



Direzione Agricoltura e Sviluppo Rurale

Settore Servizio Fitosanitario Regionale e di Vigilanza e Controllo Agroforestale

**Linee guida 2024 per la realizzazione di campionamenti per
l'effettuazione della sorveglianza annuale nell'area delimitata (zone
infette e zona cuscinetto) del focolaio di *Xylella fastidiosa* di Monte
Argentario (GR) (Reg. (UE) 2020/1201)**

Indice generale

1	Introduzione.....	3
2	Delimitazioni.....	3
3	Obiettivi del campionamento.....	4
4	Oggetto del Campionamento.....	5
5	Indagini nelle zone infette.....	5
	5.1 Ambito territoriale delle zone infette.....	5
	5.2 Specie da indagare.....	5
	5.3 Distribuzione dei campioni da prelevare.....	6
	5.4 Organizzazione delle indagini.....	6
6	Indagini nelle zone cuscinetto.....	6
	6.1 Metodologia adottata (RiPEST).....	6
	6.1.1 Suddivisione delle aree e individuazione della popolazione ospite nell'area di indagine	7
	6.1.2- Calcolo della dimensione del campione.....	7
	6.1.3 Localizzazione del prelievo dei campioni nell'area di indagine, considerando i fattori di rischio.....	8
	6.2. Modalità operative per la realizzazione del campionamento nella zona cuscinetto.....	8
7	Modalità operative generali.....	9
	7.1 Preparazione delle ispezioni.....	9
	7.2 Modalità operative per la realizzazione del campionamento.....	9
	7.3 Misure di profilassi.....	12
	7.4 Analisi di laboratorio.....	12

1 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 attività di ispezione e campionamento nelle aree delimitate del focolaio di *Xylella fastidiosa* di Monte Argentario (GR). L'attività si svolge ai sensi del Reg. di esecuzione (UE) 2020/1201 della Commissione del 14 agosto 2020 relativo alle misure per prevenire l'introduzione e la diffusione nell'Unione della *Xylella fastidiosa*, tenendo conto anche di quanto riportato nel DM 24/1/2022 "Adozione del piano di emergenza nazionale per il contrasto di *Xylella fastidiosa* (Well et al.)", della Pest survey card on *Xylella fastidiosa*, delle 'Guidelines for statistically sound and risk-based surveys of *Xylella fastidiosa*' pubblicate dalla European Food Safety Authority (EFSA) e delle Procedure standard EPPO PM 7/24 Diagnostic Protocol.

Nella predisposizione delle presenti LG si è inoltre tenuto conto dei dati tecnici e scientifici disponibili, della biologia dell'organismo specificato e dei suoi vettori, della presenza e della biologia delle piante ospiti dell'organismo specificato. Sono state inoltre considerate tutte le informazioni pertinenti per quanto riguarda la presenza di *Xylella fastidiosa* rilevate nella zona delimitata di Monte Argentario, comprendente il territorio dei comuni di Monte Argentario e parte di quello di Orbetello (GR) nel corso delle campagne di indagine precedenti e delle operazioni di rimozione delle piante infette svolte finora.

Secondo l'art. 10 del Reg.(UE) 2020/1201 le indagini devono essere effettuate annualmente, tenendo conto delle informazioni riportate nella scheda di sorveglianza fitosanitaria dell'EFSA (detta Pest Survey Card) nelle quali è riportata una panoramica dell'organismo nocivo (O.N.), in cui sono elencate tutte le caratteristiche relative al batterio e sono indicati alcuni fattori di rischio da prendere in considerazione ai fini dell'esecuzione delle indagini. I fattori di rischio da tenere presenti sono le condizioni biotiche e abiotiche presenti sul territorio in cui vengono svolte le indagini che aumentano la probabilità di infestazione dall'organismo nocivo. Ne sono un esempio la presenza delle piante ospiti, la loro numerosità e la presenza degli insetti vettori; tali elementi possono influenzare la diffusione annuale della *Xylella fastidiosa*.

L'art. 10 del Reg. (UE) 2020/1201 prende in considerazione anche le "Linee guida per indagini statisticamente attendibili e basate sul rischio relative alla *Xylella fastidiosa*" redatte da EFSA. Tale documento riporta le metodologie da adottare nel campionamento di *Xylella* in un'area delimitata (dove l'O.N. è presente) oppure in un'area indenne (in cui l'O.N. non è presente). Anche le linee guida riportano ed evidenziano l'importanza dei fattori di rischio nella programmazione delle indagini.

La programmazione delle attività di indagine per *Xylella fastidiosa* del Servizio Fitosanitario della Regione Toscana prende in considerazione quindi tutti gli aspetti sopra menzionati, adattandoli alla realtà presente sul territorio di Monte Argentario e Orbetello.

2 Delimitazioni

Ai sensi dell'art 4 comma 2 del Reg. (UE) 2020/1201, le zone delimitate sono così definite: "L'area delimitata è costituita da una zona infetta e da una zona cuscinetto. La zona infetta ha un raggio di almeno 50 m attorno alla pianta che è risultata infetta dall'organismo nocivo specificato. La larghezza della zona cuscinetto è di almeno 2,5 km quando la zona infetta è stabilita ai fini dell'adozione delle misure di eradicazione di cui agli articoli da 7 a 11...".

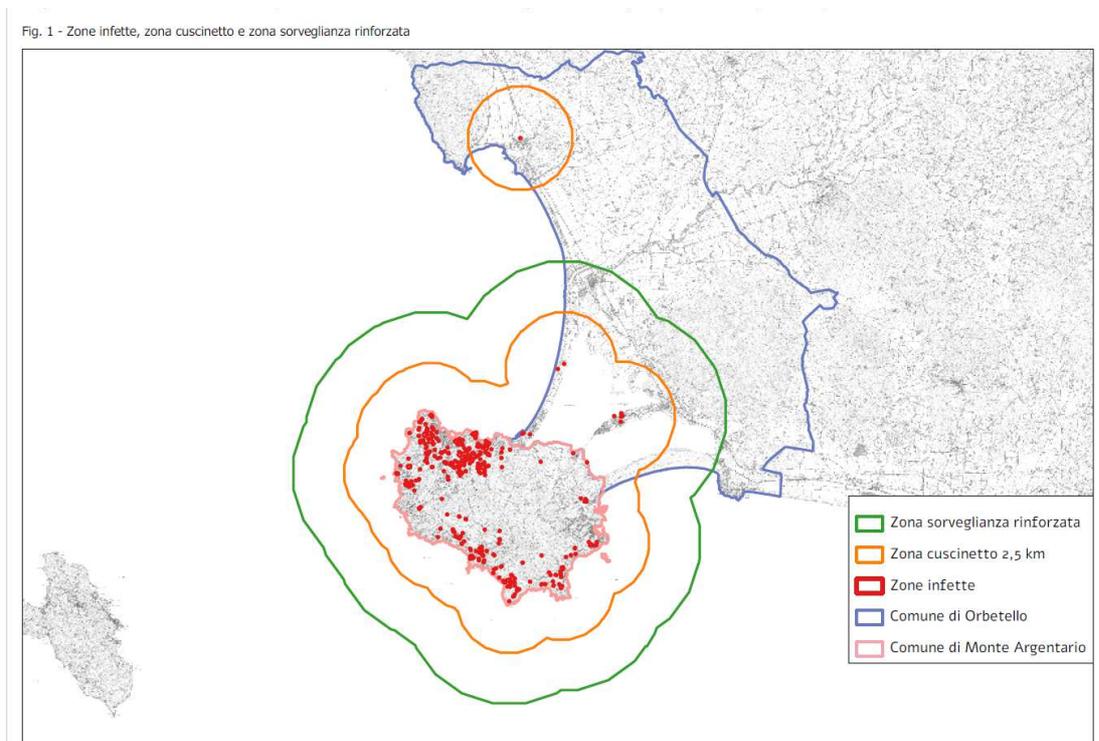
Dopo il primo rinvenimento di alcune piante positive nel Comune di Monte Argentario (GR) nel 2018, l'area fu immediatamente delimitata con il Decreto Dirigenziale n. 20621 del 20/12/2018, redatto secondo la normativa allora vigente ed in particolare secondo la Decisione di esecuzione (UE) 2015/789 del 18 maggio 2015. Con tale atto sono state individuate le zone infette intorno ai punti dove sono state rinvenute le singole piante infette; in tali zone sono state effettuate le indagini intensive e le operazioni di eradicazione. Lo stesso decreto ha

individuato la zona cuscinetto intorno alle zone infette in cui è stata svolta un'intensa attività di sorveglianza, tesa ad individuare eventuali altre piante infette.

A seguito di tali indagini sono state rinvenute ulteriori piante infette, per cui con Decreto Dirigenziale n.106 del 9 Gennaio 2020 (Delimitazione delle zone infette e cuscinetto per *Xylella fastidiosa* subspecie *multiplex*), sono state ridefinite ed aggiornate le perimetrazioni delle aree infette.

Con l'adozione del Reg.(UE) 2020/1201 la delimitazione è stata adeguata con Decreto Dirigenziale n° 15430 del 1/10/2020, nel quale sono state individuate complessivamente 83 zone infette. E' stata modificata anche la zona cuscinetto, comprendente il territorio ricadente nel raggio di 2,5 km dalle zone infette, ed istituita una ulteriore zona di sorveglianza rinforzata di ulteriori 2.5 Km intorno alla zona cuscinetto.

Con le campagne di indagine successive, l'area delimitata è stata nuovamente perimetrata. L'ultima delimitazione (Fig.1) delle zone è stata definita con il Decreto Dirigenziale n. 5189 del 13/3/2024, che approva la nuova cartografia riportante la zona delimitata per la presenza del focolaio di *Xylella fastidiosa*, composta da 176 zone infette, dalla zona cuscinetto intorno ad esse e da una zona di sorveglianza rinforzata.



3 Obiettivi del campionamento

La realizzazione delle indagini annuali, da svolgersi nei periodi più adatti e conformemente a quanto disposto nell'articolo 10 del Reg.(UE) 2020\1201, ha per obiettivo la determinazione della presenza e della distribuzione di *Xylella fastidiosa* nell'intera area delimitata e può portare all'eventuale ridefinizione della superficie della zona infetta ai fini della successiva e tempestiva eradicazione dei focolai rinvenuti, nonché all'eventuale passaggio in alcuni territori da una strategia di eradicazione a quella di contenimento (Capo V, Reg.(UE) 2020/1201) e all'ampliamento delle conoscenze dell'organismo nocivo presente nell'area.

4 Oggetto del Campionamento

Ai sensi dell'art. 10 del Reg.(UE) 2020/1201, le piante oggetto di campionamento ed analisi sono le piante ospiti, comprese le piante specificate, come pure le altre piante che presentano sintomi indicativi della possibile infezione da parte di tale organismo nocivo o che si sospetta siano infette da tale organismo nocivo, in quanto appartenenti allo stesso genere delle piante già rinvenute infette.

Di seguito si riportano le definizioni ai sensi dell'art. 1 del Reg.(UE) 2020/1201:

b) «piante ospiti»: tutte le piante da impianto, escluse le sementi, appartenenti ai generi o alle specie elencati nell'allegato I al regolamento;

c) «piante specificate»: piante ospiti da impianto, escluse le sementi, appartenenti ai generi o alle specie elencati nell'allegato II e notoriamente sensibili a singole sottospecie dell'organismo nocivo specificato

5 Indagini nelle zone infette

5.1 Ambito territoriale delle zone infette

La zona infetta, così come previsto dal piano di azione, è rappresentata dalla superficie ricadente nei 50m di raggio attorno alla pianta infetta. L'articolo 10 del Reg.(UE) 2020/1201 prevede che il piano di indagine e lo schema di campionamento nelle zone infette devono permettere di rilevare un tasso di presenza di piante infette dello 0,5% ed un livello di confidenza di almeno il 90%. Il numero totale dei campioni da prelevare all'interno di tali aree è stato programmato utilizzando lo standard FAO ISPM31, validato a livello internazionale, che consente di individuare un numero minimo di campioni a partire dalla quantità di popolazione vegetale presente. Le attuali 176 zone infette, così come identificate nel D.D. 5189 del 13/3/2024 sono considerate come un'unica zona infetta, considerando che la probabilità di diffusione del parassita e le condizioni ambientali presenti sono omogenee. Nella zona infetta è presente una grande quantità di specie ospiti sia per numero che per tipologia. La maggior parte delle zone, infatti, si trova in ambienti di macchia mediterranea e gariga o in terreni incolti con vegetazione spontanea, quindi con un numero molto alto di specie vegetali anche ospiti per cui il numero delle piante presenti, ai fini del calcolo del numero dei campioni da prelevare è considerato infinito.

Nelle zone infette l'applicazione dello strumento di calcolo fornito da EFSA, RiPEST non è ritenuta idonea, dato che nelle zone infette la presenza del parassita è già nota. Tale strumento consente di rilevare l'assenza o meno dell'organismo nocivo in una popolazione vegetale in cui l'organismo ancora non è stato rilevato ed è pertanto più idonea all'uso nelle zone cuscinetto e nelle aree indenni

Pertanto, secondo le tabelle dello standard ISPM31, con tasso di presenza di piante infette dello 0,5% ed un livello di confidenza di almeno il 90%, il numero minimo dei campioni da prelevare nella zona infetta è 459.

Nelle Linee guida redatte da EFSA la distribuzione spaziale dei punti di prelievo dei campioni non è stabilita. Come negli anni precedenti è stato scelto di suddividere cartograficamente tutta la superficie della zona infetta in quadranti omogenei di 25m di lato. Suddividendo il numero totale dei campioni per il numero totale dei quadranti si ottiene la "cadenza" di campionamento, cioè quanti campioni si devono prelevare per ogni singolo quadrante. In questo modo il campionamento coprirà in modo omogeneo tutte le aree.

Le zone infette da indagare sono in totale 176, con una superficie totale di circa 263 ha,

5.2 Specie da indagare

Ai fini di una migliore conoscenza della distribuzione del batterio sulle diverse specie vegetali presenti nel territorio del Comune di Monte Argentario, si ritiene opportuno proseguire nel

prelievo di campioni dalle piante specificate meno indagate finora e/o mai risultate infette o risultate infette con una frequenza limitata. Pertanto almeno il 50% dei campioni sarà rappresentato da tali specie (per l'elenco delle specie vedasi il par. 6.2). Potranno essere previste eccezioni per motivazioni scientifiche.

5.3 Distribuzione dei campioni da prelevare

Al fine di effettuare una ripartizione omogenea dei campioni sul territorio, la superficie di ciascuna zona infetta è stata suddivisa in quadranti di 25 ml di lato con una superficie di 625 mq ciascuno, codificati in cartografia con la lettera "a" e un numero univoco, per un totale di 6528 quadranti compresi nel perimetro delle zone infette. In base alle tabelle ISPM 31 si è previsto il prelievo di almeno 460 campioni. La distribuzione dei campioni nelle zone infette e nei quadranti è determinata principalmente dalla frequenza di campionamento che in questo caso è di un campione ogni 14 quadranti; le modalità di dettaglio saranno comunicate dal SFR agli affidatari durante la riunione preliminare. Si deve considerare che il calcolo della frequenza di campionamento non include la zona infetta di Fonteblanda, sulla quale è già stato eseguito un campionamento completo da parte del SFR. Per le restanti zone infette, ogni area dovrà essere raggiunta e dovrà essere oggetto di campionamento.

5.4 Organizzazione delle indagini

Le indagini nelle zone infette saranno effettuate con la partecipazione del Dipartimento DAGRI dell'Università di Firenze, nell'ambito dell'accordo di collaborazione scientifica stipulato con tale Dipartimento e del personale qualificato di una ditta esterna.

Prima dell'inizio delle operazioni sono previste riunioni organizzative fra il SFR, il DAGRI e la ditta esterna, al fine di coordinare le modalità di lavoro e la ripartizione dei compiti e di perseguire obiettivi tecnico scientifici di comune interesse, in particolare per quanto concerne l'attività effettuata dal DAGRI. A ogni soggetto verranno assegnate specifiche zone infette in modo da non sovrapporre le attività di campionamento.

Si stima di completare la realizzazione delle indagini nelle zone infette entro la fine del mese di Dicembre 2024.

6 Indagini nelle zone cuscinetto

6.1 Metodologia adottata (RiPEST)

La zona cuscinetto, così come previsto dal piano di azione, ha una larghezza di 2,5 Km a partire dal confine con la zona infetta. La programmazione delle indagini ed il calcolo del numero dei campioni sono stati effettuati seguendo le linee guida EFSA e applicando RiPEST, lo strumento di calcolo fornito da EFSA idoneo per le zone dove non è nota la presenza dell'O.N.. Tale strumento consente di impostare le indagini per accertare l'assenza (o l'eventuale presenza al di sotto di un certo tasso) di piante infette, con una confidenza nota della rilevazione. Per le aree cuscinetto l'art.10 stabilisce che il piano d'indagine deve permettere di rilevare un tasso di presenza di piante infette del 1% con un livello di confidenza di almeno il 90%.

Sulle linee guida EFSA e sulla Pest Survey Card sono elencati gli elementi essenziali per poter programmare le indagini con l'uso di RiPEST. Tale strumento è previsto anche nel Reg. (UE) 2020/1201 Allegato V.

Secondo gli esempi di programmazione delle indagini in area demarcata con utilizzo del RiPEST, presentati sulla linee guida per Xylella elaborate da EFSA la metodologia da utilizzare prevede le seguenti fasi da seguire per l'implementazione delle indagini:

- 1- individuazione della popolazione ospite nell'area di indagine
- 2- calcolo della dimensione del campione

3- allocazione del campione nell'area di indagine, considerando i fattori di rischio.

6.1.1 Suddivisione delle aree e individuazione della popolazione ospite nell'area di indagine

La popolazione vegetale ospite nella zona cuscinetto dell'area demarcata di Monte Argentario e Orbetello è molto varia per tipologia di ambienti e per numero di specie. Sono presenti ambienti con vegetazione tipicamente lagunare, dunale, retrodunale, zone agricole, boschi di conifere, garighe, ecc.. Per questo motivo è utile definire più zone omogenee in cui eseguire le indagini. Le linee guida EFSA indicano il concetto di unità epidemiologica (UE), intesa come un'area omogenea in cui le interazioni tra il parassita, le piante ospiti, i fattori e le condizioni abiotiche e biotiche darebbero luogo a un'epidemiologia simile, qualora il parassita fosse presente.

La zona cuscinetto pertanto è stata suddivisa in base alle caratteristiche del territorio, per zone omogenee dal punto di vista delle possibilità di insediamento, in 6 unità epidemiologiche:

- 1- Orbetello mare (UE caratterizzata da vegetazione arborea forestale e arbustiva naturale e retrodunale): codice quadranti "d" e "j";
- 2- Orbetello laguna (UE caratterizzata dalla presenza di campi coltivati): codice quadranti "e" e "k";
- 3- Orbetello urbano (UE caratterizzata dalla presenza di aree urbane): codice quadranti "c" e "h";
- 4- Argentario (UE con prevalenza di macchia mediterranea): codice quadranti "b" e "f";
- 5- Feniglia (UE con prevalenza di foresta di conifere): codice quadranti "g";
- 6- Fonteblanda(UE con prevalenza di aree agricole): codice quadranti "n" e "o".

In ogni UE, in base all'uso prevalente del suolo, è stato stimato il numero di piante presenti. Gli usi del suolo attribuiti ad ogni UE sono stati i seguenti indicati tra parentesi:

- 1- Orbetello mare (aree forestali)
- 2- Orbetello laguna (aree coltivate)
- 3- Orbetello urbano (aree urbane)
- 4- Argentario (aree a macchia mediterranea)
- 5- Feniglia (aree forestali)
- 6- Fonteblanda(aree coltivate).

La stima del numero di piante ospiti è necessaria per il calcolo del numero dei campioni attraverso il software RiPEST.

6.1.2- Calcolo della dimensione del campione

Lo strumento "RiPEST" fornisce il numero dei campioni da prelevare per avere la certezza (con un certo livello di confidenza) che l'O.N. sia assente. I fattori di input necessari per implementare RiPEST sono la popolazione numerica (in questo caso finita), il livello di confidenza da raggiungere, il tasso di presenza di piante infette, e la sensibilità del metodo. Come riportato all'art. 10 del Reg.(UE) 2020/1201 il livello di confidenza e il tasso di presenza di piante infette sono definiti per la zona cuscinetto rispettivamente al 90% ed al 1%. La sensibilità del metodo invece è stabilita dal prodotto tra l'efficacia diagnostica e l'efficienza di campionamento, così come definite nelle linee guida EFSA. L'efficacia diagnostica è rappresentata dalla probabilità di ottenere un'analisi positiva da un campione sicuramente positivo (infetto). Tale valore è fornito dal laboratorio del SFR Toscana ed è pari al 90%, sulla base di una media tra diverse analisi su diverse piante ospiti di *Xylella fastidiosa*. L'efficienza di campionamento invece è la probabilità di campionare una parte di pianta infetta da una pianta sicuramente infetta. Data l'esperienza acquisita in campo dagli ispettori del SFR e dal personale impegnato nelle indagini sul focolaio di Monte Argentario l'efficienza di campionamento si può ritenere pari all'80%. In generale quindi la sensibilità del metodo adottata nel calcolo del campione è del 72% (90%x80%).

RIPEST considera tutti questi parametri ed anche i fattori di rischio presenti. L'art. 10 del Reg. (UE) 2020/1201 indica che i primi 400m attorno alle zone infette presentano un livello di rischio più elevato. In conseguenza di questo è stata considerata la distanza dei primi 400m della zona cuscinetto come fattore di rischio, assumendo di avere una probabilità doppia (livello di rischio "2") di ritrovare piante infette in questa zona e di avere invece una probabilità "base" (livello di rischio "1") nella restante parte della zona cuscinetto. Tali fattori sono indicati in cartografia con un diverso codice di quadrante.

I valori sopra esposti rappresentano gli input per calcolare la dimensione del campione attraverso RIPEST.

In base a quanto sopra, nella zona cuscinetto dovranno essere prelevati in totale 561 campioni di cui 166 nei primi 400 m e 395 nella restante parte della zona cuscinetto.

6.1.3 Localizzazione del prelievo dei campioni nell'area di indagine, considerando i fattori di rischio

L'art. 10 del Reg.(UE) 2020/1201 considera i primi 400m attorno alle zone infette come aree aventi un rischio più elevato. In conseguenza di questo i campioni calcolati con RIPEST sono distribuiti in ogni Unità epidemiologica in 2 parti, in modo da assegnare più campioni alla zona con maggiore rischio di infestazione.

Come nella zona infetta, anche in quella cuscinetto il prelievo dei campioni deve coprire tutta l'area di indagine, in maniera quanto più possibile uniforme. Per questo motivo anche la zona cuscinetto è stata suddivisa in quadranti di 100m di lato, nella zona dei primi 400m di raggio, e di 1Km nella restante parte della zona. Tale suddivisione permette un campionamento più puntuale e intenso nella parte di zona con maggiore rischio (primi 400m).

I quadranti compresi entro i 400 m della zona cuscinetto sono 4168. Per la restante parte (ulteriori 2100 m), il numero totale dei quadranti è 157.

Suddividendo successivamente il numero totale dei campioni per il numero totale dei quadranti si ottiene la "cadenza" di campionamento, cioè quanti campioni si devono prelevare per ogni singolo quadrante di ogni fattore di rischio (< o > di 400 m) in ogni Unità epidemiologica. In questo modo il campionario arriverà a campionare tutto il territorio interessato dall'indagine.

Il numero dei campioni e la cadenza di campionamento varia per ogni unità epidemiologica e sarà fornito dal SFR ai soggetti coinvolti nella riunione preliminare.

6.2. Modalità operative per la realizzazione del campionamento nella zona cuscinetto

Al fine di individuare con maggiore probabilità l'eventuale espansione dell'organismo nocivo, i campioni in zona cuscinetto dovranno essere costituiti per almeno l'80% da ospiti preferenziali, cioè piante che nell'area sono state colpite più frequentemente da *Xylella fastidiosa*, appartenenti alle seguenti specie:

Spartium junceum (Ginestra), *Rhamnus alaternus* (Alaterno), *Cistus monspeliensis*, *C. creticus*, *C. salviifolius* (Cisti), *Laurus nobilis* (Alloro), *Prunus dulcis* (Mandorlo), *Polygala myrtifolia*.

Eventuali deroghe saranno possibili se concordate con il SFR.

Durante il campionamento si procede quindi con l'individuazione delle piante ospiti o sospette effettuando le seguenti operazioni:

- Individuare le unità epidemiologiche e i fattori di rischio indicate sulle mappe e individuare la cadenza media in base al numero di quadranti presenti.
- Percorrere il quadrante seguendo i percorsi già presenti; rilevare la presenza di piante sintomatiche, da campionare prioritariamente. In assenza di percorsi percorribili e/o piante sintomatiche, i campioni dovranno essere comunque prelevati nella vegetazione presente nel quadrante.

7 Modalità operative generali

7.1 Preparazione delle ispezioni

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 delle aree delimitate predisposto dal SFR e accedere alle mappe relative alle zone assegnate. I rilievi devono essere registrati sulla stessa *App* 'FitoSIRT'.

Gli operatori devono essere dotati degli strumenti necessari per il campionamento (buste sigillo, fascette a strozzo, forbici, disinfettante, ecc.).

7.2 Modalità operative per la realizzazione del campionamento

Il campionamento deve essere effettuato rispettando la cadenza stabilita, in caso di problemi per l'accesso ai quadranti o di non idoneità di alcuni al campionamento, è possibile passare al quadrante più vicino.

I campioni devono essere prelevati preferenzialmente lungo le strade o lungo i sentieri, scartando le zone difficilmente raggiungibili, le aree private chiuse, le aree troppo impervie o pericolose.

E' opportuno informare, i proprietari/conduttori dei terreni eventualmente presenti, sull'emergenza *Xylella fastidiosa* a Monte Argentario, sugli obblighi di legge e le relative sanzioni (D.Lgs.19/2021, art. 55, comma 15), sulle prescrizioni specifiche già emesse nei confronti dei proprietari/possessori delle superfici ricadenti in zona delimitata e sulle finalità delle indagini e della rimozione delle piante ricadenti in zona infetta.

Nel caso di diniego alle richieste di accesso NON è opportuno insistere, ricordare la possibilità di applicazione degli articoli 500 e 650 del codice penale e in ultimo che l'ispezione sarà comunque realizzata congiuntamente alla forza pubblica.

Procedere quindi al prelievo dei campioni, effettuando possibilmente per ogni quadrante da campionare, le seguenti operazioni:

- percorrere il quadrante seguendo i percorsi già presenti; rilevare la presenza di piante sintomatiche da campionare prioritariamente. In assenza di percorsi percorribili e/o piante sintomatiche, i campioni dovranno essere comunque prelevati dalla vegetazione presente nel quadrante;
- i campioni devono essere sempre prelevati da una singola pianta;
- segnare con una fascetta numerata ciascuna pianta campionata.

Nei punti in cui sono state rimosse piante infette verificare l'eventuale sviluppo di ricacci basali dalle ceppaie rimaste in loco. In caso di presenza di ricacci prelevare un campione al fine di verificarne l'eventuale infestazione, possibilmente utilizzando sul rilievo la modalità "ribattuta".

Qualora vengano ritrovate piante già campionate negli anni precedenti, tali piante possono essere ricampionate avendo l'accortezza di togliere la vecchia fascetta e apporre la nuova. In ogni caso le fascette delle precedenti campagne di monitoraggio potranno essere rimosse per un corretto smaltimento.

Le piante devono essere riconosciute e registrate con genere e specie evitando di inserire solo il genere seguito da "sp."

Il prelievo dei campioni dovrà essere registrato mediante tablet sull'Applicazione 'FitoSIRT' come segue

- Per ciascun quadrante da campionare è necessario aprire un verbale (monitoraggio area infetta o monitoraggio area cuscinetto). Indicare nel verbale il numero del quadrante a cui fa riferimento il verbale.
- Nel corso dell'indagine creare un rilievo per ciascuna specie vegetale. Nel caso di campionamento di più specie vegetali nello stesso quadrante aprire un nuovo rilievo per ciascuna specie vegetale.

- Effettuare la registrazione di ciascun campione prelevato all'interno del rilievo della specie campionata.
- Verificare sempre il corretto posizionamento geografico della pianta campionata sulla mappa e all'interno del quadrante; qualora il posizionamento automatico non sia corretto si potrà modificare in modalità "manuale".
- Applicare a ciascuna pianta campionata una fascetta numerata.

L'unità di base per il campionamento è la pianta singola, da cui deve essere prelevato un solo campione.

Le osservazioni dovranno essere rivolte in particolare sulle foglie "formate" (non più erbacee) presenti su rametti lignificati, poiché il batterio è confinato nei tessuti dello xilema, e quindi, normalmente i tessuti legnosi, i piccioli e le nervature centrali delle foglie sono le parti con le più alte concentrazioni batteriche..

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

Al fine di individuare le piante da campionare dovranno essere cercate le sintomatologie aspecifiche di solito assimilabili a bruscatore fogliare che in genere caratterizzano precocemente la presenza di infezioni di *Xylella fastidiosa*.

Nel focolaio di Monte Argentario la sintomatologia iniziale sopra descritta è stata riscontrata in particolare su *Polygala myrtifolia*, *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. *Salvia rosmarinus* 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.

Quindi, 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. 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 in numero da 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.

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.

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 villosa*, *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.*, *Salvia rosmarinus*, *Helichrysum italicum*, *Asparagus sp.* 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)

7.3 Misure di profilassi

Al fine di prevenire qualsiasi diffusione del batterio ad altre piante, è necessario che forbici, coltelli o altri attrezzi da taglio vengano disinfettati dopo ogni prelievo di campioni.

Il campione deve essere scosso, prima di essere posto nelle buste con nastro sigillo del SFR, per garantire l'assenza di vettori.

Al fine di scongiurare il rischio di trasporto passivo dei vettori è necessario che gli operatori impegnati nelle operazioni di 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*.

7.4 Analisi di laboratorio

I campioni prelevati dovranno pervenire il giorno stesso del prelievo al laboratorio SFR di Orbetello (GR) dove saranno stoccati nei frigoriferi in attesa di essere processati. 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 del SFR e inviate in sicurezza al laboratorio del SFR ufficialmente delegato alle attività analitiche (laboratorio di Pistoia (PT)).