

Linee guida per ispezione e campionamento nell'area delimitata (zone infette e zona cuscinetto) del focolaio di Xylella fastidiosa di Monte Argentario (GR)

Versione 1.0 del 02/04/2019

Indice

1	Introduzione.....	2
2	Delimitazioni.....	3
3	Obiettivi delle ispezioni e del campionamento.....	3
4	Oggetto delle ispezioni e del campionamento.....	3
5	Metodologie di ispezione e campionamento da adottare nella zona infetta.....	4
5.1	Campionamento nella prima fase di eradicazione.....	4
5.2	Ispezione visiva e campionamento in zona infetta.....	4
5.3	Ambito territoriale delle ispezioni visive e campionamento.....	5
5.4	Personale coinvolto nelle ispezioni visive e campionamento.....	5
5.5	Preparazione delle ispezioni.....	6
5.6	Definizione delle sub unità da ispezionare.....	6
5.7	Modalità operative per la realizzazione di ispezioni visive e campionamento.....	7
6	Ispezione visiva e campionamento in zona cuscinetto.....	8
6.1	Svolgimento delle attività.....	9
6.2	Quadranti 100 x 100.....	10
6.3	Quadranti 1000 x 1000.....	10
6.4	Modalità operative per la realizzazione di ispezioni visive e campionamento nella zona cuscinetto	11
7	Modalità di realizzazione delle ispezioni visive.....	12
8	Modalità di prelievo dei campioni vegetali.....	13
8.1	Prelievo campioni.....	13
8.2	Misure di profilassi.....	16
9	Analisi di laboratorio.....	17
10	Allegato 1 : Classi di rischio determinate in base alle percentuali di infezione delle specie vegetali rinvenute positive a Monte Argentario nella fase di campionamento preliminare mirato a delimitare il focolaio.....	18
11	Allegato 2: Host plants found to be susceptible to <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>Multiplex</i>	20
12	Host plants found to be susceptible to <i>Xylella fastidiosa</i> - irrespective of the subspecies.....	21

1 Introduzione

Le presenti Linee Guida, a cura del Servizio fitosanitario regionale della Toscana (SFR) hanno la finalità di definire le modalità operative per le attività di ispezione e campionamento nelle aree delimitate del focolaio di *Xylella fastidiosa* di Monte Argentario (GR). L'attività si svolge ai sensi del DM 13/2/2018 "Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di *Xylella fastidiosa* (Well et al.) nel territorio della Repubblica italiana", tenendo conto anche di quanto riportato

nell'allegato 4 al DM 13/2/2018 "Linee guida sul monitoraggio e campionamento di specie vegetali ai fini dell'identificazione di *Xylella fastidiosa* in zone indenni" e delle "Guideline for the survey of *Xylella fastidiosa* in the Union territory" pubblicate sul sito https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/ph_biosec_legis_guidelines_xylella-survey.pdf. Nella loro predisposizione 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 nonché di tutte le altre informazioni pertinenti per quanto riguarda la presenza di *Xylella fastidiosa*.

In tutte le fasi di indagine e campionamento deve essere utilizzata l'applicazione 'FitoSIRT' per tracciare le attività svolte.

2 Delimitazioni

Ai sensi dell'art 7 comma 2 punti a, c, del citato DM 13/2/2018 le zone delimitate sono così definite:

La zona delimitata è costituita da una zona infetta e una zona cuscinetto:

zona infetta: comprende tutte le piante che risultano contagiate dall'organismo specificato, tutte le piante che presentano sintomi tali da indicare la possibile infezione da parte dell'organismo specificato e tutte le altre piante che possono essere contagiate da tale organismo a causa della loro vicinanza alle piante contagiate o perché provenienti da un luogo di produzione comune, se noto, a quello delle piante contagiate, o perché trattasi di piante ottenute da queste ultime. Ai sensi del Decreto Dirigenziale n. 20621 del 20/12/2018, la zona infetta si individua come l'area sottesa ad un cerchio con un raggio di 100 metri attorno alle piante risultate infette da *Xylella fastidiosa*.

zona cuscinetto: comprende un raggio di 5 km e circonda la zona infetta.

Nel caso del focolaio di Monte Argentario (GR), la delimitazione di cui sopra è stata definita ufficialmente con Decreto Dirigenziale n. 20621 del 20/12/2018.

3 Obiettivi delle ispezioni e del campionamento

La realizzazione di ispezioni e campionamenti conformemente alla norma internazionale per le misure fitosanitarie ISPM 31, come previsto dall'art. 9 commi 4 e 8 del DM 13/2/2018 nelle zone delimitate ha per obiettivo l'individuazione di eventuali ulteriori piante infette o di ulteriori focolai, ai fini della eventuale ridefinizione della superficie della zona infetta e della successiva tempestiva eradicazione dei focolai stessi.

4 Oggetto delle ispezioni e del campionamento

Ai sensi dell'art 9, commi 4 e 8, del DM 13 febbraio 2018, le piante oggetto di ispezione visiva, campionamento ed analisi sono: le piante specificate, nonché le piante sintomatiche e le piante asintomatiche in prossimità di quelle sintomatiche.

Di seguito si riportano le definizioni ai sensi dell'art. 2 del Decreto 13 febbraio 2018:

- Piante specificate: piante ospiti e tutti i vegetali destinati alla piantagione, ad eccezione delle sementi, appartenenti ai generi o alle specie enumerate nell'allegato 1.
- Si consiglia di fare riferimento allegato I della Decisione n. 789/2015 e ss.mm.ii, testo consolidato del 11/10/2018.
- Piante ospiti: vegetali destinati alla piantagione, ad eccezione delle sementi, appartenenti ai generi o specie, enumerati nella banca dati della Commissione delle piante ospiti sensibili alla *Xylella fastidiosa* nel territorio dell'Unione, in quanto risultate sensibili, nel territorio dell'Unione, all'organismo specificato oppure, se uno stato membro ha delimitato una zona in relazione solo a una o più sottospecie dell'organismo specificato, in quanto risultate sensibili a quelle o quelle sottospecie.

In base a quanto sopra, per quanto concerne il focolaio di Monte Argentario, sono da considerarsi piante ospiti quelle relative alla sottospecie multiplex, e quelle ritrovate ospiti di *Xylella fastidiosa* indipendentemente dalla sottospecie come da elenco: https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergencymeasures/xylella-fastidiosa/susceptible_en..

5 Metodologie di ispezione e campionamento da adottare nella zona infetta

5.1 Campionamento nella prima fase di eradicazione

In prima battuta, successivamente al rinvenimento di una pianta infetta, in base a quanto previsto dalla Linee guida per l'eradicazione, devono essere prelevati campioni sulle seguenti piante destinate alla rimozione:

- piante sospette, situate nei pressi di quelle già individuate infette, appartenenti ai generi ed alle specie risultate colpite con maggior frequenza dall'organismo nocivo nel focolaio di Monte Argentario o piante presentano sintomi evidenti riconducibili alla possibile presenza di *Xylella fastidiosa*;
- piante ospiti, così come definite dall'art. 2. comma 2 del DM MiPAAF del 13/2/2018, situate nei pressi di quelle già individuate infette .

La individuazione delle piante, il prelievo dei campioni e le registrazioni su FitoSIRT devono essere effettuati prima delle operazioni di rimozione delle piante stesse; l'attività è svolta dagli ispettori e agenti fitosanitari incaricati delle azioni di eradicazione, tenendo conto delle linee guida per il prelievo dei campioni vegetali messe a punto dal SFR.

5.2 Ispezione viva e campionamento in zona infetta

In zona infetta deve essere effettuata l'ispezione viva ed il campionamento sulle piante specificate ed eventualmente su altre piante se appaiono sospette o sintomatiche, tenendo conto della norma internazionale per le misure fitosanitarie ISPM 31.

Nel caso di presenza di più piante contigue appartenenti alla stessa specie possono essere prelevati campioni pool comprendenti fino ad un massimo di 5 piante, nel caso di piante arboree, oppure fino ad un massimo di 8 nel caso di piante erbacee e arbustive.

5.3 Ambito territoriale delle ispezioni visive e campionamento

Nel caso del focolaio di Monte Argentario (GR), la delimitazione delle zone infette è stata definita ufficialmente con Decreto Dirigenziale n. 20621 del 20/12/2018.

In base a tale atto risultano 29 zone infette composte da aree singole o multiple accorpate. Le aree multiple sono in genere formate a seguito della contiguità di 2 o più aree singole fino ad un massimo di 3-4. La superficie totale delle zone infette risulta essere di circa 135 Ha.

5.4 Personale coinvolto nelle ispezioni visive e campionamento

Il personale coinvolto nelle operazioni di ispezione visiva e campionamento è composto dagli Ispettori, dagli Agenti e dai Tecnici individuati con l'ordine di servizio del Dirigente del Servizio fitosanitario regionale n°10 del 21/12/2018.

Devono essere costituite squadre operative composte da almeno 2 persone in funzione della dimensione dell'area da ispezionare. Ogni squadra ha un referente delle ispezioni e campionamenti per ciascuna zona infetta assegnata. In ciascuna area, singola o multipla, le operazioni possono essere eseguite da una o più squadre. Nel caso di zone infette multiple il territorio da ispezionare viene ripartito fra i componenti delle squadre (4/6), coordinate dal referente delle ispezioni per quella zona infetta.

Al fine di facilitare la composizione delle squadre, di ottimizzare le risorse e i mezzi le squadre devono essere preferibilmente composte da Ispettori e Agenti della stessa sede. Saranno gli stessi Ispettori e Agenti a definire i componenti delle singole squadre, in funzione di esigenze lavorative o personali che consentano una ottimizzazione dell'attività, e a definire le collaborazioni e i tempi di intervento in caso di squadre multiple. In alternativa le squadre sono organizzate dal Dirigente o dal Coordinatore delle operazioni di indagine nelle zone infette, previa consultazione degli interessati.

Poiché non tutti gli Ispettori e Agenti incaricati hanno partecipato alla prima fase di campionamento svoltasi nei mesi di novembre e dicembre 2018 non tutti sono in grado di individuare agevolmente le zone infette a partire dal punto dove si trovavano le piante già eradicato o in fase di eradicazione. A tale proposito è opportuno che il Referente della squadra sia l'Ispettore che ha realizzato il campionamento in quella zona nella fase preliminare.

Non sempre questo sarà possibile poiché molti dei colleghi che hanno partecipato alla fase preliminare sono impegnati nelle operazioni di eradicazione o perché, essendo coinvolti in un numero elevato di zone infette, sarebbero costretti ad un sovraccarico di lavoro. In questi casi la squadra sarà accompagnata nella prima visita dall'Ispettore che ha individuato quel focolaio.

Dal punto di vista organizzativo, anche per la distanza di Monte Argentario dalle varie sedi del SFR, si suggerisce che le squadre impegnate siano operative almeno 2 giorni consecutivi a settimana.

Si stima di completare la realizzazione delle ispezioni e campionamento in area infetta entro la fine del mese di maggio 2019.

5.5 Preparazione delle ispezioni

Consultare la cartografia delle aree infette assegnate nell'allegato al Decreto Dirigenziale n. 20621 del 20/12/2018 e dotarsi di quella relativa alla zona assegnata.

Dotarsi della normativa essenziale:

- Decisione di esecuzione (UE) 2015/ 789 (versione consolidata)
- DM 13/2/2018 "Misure di emergenza per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di *Xylella fastidiosa* (Well et al.) nel territorio della Repubblica italiana"
- DGR N 1463 del 17-12-2018 Piano di azione per l'eradicazione del focolaio di *Xylella fastidiosa* sul territorio della regione Toscana
- Decreto Dirigenziale n. 20621 del 20/12/2018

Scaricare da Fitoshare le eventuali prescrizioni di misure ufficiali relative alla zona infetta assegnata.

Scaricare la lista delle piante ospiti dal sito https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/legislation/emergency-measures/xylella-fastidiosa/susceptible_en.

Scaricare la mappa catastale, la foto satellitare ed eventualmente il rilievo all'infrarosso della zona assegnata presente su Geoscopio.

Acquisire l'elenco dei proprietari, così come risultante dall'applicazione 'SISTER', per quella data zona infetta.

Ricordarsi di portare il tablet in dotazione al servizio, verificare la carica della batteria, verificare l'aggiornamento del software sull'applicazione FitoSIRT. Per l'inserimento dei dati nell'applicazione seguire le istruzioni specifiche (manuale allegato).

Dotarsi degli strumenti necessari per il campionamento (Buste sigillo, fascette a strozzo, nastro segnaletico bicolore, forbici, disinfettante, ecc.).

5.6 Definizione delle sub unità da ispezionare

Al fine di facilitare le ispezioni visive e il campionamento, ciascuna zona infetta, singola o multipla, viene suddivisa in quadranti della dimensione di m. 25 x 25 (per una superficie di 625 mq.) ciascuno dei quali rappresenta la sub unità nella quale realizzare le ispezioni visive e il campionamento. Tutti quadranti sono numerati.

		1	2	3	4		
	5	6	7	8	9	10	
11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33	34
35	36	37	38	39	40	41	42
	43	44	45	46	47	48	
		49	50	51	52		

5.7 Modalità operative per la realizzazione di ispezioni visive e campionamento

Per orientarsi meglio è opportuno iniziare le ispezioni dalla sub unità dove ricade la pianta infetta già rimossa; dato l'alto numero di quadranti, sono da prendere in considerazione solo quelli ricadenti per intero nella zona infetta.

In caso di problemi per l'accesso nelle proprietà contigue, cercare di contattare i proprietari\conduttori, anche chiedendo informazioni ai proprietari/conduttori già noti.

Informare i proprietari\conduttori eventualmente presenti sulla Emergenza Xylella a Monte Argentario, sugli obblighi di legge e relative sanzioni (D.Lgs. 214/2005, art. 54, comma 3-bis "Chiunque non consente agli incaricati del Servizio fitosanitario l'effettuazione dei controlli in attuazione del presente decreto e' punito con la sanzione amministrativa del pagamento di una somma da 1.000,00 euro a 6.000,00 euro") e sulle finalità delle indagini e della rimozione delle piante.

Nel caso di diniego alle richieste di accesso NON insistere e comunicare che verrà emessa una specifica prescrizione di misura ufficiale per imporre l'accesso per le indagini e l'eventuale rimozione di altre piante.

In caso di ulteriore diniego, ricordare la possibilità di applicazione degli articoli 500 e 650 del codice penale e che l'ispezione sarà comunque realizzata congiuntamente alla forza pubblica (Carabinieri Forestali- CF). La richiesta di intervento dei CF sarà inviata a conclusione delle indagini, quando si avrà un quadro completo dei terreni con accesso problematico.

Procedere quindi con le ispezioni visive ed il campionamento delle piante specificate, effettuando possibilmente per ogni quadrante le seguenti operazioni:

- posizionarsi in un determinato punto del quadrante ritenuto rappresentativo della situazione presente all'interno del quadrante stesso ;

- esaminare tutte le piante contigue a tale punto presenti nel raggio di 3 metri (area di saggio), devono essere individuati, per ciascuna specie, gli individui asintomatici, sintomatici o sospetti (perché appartenenti a specie ad alto rischio, v. all. 1);
- prelevare almeno un campione da analizzare, in caso di presenza di più specie di piante specificate, è possibile prelevare più campioni (raccomandati se possibile i campioni pool), le piante devono essere preferibilmente sintomatiche o sospette, in assenza di queste, prelevare un campione (preferibilmente pool) da piante asintomatiche appartenenti preferibilmente a piante ad alto rischio (v. all.1).

In caso di prelievo di campioni singoli, segnare con fascetta a strozzo la pianta campionata. In caso di prelievo di campioni pool segnare una delle piante con fascetta a strozzo e le altre con nastro segnaletico bicolore o con vernice rossa.

Registrare come segue le ispezioni visive su FitoSIRT (v. manuale):

- Per ciascun quadrante da ispezionare è consigliato aprire un nuovo verbale in cui è stata suddivisa la zona infetta assegnata. Indicare nel verbale il numero della zona infetta e del quadrante a cui fa riferimento il verbale.
- Nel corso dell'ispezione visiva, creare un rilievo per ciascuna specie vegetale, relativo a più piante della stessa specie. In caso di presenza di piante asintomatiche e sintomatiche della stessa specie nella stessa area di saggio creare due differenti rilievi.
- In caso di prelievo campioni (singoli o pool come da linee guida) effettuare la registrazione di prelievo campione all'interno del rilievo della specie campionata.

In caso di quadranti inaccessibili aprire un verbale, registrare il quadrante e nella tendina accesso indicare la voce "inaccessibile". Se dall'esterno del quadrante si notano piante specificate asintomatiche, sintomatiche/sospette indicarle nei rilievi senza prelevare campioni, se possibile stimare il numero delle piante. Se il quadrante è parzialmente inaccessibile individuare l'area di saggio nella parte accessibile.

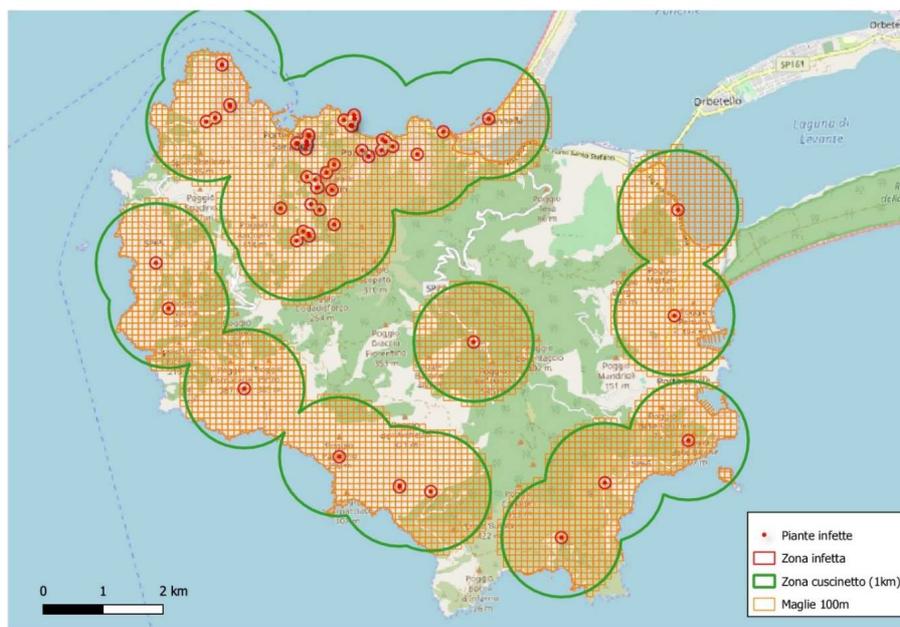
A fine giornata i campioni prelevati dovranno essere consegnati al laboratorio di Porto Santo Stefano.

6 Ispezione visiva e campionamento in zona cuscinetto

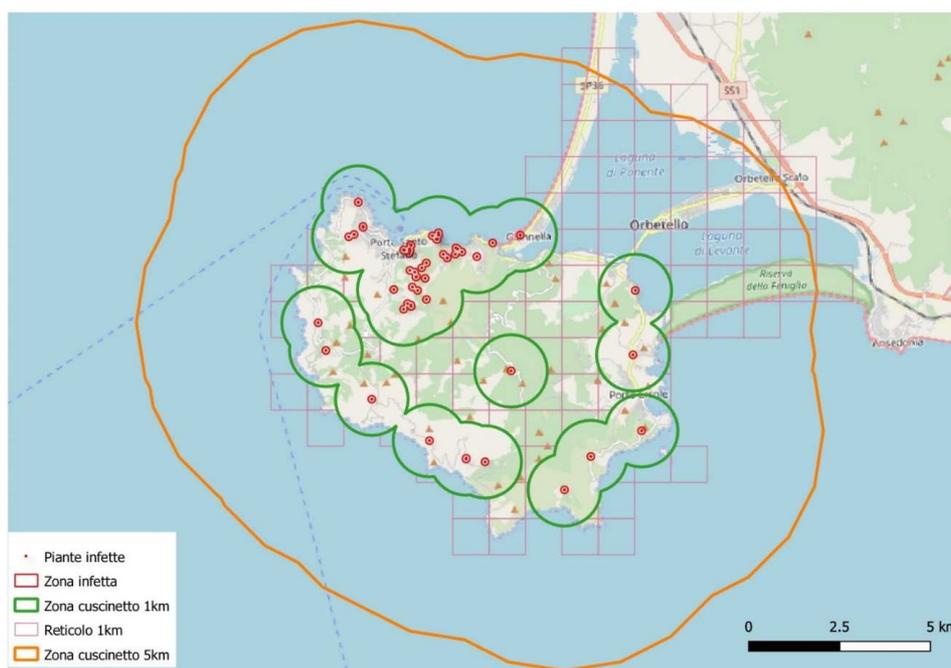
Ai sensi del DM 13/2/2018 la zona cuscinetto comprende un raggio di almeno 5 km oltre i confini della zona infestata.

Ai sensi dell'art 9 comma 8 del DM MiPAAF del 13/2/2018, a la zona cuscinetto è così suddivisa:

- La superficie che circonda le zone infette, definita da un raggio di 1 Km, in quadranti di 100 m × 100 m di lato (Figura 1);
- La superficie della restante parte della zona cuscinetto (4 km.), che circonda le zone infette, in quadranti di 1 km × 1 km di lato (Figura 2).



(Figura 1) Zona cuscinetto, griglia 100 x 100 m: area sottesa ad un cerchio con un raggio di 1 km attorno alle piante risultate infette, suddivisa da una griglia formata da quadrati di 100 m x 100 m di lato. N° quadranti circa 4500



(Figura 2) Zona cuscinetto, griglia 1km x 1 km: area sottesa ad un cerchio con un raggio di 5 km attorno alle piante risultate infette e compresa fra 1 e 5 Km. suddivisa da griglia formata da quadrati di 1 Km x 1 Km di lato. N° quadranti 35

6.1 Svolgimento delle attività

Nella zona cuscinetto deve essere controllata la eventuale presenza dell'organismo specificato tramite ispezioni annuali, tenendo conto degli orientamenti tecnici per le ispezioni di *Xylella fastidiosa*. Deve essere effettuato il controllo visivo delle piante specificate e devono essere prelevati campioni dalle piante che presentano sintomi

evidenti riconducibili alla possibile presenza di *Xylella fastidiosa*, oppure su piante sospette appartenenti ai generi ed alle specie con una classe di rischio maggiore rispetto alla probabilità di essere infette da *Xylella fastidiosa* (v. allegato 1, classi di rischio). Nel caso di presenza di più piante contigue appartenenti alla stessa specie possono essere prelevati campioni pool fino ad un massimo di 5 piante nel caso piante, arboree oppure fino ad un massimo di 8 nel caso di piante erbacee o arbustive.

6.2 Quadranti 100 x 100

Al fine di consentire un elevato dettaglio territoriale delle ispezioni e dei campionamenti si prevede la concentrazione delle indagini in un'area di saggio con raggio di 5 metri (superficie circa 78,5 mq), individuata possibilmente al centro di un quadrato composto da 4 quadranti 100 m oppure, ove non possibile per ragioni oggettive, posizionata in base ai criteri del campionamento di opportunità/convenienza (ISPM 31).

Con l'adozione di questa metodologia di campionamento, con un'area di saggio si va a coprire parzialmente la superficie dei quattro quadranti limitrofi oggetto di indagine controllata. Al fine di arrivare ad una più precisa delimitazione della nuova zona infetta può essere necessario prelevare ulteriori campioni *random* nelle aree circostanti all'area di saggio.

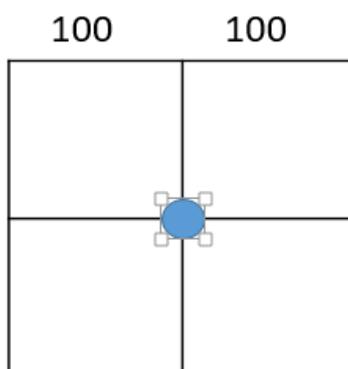


Figura 3: Schema grafico relativo a ciascuna unità campionaria

6.3 Quadranti 1000 x 1000

Nella zona cuscinetto, la superficie compresa fra 1 e 5 Km dal confine della zona infetta viene suddivisa in quadranti di 1 km x 1 km.

Le ispezioni e i campionamenti sono effettuati da soggetti esterni incaricati con le procedure contrattuali previste dalla Regione Toscana.

Al fine di consentire un elevato dettaglio territoriale delle ispezioni e dei campionamenti si prevede la concentrazione delle indagini in 3 aree di saggio del diametro di 5 metri (superficie circa 78,5 mq ciascuna, per un totale di circa 235,5 mq in ciascun quadrante delle griglia), individuate in base ai criteri del campionamento della convenienza (ISPM31).

Nel caso di individuazione di campioni positivi alla analisi molecolare, al fine di arrivare ad una più precisa delimitazione della nuova zona infetta può essere necessario prelevare ulteriori campioni *random* nelle aree circostanti all'area di saggio.

6.4 Modalità operative per la realizzazione di ispezioni visive e campionamento nella zona cuscinetto

Procedere con le ispezioni visive ed il campionamento delle piante specificate, effettuando possibilmente le seguenti operazioni:

- Individuare all'interno del quadrante le aree di saggio con le modalità descritte ai punti 5.2 e 5.3.
- posizionarsi possibilmente al centro di ciascuna area di saggio o comunque in un punto ritenuto rappresentativo della situazione presente all'interno dell'area di saggio;
- esaminare tutte le piante contigue a tale punto presenti nel raggio di 5 metri (area di saggio), devono essere individuati, per ciascuna specie, gli individui asintomatici, sintomatici o sospetti (perché appartenenti a specie ad alto rischio, v. all. 1);
- prelevare almeno tre campione da analizzare, in caso di presenza di più specie di piante specificate, è possibile prelevare più campioni (raccomandati se possibile i campioni pool), le piante devono essere preferibilmente sintomatiche o sospette, in assenza di queste, prelevare un campione (preferibilmente pool) da piante asintomatiche appartenenti preferibilmente a piante ad alto rischio (v. all.1).

In caso di prelievo di campioni singoli, segnare con fascetta a strozzo la pianta campionata. In caso di prelievo di campioni pool segnare una delle piante con fascetta a strozzo e le altre con nastro segnaletico bicolore o con vernice rossa.

. Registrare come segue le ispezioni visive su FitoSIRT (v. manuale):

1. Per ciascun quadrante da ispezionare è consigliato aprire un nuovo verbale. Indicare nel verbale il numero della zona infetta da cui si origina quella zona cuscinetto e il numero dei 4 quadranti all'interno dei quali è stata individuata l'area di saggio.
2. Nel corso dell'ispezione visiva, creare un rilievo per ciascuna specie vegetale, relativo a più piante della stessa specie. In caso di presenza di piante asintomatiche e sintomatiche della stessa specie nella stessa area di saggio creare due differenti rilievi.
3. In caso di prelievo campioni (singoli o pool come da linee guida) effettuare la registrazione di prelevamento campione all'interno del rilievo delle piante sintomatiche della specie campionata.
4. Nel caso dei quadranti di 1 km x 1 km all'interno dei quali sono individuate 3 aree di saggio aprire un nuovo verbale per ciascuna area di saggio. Indicare nel verbale il numero del quadrante ed il numero assegnato a quell'area di saggio (A, B, C).

Per quanto riguarda la registrazione dell'ispezione visiva precedere come al punto 2.

5. In caso di quadranti inaccessibili aprire un verbale, registrare il numero dei 4 quadranti all'interno dei quali è stata individuata l'area di saggio e nella tendina accesso indicare la voce "inaccessibile". Se dall'esterno del quadrante si notano piante specificate asintomatiche, sintomatiche/sospette indicarle nei rilievi senza prelevare campioni, se possibile stimare il numero delle piante. Se almeno uno dei quattro quadranti è accessibile individuare l'area di saggio nella parte accessibile.

A fine giornata i campioni prelevati dovranno essere consegnati al laboratorio di Porto

Le ispezioni e i campionamenti sono effettuati da soggetti esterni incaricati con le procedure contrattuali previste dalla Regione Toscana. Tutte le operazioni devono essere svolte sotto il diretto controllo del Servizio Fitosanitario regionale nei mesi da Aprile a Giugno, e da Settembre a Novembre.

A fine giornata i campioni prelevati dovranno essere consegnati al laboratorio di Porto Santo Stefano.

7 Modalità di realizzazione delle ispezioni visive

Obiettivo delle ispezioni visive è quello di verificare la presenza/assenza di sintomi sulle piante specificate ed eventualmente su altre piante sintomatiche presenti in ciascuna unità minima di territorio (sub unità o area di saggio).

Poiché fra le piante specificate sono comprese specie erbacee, arbustive di piccole o grandi dimensioni e specie arboree spontanee della macchia mediterranea o di valenza agraria e ornamentale, si dovrà tenere un approccio specifico al fine di osservare la presenza dei sintomi nel corso della ispezione visiva.

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

La concentrazione batterica nella pianta dipende da fattori ambientali, dal ceppo dell'organismo nocivo e dalla sottospecie considerata. 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 quando il fogliame dell'anno sviluppatosi su rametti lignificati avrà raggiunto l'accrescimento definitivo.

Nel corso della ispezione visiva dovranno essere ricercate 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 *Poligala mirtifolia*, *Prunus dulcis*, *Ficus carica*, *Cercis siliquastrum*, *Eleagnus angustifolia*. 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 elaternus* l'infezione si manifesta inizialmente con ingiallimento fogliare prima localizzato su alcune foglie e poi diffuso su parte della chioma. Talvolta sono stati 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 spinosa* 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 salvifolius* 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.

8 Modalità di prelievo dei campioni vegetali

8.1 Prelievo campioni

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.

L'unità di base per il campionamento è la pianta singola. In casi particolari possono essere effettuati campioni pool costituiti da non più di 5 piante nel caso di piante arboree oppure fino ad un massimo di 8 nel caso di piante erbacee o arbustive, appartenenti alla stessa specie vegetale.

La concentrazione batterica nella pianta dipende da fattori ambientali, dal ceppo e dalla sottospecie considerata. Il campione deve essere costituito da rami/branche situati in prossimità delle parti sintomatiche e purché 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	Peso approssimativo del
------------------------	----------------------------------	-------------------------	-------------------------

		per campione di laboratorio	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 mirtifolia</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 xylematico	-	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.

Le analisi su piante asintomatiche sono raccomandate soprattutto per le piante ospiti della sottospecie (allegato 2: *Host plants found to be susceptible to Xylella fastidiosa subsp. Multiplex*), in questo caso il campione deve essere rappresentativo

dell'intera parte aerea della pianta. Recenti studi hanno dimostrato che la raccolta dei campioni dovrebbe avvenire preferibilmente nelle parti medio - alte della chioma, in modalità incrociata lungo i quattro punti cardinali, per aumentare la probabilità di rilevamento dei batteri.

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/ramoscelli 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. In caso di realizzazione di campioni pool si contrassegnerà con fascetta numerata una delle piante componenti il pool segnando le altre con nastro bicolore o con vernice rossa. Tale campionamento deve essere registrato tramite il portale FitoSIRT con opportuno distinguo in relazione a tale tipo di attività.

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 <i>pool</i>	N. di aliquote in caso di campione <i>pool</i>	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.	Max 5	1 - 2 g (piccioli/nervature centrali/parti apicali germogli/sezioni legnose)	

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

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione <i>pool</i>	Numero di aliquote in caso di campione <i>pool</i>	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
5-8 foglie mature con		1 - 2 g (piccioli/nervature)	

picciolo/pianta	Max 8	ure centrali)	
-----------------	--------------	---------------	--

Polygala mirtifolia

Tipo di tessuto da prelevare per ogni aliquota del campione <i>pool</i>	Numero di aliquote in caso di campione <i>pool</i>	Peso approssimativo del campione da laboratorio	
3-5 rametti/pianta	Max 8	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 <i>pool</i>	Numero di aliquote In caso di campione <i>pool</i>	Peso approssimativo del campione da laboratorio
3-5 parti di pianta	Max 8	1 - 2 g (parti di pianta)

8.2 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 tra ogni prelievo di campioni. Tale disinfezione può avvenire con etanolo assoluto 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 ispezione e campionamento prima di uscire dalle zone delimitate di intervento 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*.

9 Analisi di laboratorio

I campioni prelevati durante le varie fasi operative di eradicazione/monitoraggio dovranno pervenire il giorno stesso del prelievo al laboratorio di Porto Santo Stefano dove saranno stoccati nei frigoriferi in attesa di essere processati nelle 24 ore. In tali locali verranno predisposte le aliquote di lavoro di circa 1 grammo di materiale vegetale in apposite buste tipo bioreba sigillate. Tali buste verranno inserite in buste sigillate el SFR e inviate in sicurezza tramite corriere interno al laboratorio del SFR di Pistoia ufficialmente delegato alle attività analitiche. Le analisi di laboratorio sono realizzate secondo quanto previsto dalle linee guida EPPO (cfr PM7-24 EPPO). La tracciabilità dei campioni avviene in tempo reale attraverso la registrazione dei dati su PC in rete direttamente presso il laboratorio di pronto intervento a Porto Santo Stefano – Monte Argentario (GR).

Misure di sicurezza sul lavoro

L'area delimitata 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 ispezione e campionamento pertanto tutti gli operatori coinvolti sono tenuti a rispettare tutte le norme di prevenzione degli infortuni sul lavoro.

Le aree da ispezionare sono particolarmente eterogenee: giardini pubblici e privati, aree prossime a strade di scorrimento trafficate, aree lungo strade sterrate che si inerpicano sulla montagna, aree di macchia mediterranea più o meno fitta nelle quali sono presenti specie vegetali arboree e arbustive allo stato naturale di cui alcune dotate di lunghe spine appuntite, aree caratterizzate da suoli instabili e da fortissime pendenze anche a picco sul mare, aree retrodunali con vegetazione particolarmente fitta, ecc. Ciascuna delle aree sopra descritte può presentare differenti fattori di rischio pertanto è raccomandata la massima attenzione nella realizzazione delle ispezioni che dovranno essere svolte nella massima sicurezza. Infine non è da sottovalutare la presenza di animali selvatici anche di grosse dimensioni.

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.

10 Allegato 1 : Classi di rischio determinate in base alle percentuali di infezione delle specie vegetali rinvenute positive a Monte Argentario nella fase di campionamento preliminare mirato a delimitare il focolaio

Specie	Numero Campioni	Numero Campioni positivi	% positivi	Classe di rischio	suscettibilità
Lavandula angustifolia	10	5	50,00%	alto	si
Calicotome spinosa	18	8	44,44%	alto	si
Prunus amygdalus (Mandorlo)	29	8	27,59%	alto	si
Spartium junceum	179	49	27,37%	alto	si
Rhamnus alaternus	107	25	23,36%	alto	si
Polygala myrtifolia	101	23	22,77%	alto	si
Cistus spp	87	13	14,94%	alto	si
Elaeagnus angustifolia	4	2	50,00%	Alto?	no
Cytisus scoparius	9	1	11,11%	Alto?	si
Cercis siliquastrum	10	1	10,00%	medio	si
Rosmarinus officinalis	102	7	6,86%	medio	si
Ficus carica	20	1	5,00%	medio	si
Rosmarinus officinalis prostrata	21	1	4,76%	medio	si
Buxus sp.	1	0	0,00%	n.d.	no
Cornus sp.	1	0	0,00%	n.d.	no
Crataegus spp	1	0	0,00%	n.d.	no
Dimorphocarpa sp.	1	0	0,00%	n.d.	no
Edera	1	0	0,00%	n.d.	no
Juniperus spp	1	0	0,00%	n.d.	no
Medicago arborea	1	0	0,00%	n.d.	no
Mespilus spp	1	0	0,00%	n.d.	no
Pittosporum sp.	1	0	0,00%	n.d.	no
Pyrus communis	1	0	0,00%	n.d.	no
Rubus sp.	1	0	0,00%	n.d.	no
Solanum jasminoides	1	0	0,00%	n.d.	no
Wisteria sp	1	0	0,00%	n.d.	no
Eucaliptus spp	2	0	0,00%	n.d.	no
Ligustrum sp.	2	0	0,00%	n.d.	no
Parthenocissus sp.	2	0	0,00%	n.d.	no
Prunus laurocerasus	2	0	0,00%	n.d.	no
Punica granatum	2	0	0,00%	n.d.	no
Sorbus spp	2	0	0,00%	n.d.	no
Artemisia sp.	3	0	0,00%	n.d.	no
Jasminum sp.	3	0	0,00%	n.d.	no
Lonicera sp.	3	0	0,00%	n.d.	no
Myriocladus spp	3	0	0,00%	n.d.	no
Hedera sp.	4	0	0,00%	n.d.	no
Prunus spp	4	0	0,00%	n.d.	no

Quercus spp	5	0	0,00%	n.d.	no
Rosa spp	5	0	0,00%	n.d.	no
Viburnum tinus	6	0	0,00%	n.d.	no
Arbutus unedo	7	0	0,00%	n.d.	no
Citrus spp	7	0	0,00%	n.d.	no
Vitis vinifera	8	0	0,00%	n.d.	(fastidiosa)
Westringia glabra	1	0	0,00%	n.d.	no (pauca)
Vinca sp.	3	0	0,00%	n.d.	no (pauca)

Lavandula dentata	1	0	0,00%	potenziali	si
Euryops chrysanthemoides	1	0	0,00%	potenziali	si
Genista sp.	3	0	0,00%	potenziali	si
Prunus avium (Ciliegio)	4	0	0,00%	potenziali	si
Rosa canina	6	0	0,00%	potenziali	si
Fraxinus spp	9	0	0,00%	potenziali	si

Helichrysum sp.	11	0	0,00%	indenni_su scettibili	si
Quercus suber	17	0	0,00%	indenni_su scettibili	si
Asparagus acutifolius	18	0	0,00%	indenni_su scettibili	si
Myrtus communis (Mirto)	58	0	0,00%	indenni_su scettibili	si
Nerium oleander (Oleandro)	116	0	0,00%	indenni_su scettibili	si
Olea europea (Olivo)	332	0	0,00%	indenni_su scettibili	si

Inula sp.	10	0	0,00%	indenni	no
Quercus ilex	23	0	0,00%	indenni	no
Pistacia sp.	50	0	0,00%	indenni	no
Pelargonium fragrans	12	0	0,00%	indenni	no (pauca)
Westringia fruticosa	13	0	0,00%	indenni	no (pauca)
Phillyrea sp.	51	0	0,00%	indenni	no (pauca)
Laurus nobilis	58	0	0,00%	indenni	no (pauca)

11 Allegato 2: Host plants found to be susceptible to *Xylella fastidiosa* subsp. *Multiplex*

Acacia dealbata Link

Acacia saligna (Labill.) Wendl

Acer pseudoplatanus L.

Anthyllis hermanniae L.

Artemisia arborescens L.

Asparagus acutifolius L.

Calicotome villosa (Poiret)

Cercis siliquastrum L.

Cistus creticus L.

Cistus monspeliensis L. Ref. Ares (2018)4838443 - 20/09/2018

Cistus salviifolius L.

Convolvulus cneorum L.

Coronilla glauca L.

Coronilla valentina L.

Cytisus scoparius (L.) Link

Cytisus villosus Pourr.

Euryops chrysanthemoides (DC.) B.Nord.

Ficus carica L.

Fraxinus angustifolia Vahl

Genista x spachiana (syn. *Cytisus racemosus* Broom)

Genista corsica (Loisel.) DC.

Genista ephedroides DC.

Grevillea juniperina R. Br.

Hebe

Helichrysum italicum (Roth) G. Don

Lavandula angustifolia Mill.

Lavandula dentata L.

Lavandula stoechas L.

Lavandula x allardii (syn. *Lavandula x heterophylla*)

Lavandula x intermedia
Lonicera japonica Thunb.
Medicago sativa L.
Metrosideros excelsa Sol. ex Gaertn.
Myrtus communis L.
Olea europaea L.
Pelargonium graveolens L'Hér
Phagnalon saxatile (L.) Cass.
Prunus avium (L.) L.
Prunus cerasifera Ehrh.
Prunus domestica L.
Prunus cerasus L.
Quercus suber L.
Rhamnus alaternus L.
Rosa canina L.
Spartium junceum L.
Westringia fruticosa (Willd.) Druce

**12 Host plants found to be susceptible to Xylella fastidiosa -
irrespective of the subspecies**

Calicotome spinosa (L.)
Cistus albidus L.
Coffea
Genista lucida Cambess.
Helicrysum stoechas (L.)
Moench Lavandula dentata L.
Lavandula x chaytorae
Nerium oleander L.
Polygala myrtifolia L.
Prunus dulcis (Mill.) D.A. Webb
Rosmarinus officinalis L.
Teucrium capitatum L.
Veronica elliptica L.