

L'attività diagnostica del Laboratorio del Servizio fitosanitario regionale

Gian Luca Bianchi

Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione e assistenza tecnica

La recente riforma del regime fitosanitario europeo ha determinato un'importante evoluzione del sistema fitosanitario nazionale, costituito dal Servizio fitosanitario centrale e dai Servizi fitosanitari regionali e provinciali che svolgono il ruolo di autorità competente sul territorio. In questo contesto un ruolo fondamentale a supporto dell'attività istituzionale svolta dai Servizi fitosanitari regionali e provinciali viene esercitato dai laboratori designati all'esecuzione delle analisi ufficiali.

La globalizzazione (concetto estremamente ricorrente in tutti i contesti produttivi mondiali, in questo caso inteso come fenomeno di liberalizzazione degli scambi commerciali di piante e parti di piante) si caratterizza, oltre che per le opportunità commerciali per le imprese agricole e per i consumatori, anche per gli aspetti negativi legati alla diffusione di organismi nocivi alle piante. L'introduzione di nuove specie vegetali o di prodotti vegetali da altri continenti è sempre stata accompagnata dall'introduzione di nuovi parassiti, che possono essere diffusi anche tramite gli imballaggi di legno. Gli organismi nocivi per le piante o per i prodotti vegetali possono essere suddivisi come segue:

- Organismi da quarantena: sono organismi nocivi la cui identità è stata accertata, che non sono presenti nel territorio dell'Unione Europea (UE), oppure, se presenti, non sono ampiamente diffusi e sono in grado di introdursi, di insediarsi e di diffondersi all'interno dell'UE. Il loro ingresso determina un impatto economico, ambientale, sociale inaccettabile sul territorio in questione. Negli organismi da quarantena rientra, ad esempio, il batte-

rio *Xylella fastidiosa*. Gli organismi da quarantena possono essere ulteriormente suddivisi in:

- rilevanti per la UE prioritari, se il potenziale impatto economico ambientale o sociale sul territorio dell'Unione è più grave rispetto ad altri organismi nocivi da quarantena;
- rilevanti per la UE, quando possiedono lo status di organismi da quarantena soltanto all'interno della UE;
- Organismi nocivi regolamentati non da quarantena: si tratta di organismi ampiamente diffusi in UE e trasmessi prevalentemente da determinate piante da impianto. Vista la loro diffusione non rispondono più ai criteri di un organismo da quarantena ma, date le ripercussioni economiche inaccettabili che la loro comparsa potrebbe comportare, occorre adottare misure fitosanitarie a livello di materiale di moltiplicazione. Appartengono a questa categoria, in particolare, gli «organismi di qualità» noti nel settore della certificazione dei materiali di moltiplicazione, incluse le sementi.

L'Unione Europea con l'introduzione del regolamento (UE) 2016/2031 ha ridisegnato il sistema dei controlli fitosanitari a livello europeo imponendo una profonda riorganizzazione dei Servizi fitosanitari nazionali, anche in termini di adeguamento delle risorse umane, ampiamente sottodimensionate, almeno in Italia, accompagnata da nuovi adempimenti a carico degli operatori professionali anche in materia di controllo e tracciabilità dei vegetali immessi in commercio ed, in particolare, a carico delle imprese

vivaistiche chiamate a garantire sempre più la qualità fitosanitaria dei propri prodotti mediante un autocontrollo organizzato a livello aziendale. Successivamente, con l'approvazione del Regolamento di esecuzione (UE) 2019/2072, è stata aggiornata la lista degli organismi nocivi di quarantena e non specifici per ogni coltura. Attualmente nel regolamento sono presenti oltre 200 organismi di quarantena ed altrettanti organismi regolamentati non da quarantena. Le competenze del Servizio fitosanitario regionale in Friuli Venezia Giulia sono svolte dal Servizio fitosanitario e chimico, ricerca, sperimentazione ed assistenza tecnica dell'ERSA. L'attività svolta dal Servizio fitosanitario regionale è supportata dal punto di vista analitico dal Laboratorio di fitopatologia e biotecnologie dell'ERSA, che è stato designato laboratorio ufficiale del Servizio fitosanitario della Regione Friuli Venezia Giulia.

Storia

Il Laboratorio di biotecnologie dell'ERSA ha iniziato sulla sua attività nel 1999 svolgendo analisi per la determinazione di Organismi Geneticamente Modificati (OGM) in Mais e Soja ed è stato costituito formalmente come nuovo Laboratorio a sé stante nel 2001, su iniziativa della dott.ssa Maria Taccheo Barbina, all'epoca direttore del Servizio chimico-agrario e certificazione dell'ERSA che annoverava già il laboratorio di chimica-agraria, il laboratorio di analisi dei residui di fitofarmaci e la sezione di fitovirologia con il proprio laboratorio specializzato nell'e-

secuzione di analisi immunoenzimatiche ELISA per la diagnosi delle principali virosi di interesse regionale.

Agli inizi degli anni 2000 era sorto il problema della contaminazione accidentale delle sementi da Organismi Geneticamente Modificati (OGM) non autorizzati dall'Unione Europea, che aveva determinato una situazione di incertezza a danno degli agricoltori che utilizzavano lotti di sementi certificate ma talvolta contaminate a bassi livelli (< 1%) da OGM non autorizzati all'emissione nell'ambiente. Il problema si era manifestato in quanto sia il comparto sementiero che il sistema nazionale di controllo delle sementi, all'epoca facente capo all'Ente Nazionale delle Sementi Elette (ENSE), non erano sufficientemente strutturati per gestire questa problematica legata alla commistione tra le colture transgeniche e quelle tradizionali nei comprensori dedicati alla produzione di sementi di base di Mais e Soja. Questa situazione di indeterminazione raggiunse il suo apice nel 2003 con il sequestro in tutta Italia e, limitatamente alla regione Piemonte, anche con la distruzione, prima della raccolta, di centinaia di ettari di mais coltivati con una varietà certificata ma risultata successivamente contaminata accidentalmente da un OGM non autorizzato. Pertanto, per fare fronte a questa situazione di emergenza, è stato costituito il Laboratorio di biotecnologie che ha fornito per molti anni un servizio di analisi sia per le attività di autocontrollo svolte dalle ditte sementiere e dai centri di raccolta, nonché per attività preventive di mo-



Strumento Qiasymphony per estrazioni automatiche degli acidi nucleici.

onitoraggio della qualità delle sementi certificate in collaborazione con varie aziende agricole singole e associate.

Negli anni il Laboratorio si è specializzato nell'esecuzione di analisi molecolari, in particolare real time PCR qualitative e quantitative, e nella messa a punto di protocolli diagnostici per la determinazione dei diversi OGM, costruendo la propria competenza in materia di analisi molecolari real time PCR, caratterizzate da maggiore sensibilità, specificità, velocità di esecuzione e sicurezza per l'operatore rispetto ai classici protocolli PCR qualitativi.

Successivamente, nel 2005 è iniziata la collaborazione con l'Osservatorio per le malattie delle piante di Pordenone, diretto all'epoca dal dott. Carlo Frausin, per l'esecuzione di analisi finalizzate alla diagnosi dei giallumi della Vite causati da Flavescenza dorata e Legno nero, culminata con la stesura e pubblicazione del primo protocollo per la diagnosi dei giallumi della Vite con tecnica real time PCR, nell'ambito di una collaborazione instaurata con l'Istituto Sperimentale per la Viticoltura di Conegliano (TV).

In seguito, nel 2007, la Regione ha avviato una prima riforma del sistema fitosanitario regionale con l'accorpamento dei quattro Osservatori delle malattie delle piante, uno per provincia, al Servizio chimico-agrario e certificazione dell'ERSA per costituire il Servizio fitosanitario e chimico in seno all'ERSA con a capo il dott. Carlo Frausin. Dall'anno 2007 pertanto il Laboratorio di biotecnologie è diventato la struttura interna di riferimento del Servizio fitosanitario regionale per l'esecuzione delle attività di diagnosi fitopatologiche con metodi molecolari. Negli anni successivi in capo al Laboratorio di biotecnologie sono state affidate progressivamente anche le competenze per la diagnosi degli organismi nocivi con tecniche immunoenzimatiche (ELISA test) e microbiologiche.

Con la recente riforma del settore fitosanitario nazionale il Laboratorio è stato designato come Laboratorio ufficiale del Servizio fitosanitario regionale del Friuli Venezia Giulia ed inserito nell'elenco nazionale dei laboratori ufficiali predisposto dal MiPAAF con nota n. 9048900 del 10/08/2020.

Attualmente il Laboratorio di Fitopatologia e Biotecnologie svolge analisi:

- a supporto delle attività di controllo ufficiale

e delle attività sperimentali del Servizio fitosanitario regionale;

- su richiesta di altri Enti e Servizi della Regione o di altri Servizio fitosanitari;
- per il pubblico, a supporto del comparto agricolo regionale.

Contesto normativo

L'Unione Europea con proprio regolamento (UE) 2017/625, successivamente integrato con il regolamento (UE) 2021/1353, ha profondamente rinnovato tutta la normativa relativa ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari.

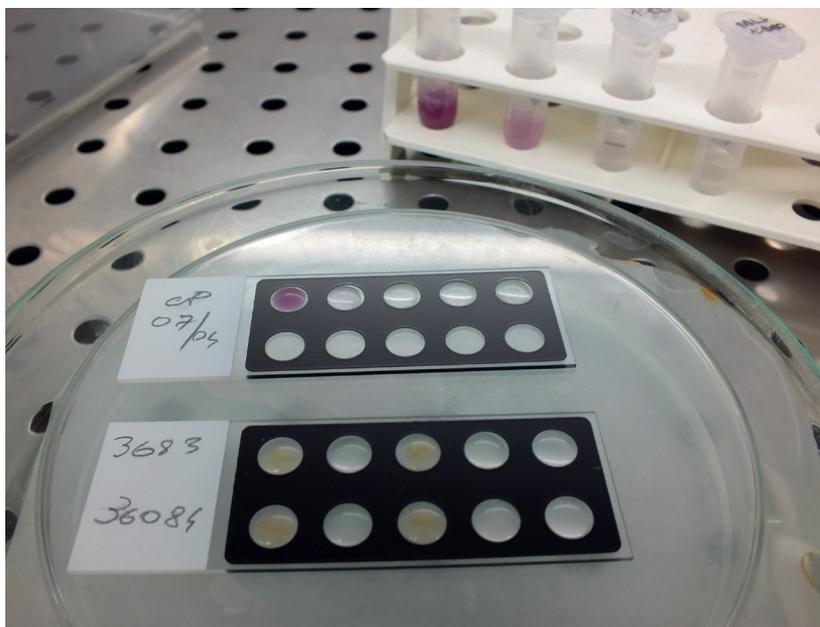
L'entrata in vigore di tale regolamento ha determinato sia l'aggiornamento che l'abrogazione di tutta una serie di regolamenti europei relativi alle tematiche in oggetto.

In particolare, il regolamento all'art. 37 - Designazione dei laboratori ufficiali, al comma 4 dispone che:

Le autorità competenti possono designare come laboratorio ufficiale un laboratorio che:

- a) possiede l'esperienza, le attrezzature e le infrastrutture necessarie per effettuare analisi, prove o diagnosi sui campioni;
- b) dispone di un numero sufficiente di addetti adeguatamente qualificati, formati ed esperti;
- c) garantisce che i compiti attribuitigli ai sensi del paragrafo 1 sono effettuati in modo imparziale ed esente da qualsiasi conflitto di interessi per quando riguarda l'adempimento dei propri compiti in qualità di laboratorio ufficiale;
- d) è in grado di fornire tempestivamente i risultati delle analisi, prove o diagnosi effettuate sui campioni prelevati durante i controlli ufficiali e le altre attività ufficiali;
- e) opera secondo la norma EN ISO/IEC 17025 ed è stato accreditato secondo tale norma da un organismo nazionale di accreditamento operante in conformità del regolamento (CE) n. 765/2008.

La conseguenza più importante di questo regolamento nel settore fitosanitario è stato sicuramente l'obbligo posto a carico dei laboratori ufficiali



Vetrini di immunofluorescenza per il rilevamento di *Ralstonia solanacearum* in estratti di patata.

di essere accreditati ai sensi della norma EN ISO/IEC 17025 (in Italia recepita come UNI CEI EN ISO/IEC 17025) sulla base di un riconoscimento rilasciato dall'organismo nazionale di accreditamento operante in conformità del regolamento (CE) n. 765/2008 (in Italia l'ente nazionale di accreditamento è ACCREDIA). Tale requisito esisteva già per tutti gli altri laboratori ufficiali operanti negli altri settori (alimentare, zootecnico, ambientale, ecc.) ai sensi del regolamento (CE) 882/2004.

L'accREDITAMENTO ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 – Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prove e taratura è l'attestazione da parte di un organismo terzo (ACCREDIA) che garantisce gli utenti, attraverso verifiche tecniche periodiche, sulla competenza ed imparzialità dei Laboratori nell'effettuazione delle prove accreditate. I requisiti del sistema di gestione risultano allineati con la norma internazionale ISO 9001 e vengono applicati all'intera organizzazione dei Laboratori, mentre i requisiti tecnici coinvolgono le sole prove accreditate. L'accREDITAMENTO costituisce attestazione di competenza tecnica e gestionale del laboratorio ma non costituisce una garanzia rilasciata da ACCREDIA sulle singole operazioni eseguite.

L'accREDITAMENTO ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 riguarda singole prove, intese come metodi di analisi o prova eseguiti su distinte matrici vegetali e con una specifica tecnica di prova per la determinazione di un target

diagnostico (un organismo nocivo nel settore della sanità delle piante) ben definito. Esiste anche la possibilità di accreditare prove con scopo flessibile, quindi con la possibilità di analizzare più organismi nocivi su diverse matrici. Tale opportunità, molto utile nel caso di Laboratori che devono svolgere analisi su molti target, però non è semplice da applicare e richiede comunque un notevole impegno dal punto di vista gestionale in termini di verifica delle prestazioni del metodo di prova.

L'accREDITAMENTO ha un costo importante a carico del laboratorio, sia per la gestione del sistema di qualità e delle prove accreditate, che per il mantenimento della convenzione con l'ente nazionale di accREDITAMENTO.

Il Laboratorio di fitopatologia e biotecnologie dell'ERSA è stato il primo Laboratorio di un Servizio fitosanitario italiano ad ottenere l'accREDITAMENTO ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, già nel 2013 per l'effettuazione di analisi di OGM e poi, nel 2014, per l'esecuzione di analisi fitopatologiche per la diagnosi dei Virus della Vite regolamentati dal D.M. 07/07/2006 con il metodo ufficiale di diagnosi basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA.

I laboratori ERSa sono accreditati ACCREDIA n. 1355. L'elenco delle prove accreditate è disponibile sia sul sito ACCREDIA che sul sito www.ersa.fvg.it.

Competenze

Con l'entrata in vigore dell'obbligo di accREDITAMENTO ai sensi della norma EN ISO/IEC 17025, divenuto un requisito cogente a partire dal 29 aprile 2022, l'Unione Europea ha imposto ai laboratori ufficiali operanti nel settore fitosanitario sia l'adozione di un sistema di gestione della qualità conforme alla norma ISO 9001 che l'obbligo di accREDITARE le singole prove per la diagnosi dei vari organismi nocivi. In considerazione dell'elevato numero di metodi di prova per la diagnosi di diversi organismi nocivi, il regolamento (UE) 2017/625 prevedeva una serie di deroghe temporanee di cui potevano avvalersi i laboratori ufficiali del settore.

Con la successiva emanazione del regolamento (UE) 2021/1353 l'Unione Europea ha previsto per i laboratori ufficiali operanti nel settore

della sanità delle piante un ulteriore regime di deroga rispetto ai requisiti applicati per i laboratori operanti negli altri settori (alimenti, salute animali, mangimi, ecc.). In teoria tutte le analisi ufficiali dovrebbero essere svolte con metodi di prova accreditati ai sensi della norma EN ISO/IEC 17025. Per i laboratori che operano nel settore della sanità delle piante tale obiettivo è impossibile da raggiungere a causa del numero elevatissimo di organismi nocivi e matrici da analizzare, considerata anche l'impossibilità di svolgere analisi multiple, come invece possibile per alcuni tipi di analisi chimiche, e tenuto conto dei relativi costi da sostenere per l'ottenimento di tali accreditamenti.

L'art. 3 - Laboratori ufficiali nel settore della sanità delle piante - del regolamento delegato (UE)

2021/1353 infatti dispone che: *Le autorità competenti possono designare come laboratori ufficiali nel settore della sanità delle piante laboratori che non soddisfano le condizioni di cui all'articolo 37, paragrafo 4, lettera e), del regolamento (UE) 2017/625, per tutti i metodi di analisi, prova o diagnosi di laboratorio da essi impiegati per i controlli ufficiali o le altre attività ufficiali, a condizione che: "il laboratorio sia già accreditato per almeno uno dei metodi elencati nelle categorie di cui all'allegato per l'impiego su un organismo nocivo appartenente allo stesso gruppo di organismi cui appartiene l'organismo nocivo per il quale è impiegato il metodo non accreditato".*

Poiché i controlli ufficiali del settore della sanità delle piante prevedono l'analisi di organismi no-

Tabella 1:
Elenco prove accreditate ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Matrice	Organismi nocivi/OGM	Classe Organismi nocivi	Tecnica di prova
Estratto di tessuto di tubero di patata, Isolati batterici, Patate	<i>Ralstonia pseudosolanacearum, Ralstonia solanacearum, Ralstonia syzygii</i> (Phy I-IV)	Batteri	Biologia molecolare: PCR-real time e PCR-elettroforesi capillare/ Indirect Fluorescent antibody test IFA/ Metodo colturale + PCR-real time/Prove in vivo/
Funghi, Legno di Platano	<i>Ceratocystis platani</i>	Funghi	microscopia ottica + PCR-real time
Foglie e parti legnose di vite, Tessuto floematico da materiale legnoso di vite del periodo invernale	ArMV (<i>Arabis mosaic virus</i>), GfKV (<i>Grapevine fleck virus</i>), GFLV (<i>Grapevine fanleaf virus</i>), GLRaV-1 (<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>), GLRaV-2 (<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>), GLRaV-3 (<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>), GVA (<i>Grapevine virus A</i>), GVB (<i>Grapevine virus B</i>)	Virus	Biologia molecolare: PCR-real time
Terreni	<i>Xiphinema index</i>	Nematodi	microscopia ottica + PCR-real time
Tessuto floematico da materiale legnoso di vite del periodo invernale	ArMV (<i>Arabis mosaic virus</i>), GFLV (<i>Grapevine fanleaf virus</i>), GLRaV-1 (<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>), GLRaV-3 (<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>), GVA (<i>Grapevine virus A</i>)	Virus	Immunoenzimatica: ELISA
Piante e parti di piante di Olea europea, Vite	<i>Xylella fastidiosa</i>	Batteri	Biologia molecolare: PCR-real time
Foglie e parti legnose di vite	<i>Xylophilus ampelinus</i>	Batteri	Biologia molecolare: PCR-real time
Foglie e parti legnose di vite	Flavescenza dorata, Legno nero	Fitoplasmi	Biologia molecolare: PCR-real time
Alimenti - solo Mais e Soia	Organismi Geneticamente Modificati (OGM)/Genetically modified organisms (GMOs): Promotore 35S CaMV/35S CaMV-promoter	OGM quantitativo/ qualitativo	Biologia molecolare: PCR-real time

Tabella 2:
Prospetto riepilogativo
delle analisi svolte
dal laboratorio
di fitopatologia e
biotecnologie dal 1999
al 2021.

Tipo analisi	Periodo	Campioni	Totale analisi	O.N./OGM analizzati	Target diagnostico
Molecolari OGM	1999-2021	16.630	828.002	7	OGM in Mais e Soja
Molecolari O.N.	2005-2021	49.426		172	Batteri, Funghi, Fitoplasm, Virus e Viroidi, Nematodi
Immunoenzimatiche ELISA	2009-2021	132.475	198.712	5	Virus
Immunoenzimatiche IF	2007-2021	1.980	1.980	1	Batteri
Riconoscimento morfologico	2012-2021	3.780	3.780	181	Batteri, Funghi, fisiopatie, Nematodi
Totale	1999-2021	204.291	1.032.474	366	

civi appartenenti alle classi dei Batteri, Funghi, Fitoplasm, Virus e viroidi, Nematodi, Insetti ed acari, con questa norma i laboratori ufficiali designati dai Servizi fitosanitari regionali possono svolgere qualsiasi analisi ufficiale, anche metodi di prova non accreditati EN ISO/IEC 17025, purché siano in possesso di un accreditamento per almeno un metodo di prova su un organismo nocivo appartenente alle classi sopracitate.

In sostanza la UE ha accettato il principio per cui se un laboratorio europeo è accreditato EN ISO/IEC 17025 per lo svolgimento di un'analisi di un organismo nocivo appartenente ad una specifica classe con una determinata tecnica di prova, si ritiene altrettanto competente per svolgere lo stesso tipo di analisi anche su altri organismi nocivi della stessa classe nelle medesime condizioni operative.

In considerazione di tale principio, il laboratorio di fitopatologia e biotecnologie, al fine di garantire la massima copertura delle analisi richieste per i controlli ufficiali e le altre attività ufficiali, ha pianificato un percorso di sviluppo delle prove accreditate UNI CEI EN ISO/IEC 17025, in funzione dell'importanza e della numerosità dei campioni ricevuti, per accreditare le principali tecniche di prova utilizzate per la diagnosi delle diverse classi di organismi nocivi come riportato in Tabella 1.

Attualmente il Laboratorio è in grado di coprire, con almeno una prova accreditata, tutte le classi di organismi nocivi ad eccezione degli insetti ed acari, per i quali il Servizio fitosanitario regionale si avvale di un servizio di analisi in convenzione affidato al Laboratorio nazionale di riferimento del CREA.

Questo risultato è stato reso possibile grazie alla competenza e alla professionalità maturata dal

personale di laboratorio in oltre 20 anni di attività. Attualmente l'organigramma del laboratorio è costituito da 8 analisti, 4 assunti con contratto a tempo indeterminato e 4 con contratto a tempo determinato, somministrati tramite Agenzia interinale. Tutti gli analisti sono laureati in discipline attinenti alle finalità analitiche del Laboratorio, quali Scienze agrarie, Biotecnologie agrarie, Biologia, Scienze della produzione animale e Scienze della preparazione alimentare, con precedenti percorsi di specializzazione, dottorati di ricerca in biotecnologie e difesa delle piante, e/o attività di ricerca presso le Università di Udine e Trieste.

Attività

Gli ambiti di interesse principale dei controlli ufficiali e delle relative analisi svolte dal Laboratorio sono:

- Controlli all'importazione: il Porto di Trieste è uno dei maggiori e più importanti punti di ingresso di vegetali e prodotti vegetali, con particolare riferimento per le importazioni di patate dall'Egitto, in quantità superiori a 20.000 tonnellate/anno;
- Controlli all'esportazione: il sistema vivaistico viticolo regionale è il più importante al mondo con circa 100.000.000 di piante di vite prodotte ogni anno, di cui quasi il 40% esportato in oltre 50 paesi europei ed extra-europei;
- Controlli alla produzione: con oltre 2.000 ettari di superficie di vigneti destinati ad attività vivaistiche e circa 1.000 ettari di vivaio, il Friuli Venezia Giulia è la regione più importante al mondo per la produzione di piante innestate di Vite (barbatelle);
- Monitoraggio del territorio rispetto ad orga-

nismi nocivi regolamentati di quarantena e non.

Il laboratorio non svolge i campionamenti, che sono effettuati direttamente dagli Ispettori fitosanitari o tecnici incaricati del Servizio fitosanitario regionale o dai vari committenti delle attività analitiche.

Attualmente il laboratorio è in grado di svolgere la diagnosi di oltre 200 diversi organismi nocivi o gruppi di organismi nocivi regolamentati, a livello di genere o di singola specie, appartenenti alle classi dei Batteri, dei Funghi, dei Fitoplasmidi, dei Virus e viroidi e dei Nematodi con tecniche molecolari, immunoenzimatiche e di riconoscimento morfologico. Nella Tabella 2 sono riepilogati i campioni e le analisi svolte dal laboratorio a partire dall'anno 1999 fino all'anno 2021.

La maggior parte delle analisi svolte sono a supporto dell'attività di controllo e certificazione del comparto viticolo vivaistico regionale in quanto il Friuli Venezia Giulia è leader mondiale nella produzione di piante di vite innestate (barbatelle) con oltre 3000 ettari di superficie destinata alle produzioni vivaistiche che sono soggetti al controllo ufficiale da parte degli ispettori e tecnici del Servizio fitosanitario regionale.

Le principali attività del laboratorio comprendono:

ANALISI MOLECOLARI per il controllo ufficiale dello stato sanitario delle colture vegetali e delle relative produzioni regionali, in fase di importazione, in fase di esportazione, in fase di produzione, per attività di monitoraggio del territorio e a supporto dell'utenza pubblica e privata.

Di seguito si riepilogano le principali attività svolte, suddivise per organismi nocivi

- Analisi real time PCR per l'attività di controllo fitosanitario dei giallumi della vite: ogni anno vengono analizzate centinaia di piante, raccolte da Ispettori fitosanitari o da tecnici incaricati dal Servizio fitosanitario nei diversi vigneti di piante madri e da barbatellai della regione Friuli Venezia Giulia, con sintomi di giallumi riferibili a Flavescenza Dorata o a Legno Nero o per finalità di certificazione di barbatelle destinate all'export (Tabella 3).
- Analisi real time PCR per l'attività di monitoraggio della presenza di *Xylella fastidiosa* in Vite, Olivo e altre piante ospiti, sia coltivate che spontanee, ai fini dell'attestazione dello status di pest free area o per finalità di certificazione di barbatelle destinate all'export.

Anno	Piante	Campioni	Negativi	FD	BN	BN+FD
2006	856	483	9,11%	2,86%	86,75%	1,24%
2007	1475	690	14,06%	5,94%	78,70%	1,30%
2008	1206	584	6,68%	2,40%	89,38%	1,54%
2009	1672	686	4,52%	7,87%	84,84%	2,62%
2010	967	496	10,48%	10,48%	74,40%	4,44%
2011	863	365	6,58%	15,34%	73,97%	4,11%
2012	1321	664	13,40%	13,86%	67,77%	4,82%
2013	970	577	9,36%	28,77%	55,98%	5,89%
2014	1487	785	12,74%	23,18%	56,31%	7,77%
2015	739	427	15,22%	26,93%	46,60%	11,24%
2016	748	409	8,56%	33,74%	38,39%	19,32%
2017	972	695	13,09%	41,29%	35,68%	9,93%
2018	729	394	14,21%	25,89%	40,36%	19,54%
2019	1258	633	22,59%	40,44%	25,91%	11,06%
2020	1167	625	16,80%	25,44%	51,04%	6,72%
2021	801	622	11,25%	52,25%	31,83%	4,66%
TOTALE	17231	9135	11,79%	22,29%	58,62%	7,26%

Tabella 3:
Risultati delle analisi
per la determinazione
di Flavescenza dorata
(FD) e Legno nero (BN)
(2006-2021)

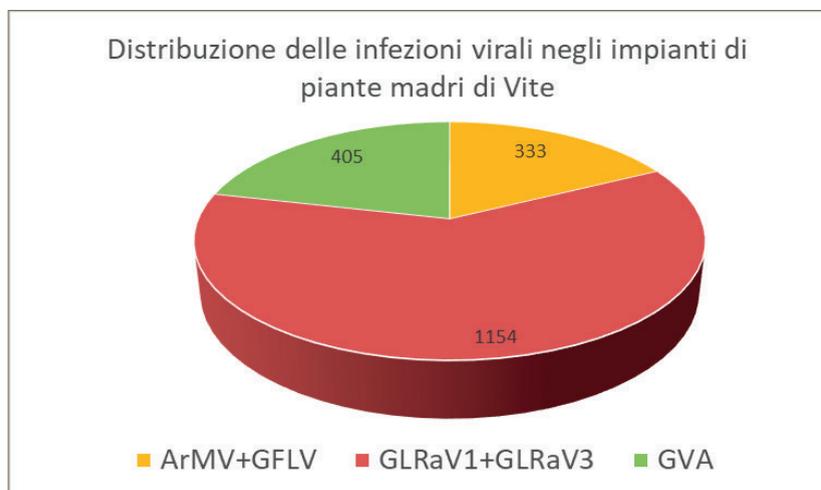


Figura 1:
Vigneti di piante madre di marze e portinesti positivi al saggio ELISA (2009-2021).

- Analisi PCR e real time PCR per il controllo di *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* su lotti di patate da consumo provenienti dall'Egitto, raccolti presso il porto di Trieste nell'ambito dei Programmi europei di controllo fitosanitario sull'importazione di materiale vegetale da Paesi Terzi, o su campioni di tuberi seme raccolti presso vari rivenditori di prodotti agricoli per finalità di monitoraggio.
- Analisi real time PCR per la verifica della presenza di *Xylophilus ampelinus* nei vigneti di piante madri di marze e portinesti su tralci e barbatelle.

ANALISI IMMUNOENZIMATICHE per l'accertamento di virus esenza nei campi di piante madri di marze e portinesto di Vite di categoria Certificato e Base e per il controllo di batteri fitopatogeni (*Ralstonia solanacearum*) sui lotti di patate da consumo importati dall'Egitto nell'UE attraverso il porto di Trieste.

Con l'emanazione del D.M. 7 luglio 2006, è stata resa obbligatoria la verifica dello stato sanitario dei materiali di moltiplicazione della vite con metodiche di laboratorio, al posto delle previgenti valutazioni visive. Con successivo Decreto del 13 dicembre 2011 è stato definito il protocollo di diagnosi ufficiale basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA. L'insieme delle norme prevedeva una serie di controlli in funzione delle diverse categorie (Materiale Iniziale, Base, Certificato, Standard) e considerava i seguenti organismi nocivi:

- agenti del complesso della degenerazione infettiva della vite: virus dell'arriccamento

della vite (*Grapevine fanleaf virus* - GFLV) e virus del mosaico dell'Arabis (*Arabis mosaic virus* - ArMV);

- agenti del complesso dell'accartocciamento fogliare della vite: virus 1 associato all'accartocciamento fogliare della vite (*Grapevine leaf roll associated virus 1* - GLRaV1) e virus 3 associato all'accartocciamento fogliare della vite (*Grapevine leaf roll associated virus 3* - GLRaV3);
- agente del complesso del legno riccio (*Grapevine virus A* - GVA).
- agente della maculatura infettiva (*Grapevine fleck Virus* - GFkV), limitatamente ai portinesti.

In conseguenza di tali norme, recentemente abrogate dal Decreto n. 16 del 02 febbraio 2021, che ha tuttavia mantenuto l'obbligatorietà dei controlli sui virus sopracitati, è stato posto in carico al Servizio fitosanitario regionale l'obbligo dei controlli con analisi immunoenzimatiche ELISA di tutti gli impianti di categoria certificato ogni 10 anni. Ai fini del controllo era sufficiente la presenza di una pianta positiva ad uno dei virus sopracitati per determinare la sospensione dell'impianto a fini vivaistici. Complessivamente sono stati controllati 4.443 vigneti, di cui 1.372 sono risultati positivi per la presenza di almeno una pianta infetta da uno dei virus regolamentati, con una percentuale di impianti infetti dopo 10 anni pari al 30,88%.

Si riportano in Figura 1 i dati relativi alla distribuzione delle varie virosi riscontrate negli impianti di piante madri di marze e portinesti di Vite risultati positivi.

ANALISI MOLECOLARI per la determinazione di OGM in sementi di Mais e Soja, piante ed altre produzioni vegetali a supporto dell'attività di controllo ufficiale e monitoraggio svolta dal Servizio Fitosanitario regionale o su incarico della Regione, nell'ambito del monitoraggio previsto dal Decreto 8 novembre 2017, Piano generale per l'attività di vigilanza sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, nonché a favore dell'utenza privata. Il Servizio fitosanitario regionale svolge un'attività di controllo sui lotti di semente di Mais e Soja importati in Italia da paesi terzi, principalmente Turchia e Serbia, attraverso i punti di entrata delle Dogane di Trieste, Gorizia ed Udine. L'attività è finalizzata alla verifica dell'assenza di conta-

Organismo Nocivo	Classe	Sintomatologia	Positivi
<i>Fusarium</i> sp.	Funghi	tracheomicosi e avvizzimenti	161
<i>Alternaria</i> sp.	Funghi	necrosi frutti e foglie	141
<i>Botryosphaeria</i> sp.	Funghi	cancri del legno, marciumi dei frutti	108
<i>Cryphonectria</i> sp.	Funghi	cancro del castagno	101
<i>Phytophthora</i> sp.	Funghi	marciumi radicali e del colletto	78
<i>Nectria</i> sp.	Funghi	cancri del legno	75
<i>Armillaria</i> sp.	Funghi	marciumi radicali	65
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	Funghi	marciumi radicali	46
<i>Erwinia</i> sp.	Funghi	marciumi e disseccamenti improvvisi	40
<i>Phoma</i> sp.	Funghi	necrosi fogliari	40
<i>Gloeosporium</i> sp.	Funghi	marciumi dei frutti	34
<i>Botrytis</i> sp.	Funghi	marciumi dei frutti e dei fiori	33
<i>Pythium</i> sp.	Funghi	marciumi radicali	33
<i>Colletotrichum</i> sp.	Funghi	necrosi foglie e frutti	31
<i>Rosellinia</i> sp.	Funghi	marciumi radicali	31
<i>Diplodia</i> sp.	Funghi	cancri del legno	30
<i>Plasmopara</i> sp.	Funghi	macchie e appassimenti fogliari	30
<i>Ceratocystis</i> sp.	Funghi	cancri del legno	27
<i>Pseudomonas</i> sp. (*)	Batteri	maculatura fogliare, cancri	27
<i>Verticillium</i> sp.	Funghi	tracheomicosi e avvizzimenti	27
Agenti di carie	Funghi	deperimento del legno	26
<i>Chalara</i> sp.	Funghi	deperimento dei frassini	25
<i>Phomopsis</i> sp.	Funghi	cancri corticali	25
<i>Fusicoccum</i> sp.	Funghi	cancri drupacee	24
<i>Penicillium</i> sp.	Funghi	marciumi frutti	23
<i>Rhizoctonia</i> sp.	Funghi	marciumi radicali	21
<i>Sclerotinia</i> sp.	Funghi	marciumi basali e frutti	20
<i>Coryneum</i> sp.	Funghi	vaioleure foglie e frutti	18
<i>Stemphylium</i> sp.	Funghi	necrosi fogliari	18
<i>Erysiphe</i> sp.	Funghi	Mal bianco delle foglie	15

Tabella 4:

Sintesi degli organismi nocivi maggiormente riscontrati nei campioni sottoposti a diagnosi basata sui caratteri morfologici nel periodo 2012-2021.

(*) I Batteri sono stati ulteriormente identificati a livello di specie mediante analisi molecolari.



Figura 2:
Stiletto di *Xiphinema
index*: con anello
guida e flange basali.

minazione accidentale da OGM rispetto ai requisiti previsti dal Decreto 27 novembre 2003 che prevedono una soglia tecnica di tolleranza pari al Limite di determinazione del metodo, fissato allo 0,05%. Tale attività, che prevede un'analisi quantitativa svolta dal Laboratorio mediante tecnica real time PCR e Digital PCR, si affianca ai controlli effettuati a livello nazionale dal Centro di Ricerca Difesa e Certificazione del CREA (CREA-DC) e dall'Ispettorato centrale della tutela della qualità e della repressione frodi dei prodotti agroalimentari (ICQRF) sempre con le stesse finalità. Questo servizio, che si affianca ai normali controlli fitosanitari svolti sulla semente di Mais per la verifica della presenza di *Pantoea stewartii* sub. *stewartii*, è un importante valore aggiunto per le imprese regionali di import/export. Il servizio di analisi svolto consente ai lotti di semente importati per il tramite delle Dogane del Friuli Venezia Giulia di poter essere gestiti e commercializzati dalle ditte sementiere con maggior velocità, grazie alla disponibilità di risultati analitici attestanti la conformità dei lotti di sementi analizzati, resi disponibili nell'arco di pochi giorni dal ricevimento in laboratorio. La disponibilità di un servizio di tale tipo ha un impatto anche sulle scelte strategiche delle ditte sementiere rispetto alla convenienza a svolgere la riproduzione del seme in determinati paesi extraeuropei e al conseguente flusso dei traffici commerciali. Notevole è anche la richiesta di analisi OGM su Soia da parte dell'utenza priva-

ta, che necessita di certificare l'assenza di contaminazioni da OGM nelle produzioni conferite ai centri di raccolta.

ANALISI MORFOLOGICHE per l'identificazione di batteri e funghi fitopatogeni e/o determinazione di fisiopatie su campioni ufficiali raccolti dagli Ispettori fitosanitari e su campioni consegnati dall'utenza privata (Agricoltori singoli e associati, liberi professionisti, hobbisti, tecnici dei consorzi di difesa). L'identificazione morfologica diretta prevede l'osservazione microscopica di strutture fungine già evidenti sul campione, se questo non è possibile, si procede con l'isolamento dell'agente patogeno su terreno di coltura idoneo per la crescita del micelio e osservazione al microscopio. Nell'identificazione e classificazione dei funghi vengono presi in considerazione parametri come: il tipo di riproduzione utilizzata, le caratteristiche del micelio vegetativo e la morfologia delle spore e delle strutture ifali. Si riporta in Tabella 4 l'elenco dei 30 generi fungini e batterici maggiormente riscontrati nei campioni consegnati al Laboratorio a seguito di identificazione morfologica negli ultimi 10 anni.

ANALISI MORFOLOGICHE per l'identificazione di Nematodi fitopatogeni su campioni ufficiali, raccolti dagli Ispettori fitosanitari e tecnici incaricati dal Servizio fitosanitario regionale, e su campioni consegnati dall'utenza privata (Agricoltori singoli e associati, liberi professionisti, hobbisti, tecnici dei consorzi di difesa). Gli organismi nocivi maggiormente soggetti all'attività di controllo sono i nematodi *Xiphinema index* (Fig. 2) e *Xiphinema diversicaudatum*, agenti vettori rispettivamente del Virus dell'arricciamiento *Grapevine fanleaf virus* e del Virus del Mosaico dell'Arabis. L'attività di controllo è prevista a carico dei terreni destinati a nuovi impianti di vigneti di categoria Base e certificato, nonché per i terreni destinati ad ospitare i vivai annuali di barbatelle. Nell'identificazione e classificazione dei nematodi vengono presi in considerazione parametri come: le misure delle varie porzioni dell'individuo, l'aspetto dei caratteri sessuali, la struttura dell'apparato boccale e dell'apparato digerente.

Conclusioni

Il Laboratorio di fitopatologie a biotecnologie svolge un'importante attività di analisi a supporto dei controlli ufficiali sulla sanità delle piante, per le attività sperimentali svolte dal Servizio fitosanitario dell'ERSA, nonché a favore dell'utenza privata, sia professionale che hobbistica. Nel corso di oltre 20 anni di attività, grazie agli investimenti sostenuti dall'ERSA, il Laboratorio è cresciuto progressivamente in termini di personale qualificato e di dotazioni strumentali, assolutamente adeguate per numero e caratteristiche, ha sviluppato competenze su tutte le principali tecniche di prova necessarie per la diagnosi delle diverse classi di organismi nocivi regolamentati ed ha conseguito l'accreditamento ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per un numero di prove sufficiente a garantire l'esecuzione delle analisi ufficiali su tutte le classi di organismi nocivi, ad eccezione degli insetti ed acari. In considerazione di queste caratteristiche il Laboratorio è sicuramente ai vertici nazionali in termini di campioni processati sia per tipologia che per numero di analisi svolte. La disponibilità di un servizio di tale tipo è un valore aggiunto per le imprese agricole della nostra regione in termini generali per la grande capacità di diagnosi qualificata di organismi nocivi delle diverse classi e, a livello vivaistico, per il supporto alla certificazione dei materiali di propagazione vegetale.

Esistono tuttavia ancora alcune criticità da superare. La diagnosi degli insetti regolamentati,

di quarantena e non, che viene svolta direttamente dagli ispettori fitosanitari con competenze in materia di riconoscimento morfologico e con il supporto del Laboratorio nazionale di riferimento del CREA nei casi critici, rappresenta un limite non trascurabile per l'attività di controllo ufficiale. Infatti l'identificazione morfologica non è sempre possibile ed i tempi tecnici per l'affidamento del servizio di diagnosi all'esterno sono poco compatibili con le tempistiche dell'importazione che richiedono risposte rapide per ridurre i costi a carico delle ditte importatrici. Per questa classe di organismi nocivi non ci sono molti metodi molecolari disponibili per un'analisi puntuale e specifica e l'identificazione deve essere effettuata ricorrendo a tecniche molecolari aspecifiche seguite da un sequenziamento, anche di tipo NGS, Next Generation Sequencing, di diversi geni costitutivi dell'insetto da identificare. Inoltre, per tale tecnica, si rende necessario uno sviluppo ed una messa a punto dei protocolli analitici per alcuni insetti che il Laboratorio non sarebbe in grado di svolgere con l'attuale organico a disposizione. Alle esigenze di ampliamento del personale in organico rispetto ai fabbisogni analitici futuri, si somma anche la precarietà di alcuni analisti del laboratorio, soggetti a limiti temporali e di rinnovo con la medesima agenzia interinale di somministrazione del lavoro, che costituisce un ulteriore fattore di rischio non trascurabile per l'operatività futura del laboratorio stesso.