



*"La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana
Anno 2021"*

Domenico Rizzo

Phytosanitary Service - Tuscany Region

La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021

Chi siamo (Laboratorio Servizio Fitosanitario della Regione Toscana)

La diagnosi di Flavescenza Dorata (in Toscana)

Aspetti operativi legati alle indagini territoriali del 2021 per FD

I laboratori del Servizio Fitosanitario della Regione Toscana

1. Laboratorio di Pistoia (principale)
2. laboratorio di Firenze, per il trattamento di tutti i campioni vegetali provenienti da territori esterni al distretto vivaistico pistoiese;
3. laboratorio di Livorno – Guasticce, per le analisi sui campioni prelevati presso il porto di Livorno e l'Aeroporto di Pisa (punti di entrata);
4. laboratorio di Orbetello (GR), per i campioni provenienti dall'area delimitata per *Xylella fastidiosa*.





Ubicazione laboratorio SFR di Pistoia

Il laboratorio principale è situato a Pistoia ed esegue la maggior parte delle analisi istituzionali a livello regionale (inclusa Flavescenza Dorata).

Nel laboratorio SFR di Pistoia vi lavorano due tecnici di laboratorio e il Responsabile dei Laboratori SFR.



Responsabile

Tecnico
Laboratorio

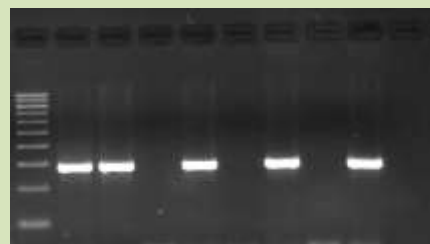
Tecnico
Laboratorio

Nel laboratorio SFR di Livorno lavora un tecnico coadiuvato da un ispettore fitosanitario.

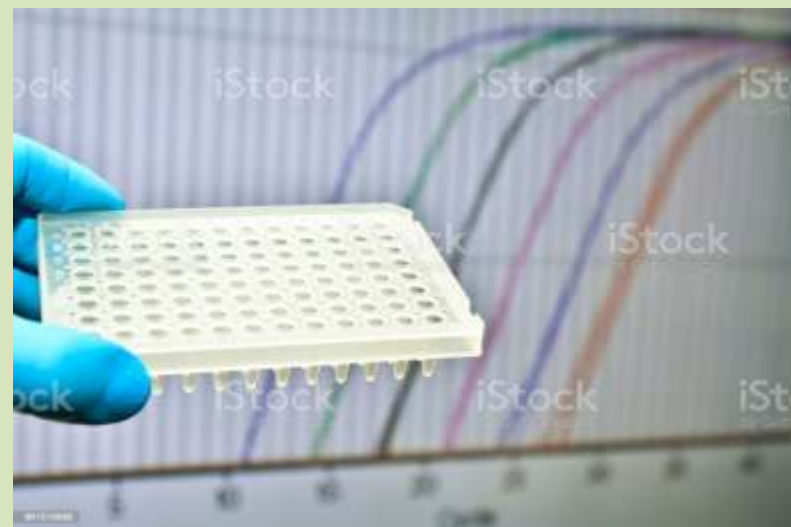
A Firenze vi è un referente tecnico - Ispettore fitosanitario che opera a seconda delle necessità



La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021



La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana - aspetti operativi



Attività di campionamento



**Inizio
attività**

- fine luglio –
metà agosto

**Fine
attività**

- Fine di
ottobre

La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021



Campione

10-15 foglie con picciolo
mostranti sintomi

Per ogni azienda oggetto
di monitoraggio si effettua
l'indagine su almeno due
vigneti.

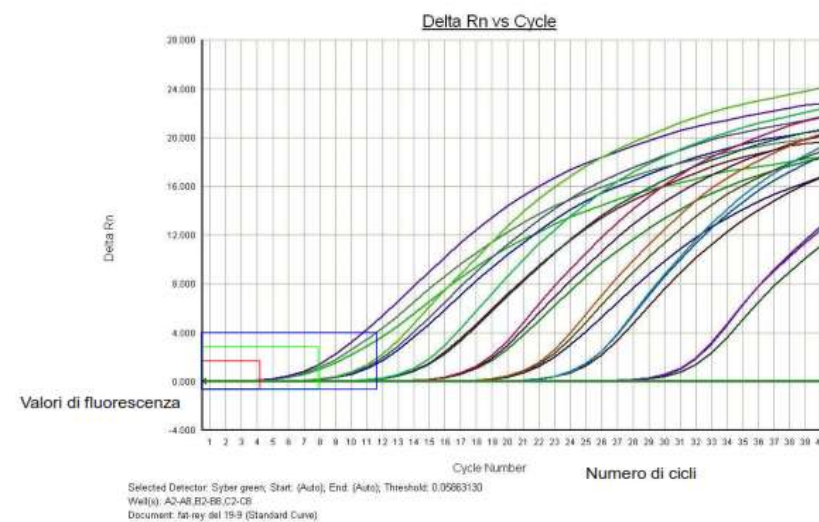
Per ogni vigneto oggetto di
monitoraggio si prelevano 6
campioni fogliari.

- No alterazioni evidenti (marciumi, necrosi estese, ecc.)
- Conservazione del materiale a +4°C
- Arrivo in laboratorio entro max 48 ore dal prelievo





Diagnosi di Flavescenza Dorata



Bulletin OEPP/EPPD Bulletin (2016) **46** (1), 78–93

ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12280

European and Mediterranean Plant Protection Organization
Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PM 7/079 (2)

Diagnostics

Diagnostic

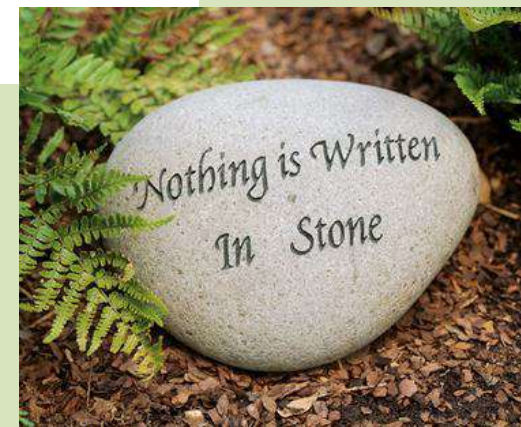
PM 7/079 (2) Grapevine flavescence dorée phytoplasma

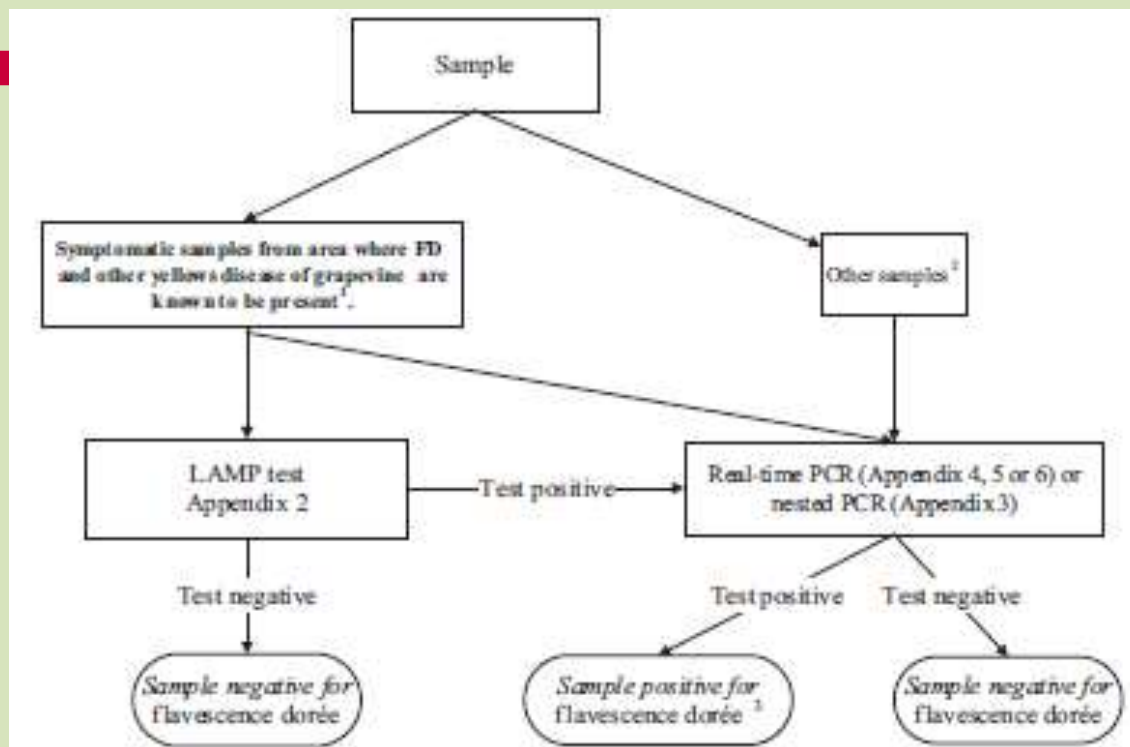
Specific scope

This Standard describes a diagnostic protocol for Grapevine flavescence dorée phytoplasma.

Specific approval and amendment

Approved in 2005-09, Revised in 2015-10.





EPPO (2016) fornisce un protocollo diagnostico dettagliato per FDp, dove vengono proposti i seguenti metodi molecolari:

- LAMP (loop-mediated isothermal amplification): adatto per screening preliminare, anche on-site, solo per campioni sintomatici provenienti da aree in cui FDp è noto per verificarsi. I campioni positivi richiedono la conferma con uno dei due metodi successivi.
- Real Time PCR o nested PCR: dovrebbe essere la prima scelta con campioni sintomatici provenienti da aree in cui non è nota la presenza di FDp o con campioni asintomatici.

PEST SURVEY CARD



APPROVED: 16 July 2020

doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1909

Pest survey card on flavescence dorée phytoplasma and its vector *Scaphoideus titanus*

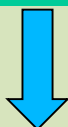
European Food Safety Authority (EFSA),
Sara Tramontini, Alice Delbianco, Sybren Vos



La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021



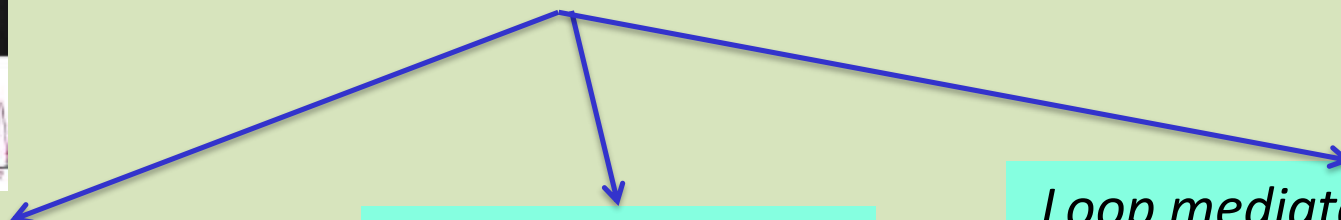
Sample preparation



Nucleic acid extraction (DNA)



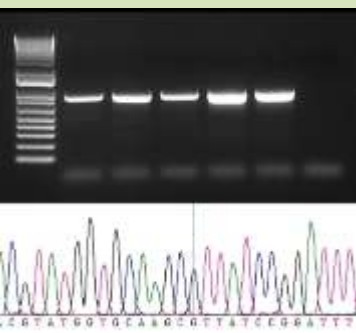
Gene amplification (PCR)



Nested PCR

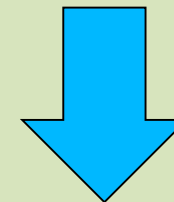
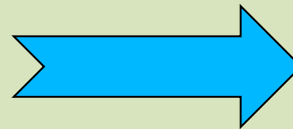
Real Time PCR

*Loop mediated isothermal
amplification (LAMP)*



Preparazione del campione

- Omogenizzazione del campione (circa 1 grammo) in giare di acciaio di 10 mL e con l'ausilio del *MixerMill* (Retsch)



Nucleic acid extraction

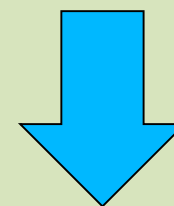
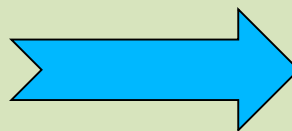
4) CRUSH THE SAMPLES USING AN HAMMER



7) SAMPLE AFTER
HOMOGENEIZATION

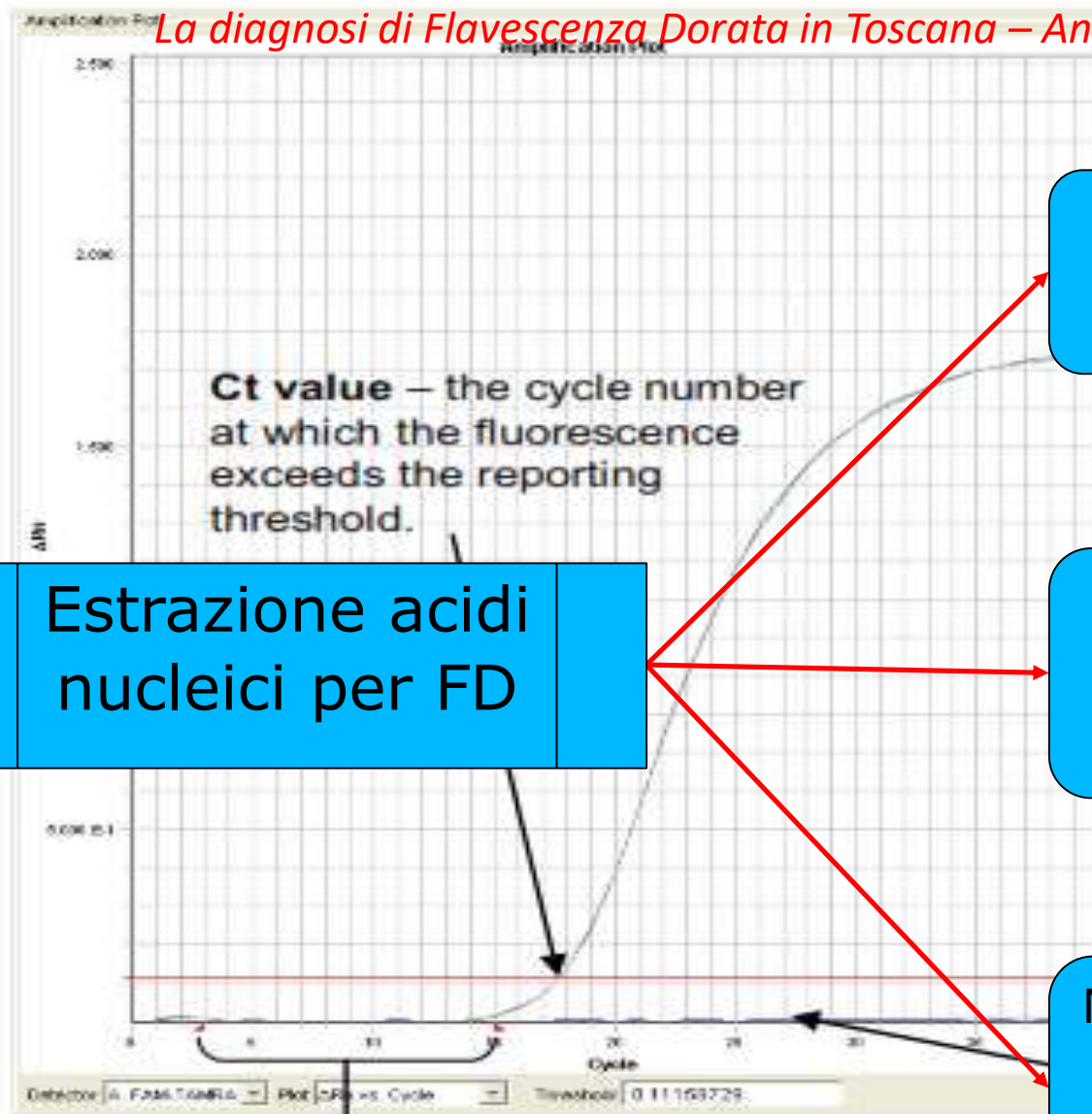


Omogeneizzazione delle aliquote di lavoro



Nucleic acid extraction

La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021



Estrazione acidi nucleici per FD

CTAB 2% (Li et al., 2008)

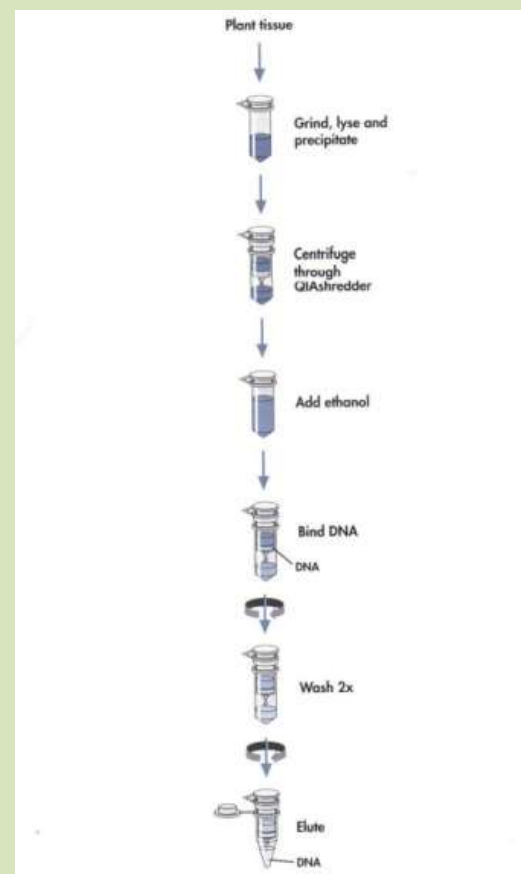
Dneasy mericon 96 -
QIAcube HT kit
(Qiagen)

Maxwell® RSC PureFood
GMO purification and
authentication kit -
MaxWell 16 (Promega)

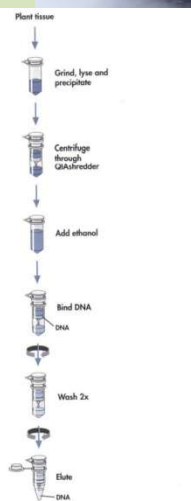
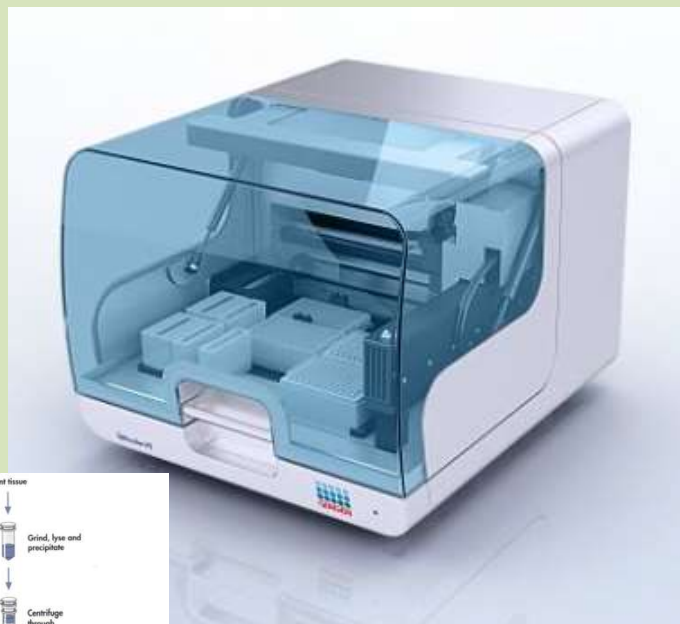
Baseline – a defined range of cycles before amplification is detected.

Nucleic acid extraction with CTAB 2% (Li et al., 2008)

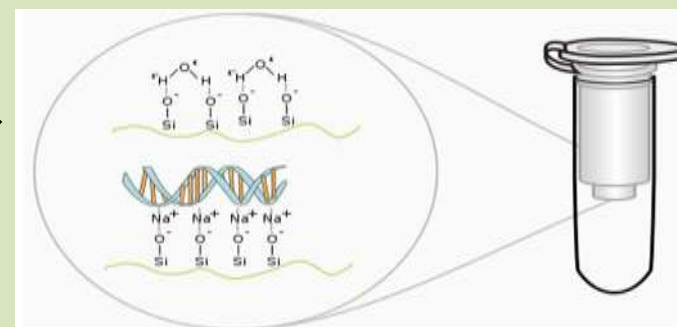
Journal of Virological Methods 154 (2008) 48–55. *A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens.* R. Li, R. Mock, Q. Huang, J. Abad, J. Hartung, G. Kinard



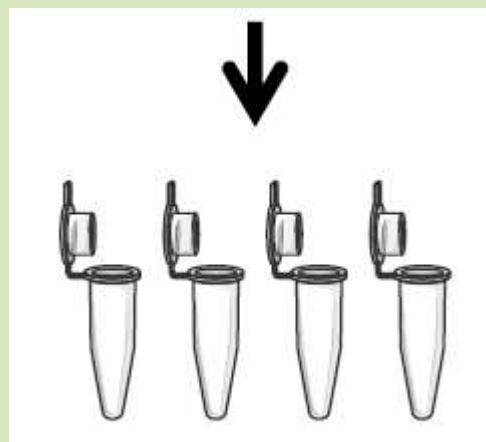
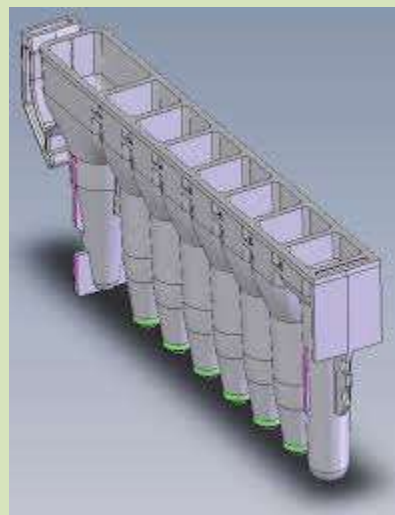
Nucleic acid extraction with Dneasy Mericon 96 QiaCube HT kit



DNA estratto



Nucleic acid extraction with Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit + Maxwell16 (Promega)



DNA estratto

Real Time PCR per la diagnosi della presenza di Flavescenza Dorata

Screening

- Real-time PCR (IPAD Lab, – PM7/79 (2) EPPO - Appendice 6)

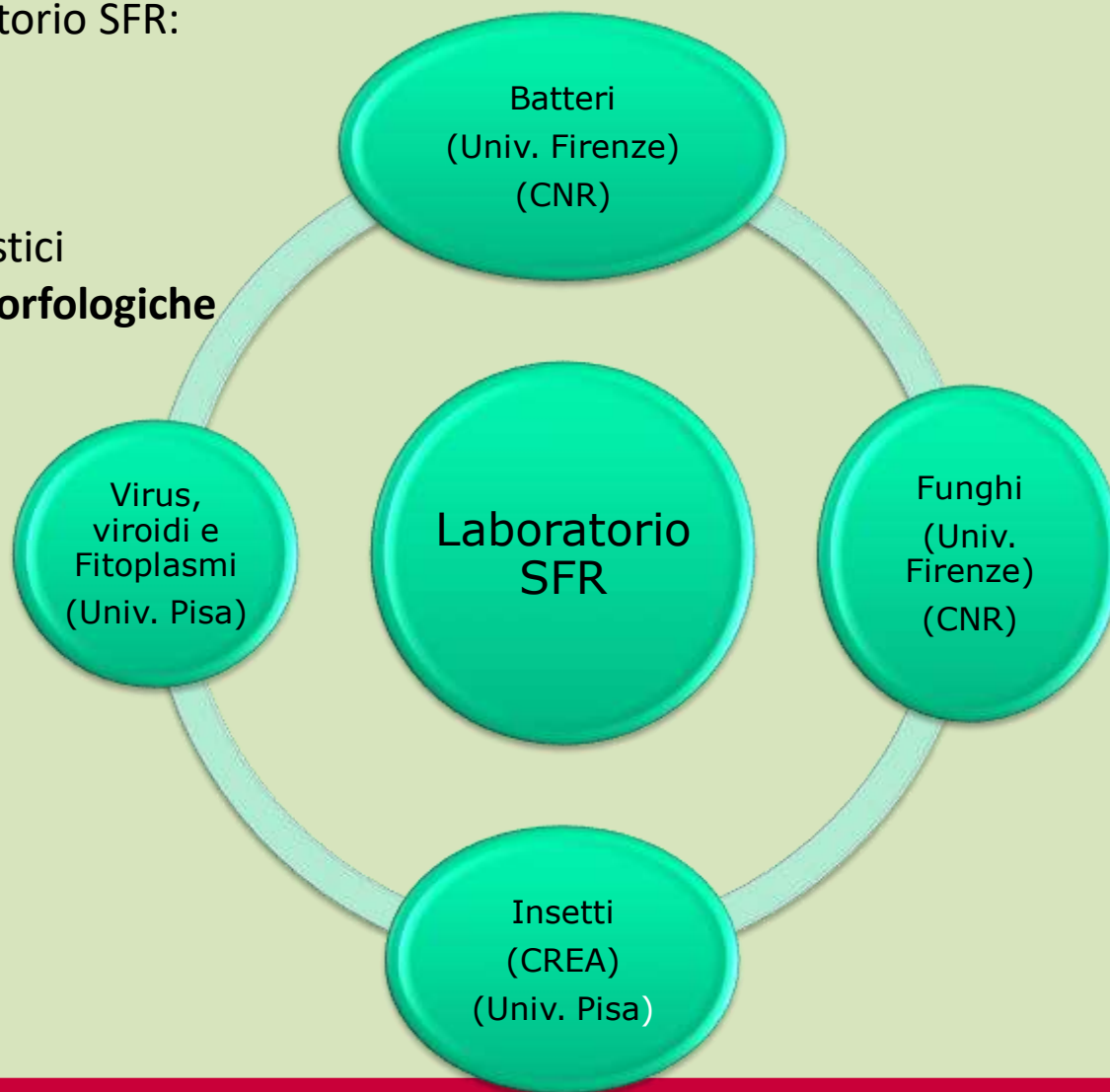
Analisi di Conferma in caso di sospetti positivi

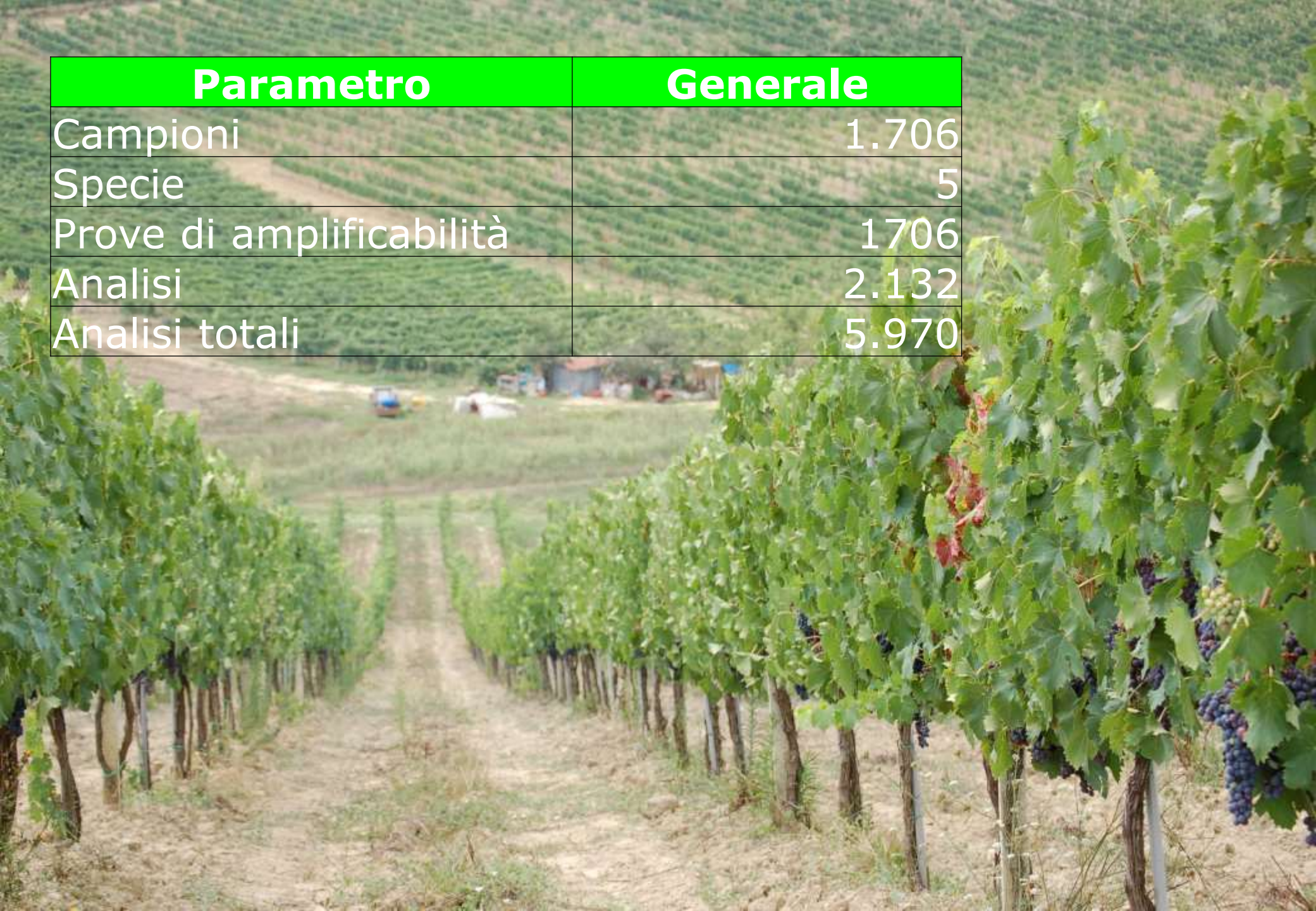
- Real-time PCR (Hren et al., 2007 – PM7/79 (2) EPPO - Appendice 4)

Accordi di collaborazione scientifica

Supporto diagnostico al laboratorio SFR:

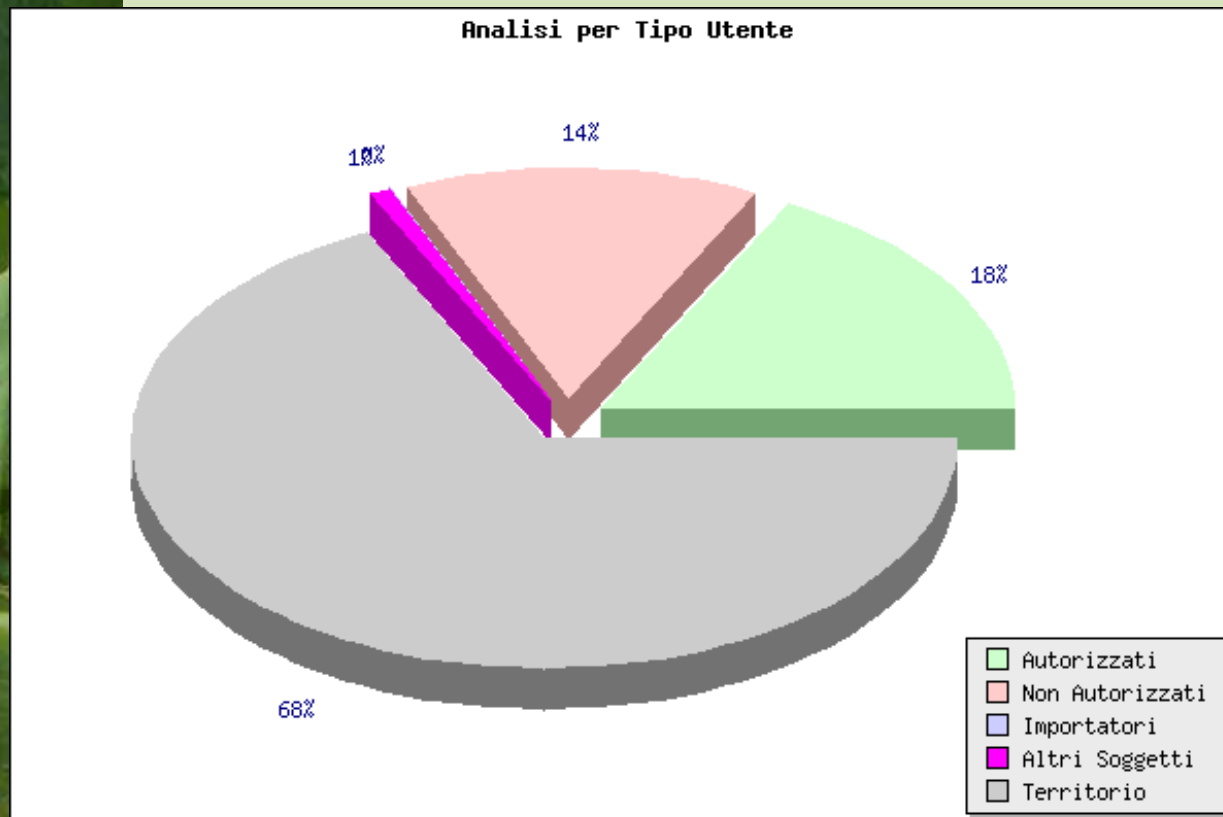
- a. Conferme diagnostiche
- b. Sviluppo metodi
- c. Confronti interlaboratori
- d. Validazione metodi diagnostici
- e. Attività di identificazioni **morfologiche**





Parametro	Generale
Campioni	1.706
Specie	5
Prove di amplificabilità	1706
Analisi	2.132
Analisi totali	5.970

La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021

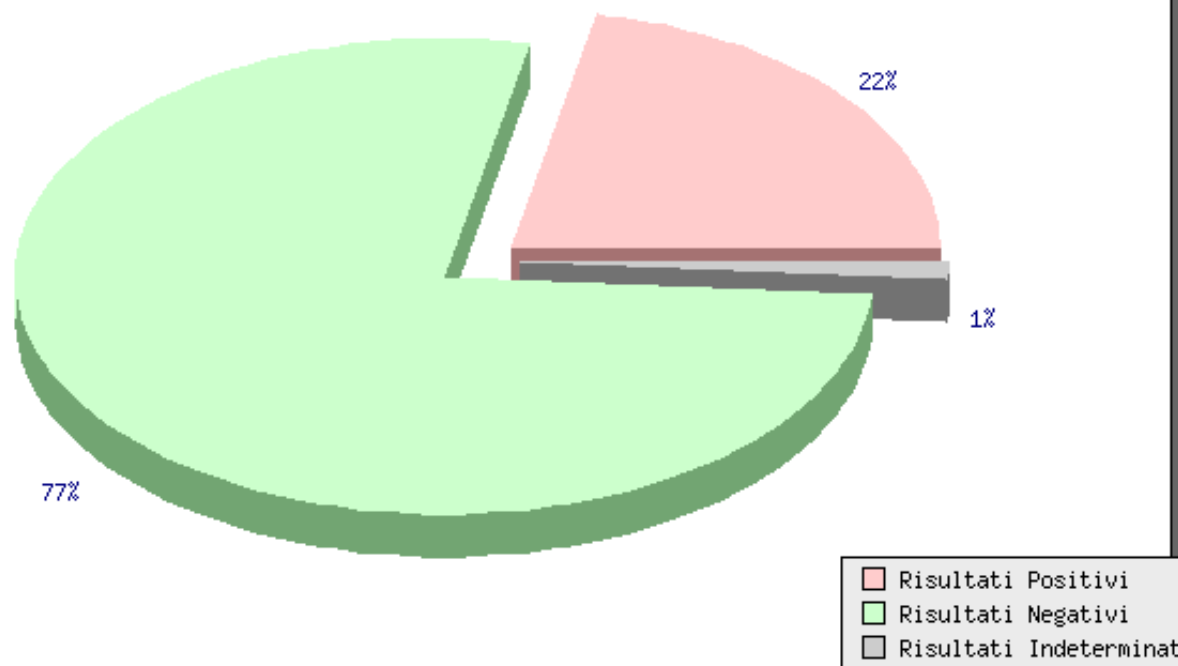


Analisi per tipo Utente – Anno 2021

La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021



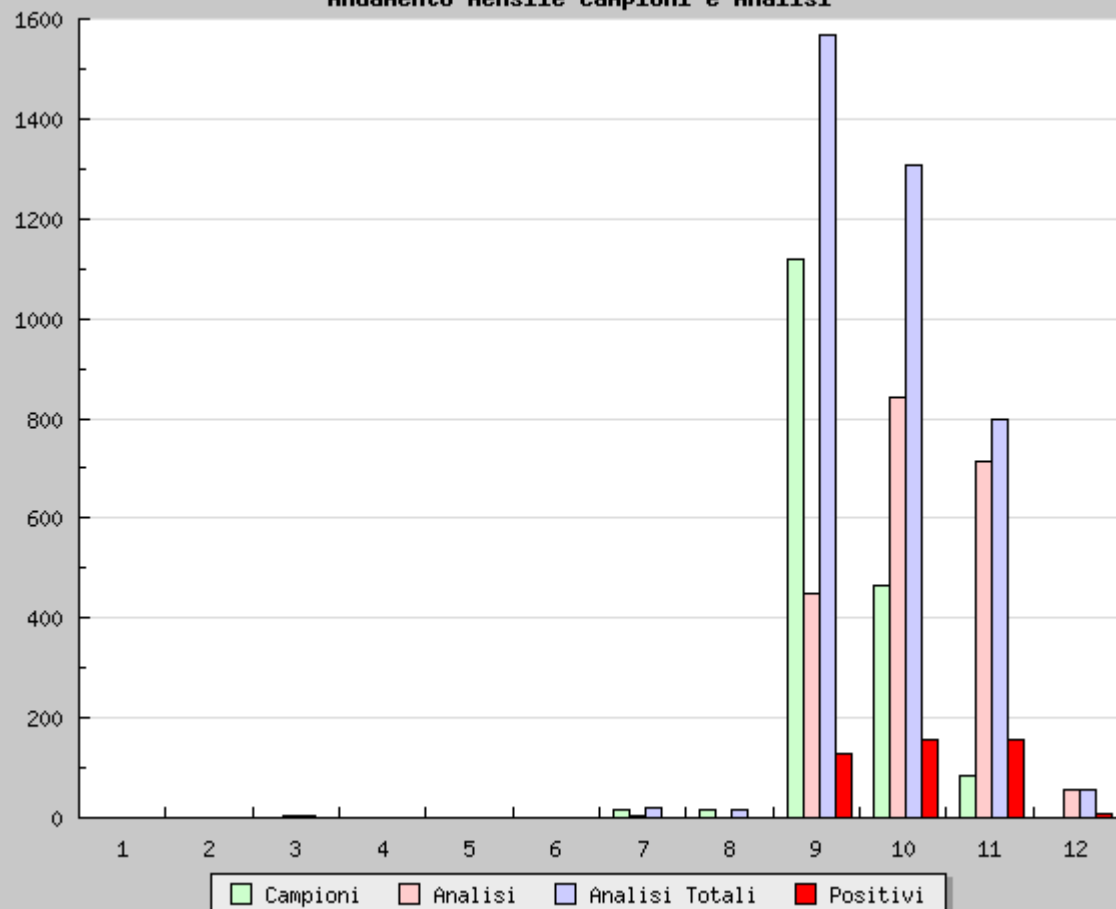
Analisi per Tipo Risultato



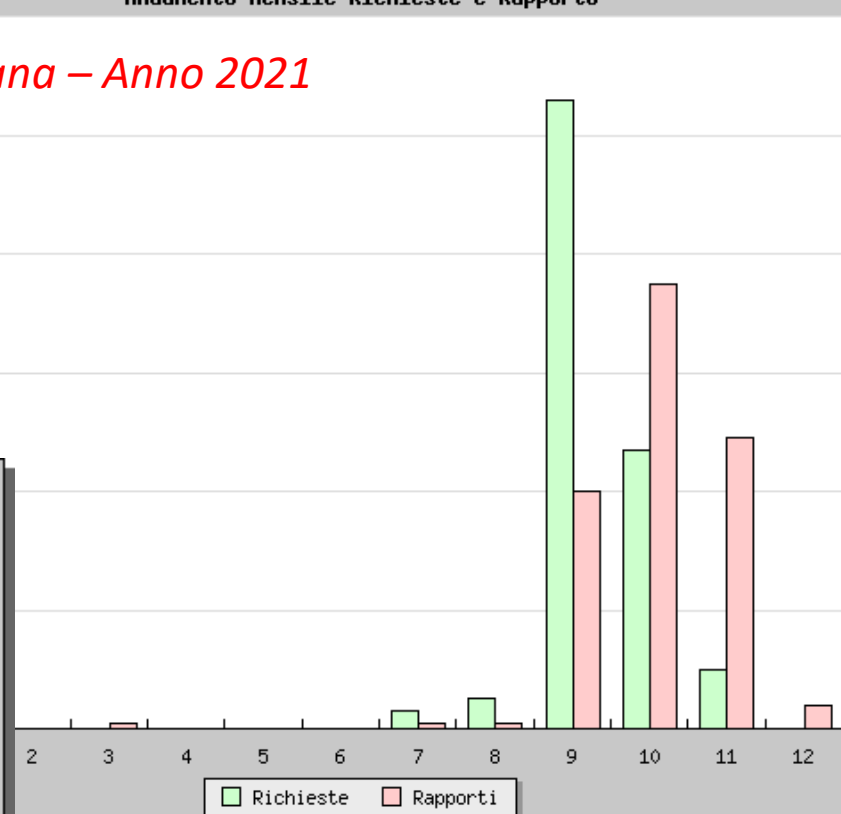
Analisi per Risultato – Anno 2021

La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021

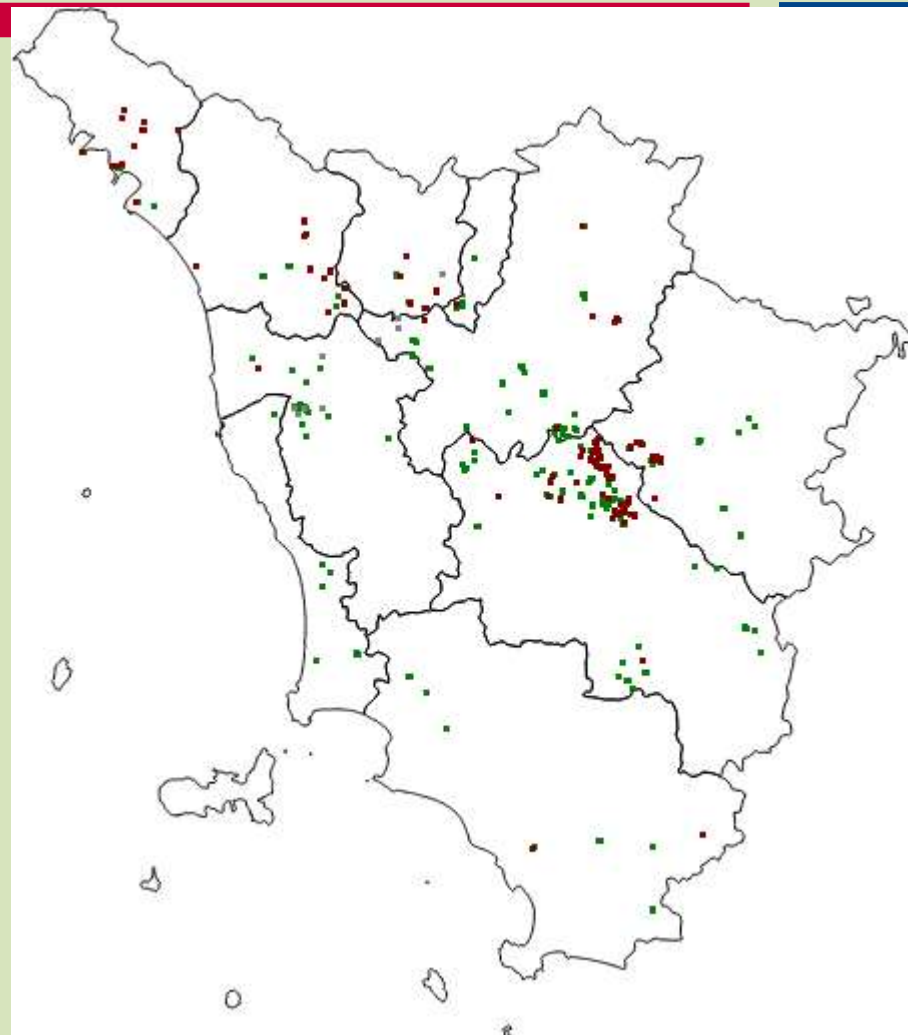
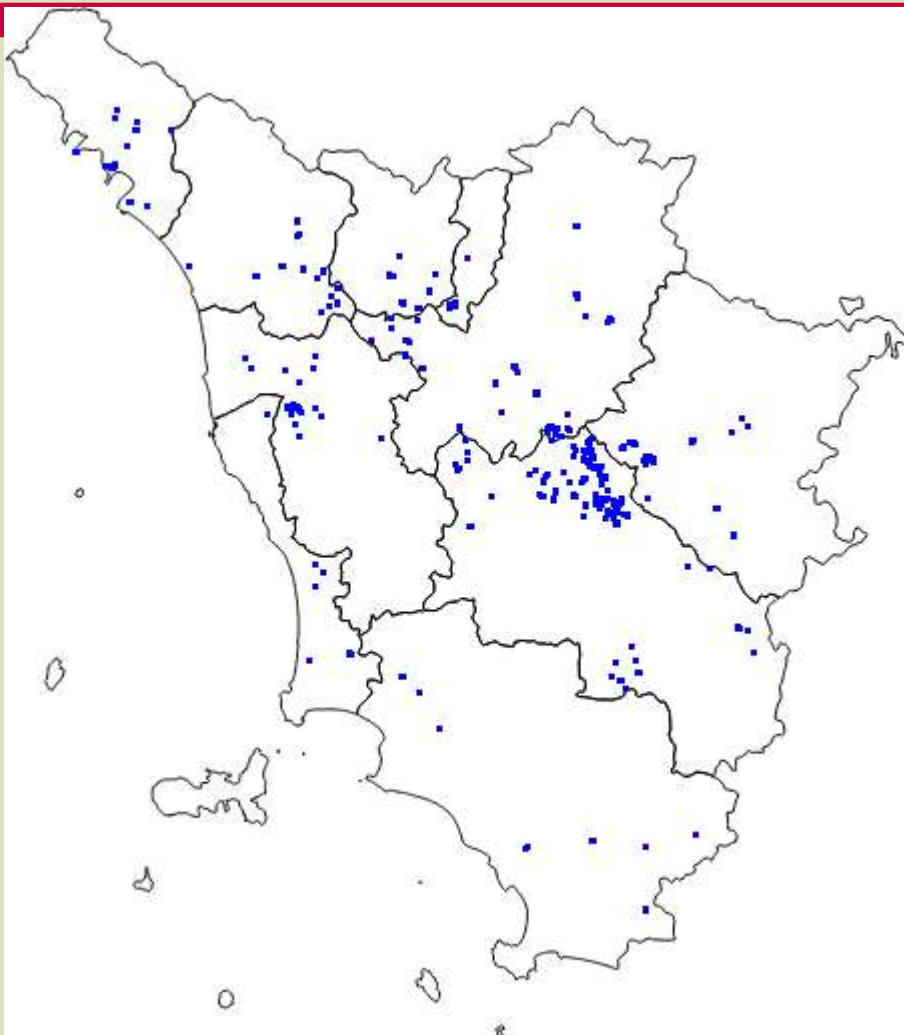
Andamento mensile Campioni e Analisi



Andamento mensile Richieste e Rapporto



La diagnosi di Flavescenza Dorata in Toscana – Anno 2021



Anno 2021 - Distribuzione territoriale dei campioni prelevati (blu) e dei relativi risultati (verde = negativo, rosso = positivo).

Thank you so much for your interest and attention.