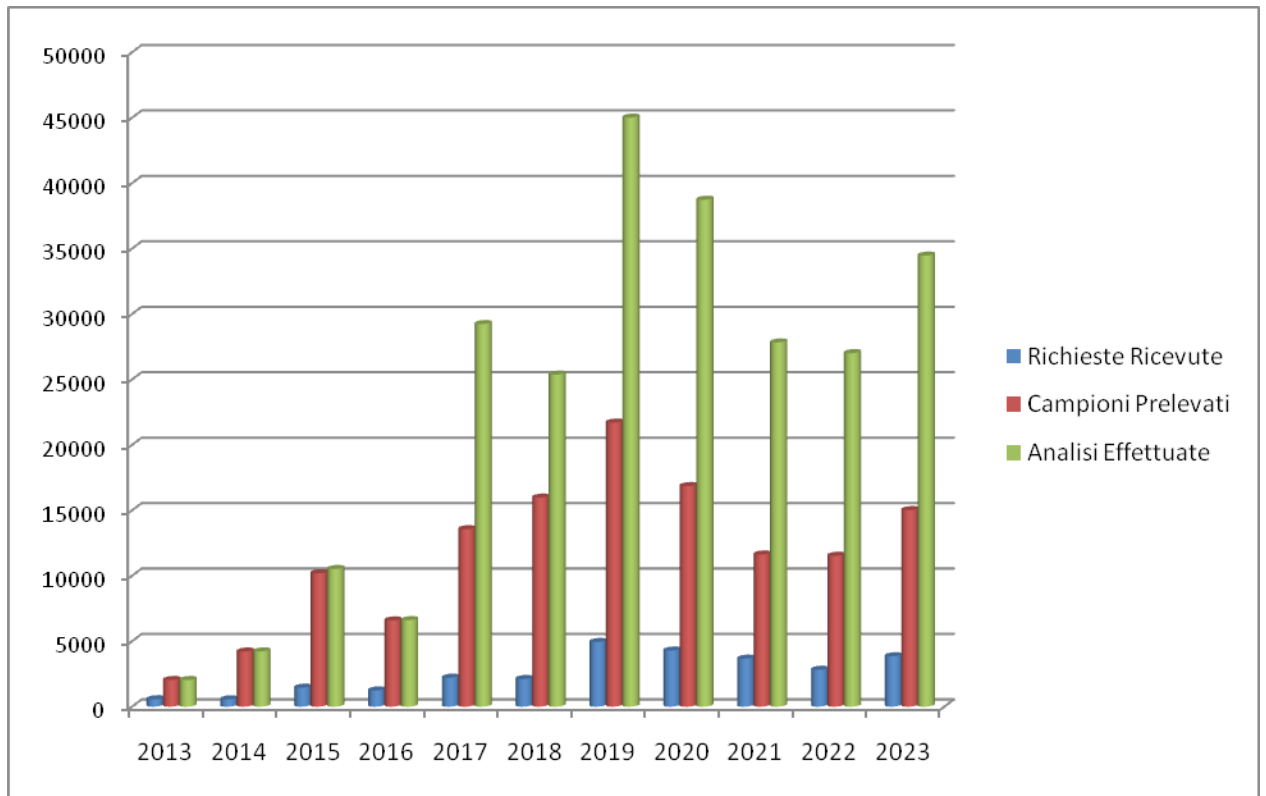


Fig. 13 – rappresentazione grafica della serie storica di richieste ricevute, campioni processati e analisi effettuate

Collaborazioni e Convenzioni con altri Enti e Istituzioni Scientifiche

Nel corso del 2023 sono proseguite le collaborazioni a carattere scientifico tra il laboratorio del Servizio Fitosanitario della Regione Toscana ed alcuni enti pubblici di ricerca con cui il lab ha da tempo istituito accordi di collaborazione.

Il laboratorio del SFR è coinvolto per quel che concerne gli aspetti diagnostici e/o di conferma analitica. Le tematiche legate alla diagnostica fitopatologia che sono state oggetto di collaborazione/sperimentazione nel corso del 2023, possono essere così descritte.

1. Università di Pisa

- Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali Università di Pisa,) per attività analitiche volte alla diagnosi dei virus delle colture florovivaistiche, della vite, dell'Olivo oltre che dei Fitoplasmi della vite.
- Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali Università di Pisa, per attività analitiche volte alla diagnosi dei virus della vite inclusi nei protocolli di certificazione vivaistica della vite ai sensi del DM 7/7/2006.
- Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali Università di Pisa, per collaborazioni in merito alla diagnosi biomolecolare di *Aleurocanthus sp*, *Anastrepha ludens*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera latifrons*, *Agri-lus planipennis*, *Paysandisia archon*, *Rynchophorus ferrugineus*, et c.

2. Università di Firenze

- dipartimento di Biotecnologie agrarie per attività analitiche legate alla batteriologia sia di tipo classico "morfologico" sia legate alla biologia molecolare, volte alla diagnosi di *Xylella fastidiosa*.
- dipartimento di Biotecnologie agrarie per attività analitiche legate alla validazione di metodi estrattivi innovativi, performanti e rapidi da diverse matrici vegetali finalizzate alla diagnosi di *Xylella fastidiosa*.
- dipartimento di Biotecnologie agrarie per attività analitiche legate alla validazione di metodi estrattivi automatici con l'ausilio di estrattori automatici, performanti e rapidi da diverse matrici vegetali finalizzate alla diagnosi di *Xylella fastidiosa*.
- dipartimento di Biotecnologie agrarie per attività analitiche legate alla diagnosi di *Pseudomonas syringae pv actinidiae* e *Pseudomonas syringae pv viridiflava* attraverso prove sperimentali su aspetti epidemiologici e diagnostici.

- dipartimento di Biotecnologie agrarie per attività analitiche sia di tipo classico “morfologico” sia di biologia molecolare volte alla diagnosi dei principali funghi agenti di marciumi/necrosi al colletto delle piante ornamentali da vivaio (*Phytophthora* sp).
- dipartimento di Biotecnologie agrarie per collaborazione volta alla diagnosi di *Geosmithia morbida*, *Pythiophthorus juglandis*, *Elsinoe australis*, *E. fawcettii*.
- dipartimento di entomologia forestale per collaborazione volta alla diagnosi di *Agriilus planipennis*, *Neophilaenus campestris*, *Philaenus italosignus*, *Philaenus spumarius*, *Ips sexdentatus* e *Zeuzera pyrina*.
- Università di Firenze dipartimento di entomologia agraria per collaborazioni scientifiche legate alla diagnosi di *Bactrocera dorsalis*, *Neophilaenus campestris*, *Philaenus spumarius*, *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha ludens*.

3. CREA-DC di Roma

- Per attività analitiche di biologia molecolare volte alla diagnosi di ToBRFV.
- Per attività analitiche di biologia molecolare volte alla diagnosi di *Xanthomonas citri* pv *citri* e *Xanthomonas citri* pv *aurantifolii*.
- Per attività analitiche di biologia molecolare volte alla predisposizione di metodi *multiplex* per la diagnosi di *Xylella fastidiosa*

4. CREA-DC di Firenze (Cascine del Riccio)

- Per attività comparative relative a metodi estrattivi da rosure legnose di *Aromia bungii*
- Per attività analitiche di biologia molecolare volte alla diagnosi di *Monochamus* sp (europei) da rosura, di *Anomala orientalis* e di *Phloesinus aubei*.
- per attività volte alla diagnosi e identificazione “genetica” di alcuni importanti insetti xilofagi o di fitofagi di temuta introduzione in Italia
- per attività volte alla diagnosi e identificazione “genetica” di alcuni importanti insetti vettori della *Xylella fastidiosa*.

5. Regione Piemonte – Laboratorio Servizio Fitosanitario

- Per attività comparative relative a metodi estrattivi da rosure legnose di *Aromia bungii*

6. Regione Lombardia – laboratorio Servizio Fitosanitario

- Laboratorio del Servizio Fitosanitario della Regione Lombardia per attività volte alla diagnosi e identificazione “genetica” di alcuni importanti insetti xilofagi (*Xylotrechus chinensis*) di nuova introduzione in Italia.
- Laboratorio del Servizio Fitosanitario della Regione Lombardia per attività analitiche legate alla validazione di metodi estrattivi innovativi, performanti e rapidi da diverse matrici vegetali ed in particolare sulle rosure di *Aromia bungii*.

7. CNR di Sesto Fiorentino (FI)

- per attività di diagnosi in campo, oltre che di confronti interlaboratori, mediante reazioni isotermiche (LAMP) per la diagnosi di vari organismi nocivi alle piante.

8. CNR di Napoli (NA)

- collaborazioni per attività di *screening* da campo per la diagnosi di *Aleurocanthus spiniferus*, *Bactrocera dorsalis*, *Ceratitis FARQ* e *Ripersiella hibiscii* in Real Time PCR (probe e SybrGreen) oltre che LAMP.

9. Università di Portici (NA)

- Per attività volte alla diagnosi e *screening* da campo per la diagnosi di *Aromia bungii* da rosura in Real Time PCR (probe e SybrGreen) oltre che LAMP. Quest’anno si sono attivate collaborazioni anche in relazione alla diagnosi di *Xyleborinus saxesenii* e *Anisandrus dispar*.
- Per attività analitiche legate alla validazione di metodi estrattivi innovativi, performanti e rapidi da diverse matrici vegetali incentrate comunque sulle rosure di *Aromia bungii*, *Anoplophora chinensis* e *glabripennis*

10. Laboratorio dell’istituto “Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants”, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

- per attività di collaborazione per la diagnosi da “tracce biologiche” di *Agrilus planipennis* ed *A. anxius*.

11. Università della California (USA), Department of Entomology, USA

- per attività di collaborazione relativamente alla diagnosi biomolecolare indiretta di *Agrilus auroguttatus* da insetti adulti, larve e rosure legonse (“tracce biologiche”).

12. Animal and Plant Health Inspection Service U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA.APHIS)

- per attività di collaborazione relativamente alla diagnosi biomolecolare indiretta di *Agrilus planipennis* da insetti adulti, larve e rosure legnose (“tracce biologiche”).

13. Università di Catania (CT)

- Attività di collaborazione in merito alla diagnosi di *Aleurocanthus camelliae* e *A. spiniferus*.
- Attività di collaborazione in merito alla diagnosi di *Bemisia tabaci* e *Liriomyza* sp. Confronti Interlaboratori e Ring Test con Enti/Istituzioni Scientifiche

Il laboratorio del SFR nel corso del 2023 ha effettuato diversi confronti interlaboratori (come anticipato in alcuni casi precedentemente) con istituzioni scientifiche per tematiche legate alla diagnostica fitopatologica.

1. Proficiency test per la diagnosi di *Anoplophora chinensis*, *Anoplophora glabripennis* a cura del laboratorio nazionale di riferimento del CREA-DC, Roma, Italy. CREA-DC_PT2023_3_ANOLCN_ANOLGL
2. Proficiency test per la diagnosi di *Fusarium circinatum* a cura del laboratorio nazionale di riferimento del CREA-DC, Roma, Italy. CREA-DC_PT2023_02_GIBBCI
3. Proficiency test per la diagnosi di *Xylella fastidiosa* a cura del laboratorio nazionale di riferimento del CREA-DC, Roma, Italy. CREA-DC_PT2023_04_Xf

Metodiche e Protocolli Diagnostici del Laboratorio del SFR

Nel corso del 2023, al pari degli ultimi anni, è stato svolto un notevole lavoro di validazione e ottimizzazione di metodiche e protocolli operativi di biologia molecolare per la diagnosi dei principali patogeni dei vegetali da parte del personale tecnico del laboratorio.

Nel corso del 2023 il laboratorio ha sviluppato/ottimizzato ulteriori metodi interessando ulteriori target (Organismi nocivi) portando a **1.343 metodi/protocolli diagnostici** per **541 Organismi Nocivi** di quarantena e/o di interesse fitosanitario, potenzialmente oggetto di verifiche analitiche da parte del laboratorio.

Costi e Investimenti per il Laboratorio

In relazione all'attività svolta nel corso del 2023 sono stati sostenuti costi legati ai beni di consumo (reagenti, plastiche, materiale di consumo vario, ecc.) pari a **168.854,43** euro; i costi per i servizi sono stati pari a **89.569,81** euro, mentre **92.270,82** euro sono stati investiti per strumenti ed arredi. L'aumento dei costi sostenuti per i servizi è dovuto sia all'aumento delle attività complessive del laboratorio sia agli adeguamenti necessari per l'accreditamento ISO 17025.

Complessivamente nel corso del 2023 per il laboratorio del SFR Toscana sono stati spesi **350.694,82 euro**.

Pubblicazioni

Nel corso del 2023, i tecnici del laboratorio hanno collaborato con diversi centri di ricerca in attività di sperimentazione finalizzate alla pubblicazione di note divulgative, articoli scientifici di interesse fitosanitario. Nel dettaglio:

1. **Identification of the ambrosia beetle. *Anisandrus dispar* (Fabricius) (Coleoptera Curculionidae Scolytinae) using TaqMan probe assay on biological samples.** Rizzo D, D'Agostino A, Stabile I, Ranaldi C, Marrucci A, Zubieta CG, Da Lio D, Bartolini L, Pennacchio F, Rossi E, Garonna AP (2023). *iForest* 16: 182-187. – doi: 10.3832/ifer4287-016 [online 2023-06-30].
2. **A duplex real-time PCR with TaqMan probes for the distinction of *Anoplophora chinensis* (Forster) and *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) on different biological matrices.** Domenico Rizzo, Daniele Da Lio, Claudia Gabriela Zubieta, Chiara Ranaldi, Andrea Marrucci, Igor Stabile, Andrea d'Agostino, Linda Bartolini, Carmelo Rapisarda, Fabrizio Pennacchio, Elisabetta Rossi. First published: 05 October 2023. <https://doi.org/10.1111/epp.12940>
3. **Updates on the invasive oak lace bug, *Corythucha arcuata*, in Italy.** Matteo BRACALINI, Domenico RIZZO, Tiziana PANZAVOLTA. *Bulletin of Insectology* 76 (1): 37-43, 2023. ISSN 1721-8861. E ISSN 2283-0332
4. Pucci, N.; Scala, V.; Cesari, E.; Crosara, V.; Fiorani, R.; L' Aurora, A.; Lucchesi, S.; Tatulli, G.; Ciarroni, S.; De Amicis, F.; et al. **An Inter-Laboratory Comparative Study on the Influence of Reagents to Perform the Identification of the *Xylella fastidiosa* Subspecies Using Tetraplex Real Time PCR.** *Horticulturae* 2023, 9, 1053. <https://doi.org/10.3390/horticulturae909105>.
5. S. Campigli, S. Luti, T. Martellini, D. Rizzo, L. Bartolini, C. Carrai, J. Baskarathevan, L. Ghelardini, F. Peduto Hand, G. Marchi (2023). **TaqMan qPCR assays improve *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 and *P. viridiflava* (PG07) detection within the *Pseudomonas* sp. community of kiwifruit.** *Phytopathologia Mediterranea* 62(1): 95-114. doi: 10.36253/phyto-14400.
6. **First Report of *Xanthomonas hydrangeae* Causing Leaf Spot on Oakleaf Hydrangea (*Hydrangea quercifolia*) in Tuscany (Italy)** Sara Campigli, Domenico Rizzo. *Plant Disease*. 2023 Feb 1. doi: 10.1094/PDIS-11-22-2607-PDN. Online ahead of print. PMID: 36724025. DOI: 10.1094/PDIS-11-22-2607-PDN.

Conclusioni

In considerazione di quanto esposto, risulta evidente che il carico di lavoro dell'anno appena trascorso per il laboratorio è stato notevolmente superiore agli ultimi anni. Il lavoro legato all'adeguamento del laboratorio ai requisiti richiesti dalla norma ISO/IEC 17025 ha determinato un ulteriore appesantimento delle attività.

I risultati emersi, anche in relazione al carico di lavoro di cui sopra, sono stati possibili grazie alla collaborazione e alla sinergia di tutto il personale del SFR, all'affidamento di alcune attività a soggetti esterni per ottimizzare parte delle lavorazioni propedeutiche alle analisi (preparazione delle aliquote dai campioni vegetali) e allo sviluppo del software gestionale delle attività del laboratorio.

L'anno appena trascorso ha comunque fatto emergere alcune criticità per il laboratorio che sarà opportuno affrontare nel corso dei prossimi anni, investendo risorse in particolare per la ottimizzazione dei processi di analisi in funzione delle tipologie di matrici potenziali, delle attrezzature, delle infrastrutture e del personale per eseguire le attività nel rispetto degli standard sempre più elevati richiesti dal Reg. 625/2017.

Allegati

Tabella 1- Elenco completo delle specie oggetto d'indagine nel 2023 dal Laboratorio SFR

Specie	Campiomi	Analisi	Negativi	Positivi	Indet.
Vitis spp	4979	5504	4097	1214	193
Olea europea (Olivo)	3733	4343	4341	2	0
Nerium oleander (Oleandro)	690	691	688	2	1
Insetti_vari Stadi Evolutivi	596	601	590	11	0
Philaenus sp.	590	590	566	24	0
Laurus nobilis	493	494	489	4	1
Spartium junceum	430	430	408	22	0
Rhamnus alaternus	308	309	294	15	0
Prunus amygdalus (Mandorlo)	248	344	342	2	0
Vitis vinifera	208	214	163	28	23
Rosmarinus officinalis	187	187	187	0	0
Solanum lycopersicon (pomodoro)	158	723	686	26	11
Prunus laurocerasus	127	161	149	12	0
Mirto	112	112	112	0	0
Cistus creticus	107	107	107	0	0
Phillyrea angustifolia	98	98	98	0	0
Quercus ilex	97	111	109	0	2
Neophilaenus sp.	95	95	95	0	0
Asparagus acutifolius	89	89	89	0	0
Citrus spp	82	306	289	17	0
Lavandula sp	81	81	81	0	0
Ficus carica	74	146	121	25	0
Prunus lusitanica	55	55	55	0	0
Prunus armeniaca (Albicocco)	52	168	146	22	0
Limone	46	112	105	7	0
Citrus x nobilis	44	48	21	27	0
Platanus spp	44	44	38	6	0
Acer sp	43	43	43	0	0
Cistus monspeliensis	41	41	41	0	0
Quercus suber	39	44	41	1	2
Varie	38	89	83	6	0
Polygala myrtifolia	35	35	35	0	0
Cercis siliquastrum	34	34	34	0	0
Rosa spp	33	33	31	2	0
Ilex sp.	32	32	18	14	0
Liquidambar sp.	32	32	32	0	0
Prunus domestica	31	140	134	6	0
Eucaliptus spp	28	28	28	0	0
Magnolia grandiflora	28	28	28	0	0
Calicotome villosa	26	26	23	3	0
Viburnum tinus	26	26	18	8	0
Ficus sp.	23	23	22	1	0
Prunus avium (Ciliegio)	23	155	155	0	0
Rosmarinus sp.	23	23	23	0	0
Pistacia lentiscus	21	21	21	0	0
Clematis vitalba	20	32	31	1	0
Solanum tuberosum	20	111	50	0	61
Citrus sinensis	19	69	67	2	0

Specie	Campiomi	Analisi	Negativi	Positivi	Indet.
Ilex aquifolium	19	19	19	0	0
Zea mays (Mais)	19	19	17	0	2
Prunus persica	18	124	124	0	0
Capsicum annuum (Peperone)	17	99	95	4	0
Juglans nigra	16	50	40	10	0
Medicago sativa (Erba medica)	16	18	18	0	0
Lagerstroemia sp.	15	15	15	0	0
Prunus spp	15	111	110	1	0
Arbutus unedo	14	14	14	0	0
Crataegus spp	13	13	11	2	0
Lavandula dentata	13	13	13	0	0
Lonicera sp.	13	13	13	0	0
Malus spp	13	13	13	0	0
Viburnum sp.	13	13	13	0	0
Lavandula angustifolia	12	12	12	0	0
Oryza sativa	12	12	12	0	0
Prunus pissardi	12	20	20	0	0
Acacia dealbata	11	11	11	0	0
Pyrus communis	11	11	5	6	0
Quercus spp	10	10	10	0	0
Cytisus scoparius	9	9	9	0	0
Prunus serrulata	9	73	73	0	0
Robinia sp.	9	9	9	0	0
Rosmarinus officinalis var. prostrata	9	9	9	0	0
Trachelospermum jasminoides	9	9	4	5	0
Actinidiae spp	8	10	10	0	0
Juniperus spp	8	10	10	0	0
Phaseolus vulgaris	8	16	16	0	0
Phillyrea latifolia	8	8	8	0	0
Pittosporum sp.	8	8	8	0	0
Citrus paradisi	7	19	18	1	0
Helichrysum italicum	7	7	6	0	1
Lagerstroemia indica	7	7	7	0	0
Callistemon sp.	6	6	6	0	0
Capsicum spp	6	36	36	0	0
Cistus salviifolius	6	6	6	0	0
Citrus reticulata	6	30	30	0	0
Fortunella spp	6	30	30	0	0
Malus domestica	6	6	4	2	0
Pelargonium sp.	6	6	6	0	0
Pyrus spp	6	6	6	0	0
Rovo	6	6	6	0	0
Rubus sp.	6	6	6	0	0
Clematis flammula	5	5	5	0	0
Morus sp.	5	5	5	0	0
Punica granatum	5	5	5	0	0
Rosa canina	5	5	5	0	0
Sedum sp.	5	5	5	0	0
Sixalix atropurpurea	5	5	5	0	0
Allium sp.	4	6	6	0	0
Asparagus densiflorus	4	4	4	0	0
Cistus spp	4	4	4	0	0
Citrus bergamia	4	20	20	0	0
Citrus medica	4	20	20	0	0

Specie	Campiomi	Analisi	Negativi	Positivi	Indet.
Fatsia sp.	4	10	6	4	0
Fraxinus ornus	4	4	4	0	0
Limbarda crithmoides	4	4	2	0	2
Pittosporum	4	4	4	0	0
Teucrium fruticans	4	4	4	0	0
Aralia sp	3	9	6	3	0
Camellia spp	3	16	14	2	0
Chamaerops humilis	3	3	0	3	0
Citrus limetta	3	15	15	0	0
Citysus spp	3	3	3	0	0
Elaeagnus	3	3	3	0	0
Elaeagnus angustifolia	3	3	3	0	0
Elaeagnus sp.	3	3	3	0	0
Eriobotrya sp.	3	3	2	1	0
Euonymus sp.	3	12	11	0	1
Ginkgo biloba	3	3	3	0	0
Hibiscus spp	3	3	3	0	0
Inula sp.	3	3	3	0	0
Magnolia sp.	3	12	12	0	0
Pinus spp	3	15	15	0	0
Poncirus spp	3	15	15	0	0
Salvia sp.	3	3	3	0	0
Acer campestre	2	2	2	0	0
Allium ampeloprasum	2	4	4	0	0
Brassica sp.	2	4	4	0	0
Citrus aurantium	2	6	6	0	0
Citrus australasica	2	10	10	0	0
Citrus myrtifolia	2	10	10	0	0
Cotoneaster spp	2	2	2	0	0
Cucurbita pepo (Zucchino)	2	2	2	0	0
Erigeron canadensis	2	2	2	0	0
Euphorbia sp.	2	2	2	0	0
Globularia alypum	2	2	2	0	0
Ligustrum sp.	2	2	2	0	0
Lonicera pileata	2	2	2	0	0
Osteospermum	2	2	2	0	0
Phillyrea sp.	2	2	2	0	0
Picea spp	2	2	1	1	0
Pyracantha spp	2	2	2	0	0
Quercus robur	2	2	2	0	0
Ribes idaeus	2	2	2	0	0
Salix sp.	2	2	2	0	0
Sorbus spp	2	2	2	0	0
Triticum durum	2	2	0	0	2
Vinca major	2	2	2	0	0
Westringia fruticosa	2	2	2	0	0
Acacia saligna	1	1	1	0	0
Acer pseudoplatanus	1	1	1	0	0
Allium cepa	1	2	2	0	0
Amelanchier spp	1	1	1	0	0
Arbutus spp	1	1	1	0	0
Artemisia sp.	1	1	1	0	0
Beaucarnea sp.	1	1	1	0	0
Calicotome spinosa	1	1	1	0	0

Specie	Campiomi	Analisi	Negativi	Positivi	Indet.
Castanea sativa	1	1	1	0	0
Citrus macrophylla	1	5	5	0	0
Citrus maxima	1	5	5	0	0
Citrus mitis	1	5	5	0	0
Convolvulus cneorum	1	1	1	0	0
Coronilla glauca	1	1	1	0	0
Cucumis sativus	1	1	1	0	0
Cucurbita sp	1	1	1	0	0
Cupressus spp	1	10	10	0	0
Cytisus racemosus	1	1	1	0	0
Daphne	1	1	1	0	0
Euonymus alatus	1	1	1	0	0
Fraxinus excelsior	1	1	1	0	0
Fraxinus spp	1	1	1	0	0
Genista sp.	1	1	1	0	0
Grevillea sp.	1	1	1	0	0
Jacaranda mimosifolia	1	1	1	0	0
Juglans regia	1	2	1	1	0
Juglans sp.	1	2	2	0	0
Ligustrum lucidum	1	1	1	0	0
mirabolano	1	1	1	0	0
Myoporum insulare	1	1	1	0	0
Nandina domestica	1	1	1	0	0
Nicotiana tabacum	1	1	1	0	0
Paliurus spina-christi	1	1	1	0	0
Parthenocissus tricuspidata (vite americana)	1	2	2	0	0
Pinus halepensis	1	1	1	0	0
Pinus nigra	1	1	1	0	0
Pinus pinea	1	2	1	1	0
Pistacia sp.	1	1	1	0	0
Populus spp	1	1	1	0	0
Prunus spinosa	1	1	1	0	0
Quercus cerris	1	1	1	0	0
Quercus pubescens	1	1	1	0	0
Rhamnus sp.	1	1	1	0	0
Solanum melongena	1	2	2	0	0
Spinacia oleracea	1	1	1	0	0
Strelitzia reginae	1	1	1	0	0
Teucrium sp.	1	1	1	0	0
Vinca minor	1	1	1	0	0
Vinca sp.	1	1	1	0	0
Westringia sp.	1	1	1	0	0
Wisteria sp	1	1	1	0	0
Yucca sp.	1	1	1	0	0