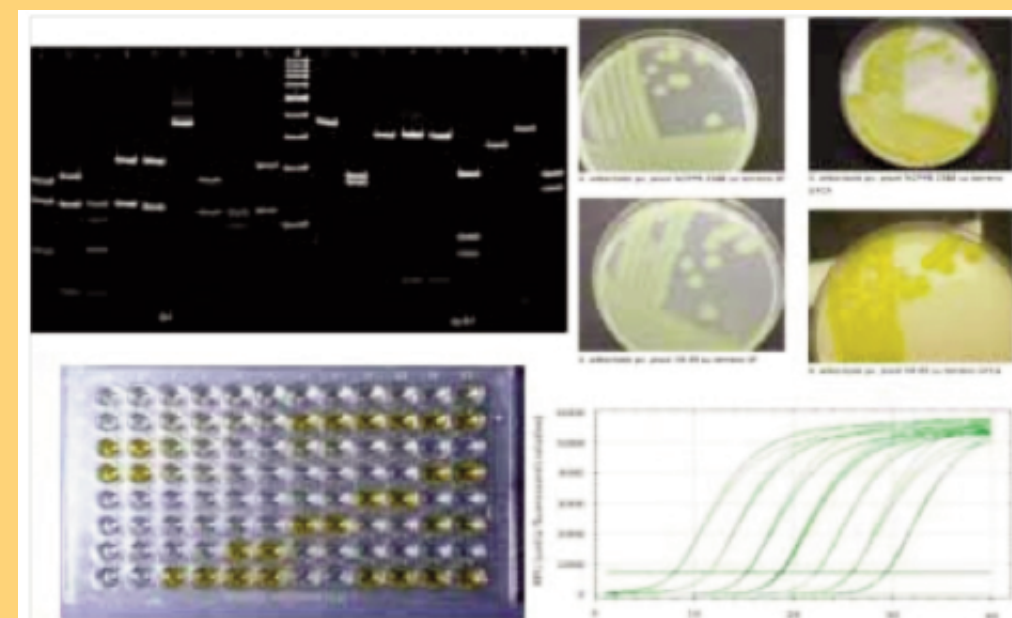


Protocolli di diagnosi di riferimento P.F. “ASPROPI”

- Protocolli di diagnosi di riferimento Progetto Finalizzato “ASPROPI 2017”



A cura di

Marina Barba, Alessandra Belisario, Francesco Faggioli, Luca Ferretti, Andrea Gentili, Anita Haegi, Vincenza Ilardi, Stefania Loreti, Nicoletta Pucci, Luca Riccioni, Valeria Scala, Salvatore Vitale



**CREA – DC Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi
dell'Economia Agraria - Via C.G. Bertero, 22
00156 Roma**

COPERTINA: Differenti tecniche di rilevamento diagnostico

Volume realizzato Redazione CREA DC - Sig.ra Patrizia Rosset

Stampa eseguita da:
Tipografia CSR S.r.L - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma - Tel. 06.4182113

Chiuso in Redazione : 12/06/2017
Finito di stampare : 19/06/2017

Indice del volume

Premessa	3
Protocollo diagnostico per <i>Plasmopara halstedii</i>	7
Protocollo diagnostico per ‘<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>’ in semi di <i>Apiaceae</i>	33
Protocollo diagnostico per i Fitoplasmi agenti della Flavescenza Dorata della vite	57
Protocollo diagnostico per <i>Phytophthora lateralis</i>	95
Protocollo diagnostico per <i>Phytophthora ramorum</i>, <i>Phytophthora kernoviae</i>	115
Protocollo diagnostico per <i>Xanthomonas vesicatoria</i>, <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>, <i>Xanthomonas perforans</i> <i>Xanthomonas gardneri</i>	143
Protocollo diagnostico per <i>Peach Latent Mosaic Viroid</i>	167
Protocollo diagnostico per <i>Grapevine Pinot Gris Virus</i>	191
Protocollo diagnostico per <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> da seme	217
Protocollo diagnostico per <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> ceppo CoDiRO	241

PREMESSA

I protocolli diagnostici descritti in questo volume sono il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ASPROPI', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali e sono la naturale prosecuzione dell'attività già svolta nell'ambito del progetto 'ARON-ARNADIA'.

Come i precedenti, questi protocolli forniscono le linee guida per il rilevamento e l'identificazione di patogeni delle piante (funghi, batteri, fitoplasmi, virus e viroidi) ai laboratori preposti alla diagnosi degli organismi di qualità e/o quarantena, presenti sul territorio italiano. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse condizioni operative.

Le metodologie di laboratorio riportate nei protocolli di questo volume sono state selezionate sulla base del valore, ottenuto per ciascuna di esse, dei parametri di sensibilità diagnostica, specificità diagnostica, selettività, accuratezza, sensibilità analitica (limite di rilevabilità), specificità analitica, inclusività ed esclusività (per le colture batteriche pure), accordanza (o ripetibilità) e concordanza (o riproducibilità) (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/76-4 e PM7/98-2).

Per l'ottenimento di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state eseguite con reagenti e strumentazione riportati in dettaglio all'interno di ogni protocollo. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative, né la modifica di alcune procedure allo scopo di avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché questo venga adeguatamente valutato e validato secondo le metodologie previste dagli standard sopra riportati.

Per ogni protocollo, la scelta delle metodologie diagnostiche da validare e la definizione dei parametri sotto descritti è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro (GdL)** di esperti costituito da varie istituzioni scientifiche di comprovata esperienza nello studio del patogeno oggetto di diagnosi. La composizione dei singoli GdL competenti per ciascun patogeno considerato è riportata all'interno di ogni protocollo. Infine, per l'ottenimento del valore della concordanza (o riproducibilità), ogni protocollo è stato sottoposto ad una prova *inter* laboratorio (Test Performance Study) a cui hanno preso parte laboratori dei servizi fitosanitari regionali (SFR), Enti/Istituzioni di ricerca e laboratori privati. All'interno di ogni specifico protocollo è riportata la lista dei laboratori che hanno partecipato alla sua valutazione ed armonizzazione.

PROVE DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri [ISO/IEC standard 16140:2003(E); ISO/IEC standard 17025:2005(E); EPPO Diagnostic PM7/76-4 e PM7/98-2]*, utilizzando campioni target e non target di riferimento.

1. **Inclusività:** capacità di un saggio di rilevare il patogeno bersaglio all'interno di una collezione di ceppi batterici in coltura pura (microrganismi 'target' che possono differire per provenienza, anno d'isolamento, collezioni etc.)
2. **Esclusività:** assenza di interferenza da parte di un saggio a partire da una collezione di ceppi batterici in coltura pura 'non target' (microrganismi afferenti a subsp., pathovar, specie o genere diversi rispetto al "target")
3. **Sensibilità diagnostica:** capacità del saggio di rilevare la presenza del patogeno 'target' nei campioni di riferimento contaminati o sicuramente infetti
4. **Specificità diagnostica:** capacità del saggio di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni 'non target' cioè non infetti o non contaminati dal patogeno 'target'
5. **Accuratezza:** il grado di corrispondenza tra la risposta ottenuta dal saggio e la risposta attesa dal materiale di riferimento, che media i parametri di sensibilità e specificità diagnostica
6. **Sensibilità analitica (limite di rilevabilità):** la più piccola quantità di entità infettiva (o DNA) individuata dal saggio mediante utilizzo di estratti vegetali contaminati sperimentalmente con sospensioni dei patogeni (o DNA) a concentrazioni calibrate decrescenti per microrganismi fungini e batterici; nel caso di patogeni virali vegetali, che non possono essere quantificati *in vitro*, corrisponde alla diluizione limite dell'estratto iniziale nella quale il saggio riesce ad individuare il patogeno
7. **Specificità analitica:** capacità del metodo utilizzato di NON rilevare la presenza di altri microrganismi o di reagire con il tessuto ospite (*cross-reaction*)
8. **Accordanza:** la percentuale di ottenimento del medesimo risultato (ad es. entrambi positivi o entrambi negativi) da due identici campioni, analizzati nello stesso laboratorio in condizioni di ripetibilità (cioè dallo stesso operatore che utilizza la stessa attrezzatura e gli stessi reagenti, entro un breve lasso di tempo). L'*accordanza* nei metodi qualitativi corrisponde alla **ripetibilità** nei metodi quantitativi
9. **Concordanza:** la percentuale di ottenimento dello stesso risultato da due identici campioni, analizzati in due laboratori differenti, da differenti operatori. La *concordanza* nei metodi qualitativi corrisponde alla **riproducibilità** nei metodi quantitativi

**EPPO Diagnostic PM 7/98-2 (2014) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity*

EPPO Diagnostic PM 7/76-4 (2017) Use of EPPO diagnostic protocols

ISO/IEC 16140 (2003) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods

ISO/IEC 17025 (2017) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories"

Campioni di riferimento 'target': isolati o ceppi che coprono la diversità genetica, la distribuzione geografica e le eventuali diverse specie ospiti del patogeno oggetto di diagnosi.

Campioni di riferimento 'non target': microrganismi patogeni o contaminanti

(saprofiti, opportunisti) che colpiscono la stessa specie ospite, patogeni geneticamente correlati (nel caso dei virus vegetali appartenenti allo stesso genere, nel caso dei batteri appartenenti alla stessa specie, pathovar o subspecie) e campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite

Criteri per il calcolo dei dati di validazione

Di seguito si riportano i criteri con i quali sono stati calcolati i dati dei parametri di valutazione e validazione adottati nei protocolli diagnostici riportati in questo volume.

positivi ottenuti / positivi attesi (veri positivi)	A	C	positivi ottenuti / negativi attesi (falsi positivi)
negativi ottenuti / positivi attesi (falsi negativi)	B	D	negativi ottenuti / negativi attesi (veri negativi)
% Sensibilità diagnostica:			A/(A+B)
% Specificità diagnostica:			D/(C+D)
% Accuratezza relativa:			A + D/(A+B+C+D)

Per l'accordanza (o ripetibilità) vengono scelti diversi campioni target e "non target" utilizzati a diverse diluizioni. I campioni vengono analizzati dalla stessa persona, con gli stessi reagenti, per tre volte, nella stessa giornata o in giornate successive.

$$\text{\% Accordanza: } \frac{1}{L} S (E^2 + F^2) / n^2$$

$$\text{\% Concordanza: } \frac{1}{L} Si \frac{E(SE - E) + F(SF - F)}{n(N - n)}$$

$$E = A + D$$

$$F = B + C$$

n = numero di dati per laboratorio

N = numero totale di dati

L = numero totale di laboratori.

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
*PLASMOPARA HALSTEDII***

L. Riccioni, M. T. Valente

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Introduzione
- 1.2 Ciclo biologico
- 1.3 Sintomatologia
- 1.4 Morfologia

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Estrazione del DNA
- 2.3 Metodo diagnostico 1: PCR convenzionale (Ioos et al., 2007)
 - 2.3.1 Reazione di amplificazione
 - 2.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio
 - 2.3.3 Uso dei controlli
 - 2.3.4 Valutazione dei risultati
- 2.4 Metodo diagnostico 2: duplex Real-time PCR (Ioos et al., 2012)
 - 2.4.1 Reazione di amplificazione Real-time PCR
 - 2.4.2 Uso dei controlli
 - 2.4.3 Valutazione dei risultati

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Valutazione delle performance dei metodi
- 3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione
- 3.3 Validazione del metodo diagnostico 1
 - 3.3.1 Sensibilità analitica
 - 3.3.2 Specificità analitica
 - 3.3.3 Ripetibilità e riproducibilità
- 3.4 Validazione del Metodo diagnostico 2
 - 3.4.1 Sensibilità analitica
 - 3.4.2 Specificità analitica
 - 3.4.3 Ripetibilità e riproducibilità
- 3.5 Prove valutative inter-laboratorio
- 3.6 Conclusioni

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I- Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Allegato II- Strumentazione e reagenti utilizzati nelle prove valutative inter-laboratorio

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Plasmopara halstedii</i> (Farlow) Berlese & de Toni
Tassonomia	Oomycetes; Peronosporales; Peronosporaceae; Plasmopara
Avversità	Peronospora del girasole
Sinonimi	<i>Plasmopara helianthi</i> Novotel' nova
Categoria fitosanitaria	EU Annex designation:II/A2

1.1 Introduzione

Plasmopara halstedii, l'agente causale della peronospora del girasole, è un oomicete parassita obbligato. E' originario del Nord America (Nishimura, 1922;) e da qui si è diffuso in tutte le maggiori aree di coltivazione del girasole, probabilmente attraverso il seme infetto. In Europa la malattia è considerata la maggiore minaccia per la produzione di seme commerciale di girasole (Sackston, 1981). In Italia è stata segnalata per la prima volta in Friuli nel 1949 e si è diffusa rapidamente negli anni 70 causando ingenti danni. La gravità della malattia può variare considerevolmente in base alle condizioni igroclimatiche e allo stadio fenologico della coltura. L'incidenza di peronospora del girasole in un campo varia da tracce fino al 95% (Sackston, 1981). Una volta insediata, la malattia è molto difficile da eradicare: le oospore del patogeno sopravvivono per più di 10 anni nel suolo. Con il miglioramento delle tecniche di lotta e l'uso di varietà di girasole resistenti, la malattia è attualmente ridimensionata. Esistono diverse razze fisiologiche del patogeno: in Italia sono presenti la razza 1 (definita "europea") e la razza 2 o "Red River". Attualmente la normativa che controlla l'importazione di sementi di girasole (Dir. 2000/29/CE recepita dal D.Lgs. 214/2005) sancisce che le sementi devono provenire da zone notoriamente indenni dal patogeno oppure, ad eccezione di varietà resistenti a tutte le razze del patogeno, devono essere sottoposte ad opportuni trattamenti per evitare l'introduzione e la diffusione di nuove razze non presenti in Italia.

Gli ospiti più importanti del fungo sono le specie selvatiche e coltivate del genere *Helianthus* (Leppik, 1966; Novotel' nova, 1966), ma sono state riportate più di 100 specie ospiti appartenenti a diversi generi della famiglia delle Asteraceae.

1.2 Ciclo biologico

Lo svernamento avviene tramite le oospore presenti nel suolo, sui residui colturali o sul seme. Dalle oospore si sviluppano i macrosporangii che contengono numerose zoospore biflagellate, le quali, in presenza di acqua libera, si muovono rapidamente

verso i siti d'infezione disponibili nei quali si incistano e germinano (Novotel'nova, 1966; Delanoë, 1972). La penetrazione dell'ospite avviene direttamente attraverso l'epidermide (Virányi, 1988). Una volta insediatosi, il fungo cresce attraverso gli spazi intercellulari e, in una combinazione ospite/patogeno compatibile, procede con la colonizzazione sistemica verso l'apice della pianta. Il micelio può essere presente in tutti i tessuti fogliari eccetto i meristemi (Novotel'nova, 1966). Quando le condizioni sono favorevoli, la sporulazione asessuata avviene per mezzo di sporangiofori che emergono principalmente attraverso gli stomi o altre aperture del tessuto infetto. Anche le oospore sono prodotte in parti di piante infette, soprattutto nelle radici e nel gambo (Virányi, 1988b).

P. halstedii è principalmente trasmesso attraverso il suolo e il seme (Basavaraju et al., 2004); le oospore fungono da inoculo primario per le giovani piantine di girasole. Gli sporangi possono anche essere veicolati dal vento, causando infezioni secondarie, di solito localizzate, in parti di pianta epigee. L'infezione secondaria è generalmente considerata di minore importanza ma, in condizioni ambientali favorevoli (Zimmer & Hoes, 1978), può rivestire un ruolo significativo. L'umidità e la temperatura sono i più importanti fattori ambientali che influenzano l'infezione e la diffusione. Le zoospore, provenienti sia da sporulazione sessuale che asessuale, richiedono la presenza di acqua libera per mantenere la vitalità e muoversi verso siti di infezione. Di conseguenza, pioggia o irrigazione intensiva giocano un ruolo chiave per l'avvio dell'infezione primaria, in particolare durante le prime 2-3 settimane dopo la semina (Zimmer & Hoes, 1978; Kolte, 1985). Anche l'età delle piante e i tessuti dell'ospite rappresentano fattori importanti nel determinare la suscettibilità alle peronospora del girasole (Sackston, 1981).

1.3 Sintomatologia

I sintomi della malattia variano a seconda dello stadio fenologico del tessuto al momento dell'infezione, dal livello di inoculo, dalle cultivar e dalle condizioni ambientali (temperatura e umidità). Le infezioni primarie precoci portano ad un arresto dello sviluppo e quindi la morte della pianta. Se le infezioni primarie sono più tardive le piante si sviluppano in modo stentato. Sulle foglie appaiono aloni clorotici o di color verde pallido, sulla pagina superiore lungo le nervature principali. Le foglie più giovani possono diventare interamente clorotiche, presentare accartocciamenti verso il basso diventando rigide e spesse. In condizioni di elevata umidità relativa nella pagina inferiore delle foglie, in corrispondenza degli aloni clorotici, si sviluppa una peluria biancastra costituita dagli sporangiofori e dagli sporangi dell'oomicete. I capolini dei girasoli infetti presentano taglia ridotta e producono un basso o nullo numero di semi, generalmente sterili.

1.4 Morfologia

Gli sporangiofori sono ramificati monopodialmente, esili, solitamente terminano con tre sterigmi portanti all'apice sporangi ovoidali/ellissoidali. La dimensione degli sporangi è variabile, come lo è il numero di zoospore biflagellate rilasciate da un unico sporangio (Novotel'nova, 1966).

Il tallo vegetativo è composto da ife intercellulari che producono austori globulari che penetrano nelle cellule ospiti permettendo al fugo biotrofo di assorbire nutrienti. La riproduzione sessuale avviene tramite oogamia che dà origine ad oospore con pareti spesse le quali fungono da strutture di conservazione.

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Di seguito sono descritti due metodi di diagnosi molecolare basati uno su una PCR (Polymerase Chain Reaction) convenzionale e l'altro su una Real Time PCR. Entrambi sono riportati nel protocollo EPPO PM 7/85(2) (EPPO 2014), e descritti originariamente nei lavori di Ioos *et al.* (2007) e Ioos *et al.* (2012). Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del fungo *P. halstedii* nei laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze. La scelta della metodologia diagnostica da validare, secondo i parametri di validazione ISO 16140:2003, ISO 17025 ed EPPO Diagnostic PM7/98 (2) (EPPO 2014), è scaturita da un'attenta rivisitazione delle metodiche riportate sull'argomento, nonché da un confronto con i Servizi Fitosanitari Regionali. **Per la definizione di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.** Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato 1.

2.2 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA va eseguita su semi di *Helianthus annuus* ed è dettagliatamente riportata nel lavoro di Ioos *et al.*, 2012. Si basa sull'uso del Kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Duren, Germany):

1. polverizzare per 1 minuto il campione di semi (circa 1000 semi equivalenti a circa 70 mg) utilizzando un mixer;
2. trasferire un volume pari a circa 500 mL di polvere di semi in una provetta sterile da 2 mL utilizzando una spatola sterile;
3. aggiungere 400 mL di tampone di lisi PL1 e 10 mL di *RNAse A* fornita dal kit e omogeneizzare servendosi di un pestello per provette sterile;
4. incubare a 65°C per 10 min;
5. aggiungere 100 mL di cloroformio, miscelare per 10 sec con il vortex e centrifugare per 15 min a 20000 x g;
6. trasferire in surnatante (fase acquosa) nella colonnina di filtraggio (viola) fornita dal kit;
7. centrifugare per 2 min a 11000 x g;
8. trasferire l'eluato in una provetta sterile da 1,5 mL, aggiungere 450 mL di

9. soluzione PC e miscelare con *vortex*;
10. caricare l'eluato nella colonnina di legame con il DNA (verde) fornita dal kit e centrifugare per 1 min a 11000 $\times$ g;
11. rimuovere l'eluato e lavare la colonnina con 400 mL di soluzione PW1 centrifugando per 1 min a 11000 $\times$ g;
12. rimuovere l'eluato e lavare la colonnina con 700 mL di soluzione PW2 centrifugando per 1 min a 11000 $\times$ g;
13. rimuovere l'eluato e lavare la colonnina con 200 mL di soluzione PW2 centrifugando per 2 min a 11000 $\times$ g;
14. trasferire la colonnina in una provetta sterile da 1,5 mL e caricare 50 mL di tampone di eluizione PE a 65°C; incubare per 5 min e centrifugare per 1 min a 11000 $\times$ g;
15. ripetere il punto 13 con altri 50 mL di tampone di eluizione PE a 65°C.

2.3 Metodo diagnostico 1: PCR convenzionale (Ioos et al., 2007)

Il metodo di PCR si basa sull'amplificazione specifica di un frammento di 308 paia di basi localizzato nella regione del DNA ribosomale 28S (large sub-unit, LSU) con una coppia di primer specifici:

Forward primer: PHAL-F: 5'TATCTCTAAGTTGCTTATAC-3'

Reverse primer: PHAL-R: 5'AGCATATACAGCACATACG-3'

I primer si acquistano purificati in HPLC. Si diluiscono ad una concentrazione di 100 mM in tampone TE (TrisHCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice e sono conservati a -20°C in aliquote da 50 mL. Si prepara la soluzione di lavoro alla concentrazione di 10 mM, diluendo in acqua milliQ sterile le aliquote da 100 mM da utilizzare al momento. La soluzione di lavoro non utilizzata al momento si conserva a -20°C.

2.3.1 Reazione di amplificazione

La reazione di amplificazione si allestisce in ghiaccio. Quando si effettuano più reazioni di PCR contemporaneamente occorre preparare, in una singola provetta da 1,5 mL, una soluzione madre (*master mix*) che contenga tutti i reagenti illustrati nella Tabella 1, meno il DNA-stampo che verranno introdotti direttamente nelle provette di reazione PCR. Nel numero di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare un campione in più per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante.

1. Miscelare con il *vortex* tutte le soluzioni (eccetto la DNA-polimerasi) dopo averle scongelate;
2. aggiungere, in una provetta da 1,5 mL tenuta in ghiaccio, i volumi richiesti delle varie componenti come indicato in Tabella 1;
3. miscelare con *vortex* la *master mix* e centrifugarla pochi secondi per raccogliere le gocce sul fondo;
4. distribuire 18 μ L di *master mix* in provette da PCR da 0,2 mL predisposte in ghiaccio, in un apposito portaprovette;

5. aggiungere 2 μL di DNA stampo in ciascun campione ed un equivalente volume di acqua al campione di controllo negativo, che va sempre inserito in ogni esperimento PCR.

TABELLA 1 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione PCR del Metodo 1

COMPONENTI	Concentrazione	Volume per	Concentrazione finale
	iniziale	reazione (μL)	
1. Acqua milliQ sterile	/	10,6	/
2. Tampone di amplificazione	10X	2	1X
3. MgCl_2	25 mM	1,6	2 mM
4. dNTPs	10 mM (ciascuno)	0,3	0,15 mM (ciascuno)
5. Primer PHAL-F	10 μM	0,9	0,45 μM
6. Primer PHAL-R	10 μM	0,9	0,45 μM
7. Bovine Serum Albumin (BSA)	10 mg/mL	1,6	0.8 mg/mL
8. DNA polimerasi	5 U/ μL	0,1	0.025 U/ μL
Subtotale	/	18	/
DNA stampo	/	2	/

Una volta pronti, i campioni sono inseriti nel termociclatore e sottoposti al seguente ciclo termico:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	5'	1
	94 °C	20"	
Amplificazione	58 °C	30"	35
	72 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	7'	1
Step di blocco	4 °C	∞	1

N.B.: se possibile, le provette vanno tenute in ghiaccio fino a che il termociclatore non raggiunge la temperatura di denaturazione (95°C). Una volta arrivato a temperatura possono essere sistemate nella macchina.

2.3.2 Elettroforesi su gel di agarosio

1. Preparare il gel di agarosio 1% (massa/volume) in tampone TBE (o TAE) 0,5X con il colorante scelto per marcare il DNA (GelRed alla concentrazione finale 0,5X).
2. Caricare 10 µL del campione amplificato più 2 µL di *DNA loading buffer* 6X in ciascun pozzetto.
3. Caricare in un pozzetto un marcatore di peso molecolare idoneo (range circa 50-1000 paia di basi).
4. Correre in tampone TBE (o TAE) 0,5X per 30-40 minuti a 80 volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Osservare il gel mediante transilluminatore ad U.V. e fotografare.

2.3.3 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione devono essere aggiunti i seguenti controlli:

Controllo negativo di amplificazione (NTC): reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con H₂O. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.

Controllo negativo di isolamento (NIC): reazione di amplificazione su DNA estratto da seme di *H. annuus* non infetto (se non disponibile è possibile utilizzare il solo buffer di estrazione). Serve a monitorare eventuali contaminazioni durante l'estrazione del DNA.

Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di amplificazione su DNA plasmidico contenente l'amplicone target di *P. halstedii* diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR.

Controllo di amplificazione interno (IPC): reazione di amplificazione con i primer universali del gene endogeno ubiquitario *18S* (Tabella 2) presente nel DNA genomico dell'ospite (*H. annuus*). Serve a verificare la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi l'assenza di eventuali inibitori della PCR

2.3.4 Valutazione dei risultati

Il campione è considerato positivo per la presenza di *P. halstedii* se l'amplificazione PCR produce un amplicone di 308 paia di basi la cui banda avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo e coerentemente alla banda di riferimento del marcatore di peso molecolare. Al contrario, la presenza di bande di peso molecolare diverso o l'assenza di segnali di amplificazione indicano che il campione è negativo per la presenza di *P. halstedii*.

2.4 Metodo diagnostico 2: duplex Real-time PCR (Ioos *et al.*, 2012)

Il metodo è basato sull'utilizzo di una Duplex Real-time PCR per la simultanea determinazione di due diversi target grazie all'uso di due sonde marcate diversamente: una sequenza target di 94 paia di basi specifica per *P. halstedii*, localizzata nella regione del DNA ribosomale 28S (LSU) e una sequenza di 150 paia di basi nella regione del 18S rDNA altamente conservata in un vasto *range* di organismi, incluse

le piante. L'amplificazione specifica per il 18S rDNA garantisce la qualità del DNA estratto e funge da controllo di amplificazione interno.

Le sequenze di ciascun primer e le sonde fluorogeniche sono riportate in Tabella 2.

TABELLA 2 - Primer e sonde utilizzati per la duplex Real-time PCR

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
qPHAL-F	Primer <i>forward</i> specifico per <i>P. halstedii</i>	5'-TTCCAGTGTCTATAATCCGTGGT-3'
qPHAL-R	Primer <i>reverse</i> specifico per <i>P. halstedii</i>	5'-GCACATACGCCGAGCGTA-3'
qPHAL-P:	Sonda <i>dual labeled</i> specifica per <i>P. halstedii</i>	5'-FAM-TCGGCGAGCGTGTGCGTGT-BHQ1-3'
18S uni-F	Primer <i>forward</i> universale per 18S rDNA	5'-GCAAGGCTGAACTTAAAGGAA-3'
18S uni-R	Primer <i>reverse</i> universale per 18S rDNA	5'-CCACCACCCATAGAATCAAGA-3'
18S uni-P	Sonda <i>dual labeled</i> per 18S rDNA	5'-JOE-ACGGAAGGGCACCACCAGGAGT-BHQ1-3'

I primer e le sonde si acquistano purificati in HPLC. Si diluiscono ad una concentrazione di 100 mM in tampone TE (TrisHCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice e sono conservati a -20°C in aliquote da 50 mL. Si prepara la soluzione di lavoro alla concentrazione di 10 mM, diluendo in acqua milliQ sterile le aliquote da 100 mM, da utilizzare al momento o da conservare a -20°C.

2.4.1 Reazione di amplificazione Real-time PCR

Le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando la *master mix* qPCR core kit no ROX dell' Eurogentec (vedi Allegato 1), come consigliato in Ios et al. (2012).

La reazione di amplificazione è allestita a temperatura ambiente, dal momento che la DNA polimerasi utilizzata è un enzima *hot-start*. Tutti i reagenti, dopo essere stati scongelati, devono essere miscelati pochi secondi con il *vortex*. In una singola provetta da 1,5 mL si prepara una *master mix* contenente tutti i reagenti illustrati nella Tabella 3, meno il DNA-stampo, da introdurre direttamente nelle provette di reazione PCR; si calcolano i quantitativi richiesti in funzione del numero totale di campioni da saggiare. Nel numero di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare un

campione in più per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante. Si aggiungono i volumi richiesti dei vari componenti nell'ordine indicato in Tabella, e si miscelano tra loro con *vortex*; si consiglia di centrifugare per pochi secondi la *master mix* per raccogliere le gocce sul fondo. Per ogni campione si eseguono 3 repliche tecniche.

TABELLA 3 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Real-time PCR del Metodo 2

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (µL)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile	/	10,9	/
2. **Tampone di amplificazione	10X	2	1X
3. **MgCl ₂	50 mM	2	5 mM
4. **dNTPs	5 mM	0,8	0,2 mM
5. Primer qPHAL-F	10 µM	0,1	0,05 µM
6. Primer qPHAL-R	10 µM	0,6	0,3 µM
7. Sonda qPHAL-P	10 µM	0,1	0,05 µM
8. Primer 18S-uni-F	10 µM	0,6	0,3 µM
9. Primer 18S-uni-R	10 µM	0,6	0,3 µM
10. Sonda 18S-uni-P	10 µM	0,2	0,1 µM
11. DNA polimerasi	5 U/µL	0,1	0.025 U/µL
Subtotale	/	18	/
DNA stampo	/	2	/

**Reagenti forniti con il kit *qPCR core No Rox* (Eurogentec)

Una volta pronti, i campioni sono inseriti nel termociclatore per Real-time e sottoposti al ciclo termico riportato nello schema di seguito.

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	10'	1
Amplificazione	95 °C	10''	40
	65 °C	45''	

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per i fluorofori FAM (target *P. halstedii*) ed JOE (target 18S).

2.4.2 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR *Real Time* devono essere aggiunti i seguenti controlli:

Controllo negativo di amplificazione (NTC): reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con H₂O. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.

Controllo negativo di isolamento (NIC): reazione di amplificazione su DNA estratto da seme di *H. annuus* non infetto (se non disponibile è possibile utilizzare il solo buffer di estrazione). Serve a monitorare eventuali contaminazioni durante l'estrazione del DNA.

Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di PCR su DNA plasmidico contenente l'*amplicone target* di *P. halstedii* diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di **preparazione della reazione PCR**.

Controllo di amplificazione interno (IPC): co-amplificazione del gene endogeno *ubiquitario 18S* presente nel DNA genomico dell'ospite (*H. annuus*) identificato dal segnale di amplificazione relativo al fluoroforo JOE con i primer 18S uni-F/18S uni-R e la sonda 18S uni-P (Tabella 2) . Serve a verificare la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR.

2.4.3 Valutazione dei risultati

Il campione è considerato positivo per la presenza di *P. halstedii* se il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo FAM è rilevato in corrispondenza di un ciclo soglia (Ct) inferiore al Ct del controllo positivo di amplificazione (PAC). Il campione è considerato negativo per la presenza del target se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un Ct superiore al Ct del controllo positivo di riferimento, e contemporaneamente il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo HEX risulta rilevabile.

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Valutazione delle *performance* dei metodi

Il processo di validazione per entrambi i metodi è stato condotto come descritto nel documento EPPO PM7/98 (2) (EPPO 2014), utilizzando il materiale di riferimento riportato in Tabella 4 e facendo riferimento ai protocolli diagnostici “standard” pubblicati in letteratura (PM 7/85 (2), EPPO 2014; Ioos *et al.*, 2007; Ioos *et al.*, 2012) con piccole modifiche e adattamenti specificati. I **parametri di validazione** considerati e definiti secondo il documento EPPO PM 7/98 (2) sono stati: sensibilità analitica, specificità analitica, sensibilità diagnostica, specificità diagnostica, ripetibilità, riproducibilità.

Tali valutazioni sono state eseguite presso i laboratori del Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (CREA-PAV) e in collaborazione con 10 laboratori di Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) ed enti pubblici di ricerca, elencati di seguito con i relativi referenti per la presente valutazione delle *performance*:

SFR Lombardia, Referente Dr.ssa Francesca Gaffuri.

Fondazione Edmund Mach, Unità Protezione delle piante e biodiversità agroforestale Referente Dr.ssa Valeria Gualandri.

Agenzia Regionale per lo Sviluppo Rurale (ERSA) Friuli Venezia Giulia, Referente Dr. Gian Luca Bianchi.

SFR Regione Campania, Referente Dr.ssa Paola Spigno.

SFR Emilia-Romagna, Referente Dr.ssa Carla Montuschi.

Centro di Ricerca Sperimentazione e Formazione in Agricoltura (CRSFA) “Basilica Caramia”, Referente Dr. Nicola Trisciuzzi.

Istituto Regionale per la Floricoltura di Sanremo, Referente Dr.ssa Patrizia Martini.

SFR Marche, Referente Dr.ssa Simona Talevi.

SFR Toscana, Referente Dr. Domenico Rizzo.

CREA-Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale /CREA-PAV), Referente Dr.ssa Anita Haegi.

3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione

Gli esperimenti di validazione sono stati eseguiti su 5 campioni target e 4 campioni non target descritti in tabella 4.

TABELLA 4 - Campioni utilizzati per la validazione dei Metodi diagnostici 1 e 2

Codice	Natura del campione	Descrizione	Conferma identità
pGEM-Ph	Target	Plasmide contenente l'amplicone target per l'identificazione di <i>P. halstedii</i> .	Sequenziamento primer universali T7 x Sp6

Ph1	Target	DNA derivante da micelio di <i>P. halstedii</i> su foglia di <i>H. annuus</i> proveniente dai laboratori del SFR Emilia Romagna	Sequenziamento ITS4 x ITS6 (Cooke <i>et al.</i> , 2000)
Ph2	Target	Campione fogliare sintomatico di <i>H. annuus</i> naturalmente infetto da <i>P. halstedii</i> proveniente dai laboratori del SFR Emilia Romagna	Sequenziamento ITS4 x ITS6
Ph3	Target	Campione fogliare sintomatico di <i>H. annuus</i> naturalmente infetto da <i>P. halstedii</i> proveniente dai laboratori del SFR Emilia Romagna	Sequenziamento ITS4 x ITS6
Ph4	Target	Campione fogliare sintomatico di <i>H. annuus</i> naturalmente infetto da <i>P. halstedii</i> proveniente dai laboratori del SFR Emilia Romagna	Sequenziamento ITS4 x ITS6
Pr	Non target	DNA estratto da micelio di isolato di <i>Phytophthora ramorum</i> presente in collezione presso il CREA-PAV (AB2)	Sequenziamento ITS4 x ITS6
Pl	Non target	DNA estratto da micelio di isolato di <i>P. lateralis</i> presente in collezione presso il CREA-PAV (AB191)	CBS 102.608 *
Pc	Non target	DNA estratto da micelio di isolato di <i>P. cinnamomi</i> presente in collezione presso il CREA-PAV (AB76)	Sequenziamento ITS4 x ITS6
Ha	Non target	DNA estratto da semi non infetti di <i>H. annuus</i>	Sequenziamento ITS4 x ITS6 (**)

*Centraalbureau voor Schimmelcultures-Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, The Netherlands).

**I sequenziamenti del prodotto di PCR ITS4 x ITS6 hanno mostrato un'identità del 100% con gli *Accession number* corrispondenti a sequenze ITS di *H. annuus*: KF767534, JN115024, JX867644, JX121430, AF047924.

P. halstedii è un patogeno biotrofo obbligato e non è possibile allevarlo in coltura pura; pertanto, non avendo la disponibilità del DNA del fungo ottenuto da solo micelio, alcuni parametri di validazione sono stati valutati su DNA plasmidico contenente la sequenza target della regione LSU di *P. halstedii* per l'amplificazione PCR e Real time PCR. Questa sequenza, è stata ottenuta dall'amplificazione di un campione di foglia di *H. annuus* naturalmente infetta da *P. halstedii*, è stata quindi clonata nel vettore pGEM-T *easy* (Promega). il vettore trasformato è stato purificato con il kit "Quantum Prep Plasmid Miniprep" (Biorad) e sequenziato con i primer T7 e

SP6 localizzati 61 bp e 75 bp rispettivamente a monte e a valle del sito di clonaggio. I sequenziamenti hanno confermato la giusta inserzione e sequenza dell'amplicone target.

L'identità dei 4 campioni target, rappresentati da 4 diversi campionamenti di *P. halstedii* su foglia di girasole (tabella 4), è stata confermata eseguendo un'amplificazione con i primer universali ITS4 x ITS6 come descritto da Cooke *et al.*, (2000). La reazione di PCR ha prodotto 2 diversi ampliconi, evidenziando la presenza di due diversi DNA genomici. I diversi frammenti di DNA sono stati isolati dal gel d'agarosio, purificati con il kit "Gel and PCR Clean-up" (Machery-nagel) e sequenziati. I risultati del sequenziamento hanno dimostrato la co-presenza nei 4 campioni target di DNA dell'ospite *H. annuus* e del DNA del target *P. halstedii*.

3.3 Validazione del metodo diagnostico 1

3.3.1 Sensibilità analitica

I valori di sensibilità analitica del metodo riportati nel documento EPPO PM 7/85 (2) si riferiscono al DNA puro di *P. halstedii*. E' stato dunque necessario calcolare la sensibilità analitica *ex novo* sul target di DNA plasmidico pGEM-Ph (tabella 4). Tale valutazione è stata inizialmente eseguita utilizzando come DNA stampo il DNA plasmidico puro. Sono state eseguite 3 ripetizioni di PCR su diluizioni seriali 1:10 di target per determinare il limite di rivelazione (LOD). I risultati hanno mostrato che, nelle suddette condizioni sperimentali, il LOD è pari a 530 copie di DNA plasmidico (PCN, Plasmid Copy Number) (Fig. 1)

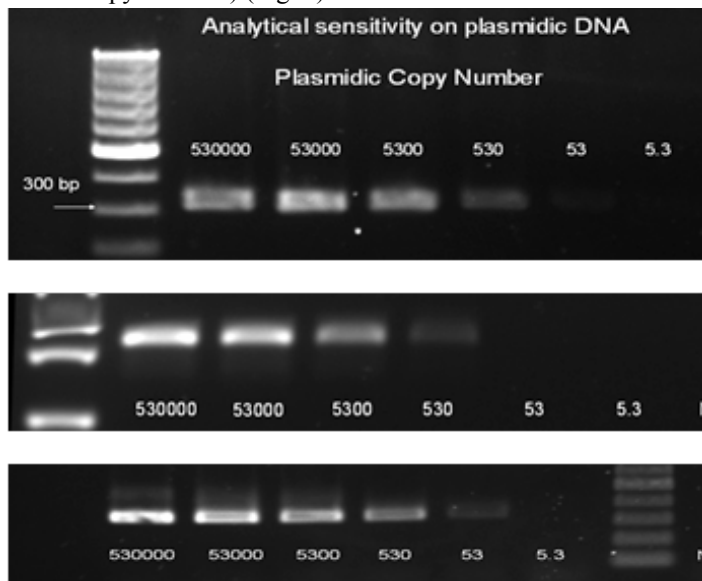


Figura 1 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione (x3 ripetizioni) ottenuti da diluizioni seriali del DNA plasmidico tal quale; i numeri che identificano ciascun pozzetto indicano il numero di copie del plasmide amplificato; NTC, controllo no DNA; M, marcatore di peso molecolare.

E' noto che l'estrazione di DNA da seme comporta la co-purificazione di composti presenti nel tegumento, inibenti l'amplificazione PCR. E' dunque importante determinare la quantità massima di DNA dell'ospite che non inficia sulle performance di sensibilità del metodo; a tal fine sono state condotte prove di amplificazione su DNA plasmidico al LOD (530 PCN) con quantità crescenti di DNA di seme di girasole. La quantità di DNA di seme di girasole pari a 2 mL di estratto non inficia nella reazione di PCR sull'amplificazione del target.

Al fine di simulare una situazione più realistica di diagnosi, la sensibilità analitica è stata valutata su DNA plasmidico misto a 2 mL di estratto di DNA da seme di girasole. I risultati, visibili in fig. 2, mostrano che la sensibilità analitica rimane costante a 530 PCN.

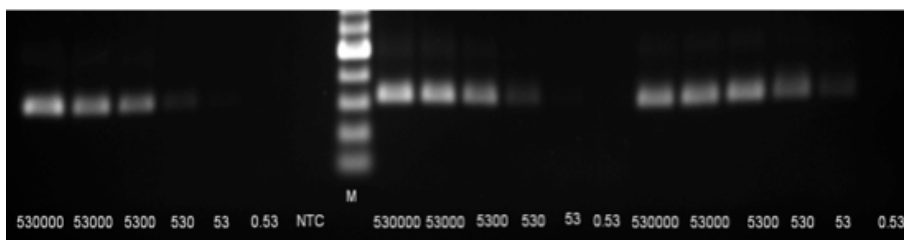


Figura 2 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti da diluizioni seriali del DNA plasmidico in DNA di seme di girasole (2 mL). I numeri che identificano ciascun pozzetto indicano il numero di copie del plasmide amplificato; NTC, controllo no DNA; M, marcatore di peso molecolare.

3.3.2 Specificità analitica

La specificità analitica è stata valutata su 20 ng di DNA dei 4 campioni target (Ph1, Ph2, Ph3, Ph4) dei 4 campioni non-target (Pl, Pr, Pc, Ha) descritti in tabella 4. Contemporaneamente è stata verificata l'amplificabilità del DNA in esame mediante una PCR con i primer ITS4 x ITS6. I risultati di queste analisi hanno confermato la specificità del metodo (Fig. 3) non essendoci stato alcun falso positivo.

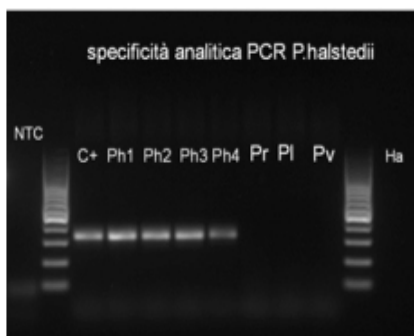


Figura 3 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti da DNA dei campioni target (Ph1, Ph2, Ph3, Ph4) e non-target (Pr, Pl, Pc, Ha); NTC, controllo no DNA; C+, controllo positivo.

3.3.3 Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità è stata eseguita amplificando simultaneamente tre repliche dello stesso DNA target (pGEM-Ph) al limite di rivelazione combinato con 2 mL di DNA di seme di girasole. I risultati, mostrati in figura 4, confermano la ripetibilità del metodo.

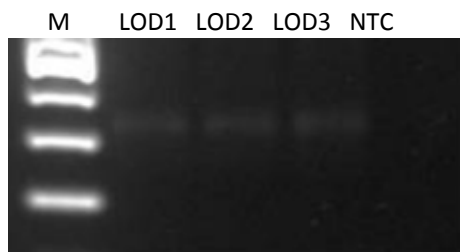


Figura 4 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di amplificazione di 3 repliche di pGEM-Ph al limite di rivelazione (LOD1, LOD2, LOD3); NTC, controllo no DNA; M, marcatore di peso molecolare.

Come per la ripetibilità, la riproducibilità è stata valutata amplificando 3 repliche dello stesso DNA target (pGEM-Ph) al limite di rivelazione combinato con 2 mL di DNA di seme di girasole, in momenti diversi (dati non mostrati). I risultati confermano la riproducibilità del metodo.

3.4 Validazione del Metodo diagnostico 2

I dati di validazione per il Metodo 2 sono disponibili nel documento EPPO PM/7/85(2). E' stato dunque eseguito un test di verifica dei criteri di *performance* indicati in tale documento al fine di valutare l'abilità del laboratorio ad ottenere i valori di validazioni pubblicati, seguendo le linee guida riportate nel documento EPPO PM 7/98 (2).

3.4.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata valutata amplificando 8 campioni target pGEM-Ph (tabella 4) a cui sono stati aggiunti 2 mL di DNA estratto da seme di girasole diluito 1:10 (fig. 5). Tutti i campioni, testati al limite di rilevazione del target, ovvero 456 PCN, hanno mostrato il segnale di amplificazione e sono stati identificati positivi alla presenza del target.

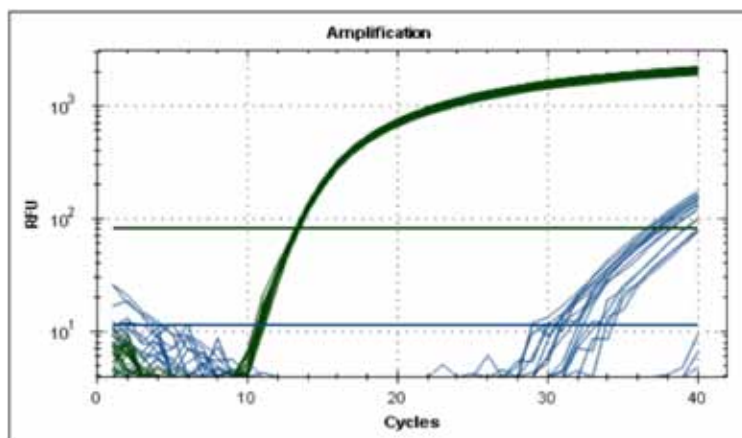


Figura. 5 - Curve di amplificazione della duplex Real-time PCR su 8 campioni target pGEM-Ph al LOD diluiti in DNA di seme di girasole. In verde, curve di amplificazione del controllo endogeno 18S; in blu, curve di amplificazione dell'amplicone target per *P. halstedii*; NTC, controllo no DNA.

3.4.2 Specificità analitica

La specificità analitica è stata valutata su 20 ng di DNA dei 4 campioni target (Ph1, Ph2, Ph3, Ph4) dei 4 campioni non-target (Pl, Pr, Pc, Ha) descritti in tabella 4. L'amplificabilità del DNA in esame è stata confermata nella stessa reazione monitorando il segnale di amplificazione del controllo endogeno del 18S. I risultati di queste analisi hanno confermato la specificità del metodo (dati non mostrati).

3.4.3 Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità è stata eseguita amplificando simultaneamente 8 repliche dello stesso DNA target (pGEM-Ph) al limite di rivelazione combinato con 2 ml di DNA di seme di girasole diluiti 1:10. I risultati, mostrati in tabella 5, confermano la ripetibilità del metodo. Come per la ripetibilità, la riproducibilità è stata valutata amplificando 8 repliche dello stesso DNA target (pGEM-Ph) al limite di rivelazione combinato con 2 ml di DNA di seme di girasole diluiti 1:10 in momenti e con operatori diversi.

I risultati, mostrati in tabella 5, sono espressi come coefficiente di variazione (rapporto in percentuale fra deviazione standard e media) dei cicli di soglia Ct, al fine di poterli confrontare con i risultati riportati nel EPPO PM/7/85(2). Tali risultati confermano la robustezza del metodo.

TABELLA 5 - Calcolo dei coefficienti di variazione dei cicli soglia (Ct) su 8 repliche dello stesso campione al limite di rilevazione (LOD1-LOD8) per la valutazione di ripetibilità e riproducibilità nel Metodo 2

Campione	RIPETIBILITA'			RIPRODUCIBILITA'		
	Ct	Ct medio	Coefficiente di variazione (%)	Ct	Ct medio	Coefficiente di variazione (%)
LOD1	34,02			30,29		
LOD2	34,28			30,95		
LOD3	33,25			28,20		
LOD4	33,83	33,42	1,85	28,76	30,17	4,61
LOD5	32,29			31,13		
LOD6	33,38			31,67		
LOD7	33,20			/		
LOD8	33,13			/		

3.5 Prove valutative inter-laboratorio

La robustezza dei Metodi diagnostici 1 e 2, intesa come validità di *performance* usando diversi reagenti e strumentazioni in diversi laboratori, con diversi operatori, è stata valutata mediante uno studio comparativo inter-laboratorio (*Performance study* - PT) a cui hanno partecipato 9 laboratori per il Metodo diagnostico 1 e 8 laboratori per il Metodo diagnostico 2. Questo studio è stato organizzato, gestito e valutato attenendosi alle linee guida proposte dal documento ISO 16140:2003

Per ogni laboratorio aderente al PT è stato preparato un set di 24 campioni. Ciascun campione è stato preparato come segue: 50 mL di DNA plasmidico pGEM-Ph contenente la sequenza target, estratto come descritto nel paragrafo 4.2, diluito in acqua milliQ sterile alle concentrazioni desiderate sono stati miscelati a 50 mL di una diluizione 1:10 di DNA di seme di girasole estratto come descritto nel paragrafo 3.2.

Il set di campioni risultava composto da:

- 8 repliche di campione positivo contenente una quantità di DNA target leggermente superiore al limite di rilevazione
- 8 repliche di campione positivo contenente una quantità di DNA target 10 volte superiore al limite di rilevazione
- 8 repliche di campione negativo contenente solo il DNA di seme di girasole

L'omogeneità e la stabilità dei campioni sono state confermate presso il laboratorio organizzante testando i campioni prima della spedizione e alla data stabilita come termine per la consegna dei risultati. Oltre ai campioni da testare il laboratorio organizzante ha fornito gli oligonucleotidi, le sonde e il controllo positivo costituito da DNA plasmidico pGEM-Ph diluito al limite di rilevazione. Per il Metodo diagnostico 1 sono stati analizzati i dati di 8 laboratori su 9, per un totale di 192 dati, giacché il dataset di un laboratorio risultava inficiato dall'assenza di amplificazione nel controllo positivo. Per il Metodo diagnostico 2 sono stati analizzati i dati di 6 laboratori su 8, per un totale di 144 dati, giacché i dataset di 2 laboratori risultavano inficiati ri-

spettivamente dall'assenza di amplificazione nel controllo positivo e dalla presenza di contaminazione nel controllo negativo di amplificazione. I risultati del metodo 2 sono stati analizzati come dati quantitativi (valori dei Ct di Real-time) confrontando la media e la deviazione standard di ciascun campione con il valori del controllo positivo.

In Allegato II sono riportati i reagenti e le strumentazioni utilizzati dai diversi laboratori partecipanti.

3.6 Conclusioni

I dati di validazione e/o verifica delle *performance* per entrambi i Metodi diagnostici proposti, ottenuti presso il laboratorio organizzante secondo le linee guida del documento EPPO PM 7/98(2), sono schematizzati in tabella 6 e messi a confronto con i valori di validazione pubblicati sul documento EPPO PM 7/85(2).

TABELLA 6 - confronto dei dati di validazione e/o verifica delle *performance* per entrambi i Metodi ottenuti presso il laboratorio organizzante

	Parametri	Valori ottenuti nel test di verifica	Valori pubblicati (EPPO PM 7/85(2))
METODO 1	Sensibilità analitica	530 PCN in 2 mL di estratto di DNA da seme di girasole	-3 pg di DNA genomico in 20 ng/mL di DNA da seme di girasole -1 seme infetto su 100
	Specificità analitica	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 4 campioni non-target valutati	Nessuna <i>cross reaction</i> su tutti campioni non-target valutati (Ioos <i>et al.</i> , 2007)
	Ripetibilità (%)	100%	97,5%
	Riproducibilità (%)	100%	87%
METODO 2	Sensibilità analitica	456 PCN	-456 PCN -1 seme infetto su 1000
	Specificità analitica	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 4 campioni non-target valutati	Nessuna <i>cross reaction</i> su tutti campioni non-target valutati (Ioos <i>et al.</i> , 2012)
	Ripetibilità (coefficiente di variazione)	1,85 %	1,98 %
	Riproducibilità (coefficiente di variazione)	4,61 %	1,69 %

Il Metodo 1 ha mostrato una sensibilità analitica equiparabile a quella del Metodo 2. Nel documento EPPO PM 7/85(2)) si attesta che la sensibilità analitica del Metodo 1, valutata come percentuale di seme infetto, sia pari all'1% mentre quella dichiarata per il Metodo 2 sia 0,1%. Tuttavia la valutazione della sensibilità analitica in base alle percentuali di seme infetto sul totale è incerta e non sempre riproducibile

poiché il limite di rilevazione dipende dalla biomassa di patogeno presente all'interno del seme che non è misurabile e non è sempre la stessa. Nel presente lavoro la sensibilità analitica è stata valutata come copie di target presente in DNA plasmidico in entrambi i Metodi, in maniera tale da rendere confrontabili e ripetibili i dati di ciascun metodo (Tabella 6).

I dati di specificità, ripetibilità e riproducibilità sono in linea con i valori di validazione riportati nel documento EPPO PM 7/85(2) per entrambi i metodi. La riproducibilità del Metodo 2 mostra un coefficiente di variazione leggermente maggiore rispetto al valore pubblicato.

I risultati del PT sono stati analizzati per valutare sensibilità relativa, specificità relativa, accuratezza relativa, accordanza (ripetibilità) e concordanza (riproducibilità). I dati relativi sono stati analizzati utilizzando le formule di calcolo mostrate in tabella 7, secondo le linee guida indicate nel documento ISO 16140:2003.

TABELLA 7 - Analisi dei risultati del *Performance test* relativi ai Metodi diagnostici.

CRITERIO DI VALUTAZIONE	Risultato Metodo diagnostico 1	Risultato Metodo diagnostico 2
Sensibilità relativa	99%	96%
Specificità relativa	100%	100%
Accuratezza relativa	99%	97%
Accordanza	99%	95%
Concordanza	99%	95%

I risultati del PT risultano soddisfacenti per entrambi i Metodi e per tutti i parametri di validazione osservati. Il confronto tra le medie dei dati ottenuti da ciascun laboratorio per ciascun parametro di validazione tra Metodo 1 e Metodo 2 non evidenzia differenze statisticamente significative: i due Metodi sono pertanto equiparabili per tutti i parametri analizzati.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BASAVARJU P., CHALUVARAJU G., DEEPAK S.A., AMRUTESH K.N., SHETTY H.S., 2004. Location and transmission of downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Seed Research*, **32**, 108–110.
- COOKE D.E.L., DRENTH A., DUNCAN J.M., WAGELS G., BRASIER C.M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **30**, 17–32.
- DELANOE D., 1972. Biologie et epidemiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). *CETIOM Informations Techniques*, **29**, 1–49.
- EPPO Diagnostic PM 7/85 (2), 2014. *Plasmopara halstedii*. *OEPP/ EPPO Bulletin*, **44**, 350–359. doi:10.1111/epp.12160
- EPPO Diagnostic PM 7/98 (2), 2014. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *OEPP/ EPPO Bulletin*, **44**, 117–147. doi:10.1111/epp.12118
- IOOS R., LAUGUSTIN L., ROSE S. *et al* , 2007. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology*, **56**, 209–218.
- IOOS R., FOURRIER C., WILSON V., WEBB K., SCHEREFFER J.-L., TOURVIEILLE DE LABROUHE D., 2012. An optimized duplex real-time PCR tool for sensitive detection of the quarantine Oomycete *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Phytopathology*, **102**, 908–917.
- ISO 16140, 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods.
- ISO/IEC 17025, 2005. Standard. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- KOLTE, S.J. (1985) Diseases of annual edible oilseed crops, Vol. 3, sunflower, safflower & nigerseed diseases. CRC Press, Inc., Boca Raton, USA.
- LEPPIK E.E., 1966. Origin and specialisation of *Plasmopara halstedii* complex in the Compositae. *FAO Plant Protection Bulletin*, **14**, 72–76.
- NISHIMURA, M., 1922. Studies in *Plasmopara halstedii*. J. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ. XI (Pt 3), 185–210.
- NOVOTEL'NOVA N.S. , 1966. Downy Mildew of Sunflower. USSR, Nauka, Moscow (RU).
- SACKSTON W.E., 1981. Downy mildew of sunflower. In: The Downy Mildews (ed. Spencer DE), pp. 545–575. Academic Press, London (UK).
- VIRÁNYI, F. , 1988. *Plasmopara halstedii*. In: European handbook of plant diseases (Ed. by Smith, I.M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliot, R.A.; Archer, S.A.), pp. 228–230. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- VIRÁNYI, F., 1988b. Factors affecting oospore formation in *Plasmopara halstedii*. *Proceedings of the 12th International Sunflower Conference*, Novi Sad, **2**, 32–37.
- YOUNG P.A., MORRIS H.E., 1927. *Plasmopara* Downy Mildew of Cultivated Sunflowers in *American Journal of Botany*, **14**, 9552–552.
- ZIMMER, D.E., HOES, J.A., 1978. Diseases. In: Sunflower science and technology (Ed. by Carter, J.F.), pp. 225–262. American Society of Agronomy, Madison, USA.

ALLEGATO I Strumentazione , materiali e reagenti necessari

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Vortificatore
3. Autoclave
4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Bilancia analitica
6. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
7. Apparat per elettroforesi orizzontali su gel d'agarosio Bio-Rad
8. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
9. Mixer (Waring Commercial)
10. Distillatore
11. Frigorifero e congelatore
12. Termociclatore "T-100 Thermal Cycler" (Bio-Rad)
13. Termociclatore per Real-Time PCR "CFX-96" (Bio-Rad)
14. Micropipette Gilson dedicate all'estrazione di acidi nucleici e calibrate (P20, P100, P200, P1000)
15. Micropipette Gilson dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P100, P200, P1000)
16. Sistema di *imaging* per visualizzare i risultati delle analisi elettroforetiche GelDoc XR+ (Bio-Rad)
17. Fluorimetro Qubit .1 (Invitrogen)

Reagenti

1. Agarosio per biologia molecolare
2. Colorante per acidi nucleici "Gel Red Nucleic Acid Stain" (Biotium; Cat. 41003)
3. Kit commerciale per estrazione DNA "NucleoSpin Plant II" (Macherey-Nagel; cat. 740770)
4. Reagenti chimici per elettroforesi su gel d'agarosio [Tris-(idrossimetil)- amminometano, acido borico, EDTA, Blu di bromofenolo, Glicerolo]
5. Marcatore di peso molecolare per DNA "1 kb Plus DNA Ladder" (Invitrogen; Cat. 10787-018)
6. Primer e sonde specifici per *P. halstedii*
7. Primer e sonde specifici per 18S rDNA
8. Enzima Taq DNA polimerasi (Invitrogen; Cat. 10342)
9. dNTP MIX (Bioline, Cat. BIO-39053)
10. Ultrapure BSA (Ambion Cat. 2616)
11. Kit per Realtime PCR "qPCR core kit No Rox" (Eurogentec, Cat., 05-QP73-05NR)

Materiali

1. Ghiaccio granulare
2. Acqua bidistillata sterile nucleasi-*free*
3. Guanti monouso
4. Porta provette
5. Provette tipo Eppendorf da 0,2, 1,5 e 2 ml
6. Piastre da 96 pozzetti (con pellicole adesive) per Real time PCR (Bio-rad, Cat. MLL9601)
7. Puntali per micro pipette, nucleasi-*free* e con filtro
8. Vetreria varia o materiale plastico monouso o autoclavata e/o nucleasi-*free*

ALLEGATO II - Strumentazione e reagenti utilizzati nelle prove valutative inter-laboratorio

METODO 1						
Codice laboratorio	DNA polimerasi o Master Mix	Termociclatore	Tipo di gel per elettroforesi	Colorante per acidi nucleici	Sistema acquisizione immagini	
LAB01	GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega)	iQ5 (Bio-rad)	Agilent DNA 1000 chip, 5067-1504		Agilent Bioanalyzer 2000	
LAB02	Platinum Taq (Invitrogen)	GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)	Agarosio, (Sigma)	Eurosafe (Euroclone)	Gel Doc 2000 (Bio-rad)	
LAB03	GoTaq DNA polymerase (promega)	LifePro Thermal Cycler /BIOER (Serves Life)	Pre-cast gel E-GELS 2% (Invitrogen)		E-gel IBASE power system (Life Technologies)	
LAB04	qPCRCore kit No Rox (Eurogentec)	T100™ Thermal Cycler (Bio-rad)	Agarosio	GelRed (Biotum)	System Chemidoc XRS+ (Bio-rad)	
LAB05	Taq DNA Polymerase (Invitrogen)	T100™ Thermal Cycler (Bio-rad)	Agarosio Type D-1 LE (Hispanagar)	GelRed (Biotum)	System Geldoc XRS+ (Bio-rad)	
LAB06a	Platinum Taq (Invitrogen)	GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)	Agarosio, (Sigma)	Bromuro di etidio 10 mg/ml (Sigma)	GelDoc XR Universal Hood II, (Bio-rad)	
LAB07	Taq DNA polymerase (Qiagen)	Mastercycler (Eppendorf)	Agarosio	Sybr Safe (Invitrogen)	Gel Doc 2000 (Biorad)	
LAB08						

METODO 2		
Codice laboratorio	DNA polimerasi o Master Mix	Termociclatore Real-time
LAB01	IQ Multiplex Powermix (Bio-Rad)	cfx96 (Bio-rad)
LAB02	qPCRCore kit No Rox (Eurogentec)	SteponePlus (Applied Biosystem)
LAB03	TaqMAN Universal Master Mix with UNG II (Life Technologies)	7500 Real Time PCR System, (Applied Biosystem)
LAB04	SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix (Bio-rad)	cfx96 (Bio-rad)
LAB05	qPCRCore kit No Rox (Eurogentec)	cfx96 (Bio-rad)
LAB06b	2X sSO Fast SuperMix, (Bio-rad)	cfx96 (Bio-rad)

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’
in semi di *Apiaceae*

V. Ilardi, V. Lumia, E. Di Nicola

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Patogeno, colture colpite e diffusione
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Trasmissione e aplotipi di CaLsol
- 1.4 Normativa e misure di emergenza fitosanitaria

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Dimensione campione
- 2.3 Estrazione del DNA
 - 2.3.1 Occorrente
- 2.4 Metodo diagnostico 1: end-point PCR (Ravindran *et al.*, 2011)
 - 2.4.1 Reazione di amplificazione
 - 2.4.2 Elettroforesi in gel di agarosio
 - 2.4.3 Uso dei controlli
 - 2.4.4 Valutazione dei risultati
- 2.5 Metodo diagnostico 2: real-time PCR (Li *et al.*, 2009)
 - 2.5.1 Reazione di amplificazione real-time PCR
 - 2.5.2 Uso dei controlli
 - 2.5.3 Valutazione dei risultati

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Valutazione delle *performance* dei metodi
- 3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione
- 3.3 Validazione intra-laboratorio del metodo diagnostico 1 (end-point PCR)
 - 3.3.1 Sensibilità analitica
 - 3.3.2 Specificità analitica
 - 3.3.3 Selettività
 - 3.3.4 Ripetibilità e riproducibilità
- 3.4 Validazione intra-laboratorio del Metodo diagnostico 2 (real-time PCR)
 - 3.4.1 Sensibilità analitica
 - 3.4.2 Specificità analitica
 - 3.4.3 Selettività
 - 3.4.4 Ripetibilità e riproducibilità
- 3.5 Prove valutative inter-laboratorio

4. RISULTATI E CONCLUSIONI

- 4.1 Conclusioni per i metodi di PCR 1 (end-point PCR) e 2 (real-time PCR TaqMan)
- 4.2 Conclusioni per il metodo di estrazione del DNA da semi di *Apiaceae*

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	' <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum'
Tassonomia	Domain: Bacteria Phylum: Proteobacteria Class: Alphaproteobacteria Order: Rhizobiales Family: Phyllobacteriaceae Genus: <i>Candidatus</i> Liberibacter Species: " <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum"
Avversità	zebra chip, zebra complex, psyllid yellows, tomato psyllid yellows, yellow declines e vegetative disorders.
Sinonimi e acronimi	' <i>Candidatus</i> Liberibacter psyllaourous' Liberibacter psyllaourous Liberibacter solanacearum CaLsol Lso
Categoria fitosanitaria	Lista A1 dell'EPPO per gli aplotipi delle solanaceae

1.1 Patogeno, colture colpite e diffusione

'*Candidatus* Liberibacter solanacearum' (CaLsol), è un batterio Gram-negativo non coltivabile *in vitro*, parassita obbligato limitato al floema di piante (*Solanaceae* e *Apiaceae*) ed emolinfa di psille (*Psyllidae*).

CaLsol è patogeno di colture economicamente importanti quali le *Solanaceae* patata (*Solanum tuberosum*), pomodoro (*S. lycopersicum*), peperone (*Capsicum annuum*), melanzana (*S. melongena*) e tabacco (*Nicotiana tabacum*) e delle *Apiaceae* carota (*Daucus carota*), sedano (*Apium graveolens*) e pastinaca (*Pastinaca sativa*).

Benchè la malattia della patata "zebra chip" fosse nota in Messico già dal 1994, CaLsol è stato identificato per la prima volta nel 2008 negli Stati Uniti ed in Nuova Zelanda in piante di patata e pomodoro, e nella psilla *Bactericera cockerelli*. Da allora è stato rinvenuto anche in numerosi stati dell'America centrale sempre associato a malattie delle *Solanaceae* (EPPO 2013; per una rassegna Haapalainen, 2014). A partire dal 2010 è stato identificato in carota in Finlandia, Svezia, Norvegia, Germania, Francia, Spagna continentale e isole Canarie, Marocco ed Austria (EPPO 2013; per una rassegna Haapalainen, 2014; (Euphresco PHYLIB meeting 27-28 aprile 2017). Successivamente, sempre in Spagna, è stato rinvenuto anche in sedano (Teresani et al., 2014), prezzemolo e pastinaca (Alfaro-Fernández et al., 2017).e recentemente in sedano in Austria (Euphresco PHYLIB meeting 27-28 aprile 2017). In Italia, ad oggi, sulle colture non è stata segnalata alcuna malattia ascrivibile ad infezione da CaLsol, mentre è stato rinvenuto in semi di carota, prezzemolo e sedano commercializzati nel nostro paese (Ilardi et al., 2016a; Ilardi et al., 2016b). In ogni caso CaLsol, sia sulle

Apiaceae sia sulle *Solanaceae*, è da considerare una seria minaccia per l'agricoltura italiana ed europea (Ilardi e Catara, 2013).

1.2 Sintomatologia

I sintomi indotti dall'infezione di CaLsol possono essere confusi con quelli dovuti a fitoplasmi o a disordini fisiologici. Nelle *Solanaceae* si ha arresto della crescita, clorosi e arrossamento del fogliame, arrotolamento delle foglie, accorciamento e rigonfiamento degli internodi (pianta a rosetta), presenza di rami ascellari o tuberi aerei, disseccamento fogliare, difficoltà di allegagione, produzione di numerosi piccoli e deformi frutti di scarsa qualità. I sintomi del tubero di patata sono caratteristici (zebra chip) e consistono nell'imbrunimento del tessuto vascolare con punteggiature necrotiche dei tessuti interni e striature dei tessuti dei raggi midollari. Con la frittura, questi sintomi diventano più pronunciati e il prodotto trasformato diviene commercialmente inaccettabile. I sintomi in carota, simili a quelli associati a fitoplasmi e *Spiroplasma citri*, comprendono arricciatura fogliare, giallume, bronzature e scolorimento violaceo delle foglie, arresto della crescita dei germogli e del fittone, proliferazione di radici secondarie. Nel sedano, disturbi vegetativi associati al patogeno comprendono un numero anomalo di germogli e arricciamento degli steli.

1.3 Trasmissione e aplotipi di CaLsol

In natura CaLsol è trasmesso in maniera persistente - propagativa da diverse specie di psille (ordine Homoptera, famiglia *Psyllidae*). Può essere trasmesso anche per innesto e attraverso la cuscuta (Haapalainen, 2014). Nelle *Solanaceae* non è trasmesso da seme vero (Munyanza, 2012), mentre Bertolini e coautori (2014) hanno dimostrato la trasmissibilità di CaLsol per seme in carota. Tuttavia, uno studio francese non è riuscito a riprodurre quest'ultimo risultato (Loiseau *et al.*, 2015).

In base a polimorfismi a livello del singolo nucleotide (SNP) di porzioni del gene 16S, della regione intergenica ISR16S/23S e dei geni 50rpIJ/rpIL di CaLsol, attualmente sono riconosciuti cinque aplotipi: A, B, C, D, E (Nelson *et al.*, 2013; Teresani *et al.*, 2014). A e B, trasmessi da *Bactericera cockerelli*, infettano le *Solanaceae*, mentre C, D ed E sono stati associati ad infezioni delle *Apiaceae*. L'aplotipo C, rinvenuto in nord Europa, è trasmesso da *Trizoa apicalis*, mentre in Spagna, Francia e Marocco sono stati rinvenuti gli aplotipi D ed E trasmessi da *Bactericera trigonica*.

1.4 Normativa e misure di emergenza fitosanitaria

Gli aplotipi A e B e il vettore *Bactericera cockerelli* sono nella lista EPPO A1 tra i patogeni da quarantena non presenti in Europa e nel bacino del mediterraneo (EPPO Standards, 2016).

Il fatto che sia stata dimostrata la trasmissibilità per seme in carota ha spinto paesi importatori di questa semente a chiedere misure di emergenza in tal senso e non

solo per le piantine ed i tessuti in coltura. Nelle notifiche del World Trade Organization (WTO) volute dal Giappone (G/SPS/N/JPN/383) e dall'Australia (G/SPS/N/AUS/345 e successiva G/SPS/N/AUS/377) viene richiesto che i lotti di semi di carota importati vengano precedentemente controllati per la assenza di CaLsol mediante la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR) o trattati termicamente per devitalizzare il patogeno (IPPC. 2016 Emergency Action).

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (CaLsol) fa parte dei batteri fastidiosi non coltivabili in laboratorio. Inoltre, le piante infette possono essere asintomatiche ed i sintomi possono essere simili a quelli associati ad altri batteri floematici o a stress fisiologici. Ne consegue che la diagnosi di CaLsol attualmente è basata essenzialmente sul rilevamento del suo acido nucleico mediante test di biologia molecolare. In particolare, vengono utilizzati test di Polymerase Chain Reaction (PCR) convenzionale (cPCR o end-point PCR), e real-time PCR per l'amplificazione principalmente di 16S, ISR16/23S e rpIJ/rpILrpIJ/rpIL rDNA. Ove possibile è associata la visualizzazione al microscopio elettronico del patogeno nei tessuti vegetali.

Di seguito è descritto un protocollo per l'estrazione del DNA da semi di *Apiaceae* e due metodi di diagnosi molecolare basati uno su una end-point PCR e l'altro su una real-time PCR TaqMan. Il protocollo di estrazione del DNA è stato messo a punto presso il CREA-DC mentre i due metodi molecolari, modificati e validati, sono descritti originariamente nei lavori di Ravindran *et al.* (2011) e Li *et al.* (2009). Entrambi i metodi molecolari sono riportati nel protocollo diagnostico IPPC DP21 (2017) ed in quello EPPO nella serie PM 7 in corso di preparazione. Il metodo della real-time PCR TaqMan è riportato anche dall'International Seed Federation (ISF, 2017).

I protocolli diagnostici di seguito forniscono le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del batterio CaLsol in semi di *Apiaceae* nei laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze. La scelta della metodologia diagnostica da validare, secondo i parametri di validazione ISO 16140:2003, ISO 17025 ed EPPO Diagnostic PM7/98 (2) (EPPO 2014), è scaturita da un attento studio delle metodiche riportate sull'argomento, nonché da un confronto con i Servizi Fitosanitari Regionali (Gruppo di lavoro costituito da: SFR Emilia Romagna – Dr Babbini -; SFR Liguria – Dr Guelfi -; SFR Lombardia – Dr Calvi-; SFR Toscana - Dr Rizzo -; SFR Veneto – Dr Saccardi -; CREA-DC – Dr Ilardi -).

Per la definizione di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono

state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.

2.2 Dimensione campione

L' International Seed Federation (ISF) indica:
campione: 20.000 semi (≈ 20 gr per semi di carota)
sotto campione: 10.000 semi

Tuttavia, qualora non fosse disponibile un campione di tali dimensioni, è possibile usare campioni più piccoli (500 semi ≈ 0.5 gr) così come riportato in letteratura (Bertolini *et al.*, 2014; Ilardi *et al.*, 2016a; Ilardi *et al.*, 2016b).

2.3 Estrazione del DNA

Il metodo riportato riguarda l'estrazione del DNA da semi di *Apiaceae*. Si basa sull'uso del tampone CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) e del kit commerciale QIAGEN DNeasy® Plant mini kit. Il metodo non prevede l'uso di solventi organici e si svolge in due giorni. Durante il primo giorno i semi vengono lavati per togliere eventuali fungicidi e lasciati ad imbibire in acqua tutta la notte per rendere poi più agevole la macerazione. Visto che CaLsol nel seme è localizzato nel tegumento (Bertolini *et al.*, 2014), la fase di macerazione deve essere molto accurata evitando, comunque, di surriscaldare il campione.

I giorno:

1. Dal campione di 20gr di seme pesare due sotto campioni di 10 gr e metterli ognuno in un backer da 1 litro;
2. Aggiungere 500 ml di tampone di lavaggio (0.5% Triton X-100 in H₂O distillata), agitare 30' a temperatura ambiente;
3. Eliminare il tampone di lavaggio e sciacquare ripetutamente con H₂O del rubinetto sino a che non si formi più schiuma;
4. Aggiungere H₂O distillata a copertura e lasciare tutta la notte a T ambiente;

II giorno:

1. Eliminare l'H₂O;
2. Trasferire i semi in busta di plastica resistente (tipo grinding bags, stomacher bags) ed aggiungere 100 ml di tampone CTAB con acido ascorbico*;
3. Macerare i semi con martello o omogenizzatore palmare o montato su trapano;
4. Trasferire 500µl di supernatante in tubo da 1.5 ml (tipo eppendorf) e aggiungere

- 4 µl di RNase A (fornita con il DNeasy kit). Chiudere la provetta, invertire gentilmente ed incubare a 65°C per 35' continuando ad invertire ogni tanto;
5. Aggiungere 130 µl di buffer P3 (QIAGEN), invertire 3 volte e incubare in ghiaccio per 5';
6. Centrifugare a temperatura ambiente a 14.000 rpm per 5';
7. Trasferire il supernatante sulla colonna QIAshredder™ posta in un tubo fornito dal kit e centrifugare a 20.000 x g (14,000 rpm o a massima velocità) per 2';
8. Trasferire 450 µl di eluato in tubo da 1.5ml contenente 675 µl QIAGEN buffer AW1 (se si recupera minor quantità calcolare 1.5 volumi di AW1). Mischiare pipettando;
9. Trasferire 650 µl di estratto sulla colonna DNeasy (posta in un tubo fornito dal kit) e centrifugare a 6,000 x g (8.000 rpm) per 1';
10. Eliminare l'eluato ed aggiungere il resto dell'estratto alla colonna e centrifugare a 10.000 rpm per 1';
11. Mettere la Colonna in un nuovo tubo da 2 ml e aggiungere 500 µl di QIAGEN buffer AW2 (tampone di lavaggio) e centrifugare a 10.000 rpm per 1';
12. Buttare l'eluato, aggiungere altri 500 µl di QIAGEN buffer AW2 e centrifugare alla massima velocità per 2 min;
13. Buttare il tubo con tutto l'eluato. Assicurarsi che la base della colonna sia asciutta, eventualmente tamponarla su carta da filtro, e posizionarla in un tubo nuovo da 1.5 ml. Aggiungere direttamente sul filtro della colonna 100 µl di AE buffer preriscaldato a 65°C, incubare 5' a temperatura ambiente e centrifugare a 10.000 rpm per 1'. Buttare la colonna e conservare il DNA a +4°C. (per raccogliere tutto si possono aggiungere altri 50 µl di AE alla colonna e ricentrifugare 1').

2.3.1 Occorrente

Attrezzature

Bilancia

Autoclave (preparazione componenti tampone CTAB, sterilizzare acqua distillata)

Macchina per la produzione di ghiaccio

pHmetro (preparazione componenti tampone CTAB)

Freezer a -20°C

Centrifuga da tavolo per tubi da 1.5/2.2 ml

Pipette da 20-200 µl e 200-1000 µl

Bagnetto ad acqua o heating block a 65°C

Agitatore magnetico (preparazione tampone CTAB)

Agitatore (lavaggio semi)
Orologio/timer
Martello od omogenizzatore palmare (tipo handheld homogenize Bioreba) o montato su trapano.

Materiale

Backer da 1 litro
Grinding bags (tipo Agdia o Bioreba)
Puntali sterili per Pipette da 20-200 µl and 200-1000 µl
Pipette da 5ml (per dispensare il tampone CTAB)
Provettoni da 50 ml (tipo Falcon)
Provette sterili tipo eppendorf da 2 e 1.5 ml
Guanti monouso

Soluzioni e kit

QIAGEN DNeasy® Plant mini kit
Tampone di estrazione CTAB*
Etanolo assoluto (da aggiungerne al tampone AW del kit)
Triton X-100
H₂O distillata
H₂O bidistillata sterile

*** Tampone di estrazione CTAB (2.5% cetyltrimethylammonium bromide)**

Reagenti°	Concentrazione finale	quantità per 1 L
CTAB	2.5%	25 g
NaCl	1.4 M	81.76 g
1 M Tris-HCl, pH 8.0 (sterile)	100 mM	100 ml
0.5 M EDTA, pH8.0 (sterile)	20 mM	40 ml
Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)	1%	10 g

* Portare a volume con acqua distillata sterile. Conservare a Temperatura ambiente.
Subito prima dell'uso aggiungere acido ascorbico (5.3g/L)

2.4 Metodo diagnostico 1: end-point PCR (Ravindran *et al.* 2011)

Il metodo di PCR si basa sull'amplificazione specifica di un frammento di 383 paia di basi localizzato nella regione intergenica del DNA ribosomale 16S/23S con una coppia di primer specifici:

Lso TX 16/23 F AATTTTAGCAAGTTCTAAGGG

Lso TX 16/23 R GGTACCTCCCATATCGC

Composti chimici per la corsa elettroforetica: Tampone TAE (Tris base, acido acetico, EDTA); Agarosio per biologia molecolare; Bromuro d'Etidio (EtBr) o GelRed per la colorazione del DNA.

Marcatore di peso molecolare per DNA (range 50 bp-1000 bp). I primer si acquistano "desalted" e si diluiscono ad una concentrazione di 100 µM in tampone TE (TrisHCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice e sono conservati a -20°C in aliquote da 50 µl. Si prepara la soluzione di lavoro alla concentrazione di 10 µM, diluendo in acqua bidistillata o ultrapura sterile. Anche la soluzione di lavoro si conserva a -20°C.

2.4.1 Reazione di amplificazione

La reazione di amplificazione si allestisce in ghiaccio. Quando si effettuano più reazioni di PCR contemporaneamente occorre preparare, in una singola provetta da 1,5 mL, una soluzione madre (*master mix*) che contenga tutti i reagenti illustrati nella Tabella 1, meno i campioni di DNA che verranno introdotti direttamente nelle provette di reazione della PCR. Nel calcolo della *master mix* è consigliabile considerare il 10% in più rispetto al numero delle reazioni da eseguire per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante.

1. Miscelare tutte le soluzioni dopo averle scongelate e centrifugarle pochi secondi per raccogliere le gocce sul fondo;
2. aggiungere, in una provetta da 1,5 ml tenuta in ghiaccio, i volumi richiesti delle varie componenti come indicato in Tabella 1;
3. miscelare la *master mix* e centrifugarla pochi secondi per raccogliere le gocce sul fondo;
4. distribuire 15 µl di *master mix* in provette da PCR da 0,2 ml (o 0,5 ml a seconda del termociclatore) predisposte in ghiaccio, in un apposito portaprovette;
5. dopo aver diluito i campioni di DNA estratti da seme 1:10 (es. 10µl DNA+90µl H₂O milliQ sterile) aggiungere 10 µl di ogni campione diluito nella corrispondente provetta da 0,2 (0,5) ml ed un equivalente volume di acqua al campione di controllo negativo, che va sempre inserito in ogni esperimento PCR.

TABELLA 1 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione PCR del Metodo 1

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per reazione
H ₂ O			3.8 µl
Buffer*	5 X	1 X	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
primer LSoTXF	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
primer LSoTXR	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
dNTPs	10 mM	800 µM	2 µl
Taq polimerasi*	5 U/µl	1 U	0.2 µl
Subtotale			15 µl

*Go Taq G2Flexi DNA polymerase (Promega M7805) con *loading buffer* incluso nel Buffer 5X

Una volta pronti, i campioni sono inseriti nel termociclatore e sottoposti al seguente ciclo termico:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	4'	1
	95 °C	30"	
Amplificazione	55 °C	30"	40
	72 °C	60"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	∞	1

N.B.: se possibile, le provette vanno tenute in ghiaccio fino a che il termociclatore non raggiunge la temperatura di denaturazione (95°C). Una volta arrivato a temperatura possono essere sistemate nella macchina.

2.4.2 Elettroforesi in gel di agarosio

1. Preparare il gel di agarosio 1.8% (peso/volume) in tampone TAE 1X.
2. Caricare 10 µl del campione amplificato (se si usa un buffer di reazione della PCR contenente già il *loading buffer*) altrimenti aggiungere 2 µl di *DNA loading buffer* 6X per ogni campione.
3. Caricare in un pozzetto un marcatore di peso molecolare idoneo (range circa 50-1000 paia di basi).

4. Correre in tampone TAE 1X per circa 40-50 minuti a 80 volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Dopo la corsa elettroforetica colorare il gel in EtBr o GelRed.
6. Osservare il gel mediante transilluminatore ad U.V. e fotografare.

2.4.3 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione devono essere aggiunti i seguenti controlli:

Controllo negativo di amplificazione (NTC): reazione di amplificazione in cui il campione di DNA è sostituito con H₂O. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.

Controllo negativo di isolamento (NIC): reazione di amplificazione di DNA estratto da seme di *Apiaceae* non infetto. Serve a confermare la specificità del metodo per l'organismo target.

Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di amplificazione di DNA plasmidico contenente l'amplicone target di CaLsol o di un campione biologico positivo a CaLsol già verificato in esperimenti precedenti diluito al limite di rilevazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR..

2.4.4 Valutazione dei risultati

L'esperimento di end-point PCR è considerato valido se:

1. il controllo positivo di amplificazione PAC dà una banda di 383 paia di basi;
2. il controllo negativo NIC non dà banda di 383 pb;
3. il controllo negativo NTC non dà alcuna banda.

Il campione è considerato positivo per la presenza di CaLsol se l'amplificazione produce un amplicone di 383 paia di basi che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo e coerentemente rispetto alla banda di riferimento del marcatore di peso molecolare. Al contrario, la presenza di bande di peso molecolare diverso o l'assenza di segnali di amplificazione indicano che il campione è negativo per la presenza di CaLsol.

2.5 Metodo diagnostico 2: real-time PCR (Li *et al.*, 2009)

Il metodo originale sarebbe basato sull'utilizzo di una duplex real-time PCR TaqMan per la simultanea individuazione del genoma di CaLsol (gene 16S) e la verifica della qualità del DNA estratto mediante l'amplificazione di un gene di controllo interno (gene per la citocromo ossidasi dei mitocondri di pianta COX). Benché nella pubblicazione sia scritto che la ricerca contemporanea del gene COX non diminuisca la sensibilità del test, nella nostra esperienza, invece, la capacità di identificare CaLsol diminuisce notevolmente dando luogo a falsi negativi. Di conseguenza, facendo riferimento al metodo di Li *et al.*, 2009 si intende la ricerca del

solo gene 16S di CaLSol. Nello specifico il metodo è una real-time PCR TaqMan dove i primers amplificano una regione di 78 paia di basi (pb) all'interno della quale si lega la sonda che porta il fluoroforo FAM (6-carboxifluoresceina) ed il "quencher" BHQ1 (Black Hole Quencher 1).

Qualora si voglia controllare la qualità del DNA estratto mediante l'amplificazione del gene COX, si consiglia di eseguire in un'altra provetta/pozzetto questo test real-time PCR TaqMan che comunque, si svolge con lo stesso ciclo termico e può essere effettuato contemporaneamente. In questo caso i primers amplificano una regione di 68 pb e la sonda porta il fluoroforo TET (tetraclorofluoresceina) ed il "quencher" BHQ2 (Black Hole Quencher 2).

Le sequenze di ciascun primer e le sonde fluorogeniche sono riportate in Tabella 2.

TABELLA 2 - Primers e sonde utilizzati per le real-time PCR TaqMan

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
LsoF	Primer <i>forward</i> specifico per CaLSol	5'GTCGAGCGCTTATTTTAATAGGA-3'
HLBr	Primer <i>reverse</i> specifico per CaLSol	5'GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG3'
HLBp	Sonda <i>dual labeled</i> specifica per CaLSol	5'-FAM-AGACGGGTGAGTAACGCG-BHQ1-3'
COXf	Primer <i>forward</i> per COX	5' GTATGCCACGTGCGATTCCAGA 3'
COXr	Primer <i>reverse</i> per COX	5' GCCAAACTGCTAAGGGCATT3'
COXp	Sonda <i>dual labeled</i> per COX	5' -TET-ATCCAGATGCTTACGCTGG-BHQ2-3'

I primer si acquistano "desalted", le sonde purificate in HPLC. Tutti gli oligonucleotidi si diluiscono alla concentrazione di 100 µM in tampone TE (TrisHCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) seguendo le istruzioni della ditta fornitrice e sono conservati a -20°C in aliquote da 50 µL. Si prepara la soluzione di lavoro alla concentrazione di 10 µM per i primers e di 20µM per i probes, diluendo in acqua bidistillata o ultrapura sterile le aliquote da 100 µM. Anche la soluzione di lavoro si conserva a -20°C. La sonda diluita, una volta scongelata, può essere conservata a 4°C per massimo una settimana o ricongelata una sola volta.

2.5.1 Reazione di amplificazione real-time PCR TaqMan

Le reazioni di PCR sono condotte utilizzando la *master mix* TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies), come consigliato dal protocollo ISF (2017).

La reazione di amplificazione è allestita in ghiaccio. Tutti i reagenti, dopo essere stati scongelati, devono essere miscelati e centrifugati pochi secondi. In una singola provetta da 1,5 mL si prepara una *master mix* contenente tutti i reagenti illustrati nella Tabella 3, meno i campioni di DNA, da introdurre direttamente nelle

provette di reazione PCR; si calcolano i quantitativi richiesti in funzione del numero totale di campioni da saggiare. Nel numero di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare il 10% in più per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante. Si aggiungono i volumi richiesti dei vari componenti nell'ordine indicato in Tabella, e si miscelano tra loro; si consiglia di centrifugare per pochi secondi la *master mix* per raccogliere le gocce sul fondo. Per ogni campione si eseguono 3 repliche tecniche.

TABELLA 3 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Real-time PCR del Metodo 2

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (μl)	Concentrazione finale
H ₂ O		3,19	
MastMix II*	2X	7,50	1,X
primer LsoF	10μM	0,60	0,40 μM
primer HLBr	10μM	0,60	0,40 μM
probe HLBP (FAM)	20μM	0,11	0,15 μM
Subtotale	/	12	/
DNA stampo	/	3	/

*TaqMan Universal Master Mix II

Una volta pronti, i campioni sono inseriti nel termociclatore per real-time e sottoposti al ciclo termico riportato nello schema di seguito.

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale e attivazione della polimerasi	95 °C	10'	1
Denaturazione	95 °C	15''	45
Ibridazione/polimerizzazione	60 °C	60''	

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per il fluoroforo FAM (target CaLsol 16SrDNA) o TET (target COX).

2.5.2 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione real-time PCR devono essere aggiunti i seguenti controlli:

Controllo negativo di amplificazione (NTC): reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con H₂O. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.

Controllo negativo di isolamento (NIC): reazione di amplificazione di DNA estratto da seme di *Apiaceae* non infetto. Serve a confermare la specificità del metodo per l'organismo

target.

Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di amplificazione di DNA plasmidico contenente l'amplicone target di CaLsol o di un campione biologico positivo a CaLsol già verificato in esperimenti precedenti diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione.

2.5.3 Valutazione dei risultati

L'esperimento di real-time è considerato valido se:

1. il controllo positivo di amplificazione PAC dà una curva esponenziale ad un valore $Ct \leq 40$ fissando il threshold sopra il background della fluorescenza;
2. i controlli negativi NTC e NIC non danno una curva esponenziale.

I campioni sono considerati positivi per la presenza di CaLsol se danno una curva esponenziale ad un valore $Ct \leq 40$ fissando il threshold sopra il background della fluorescenza. I campioni sono considerati negativi per la presenza di CaLsol se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un Ct maggiore di 40. NB. Il valore soglia di Ct pari a 40 è indicativo, ogni laboratorio deve verificarlo nelle proprie condizioni quando esegue il test per la prima volta.

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Valutazione delle *performance* dei metodi

Il processo di validazione per entrambi i metodi diagnostici molecolari è stato condotto come descritto nel documento EPPO PM7/98 (2) (EPPO 2014), facendo riferimento ai protocolli diagnostici pubblicati in letteratura (Ravindran *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; ISF, 2017) con modifiche e adattamenti specificati nel testo. I **parametri di validazione** considerati sono stati: sensibilità analitica, specificità analitica, selettività, ripetibilità e riproducibilità. Le valutazioni dei primi quattro parametri sono state eseguite presso i laboratori del Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, sede di Roma (CREA-DC). Il parametro di riproducibilità è stato validato presso il CREA-DC ed organizzando un **Ring Test (Test Performance Study – TPS-)** a cui hanno partecipato 10 laboratori di Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) ed il CREA-DC. Di seguito sono elencate le strutture con i relativi responsabili e referenti tecnici:

1. SFR Campania - Dr Paola Spigno e Dr Lucia Cozzolino
2. SFR Emilia-Romagna - Dr Ambra Alessandrini e Dr Rossella Gozzi
3. SFR Liguria - Dr Moreno Guelfi
4. SFR Lombardia - Dr Francesca Gaffuri
5. SFR Marche - Dr Simona Talevi in collaborazione con UNIVPM - Prof. Gianfranco Romanazzi, Dr Lucia Landi e Dr Sergio Murolo
6. SFR Piemonte – Dr Giovanna Mason

7. SFR Sardegna - Dr Mauro Nannini e Dr Luisa Otgianu
8. SFR Toscana - Dr Domenico Rizzo
9. SF Trento FEM-IASMA - Dr Valeria Gualandri
10. SFR Veneto - Dr Saccardi e Dr Daniela Pasqua di Bisceglie
11. CREA-DC - Dr Vincenza Ilardi e Dr Valentina Lumia

3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione

‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (CaLsol) è un patogeno obbligato e non è possibile coltivarlo *in vitro*; pertanto, non avendo la disponibilità di DNA del batterio ottenuto da singola colonia, la sensibilità analitica è stata valutata con DNA plasmidico contenente la sequenza target del gene 16S di CaLsol riconosciuta dal test di real-time PCR TaqMan (DNA gentilmente fornito dal Prof. Li, autore dell’articolo Li *et al.*, 20019) e con la diluizione seriale di un campione di DNA di seme di carota infetto da CaLsol.

Gli esperimenti di validazione sono stati eseguiti su 32 campioni target (1 DNA plasmidico contenente la sequenza target del test di real-time PCR, DNA estratti da campioni infetti di seme di 14 lotti di carota, 15 lotti di prezzemolo e 2 lotti di sedano) e 29 campioni non target (DNA estratto da semi sani di 3 lotti di prezzemolo, 2 di sedano e 4 di finocchio; DNA di 14 batteri caratterizzati e 6 non caratterizzati afferenti a diversi generi e specie ed isolati da varie matrici vegetali).

3.3 Validazione intra-laboratorio del metodo diagnostico 1 endpoint PCR

3.3.1 Sensibilità analitica

I valori di sensibilità analitica del metodo sono stati valutati con diluizioni seriali 1:10 di DNA estratto dal campione 4D (seme di carota infetto da CaLsol fornito dal SFR Emilia Romagna) per determinare il limite di rivelazione (LOD). I risultati hanno mostrato che, nelle suddette condizioni sperimentali, il LOD è pari a 10^{-2} .

3.3.2 Specificità analitica

La specificità analitica è stata valutata sui campioni target relativi alle diverse specie di ospite (14 lotti di semi di carota, 15 lotti di semi di prezzemolo, 2 lotti di seme di sedano) e sui 29 campioni non target. Il metodo è riuscito a rilevare la presenza di CaLsol in tutte le specie di seme analizzate (carota, prezzemolo, sedano). Per quanto concerne la specificità nei confronti di batteri non target, il test ha dato luogo a falsi positivi nei confronti dei batteri *Pseudomonas putida*, *P. marginalis*, *Pectobacterium carotovora*, *Candidatus Phytoplasma stolbur*, ed un batterio unknown isolato da carota.

3.3.3 Selettività

La selettività è stata valutata utilizzando diverse varietà di seme afferente alle varie specie, ed in particolare: almeno 5 varietà di carota, almeno 6 di prezzemolo e 2 di sedano. CaLsol è stato rilevato in tutte le varietà esaminate.

3.3.4 Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità è stata eseguita amplificando simultaneamente tre repliche biologiche dello stesso DNA target (4D) al limite di rilevazione 10^{-2} . I risultati hanno confermato la ripetibilità del metodo.

Come per la ripetibilità, la riproducibilità è stata valutata amplificando 3 repliche dello stesso DNA target (4D) a diverse concentrazioni, in giorni diversi con due diversi operatori ed utilizzando due macchine di PCR. I risultati confermano la riproducibilità del metodo.

3.4 Validazione intra-laboratorio del Metodo diagnostico 2 real-time PCR TaqMan

Come precedentemente accennato, il metodo di Li *et al.*, 2009 è pubblicato come duplex real-time PCR TaqMan per la simultanea rilevazione di CaLsol e del controllo interno COX. Nella nostra esperienza è emerso che la duplex real-time PCR TaqMan diminuisce notevolmente la capacità di rilevare CaLsol impedendo anche la generazione di una curva esponenziale. Di conseguenza è stato validato il metodo per la sola rilevazione di CaLsol.

3.4.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata valutata utilizzando sia diluizioni di DNA plasmidico contenente il target a cui sono stati aggiunti 2 μ L di DNA estratto da seme di carota sano sia il DNA estratto da un lotto di seme di carota infetto da CaLsol (4D) a diluizioni seriali 1:10.

La LOD per il campione 4D è stata 10^{-3} mentre il plasmide è stato rilevato sino a 5 copie.

3.4.2 Specificità analitica

La specificità analitica è stata valutata sui campioni target relativi alle diverse specie di ospite (14 lotti di semi di carota, 15 lotti di semi di prezzemolo, 2 lotti di seme di sedano) e sui 29 campioni non target. Il metodo è riuscito a rilevare la presenza di CaLsol in tutte le specie di seme analizzate (carota, prezzemolo, sedano e finocchio - per quest'ultimo al DNA di seme di finocchio è stato aggiunto DNA plasmidico contenente il target). Per quanto concerne la specificità nei confronti di batteri non target, il test non ha mai dato luogo a falsi positivi.

3.4.3 Selettività

La selettività è stata valutata utilizzando diverse varietà di seme afferente alle varie specie, ed in particolare: almeno 5 varietà di carota, almeno 6 di prezzemolo, 2 di sedano e 1 di finocchio. CaLsol è stato rilevato in tutte le varietà esaminate.

3.4.4 Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità è stata eseguita amplificando simultaneamente quattro repliche (moltiplicate per tre repliche tecniche ognuno) dello stesso DNA target (4D) al limite di rivelazione 10^{-3} e di 5 copie del plasmide contenente il target. I risultati hanno confermato la ripetibilità del metodo.

Come per la ripetibilità, la riproducibilità è stata valutata amplificando 3 repliche dello stesso DNA target (4D) a diverse concentrazioni, in giorni diversi con due diversi operatori ed utilizzando due macchine di PCR. I risultati confermano la riproducibilità del metodo.

3.5 Prove valutative inter-laboratorio

La robustezza dei Metodi diagnostici molecolari 1 e 2, intesa come validità di *performance* usando diverse strumentazioni in diversi laboratori, con diversi operatori, è stata valutata mediante uno studio comparativo inter-laboratorio (**Test Performance Study - TPS**) a cui hanno partecipato un totale di **11 laboratori** (10 servizi fitosanitari regionali ed il CREA-DC). In particolare 10 laboratori per il Metodo diagnostico 1 (Il SF regione Piemonte non ha partecipato per il metodo 1 di end-point PCR) e 10 laboratori per il Metodo diagnostico 2 (il SF regione Sardegna non ha partecipato per il metodo 2 di real-time PCR non disponendo dell'attrezzatura necessaria). Questo studio è stato organizzato, gestito e valutato attenendosi alle linee guida proposte dal documento ISO 16140:2003 e dall'EPPO Diagnostic PM7/98 (2) (EPPO 2014). Tutti gli 11 laboratori hanno partecipato per l'estrazione del DNA da semi di *Apiaceae*. È stato chiesto ai laboratori di estrarre il DNA dai campioni di seme inviati e di svolgere le prove di diagnosi molecolare con i metodi 1 e 2 in contemporanea con i campioni di DNA in provetta inviati dal CREA-DC. In questo modo i campioni di DNA in provetta inviati dal CREA-DC hanno svolto il ruolo di controlli positivi e negativi dei test molecolari svolti sui DNA estratti da seme dai partecipanti. Per la valutazione della performance dei metodi molecolari 1 e 2 sono stati valutati solo i dati relativi ai risultati ottenuti dai laboratori per i campioni di DNA già estratti ed inviati dal CREA-DC. Per la valutazione della performance del metodo di estrazione del DNA da semi di *Apiaceae* sono stati valutati i dati ottenuti dai metodi molecolari 1 e 2 sui campioni di DNA estratto da seme dai laboratori.

Per ogni laboratorio aderente al TPS è stato preparato un set di 10 campioni di DNA per la end-point PCR, 10 per la real-time PCR, e 3 campioni di semi di *Apiaceae* da cui estrarre il DNA secondo il metodo precedentemente riportato. In particolare sono stati inviati in cieco:

Per la end-point PCR:

Il DNA del campione 4D così come estratto (controllo positivo);
 tre repliche del DNA del campione 4D diluito 10^{-2} (LOD, per la sensibilità);
 tre DNA di campioni sani: uno di carota, due di finocchio (controlli negativi);
 H₂O (controllo negativo);
 Il DNA di *X. campestris* pv *begoniae* isolato da carota (per la specificità);
 Il DNA di *Pseudomonas* sp isolato da finocchio (per la specificità);

Per la real-time PCR TaqMan:

Il DNA del campione 4D così come estratto (controllo positivo);
 tre repliche del DNA del campione 4D diluito 10^{-3} (LOD, per la sensibilità);
 10^4 copie del DNA plasmidico contenente il target;
 10^2 copie del DNA plasmidico contenente il target;
 5 copie del DNA plasmidico contenente il target (LOD, per la sensibilità);
 DNA di un campione sano di carota (controllo negativo);
 Il DNA di *X. campestris* pv *begoniae* isolato da carota (per la specificità);
 Il DNA di *Pseudomonas* sp isolato da finocchio (per la specificità).

Per l'estrazione del DNA da semi di *Apiaceae*:

20 gr di semi di carota infetti da CaLsol (trattati termicamente a 50°C per 72 ore);
 10gr di semi di finocchio CaLsol *free*.

Per la real-time PCR è stato chiesto di analizzare in triplicato tecnico ogni campione. Tutti i campioni sono stati inviati in quantità tale da poter ripetere l'esperimento almeno due volte.

Trattandosi di un *Test Performance Study*, ad ogni laboratorio sono stati inviati anche:

Il Kit Qiagen (DNeasy kit QIAGEN);
 I primers, la sonda e la mix completa per la qPCR (TaqMan Universal Master Mix II -Life Technologies Italia 4440040-);
 I primers, il buffer, i nucleotidi e la polimerasi per la end-point PCR (Go Taq G2Flexi DNA polymerase -Promega M7805- con "loading buffer" incluso nel Buffer 5X).

L'omogeneità e la stabilità dei campioni sono state confermate presso il CREA-DC testando i campioni prima della spedizione e alla data stabilita come termine per la consegna.

4. RISULTATI E CONCLUSIONI

4.1 Metodi di PCR 1 (end-point PCR) e 2 (real-time PCR TaqMan)

I dati di validazione delle *performance* per entrambi i Metodi molecolari proposti, ottenuti presso il laboratorio organizzante secondo le linee guida del documento EPPO PM 7/98(2), sono schematizzati in tabella 4.

TABELLA 4 - dati di validazione delle *performance* per entrambi i Metodi ottenuti presso il laboratorio organizzante

	Parametri	Valori ottenuti
METODO 1	Sensibilità analitica	LOD pari alla diluizione 10^{-2} di un campione di DNA di seme di carota positivo per CaLsol
	Specificità analitica	Su 29 batteri non target si sono avuti falsi positivi nei confronti di <i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. marginalis</i> , <i>Pectobacterium carotovora</i> , <i>Candidatus phytoplasma stolbur</i> ed un batterio unknown isolato da carota
	Ripetibilità (%)	100%
	Riproducibilità (%)	100%
METODO 2	Sensibilità analitica	LOD pari a 10^{-3} di un campione di DNA di seme di carota positivo per CaLsol e 5 copie di plasmide target
	Specificità analitica	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 29 campioni non-target valutati
	Ripetibilità	100%
	Riproducibilità	100%

Il Metodo 1 ha mostrato una sensibilità analitica inferiore a quella del Metodo 2; inoltre, il metodo 1 ha mostrato debolezza per quanto concerne la specificità analitica in quanto dà falsi positivi con alcuni batteri non target. Tale debolezza è stata confermata anche nel *Test Performance Study* (TPS). I dati relativi al TPS sono stati analizzati secondo le linee guida indicate nel documento ISO 16140:2003 ed i risultati sono mostrati in tabella 5.

TABELLA 5 - Analisi dei risultati del *Test Performance Study* relativi ai Metodi diagnostici molecolari 1 e 2.

CRITERIO DI VALUTAZIONE	Risultato Metodo diagnostico 1	Risultato Metodo diagnostico 2
Sensibilità relativa	100%	98.6%
Specificità relativa	79.6%	100%
Accuratezza relativa	87.8%	99%
Accordanza	80.2%	98.2%
Concordanza	78.3%	98%

In generale il Metodo 1 è risultato essere meno sensibile del metodo 2 (almeno di un fattore 10) e debole per quanto concerne la specificità. Per la diagnosi di CaLsol in semi di *Apiaceae* appare decisamente migliore il metodo 2 real-time PCR TaqMan utilizzando i primers ed il probe per CaLsol suggeriti da Li *et al.*, 2009.

4.2 Metodo di estrazione del DNA da semi di *Apiaceae*

Tutti gli 11 laboratori hanno partecipato all'estrazione del DNA da semi di *Apiaceae*. Dai dati ottenuti emerge che in 3 laboratori CaLsol è stato rilevato solo mediante real-time PCR TaqMan e non con la end-point PCR. Tale risultato può essere spiegato con la maggiore sensibilità della real-time PCR TaqMan rispetto alla end-point PCR e dal fatto che il target della prima ha dimensioni minori rispetto all'altra (78 paia basi rispetto a 383). I dati relativi al TPS sono stati analizzati secondo le linee guida indicate nel documento ISO 16140:2003 ed i risultati sono mostrati in tabella 6.

In ogni caso, il metodo proposto si è rivelato valido per l'estrazione del DNA da semi di *Apiaceae* al fine di diagnosticare CaLsol. La difficoltà di estrarre il DNA del patogeno da seme risiede non solo nella natura di questa matrice, notoriamente ostica, ma anche nel fatto che il batterio è localizzato nel tegumento (Bertolini *et al.*, 2014) che deve quindi essere ben macerato.

TABELLA 6 - Analisi dei risultati del *Test Performance Study* relativi al metodo di estrazione del DNA da semi di *Apiaceae* valutato con i metodi molecolari 1(end-point PCR) e 2 (real-time PCR TaqMan)

CRITERIO DI VALUTAZIONE	Risultato Metodo Estrazione DNA valutato in end-point PCR	Risultato Metodo Estrazione DNA valutato in real-time PCR
Sensibilità relativa	75%	100%
Specificità relativa	100%	90%
Accuratezza relativa	83.3%	96.6%
Accordanza	86.6%	95.5%
Concordanza	70.6%	93.3%

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ALFARO-FERNÁNDEZ A., HERNÁNDEZ-LLOPIS D., & FONT M. I. 2017. Haplotypes of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ identified in Umbeliferous crops in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 1-5.
- BERTOLINI E., TERESANI G. R., LOISEAU M., TANAKA F. A. O., BARBÉ S., MARTÍNEZ C., ... & CAMBRA, M. 2015. Transmission of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in carrot seeds. *Plant Pathology*, **64**(2), 276-285.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **43**, 197–201.
- EPPO(2014a)PM7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for plant pest diagnostic activity. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **44**, 117–147.
- EPPO Standards 2016. http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-002-25-en_A1A2_2016.pdf
- HAAPALAINEN M. 2014. Biology and epidemics of Candidatus Liberibacter species, psyllid transmitted plant pathogenic bacteria. *Annals of applied biology*, **165**(2), 172-198.
- ILARDI V., V. CATARA, 2013. Candidatus Liberibacter spp: emerging threats for agriculture in the European and Mediterranean region. *Biosafety*. **2**, e135.
- ILARDI V., E. DI NICOLA, M. TAVAZZA, 2016a. First report of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in commercial carrot seeds in Italy. *Journal of Plant Pathology*. **98**(2).
- ILARDI V., E. DI NICOLA, V. LUMIA, M. TAVAZZA, 2016b. Report of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in commercial *Apiaceae* seeds in Italy”. *Journal of Plant Pathology* **98**, S28
- IPPC (International Plant Protection Convention) 2016. Emergency Action. <https://www.ippc.int/en/countries/japan/erventreporting/2015/05emergency-measure-to-reduce-the-risk-of-introduction-of-candidatus-liberibacter-solanacearum-through-the-importation-of-carrot-seed-and-seedling-and-celery-seedling/>
- IPPC 2017 DP 21: ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’. https://www.ippc.int/static/.../DP_21_2017_En_2017-03-31.pdf
- ISF 2017 Detection of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in carrot seeds. http://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2017/03/Detection_Carrot_Lso_2017.pdf
- Li W, J. A. Abad, R. D. French-Monar, Aimin Wen J. R., Gudmestad N.C., Secor G.A., Lee I.M., Duan Y., Levy L. 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in potato plants with zebra chip - *Journal of Microbiological Methods* **78**: 59-65
- LOISEAU et al., 2015. Essai de transmission de Candidatus Liberibacter solanacearum par la semence de carotte”. Internal report, laboratoire de la sante de végétaux. ANSES - French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety

- MUNYANEZA, J.E. 2012. Zebra chip disease of potato: Biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research*, **89**: 329–350.
- NELSON, W.R., SENGODA, V.G., CROSSLIN, J.M., ALFARO-FERNÁNDEZ, A.O., FONT, M.I. & MUNYANEZA, J.E. 2013. A new haplotype of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in the Mediterranean region. *European Journal of Plant Pathology*, **135**: 633–639.
- RAVINDRAN A., LEVY J., PIERSON E., GROSS D.C. (2009) - Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ - Plant Disease Vol. 95 No. **12**, 1542-1546
- TERESANI G.R., BERTOLINI E., ALFARO-FERNÁNDEZ A., MARTÍNEZ C., TANAKA F.A.O., KITAJIMA E.W., ROSELLÓ M., SANJUÁN S., FERRÁNDIZ J.C., LÓPEZ M.M., CAMBRA M., FONT M.I. 2014. Association of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ with a vegetative disorder of celery in Spain and development of real-time PCR method for its detection. *Phytopathology*, **104**, 804–811.

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
I FITOPLASMI AGENTI DELLA FLAVESCENZA
DORATA DELLA VITE**

**L. Ferretti¹, L. Vizzaccaro¹, G. Mason², M. Calvi³, G. L. Bianchi⁴,
D. Rizzo⁵, P. Casati⁶, E. Angelini⁷, L. Filippin⁷, S. Paltrinieri⁸,
A. Bertaccini⁸**

- 1 - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca Difesa e Certificazione(CREA-DC)
- 2 - Settore Fitosanitario e servizi tecnico-scientifici Regione Piemonte
- 3 - ERSAF – Servizio Fitosanitario Regione Lombardia, Laboratorio Fitopatologico c/o Fondazione Minoprio
- 4 - ERSA – Servizio Fitosanitario Friuli Venezia Giulia
- 5 - Servizio Fitosanitario Regione Toscana - Laboratorio di diagnostica fitopatologica e di biologia molecolare
- 6 - DiSAA, Produzione, territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano
- 7 - Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca per la viticoltura
- 8 - DipSA, Patologia Vegetale, *Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Presenza sul territorio
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Trasmissione ed epidemiologia
- 1.4 Normativa Fitosanitaria

2. CAMPIONAMENTO

- 2.1 Prelievo in campo
- 2.2 Conservazione e preparazione dei campioni in laboratorio

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 3.1 Metodi di diagnosi
 - 3.1.1 Avvertenze generali
 - 3.1.2 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche
- 3.2 Metodo diagnostico 1: PCR *nested* gruppo 16SrV-specifica (Lee *et al.*, 1994)
 - 3.2.1 Preparazione del saggio
 - 3.2.2 Esecuzione del saggio
 - 3.2.3 Elettroforesi in gel di agarosio
 - 3.2.4 Valutazione dei risultati
- 3.3 Metodo diagnostico 2: Triplex TaqMan® real time PCR (IPADLAB)
 - 3.3.1 Preparazione del saggio
 - 3.3.2 Esecuzione del saggio
 - 3.3.3 Valutazione dei risultati
- 3.4 Metodo diagnostico 3: TaqMan® real time PCR (Angelini *et al.*, 2007)
 - 3.4.1 Preparazione del saggio
 - 3.4.2 Esecuzione del saggio
 - 3.4.3 Valutazione dei risultati
- 3.5 Metodo diagnostico 4: LAMP (Durante *et al.*, 2015)
 - 3.5.1 Preparazione del saggio
 - 3.5.2 Esecuzione del saggio
 - 3.5.3 Valutazione dei risultati

4. DATI DI VALIDAZIONE

- 4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche
 - 4.1.1 Sensibilità analitica
 - 4.1.2 Specificità analitica
 - 4.1.3 Ripetibilità e riproducibilità

4.2. Valori di validazione

4.2.1 Metodo diagnostico 1: PCR *nested* gruppo 16SrV specifica (Lee *et al.*, 1994)

4.2.2 Metodo diagnostico 2: Triplex TaqMan® real time PCR (IPADLAB)

4.2.3 Metodo diagnostico 3: TaqMan® real time PCR (Angelini *et al.*, 2007)

4.2.4 Metodo diagnostico 4: LAMP (Durante *et al.*, 2015)

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I: Strumentazione, materiali e reagenti necessari

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	“Flavescence dorée” fitoplasma (Daire <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Classe:</i> Mollicutes
Tassonomia	<i>Gruppo ribosomico:</i> 16SrV: “Elm Yellows”
	<i>Sottogruppo:</i> 16SrV-C e 16SrV-D
Ceppi individuati	FD-C e FD-D (Martini <i>et al.</i> , 1999; Davis and Dally, 2001)
Avversità	Flavescenza dorata della vite
Acronimo	FD (<i>Flavescence dorée</i>)
Ospiti	Vite
Vettori	<i>Scaphoideus titanus</i> Ball.

1.1 Presenza sul territorio

In Italia FD ed il suo insetto vettore *S. titanus* Ball. sono tutt’oggi ancora prevalentemente confinati nelle aree viticole delle regioni settentrionali (Sancassani *et al.*, 2008). Al di fuori di questo areale, la presenza del solo vettore è stata segnalata in Lazio, Abruzzo, Campania e Basilicata (Viggiani 2002, 2004; Romanazzi *et al.* 2007, Bagnoli *et al.* 2008).

Nel 2011 la contemporanea presenza di FD (ceppo D) e del suo vettore è stata segnalata in diversi vigneti localizzati nell’Isola di Ischia (Griffo *et al.* 2011; Ferretti *et al.*, 2014), che rappresenta ad oggi la segnalazione più a sud di questa malattia.

1.2 Sintomatologia

A livello sintomatologico, la flavescenza dorata (FD) non è distinguibile dagli altri giallumi causati da fitoplasmi su vite, quali in particolare il legno nero (BN – *Bois Noir*), collettivamente riportati sotto il nome di giallumi della vite (GY – *Grapevine Yellows*).

Sulle foglie si ha la comparsa di tipiche alterazioni cromatiche che interessano, in maniera più o meno estesa, la lamina fogliare e le nervature principali e secondarie (Fig. 1A, 1B). La colorazione evidenziata è caratteristicamente funzione del tipo di vitigno, risultando gialla nelle uve a bacca bianca e rossa in quelle a bacca nera. Con

l'avanzare della stagione vegetativa si ha la comparsa di necrosi variamente estese, sia del lembo fogliare sia delle nervature, che determinano un precoce invecchiamento della foglia. Su molte varietà, inoltre, la malattia causa un accentuato arrotolamento del lembo fogliare verso il basso che fa assumere alla foglia una tipica forma triangolare.

I tralci hanno una consistenza erbacea, dovuta alla mancata o parziale lignificazione e un ridotto sviluppo degli internodi accompagnato, in genere, da un andamento a *zig-zag*. I sintomi possono interessare singoli tralci o l'intera pianta.

La comparsa precoce di sintomi in fase di fioritura può determinare il disseccamento delle infiorescenze, che cadono rapidamente, o l'aborto dei fiori, con la formazione di raspi privi di acini. Se la malattia comincia a manifestarsi dopo l'allegagione, i grappoli restano attaccati al tralcio ma gli acini, presenti in numero ridotto, risultano piccoli ed acerbi e tendono a raggrinzire (Fig. 1C). Spesso queste manifestazioni si osservano sull'intero grappolo, ma a volte possono interessare in maniera irregolare solo alcuni acini.

A questi sintomi specifici, si aggiunge un generale deperimento della pianta. Nel caso di varietà particolarmente sensibili o in presenza di piante già debilitate da altri stress biotici o abiotici, tali deperimenti possono portare a morte la piante nel giro di pochi anni.



Figura 1 – Sintomi di giallumi della vite: alterazioni cromatiche su foglie di vite a bacca bianca (A) e rossa (B) ed irregolare maturazione dei grappoli (C).

1.3 Trasmissione ed epidemiologia

In Italia, l'unico insetto vettore in grado di operare una trasmissione naturale del fitoplasma agente di FD da viti infette a viti sane, è il cicadellide *S. titanus* (Ball) (Mori *et al.*, 2002). Lo scafoideo, nutrendosi su viti infette, acquisisce il fitoplasma e, dopo un periodo di latenza, può inocularlo nel floema di viti sane propagando in modo persistente la malattia. Il vettore rimane infettivo per tutta la durata della sua vita.

La capacità di trasmettere il fitoplasma è stata verificata anche per *Dictyophara europaea* ma in maniera occasionale e solo da piante spontanee di *Clematis vitalba* a vite (Filippin *et al.*, 2009). Recentemente, inoltre, è stato dimostrato che in condizioni sperimentali *Orientus ishidae* è in grado di trasmettere FD a piante di vite (Lessio *et al.*, 2016).

La flavescenza dorata può anche essere trasmessa per innesto attraverso l'impiego di marze e/o portainnesti infetti. Tuttavia, la percentuale di attecchimento degli innesti eseguiti con materiali prelevati da piante infette risulta generalmente bassa e questa modalità di trasmissione sembra essere meno importante.

1.4 Normativa Fitosanitaria

Il fitoplasma agente di FD è riconosciuto un patogeno da quarantena, inserito nella lista A2 dell'OEPP/EPPO e regolato nell'Annesso II/A2 della direttiva europea 2000/29. Come tale, FD è soggetta a lotta obbligatoria definita, a livello normativo nazionale, dal D.M. 31 maggio 2000 (*G.U. n. 159 del 10 luglio 2000*): “Misure per la lotta obbligatoria contro la flavescenza dorata della vite”.

Tale decreto scaturisce in considerazione di una serie di provvedimenti fitosanitari nazionali già vigenti e, in particolare:

1. legge 18 giugno 1931, n. 987, recante disposizioni per la difesa delle piante coltivate e dei prodotti agrari dalle cause nemiche e sui relativi servizi;
2. D.M. 31 gennaio 1996, (suppl. ord. n. 33 alla G.U. n. 41 del 19 febbraio 1996), concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nel territorio della Repubblica italiana di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e successive modificazioni;
3. D.lgs 19 agosto 2005, n. 214 „Attuazione della direttiva 2002/89/CE concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali“

Tale patogeno, inoltre, è soggetto alle disposizioni contenute nelle Direttive comunitarie n. 68/193/CEE e n. 2005/43/CEE, concernenti la commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite all'interno della Comunità ed ai relativi decreti ministeriali (D.M. 8 febbraio 2005; D.M. 7 luglio 2006 ; Decreto 24 giugno).

2. CAMPIONAMENTO

Un corretto campionamento ed il buono stato di conservazione del materiale vegetale da analizzare sono presupposti fondamentali per l'attendibilità del risultato ottenuto con qualsiasi saggio diagnostico.

2.1 Prelievo in campo

Periodo. Luglio - settembre, in funzione della comparsa dei sintomi e dell'inizio del riposo vegetativo.

Matrice. La matrice migliore è costituita da nervature fogliari.

Tipologia del campione. Foglie (10 – 15) raccolte dalle varie porzioni sintomatiche della chioma. Le foglie devono essere integre, prive di necrosi e/o imbrunimenti e non in avanzato stato di senescenza.

Mantenimento del campione. Il materiale vegetale da prelevare deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica. Durante il prelievo, evitare l'esposizione diretta dei campioni ai raggi del sole e, possibilmente, conservarli in un contenitore refrigerato.

Rintracciabilità del campione: Per ogni azienda o vivaio è opportuno compilare una scheda identificativa in cui riportare tutti i dati. Le piante da cui

viene prelevato il materiale vegetale per la costituzione del campione da sottoporre all'analisi di laboratorio devono essere opportunamente siglate. La stessa sigla va riportata sulla busta contenente il campione che viene consegnato al laboratorio di analisi.

Spedizione del campione: I campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 24 ore.

2.2 Conservazione e preparazione dei campioni in laboratorio

I campioni fogliari possono essere mantenuti a 4°C non oltre 4 giorni, evitandone la disidratazione. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico (nota: *i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o comparsa di muffe non devono essere processati, perché i risultati potrebbero non essere attendibili*).

Prelevare con un bisturi la nervatura principale dalle foglie costituenti il campione (incluso, eventualmente, anche una parte di picciolo) fino al raggiungimento del quantitativo richiesto per l'estrazione dell'acido nucleico.

Può essere opportuno mantenere una aliquota di nervature fogliari a -20°C (previa polverizzazione in azoto liquido) o a temperatura ambiente (previa liofilizzazione), per poter ripetere l'analisi in caso di contenzioso.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

Il presente protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi di fitoplasmi agenti della flavescenza dorata (FD) della vite nei laboratori presenti sul territorio italiano. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati garantisce la confrontabilità dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze ed è, quindi, alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie.

Le metodologie di laboratorio riportate nel presente protocollo sono state selezionate sulla base dei parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità determinati attraverso prove inter-laboratorio (ring-test) eseguite nell'ambito di progetti Nazionali (ASPROPI) ed Europei (EUPHRESKO-GRAFDEPI).

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare e/o da includere nel presente protocollo è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

1. CREA - Centro di Ricerca Difesa e Certificazione - Coordinatore del Gruppo (referenti Luca Ferretti, Lorenzo Vizzaccaro);
2. ERSA – Servizio Fitosanitario Regione Friuli Venezia Giulia (referente Gian Luca Bianchi);
3. Settore Fitosanitario e servizi tecnico-scientifici Regione Piemonte (referente Giovanna Mason);
4. ERSF – Servizio Fitosanitario Regione Lombardia, Laboratorio Fitopatologico c/o Fondazione Minoprio (referente Marica Calvi);
5. Servizio Fitosanitario Regione Toscana - Laboratorio di diagnostica fitopatologica e di biologia molecolare (referente Domenico Rizzo);
6. DiSAA - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università di Milano (referenti Piero Attilio Bianco, Paola Casati);
7. DipSA - Patologia vegetale, Università di Bologna (referenti Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri);
8. CREA – Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia (referenti Elisa Angelini, Luisa Filippin).

3.1 Metodi di diagnosi

La diagnosi dei fitoplasmi agenti di FD in campioni di vite può essere effettuata su base molecolare per riconoscimento del DNA, mediante:

Metodo 1: PCR *nested* 16SrV gruppo-specifica (Lee *et al.*, 1994)

Metodo 2: Triplex TaqMan® real time PCR (primers e sonde brevettate IPADLAB)

Metodo 3: TaqMan® real time PCR (Angelini *et al.*, 2007)

Metodo 4: LAMP (Durante *et al.*, 2015)

3.1.1 Avvertenze generali

- A) Tutti i metodi sopra elencati non consentono l'identificazione specifica dei fitoplasmi agenti di FD (16SrV-C/-D) ma la diagnosi generica di fitoplasmi appartenenti al gruppo ribosomico 16SrV ("Elm yellows"). Per confermare la presenza di FD in campioni risultati positivi all'analisi con questi metodi e/o per accertarne il ceppo (FD-C o FD-D) è necessario, quindi, procedere ad una caratterizzazione molecolare specifica. Questa può essere effettuata mediante analisi PCR/RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), come descritto in Martini *et al.* (1999) o mediante sequenziamento dei prodotti di amplificazione ottenuti in PCR *nested* con i *primers* gruppo 16SrV-specifici (metodo 1 del presente protocollo) e successivo confronto con le sequenze depositate in GenBank.
- B) Tutti i metodi descritti nel presente protocollo, sono stati validati a partire da estratti di DNA totale (tDNA) ottenuti con un protocollo derivato da Doyle & Doyle (1990), modificato come descritto in Marzachi *et al.* (1999). Si ritiene comunque possibile, previa validazione interna al singolo laboratorio, l'utilizzo di metodi di estrazione del tDNA diversi, ivi inclusi quelli basati sull'impiego di kit commerciali. Indipendentemente dal protocollo utilizzato è, comunque, consigliabile verificare il buon esito del processo di estrazione del tDNA includendo sempre, fra i campioni da estrarre, un campione sicuramente infetto ed uno sicuramente esente dal fitoplasma *target*. L'estratto di tDNA ottenuto da tali campioni dovrà essere successivamente analizzato con il metodo di amplificazione prescelto, unitamente ai campioni in esame ed ai controlli di amplificazione, positivi e negativi.
- C) Per i metodi basati su tecnica real time PCR (metodi 2 e 3) è importante determinare preliminarmente il valore soglia del *Ct* (*threshold cycle*) oltre il quale un campione può essere considerato negativo. Per la determinazione di tale valore si può adottare la procedura descritta in Mehle *et al.* (2013) che identifica il *Ct* soglia come il più alto valore di *Ct* (+ 0,5) registrato dopo aver analizzato almeno cinque diluizioni seriali (solitamente in base dieci) di un campione positivo, ciascuna replicata cinque volte (se disponibile, si può utilizzare anche un estratto plasmidico contenente il frammento genomico *target* del metodo utilizzato). Un esempio di calcolo viene di seguito riportato:

Diluizione	<i>Ct</i> repliche	<i>Ct</i> soglia
10 ⁻²	30-31-30-30-31	Non determinabile
10 ⁻³	33-33-34-33-33	Non determinabile
10 ⁻⁴	37-36-37-36-37	Non determinabile
10 ⁻⁵	nd-38-nd-37-37,5	38,5
	oppure nd-nd-nd-nd-nd	37,5
10 ⁻⁶	nd-nd-nd-nd-nd	

Poiché il *Ct* soglia è influenzato da diversi fattori, fra cui i reagenti e la strumentazione utilizzata per l'esecuzione del test, è opportuno che venga sempre determinato internamente al laboratorio. Inoltre, considerato che il valore di *Ct* dipende anche dalla *threshold*, ovvero del valore di fluorescenza oltre il quale una reazione real time PCR viene considerata positiva, è opportuno che il laboratorio definisca contemporaneamente anche le modalità per la definizione della *threshold*. Tale valore viene calcolato automaticamente dal software dello strumento real time PCR, e quindi varia di volta in volta, oppure può essere prefissato dall'operatore e restare costante in ogni esperimento.

D) Tutti i metodi di seguito descritti si caratterizzano per una sensibilità molto elevata che, se da un lato ne determina un'alta efficienza diagnostica dall'altro, può favorire l'ottenimento di falsi positivi o provocare contaminazioni in laboratorio (a livello di estratti, reagenti e strumentazioni), se non eseguiti correttamente. Nel caso specifico del saggio di PCR diretta e *nested*, inoltre, il rischio di contaminazioni è notevolmente aumentato dall'esecuzione di una doppia amplificazione genica che implica la manipolazione di ampliconi in fase di preparazione della PCR *nested*. E' necessario, pertanto, lavorare con estrema attenzione (in particolare in fase di esecuzione delle diluizioni) e di avvalersi sempre di controlli negativi per verificare la validità di ogni evento di amplificazione. In generale, al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:

1. organizzare il laboratorio di diagnosi molecolare con ambienti separati, ciascuno dedicato ad una delle tre principali fasi operative: i) estrazione del DNA, ii) esecuzione del saggio diagnostico, iii) elettroforesi dei prodotti amplificati (nel caso della PCR convenzionale); se ciò non fosse possibile, utilizzare banconi separati per le tre fasi (fare molta attenzione al bancone di elettroforesi, dove si maneggiano amplificati);
2. utilizzare set di pipette dedicate per ciascuna fase operativa, avendo cura di NON SCAMBIARLE e puntali sterili con filtro; il set dedicato alla esecuzione del saggio diagnostico dovrebbe includere una pipetta dedicata al solo caricamento dell'estratto di DNA, da non utilizzare nella preparazione della miscela di reazione;
3. in fase di esecuzione del saggio diagnostico, utilizzare puntali sterili con filtro e provette sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti puliti;
4. aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e sostituirli con aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
5. chiudere le provette contenenti i campioni/reagenti una volta che l'aliquota richiesta è stata prelevata;
6. usare solo acqua sterile 'nucleasi-free' (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC) possibilmente suddivisa in aliquote monouso;
7. durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di

- caricamento del DNA target, cambiare i guanti se si ha il sospetto di averli contaminati;
8. in fase di esecuzione della PCR *nested*, SOSTITUIRE SEMPRE i guanti dopo aver realizzato le diluizioni degli amplificati di PCR diretta;
9. aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
10. in fase di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse e le piastre ben sigillate con l'apposita pellicola ottica; se al termine di una PCR/real time si ritrovano provette/piastre aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio, provette fallate, errato posizionamento della pellicola) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio.

Inoltre, per una corretta ed affidabile esecuzione del saggio di PCR:

- controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (le Unità di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato);
- rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti; in particolare, mantenere sempre in ghiaccio gli enzimi quando vengono utilizzati nella preparazione della miscela di reazione;
- mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della PCR;
- fare attenzione a caricare in modo uniforme le provette nel blocco del termociclatore, la chiusura non ermetica del coperchio può produrre temperature disomogenee con conseguenti reazioni di amplificazione parziali o non confrontabili tra i campioni.

3.1.2 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

3.2 Metodo diagnostico 1: PCR *nested* gruppo 16SrV-specifica (Lee *et al.*, 1994)

Il saggio prevede una doppia amplificazione genica mediante PCR diretta seguita da PCR *nested*. Per la diagnosi del fitoplasma agente di FD si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

1 - PCR diretta (*primers universali*)

P1: 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' (*)

P2: 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' (**)

(*)Deng and Hiruki,1991; (**)Schneider *et al.*, 1995

2 - PCR *nested* (*primers specifici per il gruppo ribosomico 16SrV*)

R16(V)F1: 5'-TTAAAAGACCTTCTTCGG-3' (*)

R16(V)R1: 5'-TTCAATCCGTAAGACTACC-3' (*)

(*)Lee *et al.*, 1994

I *primers* possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i *primers* ad una concentrazione di 100 mM in dH₂O rigorosamente sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 ml totali alla concentrazione d'uso di 10 mM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari all'esecuzione del saggio sono riportati in Allegato 1.

3.2.1 Preparazione del saggio

1. Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da banco.
2. Se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere pipette, puntali e provette sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.
3. Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.
4. Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR. In ogni esperimento inserire sempre:
5. un controllo positivo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente infetto da FD, estratto insieme ai campioni da analizzare);
6. un controllo negativo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente esente da FD, estratto insieme ai campioni da analizzare);
7. un controllo positivo di amplificazione (estratto di tDNA ottenuto anche da una matrice diversa dalla vite, sicuramente positivo in PCR diretta e *nested*);
 - un controllo negativo di amplificazione (estratto di tDNA ottenuto anche da una matrice diversa dalla vite, sicuramente negativo in PCR diretta e *nested*);
 - almeno un controllo in bianco (campione contenete una pari quantità di acqua al posto del tDNA target); se i campioni sono più di 8 – 10 utilizzare almeno due controlli in bianco.

3.2.2 Esecuzione del saggio

PCR diretta

1. Indossare guanti puliti.
2. Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
3. Scongellare gli estratti di tDNA ed i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata, mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (*concentrazioni finali in 25 ml totali*):

1X *Taq* DNA polimerasi buffer
 1,5 mM MgCl₂ (*nota: se non già incluso nel buffer*)
 200 mM miscela dNTP
 0,4 mM *primer* P1
 0,4 mM *primer* P7
 0,625 U enzima *Taq* DNA polimerasi
 Acqua sterile per un volume di 24 ml
 1 ml estratto tDNA (diluito 1:10)

1. Preparare la diluizione 1:10 degli estratti di tDNA da analizzare e dei relativi controlli; cambiare i guanti e procedere con la preparazione della miscela di reazione.
2. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reagente (volume 24 ml) in funzione del numero totale di campioni da saggiare ed aggiungerli secondo il seguente ordine: acqua, buffer, MgCl₂ (se necessario), dNTPs, *primers*, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
3. Distribuire 24 ml di miscela di reazione per ciascuna provetta.
4. Aggiungere 1 ml della diluizione 1:10 dell'estratto di tDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione. Nel/i controllo/i in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua al posto del tDNA.
5. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
6. Inserire le provette nel termociclatore ed avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma:

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
	94 °C	1'	
Amplificazione	55 °C	1'	35
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Togliere le provette dal termociclatore e conservarle a 4°C in frigorifero.

PCR *nested*

1. Indossare guanti puliti.
2. Siglare un numero di provette pari a quelle usate in PCR diretta e dispensare in ciascuna una quantità d'acqua sterile sufficiente per realizzare una diluizione 1:40 del prodotto di PCR diretta (es. 78 ml di H₂O per 2 ml di amplificato).
3. Prelevare il volume stabilito dell'amplificato ottenuto in PCR diretta da ciascun campione (incluso il controllo in bianco) e caricarlo nella corrispondente provetta contenente acqua sterile. Cambiare puntale ad ogni campione.
4. Sostituire i guanti e siglare un'altra serie di provette in numero pari a quelle usate in PCR diretta più una, per il controllo in bianco della PCR *nested*.
5. Scongelare i reagenti per la miscela di reazione sotto specificata, mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (*concentrazioni finali in 25 ml totali*):

1X *Taq* DNA polimerasi buffer
 1,5 mM MgCl₂ (*nota: se non già incluso nel buffer*)
 200 mM miscela dNTP
 0,4 mM *primer* R16(V)F1
 0,4 mM *primer* R16(V)R1
 0,625 U enzima *Taq* DNA polimerasi
 Acqua sterile per un volume di 24 ml
 1 ml prodotto PCR diretta (diluito 1:40)

6. Calcolare i quantitativi esatti per ogni reagente (volume 24 ml) in funzione del numero totale di campioni da saggiare (quelli della PCR diretta + un controllo acqua specifico per la PCR *nested*) ed aggiungerli secondo il seguente ordine: acqua, buffer, MgCl₂ (se necessario), dNTPs, *primers*, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
7. Distribuire 24 ml di miscela di reazione in ciascuna provetta, mantenendole in ghiaccio.
8. Prelevare 1 ml della diluizione 1:40 ottenuta per ciascun campione e caricarlo nella corrispondente provetta contenente la miscela di reazione, cambiando puntale ad ogni campione. Nel controllo in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua.
9. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
10. Inserire le provette nel termociclatore ed avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma:

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
	94 °C	1'	
Amplificazione	50 °C	1'	35
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Togliere le provette dal termociclatore e conservarle a 4°C in frigorifero.

3.2.3 Elettroforesi in gel di agarosio

La visualizzazione dei risultati viene effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio degli amplificati ottenuti e successiva visualizzazione alla luce UV, dopo colorazione del gel in etidio bromuro o prodotti sostitutivi (es., GelRed).

Si può effettuare la corsa elettroforetica dei soli amplificati ottenuti in PCR *nested*.

Per l'esecuzione della corsa elettroforetica procedere come segue:

1. preparare il gel di agarosio (1,2% di agarosio in TBE 1X);
2. centrifugare brevemente le provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol;
3. prelevare 5 o 10 ml di amplificato da ciascun campione e miscelarli con 1 o 2 ml di *loading buffer* 6X (nota: se nella miscela di reazione è stato utilizzato un buffer per la Taq polimerasi già colorato, omettere questo passaggio e caricare direttamente l'amplificato). Caricare ciascun campione in un pozzetto, cambiando il puntale ad ogni campione;
4. caricare in un pozzetto un idoneo marker (dimensione 1 Kb);
5. correre per circa 40 minuti a 100 volt, facendo riferimento al fronte del colorante;
6. estrarre il gel dalla cella elettroforetica e trasferirlo per 15-20 minuti in una soluzione 0,5 mg/ml di etidio bromuro (se si utilizzano prodotti sostitutivi, seguire le istruzioni fornite dalla ditta produttrice);
7. lavare il gel per circa 10 minuti in H₂O;
8. visualizzare la corsa ponendo il gel su un transilluminatore ad UV.

Tamponi necessari alla preparazione del gel di agarosio:

TBE 10X		
TRIS	108	g
acido borico	55	g
0,5 M EDTA (pH 8)	40	ml
Portare ad 1 litro con H ₂ O distillata		
Autoclavare		

Loading buffer 6X in TBE

Blu di	0,3%
bromofenolo	
Xilencianolo	0,3%
Glicerolo	60%

Soluzione di etidio bromuro 0,5 mg/ml

Etidio bromuro	50 mg
acqua	100 ml
Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua	

Acqua bidistillata DEPC 0,1%

DEPC	1 ml
Lasciare 12 ore a temperatura ambiente in bottiglia chiusa, possibilmente sotto cappa.	
Autoclavare 121 °C per 20'	

3.2.4 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 1.100 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo di PCR.

Il saggio si considera attendibile solo se si verificano, contemporaneamente, le seguenti condizioni:

1. nel controllo positivo di amplificazione è presente la banda della dimensione attesa;
2. nel controllo negativo di amplificazione e nei controlli in bianco non sono presenti bande alla stessa altezza del controllo positivo;
3. nel controllo positivo di estrazione è presente la banda della dimensione attesa;
4. nel controllo negativo di estrazione non è presente la banda alla stessa altezza del controllo positivo.

Se si verificano le condizioni 1 e 3 ma in uno o più controlli negativi (bianco, di amplificazione, di estrazione) sono visibili bande alla stessa altezza del controllo

positivo, si deve sospettare una contaminazione in sede di esecuzione del saggio, che va ripetuto.

Qualora, invece, si verifichino le condizioni 1 e 2 ma:

1. nel controllo positivo di estrazione non è presente la banda della dimensione attesa;
2. e/o nel controllo negativo di estrazione è presente una banda alla stessa altezza del controllo positivo,

si deve sospettare un problema o una contaminazione intercorso/a in fase di estrazione ed in entrambi i casi occorre ripetere il saggio partendo da nuovi estratti.

3.3 Metodo diagnostico 2: Triplex TaqMan® real time PCR (IPADLAB)

Questo metodo è stato originariamente sviluppato dal Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali (DiSAA) dell'Università di Milano e dal Laboratorio Fitopatologia Servizio Fitosanitario Regione Lombardia in collaborazione con IPADLAB - International Plant Analysis and Diagnostics s.r.l. (<http://www.ipadlab.eu>), detentore del brevetto relativo alle sequenze dei *primers* e delle sonde utilizzate.

Il metodo prevede l'utilizzo di un kit '*ready-to-use*' commercializzato da Qualiplane SAS (<http://www.qualiplane.eu>) che consente la diagnosi simultanea in singolo pozzetto del fitoplasma agente di FD, del fitoplasma "stolbur", agente del legno nero (*Bois noir* - BN) della vite e di un controllo endogeno (IPC – *internal positive control*) rappresentato da un frammento del gene *COX* di vite.

Il kit si compone di:

- una *Master mix*, contenente *primers* e sonde TaqMan® per FD, BN e controllo endogeno;
- un controllo positivo FD-BN;
- un controllo negativo

Le sonde TaqMan® per l'amplificazione delle singole regioni *target* sono marcate, all'estremità 5', con i fluorocromi di seguito specificati:

Sonda	Fluorocromo	Emissione
FD	FAM	520 nm (blu)
BN	VIC/HEX	550 nm (verde)
Controllo endogeno	Cy5	650 nm (viola)

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato 1.

3.3.1 Preparazione del saggio

1. Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da banco.
2. Se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere pipette, puntali e provette sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.
3. Preparare un foglio di lavoro in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento ed uno schema di caricamento della/e piastra/e.
4. Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla nello schema della piastra, nella posizione stabilita (*nota: se al posto della piastra si utilizzano microprovette singole o in 'strip' dotate di chiusura con tappo, non siglare in nessuna parte per non ostacolare la rilevazione del segnale da parte dello strumento*). In ogni esperimento inserire sempre:
 - il controllo positivo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente infetto da FD, estratto insieme ai campioni da analizzare);
 - il controllo negativo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente esente da FD e BN, estratto insieme ai campioni da analizzare);
 - il controllo positivo del kit;
 - il controllo negativo del kit;
 - almeno 2 controlli in bianco (campione contenete una pari quantità di acqua al posto del tDNA target) da posizionare sempre uno, come primo campione e uno, come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra (*nota: se l'esperimento prevede l'analisi di numerosi campioni, si suggerisce di considerare un controllo in bianco ogni 20 campioni da distribuire anche all'interno della piastra ma avendo sempre cura di posizionarne uno come primo campione e uno come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra*).

3.3.2 Esecuzione del saggio

1. Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (*nota: lo stesso camice non deve essere stato utilizzato per la manipolazione di amplificati o in fase di estrazione dei campioni*).
2. Indossare guanti puliti.
3. Preparare la miscela di reazione in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
4. Disporre le piastre ottiche o le microprovette sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.

5. Scongellare la *Master mix* mantenendola in ghiaccio; quando completamente scongelata, mescolarla con vortex e dare uno leggero '*spin*' per far scendere eventuali residui rimasti sul tappo.
6. Distribuire 22 ml di *Master mix* in ciascuna provetta o pozzetto previsto in funzione del numero totale di campioni da saggiare.
7. Cambiare area di lavoro e caricare, in ciascuna provetta o pozzetto, 3 ml di tDNA del relativo campione da analizzare o dei controlli positivi e negativi previsti, utilizzando una micropipetta dedicata SOLO a questo scopo (nei campioni in bianco, caricare 3 ml di acqua '*Nuclease-free*').
8. Se si utilizza una piastra ottica, coprirla con l'apposita pellicola; inserire la piastra (o le provette) nel termociclatore per real time ed avviare lo strumento dopo aver impostato il seguente programma:

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Attivazione enzima	95 °C	10'	1
Amplificazione	95 °C	15''	45
	60 °C	50''	

Nota: la *Master mix* utilizzata non contiene ROX come '*passive reference dye*'. Alcuni modelli di termociclatori real time possono avere la modalità ROX preimpostata; in tali casi, fare sempre attenzione a modificare questa impostazione prima di avviare il programma di amplificazione.

3.3.3 Valutazione dei risultati

Tutte le informazioni relative alla validità e all'interpretazione dei risultati sono riportate nel foglio di istruzioni del kit e vanno seguite scrupolosamente.

Il saggio si considera attendibile solo se si verificano, contemporaneamente, le seguenti condizioni:

1. nel controllo positivo del kit devono essere presenti tre curve esponenziali di amplificazione corrispondenti, rispettivamente, ai fluorocromi FAM (FD), VIC (BN) e Cy5 (IPC);
2. nel controllo positivo di estrazione devono essere presenti curve esponenziali di amplificazione corrispondenti ai fluorocromi FAM (FD) e Cy5 (IPC);
3. nel controllo negativo del kit e nel controllo negativo di estrazione deve essere presente solo la curva di amplificazione corrispondente al fluorocromi Cy5 (IPC);
4. nei controlli in bianco non devono essere presenti curve esponenziali di amplificazione;
5. in tutti i campioni in esame, sia positivi sia negativi, deve essere presente la curva di amplificazione corrispondente al fluorocromi Cy5 (IPC).

L'interpretazione dei risultati (discriminazione dei campioni in positivi e negativi) dovrà essere fatta sulla base del valore di *Ct* delle curve generate dalle sonde specifiche per ciascun 'target' (FD, BN, IPC), secondo la seguente tabella decisionale:

	<i>Ct</i> IPC < 22	<i>Ct</i> IPC ≥ 22 o nessuna curva
<i>Ct</i> FD ≤ 40	Positivo FD	Positivo FD
<i>Ct</i> BN ≤ 40	Positivo BN	Positivo BN
40 < <i>Ct</i> FD < 45	<i>Non interpretabile</i> ^(*)	<i>Non attendibile</i> ^(**)
40 < <i>Ct</i> BN < 45	<i>Non interpretabile</i> ^(*)	<i>Non attendibile</i> ^(**)
No <i>Ct</i>	Negativo FD e/o BN	<i>Non attendibile</i> ^(**)

^(*) Il titolo di fitoplasma nel campione potrebbe essere al limite della sensibilità del metodo; il campione dovrebbe essere analizzato con altre tecniche (es., PCR *nested*).

^(**) Possibile presenza di inibitori della *Taq* polimerasi nel campione. Il test dovrebbe essere ripetuto previa diluizione dell'estratto di tDNA (1:5 o 1:10). Se il valore di *Ct* del IPC si conferma ≥ 22, si deve ripetere l'estrazione del DNA dal campione.

Nota. I valori di *Ct* di 22 (IPC) e 40 (FD/BN) sono quelli ottenuti nelle condizioni di laboratorio della ditta produttrice. Alcuni fattori, quali il tipo di termociclatore utilizzato, possono influenzare tali valori pertanto si consiglia di verificare sempre i *Ct* soglia nelle proprie condizioni di laboratorio, come specificato nel paragrafo 'Avvertenze generali' del presente protocollo.

3.4 Metodo diagnostico 3: TaqMan® real time PCR (Angelini *et al.*, 2007)

Questo metodo consente la diagnosi simultanea, in pozzetto multiplo, dei fitoplasmi agenti di FD e BN della vite e di un controllo endogeno (IPC – *internal positive control*) rappresentato da un frammento del gene *chaperonin 21* della vite.

Il metodo prevede l'utilizzo di *primers* e sonde TaqMan® specifiche per ciascun *target*, di seguito specificate.

1 – FD:

Forward: 5' - AAGTCGAACGGAGACCCTTC -3'

Reverse: 5' - TAGCAACCGTTTCCGATTGT -3'

Sonda: 5' - FAM-AAAAGGTCTTAGTGGCGAACGGGT-3' - TAMRA

2 – BN:

Forward: 5' – GGTAAAGTCCCGCAACGAG – 3'

Reverse: 5' – CCCACCTTCCTCCAATTTATCA – 3'

Sonda: FAM- 5' - AACCTTGTGTGTTAATTGCCATCATTAAG – 3' – TAMRA

3 – Controllo endogeno:

Forward: 5' – GGTCCTTTGGATGAGGATGG – 3'

Reverse: 5' – GAAGTCATTCCCTGCATACTTGG – 3'

Sonda: FAM- 5' - GAAACCACTGTCTGTGAGCCCAGGA – 3' - TAMRA

Primers e sonde possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano. E' conveniente preparare delle soluzioni madri ad un'opportuna concentrazione (100 mM o 200 mM) diluendo *primers* e sonde in dH₂O sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservarle a -20°C. Da tali soluzioni, preparare delle aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione d'uso di 20 mM in acqua sterile e conservarle a -20 °C. Fare attenzione a proteggere sempre le sonde (soluzioni madri e aliquote d'uso) dalla luce.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari all'esecuzione del saggio sono riportati in Allegato 1.

3.4.1 Preparazione del saggio

1. Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da banco.
2. Se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere pipette, puntali e provette sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.
3. Preparare un foglio di lavoro in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento ed uno schema di caricamento della/e piastra/e (*nota: nel predisporre lo schema, inserire sempre tutti e tre i target in ogni singola piastra prevista dall'esperimento, come nell'esempio riportato di seguito; in tal modo ogni campione verrà analizzato contemporaneamente per ogni singolo target nello stesso evento di amplificazione*).
4. Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla nello schema della piastra, nella posizione stabilita (*nota: se al posto della piastra si utilizzano microprovette singole o in 'strip' dotate di chiusura con tappo, non siglare in nessuna parte per non ostacolare la rilevazione del segnale da parte dello strumento*). Per ciascun *target*, in ogni esperimento inserire sempre:
 - un controllo positivo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente infetto da FD ed uno da BN, estratti insieme ai campioni da analizzare);
 - un controllo negativo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente esente da FD e BN, estratto insieme ai campioni da analizzare);
 - un controllo positivo di amplificazione (estratto di tDNA ottenuto anche da una matrice diversa dalla vite, purché sicuro positivo in real time PCR per il fitoplasma *target*; per il controllo endogeno, invece, utilizzare sempre un estratto di tDNA da vite che si amplifica sicuramente in real time PCR per il gene *target*);
 - un controllo negativo di amplificazione (estratto di tDNA sicuro negativo in real time PCR per il fitoplasma *target*);
 - almeno 2 controlli in bianco (campione contenete una pari quantità di acqua al posto del tDNA *target*) da posizionare SEMPRE uno, come primo campione e uno, come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra (*nota: se l'esperimento prevede l'analisi di numerosi campioni, si suggerisce di considerare un controllo in bianco ogni 20 campioni da distribuire anche all'interno della piastra ma avendo sempre cura di posizionarne uno come primo campione e uno come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra*).

Esempio di schema di caricamento (piastra a 96 pozzetti)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	FD	FD	FD	NTC	BN	BN	BN	NTC	IPC	IPC	IPC
B	FD	FD	FD	FD	BN	BN	BN	BN	IPC	IPC	IPC	IPC
C	FD	FD	FD	FD	BN	BN	BN	BN	IPC	IPC	IPC	IPC
D	FD	FD	FD	PEC (FD)	BN	BN	BN	PEC (BN)	IPC	IPC	IPC	PEC (FD)
E	FD	FD	FD	NEC	BN	BN	BN	NEC	IPC	IPC	IPC	PEC (BN)
F	FD	FD	FD	PAC (FD)	BN	BN	BN	PAC (BN)	IPC	IPC	IPC	NEC
G	FD	FD	FD	NAC	BN	BN	BN	NAC	IPC	IPC	IPC	PAC
H	FD	FD	FD	NTC	BN	BN	BN	NTC	IPC	IPC	IPC	NTC

IPC = controllo endogeno; NTC = campione in bianco; PEC = controllo positivo di estrazione; NEC = controllo negativo di estrazione; PAC = controllo positivo di amplificazione; NAC = controllo negativo di amplificazione

3.4.2 Esecuzione del saggio

1. Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (nota: *lo stesso camice non deve essere stato utilizzato per la manipolazione di amplificati o in fase di estrazione dei campioni*).
2. Indossare guanti puliti.
3. Preparare la miscela di reazione in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
4. Disporre le piastre ottiche o le microprovette sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.
5. Scongelerare gli estratti di tDNA ed i reagenti necessari per la preparazione delle miscele di reazione, mantenendoli in ghiaccio (nota: *dopo il completo scongelamento, centrifugare brevemente gli estratti di tDNA prima di caricarli*).
6. In provette separate mantenute in ghiaccio, preparare la miscela di reazione per FD, BN e controllo endogeno, dopo aver calcolato il quantitativo esatto di ogni reattivo in funzione del numero totale di campioni da saggiare:

Miscela di reazione unitaria per FD (*concentrazioni finali in 25 ml totali*):

1X qPCR Master mix^(*)

200 nM primer forward FD

200 nM *primer reverse* FD
 150 nM sonda FD
 Acqua sterile per un volume di 20 ml
 5 ml estratto tDNA

Miscela di reazione unitaria per BN (*concentrazioni finali in 25 ml totali*):

1X qPCR *Master mix*^(*)
 200 nM *primer forward* BN
 200 nM *primer reverse* BN
 150 nM sonda BN
 Acqua sterile per un volume di 20 ml
 5 ml estratto tDNA

Miscela di reazione unitaria per controllo endogeno (*concentrazioni finali in 25 ml totali*):

1X qPCR *Master mix*^(*)
 200 nM *primer forward* CHP
 200 nM *primer reverse* CHP
 150 nM sonda CHP
 Acqua sterile per un volume di 20 ml
 5 ml estratto tDNA

^(*) L'utilizzo della *2X Platinum qPCR Supermix-UDG* (Invitrogen; Cat. No. 11730) è consigliato per l'esecuzione di questo saggio. L'uso di *Master mix* alternative (con o senza UDG e con o senza ROX) è possibile, purché la concentrazione di MgCl₂ non sia superiore a 6 mM (3 mM nella concentrazione finale 1X).

1. Cambiare area di lavoro e caricare, in ciascuna provetta o pozzetto, 5 ml di tDNA del relativo campione da analizzare o dei controlli positivi e negativi previsti, utilizzando una micropipetta dedicata SOLO a questo scopo (nei campioni in bianco, caricare 5 ml di acqua '*Nuclease-free*').
2. Se si utilizza una piastra ottica, coprirla con l'apposita pellicola; inserire la piastra (o le provette) nel termociclatore per real time ed avviare lo strumento dopo aver impostato il seguente programma:

<i>Ciclo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Attivazione UDG ^(*)	50 °C	3'	1
Attivazione enzima	95 °C	3'	1
Amplificazione	95 °C	15''	50
	60 °C	60''	

^(*) *Questo ciclo va eseguito SOLO se la Master mix utilizzata contiene UDG (Uracil-DNA Glycosylase)*

Nota. La 2X Platinum qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) non contiene ROX come 'passive reference dye'. Questo viene fornito come componente separato nella confezione. Alcuni modelli di termociclatori real time possono avere la modalità ROX preimpostata; in tali casi, fare sempre attenzione a modificare questa impostazione prima di avviare il programma di amplificazione. Con strumenti che, invece, non consentono di modificare la modalità ROX, questo dovrà essere aggiunto nella miscela di reazione; in tal caso, occorre ridurre il quantitativo unitario di acqua nella miscela di reazione di un volume pari al ROX aggiunto, così da rispettare il volume finale di reazione. Le stesse accortezze vanno prestate nel caso si utilizzino Master mix alternative contenenti o meno ROX.

3.4.3 Valutazione dei risultati

Il saggio si considera attendibile solo se, per ciascuno dei *target* considerati (FD, BN, controllo endogeno), si verificano contemporaneamente le seguenti condizioni:

1. nel controllo positivo di amplificazione è presente una curva esponenziale di amplificazione;
2. nel controllo negativo di amplificazione per FD e BN, non è presente una curva esponenziale di amplificazione;
3. nel controllo positivo di estrazione è presente una curva esponenziale di amplificazione;
4. nel controllo negativo di estrazione non è presente una curva esponenziale di amplificazione, per FD e BN mentre è presente una curva esponenziale di amplificazione, per il controllo endogeno;
5. nei controlli in bianco non devono essere presenti curve esponenziali di amplificazione;
6. in tutti i campioni in esame, sia positivi sia negativi, deve essere presente una curva esponenziale di amplificazione per il controllo endogeno.

Se non si verifica la condizione 6, su tutti o parte dei campioni, bisogna sospettare la presenza di inibitori della Polimerasi. In tal caso, il test deve essere ripetuto previa diluizione dell'estratto di tDNA (1:5 o 1:10) dei campioni che non soddisfano la condizione 6.

L'interpretazione dei risultati (discriminazione dei campioni in positivi e negativi) dovrà essere fatta sulla base del valore di *Ct* soglia preventivamente stabilito nelle proprie condizioni di laboratorio, come specificato nel paragrafo 'Avvertenze generali' del presente protocollo.

3.5 Metodo diagnostico 4: LAMP (Durante *et al.*, 2015)

Questo metodo utilizza la tecnica di amplificazione isoterma LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) e prevede l'uso di un kit 'ready-to-use' sviluppato

da IPADLAB - International Plant Analysis and Diagnostics s.r.l. (<http://www.ipadlab.eu>) in collaborazione con Hyris Ltd (<http://www.hyris.net>). Il metodo si basa sull'impiego di un set di sei *primers* specificatamente disegnati sul gene *rpl14* del fitoplasma agente di FD, attualmente coperto da un brevetto internazionale di cui IPADLAB è detentore.

Il kit si compone di:

- una *Master mix*, contenente il set di *primers* ed un enzima specifico per amplificazione isotermica;
- un controllo positivo;
- un controllo negativo.

Questo metodo può essere eseguito sia su strumentazione specifica per tecnica LAMP sia su normali termociclatori per real time.

Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato I.

3.5.1 Preparazione del saggio

1. Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da banco.
2. Se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere pipette, puntali e provette sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.
3. Preparare un foglio di lavoro in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento ed uno schema di caricamento della/e piastra/e.
4. Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla nello schema della piastra, nella posizione stabilita (nota: *se al posto della piastra si utilizzano microprovette in 'strip' dotate di chiusura con tappo, non siglare in nessuna parte per non ostacolare la rilevazione del segnale da parte dello strumento*). In ogni esperimento inserire sempre:
 - il controllo positivo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente infetto da FD, estratto insieme ai campioni da analizzare);
 - il controllo negativo di estrazione (tDNA ottenuto da un campione di vite sicuramente esente da FD e BN, estratto insieme ai campioni da analizzare);
 - il controllo positivo del kit;
 - il controllo negativo del kit;
 - almeno 2 controlli in bianco (campione contenete una pari quantità di acqua al posto del tDNA target) da posizionare sempre uno, come primo campione e uno, come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra (nota: *se l'esperimento prevede l'analisi di numerosi campioni, si suggerisce di considerare un controllo in bianco ogni 20 campioni da distribuire anche all'interno della piastra ma avendo sempre cura di posizionarne uno*

come primo campione e uno come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra).

3.5.2 Esecuzione del saggio

1. Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix (nota: lo stesso camice non deve essere stato utilizzato per la manipolazione di amplificati o in fase di estrazione dei campioni).
2. Indossare guanti puliti.
3. Preparare la miscela di reazione in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
4. Disporre le piastre ottiche o le micropiastre sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.
5. Scongelerla la *Master mix* mantenendola in ghiaccio; quando completamente scongelata, mescolarla con vortex e dare uno leggero '*spin*' per far scendere eventuali residui rimasti sul tappo.
6. Distribuire 20 µl di *Master mix* in ciascuna provetta o pozzetto previsto in funzione del numero totale di campioni da saggiare.
7. Cambiare area di lavoro e caricare, in ciascuna provetta o pozzetto, 5 µl di tDNA del relativo campione da analizzare o dei controlli positivi e negativi previsti, utilizzando una micropipetta dedicata SOLO a questo scopo (nei campioni in bianco, caricare 5 µl di acqua '*Nuclease-free*').
8. Se si utilizza una piastra ottica, coprirla con l'apposita pellicola; inserire la piastra (o le *strips*) nel termociclatore per real time ed avviare lo strumento dopo aver impostato il seguente programma:

Ciclo	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Amplificazione	65 °C	1''	30
	65 °C	55''	
Curva di <i>melting</i>	Utilizzare le impostazioni standard del proprio termociclatore		

Nota: la *Master mix* utilizzata non contiene ROX come '*passive reference dye*'. Alcuni modelli di termociclatori real time possono avere la modalità ROX preimpostata; in tali casi, fare sempre attenzione a modificare questa impostazione prima di avviare il programma di amplificazione.

Se si utilizza un termociclatore specifico per LAMP, impostare le seguenti condizioni:

Ciclo	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Amplificazione	65 °C	30'	1
Curva di <i>Melting</i>	Da 98 °C a 80 °C		

3.5.3 Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati si basa sul valore di *Ct* delle curve di amplificazione e sulla temperatura di *melting* (*Tm*) del frammento amplificato. L'amplicone specifico per FD produce una curva di *melting* con una *Tm* compresa tra 81 °C e 82 °C (nota:

si consiglia di verificare preventivamente il valore di Tm che si ottiene per FD nelle proprie condizioni di laboratorio).

Il saggio si considera attendibile solo se si verificano contemporaneamente le seguenti condizioni:

1. il controllo positivo del kit genera una curva esponenziale di amplificazione e una curva di *melting* con una Tm compresa tra 81 °C e 82 °C;
2. il controllo negativo del kit ed i controlli in bianco non generano curve di amplificazione o curve di *melting* con una Tm compresa tra 81 °C e 82 °C;
3. nel controllo positivo di estrazione è presente una curva esponenziale di amplificazione e una curva di *melting* con una Tm compresa tra 81 °C e 82 °C;
4. nel controllo negativo di estrazione non è presente una curva esponenziale di amplificazione o una curva di *melting* con una Tm compresa tra 81 °C e 82 °C;

Se la condizione 3 e/o la 4 non vengono verificate, si deve sospettare un problema/contaminazione intercorso/a in fase di estrazione del DNA ed il saggio va ripetuto partendo da nuovi estratti.

L'interpretazione dei risultati (discriminazione dei campioni in positivi e negativi), si basa sul valore di Ct delle curve esponenziali di amplificazione ottenute e sulla relativa Tm, secondo la seguente tabella decisionale:

Curva di <i>melting</i> (Tm)	Valore di Ct	
	Ct ≤ 20	Ct > 20
81 °C < Tm < 82 °C	Positivo	Indeterminato ^(*)
Nessuna Tm	Negativo	Negativo
Tm non compresa tra 81 °C e 82 °C	Negativo	Negativo

^(*) Il campione dovrebbe essere analizzato con altre tecniche (es., real time PCR, PCR *nested*). Tuttavia, se il Ct è compreso tra 25 e 30 si deve sospettare una contaminazione ed in tal caso si può ripetere il saggio.

Nota. Il valore di Ct di 20 è quello ottenuto nelle condizioni di laboratorio della ditta produttrice. Alcuni fattori, quali il tipo di termociclatore utilizzato, possono influenzare tale valore pertanto si consiglia di verificare sempre il Ct soglia nelle proprie condizioni di laboratorio, come specificato nel paragrafo 'Avvertenze generali' del presente protocollo.

4. DATI DI VALIDAZIONE

La validazione dei metodi diagnostici sopra descritti è stata ottenuta secondo le linee guida del documento EPPO PM 7/98(2), attraverso la definizione dei seguenti parametri di *performance*:

- **Sensibilità analitica**
- **Specificità analitica**
- **Ripetibilità**
- **Riproducibilità**

La specificità analitica è stata valutata sia qualitativamente (attraverso verifica della capacità dei metodi di dare reazioni positive/negative nei confronti di fitoplasmi *target* e *non-target* di riferimento) sia quantitativamente, attraverso il calcolo dei seguenti parametri:

- **Sensibilità diagnostica**
- **Specificità diagnostica**
- **Accuratezza**

Per il metodo 1 (PCR diretta e *nested*) si riportano i dati di validazione scaturiti dal ring-test Europeo, coordinato dal CREA-PAV nell'ambito del progetto EUPHRESCHO-GRAFDEPI (The Euphresco GRAFDEPI Group, 2015).

Per tutti gli altri metodi, invece, si riportano i dati di validazione scaturiti dal ring-test organizzato nell'ambito del progetto Nazionale ASPROPI finanziato dal MIPAAF (D.M. 28635 del 28/12/201) e coordinato dal CREA-PAV, a cui hanno partecipato 15 laboratori di diagnosi afferenti ai Servizi Fitosanitari Regionali (11) e ad Istituzioni scientifiche (4), di seguito elencate:

1. Settore Fitosanitario e servizi tecnico-scientifici Regione Piemonte (Giovanna Mason);
2. ERSAF – Servizio Fitosanitario Regione Lombardia, Laboratorio Fitopatologico c/o Fondazione Minoprio (Marica Calvi)
3. Servizio Fitosanitario Regione Toscana - Laboratorio di diagnostica fitopatologica e di biologia molecolare (Domenico Rizzo);
4. ASSAM – Servizio Fitosanitario Regione Marche (Simona Talevi)
5. Settore Fitosanitario Regione Veneto (Teresa Cosmi);
6. Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna (Anna Rosa Babini, Patrizia Grillini);
7. ERSA – Servizio Fitosanitario Regione Friuli Venezia Giulia (Gian Luca Bianchi);
8. Fondazione Edmund Mach, Unità Protezione delle piante e biodiversità agroforestale (Cristian Cainelli);

9. Centro di Sperimentazione Agraria e Forestale Laimburg - Laboratorio di Virologia e Diagnostica (Andreas Gallmetzer);
10. Centro di Ricerca Sperimentazione e Formazione in Agricoltura (CRSFA) "Basile Caramia (Nicola Trisciuzzi);
11. CIHEAM - Istituto Agronomico Mediterraneo Bari (Michele Digiaro);
12. DipSA, Facoltà di Agraria, Università di Bologna (Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri);
13. DiSAA - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università di Milano (Paola Casati);
14. CREA – Centro di ricerca Viticoltura ed Enologia (Elisa Angelini, Luisa Filippin);
15. CREA – Centro di Ricerca Difesa e Certificazione (Luca Ferretti, Lorenzo Vizzaccaro)

4.1. Validazione delle metodologie diagnostiche

Per tutti i dettagli relativi alla validazione del metodo 1, si rimanda alla seguente pubblicazione scientifica:

The EUPHRESKO GRAFDEPI GROUP, 2015. European interlaboratory comparison of detection methods for "flavescence dorée" phytoplasma: preliminary results. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5 (1-Supplement), S35-S37.

I dettagli relativi alla validazione dei metodi 2, 3 e 4 vengono, invece, descritti di seguito.

4.1.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata valutata presso il laboratorio del CREA-PAV a partire da due estratti di DNA ottenuti da piante di vite naturalmente infette da FD a differente titolo di fitoplasma (alto e basso).

Per la determinazione della sensibilità analitica sono state analizzate 5 diluizioni seriali (1/10, 1/100, 1/200, 1/1000, 1/2000) per campione, ciascuna replicata tre volte al fine di stabilire l'ultima diluizione con il 100% di risultati positivi.

4.1.2 Specificità analitica

La valutazione qualitativa della sensibilità analitica è stata eseguita presso il laboratorio del CREA-PAV analizzando un totale di 12 campioni rappresentati da estratti di DNA, di cui:

- 2 campioni di vite infette, rispettivamente, da Flavescenza dorata tipo C e D;
- 3 campioni infetti da altri fitoplasmi del gruppo 16SrV: 16SrV-A (ULW), 16SrV-B (JWB), 16SrV-C (PGY), 16SrV-E (RuS);

- 4 campioni infetti da fitoplasmi appartenenti a gruppi diversi dal 16SrV: 16SrI-B (SAY), 16SrIII (GY-U), 16SrVII (ASHY), 16SrXII-A (STOLBUR)
- 3 campioni di vite sana (viti certificate mantenute in ambiente protetto)

I ceppi dei fitoplasmi utilizzati per la determinazione della specificità analitica e la loro provenienza sono riportati nella successiva tabella 1.

Per la valutazione quantitativa della specificità analitica è stato utilizzato un panel di 18 campioni rappresentati da repliche tecniche di estratti di DNA *target* (ottenuti da piante di vite naturalmente infette da FD-C ed FD-D) e *non-target* (ottenuti da piante di vite sana ed infetta da legno nero). I campioni *target* sono stati analizzati a due diversi livelli di diluizione (bassa e alta) del DNA totale di partenza, come specificato nella tabella 2.

Attraverso l'analisi di questi campioni sono stati calcolati i parametri di sensibilità diagnostica (SE), specificità diagnostica (SP) e accuratezza (AC).

TABELLA 1 - Campioni per la determinazione della specificità analitica

Provenienza	Isolato	Gruppo 16Sr	16SrV	FD
CREA-PAV, Italia	SAY, Severe aster yellows	16SrI-B	0	0
DipSA, Italia	GY-U, Western X grapevine	16SrIII	0	0
CREA-PAV, Italia	ULW	16SrV-A	1	0
DipSA, Italia	JWB (Cina)	16SrV-B	1	0
JKI, Germania	PGY (EY-38), Palatinate grapevine yellows	16SrV-C	1	0
ERSA, Italia	FD-C (39168), Flavescence dorée	16SrV-C	1	1
CREA-PAV, Italia	FD-D (227V), Flavescence dorée	16SrV-D	1	1
CREA-PAV, Italia	RuS	16SrV-E	1	0
DipSA, Italia	ASHY2, 'Ca. P. fraxini' (USA)	16SrVII-A	0	0
CREA-PAV, Italia	323V, 'Ca. P. solani'	16SrXII-A	0	0
CREA-PAV, Italia	Vite sana 1	-	0	0
CREA-PAV, Italia	Vite sana 2	-	0	0
CREA-PAV, Italia	Vite sans 3	-	0	0

1: positivo – 0: negativo

TABELLA 2 - Campioni per la determinazione dei parametri SE, SP ed AC

Origine	Sigla	Diluizione	Codice replica	16SrV	FD
ERSA Friuli V.-G.	39168 (FD-C)	1/10	A1	1	1
			A2	1	1
			A3	1	1
		1/2000	A4	1	1
			A5	1	1
			A6	1	1
SFR Lombardia	697/3+694/2 (FD-D)	1/10	B1	1	1
			B2	1	1
			B3	1	1
		1/200	B4	1	1
			B5	1	1
			B6	1	1
CREA-PAV Lazio	LN65 (BN)	1/10	C1	0	0
			C2	0	0
			C3	0	0
CREA-PAV Lazio	Vite sana	1/10	D1	0	0
			D2	0	0
			D3	0	0

4.1.3 Ripetibilità e riproducibilità

Lo stesso panel di 18 campioni (tab. 2) è stato utilizzato per la determinazione dei parametri di ripetibilità e riproducibilità, calcolati secondo i criteri riportati nella premessa al presente volume.

4.2. Valori di validazione

4.2.1 Metodo diagnostico 1: PCR *nested* gruppo 16SrV specifica (Lee *et al.*, 1994)

Parametri	Valori ⁽¹⁾
Sensibilità analitica ⁽²⁾	< 1/10
Specificità analitica	Reazione con i fitoplasmi del gruppo 16SrV valutati. Nessuna <i>cross reaction</i> su i campioni <i>non-target</i> .
Sensibilità diagnostica (SE)	91,4%
Specificità diagnostica (SP)	88,3%
Accuratezza (AC)	90,3%
Ripetibilità	81,6%
Riproducibilità	73,8%

⁽¹⁾ Valori ottenuti nel ring-test Europeo nell'ambito del progetto EUPHRESCO-GRAFDEPI

⁽²⁾ Espressa come ultimo livello di diluizione con il 100 % di risultati positivi.

4.2.2 Metodo diagnostico 2: Triplex TaqMan® real time PCR (IPADLAB)

Parametri	Valori
Sensibilità analitica ⁽¹⁾ :	
campione A	> 1/2000
campione B	> 1/200
Specificità analitica	Reazione con i fitoplasmi del gruppo 16SrV valutati. Nessuna <i>cross reaction</i> su i campioni <i>non-target</i> .
Sensibilità diagnostica (SE)	91,7%
Specificità diagnostica (SP)	96,7%
Accuratezza (AC)	94,2%
Ripetibilità	97,8%
Riproducibilità	93,3%

⁽¹⁾ Espressa come ultimo livello di diluizione con il 100 % di risultati positivi; A, campione ad alto titolo di fitoplasma; B, campione a basso titolo di fitoplasma.

4.2.3 Metodo diagnostico 3: TaqMan® real time PCR (Angelini *et al.*, 2007)

Parametri	Valori
Sensibilità analitica ⁽¹⁾ :	
campione A	> 1/2000
campione B	> 1/200
Specificità analitica	Reazione con i fitoplasmi del gruppo 16SrV valutati. Nessuna <i>cross reaction</i> su i campioni <i>non-target</i> .
Sensibilità diagnostica (SE)	100,0%
Specificità diagnostica (SP)	73,3%
Accuratezza (AC)	86,7%
Ripetibilità	93,3%
Riproducibilità	91,1%

⁽¹⁾ Espressa come ultimo livello di diluizione con il 100 % di risultati positivi; A, campione ad alto titolo di fitoplasma; B, campione a basso titolo di fitoplasma.

4.2.4 Metodo diagnostico 4: LAMP (Durante *et al.*, 2015)

Parametri	Valori
Sensibilità analitica ⁽¹⁾ :	
campione A	> 1/2000
campione B	< 1/200
Specificità analitica	Reazione con i fitoplasmi del gruppo 16SrV valutati. Nessuna <i>cross reaction</i> su i campioni <i>non-target</i> .
Sensibilità diagnostica (SE)	75,0%
Specificità diagnostica (SP)	100,0%
Accuratezza (AC)	87,5%
Ripetibilità	93,6%
Riproducibilità	83,3%

⁽¹⁾ Espressa come ultimo livello di diluizione con il 100 % di risultati positivi; A, campione ad alto titolo di fitoplasma; B, campione a basso titolo di fitoplasma.

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ANGELINI E., G. L. BIANCHI, L. FILIPPIN, C. MORASSUTTI, M. BORGO, 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, **68**, 613–622.
- BAGNOLI B., L. FERRETTI, V. TRIVELLONE, L. NUCCITELLI, G. PASQUINI, 2008: Occurrence of *Scaphoideus titanus* in Latium region. *Petria*, **18**, 304-308.
- DAIRE X., E. BOUDON-PADIEU, A. BERVILLE, B. SCHNEIDER, AND A. CAUDWELL, 1992. Cloned DNA Probes for Detection of Grapevine Flavescence Doree Mycoplasma-Like Organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, **121**, 95-103.
- DAVIS R.E. AND E.L. DALLY, 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of *Flavescence dorée* - associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Disease*, **85**, 790–797.
- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbiol. Methods*, **14**, 53-61.
- DOYLE J.J., DOYLE J.I., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- DURANTE G., C. GIANINAZZI, S. LOPRIORE, C. CHATILLON, 2015. Development of an isothermal amplification assay for in-field detection of grapevine flavescence doree phytoplasma. *11th International Conference on Plant Diseases*. Tours (France), 101-108.
- FERRETTI L., A. GENTILI, E. COSTANTINI, A. ZOINA, L. COZZOLINO, P. SPIGNO AND G. PASQUINI, 2014. Identification of Flavescence dorée-related phytoplasma infecting grapevines on the isle of Ischia (southern Italy). *Vitis*, **53** (1), 39–43.
- FILIPPIN L., J. JOVIĆ, T. CVRKOVIĆ, V. FORTE, D. CLAIR, I. TOŠEVSKI, E. BOUDON-PADIEU, M. BORGO, E. ANGELINI, 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with *Flavescence dorée* in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology*, **58** (5), 826-837.
- GRIFFO, R., D. BENCHI, A. BIFULCO, G. PESAPANE, 2011. Flavescenza dorata anche in Campania. *L'informatore Agrario*, **44**, 67.
- LEE I.M., D. E. GUNDERSEN, R. W. HAMMOND, R. E. DAMS, 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* **84**, 559-566.
- LESSIO F., L. PICCIAU, E. GONELLA, M. MANDRIOLI, F. TOTA, A. ALMA, 2016. The mosaic leafhopper *Orientus ishidae*: host plants, spatial distribution, infectivity, and transmission of 16SrV phytoplasmas to vines. *Bulletin of Insectology*, **69** (2), 277-289.
- MARTINI, M., E. MURARI, N. MORI, A. BERTACCINI, 1999. Identification and epidemic distribution of two Flavescence dore 'e-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease* **83**, 925–930.
- MARZACHÌ, C., A. ALMA, M. D'AQUILIO, G. MINUTO AND G. BOCCARDO. Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria

- (Italian Riviera) *Journal of plant pathology* **81**(2), 127-136.
- MEHLE, N., N. PREZELJ, M. HREN, J. BOBEN, K. GRUDEN, M. RAVNIKAR, & M. DERMASTIA, 2013. A real-time PCR detection system for the Bois noir and Flavescence dorée phytoplasmas and quantification of the target DNA. In *Phytoplasma*, 253-268. Humana Press.
- MORI N, A. BRESSAN, M. MARTINI, M. GUADAGNINI, V. GIROLAMI, A. BERTACCINI, 2002. Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* Ball of two *Flavescence dorée*-type phytoplasmas. *Vitis*, **41**, 99–102.
- ROMANAZZI G., S. MUROLO, D. D'ASCENZO, R. DI GIOVANNI, 2007. Nuove acquisizioni sulla diffusione dei giallumi della vite in Abruzzo. *Italus Hortus*, **14**, 253-256.
- SANCASSANI GP, N. MORI, M. BARBA, G. PASQUINI , 2008. Distribuzione dei giallumi della vite in Italia. *Quaderni dell'Accademia dei Georgofili* 2006, **VIII**, 67-85.
- SCHNEIDER B., E. SEEMÜLLER, C.D. SMART, B. KIRKPATRICK, 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Razin S., and Tully, J.D. (eds.) *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology*, 369-380. Academic Press, San Diego, CA.
- The EUPHRESCO GRAFDEPI GROUP, 2015. European interlaboratory comparison of detection methods for “flavescence dorée” phytoplasma: preliminary results. *Phytopathogenic Mollicutes*, **5** (1-Supplement), S35-S37.
- VIGGIANI G., 2002. Il vettore della flavescenza dorata trovato in Basilicata. *L'Informatore Agrario*, **58** (36), 59.
- VIGGIANI G., 2004. Il vettore della Flavescenza dorata anche in Campania. *L'Informatore Agrario*, **60** (18), 98.

ALLEGATO I Strumentazione , materiali e reagenti necessari

a) Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Congelatore
6. Frigorifero
7. Macchina per produzione ghiaccio
8. Micropipette calibrate dedicate alla PCR (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
9. Termociclatore
10. Transilluminatore
11. Vortex
- 12.

b) Reagenti

1. Acqua sterile '*nucleasi-free*'
2. Agarosio e composti chimici per tampone TBE
3. Bromuro d'etidio (o suoi sostituti)
4. *Taq* DNA polimerasi e relativo *buffer*
5. $MgCl_2$ (se non incluso nel buffer della polimerasi)
6. Primers universali
7. Primers 16SrV - specifici
8. dNTPs
9. *Loading buffer* per elettroforesi (se si utilizzano *buffer* della polimerasi non colorati)
10. Marker di DNA (1 Kb)
- 11.

c) Materiali

1. Carta da laboratorio
2. Guanti
3. Puntali sterili con filtro per micropipette dedicate alla PCR
4. Portaprovette
5. Provette sterili da 0,2 o 0,5 ml per PCR
6. Provette sterili da 1,5 e 2 ml

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
PHYTOPHTHORA LATERALIS

Vitale S., Haegi A., Belisario A.

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Introduzione
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Morfologia
- 1.4 Criteri di campionamento
- 1.5 Normativa fitosanitaria

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Estrazione del DNA
- 2.3 Metodo diagnostico: Real-time PCR (Schenk *et al.*, 2016)
 - 2.3.1 Primer e Sonde utilizzate
 - 2.3.2 Reazione di amplificazione Real-time PCR
 - 2.3.3 Ciclo di amplificazione
 - 2.3.4 Uso dei controlli
 - 2.3.5 Valutazione dei risultati

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Metodo di lavoro
- 3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione
- 3.3 Misura del limite di rilevabilità (LOD)
- 3.4 Validazione
- 3.5 Conclusioni

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I-Strumentazione, materiali e reagenti necessari

1 DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Phytophthora lateralis</i> Tucker & Milbrath
Tassonomia	Chromista, Oomycetes, Peronosporales, Pythiaceae
Avversità	Marciume del colletto e delle radici di Cipresso di Lawson e più in generale di <i>Chamaecyparis</i> spp., <i>Thuja</i> spp., <i>Taxus</i> spp.
Categoria Fitosanitaria	EPPO A2 list no. 337*

* Elenco di patogeni da quarantena presenti nella regione europea stilato dall'European Plant Protection Organization (EPPO) PM1/002 (25) 2016.

1.1 Introduzione

Phytophthora lateralis è l'agente causale responsabile del marciume radicale del Cipresso di Lawson [Port-Orford-Cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*)]. La prima segnalazione risale al 1923 in Seattle (USA) (Zobel *et al.*, 1985) anche se la prima vera descrizione della specie *P. lateralis* come agente causale è avvenuta 20 anni dopo (Tucker & Milbrath, 1942). Attualmente il patogeno è diffuso in tutto l'areale Nord-est americano dove è presente in natura il Port-Orford-Cedar (Hansen *et al.*, 2000). In Europa *P. lateralis* è stata segnalata per la prima volta su *C. lawsoniana* in Francia nel 1998 (Hansen *et al.*, 1999) e in Olanda in vivaio nel 2004 (Sansford, 2009). Più recentemente, è stata isolata su siepi frangivento in Bretagna (Francia) e quindi ritenuta **A2** (Robin *et al.*, 2011).

Dal 2010 *P. lateralis* su *C. lawsoniana* è stata segnalata anche nel Regno Unito in ambiente forestale, in parchi e siepi frangivento; di non trascurabile importanza è la segnalazione di *P. lateralis* in vivaio da materiale importato dal continente Europeo di *C. lawsoniana* e *Thuja occidentalis* (Green *et al.*, 2012).

Ulteriori rinvenimenti di *P. lateralis* sono stati segnalati in Taiwan nel 2008 da terreno su *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* asintomatiche (Brasier *et al.*, 2010) e nel 2011 nel sud-est dell'Irlanda in un parco pubblico sempre su *C. lawsoniana* (EPPO, 2011).

L'ospite principale è *C. lawsoniana* anche se altre specie di *Chamaecyparis* (*C. formosensis*, *C. obtusa*, *C. pisifera*) possono essere attaccate ma con danni limitati. Alcune *Cupressaceae* sono riportate come ospiti (*Thuja occidentalis* e *T. plicata*) da Schlenzig *et al.*, 2011 e 2014. Inoltre DeNitto & Kliejunas (1991) segnarono questo oomicete su *Taxus brevifolia*.

1.2 Sintomatologia

I sintomi prodotti da un attacco di *P. lateralis* non sono specifici ma molto simili a quelli di altre specie di *Phytophthora*. Sull'ospite principale *C. lawsoniana* i sintomi più frequenti sono lesioni e marciumi di radici colletto e tronco. La penetrazione di questo oomicete avviene mediante le zoospore dalle radici per poi progredire verso il colletto a livello sub-corticale. Le radici risultano imbevute di acqua (water soak) ed assumono una colorazione marrone chiara tendente al bruno. Sulla parte epigea si possono cominciare ad osservare ingiallimenti e imbrunimenti del fogliame che tende successivamente al secco. Sintomi precoci sulla chioma possono essere rappresentati da un leggero avvizzimento durante giornate calde seguito da cambiamento di colore delle foglie. Nei casi di piante con sintomi sopra descritti l'analisi subcorticale del colletto dovrebbe evidenziare una linea netta di demarcazione tra tessuti sani e infetti.

Foto copyright: www.forestry.gov.uk/pestsanddiseases

1.3 Morfologia

Phytophthora lateralis è un oomicete ootallico che prende questo nome per la formazione di clamidospore laterali rispetto alle ife (figura). Gli oogoni con anteridio paragono si possono osservare su agar con foglie di *Chamaecyparis lawsoniana* o erba medica. La forma degli oogoni è sferica con un diametro tra 31 e 55 µm. Le oospore sono plerotiche con 28-50 µm di diametro e 5 – 6 µm di spessore delle pareti. Gli sporangi, ellissoidali, sono non-papillati, non-caduchi (persistenti) e misurano circa 50 × 25 µm. La maggior parte delle clamidospore sono prodotte lateralmente alle ife, ma si possono osservare anche clamidospore intercalari e terminali. Quando arrivano a maturazione presentano una colorazione marrone cannella e un diametro da 30 a 50 µm. In fase di maturazione le clamidospore possono essere confuse con



sfiancamenti ifali (hyphal swelling). Quest'ultimi invece possono essere presenti in catena. La temperatura massima di crescita di *P. lateralis* è intorno a 25°C.

1.4 Criteri di campionamento

Per una più completa trattazione dell'argomento si rimanda alle indicazioni fornite dalla pubblicazione su *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* (2015) 45(3), 397–409 PM 7/123 (1) *Phytophthora lateralis*.

Qui di seguito vengono indicate alcune raccomandazioni ed evidenziati alcuni punti critici al fine di migliorare l'attività diagnostica

1. Gli attrezzi utilizzati per il prelievo (forbici, lame, sgorbie) devono essere accuratamente disinfettati (con soluzioni concentrate di ipoclorito di sodio/sali quaternari d'ammonio o passati alla fiamma) nella fase di passaggio tra un prelievo e l'altro per evitare di contaminare i campioni di diversa provenienza.
2. Prelevare porzioni di organi vegetali che comprendano la zona di passaggio tra tessuti sani e lesionati.
3. Per evitare contaminazioni, i diversi campioni vegetali, devono essere confezionati singolarmente in sacchetti di plastica ed identificati con etichette poste all'interno ed all'esterno della confezione.
4. Per riporre il campione utilizzare buste di plastica di dimensioni proporzionate. Campioni vegetali come foglie e germogli possono andare incontro a disidratazione per questo devono essere confezionati in buste di plastica chiuse.
5. Il campione qualora si presentasse bagnato deve essere tamponato con carta assorbente prima del confezionamento, per evitare che si formi eccessiva condensa nel sacchetto. Il materiale deve essere asciugato prima del confezionamento, in quanto l'umidità accelera fenomeni di marcescenza e lo sviluppo di microrganismi saprofiti che possono ostacolare l'analisi.
6. Se il campionamento è effettuato in parcelle e/o appezzamenti diversi è opportuno indossare sovrascarpe per evitare di diffondere il patogeno (eventualmente presente) attraverso le particelle di suolo attaccate alle scarpe che risultano così contaminate.
7. **Importantissimi sono i tempi di lavorazione:** meno tempo intercorre tra il prelievo dei campioni e la lavorazione in laboratorio e maggiori sono le possibilità di isolare *P. lateralis*. Nell'impossibilità di recapitare direttamente, o nell'arco di 24 ore, i campioni al laboratorio di diagnosi, questi possono essere conservati a **basse temperature (4-10°C)** anche per tempi più lunghi di 24 h.

In funzione del tipo di materiale da campionare possono essere utilizzati diversi criteri di prelievo:

1. Per campioni di radici coltetto e tronco scegliere il punto di passaggio tra sano e malato. Le porzioni di floema e xilema devono essere asportate con uno scalpello o lama sterile e riposti in un sacchetto o contenitore sterile a chiusura ermetica.
2. Per eventuali campioni di terreno i sacchetti devono essere sigillati singolarmente.
3. Il sacchetto sigillato deve essere identificato in maniera univoca con una sigla/

codice che verrà riportata sul verbale che andrà completato in ogni sua parte. Compilare il “Verbale di ispezione e prelievo” ed allegarlo al campione.

4. Per l'esame morfologico si consiglia di eseguire le osservazioni su colonie allevate su substrati semiselettivi come PARP, P₅ARP e V8 **evitando l'uso dell'imexazolo che inibisce la crescita di *P. lateral***. Condizioni standard di incubazione sono 18-20°C al buio.
5. Dai campioni di terreno per l'isolamento si utilizza la tecnica del Baiting (Ostrofsky *et al.*, 1977).

Informazioni che possono essere di utilità al processo diagnostico:

1. Anamnesi della situazione di campo e/o vivaio, principalmente: provenienza del materiale vegetale, fotografie e/o una mappa della zona oggetto di campionamento, con evidenziati i punti di prelievo.
2. Descrizione dell'ambiente in cui si trovano le piante oggetto dell'indagine, andamento climatico, le variazioni meteorologiche del periodo recente, il tipo di terreno, la sua giacitura, i possibili problemi di ristagni idrici ed eventualmente l'analisi chimico fisica del terreno stesso.
3. Recenti pratiche colturali: potature, rinvasi, impianti, etc.
4. Concimazioni effettuate, tipo di irrigazione e gli eventuali trattamenti crittogamici.
5. Eventuale applicazione di anticrittogamici (**l'uso di anticrittogamici può mascherare i sintomi e ostacolare le operazioni di isolamento**).
6. Vicinanza a zone industriali, a strade di grande traffico e tutte le indicazioni che possano far individuare danni da inquinamento.

L'abilità di ottenere *P. lateral* dagli isolamenti effettuati da campioni prelevati in campo dipende principalmente da:

- a) **Stagionalità** – è importante eseguire i prelievi nelle stagioni di mezzo vale a dire a primavera ed in autunno in quanto le condizioni di temperatura ed umidità sono favorevoli all'attività di *P. ramorum*.
- b) **Intervallo di tempo tra il campionamento e la messa a coltura** – Come detto in precedenza, la brevità dell'intervallo di tempo che intercorre tra il campionamento e la messa a coltura è importante al fine di ottenere un risultato positivo. Allo stesso tempo, si deve procedere ad una corretta conservazione dei campioni che ne prevenga il disseccamento e il deterioramento.

1.5 Normativa fitosanitaria

Phytophthora lateral presente in Alert List fino al 2006, è passata nella Lista A1 ed infine, dal 2011, nella Lista A2. Attualmente si può considerare un organismo da quarantena “ufficioso” e non esistono al momento Decreti Ministeriali o Direttive UE su questo patogeno.

2. Protocollo di diagnosi

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto in questa scheda è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ASPROPI', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF). **Questo protocollo diagnostico è finalizzato alla individuazione e diagnosi dell'oomicete *Phytophthora lateralis* coperto da norme fitosanitarie e fornisce le linee guida al fine di operare una corretta diagnosi su materiale vegetale infetto.**

I saggi sono stati effettuati in laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi di qualità e/o da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze.

La metodologia di laboratorio riportata nel protocollo è stata validata sulla base dei parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, accordanza (ripetibilità) e concordanza (riproducibilità).

Per la definizione di tali parametri si è scelto di condurre la metodologia di diagnosi con l'utilizzo dei reagenti e strumentazioni in dotazione a ciascun laboratorio in modo da conoscere la complessiva robustezza del metodo a prescindere da condizioni specifiche legate al laboratorio e/o all'operatore.

La definizione dei parametri di validazione è scaturita dall'effettuazione di un *ring test* nazionale eseguito presso i seguenti laboratori:

- 1- SFR Emilia Romagna, Referente Dott.ssa Carla Montuschi;
- 2- SFR Provincia di Trento – Fondazione Edmund Mach–IASMA, Referente Dott.ssa Valeria Gualandri;
- 3- SFR Marche, Referente Dott.ssa Simona Talevi;
- 4- SFR Toscana, Referente Dott. Domenico Rizzo;
- 5- SFR Puglia, Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura Basile Caramia, Referente Dott. Nicola Trisciuzzi;
- 6- Regione Campania, Referente Dott.ssa Paola Spigno;
- 7- CREA-DC (Roma), Referente Dott. Salvatore Vitale.

La scelta della metodologia diagnostica da validare secondo i parametri ISO 16140:2003 e ISO 17025 è scaturita sulla base di una attenta lettura delle metodiche riportate in appendice 2 e 3 del *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* (2015) 45(3), 397–409 PM 7/123 (1) *Phytophthora lateralis*. In particolare in "Appendix 2" si descrive il metodo di identificazione di *P. lateralis* mediante PCR convenzionale con primers disegnati nella regione "ras-related protein *gene Ypt1*" (Schena *et al.* 2006 e 2008). Questo metodo supera le difficoltà dei metodi diagnostici precedenti in cui, operando nella regione ITS, si andava incontro a fenomeni di "*cross reaction*" ovvero di reazione incrociata *P. lateralis*/*P. ramorum*. Il metodo da noi validato è riportato in

“Appendix 3” e prevede l’uso di una real-time PCR con il protocollo sviluppato da Schenck et al. 2016 e l’impiego di primers e sonda disegnati sulla regione “ras-related protein *gene Ypt1*”. Caratteristiche fondamentali di questo metodo sono la maggior specificità e robustezza rispetto al metodo di PCR convenzionale. Inoltre la real-time PCR prevede minori tempi di lavorazione e non necessità della preparazione di gel di agarosio. Per quanto concerne la **specificità**, questo metodo si definisce ad alta specificità in quanto testato rispetto a 17 differenti specie di oomiceti strettamente vicini a *P. lateralis* (Schenk *et al.* 2016). Questo dato risulta confermato anche nei nostri laboratori dove la specificità è stata testata nei confronti delle specie di *Phytophthora*, affini a *P. lateralis*, presenti nella collezione CREA-PAV.

Per la validazione del metodo il CREA-PAV ha utilizzato i seguenti isolati

Specie	Num ceppo CBS	Ospite	Origine geografica
<i>P.lateralis</i>	CBS 168.42	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	USA, Oregon (2000)
<i>P. lateralis</i>	CBS 102.608	Port-Orford-cedar tree	USA, California (2000)
<i>P. lateralis</i>	CBS 117.106	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i> , “ <i>Columnaris</i> ”	The Netherlands; Grollo (2004)

2.2 Estrazione del DNA

Utilizzando il DNA dei tre diversi ceppi non è stata rilevata alcuna variazione in **sensibilità** della metodica. La sensibilità e la riproducibilità della metodica è stata saggiata all’interno del CREA-PAV preventivamente alla effettuazione del ring-test utilizzando diversi kit di estrazione per il DNA quali: Wizard (Promega), Qiagen DNeasy Plant Mini Kit e Macherey-Nagel “Nucleospin Plant II”; I risultati ottenuti hanno evidenziato che la corretta diagnosi non veniva alterata dal tipo di metodo/kit di estrazione. Per la preparazione dei campioni “blind” di DNA da spedire per il ring-test il CREA_PAV ha utilizzato il kit di estrazione Wizard (Promega).

Nel caso si disponesse di altro kit commerciale è necessario seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

Preparazione dei campioni per l’estrazione:

Macerare in azoto liquido il tessuto vegetale e pestellare fino ad ottenere una polvere piuttosto fine ed uniforme. E’ consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. In questa fase è molto importante operare con la **massima accortezza** utilizzando mortai e pestelli sterili e preventivamente lavati con una soluzione diluita di ipoclorito di sodio. Anche il contenitore di azoto liquido deve essere ben lavato dopo ogni utilizzo.

2.3 Metodo diagnostico: Real-time PCR (Schenk *et al.*, 2016)

La real time PCR è un metodo particolarmente sensibile e deve essere eseguito da personale debitamente addestrato con esperienza. Con questa tecnica si devono osservare condizioni speciali di sicurezza per evitare contaminazioni e perciò false reazioni:

1. Indossare i guanti durante il test (se possibile senza talco).
2. Usare nuove puntali per ogni aggiunta (con filtro integrato).
3. Si consiglia l'utilizzo di micro pipette dedicate per la miscela dei prodotti separare dalle micro pipette per i campioni di DNA.

Per la strumentazione, materiali e reagenti necessari si veda l'allegato I

2.3.1 Primers e Sonde utilizzate

Il protocollo di amplificazione di real-time PCR è stato impostato sul lavoro di Schenck *et al.*, 2016 già precedentemente citato e la sequenza target di 170 paia di basi (bp) specifica per *P. lateralis* è localizzata sul gene *Ypt1* (ras-related protein).

Primer e sonde utilizzati per la Real Time PCR

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
qPlat-F	Primer forward specifico per <i>P. lateralis</i>	5'- ACGGGATCGTGTCTAGCAG -3'
qPlat-R	Primer reverse specifico per <i>P. lateralis</i>	5'- TAGCTGCACGTCGTTGCTAC-3'
qPlat-P	Sonda dual labeled specifica per <i>P. lateralis</i>	5'FAM-TTTTCCCGCTTTCCTTGGGG-BHQ1-3'

I primers e sonde possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. Per la sonda è importante specificare il fluoroforo legato al 5' (FAM nel nostro caso). E' conveniente diluire i primers e la sonda ad una concentrazione di 100 µM tampone TE (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM in H₂O distillata microfiltrata sterile per biologia molecolare e conservarle a -20 °C. Per la sonda sia la soluzione madre che la "working solution" (soluzione di lavoro) devono essere mantenute al buio. Nella validazione del suddetto protocollo il laboratorio CREA-PAV ha provveduto ad inviare primers e sonda a tutti i laboratori partecipanti al ring-test alla concentrazione di lavoro (10 µM).

2.3.2 Reazione di amplificazione Real-time PCR

La reazione di amplificazione può essere allestita anche a temperatura ambiente, dal momento che la DNA polimerasi utilizzata è un enzima hot-start. Tutti i reagenti, dopo essere stati scongelati, devono essere miscelati per pochi secondi con il vortex. La soluzione madre (master mix) può essere preparata in una singola provetta da 1,5 mL o 2 mL contenente tutti i reagenti illustrati nella Tabella 2 (A o B in relazione al kit utilizzato). Dopo aver calcolato i quantitativi richiesti in funzione del numero totale di campioni da saggiare, si consiglia di aggiungere i volumi richiesti dei vari componenti nell'ordine indicato in tabella 1A o 1B miscelandoli tra loro con vortex e successivamente centrifugando per pochi secondi la master mix per raccogliere le gocce sul fondo. Il DNA stampo, invece, deve essere introdotto direttamente nelle provette di reazione PCR. Per ogni campione si eseguono 3 repliche tecniche.

TABELLA 1A. - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione in Real Time PCR con qPCR™ Core Kit, (Eurogentec)

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (μL)	Volume per n* reazioni (μL)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile	/	11.6	11.6 x n	/
2. **Tampone di amplificazione	10X	2.0	2.0 x n	1X
3. **MgCl ₂	50 mM	2.0	2.0 x n	5 mM
4. **dNTPs	5 mM	0,8	0,8 x n	0,2 mM
5. Primer forward	10 μM	0,6	0,6 x n	0,30 μM
6. Primer reverse	10 μM	0,6	0,6 x n	0,30 μM
7. Sonda	10 μM	0,2	0,2 x n	0,10 μM
8. Hot Gold Start	5 U/μL	0,1	0,1 x n	0.03 U/μL
Subtotale	/	18	18 x n	/
DNA stampo	/	2	/	/

* nel numero n di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare un campione in più (n+1) per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante. **Reagenti forniti con il kit *qPCR core No Rox* (Eurogentec)

Tabella 1B. Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione in Real Time PCR con SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad)

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (μL)	Volume per n* reazioni (μL)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile	/	6.5	6.5 x n	/
2. **Universal Probe Supermix	2 x	10	10 x n	1x
3. Primer forward	10 μM	0,6	0,6 x n	0,30 μM
4. Primer reverse	10 μM	0,6	0,6 x n	0,30 μM
5. Sonda	10 μM	0,2	0,2 x n	0,10 μM
Subtotale	/	18	18 x n	/
DNA stampo	/	2	/	/

* nel numero n di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare un campione in più (n+1) per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante. **Reagenti forniti con il kit SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad)

2.3.3 Ciclo di amplificazione

Una volta pronti, i campioni devono essere inseriti nel termociclatore Real Time e sottoposti al ciclo di amplificazione riportato nello schema di seguito:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione*	95 °C	10'	1
Amplificazione	denaturazione	95 °C	10''
	annealing/estensione	60 °C	45''
			40

* attivazione della HotGoldStar

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per il fluoroforo FAM per il nostro target *P. lateralis*.

2.3.4 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR Real Time devono essere inseriti i seguenti controlli:

Controllo negativo di amplificazione (NTC): reazione di amplificazione in cui il DNA stampo (template) è sostituito con H₂O. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione. Da aggiungere al saggio utilizzando la tipologia di acqua impiegata in laboratorio per le reazioni in oggetto.

Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di PCR su DNA target di *P. lateralis* diluito al limite di rivelazione (LOD).. Serve come valore di riferimento

per la valutazione dei risultati e per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR. Campione fornito dal CREA-PAV nel ring-test.

2.3.5 Valutazione dei risultati

Il campione sarà considerato positivo per la presenza di *P. lateralis* se il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo FAM, è rilevato in corrispondenza di un ciclo soglia (Ct) inferiore al Ct del controllo positivo di amplificazione (PAC). Viceversa, se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un Ct superiore al Ct del controllo positivo di riferimento, il campione si considera negativo per la presenza di *P. lateralis*.

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Metodo di lavoro

In questo lavoro è stato eseguito uno studio comparativo inter-laboratorio (*Performance study* - PT) al fine di valutare l'ideoneità e la robustezza del metodo proposto ed adottando le linee guida per l'organizzazione di confronti inter-laboratorio in studi di diagnostica di fitopatogeni (**EPPO PM 7/122**). I saggi sono stati effettuati in laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze.

Per la validazione del metodo diagnostico per *P. lateralis* hanno collaborato i seguenti laboratori:

1. SFR Emilia Romagna, Referente Dott.ssa Carla Montuschi;
2. SFR Provincia di Trento – Fondazione Edmund Mach-IASMA, Referente Dott.ssa Valeria Gualandri;
3. SFR Marche, Referente Dott.ssa Simona Talevi;
4. SFR Toscana, Referente Dott. Domenico Rizzo;
5. SFR Puglia, Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura Basile Caramia, Referente Dott. Nicola Trisciuzzi;
6. Regione Campania, Referente Dott.ssa Paola Spigno;
7. CREA-DC (Roma), Referente Dott. Salvatore Vitale.

Per la definizione dei parametri di validazione, la metodologia di diagnosi è stata effettuata con reagenti dettagliatamente riportati e strumentazioni in dotazione a ciascun laboratorio in modo da conoscere la complessiva robustezza del metodo a prescindere da condizioni specifiche legate al laboratorio e/o all'operatore.

La scelta della metodologia diagnostica da validare è stata illustrata nel paragrafo 2.1. Tale metodo consigliato anche nel Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2015) 45 (3), 397–409 PM 7/123 (1) *Phytophthora lateralis* (appendix 3), deriva dal lavoro di messa a punto di PCR Real Time descritta da Schenk *et al.* (2016) con primer e sonde disegnati sulla regione del gene *Ypt1*.

Caratteristiche fondamentali di questo metodo sono la maggior specificità e robustezza rispetto ai precedenti metodo di PCR convenzionale dove, nella regione

ITS, si incorreva a fenomeni di reazione incrociata (cross-reaction) con *P. ramorum*. Inoltre la real-time PCR prevede minori tempi di lavorazione e non necessita della preparazione di gel di agarosio. Per quanto concerne la **specificità**, questo metodo si definisce ad alta specificità in quanto testato rispetto a 16 differenti specie di oomiceti strettamente vicini a *P. lateralis* (Schenk *et al.* 2016).

Questo dato risulta confermato anche nei nostri laboratori dove la specificità è stata testata nei confronti delle specie di *Phytophthora*, affini a *P. lateralis*, presenti nella collezione CREA-PAV.

3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione

Gli esperimenti di validazione per la *P. lateralis* sono stati eseguiti su 3 campioni target e 7 campioni non target descritti in tabella 2.

TABELLA 2 - Isolati utilizzati per la validazione del Metodo diagnostico

Specie	Num. CBS	Isolato CREA-PAV	Ospite	Origine geografica
<i>P.lateralis</i>	168.42	AB190	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	USA, Oregon (2000)
<i>P.lateralis</i>	102.608	AB191	Port-Orford-cedar tree	USA, California (2000)
<i>P.lateralis</i>	117.106	AB192	<i>C.lawsoniana</i> , "Columnaris"	Olanda (2004)
<i>P.ramorum</i>	FERA (ex CSL)	AB2	<i>Viburnum tinus</i>	
<i>P. ramorum</i>		AB188	<i>Rhododendron</i> sp.	Italia
<i>P.kernoviae</i>	CBS 122049	AB272	<i>Rhododendron</i> sp.	Regno Unito
<i>P.kernoviae</i>	CBS 122208	AB273	<i>Rhododendron ponticum</i>	Regno Unito
<i>P.cinnamomi</i>		AB97	<i>Juglans regia</i>	Italia
<i>P.hedraiaandra</i>		AB68	<i>Viburnum</i> sp.	Italia
<i>P.hydopathica</i>		AB234	<i>Viburnum</i> sp.	Italia

Il numero di campioni da analizzare è stato scelto in accordo con le linee guida dell'EPPO PM 7/98(2)) e di ISO16140. In particolare, per ogni laboratorio partecipante sono stati inviati 31 campioni corrispondenti a:

1. 8 repliche del campione corrispondente a 10 volte il limite di detection;
2. 8 repliche del campione poco sopra il limite di detection;
3. 8 repliche del campione livello 0 (controllo negativo);
4. 6 repliche del campione controllo specificità;

1 campione Controllo positivo al limite di detection (LOD = PAC).

Un Controllo Negativo di amplificazione (NTC) è stato aggiunto da ogni laboratorio al fine di monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.

I campioni positivi sono stati preparati miscelando DNA target (alla opportuna concentrazione) con DNA genomico estratto da foglie di *Chamaecyparis lawsoniana* (alla concentrazione di 25 ng/μL). I campioni di controllo negativo consistevano in DNA genomico solo dell'ospite. I campioni di controllo per la specificità consistevano in miscele di DNA genomico di specie di *Phytophthora* affini a *P. lateralis* (*P. hedraiaandra*, *P. hydropathica*, *P. cinnamomi*, *P. kernoviae* e *P. ramorum*) Prima dell'invio del materiale ai rispettivi laboratori i campioni sono stati controllati effettuando un ring test interno CREA-PAV.

3.3 Misura del limite di rilevabilità (LOD)

Il limite di rilevabilità (Limit of detection LOD) è la più bassa concentrazione di DNA del patogeno in un campione che può essere rivelata nelle condizioni sperimentali del metodo, ma non necessariamente quantificata. Il suo segnale è vicino ma differente da quello del controllo negativo e deve essere almeno tre volte maggiore del rumore di fondo. Schenk *et al.* (2016) riportano per *P. lateralis* una LOD tra 100fg e 1pg nell'analisi del solo DNA del patogeno, tuttavia nei campioni reali il DNA genomico della pianta può interferire con l'attività della polimerasi e modificare questo parametro. Poiché è necessario per la preparazione dei campioni questo è stato calcolato nelle nostre condizioni.

La sensibilità analitica è stata verificata approntando una curva standard contenente quantità decrescenti di DNA genomico di *P.lateralis* (isolato AB190 e stesso risultato per gli isolati AB191 e AB192): 1 ng, 100 pg, 10pg, 1 pg, 100 fg tutti in presenza di DNA di *Chamaecyparis lawsoniana* (25 ng/reazione). La figura 1 mostra che il metodo utilizzato rileva il DNA del patogeno fino a 1 pg in maniera costante e riproducibile, la LOD è stata quindi fissata ad 1 pg.

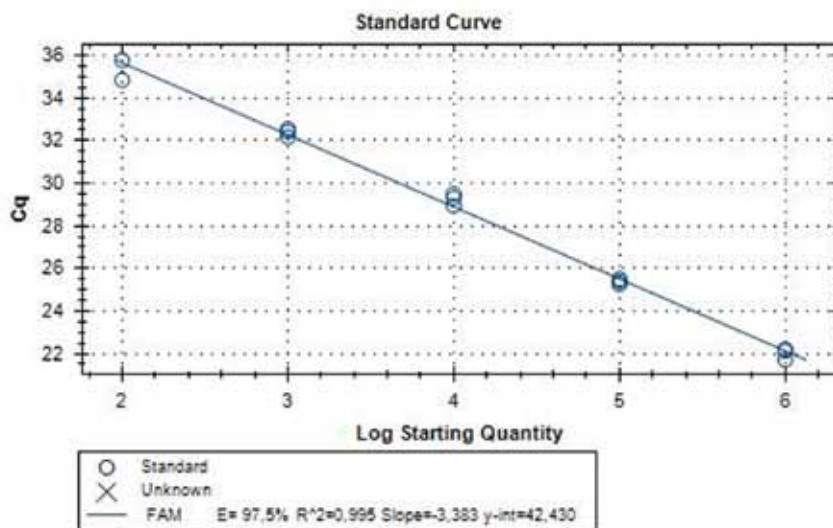


Figura 1: Curva standard di DNA genomico di *P. lateralis* determinata in Real Time con il metodo descritto in questa scheda, nelle seguenti quantità: 1 ng (6); 100pg (5), 10 pg (4); 1pg (3) e 100fg (2) in presenza di DNA genomico di *Chamaecyparis lawsoniana* (25 g/μL).

3.4 Validazione

In Tabella 3 sono riassunti gli esiti del ring test effettuato dai 7 laboratori a confronto con il risultato atteso.

TABELLA 3 - Confronto tra risultato atteso ed esito della real time dei 30 campioni anonimi dei 7 laboratori impegnati nel Test Performance Study.

risultato atteso	N campione	LAB 0	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6
		ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO
POS	1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	4	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	6	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	8	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	9	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	Contr +	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	13	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	14	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	15	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	18	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	20	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	21	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	23	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	24	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	Contr -	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	25	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	26	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	27	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	28	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	30	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

In relazione ai dati pervenuti dal Test Performance Study (TPS) sono stati effettuati i calcoli utilizzando le formule di mostrate in tabella 4, secondo le linee guida indicate nel documento ISO 16140:2003 ed ISO/IEC 17025, 2005.

TABELLA 4 - Analisi dei risultati del *Performance test* : N numero totale di dati; L, numero di laboratori.

Criterio di Validazione	Risultato ottenuto <i>P. lateralis</i>
Sensibilità relativa	100 %
Specificità relativa	100 %
Accuratezza relativa	100 %
Accordanza	100 %
Concordanza	100 %

3.5 Conclusioni

I risultati ottenuti dal Test Performance Study con i sette laboratori partecipanti risultano di gran lunga soddisfacenti. Il metodo di diagnosi elaborato da Schenk *et al.* (2016) ha quindi ampiamente superato le problematiche di reazioni incrociate (cross-reaction) nei confronti di *P. ramorum* quando primers e sonde venivano disegnate sulla regione ITS del DNA ribosomale.

L'unico punto critico osservato in questo studio può essere rappresentato dal DNA dell'ospite che, se in concentrazioni superiori a 25 ng/μL, potrebbe inibire e quindi spostare la LOD in maniera molto significativa. E' consigliabile quindi, in presenza di campioni vegetali, diluire molto l'estratto di DNA al fine di eliminare componenti vegetali inibitori della reazione di PCR.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- Brasier CM, Vettraino AM, Chang TT & Vannini A (2010) *Phytophthora lateralis* discovered in an old growth *Chamaecyparis* forest in Taiwan. *Plant Pathology* **59**, 595–603.
- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2014) 44 (3), 390–399 PM 7/122 (1) Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories.
- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2015) 45(3), 397–409 PM 7/123 (1) *Phytophthora lateralis*.
- DeNitto GA & Kliejunas JT (1991) First report of *Phytophthora lateralis* on Pacific Yew. *Plant Disease* **75**(9), 968.
- EPPO (2011) First report of *Phytophthora lateralis* in Ireland. EPPO Reporting Service 2011/221.
- Green S, Brasier CM, Schlenzig A, McCracken A, MacAskill GA, Wilson M *et al.* (2012) The destructive invasive pathogen *Phytophthora lateralis* found on *Chamaecyparis lawsoniana* across the UK. *Forest Pathology* **43**(1), 19–28. doi: 10.1111/j.1439-0329.2012.00788.x.
- Hansen EM, Goheen DJ, Jules ES & Ullian B (2000) Managing Port-Orford-Cedar and the introduced pathogen *Phytophthora lateralis*. *Plant Disease* **84**, 4–14.
- Hansen EM, Streito JC & Delatour C (1999) First confirmation of *Phytophthora lateralis* in Europe. *Plant Disease* **83**, 587.
- Ostrowsky WD, Pratt RG & Roth LF (1977) Detection of *Phytophthora lateralis* in soil organic matter and factors that affect its survival. *Phytopathology* **67**, 79–84.
- Robin C, Piau D, Feau N, Douzon G, Schenck N & Hansen EM (2011) Root and aerial infections of *Chamaecyparis lawsoniana* by *Phytophthora lateralis*: a new threat for European countries. *Forest Pathology* **41**, 417–424.
- Sansford CE (2009) Development of U.K./EU/EPPO pest risk analyses for *Phytophthora kernoviae*, *P. ramorum* and *P. lateralis*. In: *Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*. Proceedings of the fourth meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Working Party S07.02.09: *Phytophthoras in forests and natural ecosystems*. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-221 (Ed Goheen EM, Frankel SJ & Albany CA), pp. 139–153. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station.
- Schena L, Duncan JM & Cooke DEL (2008) Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* **57**, 64–75.
- Schena L, Hughes KJD & Cooke DEL (2006) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* **7**, 365–379.

- SCHENCK N, FOURRIER C & IOOS R (2016) A robust and specific realtime PCR tool for the detection of *Phytophthora lateralis* in plant tissues. *European Journal Plant Pathology* DOI 10.1007/s10658-016-0909-7.
- SCHLENZIG A (2014) Comunicazione personale.
- SCHLENZIG A, CAMPBELL R & MULHOLLAND V (2011) *Thuja occidentalis*: a new host for *Phytophthora lateralis*. *New Disease Reports* **24**, 8.
- TUCKER CM & MILBRATH JA (1942) Root rot of *Chamaecyparis* caused by a species of *Phytophthora*. *Mycologia* **34**, 94–101.
- ZOBEL DB, ROTH L & HAWK G (1985) Ecology, pathology and management of Port-Orford-cedar (*Chamaecyparis lawsoniana*). General Technical Report of the Pacific Northwest Forest Range Experiment Station USDA Forest Service No PNW-184, 161 pp.

ALLEGATO I Strumentazione , materiali e reagenti necessari

Strumentazione:

1. Macchina per produzione di ghiaccio granulare.
2. Centrifuga per provette tipo Eppendorf .
3. Vortex.
4. Frigorifero.
5. Congelatore.
6. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000).
7. Termociclatore per Real Time PCR. I seguenti strumenti sono equivalenti ai fini del protocollo descritto: CFX96 (Bio-rad), 7500 Real Time PCR System, (Applied Biosystem), SteponePlus (Applied Biosystem)
8. Agitatore magnetico
9. Autoclave
10. Bagnetto termostato o termoblocco
11. Distillatore
12. Fluorimetro Qubit 1 (Invitrogen).

Materiali:

1. Ghiaccio.
2. acqua milliQ sterile (preferibile) oppure acqua bi-distillata sterile.
3. Guanti.
4. Portaprovette.
5. Provette di tipo Eppendorf sterili da 0,2 ml, 0,5 ml e 1,5 ml.
6. Puntali sterili con filtro.
7. Piastre da 96 pozzetti (con pellicole adesive ottiche) per Real Time PCR

Reagenti per Real Time PCR:

1. consigliato nella pubblicazione: **qPCR Core kit No ROX (Eurogentec);**
2. in alternativa: SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad).

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
PHYTOPHTHORA RAMORUM
PHYTOPHTHORA KERNOVIAE

Haegi A., Vitale S., Belisario A.

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 *Phytophthora ramorum*
 - 1.1.1 Introduzione
 - 1.1.2 Sintomatologia
 - 1.1.3 Morfologia
 - 1.1.4 Epidemiologia
 - 1.1.5 Diagnosi
 - 1.1.6 Normativa fitosanitaria
- 1.2 *Phytophthora kernoviae*
 - 1.2.1 Introduzione
 - 1.2.2 Sintomatologia
 - 1.2.3 Morfologia
 - 1.2.4 Epidemiologia

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Estrazione del DNA
- 2.3 Metodo diagnostico: Real-time PCR (Scheda *et al.*, 2006)
 - 2.3.1 Preparazione del saggio Real time: Primers e Sonde utilizzate
 - 2.3.2 Reazione di amplificazione
 - 2.3.3 Uso dei controlli
 - 2.3.4 Valutazione dei risultati

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Metodo di lavoro
- 3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione
- 3.3 Misura del limite di rilevabilità (LOD)
 - 3.3.1 LOD del metodo *P. ramorum*
 - 3.3.2 Lod del metodo *P. Kernoviae*
- 3.4 Validazione
- 3.5 Conclusioni

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I-Strumentazione e materiali necessari

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

1.1 *Phytophthora ramorum*

Agente causale	<i>Phytophthora ramorum</i> Werres, de Cock and Man in 't Veld
Tassonomia	Oomycetes, Peronosporales, Pythiaceae
Avversità	Marciume radicale e del colletto, deperimento, ovvero "Sudden oak death" (SOD), moria
Categoria Fitosanitaria	EPPO A2 list*

* Elenco di patogeni da quarantena presenti nella regione europea stilato dall'European Plant Protection Organization (EPPO) PM1/002 (25) 2016.

1.1.1 Introduzione

Phytophthora ramorum è responsabile della malattia conosciuta come "Sudden oak death" (SOD) registrata a partire dal 1995 in California e Oregon (USA) su *Lithocarpus densiflorus* e altre specie di querce, tipiche di quell'areale (Rizzo *et al.*, 2002). L'estrema polifagia di questo patogeno come anche la rapidità di diffusione legata alla capacità di attaccare anche gli organi epigei (come foglie e rami) sui quali differenzia sporangi caduchi, facilmente trasportabili da acqua e vento, lo rendono altamente dannoso. A conferma di quanto riportato, SOD ha assunto negli anni successivi alla sua prima segnalazione, proporzioni epidemiche portando a morte decine di migliaia di alberi (in particolare querce) e causando danni su varie altre specie arboree e arbustive.

In Europa *P. ramorum* è stata segnalata, a partire dal 2001 (Werres *et al.*, 2001), principalmente in vivaio, su rododendro, viburno e azalea. La diffusione di questo patogeno potrebbe costituire una grave minaccia per la Comunità, pertanto sono state adottate temporaneamente misure fitosanitarie d'emergenza, al fine di impedirne la diffusione ovvero l'introduzione in paesi che al momento risultano esenti dal patogeno (Decisione della Commissione Europea del 19 settembre 2002 e Decreto Ministeriale 28 novembre 2002).

1.1.2 Sintomatologia

Diversi tipi di sintomatologie sono ascrivibili a questo oomicete in relazione al tipo di ospite, qui di seguito si riportano le tre tipologie annoverate nel documento EPPO Diagnostic PM 7/66, (EPPO, 2006).

1) Morte Improvvisa delle querce o specie arboree dovuta allo sviluppo di cancri letali (Sudden Oak Death -SOD), ovvero presenza di cancri con essudato.

2) Appassimento/avvizzimento dei germogli per infezioni fogliari e/o infezioni del fusto, rami e branche ovvero per marciume del colletto e delle radici (quest'ultimo segnalato in letteratura su Viburno) (*P. ramorum* shoot dieback).

3) Avvizzimento fogliare (*P. ramorum* leaf blight).

Ulteriori descrizioni vengono fornite ad integrazione per la parte di sintomatologia rilevata sulle essenze europee. Nel dettaglio:

Morte Improvvisa: sintomi rilevabili su alberi in particolare su querce, ma anche su faggio, castagno ed ippocastano.

Tronco: la presenza di *P. ramorum* è caratterizzata da un trasudo rosso-scuro o nero in corrispondenza di cancri (bleeding cankers) spesso siti nella parte bassa del tronco. Le lesioni possono risalire sul tronco fino a oltre 2-3 m.

Chioma: le necrosi che interessano l'intera circonferenza del tronco o dei rami spesso inducono una morte improvvisa dell'intera pianta e di porzioni di chioma. Si nota un cambiamento rapido ed uniforme del colore della chioma e le foglie, dopo la morte, se questa è subitanea (apoplessia), rimangono attaccate ai rami.

Appassimento/avvizzimento dei germogli (P. ramorum shoot dieback): Questa tipologia di sintomo è rilevabile su diverse piante ornamentali e/o boschive quali, rododendro, pieris (noto anche come Asebo), lillà, douglasia e viburno.

I sintomi riguardano la chioma, comprendendo foglie e germogli, con lo sviluppo di lesioni che si originano solitamente dall'apice fogliare o dal germoglio progredendo verso la base. Spesso viene interessata la nervatura principale della foglia e le macchie hanno aspetto oleoso con margine sfumato a volte con alone clorotico tipico dei danni da *Phytophthora*. Diverse specie di *Phytophthora*, come pure alcuni patogeni fungini appartenenti ai generi *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Botrytis*, ovvero altre cause, anche di natura abiotica, possono causare sintomi simili a *P. ramorum*.

1.1.3 Morfologia

Le caratteristiche morfologiche di *P. ramorum* sono schematicamente riportate sul documento EPPO Diagnostic PM 7/66, (EPPO, 2006). Considerando la morfologia espressa sul terreno di coltura semiselettivo P5ARP(H) a 20°C con 12 ore di fotoperiodo, le colonie sono piuttosto lente nella crescita (circa 2 mm al giorno). Il micelio è debolmente coralloide senza sfiancamenti ifali. Gli sporangi, prodotti abbondantemente sulla superficie del mezzo agarizzato, si presentano semipapillati, da ellissoidali ad affusolati, frequentemente in piccoli gruppi, caduchi, con o senza un corto peduncolo, di dimensioni 20–32 × 40–80 µm, media 24 × 52 µm, rapporto medio lunghezza/larghezza 2,16. Le clamidospore sono molto comuni nelle colonie più vecchie (prodotte mediamente dopo 7-10 giorni) sono piuttosto grandi (fino a 80 µm di diametro), da ialine a leggermente brune. *P. ramorum* è eterotallica, pertanto i gametangi (strutture sessuali) possono essere prodotti con colture appaiate su agar con pezzi di carota (carrot piece agar – CPA), ovvero su V8, con il complementare mating type utilizzando per l'appaiamento anche con altre specie di *Phytophthora* come *P. cryptogea*.

1.1.4 Epidemiologia

A partire dal 2001, diversi focolai della malattia sono stati accertati, principalmente su rododendro e viburno, in diversi paesi europei come Belgio, Danimarca, Francia, Germania, Irlanda, Norvegia, Olanda, Polonia, Regno Unito, Repubblica Ceca, Slovenia, Svezia e Spagna. Recentemente la malattia è stata rinvenuta anche su altre piante ornamentali, sempre in vivaio quali: *Arbutus*, *Camellia*, *Hamamelis*, *Kalmia*, *Laurus*, *Leucothoe*, *Magnolia*, *Pieris*, *Syringa*, *Taxus* e *Vaccinium*. A partire dal 2003, nel Regno Unito e Olanda, sono stati osservati i primi sintomi della malattia anche su alcune specie arboree europee come quercia (*Q. cerris*, *Quercus falcata*, *Q. ilex*, *Q. robur*, *Q. rubra*), faggio, frassino, castagno e ippocastano. Le piante colpite si trovavano all'interno di aree boschive o di parchi e, in tutti i casi, in vicinanza di piante di rododendro infette.

In Italia, la malattia è stata riscontrata per la prima volta nel 2002 in seguito ad una intercettazione francese di una pianta di rododendro infetta proveniente da un vivaio di Verbania, in Piemonte (Gullino *et al.*, 2003). Nella primavera 2013 è stata rilevata anche su piante di viburno in alcuni vivai toscani (Ginetti *et al.* 2014). Le piante presentavano evidenti attacchi alle foglie, giovani getti e rametti fiorali. Le macchie fogliari così come i cancretti rameali si presentano del tutto simili ai sintomi riportati in letteratura per il rododendro (Figura 1). Alla luce delle conoscenze attuali, è opportuno porre particolare attenzione sulla eventuale presenza e diffusione del patogeno nel nostro Paese andando a delineare un quadro degli ospiti più frequentemente attaccati.



Figura 1 - Lesioni da *Phytophthora ramorum* su viburno

1.1.5 Diagnosi

La diagnosi per eventuale presenza di *P. ramorum* può essere fatta in sito su base sintomatica da Ispettori esperti supportata dall'esito positivo ottenuto con l'uso di un kit di diagnosi in campo a mezzo di "lateral-flow" per *Phytophthora*. E' certo che in caso di positività a *Phytophthora*, congiuntamente con la presenza di sintomi conclamati, è necessario ed obbligatorio procedere ad analisi di laboratorio per una diagnosi certa. Per le metodiche di identificazione sia morfologica sia molecolare si rimanda al protocollo EPPO Diagnostic PM 7/66, (EPPO, 2006). I saggi di laboratorio, possono comprendere sia l'isolamento diretto da porzioni sintomatiche utilizzando come substrato di coltura agar con pezzi di carota (carrot piece agar – CPA) e/o terreno di coltura semiselettivo P5ARP(H) secondo quanto riportato in EPPO Diagnostic PM 7/66, (EPPO, 2006) seguito dalla diagnosi morfologica oppure a mezzo di PCR sia essa nested PCR (Vitale *et al.* 2013) ovvero Real-time PCR, quest'ultimo metodo descritto nel presente lavoro.

1.1.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva CE: n.2002/757/CE della Commissione Europea del 19 settembre 2002, relativa a misure fitosanitarie provvisorie di emergenza volte ad impedire l'introduzione e la propagazione nella Comunità di *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp. nov.
- Decreto 28 novembre 2002 – (recepimento nazionale della direttiva 2002/757/CE)- Misure fitosanitarie provvisorie di emergenza volte ad impedire l'introduzione e la propagazione nella Comunità di *Phytophthora ramorum* Werres, De Coek & Man in 't Veld sp. nov.
- Direttiva CE: n.2004/426/CE della Commissione Europea del 29 aprile 2004, che modifica la direttiva 2002/757/CE relativa a misure fitosanitarie provvisorie di emergenza volte ad impedire l'introduzione e la propagazione nella Comunità di *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp.nov.
- Direttiva CE: n.2007/201/CE della Commissione Europea del 27 marzo 2007 recante modifica della direttiva 2002/757/CE relativa a misure fitosanitarie provvisorie di emergenza volte ad impedire l'introduzione e la propagazione nella Comunità di *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld sp. nov.

1.2 Phytophthora kernoviae

Agente causale	<i>Phytophthora kernoviae</i> Brasier, Beales & S. A.
Kirk, sp. nov	
Tassonomia	Oomycetes, Peronosporales, Pythiaceae
Avversità	Avvizzimento fogliare, moria e cancri su diverse piante arbustive o arboree in particolare faggio europeo
Categoria Fitosanitaria	EPPO A2 List

1.2.1 Introduzione

Phytophthora kernoviae è un fitopatogeno che attacca principalmente il faggio europeo (*Fagus sylvatica*) e *Rhododendron ponticum* (Brasier et al., 2005). E' stato individuato per la prima volta nel 2003 a seguito di un monitoraggio per la presenza di *P. ramorum* in Gran Bretagna. Il nome della specie deriva dal luogo dove venne rinvenuta per la prima volta quale la Cornovaglia il cui antico nome è "Kernow". Venne isolata in corrispondenza di importanti lesioni sul fusto e le foglie di *R. ponticum*. Successivamente è stata rinvenuta su numerose altre specie ospiti. Analisi molecolari hanno rivelato infezioni di *P. kernoviae* in Nuova Zelanda su Pino radiata già nel 1950 (FERA, 2010) .

1.2.2 Sintomatologia

I sintomi causati da *P. kernoviae* possono essere molto diversi, anche a seconda della natura dell'ospite. Sugli ospiti arbustivi quali *Rhododendron* spp. il patogeno causa avvizzimento fogliare, con lesioni necrotiche che si possono estendere fino al picciolo, arrivando a causare anche filloptosi (Figura 2). Le lesioni necrotiche si possono estendere lungo il fusto od anche essere limitate solo a questo (vedi sintomatologia su *Hedera helix*) Si osservano anche moria dei germogli e cancri.



Se l'ospite è arboreo i sintomi sono spesso rappresentati da lesioni sul tronco con fuoriuscita di linfa, queste lesioni vanno dal marrone scuro al blu-nero, mentre nella corteccia più interna le lesioni sono arancioni-rosa (Figura 3). In alcuni casi (es. *Fagus*

Figura 2 - Moria dei rametti e avvizzimento fogliare in *Rhododendron ponticum*. Foto da [https:// www.forestry.gov.uk/pkernoviae](https://www.forestry.gov.uk/pkernoviae)



Figura 3 - Sintomi su *Fagus sylvatica*. Foto da [https:// www.forestry.gov.uk/pkernoviae](https://www.forestry.gov.uk/pkernoviae)

sylvatica, *Quercus robur*) questi sono gli unici sintomi, in altri casi (es. *Liriodendron tulipifera*) i sintomi, dal tronco si possono estendere alle foglie e ai germogli. Possono essere attaccate altre specie arboree, anche tipiche dell'areale mediterraneo come *Castanea sativa*, *Quercus ilex*, *Magnolia* spp. sulle quali più comunemente si evidenziano sintomi fogliari e/o sui germogli.

1.2.3 Morfologia

Le caratteristiche morfologiche di questo patogeno sono presenti nel lavoro sulla descrizione della specie (Brasier et al. 2005) e riportate schematicamente nel documento EPPO Diagnostic PM 7/112, (EPPO, 2013). Colonie di *P. kernoviae* crescono relativamente velocemente in terreno selettivo P5RP(H) o non selettivo Agar Carota (CA), in quest'ultimo assume una morfologia di crescita a rosetta con pronunciati anelli concentrici. Il micelio è leggermente coralloide in terreno selettivo con ife che crescono all'interno dell'agar e poca crescita superficiale mentre in terreno non selettivo si osserva un micelio aereo sparso. Gli sporangi, prodotti abbondantemente sulla superficie dell'agar, sono papillati, regolari, ovoidi o limoniformi a volte marcatamente asimmetrici o a forma di topo. Le dimensioni sono in media $38,5-45,5 \times 22,5-27 \mu\text{m}$, più comunemente $34-52 \times 19-31 \mu\text{m}$; media del rapporto lunghezza/larghezza 1,5. Gli sporangi sono caduchi con una lunghezza del peduncolo da 8,6 a 14,1 μm più comunemente da 5 a 19 μm . Molti sporangi presentano un cospicuo vacuolo. Non sono state osservate clamidospore. *P. kernoviae* è una specie omotallica, i gametangi vengono prodotti dopo 10 giorni su CA o CPA. Gli oogoni hanno dimensioni variabili da 21 a 28 μm in diametro, in media da 23,5 a 25,5 μm . Anteridio anfigino. Le oospore sono plerotiche, con dimensioni di 19-25 μm in diametro, più comunemente da 21,1 a 22-5 μm , lo spessore della parete va da 3,5 a 5 μm .

1.2.4 Epidemiologia

Focolai di *P. kernoviae* sono stati identificati nel 2006 in Nuova Zelanda, dove probabilmente il patogeno esisteva già negli anni 1950. In Europa *P. kernoviae* è stata individuata in Irlanda e in diversi siti del Regno Unito, in particolare in Inghilterra, Galles e Scozia. I Rododendri risultano essere le piante più colpite, ma il patogeno risulta essere altamente polifago, in grado di colpire diverse specie appartenenti alle famiglie Aquifoliaceae, Araliaceae, Ericaceae, Fagaceae, Magnoliaceae, Podocarpaceae, Proteaceae, Rosaceae and Winteraceae. Come *P. ramorum*, *P. kernoviae* rappresenta quindi un rischio sia per le piante forestali che per le piante da vivaio/ornamentali.

2 PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto in questa scheda è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ASPROPI', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF). **Questo protocollo diagnostico è finalizzato alla individuazione e diagnosi degli oomiceti *Phytophthora ramorum* e *P. kernoviae* entrambi soggetti a norme fitosanitarie, esso fornisce le linee guida al fine di operare una corretta diagnosi su materiale vegetale infetto.**

Il metodo è stato descritto da Schena *et al.* (2006), e si basa sulla Real Time PCR. Esso utilizza primer/sonde disegnati nella regione del "ras-related protein gene *Ypt1*". Questo metodo è stato scelto in quanto le regioni non codificanti del gene *Ypt1* mostrano una sufficiente variabilità per lo sviluppo di sonde e primer in grado di ben discriminare le diverse specie del genere *Phytophthora* ed hanno inoltre una maggiore affidabilità rispetto alla regione ITS (internal transcribed spacer) dove *P. ramorum* risulta molto simile a *P. lateralis* con conseguenti fenomeni di falsi positivi.

Nell'articolo originale di Schena *et al.* (2006) viene descritto un singolo metodo che permette di diagnosticare contemporaneamente *P. ramorum* e *P. kernoviae* con un approccio in multiplex con altre specie di *Phytophthora*. Nel presente lavoro il metodo viene valutato e validato separando la diagnosi di *P. ramorum* da quella di *P. kernoviae* per una maggiore plasticità d'uso. Ciò non toglie che in base alla necessità si possa usare il metodo diagnostico per l'analisi contemporanea di entrambi i patogeni, così come descritto originariamente.

I saggi per la validazione del metodo sono stati effettuati presso laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi di organismi da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze. Per la definizione dei parametri di validazione, le diverse metodologie di diagnosi sono state validate con reagenti e strumentazioni, quando possibile, in dotazione a ciascun laboratorio in modo da conoscere la complessiva robustezza del metodo a prescindere da condizioni specifiche legate al laboratorio e/o all'operatore.

Per i metodi di campionamento rimandiamo a quanto già descritto in Vitale *et al.* (2013), ricordando qui solo che, una volta prelevati i campioni vegetali questi debbono pervenire al laboratorio prima che avvengano fenomeni di deterioramento altamente pregiudizievoli per il buon esito di una corretta diagnosi.

2.2 Estrazione del DNA

Utilizzando il DNA dei tre diversi ceppi per *P. ramorum* e due ceppi per *P. kernoviae* non è stata rilevata nessuna variazione in **sensibilità** della metodica. Preventivamente alla effettuazione del ring-test che ha visto coinvolti diversi laboratori diagnostici, la sensibilità e la riproducibilità della metodica è stata saggiata all'interno del CREA-PAV, con diversi operatori, utilizzando diversi kit di estrazione

per il DNA quali: Wizard (Promega), Qiagen DNeasy Plant Mini Kit e Macherey-Nagel “Nucleospin Plant II”. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la corretta diagnosi non veniva alterata dal tipo di metodo/kit di estrazione. Per la preparazione dei campioni “blind” di DNA da spedire per il ring-test il CREA-PAV ha utilizzato il kit di estrazione Wizard (Promega) preceduto da macerazione del tessuto vegetale in azoto liquido.

Nel caso si disponesse di altro kit commerciale è necessario seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

2.3 Metodo diagnostico: Real-time PCR (Schena *et al.*, 2006)

La real time PCR è un metodo particolarmente sensibile e deve essere eseguito da personale debitamente addestrato e con esperienza. Con questa tecnica si devono osservare condizioni speciali di sicurezza per evitare contaminazioni e perciò false reazioni/risultati:

1. Indossare i guanti durante il test (se possibile senza talco).
2. Usare nuove puntali per ogni aggiunta/pipettaggio (con filtro integrato).
3. Si consiglia l'utilizzo di micro pipette dedicate per la miscela dei prodotti separate dalle micro pipette per i campioni di DNA.

Gli strumenti, i materiali e i reagenti necessari sono riportati in Allegato 1.

2.3.1 Preparazione del saggio Real Time: Primers e Sonde utilizzate

Il protocollo di amplificazione di real-time PCR è stato impostato seguendo quanto pubblicato in Schena *et al.*, 2006 come già precedentemente citato.

Per la diagnosi di *P.ramorum* vengono utilizzati i primers e la sonda riportati nella tabella 1, i quali amplificano una sequenza target di 87 paia di basi (bp) localizzata sul gene *Ypt1* (ras-related protein) specifica per *P. ramorum*.

TABELLA 1 - Primer e sonde utilizzati per la Real Time PCR di *P. ramorum*

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
Yram4F	Primer forward specifico per <i>P. ramorum</i>	5'-TTTGTCA GTGACCTCTCTCTCTC -3'
Yram3R	Primer reverse specifico per <i>P. ramorum</i>	5'- GCATAAGTATAAGTCAGCAAGCCTGT-3'
YramP	Sonda dual labeled specifica per <i>P. ramorum</i>	5'FAM-AGAACACGATCCCCCTCGTCAGCAGTC-BHQ1-3'

Per la diagnosi di *P. kernoviae* vengono utilizzati i primers e la sonda riportati nella tabella 2, i quali amplificano una sequenza target di 78 paia di basi (bp) localizzata sul gene *Ypt1* (ras-related protein) specifica per *P.kernoviae*.

TABELLA 2 - Primer e sonde utilizzati per la Real Time PCR di *P. kernoviae*

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
Yptc3F	Primer forward specifico per <i>P. kernoviae</i>	5'-GCTCCAAATTGTACGTCTCCG-3'
Yptc4R	Primer reverse specifico per <i>P. kernoviae</i>	5'-AACCAATTAGTCACGTGCTGATATAAA-3'
YptcP	Sonda dual labeled specifico per <i>P. kernoviae</i>	5'Yakima Yellow -ATCATAGCCCTTCCCAGAAGCTGTCACA- BHQ1. 3'

I primers e sonde possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. Per la sonda è importante specificare il fluoroforo legato al 5' ovvero FAM o Yakima Yellow. E' conveniente diluire i primers e la sonda ad una concentrazione di 100 µM con tampone TE (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA) e conservare le soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM in H₂O distillata microfiltrata sterile per biologia molecolare e conservarle a -20 °C in modo da evitare contaminazioni e scongelamenti frequenti della soluzione madre. Solo per la sonda sia la soluzione madre che la "working solution" (soluzione di lavoro) devono essere mantenute al buio. Nella validazione del suddetto protocollo il laboratorio CREA-PAV ha provveduto ad inviare primers e sonda a tutti i laboratori partecipanti il ring-test alla concentrazione di lavoro (10 µM).

Il protocollo di amplificazione di real time PCR non ha subito variazioni rispetto a quanto descritto da Schena *et al.*, 2006. Le reazioni di PCR sono condotte utilizzando **qPCR™ Core Kit, (Eurogentec)**, consigliato nella pubblicazione; in alternativa può essere utilizzata la **SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad)** che è stata testata nelle condizioni sotto descritte ed è risultata essere paragonabile all'Eurogentec. Altre polimerasi/mastermix sono state saggiate ma non hanno dato risultati soddisfacenti

2.3.2 Reazione di amplificazione

La reazione di amplificazione può essere allestita a temperatura ambiente, dal momento che la DNA polimerasi utilizzata è un enzima *hot-start*. Tutti i reagenti, dopo essere stati scongelati, devono essere miscelati per pochi secondi con il vortex. La soluzione madre (master mix) può essere preparata in una singola provetta da 1,5 mL o 2 mL contenente tutti i reagenti illustrati nella Tabella 3 (A o B in relazione al kit utilizzato). Dopo aver calcolato i quantitativi richiesti in funzione del numero

totale di campioni da saggiare, si consiglia di aggiungere i diversi prodotti nei volumi richiesti nell'ordine indicato in tabella 3A o 3B miscelandoli tra loro con vortex e successivamente centrifugando per pochi secondi la *master mix* per raccogliere le gocce sul fondo. Il DNA stampo (template), invece, deve essere introdotto direttamente nelle provette di reazione PCR. Per ogni campione si eseguono 3 repliche tecniche.

TABELLA 3A - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione in Real Time PCR con qPCR™ Core Kit, (Eurogentec)

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (μL)	Volume per n* reazioni (μL)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile	/	9,1	9,1 x n	/
2. **Tampone di amplificazione	10X	1,5	1,5 x n	1X
3. **MgCl ₂	50 mM	1,5	1,5 x n	5 mM
4. **dNTPs	5 mM	0,6	0,6 x n	0,2 mM
5. Primer Forward	10 μM	0,5	0,5 x n	0,33 μM
6. Primer Reverse	10 μM	0,5	0,5 x n	0,33 μM
7. Sonda	10 μM	0,2	0,2 x n	0,13 μM
8. Hot Gold Start	5 U/μL	0,1	0,1 x n	0.03 U/μL
Subtotale	/	14	14 x n	/
DNA stampo (template)	/	1	/	/

* nel numero (n) di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare un campione in più (n+1) per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante. **Reagenti forniti con il kit *qPCR core No Rox* (Eurogentec)

TABELLA 3B - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione in Real Time PCR con SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad).

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (μL)	Volume per n* reazioni (μL)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile	/	5,3	5,3 x n	/
2. Universal Probe Supermix	2 x	7,5	7,5 x n	1x
3. Primer Forward	10 μM	0,5	0,5 x n	0,33 μM
4. Primer Reverse	10 μM	0,5	0,5 x n	0,33 μM
5. Sonda	10 μM	0,2	0,2 x n	0,13 μM
Subtotale	/	14	14 x n	/
DNA stampo (template)	/	1	/	/

* nel numero (n) di reazioni PCR da eseguire è consigliabile considerare un campione in più (n+1) per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante. **Reagenti forniti con il kit SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad).

Una volta pronti, i campioni devono essere inseriti nel termociclatore Real Time e sottoposti al ciclo di amplificazione riportato nello schema di seguito:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	95 °C	10"	1
denaturazione	95 °C	20"	
Amplificazione	62,5 °C	20"	40
annealing/estensione			

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per il fluoroforo FAM per il nostro target *P. ramorum* o *P. kernoviae*.

2.3.3 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR *Real Time* devono essere inseriti i seguenti controlli:

Controllo negativo di amplificazione (NTC): reazione di amplificazione in cui il DNA stampo (template) è sostituito con H₂O. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione. Da aggiungere al saggio utilizzando la tipologia di acqua impiegata in laboratorio per le reazioni in oggetto.

Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di PCR su DNA target di *P.*

ramorum o *P.kernoviae* diluito al limite di rivelazione (LOD). Serve come valore di riferimento per la valutazione dei risultati e per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR. Campione fornito dal CREA-PAV nel ring-test.

2.3.4 Valutazione dei risultati

Il campione sarà considerato positivo per la presenza di *P. ramorum* o *P. kernoviae* se il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo, è rilevato in corrispondenza di un ciclo soglia (Ct) inferiore al Ct del controllo positivo di amplificazione (PAC). Viceversa, se non si rileva segnale di amplificazione o il segnale è rilevato ad un Ct superiore al Ct del controllo positivo di riferimento, il campione si considera negativo per la presenza di *P. ramorum* o *P. kernoviae*.

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Metodo di lavoro

In questo lavoro è stato eseguito uno studio comparativo inter-laboratorio (*Performance study* - PT) per valutare l'idoneità e la robustezza del metodo proposto sulla rete nazionale di laboratori dei Servizi Fitosanitari regionali ed enti pubblici di Ricerca, seguendo le linee guida dell'EPPO 7/122 (EPPO, 2014). I saggi sono stati effettuati in laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati e validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze. Il processo di validazione per entrambi i metodi è stato condotto come descritto nel documento EPPO PM7/98 (2) (EPPO 2014).

I **parametri di validazione** considerati e definiti sono stati i seguenti: **sensibilità relativa, specificità relativa, accuratezza relativa, accordanza e concordanza**. Per la sensibilità e la specificità analitica si rimanda sostanzialmente all'articolo originale di Schena *et al.* (2006). Per quanto riguarda la sensibilità analitica, cioè il limite di rilevabilità, questa è stata riportata di 100 fg per entrambi i patogeni (Schena *et al.* 2006). In questa scheda, per avvicinarsi di più alle condizioni di un campione reale, è stata considerata la sensibilità analitica in presenza del DNA genomico della pianta ospite, per ciascuno dei due patogeni abbiamo quindi misurato il limite di rilevabilità (LOD) del metodo nelle nostre condizioni. Tali validazioni sono state eseguite presso i laboratori del Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (CREA-PAV) e in collaborazione con diversi laboratori di Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) ed enti pubblici di ricerca che hanno partecipato al *Ring Test* nazionale oggetto del presente lavoro.

Per la validazione del metodo diagnostico per *P. ramorum* hanno collaborato i seguenti laboratori:

- 1- SFR Emilia Romagna, Referente Dott.ssa Carla Montuschi;
- 2- SFR Provincia di Trento – Fondazione Edmund Mach–IASMA, Referente Dott.ssa Valeria Gualandri;
- 3- SFR Marche, Referente Dott.ssa Simona Talevi;
- 4- SFR Toscana, Referente Dott. Domenico Rizzo;
- 5- SFR Puglia, Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura Basile Caramia, Referente Dott. Nicola Trisciuzzi;
- 6- SFR Piemonte, Referente Dott.ssa Giovanna Mason;
- 7- LAIMBURG, Referente Dott. Andreas Gallmetzer;
- 8- IAMB, Referente Dott. Thaer Yaseen;
- 9- CREA-PAV (Roma), Referente Dott.ssa Alessandra Belisario.

Per la validazione del metodo diagnostico per *P. kernoviae* hanno collaborato i seguenti laboratori:

1. SFR Emilia Romagna, Referente Dott.ssa Silvia Rimondi;
2. SFR Provincia di Trento – Fondazione Edmund Mach-IASMA, Referente Dott. Christian Cainelli;
3. SFR Marche, Referente Dott.ssa Simona Talevi;
4. SFR Toscana, Referente Dott. Domenico Rizzo;
5. SFR Puglia, Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura Basile Caramia, Referente Dott. Nicola Trisciuzzi;
6. SFR Campania, Referente Dott.ssa Paola Spigno;
7. CREA-PAV (Roma), Referente Dott.ssa Anita Haegi.

Per la definizione dei parametri di validazione, le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti dettagliatamente riportati e strumentazioni in dotazione a ciascun laboratorio in modo da conoscere la complessiva robustezza del metodo a prescindere da condizioni specifiche legate al laboratorio e/o all'operatore.

La scelta della metodologia diagnostica da validare è stata illustrata nel paragrafo 2.1. Tale metodo viene consigliato anche in EPPO Diagnostic PM 7/112, 2013 su *P. kernoviae*, dove in appendice 5, viene anche riportata la Real Time descritta da Hughes *et al* 2011 con primer e sonde disegnati sulla regione ITS. In EPPO Diagnostic PM 7/66, 2006 per *P. ramorum* invece vengono riportati solo metodi molecolari basati sulla regione ITS, probabilmente perché il protocollo non è stato aggiornato con il più recente lavoro di Schena *et al.* (2006).

Caratteristiche fondamentali della real-time PCR sono la maggior specificità e robustezza rispetto al metodo di PCR convenzionale. Inoltre la real-time PCR prevede minori tempi di lavorazione e non ha bisogno della preparazione di gel di agarosio necessario per rilevare gli amplificati ottenuti con PCR. Per quanto concerne la specificità, questo metodo si definisce ad alta specificità in quanto è stato saggiato su 35 specie di *Phytophthora* strettamente vicini a *P. ramorum* e *P. kernoviae* e 9 specie di *Pythium*. (Schena *et al.* 2006).

La specificità risulta confermata anche nei nostri laboratori dove la specificità è stata testata nei confronti di alcune specie di *Phytophthora*, (vedi Tabella 4), presenti nella collezione CREA-PAV.

3.2 Campioni target e non-target utilizzati per la validazione

Gli esperimenti di validazione per la *P. ramorum* sono stati eseguiti su 3 campioni target e tre campioni non target mentre gli esperimenti di validazione per la *P. kernoviae* sono stati eseguiti su 2 campioni target e 3 campioni non target descritti in tabella 4.

TABELLA 4 - Isolati utilizzati per la validazione dei Metodi diagnostici

Specie	N. ceppo Collezioni	N. ceppo CREA-PAV	Ospite	Origine geografica
<i>P. ramorum</i>	FERA (ex CSL)	AB2	<i>Viburnum tinus</i>	Regno Unito
<i>P. ramorum</i>		AB229	<i>Viburnum sp.</i>	Italia
<i>P. ramorum</i>		AB188	<i>Rhododendron</i>	Italia
<i>P. kernoviae</i>	CBS 122049	AB272	<i>Rhododendron</i>	Regno Unito
<i>P. kernoviae</i>	CBS 122208	AB273	<i>Rhododendron ponticum</i>	Regno Unito
<i>P. lateralis</i>	CBS 117.106	AB192	<i>Chamaecyparis lawsoniana,</i>	Olanda
<i>P. cinnamomi</i>		AB97	<i>Iuglans regia</i>	Italia
<i>P. hedraiaandra</i>		AB68	<i>Viburnum sp</i>	Italia
<i>P. hydropathica</i>		AB234	<i>Viburnum sp.</i>	Italia

Il numero di campioni da analizzare è stato scelto in accordo con le linee guida EPPO PM 7/98(2) e ISO16140. In particolare, in ciascuno esperimento del ring-test condotto sia per *P. ramorum* e sia per *P. kernoviae*, per ogni laboratorio partecipante, sono stati inviati 30 campioni corrispondenti a:

8 repliche del campione corrispondente a 10 volte il limite di rilevabilità (LOD);

8 repliche del campione poco sopra il limite di rilevabilità (LOD);

8 repliche del campione livello 0, senza DNA target;

6 repliche totali per controllo specificità: 2 repliche per ciascuno dei tre campioni no target;

1 Controllo positivo al limite di rilevabilità (LOD = PAC).

Controllo Negativo di amplificazione (NTC) è stato aggiunto da ogni laboratorio al fine di monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione. I campioni di controllo negativo consistevano in DNA genomico solo dell'ospite.

I campioni positivi sono stati preparati miscelando DNA target (alla opportuna concentrazione) con DNA genomico estratto da foglie di *Viburnum tinus* (30 ng/μL) per il metodo diagnostico per *P.ramorum* e DNA genomico di *Hedera helix* (30 ng/μL) per il metodo diagnostico per *P. kernoviae*.

Prima dell'invio del materiale ai rispettivi laboratori i campioni sono stati controllati effettuando un ring-test interno al CREA-PAV.

3.3 Misura del limite di rilevabilità (LOD)

Il limite di rilevabilità (Limit of detection LOD) è la più bassa concentrazione di DNA del patogeno in un campione che può essere rivelata nelle condizioni sperimentali del metodo, ma non necessariamente quantificata. Il suo segnale è vicino ma differente da quello del controllo negativo e deve essere almeno tre volte maggiore del rumore di fondo. Schena *et al.* (2006) riporta per entrambi i patogeni un valore LOD di 100 fg nell'analisi del solo DNA del patogeno ovvero DNA ottenuto da coltura pura, tuttavia nei campioni reali il DNA genomico della pianta può interferire con l'attività della polimerasi e modificare questo parametro. Poiché è necessario che il metodo di diagnosi risponda alla identificazione del patogeno in condizioni naturali, ovvero processando campioni di tessuto ospite presumibilmente infetto, per la preparazione dei campioni per la validazione del metodo è stato tenuto conto del valore di LOD in presenza di DNA ospite.

3.3.1 LOD del metodo per *P.ramorum*

La sensibilità analitica è stata verificata approntando una curva standard contenente quantità decrescenti di DNA genomico di *P. ramorum* (DNA ottenuto dal ceppo N. AB2, AB229 e AB188 del CREA-PAV) pari a: 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, tutti addizionati con DNA di *Viburnum tinus* (30 ng/μl). La figura 4 mostra che il metodo utilizzato rileva il DNA del patogeno fino a 1 pg in maniera costante e riproducibile, il valore LOD è stata quindi fissata ad 1 pg.

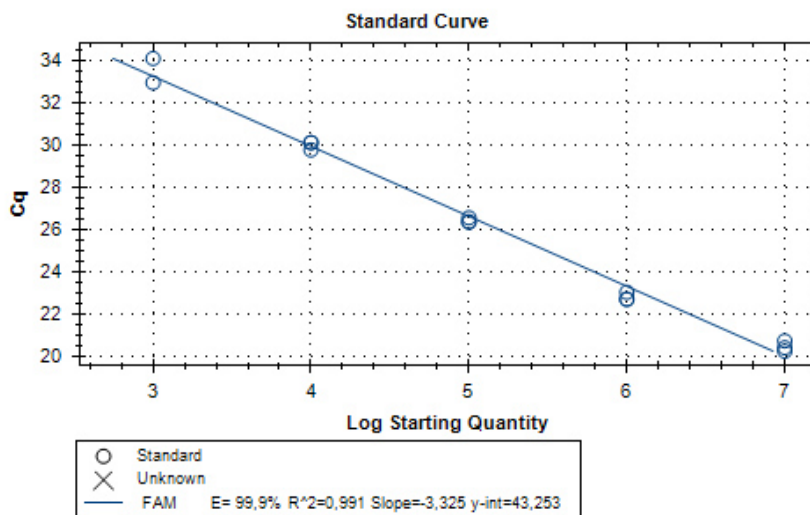


Figura 4 - Curva standard di DNA genomico di *P. ramorum* determinata in Real Time con il metodo descritto nel presente lavoro, nelle seguenti quantità: 10 ng (7); 1 ng (6); 100 pg (5), 10 pg (4); e 1 pg (3) in presenza di DNA genomico di *Viburnum tinus* (30 ng/μL).

3.3.2 LOD del metodo per *P.kernoviae*

Come precedentemente descritto anche per la determinazione del valore LOD per il metodo diagnostico per *P. kernoviae* è stata approntata una curva standard con quantità decrescenti del DNA genomico del patogeno (saggiato con il DNA di entrambi gli isolati CBS 122049 e CBS 122208) a 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, , tutti di addizionati con il DNA di *Hedera helix* (30 ng/μl). La figura 5 mostra che fino a 1 pg la individuazione del patogeno è ancora riproducibile mentre a 100 fg comincia ad essere fuori scala. Anche in questo caso il valore LOD è stata quindi considerato pari a 1 pg.

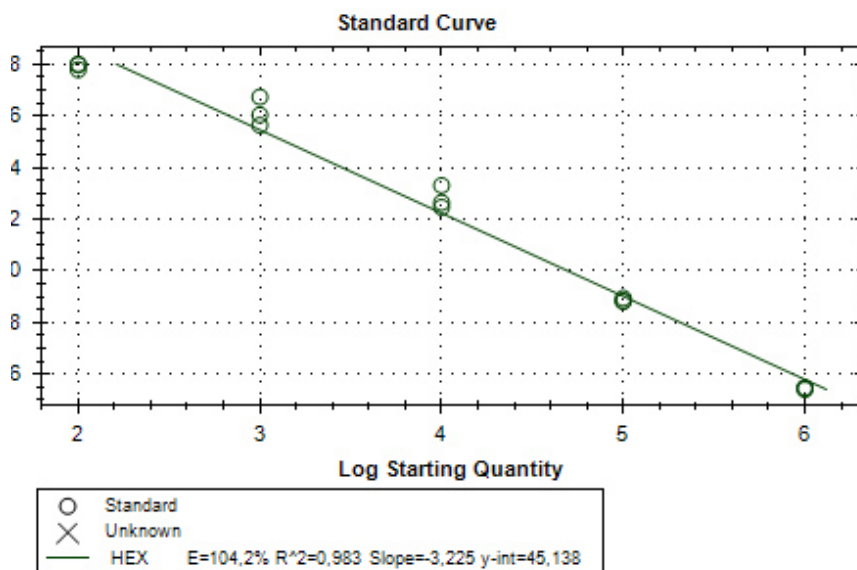


Figura 5 - Curva standard di DNA genomico di *P. kernoviae* determinata in Real Time con il metodo descritto nel presente lavoro, nelle seguenti quantità: 1 ng (6); 100 pg (5), 10 pg (4); 1 pg (3) e 100 fg (2) in presenza di DNA genomico di *Hedera helix* (30 ng/μL).

3.4 Validazione

In Tabella 5 sono riassunti gli esiti del ring test effettuato dai 9 laboratori per il metodo della *P. ramorum* a confronto con il risultato atteso.

TABELLA 5 - Confronto tra risultato atteso ed esito della real time dei 30 campioni anonimi dei 9 laboratori impegnati nel Test Performance Study.

Risultati attesi	N campione	LAB 0	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8
		ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO
POS	1	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	7	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	8	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	9	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	Contr +	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	10	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	11	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	12	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
NEG	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	14	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

In Tabella 6 sono riassunti gli esiti del ring test effettuato dai 7 laboratori per il metodo per la *P. kernoviae* a confronto con il risultato atteso.

TABELLA 6 - Confronto tra risultato atteso ed esito della real time dei 30 campioni anonimi dei 7 laboratori impegnati nel Test Performance Study.

Risultato	Campioni	LAB 0	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6
atteso		ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO	ESITO
NEG	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	2	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
POS	3	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	5	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	8	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	9	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
POS	Contr+	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	10	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	16	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
NEG	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	18	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	20	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	22	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	23	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	24	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
NEG	Contr-	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	25	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
NEG	26	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
POS	27	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	28	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	29	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
POS	30	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG

I dati relativi al Performance Test, per un totale di 210 campioni per 3 repliche per la *P. kernoviae* e di 270 campioni per 3 repliche per la *Pramorum*, sono stati analizzati utilizzando le formule di calcolo mostrate in tabella 7, secondo le linee guida indicate nel documento ISO 16140:2003 ed ISO/IEC 17025, 2005.

TABELLA 7 - Analisi dei risultati del *Performance test* :

Criterio di Validazione	Risultato	Risultato
	Diagnosi <i>P. ramorum</i>	Diagnosi <i>P. kernoviae</i>
Sensibilità relativa	99,3%	95,5%
Specificità relativa	98,4%	100,0%
Accuratezza relativa	98,9%	97,6%
Accordanza	97,9%	95,5%
Concordanza	97,8%	95,3%

3.5 Conclusioni

I risultati del Performance Test risultano soddisfacenti per entrambi i patogeni e per tutti i parametri di validazione osservati. Il metodo di diagnosi per la *P. ramorum* appare più robusto con valori in media più alti di quelli della *P.kernoviae* (98,46 verso 96,78), anche per il fatto che per la *P. ramorum* gli errori sono stati sia falsi positivi che falsi negativi (più vicino ad una distribuzione normale di Gauss, tipico per errori casuali) mentre nel caso della *P.kernoviae* gli errori sono stati **solo** falsi negativi (infatti la specificità relativa = 100%) tipico degli errori sistematici, in questo caso di metodo, indicando una mancanza nella sensibilità relativa (capacità di rilevare tutti i campioni positivi anche alle minime quantità), comunque il metodo ha una sensibilità analitica così elevata (pari a 1pg ovvero 1 billionesimo di grammo (10^{-12} g) di DNA) che nella pratica il risultato è sempre più che soddisfacente.

In conclusione, il metodo in Real Time per la diagnosi di *Pramorum* e/o *P.kernoviae* proposto in questo lavoro ha mostrato di essere solido ed affidabile tanto da essere ben eseguito dalla Rete Nazionale dei SFR e/o enti di ricerca preposti all'identificazione/diagnosi dei patogeni su scala nazionale.

4 BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BRASIER, C; BEALES, PA; KIRK, SA; DENMAN, S; ROSE, J (2005). *Phytophthora kernoviae* sp. Nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. (*Mycological Research*, **109** (8): 853–859.
- EPPO Diagnostic PM 7/66, 2006. *Phytophthora ramorum*. *OEPP/ EPPO Bulletin*, **36**, 146-155.
- EPPO Diagnostic PM 7/112, 2013. *Phytophthora kernoviae*. *OEPP/ EPPO Bulletin*, **43**: 81-93.
- EPPO Diagnostic PM 7/98 (2), 2014. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *OEPP/ EPPO Bulletin*, **44**, 117–147. doi:10.1111/epp.12118
- EPPO Diagnostic PM 7/122 (1), 2014. Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories: *OEPP/EPPO Bulletin* **44**, (3): 390–399.
- EPPO PM 1/002 (25) 2016. A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests , <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>
- FERA. 2009-02-26. (PDF).. Retrieved 2010-07-15.
- GINETTI B., CARMIGNANI S., RAGAZZI A., WERRES S., MORICCA S. (2014) Foliar Blight and Shoot Dieback Caused by *Phytophthora ramorum* on *Viburnum tinus* in the Pistoia Area, Tuscany, Central Italy. *Plant Disease*, **98**, (3), 423. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0767-PDN>
- GULLINO L, GAROFALO MC, MORETTI F, GIANETTI G, MAINENTI E, 2003. Rinvenimento su rododendro di *Phytophthora ramorum*. *L'Informatore Agrario*, **19**:, 87-89.
- ISO 16140, 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods.
- ISO/IEC 17025, 2005. Standard. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- RIZZO DM., M. GARBELLOTO, JM. DAVIDSON, GW. SLAUGHTER, ST . KOIKE, 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease*, **86**, 205-214.
- SCHENA L., HUGHES K. J. D., AND COOKE D. E. L. (2006). Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. *Molecular Plant Pathology* **7** (5), 365–379.
- VITALE S., A. HAEGI, L. LUONGO, A. BELISARIO. (2013) Protocollo diagnostico per *Phytophthora ramorum*. *Petria* **23** (2): 319-349.
- WERRES S., R. MARWITZ, WA. MAN IN 'T VELD, A. DE COCK, PJM. BONANTS, M. DE WEERDT, K. THEMANN, E. ILIEVA, RP BAAYEN, 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research*, **105**(10), 1155-1165.

ALLEGATO I Strumentazione , materiali e reagenti necessari

Strumentazione:

1. Macchina per produzione di ghiaccio granulare.
2. Centrifuga per provette tipo Eppendorf .
3. Vortex.
4. Frigorifero.
5. Congelatore.
6. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000).
7. Termociclatore per Real Time PCR. I seguenti strumenti sono equivalenti ai fini del protocollo descritto: CFX96 (Bio-rad), 7500 Real Time PCR System, (Applied Biosystem), SteponePlus (Applied Biosystem)?
8. Agitatore magnetico.
9. Autoclave
10. Bagnetto termostato o termoblocco
11. Distillatore
12. Fluorimetro Qubit 1 (Invitrogen).

Materiali:

1. Ghiaccio
2. acqua milliQ sterile (preferibile) oppure acqua bi-distillata sterile.
3. Guanti.
4. Portaprovette.
5. Provette di tipo Eppendorf sterili da 0,2 ml, 0,5 ml e 1,5 ml.
6. Puntali sterili con filtro.
7. Piastre da 96 pozzetti (con pellicole adesive ottiche) per Real Time PCR

Reagenti per Real Time PCR:

1. consigliato nella pubblicazione: **qPCR Core kit No ROX (Eurogentec);**
2. in alternativa: SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Biorad).

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
XANTHOMONAS VESICATORIA,
XANTHOMONAS EUVESICATORIA,
XANTHOMONAS PERFORANS,
*XANTHOMONAS GARDNERI***

L'Aurora A., Pucci N., Loreti S.*, Scala V.*

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

*gli autori hanno equamente contribuito

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Ospite
- 1.2 Sintomaologia
- 1.3 Descrizione del patogeno
- 1.4 Normativa

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Metodi diagnostici
- 2.3 Dimensione del campione
- 2.4 Estrazione del DNA
- 2.5 Preparazione del materiale per i saggi molecolari
- 2.6 Duplex-PCR convenzionale
 - 2.6.1 Analisi dei risultati della duplex PCR
 - 2.6.2 Interpretazione del risultato della prova PCR
- 2.7 PCR Real Time Quadruplex
- 2.8 PCR Real Time duplex
- 2.9 Interpretazione del risultato Real Time PCR Quadruplex e duplex

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Valutazione delle performance dei metodi
- 3.2 Validazione dei Metodi diagnostici
 - 3.2.1 Sensibilità analitica
 - 3.2.2 Specificità analitica (inclusività e esclusività)
 - 3.2.3 Ripetibilità
- 3.3 Prove valutative inter-laboratorio
- 3.4 Conclusioni

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I-Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Allegato II

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Xanthomonas</i> spp. (<i>X. vesicatoria</i> , <i>X. euvesicatoria</i> , <i>X. perforans</i> e <i>X. gardneri</i>)
Tassonomia	Phylum: Proteobacteria Classe: <i>Gammaproteobacteria</i> Ordine: <i>Xanthomonadales</i> Famiglia: <i>Xanthomonadaceae</i>
Avversità	Maculatura batterica del pomodoro
Sintomi e acronimi	<i>Bacterium vesicatorium</i> <i>Bacterium exitiosum</i> <i>Xanthomonas vesicatoria</i> <i>Pseudomonas gardneri</i> = <i>Xanthomonas gardneri</i> . <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Categoria fitosanitaria	Le quattro specie sono incluse nella lista A2 dell' EPPO

1.1 Ospite

I principali ospiti sono il pomodoro ed il peperone; anche diverse solanacee spontanee possono essere ospiti secondari e fra queste *Datura* spp., *Solanum* spp. e *Physalis* spp.

1.2 Sintomatologia

Sulle foglie di pomodoro e peperone appaiono maculature a contorno irregolare, idropiche nella fase iniziale, successivamente necrotiche e circondate talvolta da un alone clorotico. Sul fusto si possono osservare macchie bruno-nerastre circondate da alone clorotico. Sui frutti i sintomi sono rappresentati da maculature vescicolose, leggermente depresse, circondate da alone verde scuro. Le macchie tendono ad allargarsi e a fendersi lungo il bordo dell'infezione che possono essere sedi di marciumi.

1.3 Descrizione del patogeno

Xanthomonas spp. è un bastoncellare Gram negativo, aerobio con un solo flagello. La temperatura di crescita ottimale è di 24-29 °C. Le sue dimensioni sono 0.2-0.4 x 0.8-2.9 µm.

Il batterio può sopravvivere sui residui delle piante infette e nella rizosfera e/o delle piante coltivate (grano, barbabietola) e delle piante spontanee. Il seme provvede alla disseminazione del patogeno a breve ed a grande distanza. In campo dalle sedi di infezione primaria, i batteri possono raggiungere le piante sane infettandole, aiutati da eventi atmosferici (pioggia, vento, grandine) e da interventi dell'uomo (operazioni colturali, irrigazioni). In serra è l'uomo il responsabile della diffusione della batteriosi attraverso le operazioni colturali. Stomi e ferite sono le vie di penetrazione nei tessuti della pianta ospite.

1.4 Normativa

1. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).
Categoria fitosanitaria: le quattro specie sono incluse nella lista A2 no. 157,
EU Annex designation II/A2.
Standard PM7/110 (1) (2013)
2. D.Lgs. 19 agosto 2005 n. 214.

Attuazione della direttiva 2002/89/CE concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali.

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

La diagnosi della maculatura batterica del pomodoro avviene per isolamento diretto da foglie, frutti e piccioli di piante sintomatiche, con metodi sierologici: immunofluorescenza e ELISA e metodi molecolari (Standard PM7/110 (1), 2013, OEPP/EPPO Bulletin 43 (1), 7–20). Le Direttive 2000/29/CE, la Decisione 2004/200/CE e le linee guida nazionali per il campionamento di sementi di solanacee approvata dal Comitato Fitosanitario Nazionale il 2 dicembre 2014 sono le normative di riferimento per il campionamento e le analisi di semi di pomodoro.

2.2 Metodi diagnostici

Di seguito sono descritti tre metodi di diagnosi molecolare basati uno su una PCR duplex (Polymerase Chain Reaction) convenzionale descritta da Koenraadt *et al.* (2009), una Real Time PCR duplex descritta da Strayer *et al.* (2016) e una Quadruplex Real Time PCR messa appunto presso il CREA-DC. L'attività è stata svolta nell'ambito del progetto “ASPROPI”, finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi qualitativa e l'identificazione di *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* da semi di pomodoro. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti in laboratori e circostanze diverse. La scelta della metodologia diagnostica da validare, secondo i parametri di validazione ISO 16140:2003, ISO 17025 ed EPPO Diagnostic PM7/98 (EPPO 2010), è scaturita dal lavoro congiunto del gruppo di batteriologia del CREA-DC.

Nelle fasi iniziali di lavoro sono stati selezionati i protocolli da sottoporre a confronto nei 7 laboratori del Servizio Fitosanitario afferenti al Test Performance Study (TPS) utilizzando campioni di semi di pomodoro sani e infettati artificialmente con *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. I protocolli molecolari per il TPS sono stati scelti dal protocollo EPPO (Standard PM7/110 (1), 2013, OEPP/EPPO Bulletin 43 (1), 7–20) e dal protocollo di Real Time PCR di Strayer *et al.* (2016) per l'individuazione di *Xanthomonas* spp. Nel TPS è stato inserito un protocollo di diagnosi per l'analisi qualitativa in Real Time PCR, che in una unica reazione di amplificazione permette l'identificazione della presenza delle quattro *Xanthomonas* spp. (*X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri*).

Al TPS nazionale hanno partecipato i seguenti laboratori:

- 1 Servizio Fitosanitario Regione Toscana. Referente Dr Domenico Rizzo
- 2 FEM-IASMA, Centro Trasferimento Tecnologico Dipartimento Sperimentazione e Servizi Tecnologici Unità Protezione Pianta e Biodiversità Agroforestale Trentino Alto Adige.. Referente Dr.ssa Valeria Gualandri
- 3 Servizio Fitosanitario Regione Veneto. Referente Dr.ssa Daniela Pasqua di Bisceglie

4 Centro di Ricerca Sperimentazione e Formazione in Agricoltura (CRSFA) “Basile Caramia”. Referente Dr. Nicola Trisciuzzi

5 Servizio Fitosanitario Regionale Emilia Romagna. Referente Dr.ssa Ambra Alessandrini

6 Servizio Fitosanitario Regionale Marche. Referente Dr.ssa Simona Talevi

7 CREA-Centro di Difesa e Certificazione (CREA-DC, ex CREA-PAV). Referenti Dr.sse Loreti, Pucci, Scala

Le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato. Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati in Allegato 1.

2.3 Dimensione del campione

Si effettua l'estrazione da campioni di minimo 2500 semi di pomodoro in triplicato, seguendo le indicazioni riportate nelle linee guida nazionali per il campionamento di sementi di solanacee come indicato nella premessa, lo Standard PM7/110 (1) (2013) e l'International Seed Federation (ISF); http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html) con alcune modifiche. Si trasferisce ciascuna replica dei semi di pomodoro nella bustina Bioreba, si aggiungono 3 mL di PBS-T sterile (Appendice 2), si lascia in agitazione a 4°C per 14 ore. Successivamente si schiacciano i semi per 3 minuti nella bustina Bioreba con un martello a temperatura ambiente. La membrana della bustina separa i semi schiacciati e l'estratto. Si preleva con una pipetta l'estratto e si centrifuga a 10.000 g per 20 minuti a 10°C. Si rimuove il surnatante e si risospende il pellet in 1,5 mL di acqua sterile e si inocula l'estratto di seme ottenuto con le sospensioni 10^6 e 10^3 cfu/mL di *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. Si congela il campione aliquotato e si utilizza per l'estrazione del DNA.

2.4 Estrazione del DNA

Una aliquota di 500 µL di estratto di seme infetto con le quattro *Xanthomonas* spp. è centrifugato per 15 minuti a 7000 g. Si elimina il supernatante e si utilizza il pellet per l'estrazione del DNA. Per procedere con l'estrazione del DNA si utilizza il kit QIAGEN: DNeasy® Plant Mini Kit (Cat. No. 69104).

ATTENZIONE: ricordarsi di aggiungere ai tamponi AP3/E ed AW etanolo come riportato nel foglietto illustrativo del KIT. Riscaldare a 6 °C i buffer AP1 e AP3/E (prima dell'aggiunta di etanolo) per dissolvere i precipitati.

1. Risospendere il pellet ottenuto dalla centrifugazione in 400 µl di tampone AP1;
2. Aggiungere 4 µl di RNasi A soluzione stock (100 mg/mL) e *vortexare* vigorosamente.

Nota: non miscelare il tampone AP1 con la RNasi A prima dell'uso.

3. Incubare la miscela a 65°C per 10 min. Durante questo periodo mescolare per inversione 2-3 volte (la lisi delle cellule avviene durante questo passaggio).
4. Aggiungere 130 µl di tampone AP2 al lisato, mescolare, incubare in ghiaccio per 5 min.
5. Centrifugare il lisato per 5 min a 14 000 rpm. Non muovere l'eventuale pellet.
6. Posizionare la colonnina lilla (QIAshredder Mini Spin Column) in un nuovo tubo (non fornito nel kit) di 2 mL.
7. Pipettare il lisato nella colonnina lilla (preparata come descritta al punto precedente) e centrifugare per 2 min a 14 000 rpm.
8. Trasferire il filtrato in un nuovo tubo (non fornito nel kit), senza prendere il pellet di frammenti cellulari.
9. Aggiungere un volume pari a 1,5 volte di tampone AP3/E al lisato filtrato e immediatamente mescolare pipettando. (Esempio: a 450 µl di lisato vanno aggiunti 675 µl di tampone AP3/E.)
10. Pipettare 650 µl della miscela ottenuta, compresi eventuali precipitati, nella colonnina bianca (DNeasy Mini Spin Column posizionata precedentemente su un tubo da 2 mL).
11. Centrifugare per 1 min a < 8 000 rpm e scartare il filtrato.
12. Ripetere l'operazione del punto 10 con il campione rimanente nella medesima colonnina. Ripetere la centrifugata: 1 min a < 8 000 rpm, scartare il filtrato e il tubo di raccolta.
13. Posizionare la colonnina in un nuovo tubo di raccolta (fornito). Aggiungere 500 µl di tampone AW e centrifugare per 1 min a < 8 000 rpm.
14. Scartare il filtrato e riutilizzare il tubo di raccolta nel passaggio successivo.
15. Aggiungere 500 µl di tampone AW e centrifugare per 2 min a 14 000 rpm per far asciugare la membrana.

Nota: È importante eliminare tutto l'etanolo contenuto nel tampone di lavaggio: è quindi raccomandabile lasciar asciugare, per 10 min sotto cappa, le colonnine aperte. In seguito rimuovere con attenzione la colonnina dal tubo di raccolta per non schizzarla con il filtrato.

16. Trasferire la colonnina in una provetta da 1,5 mL o 2 mL (non fornita) e

pipettare 70 µl di tampone AE direttamente sulla membrana. Incubare per 10 min a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugare per 1 min a < 8 000 rpm per eluire.

Nota: L'eluato, contenete il DNA, deve essere mantenuto a -20°C. Se si prevede di utilizzarlo entro una settimana, esso può essere mantenuto a 4°C e poi trasferito a -20.

2.5 Preparazione del materiale per i saggi molecolari

- diluire primers e sonde per Real Time PCR alla concentrazione 100 µM (*stock solution*) e preparare una diluizione della stock solution pari a 10µM (*working solution*) (10 µl di *stock solution* + 90 µl di acqua distillata sterile). Le sonde, prima della risospensione in acqua, si conservano al buio a 4°C e una volta risospese, a -20°C. Si consiglia di aliquotare la *working solution* (10 µM) delle sonde per evitare di sottoporla a sbalzi termici ripetuti.
- nelle reazioni di Real Time PCR i campioni devono essere analizzati in triplicato tecnico e deve essere presente anche un controllo con H₂O MilliQ sterile (*not template control*, NTC); nel caso di campioni negativi e/o dubbi ripetere l'amplificazione utilizzando il templat diluito 1:10.
- miscelare accuratamente tutti i reagenti ed i campioni prima del loro uso.
- In ogni esperimento di amplificazione devono essere aggiunti i seguenti controlli:
 - Controllo negativo di amplificazione (NAC): reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con acqua MilliQ sterile. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.
 - Controllo positivo di amplificazione (PAC): reazione di PCR con il DNA di *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR.

2.6 Duplex-PCR convenzionale

Il DNA ottenuto è utilizzato per la procedura Duplex-PCR convenzionale per l'identificazione di *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* amplificando per ciascuna specie uno specifico frammento come descritto nella procedura EPPO PM7/110 (1), 2013 e da Koenraad *et al.* (2009). Il DNA è amplificato con due coppie di primer per l'identificazione di *X. euvesicatoria* e *X. vesicatoria* e l'altra per l'identificazione di *X. gardneri* e *X. perforans*. In tabella 1 si riportano i primer utilizzati in questo protocollo e le dimensioni degli ampliconi:

TABELLA 1 - Sequenza dei primer per effettuare la Duplex-PCR qualitativa per l'identificazione di *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* e dimensioni dell'amplicone.

Primer	Sequenza primer	<i>Xanthomonas</i> identificata	Dimensioni amplicone
Bs-XeF Bs-XeR	5'-CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG-3' 5'-GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATAC-3	<i>X. euvesicatoria</i>	173 bp
Bs-XvF Bs-XvR	5'-CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G -3' 5'-ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC-3'	<i>X. vesicatoria</i>	138 bp
Bs-XgF Bs-XgR	5'-TCA GTG CTT AGT TCC TCA TTG TC-3 5'-TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G-3'	<i>X. gardneri</i>	154 bp
Bs-XpF Bs-XpR	5'-GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC-3' 5'-GTG CGA GTC AAT TAT CAG AAT GTG G-3'	<i>X. perforans</i>	197 bp

Si riporta in tabella 2 il ciclo di amplificazione per entrambe le amplificazioni della Duplex-PCR.

TABELLA 2 - Ciclo di amplificazione Duplex-PCR.

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale*	94 °C	10'	1
	95 °C	30"	
Amplificazione	64 °C	30"	40
	72 °C	30"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	∞	1

*: *modificare i parametri in base alle istruzioni della casa produttrice della Taq.*

I volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione duplex-PCR per l'identificazione di *X. euvesicatoria* (Bs-XeF/Bs-XeR) e *X. vesicatoria* (Bs-XvF/Bs-XvR) sono riportati in tabella 3.

TABELLA 3 - Volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione duplex-PCR.

	Concentrazione iniziale	Volume (μl) per singolo campione	Concentrazione finale
PCR reaction buffer	10X	2.5	1X
MgCl ₂	50 mM	0.75	1.5 mM
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
BS-XeF	10 mM	0.5	0.2 mM
BS-XeR	10 mM	0.5	0.2 mM
BS-XvF	10 mM	1	0.4 mM
BS-XvR	10 mM	1	0.4 mM
Taq	5 u/μl	0.2	0.04 u/μl
DNA		2	
Molecular-grade water		16.05	
Volume totale		25	

Per effettuare questa amplificazione si consiglia di utilizzare la Taq polymerase Immolase della Bioline.

I volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione duplex-PCR per l'identificazione di *X. gardneri* (Bs-XgF/R) e *X. perforans* (Bs-XpF/R) sono riportati in tabella 4.

TABELLA 4 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione duplex-PCR.

	Concentrazione iniziale	Volume (μl) per singolo campione	Concentrazione finale
PCR reaction buffer	10X	2.5	1X
MgCl ₂	50 mM	1.5	3 mM
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
Bs-XpF	10	0.75	0.3 mM
Bs-XpR	10	0.75	0.3 mM
Bs-XgF	10	0.75	0.3 mM
Bs-XgR	10	0.75	0.3 mM
Taq	5 u/μl	0.2	0.04 u/μl
DNA		2	
Molecular-grade water		15.30	
Volume totale		25	

Per effettuare questa amplificazione si consiglia di utilizzare la Taq polymerase Immolase della Bioline.

2.6.1 Analisi dei risultati della Duplex PCR

Per analizzare i risultati della Duplex PCR si prepara un gel di agarosio 2% in TAE 1X, si colora con il "GelRed Nucleic Acid Stain" o con un colorante analogo. I campioni da visualizzare sul gel devono essere preparati come segue. Si preleva 12 μl di prodotto di amplificazione e si aggiungono 2 μl di loading buffer 6X. Caricare i 14 μL di ciascun campione nei pozzetti e in un pozzetto un marcatore di peso molecolare idoneo (range circa 50-1000 paia di basi). Applicare una tensione elettrica intorno ai 100 V per circa 50 minuti e osservare il gel mediante transilluminatore ad U.V. e fotografare.

2.6.2 Interpretazione del risultato della prova PCR

Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il NAC è negativo e se PAC evidenzia il frammento di DNA specifico per *X. euvesicatoria* di 173 bp, *X. vesicatoria* di 138 bp, *X. gardneri* di 154 bp, *X. perforans* di 197 bp.

ii) Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione è positivo.

iii) Se non si evidenzia il frammento atteso il campione è negativo.

I campioni che danno origine ad una banda debole dovranno essere testati nuovamente.

2.7 PCR Real Time Quadruplex

La metodica Quadruplex Real Time PCR permette di identificare la presenza o l'assenza, in un'unica reazione di amplificazione, delle quattro specie di *Xanthomonas* spp. Questa metodica utilizza quattro sonde ciascuna marcata all'estremità 5' in modo che si possano rilevare i 4 patogeni simultaneamente: 5' FAM per *X. perforans*, 5' TET per *X. euvesicatoria*, 5' Texas Red-X per *X. gardneri*, 5' Cy5 per *X. euvesicatoria*. Di seguito si riportano i primer e le sonde per le amplificazioni di *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*:

Sonde:

X. perforans: 5'/56-FAM/CGGGCAAGGAGCCATCGCCTGT/31ABkFQ/-3'

X. euvesicatoria: 5'/5TET/CGGGCAAGGCGCAATCGCCTGT/3BHQ_2/-3'

Primer:

FP1: 5'CGTCGACGGCCTGGGCGA-3'

RP1: 5'CCGGTGCCTGCGCCTGGA-3'

Sonde

X. gardneri: 5'-/5tEXrD-XN/TGCGCCAGCGTGACGGCACGCC/3IAbRQSP/-3'

X. vesicatoria: 5'-/5CY5/TGCGCCAGCGCGATGGCACGC/3IAbRQSp/-3'

Primer

FP2: 5'-AGGTCAGCCTGGGCGAGGT-3'

RP2: 5'-TGAAGCCCACCACTCGGC-3'

I volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Quadruplex Real Time PCR di *X. perforans* e *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. vesicatoria* sono riportate in tabella 5.

TABELLA 5 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Quadruplex Real Time PCR

	Concentrazione iniziale	Volume (µl) per singolo campione	Concentrazione finale
PCR reaction buffer	2X	5.5	1X
Primer FP1	10 mM	0.78	0.70 mM
Primer RP1	10 mM	0.78	0.70 mM
Primer FP2	10 mM	0.78	
Primer RP2	10 mM	0.78	
Sonda Xg	10 mM	0.165	
Sonda Xv	10 mM	0.165	
Sonda Xp	10 mM	0.165	0.15 mM
Sonda Xeu	10 mM	0.165	0.15 mM
DNA		1	
Molecular-grade water		0.72	
Volume totale		11	

Si consiglia di utilizzare il PCR reaction buffer Biorad Sso Advanced universal probe super mix (172-5281).

Preparati i campioni, si inseriscono nel termociclatore per Real Time e sottoposti al ciclo termico riportato nella tabella 6.

TABELLA 6 - ciclo di amplificazione Quadruplex Real Time PCR.

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	30'	1
Amplificazione	95 °C	3''	40
	69 °C	30''(optic on)	
	72°C	30 ''	

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per i fluorofori FAM, TET, Texas Red e 5' Cy5.

2.8 PCR Real Time duplex

La metodica Duplex Real Time PCR pubblicata da Strayer et al. (2016) permette di identificare le quattro specie di *Xanthomonas* spp con due reazioni di amplificazioni. La duplex Real Time PCR per *X. perforans* e *X. euvesicatoria* si utilizzano:

Sonde

X. perforans: 5'/56-FAM/CGGGCAAGGAGCCATCGCCTGT/31ABkFQ/-3'

X. euvesicatoria: 5'/5TET/CGGGCAAGGCGCAATCGCCTGT/3BHQ_2/-3'

Primer:

FP1: 5'CGTCGACGGCCTGGGCGA-3'

RP1: 5'CCGGTGCCTGCGCCTGGA-3'

La duplex Real Time PCR per *X. perforans* e *X. euvesicatoria* si utilizzano:

Sonde:

X. gardneri: 5'-/5tEXrD-XN/TGCGCCAGCGTGACGGCAGGCC/3IAbRQSP/-3'

X. vesicatoria: 5'-/5CY5/TGCGCCAGCGCGATGGCACGC/3IAbRQSp/-3'

Primer

FP2: 5'-AGGTCAGCCTGGGCGAGGT-3'

RP2: 5'-TGAAGCCCACCACCTCGGC-3'

I volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Duplex Real Time PCR di *X. perforans* e *X. euvesicatoria* sono riportate in tabella 7.

TABELLA 7 - volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Duplex Real Time PCR di *X. perforans* e *X. euvesicatoria*

	Concentrazione iniziale	Volume (µl) per singolo campione	Concentrazione finale
PCR reaction buffer	2X	5.5	1X
Primer FP1	10 mM	0.78	0.70 mM
Primer RP1	10 mM	0.78	0.70 mM
Sonda Xp	10 mM	0.165	0.15 mM
Sonda Xeu	10 mM	0.165	0.15 mM
DNA		1	
Molecular-grade water ⁰		2.61	
Volume totale		11	

Si consiglia di utilizzare il PCR reaction buffer Biorad Sso Advanced universal probe super mix (172-5281).

Preparati i campioni, si inseriscono nel termociclatore per Real Time e sottoposti al ciclo termico riportato nella tabella 8.

TABELLA 8 - ciclo di amplificazione Duplex Real Time PCR

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	30'	1
Amplificazione	95 °C	3''	40
	69 °C	30''(optic on)	
	72°C	30 ''	

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per i fluorofori FAM e TET.

I volumi e le concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Duplex Real Time PCR di *X. gardneri* e *X. vesicatoria* sono descritti in tabella 9.

TABELLA 9 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione Duplex Real Time PCR di *X. gardneri* e *X. vesicatoria*.

	Concentrazione iniziale	Volume (µl) per singolo campione	Concentrazione finale
PCR reaction buffer	2X	5.5	1X
Primer FP2	10 mM	0.78	0.70 mM
Primer RP2	10 mM	0.78	0.70 mM
Sonda Xg	10 mM	0.165	0.15 mM
Sonda Xv	10 mM	0.165	0.15 mM
DNA		1	
Molecular-grade water ⁰		2.61	
Volume totale		11	

Si consiglia di utilizzare il PCR reaction buffer Biorad Sso Advanced universal probe super mix (172-5281).

Preparati i campioni, si inseriscono nel termociclatore per Real Time e sottoposti al ciclo termico riportato nella tabella 10.

TABELLA 10 - Ciclo di amplificazione Duplex Real Time PCR.

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95 °C	30''	1
Amplificazione	95 °C	3''	40
	69 °C	30''(optic on)	
	72°C	30 ''	

La rilevazione del segnale di fluorescenza avviene al termine dello step di annealing/estensione e va impostato per i fluorofori Texas Red e 5' Cy5.

2.9 Interpretazione del risultato Real Time PCR Quadruplex e Duplex

Il saggio di amplificazione Quadruplex e Duplex Real Time PCR sono attendibili solo se il NAC è negativo e se il PAC per ciascuno dei batteri *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* evidenzia un valore di $0.00 < Ct < 40.0$. Il campione è considerato positivo se il segnale di amplificazione relativo al fluoroforo utilizzato è $0.00 < Ct < 40.0$. Il campione è considerato negativo per la presenza del target se non si rileva segnale di amplificazione. I campioni che danno origine ad un segnale debole dovranno essere testati nuovamente.

3 Dati di validazione

3.1 Valutazione delle performance dei metodi

Il processo di validazione per entrambi i metodi è stato condotto come descritto nel documento EPPO PM7/98 (2) (EPPO 2014) e facendo riferimento ai protocolli diagnostici “standard” pubblicati in letteratura EPPO PM7/110 (1), 2013, Koenraadt et al. (2009) e Strayer et al. (2016) con piccole modifiche e adattamenti specificati. I parametri di validazione considerati e definiti secondo il documento EPPO PM 7/98 (2), ISO 16140 e ISO 17025 riportati in premessa sono stati: sensibilità analitica, specificità analitica, sensibilità diagnostica, specificità diagnostica, ripetibilità, accordanza e concordanza.

Tali valutazioni sono state eseguite presso i laboratori del Centro di Ricerca per la Difesa e Certificazione di Roma (CREA-DC) e in collaborazione con 7 laboratori di Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) ed enti pubblici di ricerca, elencati di seguito con i relativi referenti:

1. Fondazione Edmund Mach, Unità Protezione delle piante e biodiversità agroforestale. Referente Dr.ssa Valeria Gualandri
2. Servizio Fitosanitario Regione Veneto. Referente Dr.ssa Daniela Pasqua di Bisceglie
3. Centro di Ricerca Sperimentazione e Formazione in Agricoltura (CRSFA) “Basile Caramia”, Referente Dr. Nicola Trisciuzzi
4. Centro Trasferimento Tecnologico, U.O. Protezione Piante e Biodiversità Agroforestale, Regione Trentino Alto Adige
5. Servizio Fitosanitario Regionale Emilia Romagna
6. Servizio Fitosanitario Regionale Marche. Referente Dr.ssa Simona Talevi
7. CREA- Centro di Ricerca per la Difesa e Certificazione di Roma.

3.2 Validazione dei metodi diagnostici

3.2.1 Sensibilità analitica

Tutti i parametri valutati nel presente protocollo sono stati ottenuti analizzando il DNA estratto da semi di pomodoro contaminati con concentrazioni note dei patogeni in tre ripetizioni biologiche e per la Real Time PCR, ciascuna in triplicato tecnico. I valori soglia di sensibilità analitica riportati in CFU/mL sono indicati per ciascuna metodica in tabella 8.

Per la metodica Quadruplex-Real Time PCR è stato calcolato anche il valore soglia di sensibilità analitica del DNA di *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* miscelati. Sono state eseguite 3 ripetizioni biologiche analizzate in triplicato nell'intervallo di concentrazione 10 ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg. I risultati sono riportati in tabella 11.

TABELLA 11- valori di sensibilità delle tre metodiche molecolari

	Duplex-PCR	Real Time-Duplex	Real Time Quadruplex
Valore di sensibilità, valutato con DNA estratto da matrice contaminata	10 ⁴ cfu/mL	10 ⁴ cfu/mL	10 ⁴ cfu/mL
Valore di sensibilità valutato con DNA da coltura pura	---	---	100 fg/μl

3.2.2 Specificità analitica (inclusività e esclusività)

La specificità analitica delle metodiche è stata valutata con il DNA di ceppi batterici riportati in tabella 12, non target, Genera *Xanthomonas* e *Pseudomonas* e *Clavibacter michiganensis*, contaminanti e saprofiti del pomodoro e ceppi target. In tabella 13 sono riportati i valori di attesi positivi e attesi negativi di ciascuna metodica per la valutazione della specificità.

TABELLA 12 - Elenco degli isolati batterici per la valutazione della specificità del metodo

Numero collezione	specie
PD2665	<i>Xanthomonas fragariae</i>
CREA-DC 1009	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
CREA-DC 1013	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>
NCPPB 3870	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>
CREA-DC 1032	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
CREA-DC 1033	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargoni</i>
CREA-DC 1038	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
CREA-DC 1045	<i>Clavibacter michiganensis michiganensis</i>
CREA-DC 1174	<i>Pseudomonas putida</i>
CREA-DC 1225	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>
CREA-DC 1264	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>
CREA-DC 1318	<i>Ralstonia solanacearum</i>
DC3000	<i>Pseudomonas syringe</i> pv. <i>tomato</i>
NCPPB 1382	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
NCPPB 1832	<i>Xanthomonas arboricola celebensis</i>

NCPPB 1832	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>populi</i>
NCPPB 1946	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>raphani</i>
CREA-DC 1494	<i>saprofiti da pomodoro</i>
CREA-DC 1495	<i>saprofiti da pomodoro</i>
CREA-DC 1496	<i>saprofiti da pomodoro</i>
CREA-DC 1497	<i>saprofiti da pomodoro</i>
CREA-DC 1498	<i>saprofiti da pomodoro</i>
CFBP 5454	<i>Pseudomonas corrugata</i>
CFBP 5447T	<i>Pseudomonas mediterranea</i>
NCB 1964	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CREA-DC 1594	<i>contaminanti pomodoro</i>
CREA-DC 1618	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
CREA-DC 1619	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
CREA-DC 1620	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
LMG849	<i>Xanthomonas poinsetticola</i>
CREA-DC 1849	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>begoniae</i>
CREA-DC 1850	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
NCPPB 422	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
NCPPB 881	<i>Xanthomonas gardneri</i>
NCPPB2968	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
NCPPB 4321	<i>Xanthomonas perforans</i>

TABELLA 13 - attesi positivi e attesi negativi di ciascuna metodica per la valutazione della specificità di ceppi batterici target e non target

	Duplex-PCR convenzionale	Real Time-Duplex	Real Time Quadruplex
Attesi positivi	8/8	5/5	5/5
Attesi negativi	23/26	27/30	23/30

La metodica PCR Duplex convenzionale non ha dato risultati falsi negativi con i ceppi target, mentre risultati falsi positivi con ceppi non target sono stati ottenuti con i seguenti: NCPPB 1832 *Xanthomonas arboricola celebensis*, CREA-DC 1495 saprofiti da pomodoro e NCB 1964 *Pseudomonas fluorescens*.

Le metodiche di Real Time PCR Duplex e Quadruplex non hanno dato risultati

falsi negativi con i ceppi target. Risultati falsi positivi amplificati con la metodica Real Time Duplex PCR sono stati ottenuti con ceppi non target: CREA-DC 1264 *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, CREA-DC 1495 saprofita da pomodoro e LMG849 *Xanthomonas poinsetticola*. Risultati falsi positivi amplificati con la metodica Quadruplex Real Time PCR sono stati ottenuti con ceppi non target: CREA-DC 1032 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, CREA-DC 1033 *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, CREA-DC 1264 *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, NCPPB 1832 *Xanthomonas campestris* pv. *populi*, NCPPB 1946 *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*, CREA-DC 1495 saprofita da pomodoro, LMG849 *Xanthomonas poinsetticola*.

3.2.3 Ripetibilità

La ripetibilità della Duplex PCR convenzionale, Duplex Real Time e della Quadruplex Real Time PCR è stata eseguita analizzando l'estratto di semi di pomodoro contaminato con una sospensione batterica 10^4 cfu/mL di *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*. La metodica è stata eseguita amplificando simultaneamente tre repliche biologiche e per ciascuna di esse, tre repliche tecniche. La ripetibilità della Duplex PCR convenzionale, Duplex Real Time PCR e Quadruplex Real Time PCR è stata del 100%.

3.3 Prove valutative inter-laboratorio

La robustezza dei metodi diagnostici usando diversi reagenti e strumentazioni in 7 diversi laboratori del Servizio fitosanitario, con diversi operatori, è stata valutata mediante uno studio comparativo inter-laboratorio (*Test Performance study* - TPS) come indicato dal documento ISO 16140:2003.

Per ogni laboratorio aderente al TPS è stato preparato un set di 11 campioni. Ciascun campione è stato preparato come indicato nel paragrafo 2.3.

In Allegato II sono riportati i reagenti e le strumentazioni utilizzati dai diversi laboratori partecipanti.

3.4 Conclusioni

I dati relativi al TPS per *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* sono riportati in tabella 14A per la Duplex PCR convenzionale in tabella 14B per la Duplex Real Time PCR e Quadruplex Real Time PCR. I risultati sono stati elaborati secondo le linee guida indicate nel documento ISO 16140:2003, utilizzando le formule di calcolo mostrate in tabella 14A e 14B.

TABELLA 14 A e B - Analisi dei risultati del TPS relativi ai metodi diagnostici Duplex PCR (A), Real Time Duplex e Quadruplex PCR (B) per *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*

CRITERIO DI VALUTAZIONE	<i>X. euvesicatoria</i>, <i>X. vesicatoria</i>	<i>X. gardneri</i>, <i>X. perforans</i>
Sensibilità relativa	95%	92%
Specificità relativa	74%	82%
Accuratezza relativa	85%	88%
Accordanza	79%	81%
Concordanza	74%	78%

A) Duplex PCR

CRITERIO DI VALUTAZIONE	Duplex Real Time PCR <i>X. euvesicatoria</i>, <i>X. perforans</i>	Duplex Real Time PCR <i>X. gardneri</i> <i>X. vesicatoria</i>.	Quadruplex Real Time PCR
Sensibilità relativa	90%	85%	92%
Specificità relativa	82%	85%	73%
Accuratezza relativa	87%	84%	83%
Accordanza	80%	77%	75%
Concordanza	76%	58%	72%

B) Real Time PCR Duplex e Quadruplex

I risultati del TPS risultano soddisfacenti per i metodi e per tutti i parametri di validazione osservati. Il confronto tra i parametri di validazione, evidenzia che la Quadruplex Real Time PCR può essere suggerita per l'analisi qualitativa di screening preliminare di campioni di semi di pomodoro potenzialmente infetti con *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, presentando un valore di sensibilità relativa del 92%. Qualora la Quadruplex PCR evidenzi un risultato positivo per una delle sonde, questo deve essere confermato con la duplex PCR convenzionale o la duplex Real Time. In caso di conferma di positività si procede con l'isolamento secondo quanto riportato nella metodica EPPO PM7/110 (1) e si prosegue con l'identificazione della specie da coltura pura con una delle due metodiche duplex. Se il risultato è inconsistente si ritesta il campione. In caso di risultato negativo il campione deve essere considerato tale.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- KOENRAADT H, VAN BETTERAY B, GERMAIN R, HIDDINK G, JONES JB, OOSTERHOF J, RIJLAARSDAM A, ROORDA P & WOUT B (2009). Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. Proceedings of the 2nd.International Symposium on Tomato Diseases. (Eds H. Saygili, F Sahin & Y Aysan) Acta Horticulturae 808, 99–102.
- STRAYER A.L, JEYAPRAKASH A., MINSAVAGE G.V., TIMILSINA S., VALLAD G.E., JONES J. B.; PARET M. L. (2016). A multiplex Real Time PCR assay differentiates four *Xanthomonas* species associated with bacterial spot of tomato. doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1085-RE.
- PM7/110 (1) (2013) OEPP/EPPO Bulletin 43 (1), 7–20

ALLEGATO I Strumentazione , materiali e reagenti necessari

1. guanti
2. puntali con filtro
3. acqua distillata sterile per effettuare le diluizioni di primers e sonde
4. cella elettroforetica
5. centrifuga
6. macchina per produrre ghiaccio
7. pipette da P-2 a P-1000
8. termociclatore
9. transilluminatore UV
10. TAE Buffer1X (STOCK 1lt 50X: Tris base 242g, acido acetico glaciale 57,1 mL, EDTA 0,5 M-ph8 100mL)
11. agarosio per elettroforesi
12. H₂O distillata ultrapura sterile per PCR
13. DNA ladder
14. GelRed Nucleic Acis Stain (BIOTIUM, cod. 410003-0.5mL)
15. provette “eppendorf” da 1,5 e 2 mL
16. provette PCR convenzionale e Real Time
17. puntali per P-2 a P-1000 con filtro
18. puntali per P-20 a P-1000 senza filtro
19. reagenti per PCR convenzionale e PCR Real Time
20. Frigorifero e congelatore
21. Termocilclatore PCR convenzionale
22. Termociclatore per Real Time
23. Autoclave
24. Kit commerciale per estrazione DNA

25. Piastre da 96 pozzetti (con pellicole adesive) per Real Time PCR

26. Vetreria varia o materiale plastico monouso

27. Porta provette

Allegato II

Tamponi

PBS-T (50 mM PB, pH 7.4)	g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	19.57 g
KH_2PO_4	1.65 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3^*$	0.5 g
Acqua distillata	1000 mL

Autoclavare 15 minuti a 121°C e raffreddare a temperatura ambiente. Aggiungere 0.2 mL di Tween 20 sterile (soluzione al 10%)

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
*PEACH LATENT MOSAIC VIROID***

Luigi M., Faggioli F.

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Ospite
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Morfologia
- 1.4 Epidemiologia e trasmissione
- 1.5 Diagnosi
- 1.6 Normativa fitosanitaria

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Metodologie diagnostiche scelte
- 2.3 Campionamento
- 2.4 Estrazione dell'RNA Totale
- 2.5 Preparazione del saggio
- 2.6 Metodo diagnostico 1: RT-PCR convenzionale (Loreti *et al.*, 1999)
 - 2.6.1 Elettroforesi su gel di agarosio
 - 2.6.2 Valutazione dei risultati metodo 1
- 2.7 Metodo diagnostico 2: real time RT-PCR (Serra *et al.*, 2017)
 - 2.7.1 Valutazione dei risultati metodo 2

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Materiale utilizzato per la validazione
- 3.2 Parametri di Validazione ottenuti
 - 3.2.1 Specificità analitica
 - 3.2.2 Sensibilità, specificità diagnostica, ripetibilità e riproducibilità
- 3.3 Conclusioni
 - 3.3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche
 - 3.3.2 Punti critici del protocollo

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I-Strumentazione, reagenti necessari e materiali

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Peach latent mosaic viroid</i>
Tassonomia	Famiglia <i>Avsunviroidae</i> , Genere <i>Pelamoviroid</i>
Avversità	Mosaico latente del Pesco
Acronimo	PLMVD

1.1 Ospite

La malattia è stata descritta per la prima volta in Francia su GF-305 innestati con germoplasma proveniente da USA e Giappone nel 1976 (Desvignes, 1976), anche se sintomi simili erano stati descritti precedentemente sempre su pesco in Nord America e in Giappone. Nel 1988, Flores e Llacer, riconoscono in un viroide l'agente casuale della malattia. E' stato descritto in Nord e Sud America, Asia (Giappone e Cina), in molti paesi dell'area del Mediterraneo: sia europei che nord africani e in Australia (Flores et al., 2003). L'ospite prediletto è il pesco (*Prunus persica*) ma è stato descritto anche su ciliegio dolce, albicocco (Hadidi et al., 1997), susino (Faggioli et al. 1997), susino giapponese, susino ornamentale (Osaki et al., 1999), pero e pero selvatico (Kyriakopoulou et al., 2001) ma con frequenze piuttosto basse.

1.2 Sintomatologia

La malattia deve il suo nome al fatto che generalmente non induce sintomi cromatici evidenti o quanto meno apprezzabili sull'apparato fogliare o sulle drupe. La malattia è, infatti, sprovvista di un sintomo patognomonico (cioè specifico) poiché le manifestazioni sintomatiche che la caratterizzano sono molto variabili: leggero ritardo nella ripresa vegetativa e nella maturazione dei frutti, presenza di mosaici fogliari con macule di varia forma e dimensione, alterazioni della colorazione dell'epidermide dei frutti, comparsa di fenomeni di spaccatura della linea di sutura, butteratura del legno, morte di gemme sia a fiore che a legno associata ad invecchiamento precoce delle piante (Desvignes et al., 1999). Queste sintomatologie diverse, inoltre, possono essere presenti a differenti gradi di intensità, fino a diventare completamente latenti (Flores et al., 1990). I sintomi più tipici compaiono su piante di quattro - cinque anni di età, che presentano ritardi di 4-6 giorni nella fioritura, foliazione e successiva maturazione dei frutti (Fig. 1) (Faggioli et al., 2003). Spesso si riscontra un deperimento generalizzato, con vegetazione scarsa, fogliame sparso, accecamento delle gemme con successivo disseccamento dei rametti giovani (Fig. 2); tutto ciò porta ad un più rapido declino ed invecchiamento delle piante, che presentano una maggiore sensibilità al freddo e agli altri agenti patogeni che causano cancri. Sui frutti, in particolare, i sintomi sono molto tipici e spesso dannosi, rendendoli non commerciabili soprattutto in caso di

forti fessurazioni della linea di sutura e punteggiature dell'epidermide (Fig. 3). Alcuni ceppi del PLMVd, infine, sono in grado di determinare una particolare sintomatologia definita calico, descritta per la prima volta da Blodgett (1944) e in Italia del nord da Canova e Branzanti nel 1959 e nel sud Italia da Ragozzino *et al.* (1972). Questa è caratterizzata da macule fogliari albine, d'ampiezza e forma variabile, ai margini delle quali si formano necrosi nel periodo più caldo dell'estate, da depigmentazione dell'epidermide dei frutti e dei rametti (Fig. 4). Il fenomeno comunque non interessa mai tutti gli organi della chioma e più spesso solo un settore. Gli alberi affetti da questo sintomo non mostrano differenze nel vigore vegetativo e nella produttività rispetto a quelli sani. Recentemente (Di Serio *et al.*, 2002) è stato possibile dimostrare che questa sintomatologia è associata ad una particolare inserzione nucleotidica nel genoma di questo ceppo. Questa sintomatologia è, comunque, molto rara ed attrae l'attenzione per la sua peculiarità.



A

B

Figura 1 - A) ritardo nella fioritura nella cv Nectaros e B) di maturazione nella cv Diamond causate da PLMVd



Figura 2 - Caratteristici sintomi di deperimento generalizzato in piante adulte infette da PLMVd

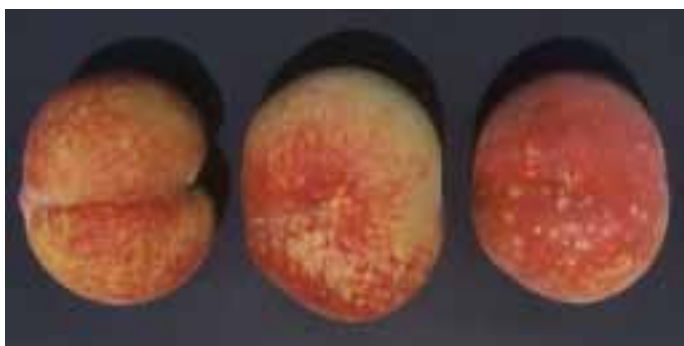


Figura 3 - Punteggiature dell'epidermide (sinistra) e spaccature nella linea di sutura (destra) osservate su frutti infetti da PLMVd



Figura 4 - Sintomi di calico su foglie (sinistra) e frutti (centro) causate da un isolato con la peculiare inserzione nucleotidica nel genoma. A destra altri sintomi cromatici di classico mosaico (da cui il nome del viroide) causati da un isoalto severo di PLMVd.

1.3 Morfologia

Il viroide è costituito da una singola particella di RNA singolo filamento circolare di 339-351 (isolato 'calico') nt, che non codifica per nessuna proteina.

1.4 Epidemiologia e trasmissione

Il PLMVd è trasmissibile per innesto, l'uso di materiale di propagazione infetto è il principale veicolo di trasmissione del viroide (Desvignes, 1986). In campo la diffusione tra piante raggiunge una percentuale annua del 5% che fa sospettare l'esistenza di un vettore. Sperimentalmente è stata dimostrata, anche se a basso livello la capacità di trasmissione di *Myzus persicae*, mentre *Aphis gossypii* e *A. spiraecola* non hanno mostrato risultati conclusivi (Flores et al., 1992). Il viroide può essere trasmesso anche attraverso l'uso di attrezzi di potatura contaminati (Hadidi et al., 1997) e per polline (Barba et al., 2007) ma non per seme (Desvignes, 1986).

1.5 Diagnosi

Essendo privo di proteine capsidiche, il saggio ELISA non può essere usato nella diagnosi del viroide del mosaico latente del pesco. L'infezione da PLMVd può essere rilevata indirettamente tramite saggi biologici su piante indicatrici mentre è

possibile effettuare la diagnosi diretta su campioni sintomatici ed asintomatici per mezzo di saggi molecolari. Le matrici su cui effettuare l'analisi possono essere i tessuti fogliari o sul legno al riposo vegetativo. Al momento i metodi molecolari maggiormente utilizzati sono: RT-PCR e real time RT-PCR

1.6 Normativa fitosanitaria

Il PLMVd è tra i patogeni inseriti nella lista delle avversità che devono essere assenti nel materiale di certificazione volontaria del pesco (D.M. 7 luglio 2006 e D.M. 20 novembre 2006) e nel materiale di CAC e di certificazione europea (DIRETTIVA DI ESECUZIONE 2014/98/UE DELLA COMMISSIONE del 15 ottobre 2014 recante modalità di esecuzione della direttiva 2008/90/CE del Consiglio per quanto riguarda i requisiti specifici per il genere e la specie delle piante da frutto di cui al suo allegato I, i requisiti specifici per i fornitori e le norme dettagliate riguardanti le ispezioni ufficiali).

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto ASPROPI, finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del PLMVd; la validazione dei metodi valutati in questo protocollo è stata effettuata così come riportato in premessa di questo volume.

Per la definizione dei parametri di validazione, le diverse metodologie di diagnosi sono state condotte con materiali, reagenti e strumentazione dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare è scaturita dall'impegno congiunto di un Gruppo di lavoro di esperti costituito da:

- Francesco Faggioli – CREA-DC, Coordinatore del gruppo del lavoro
- Anna Rosa Babini – SFR Emilia Romagna
- Simona Botti - CAV Tebano
- Marica Calvi – SFR Lombardia
- Marco Cardoni - CAV Tebano
- Francesco Di Serio- CNR-IPSP Bari
- Valeria Gualandri – FEM e SFR Trentino

- Marta Luigi – CREA-DC
- Claudio Ratti – UNIBO
- Domenico Rizzo – SFR Toscana
- Paola Spigno – SFR Campania

La definizione del parametro di riproducibilità per i saggi diagnostici è scaturita dall'effettuazione di un ringtest nazionale eseguito presso i laboratori dei seguenti enti di ricerca, Università, enti regionali e strutture private:

- CAV – Tebano
- Centro di Sperimentazione Laimburg
- CREA – DC
- CRSFA “B. Caramia”
- FEM – Fondazione Edmund Mach
- SFR Campania
- SFR Emilia Romagna
- SFR Lombardia
- SFR Piemonte
- SFR Sardegna
- SFR Veneto

2.2 Metodologie diagnostiche scelte

Le metodologie scelte dal Gruppo di lavoro per la validazione del protocollo diagnostico sono state le seguenti:

1 - RT-PCR: come da protocollo di Loreti *et al.*, 1999. (Comparison of different diagnostic methods to detect peach latent mosaic viroid. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 29: 433-438).

Componente viroidale riconosciuto: intero genoma del viroide (RNA).

2 - Real time RT-PCR: come da protocollo di Serra *et al.*, 2017 (Interference between variants of peach latent mosaic viroid reveals novel features of its fitness landscape: implication for detection. *Scientific Reports*, 7:42825).

Componente viroidale riconosciuto: porzione del genoma del viroide (RNA).

2.3 Campionamento

Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico e anche lo stato di degradazione del materiale vegetale costituente il campione può influire sul risultato dell'analisi di laboratorio.

Il corretto campionamento prevede quindi:

- il prelievo del campione vegetale nel periodo idoneo;
- la raccolta di materiale vegetale esente da alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura;
- il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- la rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

Norme da osservare per i prelievi in campo di campioni vegetali per analisi del PLMVd:

Periodo: tutto l'anno.

Matrice: la migliore matrice su cui è possibile effettuare la diagnosi è costituita da rami lignificati dell'anno; è possibile anche utilizzare foglie o epidermide di frutti sintomatici o raccolti durante o subito dopo il periodo più caldo della stagione.

Tipologia del campione: raccogliere 2 porzioni legnose dalla parte basale di rami dell'anno. I campioni legnosi devono essere integri e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura.

Mantenimento del campione: il materiale vegetale deve essere asciutto, deve essere posto in buste di plastica da conservare a basse temperature o in luoghi freschi tali da evitare eventuale disidratazione.

Rintracciabilità del campione: ogni campione deve essere opportunamente siglato sulla busta e sulla pianta.

Spedizione del campione: i campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore preferibilmente in borse termiche.

Norme da osservare in laboratorio: i campioni legnosi possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 60 giorni, evitandone la disidratazione. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico. In alternativa, le polveri dei campioni ottenute dopo la macerazione in azoto liquido possono essere conservati a -20°C almeno fino ad un anno.

Tutti i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o inizio di muffa o seccumi non devono essere processati.

2.4 Estrazione dell'RNA Totale

La fase iniziale di preparazione del campione può essere fatta con l'utilizzo di apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser'). Se possibile, in generale è consigliabile eseguire la macerazione del tessuto a freddo per preservare l'RNA.

Il seguente protocollo di estrazione è basato sull'utilizzo di un kit commerciale associato ad un primo passaggio di incubazione con tampone MacKenzie.

Estrazione con kit commerciale Zymo Research + Tampone MacKenzie

1. Accendere il termostato a 70°C.
2. Rimuovere lo strato corticale esterno (ritidoma) dai rami legnosi fino a scoprire il tessuto floematico e prelevare 0.1 g di tessuto floematico mediante raschiamento con bisturi o coltellino sterili.
3. Aggiungere 1 ml di tampone MacKenzie con 0,034 g/campione di sodio metabisolfito (2% finale) o 1% di β -mercaptoetanol e le sfere frantumatrici.
4. Macinare nell'apparecchio frantumatore per 5 minuti a 300 rpm.
5. Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a massima velocità per 5' (tutte le centrifugazioni da qui in avanti vengono considerate a temperatura ambiente).
6. Trasferire 1 ml di surnatante in eppendorf da 1,5 ml (eventualmente aiutandosi con un puntale cui è stata tolta la punta).
7. Aggiungere 100 μ l di Sarkosyl 20% ad ogni provetta.
8. Incubare a 70°C per 10' agitando periodicamente i tubi, centrifugare 1' a 12000g.
9. Trasferire 400 μ l di surnatante in una colonnina Zymo-Spin IIIC Column, precedentemente alloggiata in un tubo da 2 ml e centrifugare a 8000 g per 30".
10. Aggiungere al percolato 0,8 volumi di etanolo assoluto e mescolare bene con la pipetta (per 400 μ l di percolato 320 μ l di etanolo).
11. Trasferire la miscela ottenuta in una colonnina Zymo-Spin IIC Column, alloggiata in un tubo da 2 ml e centrifugare a 12000 g per 30".
12. Scartare il percolato e riposizionare la colonnina sul tubo. Aggiungere 400 μ l di RNA Prep Buffer alla colonna. Centrifugare a 12000 g per 1'.
13. Scartare il percolato e riposizionare la colonnina sul tubo. Aggiungere 800 μ l di RNA Wash Buffer. Centrifugare a 12000 g per 30".
14. Scartare il percolato e riposizionare la colonnina sul tubo. Aggiungere 400 μ l di RNA Wash Buffer. Centrifugare a 12000 g per 30".
15. Scartare il percolato e riposizionare la colonnina sul tubo. Centrifugare a vuoto a 12000 g per 2'.
16. Rimuovere la colonnina dal tubo di raccolta e posizzionarla in un nuovo tubo. Aggiungere 150 μ l di acqua DePC e incubare a temperatura ambiente per 1 minuto. Centrifugare a 10000 g per 30".
17. Eliminare la colonnina, conservare a -20°C o -80°C.

Tampone MacKenzie pH 5 (per 1 litro di tampone)

Guanidina isotiocianato 4 M	472 g
Sodio Acetato 0.2 M	16,4 g
EDTA 25 Mm	9,2 g
PVP 40% 2.5 %	25 g

Portare a pH 5 e autoclavare

2.5 Preparazione del saggio (comune a tutti i metodi validati)

1. Indossare guanti puliti.
2. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili.
3. Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
4. Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

2.6 Metodo diagnostico 1: RT-PCR (Loreti *et al.*, 1999)

PLMVd-C-long AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC
 PLMVd-H CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG

1. Preparare un numero adeguato di provette e aggiungere ad ognuna:

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione	Concentrazione finale
Primer complementare PLMVd-C-long	100 ng/μl	1 μl	5 ng/μl
RNA Totale del campione da saggiare/acqua		1,5 μl	

Avendo cura di mescolare bene il primer con il campione da saggiare

2. Incubare in termociclatore a 95°C per 5' e trasferire i campioni in ghiaccio per 3'.
3. Preparare la Mix RT.

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione	Concentrazione finale
First Strand buffer	5 X	4 µl	1 X
dNTPs	10 mM	8 µl	4 mM
DTT	100 mM	0,2 µl	1 mM
M-MLV	200 U/µl	0,1 µl	20 U/reazione
H ₂ O		5,2 µl	
Totale mix RT		18,5 µl	

4. Aggiungere 18,5 µl di Mix RT ai 2,5 µl di RNA e primer complementare denaturati.
5. Incubare a 42°C per 45' su termociclatore e denaturare a 95°C per 3', trasferire i campioni in ghiaccio e proseguire o congelare a -20°C.
6. Preparare la seguente Miscela di reazione per ogni campione:

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione	Concentrazione finale
H ₂ O sterile		61,7 µl	
Buffer GoTaq G2	5X	16 µl	1X
Primer omologo PLMVdH	10 µM	2 µl	0.2 µM
GoTaq G2 Polimerasi	5 U/µl	0,3 µl	1,5 U/reazione
Totale mix PCR		80,0 µl	

7. Dispensare 80 µl di reazione nello stesso tubo della RT (volume finale 100 µl).
8. Avviare il termociclatore con il seguente ciclo di amplificazione:

Ciclo	Temperatura	Durata	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5'	
Denaturazione	94°C	45"	
Annealing	60°C	45"	35
Estensione	72°C	60"	
Estensione finale	72°C	7'	
Step di blocco	4°C	30'	

Conservare le provette in frigorifero.

2.6.1 Elettroforesi su gel di agarosio

1. Preparare il gel di agarosio 1,2 % in TBE 1X.
2. Centrifugare brevemente le provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento dell'apertura pericolose contaminazioni.
3. Caricare 10 ml del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 ml di loading buffer 6X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
4. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 100-1000 bp).
5. Correr il gel per circa 60' a 100 V, facendo riferimento al fronte del colorante.
6. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 10' circa in una soluzione 0,5 mg/ml di etidio bromuro o con Gel Red.
7. Lavare il gel per circa 5' in H₂O.
8. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V. La banda attesa è di circa 330-340 bp.

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

TBE 10X

Tris 108,00 g

Acido borico 55,00 g

0.5 M EDTA (pH 8) 40 ml

Portare ad 1litro con H₂O distillata e autoclavare a 121°C per 20'

Soluzione di etidio bromuro 0.5 µg/ml

Etidio bromuro 50 µg

acqua 100 ml

Soluzione di Gel Red 1X

Gel Red 10.000 X

Acqua 100 ml

Diluire questa soluzione 1:10.000 in acqua

2.6.2 Valutazione dei risultati metodo 1: RT-PCR

Il saggio è da considerarsi positivo per PLMVd se si verificano le seguenti condizioni: il campione da analizzare presenta una sola banda all'altezza attesa (~ 340 bp) confrontando la migrazione delle bande del marcatore, il controllo positivo (P) presenta la banda attesa, il controllo negativo (N) ed il controllo bianco (B - acqua) non presentano alcuna banda di amplificazione. Il campione sarà considerato negativo se non presenta alcuna banda di amplificazione mentre i controlli sono tutti come attesi. La presenza di altre bande più deboli a varie altezze indica una reazione di amplificazione non specifica e il test deve essere ripetuto.

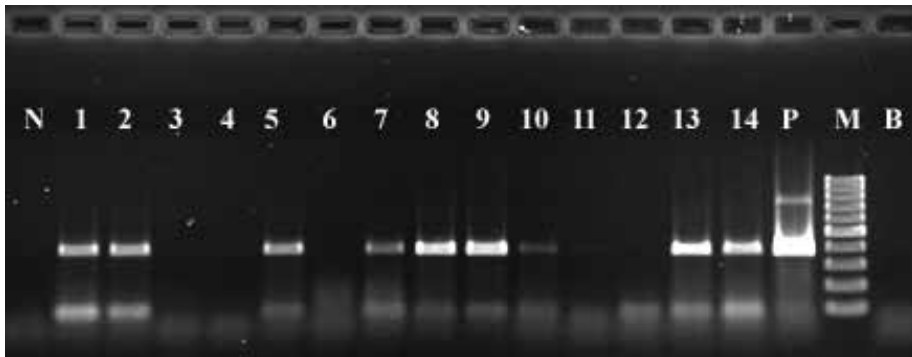


Figura 5 - Esempio di valutazione del risultato ottenuto con il metodo 1 RT-PCR utilizzando 3 controlli noti

CONTROLLI: B = controllo bianco (acqua); N = controllo negativo; P = controllo positivo, M = Marker 100bp

CAMPIONI DA VALUTARE. 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10 (debole), 13 e 14 = campioni positivi a PLMVd 3, 4, 6, 11 e 12 = campioni negativi a PLMVd

2.7 Metodo diagnostico 2: real time RT-PCR (Serra *et al.*, 2017)

RP2 (c) GGGACCGGGWTTGAAT

FP2 (i) CAATGASGTAAGGTGGGACT

P3 (i) FAM-GGTACCGCCGTAGAACTGGGTTACG-BH1

1. Impostare lo schema della piastra indicando le sigle riportate sui campioni e aggiungendo i necessari controlli con H₂O.
2. Impostare il ciclo termico sulla macchina.
3. Preparare la seguente Miscela di reazione
4. Dispensare 18 µl di reazione nei tubi o pozzetti
5. Caricare 2 µl di RNA per campione e 2 µl di acqua per il controllo negativo.
6. Avviare la macchina con il seguente ciclo di amplificazione

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione	Concentrazione finale
dH ₂ O Rnase free		4,7 µl	
TaqMan® RT-PCR Mix (ThermoFisher)	2X	10 µl	1 X
RT Enzyme Mix	40 X	0,5 µl	1 X
Forward primer	10 µM	1 µl	0,5 µM
Reverse primer	10 µM	1 µl	0,5 µM
TaqMan probe (FAM-BH1)	5 µM	0,8 µl	0,2 µM
Totale		18 µl	

Ciclo	Temperatura	Durata	N° di cicli
Retrotrascrizione	48°C	15'	
Denaturazione iniziale	95°C	10'	
Denaturazione	95°C	15''	
Annealing	60°C	60''	40

2.7.1 Valutazione dei risultati metodo 2 di real time RT-PCR

L'elevata sensibilità dei metodi di real time può rendere necessario, sulla base dell'esperienza fatta nel ring test, l'introduzione di un valore soglia utile a distinguere in modo oggettivo i campioni positivi da quelli negativi. Infatti, in caso di elevato numero di campioni da analizzare, anche i campioni sani possono generare delle curve di amplificazione negli ultimi cicli, con valori di Ct generalmente sostanzialmente differenti dai campioni infetti. Non è possibile tuttavia definire un valore di Ct soglia (*threshold cycle*) univoco per analizzare i risultati, ma per ogni singolo laboratorio e specifico protocollo è necessario utilizzare un metodo di definizione del cut-off. Tale ciclo soglia deve essere determinato sulla base di una prova preliminare da effettuarsi all'inizio di utilizzazione del protocollo, consistente nell'analisi di diluzioni seriali (almeno 5) di un campione positivo in cui, per ogni diluzioni, vengono fatte 5 ripetizioni (Mehle et al., 2013). Ottenuti tutti i risultati, si prendono in considerazione i Ct della diluizione in cui almeno una diluizione non ha generato curve. Il Ct più alto ottenuto, arrotondato per eccesso allo 0,5 superiore ed aumento di un ulteriore 0,5 sarà considerato il ciclo soglia. Se, come accade spesso, tutte e 5 le ripetizioni della diluizione vengono negative, il Ct soglia sarà dato dal Ct più alto rilevato dalle 5 ripetizioni ottenute con la diluizioni precedente aumentato di 0,5. Per chiarezza si riporta il seguente esempio:

Diluizioni	Ct ripetizioni	Ct soglia
10 ⁻²	30-31-30-30-31	Non determinabile
10 ⁻³	33-33-34-33-33	Non determinabile
10 ⁻⁴	37-36-37-36-37	Non determinabile
10 ⁻⁵	nd-38-nd-37-37,5	38,5
	o	
	nd-nd-nd-nd-nd	37,5
10 ⁻⁶	nd-nd-nd-nd-nd	-

Una volta ottenuto, il ciclo soglia verrà utilizzato dal laboratorio ogni volta che viene eseguito quello specifico protocollo.

Valutazione dei risultati una volta stabilito il limite soglia (cut-off):

- considerare positivi tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di Ct < del cut-off

- considerare negativi i campioni con un valore di Ct > del cut-off

E' buona norma porre un'attenzione maggiore a quei campioni il cui Ct sia molto vicino al Ct soglia ($\pm 0,3$), in questo caso considerare i campioni dubbi e ripetere l'analisi con un altro metodo o rifare il campionamento.

Poiché il Ct soglia è influenzato da diversi fattori, fra cui i reagenti e la strumentazione utilizzata per l'esecuzione del test, è opportuno che venga sempre determinato internamente al laboratorio. Inoltre, considerato che il valore di Ct dipende anche dalla threshold, ovvero del valore di fluorescenza oltre il quale una reazione real time PCR viene considerata positiva, è opportuno che il laboratorio definisca contemporaneamente anche le modalità per la definizione della threshold. Tale valore viene calcolato automaticamente dal software dello strumento real time PCR, e quindi varia di volta in volta, oppure può essere prefissato dall'operatore e restare costante in ogni esperimento.

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Materiale utilizzato per la validazione

Le prove di validazione sono state effettuate a fine inverno a partire da campioni legnosi. La matrice utilizzata è stato il floema ottenuto dalla zona sottocorticale di rami lignificati.

La scelta finale di utilizzare materiale legnoso è stata compiuta dopo un'accurata valutazione dell'efficacia dei protocolli sia con matrice fogliare che legnosa. Dai risultati è emerso che, con questo sistema di estrazione l'efficacia di diagnosi è equivalente per entrambe le matrici con entrambi i protocolli. Si consiglia l'utilizzo di matrice legnosa per rendere i protocolli fruibili durante tutto l'anno.

Per la validazione del protocollo molecolare per il rilevamento di PLMVd sono stati utilizzati 20 isolati di riferimento, target e non target, composti da materiale legnoso di *Prunus persica*, *Persea americana*, *Malus domestica*, *Pyrus communis* rappresentati come di seguito:

10 ISOLATI TARGET (peschi sicuramente infetti da PLMVd)

10 ISOLATI NON TARGET (5 campioni di *P. persica* sicuramente non infetti da PLMVd, 5 campioni sicuramente infetti da: *Avocado sunblotch viroid* (avocado), *Apple dimple fruit viroid* (melo), *Apple skar skin viroid* (melo), *Hop stunt viroid* (pesco), *Pear blister canker viroid* (pero).

Al fine di accertare l'effettivo stato sanitario, tutti gli isolati sono stati preventivamente controllati per mezzo di saggio molecolare di RT-PCR e real time RT-PCR in differenti laboratori.

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti materiali riportati nell'allegato I.

3.2 Parametri di validazione ottenuti

3.2.1 Specificità analitica

La valutazione della specificità analitica è stata eseguita utilizzando un panel di 10 campioni target (RNA totale ottenuto da piante di *P. persica* naturalmente infette da PLMVd) e da 10 campioni no-target così ripartiti: 5 *P. persica* esenti da PLMVd e 5 piante sperimentalmente infette da viroidi appartenenti alla stessa famiglia (*Avocado sun blach viroid*) o che condividono le stesse specie ospiti (*Apple dimple fruit viroid*, *Apple skar skin viroid*, *Hop stunt viroid*, *Pear blister canker viroid*).

3.2.2 Sensibilità, specificità diagnostica, ripetibilità e riproducibilità

Tutti gli altri parametri di validazione sono stati ottenuti seguendo i criteri e le formule riportate nella premessa di questo volume:

Valori	1-RT-PCR	2-Real Time RT-PCR
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Specificità analitica	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 10 campioni non-target valutati	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 10 campioni non-target valutati
Sensibilità diagnostica	90%	96%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza	95%	98%
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità	87%	94%

⁽¹⁾La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto di un campione di riferimento da 10⁻⁰ a 10⁻⁶.

⁽²⁾La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tutti i campioni nelle stesse condizioni del ring test.

3.3 Conclusioni

3.3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

Alla luce dei risultati ottenuti dalla validazione delle diverse metodologie di diagnosi ed al fine di definire standard tecnici per la realizzazione delle analisi si riportano alcuni suggerimenti utili:

Saggio diagnostico	Caratteristiche
RT-PCR	Tempi di esecuzione: 12 ore per l'analisi di circa 25 campioni Aspetti vantaggiosi: economicità, elevata affidabilità e specificità, semplicità di esecuzione. Aspetti svantaggiosi: minore sensibilità rispetto alla real time RT-PCR, manipolazione post-amplificazione (gel)
real time RT-PCR	Tempi di esecuzione: 7 ore per l'analisi di circa 25 campioni Aspetti vantaggiosi: maggiore sensibilità analitica; maggiore velocità di esecuzione; visualizzazione del risultato in tempo reale. Aspetti svantaggiosi: tecnica mediamente laboriosa, legata all'utilizzo di specifici reagenti e che richiede personale altamente specializzato; più difficoltà nell'interpretare in modo specifico i risultati (necessità spesso di un cut-off)

3.3.2 Punti critici del protocollo

In generale, il punto debole delle RT-PCR ed a maggior ragione delle real time RT-PCR è la loro estrema sensibilità, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi. Tuttavia tali metodologie, se non utilizzate scrupolosamente, possono dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, micro pipette contaminate, etc.). Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.

Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:

- organizzare il laboratorio di diagnosi molecolare, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per amplificazione e laboratorio per elettroforesi e dedicare un'apposita cappa ed un apposito set di pipette esclusivamente per la real time). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micro pipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione al bancale di elettroforesi, dove si maneggiano amplificati;
- è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
- usare solo acqua sterile RNasi-free (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
- cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TRNA);
- usare solo puntali sterili con filtro;
- al momento di caricamento del blocco del Termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse; se al termine di una PCR si ritrovano provette aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio.
- dedicare particolare attenzione alla chiusura delle piastre di real time con l'apposita pellicola trasparente, o alla chiusura dei tubi nel caso si utilizzino questi ultimi.

A livello tecnico il protocollo mostra due punti critici:

- Durante la fase di estrazione prestare attenzione alla disposizione delle colonnine del kit che, nonostante debbano essere usate in diversi momenti e con scopi differenti, hanno la stessa forma e lo stesso colore.
- Durante l'esecuzione della RT-PCR prestare particolare attenzione alla prima fase di denaturazione dell'acido nucleico con il primer complementare, avendo cura di mescolare accuratamente i due componenti e di rispettare i tempi di denaturazione e incubazione in ghiaccio.

Ovviamente per avere amplificazioni efficienti è bene: controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (le Unità di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato); mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione,

durante la preparazione della RT-PCR o della real time RT-PCR e fare attenzione a caricare in modo uniforme le provette nel blocco del termociclatore, la chiusura non ermetica del coperchio può produrre temperature disomogenee con conseguenti reazioni di amplificazione parziali o non confrontabili tra i campioni.

Infine, nel caso ci fossero dei campioni che non danno risposte certe (bande dubbie in end point RT-PCR o curve che non mostrano il tipico andamento e/o ottenute negli ultimi cicli della real time RT-PCR) è consigliabile analizzare tali campioni in modo incrociato tra i due metodi.

Ringraziamenti

Oltre al Mipaaf, finanziatore del progetto, e a tutti i partecipanti al GdL e al Ring test, particolari ringraziamenti vanno al CAV di Tebano per aver supportato tecnicamente ed economicamente parte del lavoro svolto, per la messa a punto del protocollo PLMVd.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BARBA M., RAGAZZINO E., FAGGIOLI F., 2007. Pollen transmission of Peach latent mosaic viroid. *Journal of Plant Pathology*, **89**, 277-279.
- CANOVA A., BRANZANTI E.C., 1959. Mosaico giallo del pesco. *Notiziario Malattie Piante* 47/48 (NS 26/27), 855-897.
- DESIGNES J.C., 1976. The virus disease detected in green-house and in field by the peach seedling GF305 indicator. *Acta Horticulture* **67**, 315-323.
- DESIGNES J.C., 1986. Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. *Acta Horticulturae* **193**, 51-57.
- DESIGNES J.C., BOYE R., CORNAGGIA D., GRASSEAU N., 1999. Virus diseases of fruit trees. *Centre technique interprofessionnel des fruits et legumes (CTIFL)*. Editor, Paris, France.
- DI SERIO, F., MALFITANO, M., ALIOTO, D., RAGOZZINO, A., FLORES, R., 2002. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of apple scar skin viroid. *J Plant Pathol* **84**, 27-34.
- FAGGIOLI F., LORETI S., BARBA M., 1997. Occurrence of Peach latent mosaic viroid (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Disease* **81**, 423
- FAGGIOLI F., RAGOZZINO E., BARBA M., FIDEGHELLI C., DELLA STRADA G., PAVIA R., 2003. Influenza del viroide del mosaico latente del pesco in cultivar di pesco e nettarine. *Frutticoltura* **65** (7/8): 65-69.
- FLORES R., HERNÁNDEZ C., AVINENT L., HERMOSO A., LLÁCER G., JOAREZ J., ARREGUI J.M., NAVARRO L., DESIGNES J.C., 1992. Studies on the detection, transmission and distribution of peach latent mosaic viroid in peach trees. *Acta Horticulturae* **309**, 325-330.
- FLORES R., HERNÁNDEZ C., DESIGNES J. C., LLACER G., 1990. Identification and partial characterization of the viroid inducing the peach latent mosaic viroid disease. 3rd Meeting of first International Viroid Working Group, Berlin, August, 25-26.

- FLORES R., HERNÁNDEZ C., LLÁCER G., SHAMLOUL A.M., GIUNCHEDI L., HADIDI A., 2003. Peach latent mosaic viroid in peach. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles J.W., Semacik, J.S. (eds.). Viroids, pp. 156-160. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- FLORES R., LLACER G., 1988. Isolation of a viroid-like RNA associated with Peach latent mosaic viroid disease. *Acta Horticulturæ* **235**, 325-332.
- HADIDI A., GIUNCHEDI L., SHAMLOUL A.M., POGGI POLLINI C., AMER A.M., 1997. Occurrence of Peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Disease*, **81**, 154-158.
- HADIDI A., GIUNCHEDI L., SHAMLOUL A.M., POGGI POLLINI C., AMER A.M., 1997. Occurrence of Peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Disease*, **81**, 154-158.
- KYRIAKOPOULOU PE, GIUNCHEDI L, HADIDI A., 2001. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear (*Pyrus communis*) and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region. *J Plant Pathol* **83**, 51-62.
- LORETI S., FAGGIOLI F., CARDONI M., MORDENTI G., BABINI A.R., POGGI POLLINI C., BARBA M., 1999. Comparison of different diagnostic methods for the detection of peach latent mosaic viroid. *OEPP Bulletin/EPPO Bulletin* **29**, 433-438.
- MEHLE N., N. PREZELJ, M. HREN, J. BOBEN, K. GRUDEN, M. RAVNIKAR, M. DERMASTIA, 2013. A Real-Time PCR Detection System for the Bois Noir and Flavescence Dorée Phytoplasmas and Quantification of the Target DNA. *Methods in molecular biology*, **938**, 253-68.
- OSAKI H, YAMAGUCHI Y, SATO Y, TOMITA Y, KAWAI Y, MIYAMOTO Y, OHTSU Y.,1999. Peach latent mosaic viroid isolated from stone fruits Japan. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **65**, 3-8.
- RAGOZZINO A., GRAZIANO A., BELLONE G. 1972 - *Indagini preliminari sulle malattie da virus o virus simili delle pomacee e delle drupacee in Campania*. *Annali Fac. Sci. agr. Univ. Napoli, Portici*, S. IV, **6**, 3-42.
- SERRA P., BERTOLINI E., CARNEM MARTINEZ M., CAMBRA M., FLORES F. 2017. Interference between variants of peach latent mosaic viroid reveals novel features of its fitness landscape: implications for detection. *Scientific Reports*, **7**, 42825.

ALLEGATO I Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Apparat per elettroforesi orizzontali su gel d'agarosio Bio-Rad
3. Autoclave
4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Bilancia analitica
6. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
7. Distillatore
8. Frantumatori a sfere
9. Frigorifero e congelatore
10. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
11. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione di acidi nucleici e micropipette dedicate all'amplificazione (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)
12. Sistema di *imaging* per visualizzare i risultati delle analisi elettroforetiche
13. Termociclatore per Real-Time PCR
14. Termociclatore per PCR qualitativa
15. Vorticare

Reagenti

1. Agarosio per biologia molecolare
2. Colorante per acidi nucleici
3. dNTP Mix (Promega; Cat. U1330)
4. GoTaq® G2 DNA Polymerase e buffer 10X (Promega, M7841)
5. Kit commerciale per estrazione RNA ZR Plant RNA MiniPrep (Zymo Research, R2024)
6. Marcatore di peso molecolare per DNA
7. Master mix per Real time: TaqMan from *RNA* to *Ct* (Thermofisher; Cat. 4392653)
8. M-MLV reverse transcriptase, 5X buffer e DTT (Thermofisher; Cat 28025013)
9. Primer e sonde specifici per *PLMVd*
10. Reagenti chimici per elettroforesi su gel d'agarosio: Tris, Acido borico, EDTA
11. Reagenti chimici per tampone MacKenzie: Guanidina isotiocianato, Sodio Acetato, EDTA, PVP 40%
12. Sodio metabisolfito o beta mercaptoetanol

Materiali

1. Ghiaccio granulare
2. Acqua bidistillata sterile nucleasi-*free*
3. Guanti monouso
4. Porta provette
5. Provette tipo Eppendorf da 0,2, 1,5 e 2 ml

6. Piastre da 96 pozzetti (con pellicole adesive) per Real time PCR o tubi o strip compatibili
7. Puntali per micro pipette, nucleasi-*free* e con filtro
8. Vetreria varia o materiale plastico monouso o autoclavata e/o nucleasi-*free*

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
*GRAPEVINE PINOT GRIS VIRUS***

Gentili A., Faggioli F.

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)
Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Ospite
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Morfologia
- 1.4 Epidemiologia e trasmissione
- 1.5 Diagnosi
- 1.6 Normativa fitosanitaria

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Metodologie diagnostiche scelte
- 2.3 Campionamento
- 2.4 Estrazione dell'RNA Totale
- 2.5 Preparazione del saggio
- 2.6 Sintesi del cDNA
- 2.7 Metodo diagnostico 1: RT-PCR
- 2.8 Metodo diagnostico 2: RT-PCR
- 2.9 Metodo diagnostico 3: Real Time RT-PCR
- 2.10 Metodo diagnostico 4: Real Time RT-PCR
- 2.11 Valutazione dei risultati metodo 1 e 2 di RT-PCR
- 2.12 Valutazione dei risultati metodo 3 e 4 di Real Time RT-PCR

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Materiale utilizzato per la validazione e avvertenze generali
- 3.2 Parametri di Validazione ottenuti
 - 3.2.1 Specificità analitica
 - 3.2.2 Sensibilità, specificità diagnostica, ripetibilità e riproducibilità
- 3.3 Conclusioni
 - 3.3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche
 - 3.3.2 Punti critici del protocollo

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I- Strumentazione, materiali e reagenti necessari per i protocolli descritti

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale associato	<i>Grapevine pinot gris virus</i>
Tassonomia	Famiglia <i>Betaflexiviridae</i> , Genere <i>Trichovirus</i>
Avversità	Malattia del Pinot Gris (o complesso dei sintomi di maculatura e deformazioni fogliari della vite)
Acronimo	GPGV

1.1 Ospite

Il virus è stato identificato inizialmente in piante di vite di ‘Pinot grigio’ del Trentino (Giampietruzzi *et al.*, 2012), successivamente è stato riscontrata la sua presenza in altre regioni Italiane ed anche in paesi esteri sia sulle varietà di vite a bacca rossa che a bacca bianca, ma la presenza di sintomi si manifesta in particolare sulle varietà a bacca bianca, che risultano più suscettibili, soprattutto le varietà quali Pinot grigio, Riesling, Traminer, Glera e Garganega. Seppur meno frequenti, anche sulle varietà a bacca rossa sono stati individuati sintomi severi come ad esempio su Pinot nero (Gualandri e Saldarelli, 2016). Recentemente, il GPGV è stato riscontrato anche su alcune piante spontanee come *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.) e *Chenopodium album* L. (Gualandri *et al.*, 2016).

1.2 Sintomatologia

La presenza di GPGV su viti di varietà sensibili si può manifestare con un complesso di sintomi, ma può anche rimanere latente, infatti, spesso viene riscontrata la presenza del virus su piante senza sintomi.

I sintomi sono particolarmente evidenti in primavera quando, nelle piante infette, si ha un incompleto allungamento del germoglio, che rimane poco sviluppato. Nei casi più gravi è possibile notare la necrosi dell’apice vegetativo ed il completo arresto della crescita. Sulle foglie possono manifestarsi sintomi quali: deformazioni, maculature, necrosi puntiformi ed erosioni, che possono essere confuse con danni precoci da Tripidi o da Eriofidi o danni da diserbo o carenze di microelementi. I sintomi sulla vegetazione sono più evidenti dal germogliamento alla fioritura con remissione dei sintomi sui nuovi germogli estivi. Anche sul grappolo possono essere evidenti sintomi di acinellatura più o meno gravi e riduzione del numero di grappoli che possono portare anche a forti riduzioni della produzione (Foto1).

Anche le piante spontanee trovate infette da GPGV mostrano macchie clorotiche e screziature (Foto 2).

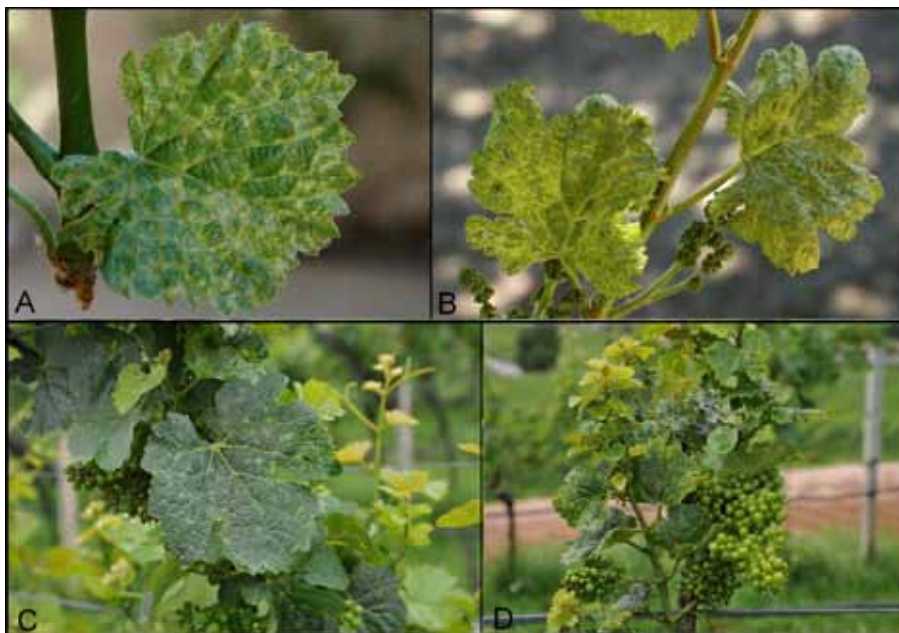


Foto 1 - Caratteristici sintomi di maculatura e deformazione fogliari e acinellatura su ‘Pinot grigio’ (A e B) e ‘Traminer’ (C e D) (foto da Giampietruzzi *et al.*, 2012)



Foto 2 - Sintomi di punteggiature, clorosi e screziature su *Silene latifolia* subsp. *alba* (Mill.) (a destra) e *Chenopodium album* L. (sinistra) (foto da Gualandri *et al.*, 2016).

1.3 Morfologia

Il GPGV non è stato ancora osservato. Per analogia con altri Trichovirus, è costituito da particelle allungate, flessuose e filamentose di lunghezza variabile da 640 a 760 nm.

1.4 Epidemiologia e trasmissione

La diffusione della virosi può avvenire ad opera dell'uomo tramite il materiale di propagazione, mentre la diffusione naturale in campo è ancora in fase di studio anche se è stata attualmente dimostrata la trasmissione del virus da parte dell'acaro eriofide *Colomerus vitis* (Malagnini *et al.*, 2016).

1.5 Diagnosi

Al momento non è stato ancora prodotto e commercializzato un antisiero per l'esecuzione del saggio ELISA. L'infezione da GPGV può essere rilevata tramite saggi biologici su piante indicatrici legnose ('Traminer', 'Pinot grigio') mentre è possibile effettuare la diagnosi diretta su campioni sintomatici ed asintomatici per mezzo di saggi molecolari. Le matrici su cui effettuare l'analisi possono essere i tessuti fogliari raccolti durante la fase di massima espressione dei sintomi (tarda primavera) o sul legno al riposo vegetativo. Al momento i metodi molecolari maggiormente utilizzati sono: RT-PCR, real time RT-PCR.

1.6 Normativa fitosanitaria

Il GPGV non è attualmente coperto da normative fitosanitarie, né di quarantena né di qualità, si auspica che quanto prima venga preso in considerazione tra i patogeni di qualità che devono essere obbligatoriamente assenti nel materiale di propagazione della vite.

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto ASPROPI, finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del GPGV; la validazione dei metodi valutati in questo protocollo è stata effettuata così come riportato in premessa di questo volume.

Per la definizione dei parametri di validazione, le diverse metodologie di diagnosi sono state condotte con materiali, reagenti e strumentazione dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare è scaturita dall'impegno congiunto di un Gruppo di lavoro di esperti costituito da:

- Francesco Faggioli – CREA-PAV, Coordinatore del gruppo del lavoro
- Elisa Angelini – CREA-VIT
- Anna Rosa Babini – SFR Emilia Romagna
- Gian Luca Bianchi – ERSF FVG
- Marica Calvi – SFR Lombardia
- Paola Casati – UNIMI
- Giorgio Gambino - CNR- IPSP Torino
- Andrea Gentili – CREA-PAV
- Valeria Gualandri – FEM e SFR Trentino
- Umberto Malossini – FEM e ACOVIT
- Claudio Ratti – UNIBO
- Domenico Rizzo – SFR Toscana
- Pasquale Saldarelli - CNR-IPSP Bari

La definizione del parametro di riproducibilità per i saggi diagnostici è scaturita da un ring test nazionale eseguito presso i laboratori dei seguenti enti di ricerca, Università, enti regionali e strutture private:

- CAV – Tebano
- CNR – IPSP Bari
- CREA – PAV
- CREA – VIT
- CRSFA “B. Caramia”
- ERSF – Friuli Venezia Giulia
- IASMA – Fondazione Edmund Mach
- SFR Emilia Romagna
- SFR Lombardia
- SFR Piemonte
- SFR Toscana
- SFR Veneto

- Università di Bologna
- Università di Milano
- Università di Padova
- CNR-ISPS Torino
- Università di Udine

2.2 Metodologie diagnostiche scelte

Le metodologie scelte dal Gruppo di lavoro per la validazione del protocollo diagnostico sono state le seguenti:

1 - RT-PCR: come da protocollo di Glasa, et.al 2014. (Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch. Virol.* 159:2103)

Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica codificante per la proteina di movimento.

2 - RT-PCR: come da protocollo di Saldarelli et al. 2015. (Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathology*, Vol 105, n. 4 2015)

Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica codificante per la proteina capsidica.

3 - Real time RT-PCR: come da protocollo di Bianchi, et al., 2015 (Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR. *EPPO Bulletin*, 45(1): p. 22-32).

Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica codificante per la proteina di movimento.

4 - Real time RT-PCR: come da protocollo di Ratti et al., 2015 (comunicazione personale).

Componente virale riconosciuto: Acido nucleico virale (RNA), regione genomica che comprende parte di quella codificante per la proteina di movimento e parte di quella per la proteina capsidica.

2.3 Campionamento

Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico e anche lo stato di degradazione del materiale vegetale costituente il campione può influire sul risultato dell'analisi di laboratorio.

Il corretto campionamento prevede quindi:

- il prelievo del campione vegetale nel periodo idoneo;
- la raccolta di materiale vegetale esente da alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura;
- il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- la rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

Norme da osservare per i prelievi in campo di campioni vegetali per analisi del GPGV:

Periodo: durante il riposo vegetativo e nella tarda primavera.

Matrice: La migliore matrice su cui è possibile effettuare la diagnosi è costituita da tralci lignificati tuttavia è possibile anche utilizzare foglie durante il periodo di massima espressione dei sintomi.

Tipologia del campione: raccogliere 2 porzioni legnose dalla parte basale di tralci dell'anno. I campioni legnosi devono essere integri e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura.

Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto, deve essere posto in buste di plastica da conservare a basse temperature o in luoghi freschi tali da evitare eventuale disidratazione.

Rintracciabilità del campione: Ogni campione deve essere opportunamente siglato sulla busta e sulla pianta.

Spedizione del campione: I campioni raccolti devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 72 ore preferibilmente in borse termiche.

Norme da osservare in laboratorio: I campioni legnosi possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 60 giorni, evitandone la disidratazione. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico. In alternativa, le polveri dei campioni ottenute dopo la macerazione in azoto liquido possono essere conservati a -20°C almeno fino ad un anno.

Tutti i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o inizio di muffa o seccumi non devono essere processati.

2.4 Estrazione dell'RNA Totale

La fase iniziale di preparazione (polverizzazione o macerazione) del campione può essere fatta sia con utilizzo di azoto in mortai e pestelli sterili, sia senza l'utilizzo di azoto tramite triturazione in bustine 'tipo bioreba' e una testa rotante oppure usando apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser').

I seguenti protocolli di estrazione basati sull'utilizzo di due diversi kit commerciali, associati ad un primo passaggio di incubazione con tampone Mac Kenzie, possono essere entrambi utilizzati per l'estrazione di RNA totale da campioni di vite per la diagnosi di GPGV. I dati di validazione ottenuti con i metodi RT-PCR e real time RT-PCR non hanno mostrato differenze rilevanti tra i due kit.

Rimuovere lo strato corticale esterno (ritidoma) dai tralci legnosi fino a scoprire il tessuto floematico e prelevare il floema mediante raschiamento con bisturi o coltellino sterili. E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e prelevare, dopo la macerazione, la quantità richiesta dal kit commerciale. E' possibile conservare i tessuti macerati in azoto a -20 °C per diversi giorni ed effettuare l'estrazione in un secondo momento, cosa consigliabile nel caso in cui si debbano processare un numero elevato di campioni.

Estrazione con kit commerciale Qiagen + Tampone MacKenzie

1. Accendere il termostato a 70°C.
2. Pesare 0,25 g di tessuto floematico.
3. Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello sterilizzati in autoclave (Conservare a -20 °C o procedere al punto 4), oppure usando apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser').
4. Aggiungere 1,7 ml di tampone MacKenzie con 0,034 g/campione di sodio metabisolfito (2% finale) e mescolare.
5. Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12.000 rpm per 6'.
6. Trasferire 1 ml di surnatante in eppendorf da 1,5 ml aiutandosi con un puntale cui è stata tagliata la punta.
7. Aggiungere 100 µl di Sarkosyl 20% ad ogni provetta.
8. Incubare a 70°C per 10' agitando periodicamente i tubi.
9. Versare il contenuto caldo nella prima colonnina del kit (VIOLA) fino al segno limite.
10. Centrifugare a 12.000 rpm per 2'.
11. Prelevare il percolato senza toccare il pellet, trasferirlo in una nuova provetta eppendorf. Ripetere dal punto 9 al punto 11 per la restante soluzione.
12. Aggiungere 500 µl di Et-OH assoluto freddo e mescolare delicatamente con la pipetta.
13. Versare 700 µl della soluzione con etanolo nella seconda colonnina del kit (ROSA).
14. Centrifugare a 10.000 rpm per 1'. Eliminare l'eluato.
15. Aggiungere 700 µl di tampone RW1 a ciascuna colonnina rosa.
16. Centrifugare a 10.000 rpm per 1'. Eliminare l'eluato.
17. Aggiungere 500 µl di tampone RPE (già addizionato di Et-OH) a ciascuna colonnina rosa.

18. Centrifugare a 10.000 rpm per 1'. Eliminare l'eluato.
19. Ripetere il passaggio centrifugando a 10.000 rpm per 2'. Eliminare l'eluato.
20. Centrifugare a vuoto a 12.000 rpm per 1'.
21. Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 50 µl di acqua RNase free. Ripetere il passaggio 2 volte (volume finale 100 µl).
22. Centrifugare a 10.000 rpm per 1'.
23. Eliminare la colonnina e mettere 15-20' a -80°C prima di usare. Conservare a -20°C o -80°C.

Estrazione con Kit commerciale SIGMA+ Tampone MacKenzie

1. Accendere il termostato a 70°C.
24. Pesare 0,25 g di tessuto floematico.
25. Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello sterilizzati in autoclave. (Conservare a -20 °C o procedere al punto 4), oppure usando apparecchi frantumatori a sfere ('tipo tissuelyser').
26. Aggiungere 1,7 ml di tampone MacKenzie con 0,034 g/campione di sodio metabisolfito (2% finale) e mescolare
27. Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12.000 rpm per 6'.
28. Trasferire 1 ml di surnatante in eppendorf da 1,5 ml aiutandosi con un puntale cui è stata tolta la punta.
29. Aggiungere 100 µl di Sarkosyl 20% a ogni provetta.
30. Incubare a 70°C per 10' agitando periodicamente i tubi.
31. Centrifugare 5' a 13.000 rpm.
32. Trasferire il surnatante, facendo attenzione ai detriti cellulari, nelle Filtration column (ANELLO BLU) collocate nei tubi da 2 ml.
33. Centrifugare 5' a 13.000 rpm.
34. Buttare la colonnina e aggiungere nel lisato 350 µl di etanolo al 70% e miscelare bene pipettando 4-5 volte.
35. Trasferire 700 µl di soluzione nelle Binding column (ANELLO ROSSO) collocate nei tubi da 2 ml e centrifugare per 1' a 13.000 rpm.
36. Scartare il liquido raccolto e pulire il tubo su carta assorbente, riposizionare la colonna e ripetere finché tutta la soluzione (punto 9) non sia stata caricata sulla colonnina.

37. Aggiungere 500 µl di Washing solution 1 e centrifugare 1' a 13.000 rpm.
38. Scartare il liquido raccolto e pulire il tubo su carta assorbente, aggiungere 500 µl di Washing solution 2 (diluito con etanolo) e centrifugare 30'' a 13.000 rpm, ripetere il passaggio centrifugando 1'.
39. Scartare il liquido raccolto e pulire il tubo su carta assorbente, aggiungere 500 µl di Washing solution 2 e centrifugare 1' a 13.000 rpm.
40. Scartare il liquido raccolto.
41. Centrifugare 1' a 13.000 rpm.
42. Trasferire la colonnina in un nuovo tubo da 2 ml e aggiungere 50 µl di Elution solution e centrifugare 1' a 13.000 rpm. Ripetere con esso il passaggio di eluizione con altri 50 µl di Elution solution.
43. Conservare a -20 o -80°C.

Tampone MacKenzie pH 5 (per 1 litro di tampone)

Guanidina isotiocianato 4 M	472 g
Sodio Acetato 0,2 M	16,4 g
EDTA 25 Mm	9,2 g
PVP 40% 2,5 %	25 g

Portare a pH 5 e autoclavare

2.5 Preparazione del saggio (comune a tutti e 4 i metodi validati)

1. Indossare guanti puliti.
2. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili.
3. Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
4. Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

2.6 Sintesi cDNA (in comune per i protocolli 1-RT-PCR e 2-RT-PCR)

1. Preparare la seguente Mix RT-1 per ogni campione da saggiare più il controllo positivo, quello negativo ed il controllo acqua

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione (µL)	Concentrazione finale (20 µL)
dNTP	10 mM (2,5 mM each)	1 µl	0,5mM
random primers	50 µM	1 µl	2,5 µM
H ₂ O sterile		5 µl	
Totale mix RT-1		7 µl	

1. Dispensare 7 µl della mix RT-1 nei tubi precedentemente siglati.
2. Caricare 5 µl di estratto di RNA totale in ogni tubo (equivalente a circa 1 ng di RNA).
3. Incubare in termociclatore a 95°C per 5 minuti, quindi trasferire i campioni in ghiaccio.
2. Preparare la Mix RT-2 per ogni campione da saggiare più il controllo positivo, quello negativo ed il controllo acqua

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione (µL)	Concentrazione finale
First Strand buffer	5X	4 µl	1X
DTT	0,1 M	2 µl	10 mM
RNase-Inhibitor	40U/µl	1 µl	40 U/rxn
M-MLV	200 U/ µl	1 µl	10 U/rxn
Totale mix RT-2		8 µl	

4. Aggiungere 8 µl di Mix RT-2 ai 12 µl alla Mix RT-1.
5. Incubare a 42°C per 1 h e 70°C per 15' su termociclatore, quindi trasferire i campioni in ghiaccio e proseguire o congelare a -20°C.

2.7 Metodo diagnostico 1-RT-PCR

Primers (gene MP, prodotto amplificato di 302 bp):

GPG-5637F 5'-ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG-3'

GPG-5939R 5'-CTGAGAAGCATTGTCCCATC-3',

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione (µL)	Concentrazione finale
H ₂ O sterile	/	15,65 µl	/
Buffer	10X	2,75 µl	1X
MgCl ₂	50 mM	1,60 µl	3,2 mM
dNTPs	10 mM	0,75 µl	0,3 mM
primer F GPGV-5637F	10 µM	1,00 µl	0,4 mM
primer R GPGV-5939R	10 µM	1,00 µl	0,4 mM
Platinum Taq polimerasi	10 U/µl	0,25 µl	2,5 U/rxn
Totale		23,00 µl	

1. Preparare la seguente miscela di reazione per ogni campione da saggiare più il controllo positivo, quello negativo ed il controllo acqua.
2. Dispensare 23 µl di reazione in tubi precedentemente siglati.
3. Caricare in ogni tubo 2 µl di cDNA.
4. Avviare il termociclatore con il seguente ciclo di amplificazione.

	Temperatura	Durata	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5'	
Denaturazione	94°C	20''	
Annealing	56°C	20''	35
Estensione	72°C	30''	
Estensione finale	72°C	10'	
Step di blocco	10°C	10'	

Conservare le provette in frigorifero prima di caricare il gel.

2.8 Metodo diagnostico 2-RT-PCR

Primers (gene MP - CP, prodotto amplificato di 588 bp):

GPGV detforward 5' TGGTCTGCAGCCAGGGGACA 3';

GPGVdetreverse 5' TCACGACCGGCAGGGAAGGA 3'

Preparare la seguente miscela di reazione per ogni campione da saggiare più il controllo positivo, quello negativo ed il controllo acqua.

1. Dispensare 23 µl di reazione in tubi precedentemente siglati
2. Caricare in ogni tubo 2 µl di cDNA.

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume per reazione (µL)	Concentrazione finale
H ₂ O sterile	/	17,05 µl	/
Buffer	10X	2,75 µl	1X
MgCl ₂	50 mM	1,60 µl	3,2 mM
dNTPs	10 mM	0,75 µl	0,3 mM
primer F GPGV detforward	10 µM	0,30 µl	0,12 µM
primer R GPGVdetreverse	10 µM	0,30 µl	0,12 µM
Platinum Taq polimerasi	10 U/µl	0,25 µl	2,5 U/rxn
Totale		23,00 µl	

Avviare il termociclatore con il seguente ciclo di amplificazione.

	Temperatura	Durata	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	2'	
Denaturazione	94°C	30''	
Annealing	60°C	40''	35
Estensione	72°C	45''	
Estensione finale	72°C	7'	
Step di blocco	16°C	16'	

Conservare le provette in frigorifero prima di caricare il gel

Elettroforesi su gel di agarosio (per la visualizzazione dei prodotti ottenuti con i metodi 1 e 2 di RT-PCR)

1. Preparare il gel di agarosio 1,2 % in TBE 1X.
2. Centrifugare brevemente le provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento dell'apertura pericolose contaminazioni.
2. Caricare 10 ml del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 ml di loading buffer 6X. Cambiare il puntale ad ogni campione.

3. Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 100-1000 bp).
4. Correr il gel per circa 60 minuti a 120 V, facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 10' circa in una soluzione 0,5 mg/ml di etidio bromuro o con Gel Red.
6. Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O.
7. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V.

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

TBE 10X

Tris	108,00 g
Acido borico	55,00 g
0,5 M EDTA (pH 8)	40 ml
Portare ad 1litro con H ₂ O distillata e autoclavare a 121°C per 20'	

Soluzione di etidio bromuro 0,5 µg/ml

Etidio bromuro	50 µg
acqua	100 ml

Soluzione di Gel Red 1X

Gel Red	10.000 X
Acqua	100 ml
Diluire questa soluzione 1:10.000 in acqua	

2.9 Metodo diagnostico 3- real time RT-PCR

Primers e sonda Taqman (gene CP)

Forward primer: GPgV504F 20 5'GAATCGCTTGCTTTTTCATG 3'

Reverse primer: GPgV588R 22 5'CTACATACTAAATGCACTCTCC 3'

Probe: GPgV CP542 24 5'[**T.RED**]-AGACTAATGCTATCACGGCTTCGG-[BHQ2] 3'

oppure

Probe GPGV CP542 24 5'[**FAM**]-AGACTAATGCTATCACGGCTTCGG-[BHQ2] 3'*

* la sonda marcata **FAM** va utilizzata necessariamente con gli strumenti che richiedono il Rox. per gli altri l'uso di una delle due sonde è indifferente.

1. Impostare lo schema della piastra indicando le sigle riportate sui campioni e aggiungendo un controllo positivo, tre controlli negativi ed il bianco (acqua).
2. Impostare il ciclo termico sulla macchina.
3. Preparare la seguente miscela di reazione per ogni campione e aggiungendo un controllo positivo, tre controlli negativi ed il bianco (acqua).

Reagenti	Concentrazione iniziale	Volume per reazione (μL)	Concentrazione finale
dH ₂ O Rnase free		4,75	
Quanti Fast probe RT PCR Master Mix (cod .204554 Qiagen)**	2X	12,5	1X
Quanti Fast RT Mix		0,25	
Forward primer	10 μM	1	0,4 μM
Reverse primer	10 μM	1	0,4 μM
TaqMan probe	5 μM	0,50	0,1 μM
Subtotale		20	
RNA target		5	

4. Dispensare 20 μl di reazione in tubi o pozzetti.
5. Caricare 5 μl di RNA per campione.
6. Avviare la macchina con il seguente ciclo di amplificazione.

	Temperatura	Durata	N° di cicli
Retrotrascrizione	50°C	30'	
Denaturazione iniziale	95°C	5'	
Denaturazione	95°C	5"	
Annealing	60°C	30"	45

** La quantità di Rox da inserire nella Master mix va verificata in funzione del termociclatore di real time che si utilizza (vedi tabella manuale Qiagen). Nel caso in cui lo strumento in dotazione richieda un'alta quantità di Rox, è necessario acquistare la Quanti Fast Probe RT-PCR Master Mix (cod. 204454 Qiagen) che contiene già il Rox nel quantitativo necessario a tali strumenti.

2.10 Metodo diagnostico 4- real time RT-PCR

Primers e sonda Taqman (geni MP e CP)

GPGVTaqF: 5'CATTCTCTGTGAGGATAGGTGTCATG 3'

GPGVTaqR: 5'CAGACATAAGTGAACGGCCAATAT 3'

Sonda GPGV: 5'[FAM]-AGGCCTTTCAATTCA-[MGB] 3'

1. Impostare lo schema della piastra indicando le sigle riportate sui campioni aggiungendo un controllo positivo, tre controlli negativi ed il bianco (acqua)
2. Impostare il ciclo termico sulla macchina
3. Preparare la seguente miscela di reazione e dispensarla (24 µl in ogni pozzetto) sulla piastra

Reagenti	Concentrazione iniziale	Volume per reazione (µL)	Concentrazione finale
H ₂ O		3,03	
GoTaq® Probe qPCR Master Mix***	2X	12,50	1X
Forward primer	10 µM	2,00	0,8 µM
Reverse primer	10 µM	2,00	0,8 µM
TaqMan probe	4 µM	0,47	0,075µM
M-MLV (1:50)#	4 U/µl	4,00	0,64 U
Totale		24,00	

Caricare 1 µl di ogni estratto di RNA seguendo lo schema di caricamento impostato sulla macchina

	Temperatura	Durata	N° di cicli
Retrotrascrizione	48°C	30'	
Denaturazione iniziale	95°C	10'	
Denaturazione	95°C	15''	40
Annealing	60°C	60''	

***Aggiungere alla master mix il giusto quantitativo di Reference dye (CXR) in base al modello di termociclatore che utilizzate (vedi manuale Promega).

L'enzima viene fornito alla concentrazione di 200U/µl e deve essere quindi diluito 50 volte per ottenere la concentrazione iniziale di utilizzo. La diluizione deve essere effettuata per ogni analisi in quanto non è consigliato stoccare l'enzima diluito a -20°C.

2.11 Valutazione dei risultati metodi 1 e 2 di RT-PCR

Il saggio è da considerarsi positivo per GPGV se si verificano le seguenti condizioni :

il campione da analizzare presenta una sola banda all'altezza attesa (~ 302 bp per metodo 1 e ~ 588 bp per il metodo 2) confrontando la migrazione delle bande del marcatore, il controllo positivo presenta la banda attesa, il controllo negativo ed il controllo bianco (acqua) non presentano alcuna banda di amplificazione. Il campione sarà considerato negativo se non presenta alcuna banda di amplificazione mentre i controlli sono tutti come attesi.

La presenza di altre bande più deboli a varie altezze indica una reazione di amplificazione non specifica e il test deve essere ripetuto.

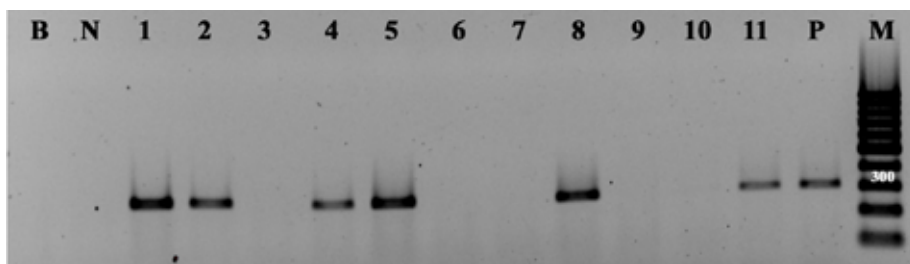


Foto 3 - Esempio di valutazione del risultato ottenuto con il metodo 1 RT-PCR

CONTROLLI: B = controllo bianco (acqua); N = controllo negativo; P = controllo positivo, M = Marker 100bp

CAMPIONI DA VALUTARE. 1, 2, 4, 5, 8 e 11 = campioni positivi a GPGV

3, 6, 7, 9, 10 = campioni negativi al GPGV

2.12 Valutazione dei risultati metodi 3 e 4 di real time RT-PCR

L'elevata sensibilità dei metodi di real time può rendere necessario, sulla base dell'esperienza fatta nel ring test, l'introduzione di un valore soglia utile a distinguere in modo oggettivo i campioni positivi da quelli negativi. Infatti, in caso di elevato numero di campioni da analizzare, anche i campioni sani possono generare delle curve di amplificazione negli ultimi cicli, con valori di Ct generalmente sostanzialmente differenti dai campioni infetti. Non è possibile tuttavia definire un valore di Ct soglia (*threshold cycle*) univoco per analizzare i risultati, ma per ogni singolo laboratorio e specifico protocollo è necessario utilizzare un metodo di definizione del cut-off. Tale ciclo soglia deve essere determinato sulla base di una prova preliminare da effettuarsi all'inizio di utilizzazione del protocollo, consistente nell'analisi di diluizioni seriali (almeno 5) di un campione positivo in cui, per ogni diluizioni, vengono fatte 5 ripetizioni (Mehle et al., 2013). Ottenuti tutti i risultati, si prendono in considerazione i Ct della diluizione in cui almeno una diluizione non ha generato curve. Il Ct più alto ottenuto, arrotondato per eccesso allo 0,5 superiore ed aumento di un ulteriore 0,5 sarà considerato il ciclo soglia. Se, come accade spesso, tutte e 5 le ripetizioni

della diluizione vengono negative, il Ct soglia sarà dato dal Ct più alto rilevato dalle 5 ripetizioni ottenute con la diluizioni precedente aumentato di 0,5. Per chiarezza si riporta il seguente esempio:

Diluizioni	Ct ripetizioni	Ct soglia
10 ⁻²	30-31-30-30-31	Non determinabile
10 ⁻³	33-33-34-33-33	Non determinabile
10 ⁻⁴	37-36-37-36-37	Non determinabile
10 ⁻⁵	nd-38-nd-37-37,5	38,5
	o	
	nd-nd-nd-nd-nd	37,5
10 ⁻⁶	nd-nd-nd-nd-nd	-

Una volta ottenuto, il ciclo soglia verrà utilizzato dal laboratorio ogni volta che viene eseguito quello specifico protocollo.

Valutazione dei risultati una volta stabilito il limite soglia (cut-off):

- considerare positivi tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di Ct < del cut-off

- considerare negativi i campioni con un valore di Ct > del cut-off

E' buona norma porre un'attenzione maggiore a quei campioni il cui Ct sia molto vicino al Ct soglia ($\pm 0,3$), in questo caso considerare i campioni dubbi e ripetere l'analisi con un altro metodo o rifare il campionamento.

Poiché il Ct soglia è influenzato da diversi fattori, fra cui i reagenti e la strumentazione utilizzata per l'esecuzione del test, è opportuno che venga sempre determinato internamente al laboratorio. Inoltre, considerato che il valore di Ct dipende anche dalla threshold, ovvero del valore di fluorescenza oltre il quale una reazione real time PCR viene considerata positiva, è opportuno che il laboratorio definisca contemporaneamente anche le modalità per la definizione della threshold. Tale valore viene calcolato automaticamente dal software dello strumento real time PCR, e quindi varia di volta in volta, oppure può essere prefissato dall'operatore e restare costante in ogni esperimento.

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Materiale utilizzato per la validazione e avvertenze generali

Per la validazione del protocollo molecolare per il rilevamento di GPGV sono stati utilizzati 44 isolati di riferimento, target e non target, composti da materiale legnoso sia di *Vitis vinifera* L. che di *Vitis* spp. (portainnesti) rappresentati come di seguito:

25 ISOLATI TARGET (viti sicuramente infetti da GPGV) di cui:

19 ad elevata carica virale

6 a bassa carica virale

13 ISOLATI NON TARGET (viti sicuramente non infetti da GPGV)

6 ISOLATI NON TARGET (viti della collezione ARNADIA infetti da GFLV, ArMV, GLRaV 1, 2 e 3, GVA, GVB e GFkV in infezione singola e/o mista)

N.B. i campioni TARGET definiti a bassa carica virale sono campioni che nelle prove preliminari effettuate hanno manifestato una bassa rilevabilità con la RT-PCR, ad esempio con bande deboli oppure campioni che non erano risultati positivi in RT-PCR ma che erano stati amplificati con metodi di real time RT-PCR.

Tutti gli isolati, messi a disposizione da FEM, UNIBO, CNR- IPSP di Bari e Torino, CREA-VIT, ERS Friuli Venezia Giulia, ACOVIT e dal CREA-PAV di Roma, sono stati preventivamente controllati per mezzo di saggio biologico e saggi molecolari di RT-PCR e real time RT-PCR in differenti laboratori.

3.2 Parametri di validazione ottenuti

3.2.1 Specificità analitica

La valutazione della specificità analitica è stata eseguita utilizzando un panel di 10 campioni target (RNA totale ottenuto da piante di *Vitis* naturalmente infette da GPGV) e da 10 campioni non-target così ripartiti: 4 *Vitis* esenti da GPGV e 6 *Vitis* affette in infezione singola e/o mista affette da GFLV, ArMV, GLRaV 1, 2 e 3, GVA, GVB e GFkV).

3.2.2 Sensibilità, specificità diagnostica, ripetibilità e riproducibilità

Tutti gli altri parametri di validazione sono stati ottenuti seguendo i criteri e le formule riportate nella premessa di questo volume:

Valori	1-RT-PCR	2-RT-PCR	3-Real Time RT-PCR	4-Real Time RT-PCR
Sensibilità analitica⁽¹⁾	10⁻³ 250 copie	10⁻² 250 copie	10⁻⁴ 12,5 copie	10⁻⁴ 12,5 copie
Specificità analitica	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 10 non-target valutati	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 10 non-target valutati	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 10 non-target valutati	Nessuna <i>cross reaction</i> sui 10 non-target valutati
Sensibilità diagnostica	77%	75%	85%	85%
Specificità diagnostica	100%	93%	99%	99%
Accuratezza	89%	84%	92%	92%
Ripetibilità⁽²⁾	97%	92%	97%	100%
Riproducibilità	96%	94%	99%	99%

⁽¹⁾La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da tal quale a 10⁻⁴ e da diluizione di un plasmide (diluito in estratto di RNA di piante sane) trasformato con inserto del gene target con le diluizioni 1000, 500, 250, 50 e 12,5 copie di plasmide.

⁽²⁾La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tutti i campioni nelle stesse condizioni del ring test.

3.3 Conclusioni

3.3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche

Alla luce dei risultati ottenuti dalla validazione delle diverse metodologie di diagnosi ed al fine di definire standard tecnici per la realizzazione delle analisi si riportano alcuni suggerimenti utili:

Saggio diagnostico	Caratteristiche
RT-PCR	Tempi di esecuzione: 12 ore per l'analisi di circa 25 campioni Aspetti vantaggiosi: economicità, elevata affidabilità e specificità, semplicità di esecuzione. Aspetti svantaggiosi: minore sensibilità della real time RT-PCR, manipolazione post-amplificazione (gel)
real time RT-PCR	Tempi di esecuzione: 7 ore per l'analisi di circa 25 campioni Aspetti vantaggiosi: maggiore sensibilità analitica; maggiore velocità di esecuzione; visualizzazione del risultato in tempo reale. Aspetti svantaggiosi: tecnica mediamente laboriosa, legata all'utilizzo di specifici reagenti e che richiede personale altamente specializzato; più difficoltà nell'interpretare in modo specifico i risultati (necessità spesso di un threshold)

3.3.2 Punti critici del protocollo

Il punto debole delle RT-PCR ed a maggior ragione delle real time RT-PCR è la loro estrema sensibilità, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi. Tuttavia tali metodologie, se non utilizzate scrupolosamente, possono dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, micro pipette contaminate, etc.). Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.

Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:

- organizzare il laboratorio di diagnosi molecolare, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per amplificazione e laboratorio per elettroforesi e dedicare un'apposita cappa ed un apposito set di pipette esclusivamente per la real time). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micro pipette dedicate

- a ciascuna fase. Fare molta attenzione al bancale di elettroforesi, dove si maneggiano amplificati;
- è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
 - usare solo acqua sterile RNasi-free (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
 - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TRNA);
 - usare solo puntali sterili con filtro;
 - al momento di caricamento del blocco del Termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse; se al termine di una PCR si ritrovano provette aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio.
 - dedicare particolare attenzione alla chiusura delle piastre di real time con l'apposita pellicola trasparente, o alla chiusura dei tubi nel caso si utilizzino questi ultimi.
 - controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (le Unità di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato).
 - mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della RT-PCR o della real time RT-PCR.
 - fare attenzione a caricare in modo uniforme le provette nel blocco del termociclatore, la chiusura non ermetica del coperchio può produrre temperature disomogenee con conseguenti reazioni di amplificazione parziali o non confrontabili tra i campioni.

Infine, nel caso ci fossero dei campioni che non danno risposte certe (bande dubbie in end point RT-PCR o curve che non mostrano il tipico andamento e/o ottenute negli ultimi cicli della real time RT-PCR) è consigliabile analizzare tali campioni in modo incrociato tra i due metodi.

Ringraziamenti

Oltre al Mipaaf, finanziatore del progetto, e a tutti i partecipanti al GdL e al Ring test, particolari ringraziamenti vanno all'ACOVIT ed al suo presidente, Umberto Malossini, per aver supportato tecnicamente ed economicamente parte del lavoro svolto per la messa a punto del protocollo GPGV.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BIANCHI G. L., DE AMICIS F., DE SABBATA L., DI BERNARDO N., GOVERNATORI G., NONINO F., PRETE G., MARRAZZO T., VERSOLATTO S., FRAUSIN C., 2015. Occurrence of Grapevine Pinot gris virus in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR. *EPPO Bulletin* **45**, 22–32.
- GIAMPETRUZZI A., ROUMI V., ROBERTO R., MALOSSINI U., YOSHIKAWA N., LA NOTTE P., TERLIZZI F., CREDI R., SILDARELLI P., 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv. Pinot gris. *VIRUS RESEARCH* **163**, 262-268.
- GLASA M., PREDAJŇA L., KOMÍNEK P., NAGYOVÁ A., CANDRESSE T., OLMOS A., 2014. Molecular characterization of divergent grapevine Pinot gris virus isolates and their detection in Slovak and Czech grapevines. *Arch Virol.* **159**, 2103-2107.
- GUALANDRI V., SILDARELLI P., 2016. Come riconoscere la virosi del Pinot Grigio (GPGV). *L'Informatore Agrario* **27/2016**, 51-52.
- GUALANDRI V., ASQUINI E., BRANCHEDI P., COVELLI L., BRILLI M., MALOSSINI U., BRAGAGNA P., SILDARELLI P., SI-AMMOUR A., 2016. Identification of herbaceous hosts of the Grapevine Pinot gris virus (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*.
- MALAGNINI V., DE LILLO E., SILDARELLI P., BEBER R., DUSO C., RAIOLA A., ZANOTELLI L., VALENZANO D., GIAMPETRUZZI A., MORELLI M., RATTI C., CAUSIN R., GUALANDRI V., 2016. Transmission of grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Arch Virol.* **161**(9), 2595-9.
- MEHLE, N., N. PREZELI, M. HREN, J. BOBEN, K. GRUDEN, M. RAVNIKAR, & M. DERMASTIA, 2013. A real-time PCR detection system for the Bois noir and Flavescence dorée phytoplasmas and quantification of the target DNA. In *Phytoplasma*, 253-268. Humana Press.
- SILDARELLI P., GIAMPETRUZZI A., MORELLI M., MALOSSINI U., PIROLO C., BRANCHEDI P., AND GUALANDRI V., 2015. Genetic Variability of Grapevine Pinot gris virus and Its Association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. *Phytopathology* **105**, 555-63.

ALLEGATO I Strumentazione , materiali e reagenti necessari

Strumentazione, materiali e reagenti necessari per i protocolli descritti

1 - Metodo diagnostico RT-PCR da Glasa *et al.*, 2014

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti materiali:

- Mortai, pestelli, bisturi, lame e azoto liquido.
- kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 Qiagen e Spectrum Plant Total RNA Kit cod. STRN50-1KT SIGMA.
- Trattamento con DNAsi: Dnasi (Life Technologies cod. 18068-015).
- Prodotti per la trascrittasi inversa: dNTP (Sigma cod. D7295); random esameri (Promega Cod C1181); First Strand buffer (Invitrogen cod. 28025-013); DTT (Invitrogen cod. 28025-013); RNase-OUT (Invitrogen cod. 10777-019); M-MLV – reverse transcriptase (Invitrogen cod. 28025- 013).
- Prodotti per l'amplificazione dell'acido nucleico (cDNA) Platinum Taq Polimerase (Invitrogen cod10966-018) primers specifici: sintetizzati da Invitrogen Ltd.
- Termociclatori: Biometra T-Professional, Biometra T3000, Eppendorf AG22331 Mastercycler, BioRad T100, MJ PTC200, BioRad iCycler.
- Transilluminatori: Biorad Geldoc 2000, Eppendorf UVIDoc HD5-20MX, Uvitec.
- Ladder per DNA: Bench Top 100bp DNA ladder 100 lanes Promega Corporation cod. G 7541.

2 - Metodo diagnostico RT-PCR da Saldarelli *et al.*, 2015

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti materiali:

- Mortai, pestelli, bisturi, lame e azoto liquido.
- kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 Qiagen e Spectrum Plant Total RNA Kit cod. STRN50-1KT SIGMA.
- Trattamento con DNAsi: Dnasi (Invitrogen cod. 18068-015).
- Prodotti per la trascrittasi inversa: dNTP (Sigma cod. D7295); random esameri (Promega Cod C1181); First Strand buffer (Invitrogen cod. 28025-013); DTT (Invitrogen cod. 28025-013); RNase-OUT (Invitrogen cod. 10777-019); M-MLV – reverse transcriptase (Invitrogen cod. 28025- 013).
- Prodotti per l'amplificazione dell'acido nucleico (cDNA) Platinum Taq Polimerase (Invitrogen cod10966-018) primers specifici: sintetizzati da

Invitrogen Ltd.

- Termociclatori: Biometra T-Professional, Biometra T3000, BioRad T100, MJ PTC200, BioRad iCycler.
- Transilluminatori: Biorad Geldoc 2000.
- Ladder per DNA: Bench Top 100bp DNA ladder 100 lanes Promega Corporation cod. G 7541.

3 - Metodo diagnostico real time RT-PCR da Bianchi *et al.*, 2015

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti materiali:

- Mortai, pestelli, bisturi, lame e azoto liquido
- kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 Qiagen e Spectrum Plant Total RNA Kit cod. STRN50-1KT SIGMA
- Prodotti per la trascrittasi inversa e amplificazione: Quanti Fast Probe RT-PCR+ ROX VialKit (cod. 204554 Qiagen) per strumenti che non necessitano del reference rox o che ne richiedono bassi livelli di concentrazione, Quanti Fast Probe RT-PCR (cod. 204554 Qiagen) per strumenti che richiedono alti livelli di Rox; primers specifici: sintetizzati da Invitrogen Ltd; sonda Taqman specifica: sintetizzati da Sigma Aldrich.
- Termociclatori real time: Biorad CFX 96, AB Stepone plus, AB 7500 fast, BioRad Chromo4.

4 - Metodo diagnostico real time RT-PCR da Ratti *et al.*, 2015

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti materiali:

- Mortai, pestelli, bisturi, lame e azoto liquido.
- kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 Qiagen e Spectrum Plant Total RNA Kit cod. STRN50-1KT SIGMA
- Prodotti per la trascrittasi inversa e amplificazione : GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2X, Promega); primers specifici: sintetizzati da Invitrogen Ltd; sonda Taqman specifica: sintetizzati da Biofab Research
- Termociclatori real time: Roche Light Cycler 480, Biorad CFX 96, AB 700SDS, AB 7300, AB 7500 fast, BioRad Chromo4.

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
CLAVIBACTER MICHIGANENSIS subsp
MICHIGANENSIS
DA SEME**

**¹N. Pucci, ²V. Catara, ³M. Scortichini, ⁴E. Stefani, ¹G. Perez,
¹S. Loreti.**

¹Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria -
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
(CREA-DC)

² Dipartimento di Scienze delle produzioni Agrarie e Alimentari-Università
degli Studi di Catania, Catania

³ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria-
Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura
(CREA-OFA)

⁴ Dipartimento di Scienze della Vita-Università di Modena e Reggio Emilia,
Modena

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Ospite
- 1.2 Sintomatologia
- 1.3 Descrizione del patogeno
- 1.4 Epidemiologia e trasmissione
- 1.5 Normativa

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Premessa
- 2.2 Prove valutative gruppo di lavoro
 - 2.2.1 Preparazione estratto semi
 - 2.2.2 Estrazione DNA
 - 2.2.3 PCR specifiche
 - 2.2.4 Immunofluorescenza
- 2.3 Prove valutative Inter-Laboratorio
 - 2.3.1 Procedura A
 - 2.3.1.1 Preparazione estratto semi (CF-A)
 - 2.3.1.2 Estrazione DNA
 - 2.3.1.3 PCR specifiche
 - 2.3.2 Procedura B
 - 2.3.2.1 Preparazione estratto semi (ES)
 - 2.3.2.2 Immunofluorescenza
 - 2.3.2.3 Estrazione DNA
 - 2.3.2.4 PCR specifiche

3. DATI DI VALIDAZIONE

- 3.1 Valori di validazione
- 3.2 Prove valutative gruppo di lavoro
 - 3.2.1 Sensibilità analitica
 - 3.2.2 Specificità analitica
- 3.3 Prove valutative inter-laboratorio (inclusività ed esclusività)
 - 3.3.1 Campioni utilizzati per la validazione
 - 3.3.2 Metodi molecolari
 - 3.3.3 IF
- 3.4 Conclusioni

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I -Strumenti, reagenti, materiali

Allegato II- Tamponi e terreni di crescita

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Davis et al.
Tassonomia	PHYLUM : Actinobacteria. Classe: <i>Actinobacteria</i> Ordine: Actinomycetales Famiglia: Microbacteriaceae
Avversità	Cancro batterico del pomodoro
Sinonimi e acronimi	<i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>michiganense</i> (Smith) Dye & Kemp <i>Corynebacterium michiganense</i> (Smith) Jensen (Cmm)
Note	Patogeno incluso nella lista A2 dell'EPPO (OEPP 2013).

1.1 Ospite

La pianta ospite di maggiore importanza economica è il pomodoro, tuttavia il patogeno è stato segnalato su alcune solanacee spontanee quali *Solanum douglasii*, *S. nigrum* e *S. triflorum*.

1.2 Sintomatologia

Le foglie delle piante infette avvizziscono e si ripiegano a doccia verso l'alto per poi ingiallire e seccare.

Sul fusto compaiono striature longitudinali di colore giallo-brunastro in corrispondenza delle quali si ha la comparsa di fenditure o cancri approfondentisi anche fino al midollo. Praticando una sezione trasversale degli organi infetti si osserva una colorazione brunastra del tessuto vascolare ed un aspetto cavernoso del midollo.

Sezionando il fusto sia trasversalmente sia a livello dell'inserzione sul fusto dei piccioli fogliari sono osservabili imbrunimenti che per la loro forma prendono il nome di "traccia a ferro di cavallo".

Sui frutti colpiti per via vascolare la polpa appare disgregata ed ingiallita con la presenza talvolta di cavità scure al centro.

Le infezioni non sistemiche, generalmente secondarie e tardive, danno origine a pustole biancastre su fusti e piccioli e a piccole lesioni cancerose bruno-nerastre circondate da un alone biancastro ("maculature ad occhio di uccello") sui frutti.

1.3 Descrizione del patogeno

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* è un batterio aerobio, Gram positivo, non sporigeno. Condizioni ottimali per il suo sviluppo sono temperature sui 26-28 °C concomitanti ad alti tenori di umidità.

1.4 Epidemiologia e trasmissione

Benchè il batterio possa sopravvivere vitale nel terreno e nei residui della vegetazione o su piante spontanee dei generi *Solanum* e *Nicotiana*, è attraverso il seme che si attuano sia la sopravvivenza che la disseminazione a breve e grande distanza. Il patogeno può localizzarsi nel seme internamente e/o esternamente e da queste sedi invadere poi l'ospite diffondendosi lungo il sistema vascolare. In caso di infezione locale la penetrazione avviene invece attraverso microlesioni e/o lacerazioni causate principalmente da insetti o dall'uomo.

1.5 Normativa

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Categoria fitosanitaria: incluso nella lista A2, EPPO A2 list n° 50, EU Annex designation II/A2

2. PROTOCOLLI DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali. Esso fornisce i risultati di validazione di alcuni metodi per la diagnosi del batterio fitopatogeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* da seme di pomodoro. L'uso di protocolli diagnostici validati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse condizioni operative. I metodi sono stati validati secondo le disposizioni ISO 16140:2003, ISO 17025 ed EPPO Diagnostic PM7/98 (EPPO 2010). Per la definizione di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato. Gli strumenti, i materiali ed i reagenti necessari sono riportati negli Allegati 1 e 2. La scelta delle metodologie diagnostiche da validare è derivata dall'attività congiunta di un Gruppo di lavoro di esperti che hanno valutato la sensibilità e specificità analitica dei metodi, costituito da:

- Dott.ssa Stefania Loreti, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria-Centro di Ricerca Difesa e Certificazione (ex-CREA-PAV, gruppo Coordinatore)

- Dott. Marco Scortichini, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria-Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (ex-CRA-FRU)
- Prof.ssa Vittoria Catara -Università di Catania (UNICT)
- Prof. Emilio Stefani -Università di Modena e Reggio Emilia (UNIMORE).

Successivamente sono stati definiti i parametri di sensibilità e specificità diagnostiche, l'accuratezza relativa, l'accordanza e la concordanza attraverso l'effettuazione di un ring test nazionale (inter-laboratorio), al quale hanno partecipato i seguenti laboratori:

- Servizio Fitosanitario Regionale (SFR) Emilia-Romagna Referente A. Calzolari
- SFR Friuli-Venezia Giulia Referente G. Bianchi
- SFR Piemonte Referenti G. Mason C Morone
- SFR Sardegna Referente M. Nannini
- SFR Lombardia Referente F. Gaffuri
- SFR Campania Referente D. Benchi
- CAV-Centro Attività Vivaistiche (Tebano) Referenti M. Cardoni, M. Vibio
- CREA- SCS Referente O. Sigillo
- CREA-PAV Referente S. Loreti

La stesura del protocollo per l'esecuzione del ring test è stata effettuata presso il CREA-DC (ex CREA-PAV) con l'obiettivo di confrontare i due protocolli (di seguito riportati come A e B) seguendo le indicazioni descritte nell'EPPO standard PM7/42(2) Cmm (EPPO, 2013) integrandoli con due saggi molecolari utilizzati come screening preliminare.

2.2 Prove valutative gruppo di lavoro

2.2.1 Preparazione estratto semi

Il calcolo della sensibilità analitica è stato effettuato dai partecipanti al gruppo di lavoro a partire da un estratto di semi di pomodoro contaminato con concentrazioni calibrate del patogeno a partire da 10^7 ufc/ml fino a 10^0 ufc/ml in tre ripetizioni e dall'estratto ottenuto da campioni di 2000 semi contaminati rispettivamente con 1, 3, 5, 10 semi infetti da Cmm e trattati secondo il seguente protocollo:

1. Mantenere i semi in frigorifero (4 °C) per una notte ad imbibire in presenza di 20 ml di tampone PBS contenente Tween 0.1%
2. Frantumare i semi inserendoli in una busta Bioreba con filtro e schiacciando con martello di gomma.

3. concentrare l'estratto di semi per centrifugazione (6000g per 10 min)
4. risospendere il pellet in 2.5 ml di tampone PBS
5. metà di questo volume viene conservato glicerolo* 20-30% a -80 ° C
6. la parte restante viene utilizzata per i successivi metodi di isolamento su mezzi generici e semi-selettivi, molecolari (estrazione DNA, PCR specifiche) ed IF realizzati secondo le procedure di seguito illustrate.

**Rimozione del glicerolo*

Il glicerolo può essere rimosso (secondo la Direttiva 2006/56/CE e il D.M. 28-1-2008 per *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) dal campione mediante aggiunta di un ugual volume di tampone per sedimento, centrifugazione per 15 minuti a 7000 g e risospensione del pellet in un volume di tampone per sedimento pari al volume di partenza del campione stesso.

L'isolamento è realizzato sui mezzi semi-selettivi Dhavanthari e mSCM e sul mezzo generico YPGA. Aliquote di 50 µl di ciascun campione e le sue diluizioni decimali (10^{-1} a 10^{-6}) vengono piastrate sui due terreni ed incubate a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ per 14 giorni.

I ceppi di riferimento Cmm NCPBP 2979 e PVCT 156.1.1 vengono utilizzati per "guidare" la selezione di colonie Cmm-like. Le colonie sospette e i ceppi di riferimento vengono piastrati su terreno generico YPGA ed incubati a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ per 48-72 ore per l'identificazione. Tali colonie saranno identificate mediante saggi specifici. In particolare per ciascun campione sono selezionate 3 colonie Cmm-like. Eventuali colonie Cmm-like selezionate vanno conservate a +4°C in terreno colturale o a -80 °C in sospensione batterica con glicerolo al 20-30%, per essere utilizzate nel caso di esito negativo delle colonie Cmm-like saggiate.

2.2.2 Estrazione del DNA

Si utilizza il kit QIAGEN DNeasy® Blood e Tissue Kit su 500 µl di estratto risospeso in PBS. Esso viene centrifugato per 5 minuti a 10.000 rpm per l'ottenimento di un pellet. Viene di seguito indicata la procedura del produttore, con alcune modifiche.

- Risospendere il pellet in 180 µl del buffer + lisozima (N.B. aggiungere al buffer enzymatic lysis fornito il lisozima immediatamente prima dell'uso e vortexare)
- Incubare a 37 °C per 30 minuti.
- Aggiungere 25 µl di proteasi K e 200 µl del buffer AL; quindi agitare con vortex.
- Incubare a 56 °C per 30 minuti.
- Aggiungere 200 µl di etanolo (100%) e agitare con vortex.
- Trasferire la soluzione (SA) nella colonnina inserita in un tubo (forniti) e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.
- Scartare il filtrato e sistemare la colonnina in un nuovo tubo (fornito).
- Aggiungere 500 µl del Buffer AW1 e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.

- ●●Scartare il filtrato e sistemare la colonnina in un nuovo tubo (fornito).
- Aggiungere 500 µl del buffer AW2 e centrifugare a 14000 rpm per 1 minuto per asciugare la membrana.
- Scartare il filtrato e sistemare la colonnina in un nuovo tubo.
- Aggiungere 200 µl buffer AE direttamente nella membrana della colonnina, attendere 10 minuti.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto per l'ottenimento di un eluito finale.

2.2.3 PCR specifiche

Il DNA estratto dai campioni mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR. I controlli, qualora si parta dalla colonia pura, devono essere trattati con la procedura di denaturazione termica.

Denaturazione termica

1. prelevare un'ansata di coltura (o una piccola colonia batterica) di 24 – 48 ore
2. sospenderla in 100 µl di acqua distillata sterile
3. mescolare ripetutamente per inversione.
4. incubare a 95 -100°C per 15 min, poi trasferire subito in ghiaccio.
5. quando le sospensioni denaturate si sono raffreddate, centrifugare a 6000 g per 1 minuto.
6. utilizzare 5 µl di surnatante, contenente il DNA, nella reazione di amplificazione.

CMM5/6 Dreier *et al.* (1995)

La Taq DNA polimerasi è la GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega.

I primer suggeriti sono i seguenti (secondo Dreier *et al.*, 1995):

CMM 5 5'-GCG AAT AAG CCC ATA TCA A -3'
CMM 6 5- CGT CAG GAG GTC GCT AAT A -3'

La dimensione attesa dell'amplicone è di 614 bp.

Aliquotare 45 µl della Master mix preparata secondo lo schema:

reagente	C _{iniz}	V _{reaz}	C _{finale}
dH ₂ O		25,6µl	
PCR buffer	5x	10 µl	1x
MgCl ₂	25 mM	3µl	1,5 mM
dNTPs	10 mM	1µl	0,2 mM
primer CMM5	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
primer CMM6	10 µM	2,5 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimerasi	5 U/µl	0,4 µl	0,04 U/µl= 2 U

Aggiungere a ciascuna aliquota 5 µl di templat.

Il programma è il seguente:

denaturazione iniziale: 96°C / 2 min
 30 cicli: 96°C / 60 sec
 55°C / 90 sec
 72°C / 60 sec
 estensione finale: 72°C / 10 min, poi mantenere a 4°C.

Elettroforesi:

Preparare un gel di agarosio 1,5% in TAE 1X; caricare nei pozzetti 12-20 µl di ciascun prodotto della PCR; applicare una tensione elettrica intorno ai 100 V per circa 45 minuti.

Interpretazione del risultato della prova PCR

- i) Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il controllo acqua è negativo e se nei controlli positivi si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm (614 bp).
- ii) Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione è positivo.
- iii) Se non si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm, il campione è negativo.

PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) modificato secondo Woudt (*dati non pubblicati*)

Questo metodo è stato saggiato con due enzimi:

- 1) Taq DNA polimerasi GoTaq® Flexi DNA Polymerase, (Promega).
- 2) Taq DNA polimerasi 'hot start' Immolase™ (Bioline).

I primer indicati sono i seguenti:

PSA-8 5'- TTG GTC AAT TCT GTC TCC CTT C -3'
 PSA-R 5'- TAC TGA GAT GTT GTT TCA CTT CCC C -3'

La dimensione attesa dell'amplicone 268 bp.

Aliquotare 22,5 della Master mix preparata secondo lo schema:

reagente	C _{iniz}	V _{reaz}	C _{finale}
dH ₂ O		12,8 µl	
PCR buffer	5 x	5 µl	1x
MgCl ₂	25 mM	1,5µl	1,5 mM
dNTPs	10 mM	1 µl	0,4 mM
PSA-8	5µM	1 µl	0, 2 µM
PSA-R	5µM	1µl	0, 2 µM
Taq DNA Polimerasi	5 U/µl	0,2 µl	0,04 U/µl = 3 U

Aggiungere a ciascuna aliquota 2,5 µl di templat.

Il programma è il seguente:

denaturazione iniziale: 95°C / 5 min
 95°C / 15 sec
 35 cicli: 63°C / 15 sec
 72°C / 45 sec
 estensione finale: 72°C / 5 min, poi mantenere a 4°C.

Nel caso dell'utilizzo della Taq DNA polimerasi 'hot start' Immolase™ (Bioline) la fase iniziale di denaturazione viene allungata a 10 min anziché 5.

Elettroforesi:

Preparare un gel di agarosio 2% in TAE 1X; caricare nei pozzetti 12-20 ml di ciascun prodotto della PCR; applicare una tensione elettrica di 100 V per circa 45 minuti.

Interpretazione del risultato della prova PCR

- i) Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il controllo acqua è negativo e se nei controlli positivi si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm (268 bp).
- ii) Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione è positivo.
- iii) Se non si evidenzia il frammento di DNA specifico per Cmm, il campione è negativo.

2.2.4 Immunofluorescenza (IF) (EPPO standard PM7 / 42 (1), 2004)

La procedura di seguito proposta è adatta per il kit di Adgen test fluoriscan IF Kit (1113-8) (Adgen Phytodiagnostics); si raccomanda di preparare i vetrini in doppio e conservarne una serie per un eventuale secondo uso.

Nota: Misurare con lo spettrofotometro l'assorbanza di una sospensione di *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cresciuto 48 ore su NA e preparata in tampone fosfato PB (paragrafo A.1): $A_{600} = 0,2$ OD corrisponde a $1-2 \times 10^8$ cfu/ml.

1. Preparare vetrini separati del controllo positivo con una sospensione di 10^6-10^5 cellule/ml del ceppo di riferimento. Usare un vetrino in ciascuna serie di prove.
2. Preparare una diluizione decimale (1:10) del campione, risospeso nel tampone per sedimentazione.
3. Trasferire su ciascuna fila di pozzetti del vetrino un volume standard di ES-tal quale e della diluizione decimale (per es. 20 µl è adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro). Aliquotare la sospensione controllo in un vetrino separato.
4. Far evaporare completamente le goccioline a temperatura ambiente overnight o mediante riscaldamento alla temperatura di 37°C per due ore.
5. Fissare le cellule batteriche al vetrino passandolo sulla fiamma.
6. I vetrini pronti possono essere conservati a 4°C fino al momento dell'utilizzo, entro qualche giorno.
7. Preparare il tampone IF in quantità sufficiente per i lavaggi.

8. Preparare la diluizioni dell'anticorpo primario come indicato dal produttore in tampone IF. vedi fig. pag. 229
 9. Coprire completamente ciascun pozzetto di saggio con l'appropriata diluizione dell'anticorpo (come indicato in figura). Il volume di anticorpo messo su ciascun pozzetto deve essere almeno equivalente al volume di estratto (cioè per es. 20 µl).
 10. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C.
 11. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare brevemente con tampone IF.
 12. Lavare immergendo per 15 minuti nel tampone IF, con una leggera agitazione.
 13. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.
 14. Preparare la diluizione 1:160 dell'anticorpo secondario coniugato di FITC, che andrà distribuita su tutti i pozzetti di tutti i vetrini.
 15. Coprire i pozzetti di saggio con la diluizione di anticorpo secondario coniugato di FITC. Il volume di coniugato messo sui pozzetti deve essere identico al volume dell'anticorpo primario (cioè per es. 20 µl).
 16. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C, al riparo dalla luce.
 17. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare brevemente con tampone IF.
 18. Lavare (al riparo dalla luce) immergendo per 15 minuti nel tampone IF, con leggera agitazione.
 19. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.
 20. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di un liquido di montaggio, ad esempio glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato*, su ciascun pozzetto e chiudere con un vetrino coprioggetti.
 21. Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione del FITC. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro.
- * In alternativa può essere utilizzato il mezzo di montaggio abitualmente in uso presso il laboratorio.
- liquido di montaggio glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato*:
- Questo liquido si prepara con glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato formato della rimozione del glicerolo a pH 9, nelle proporzioni 9:1. La soluzione finale così ottenuta va conservata a 4 °C, con l'accortezza di rinnovarla ogni 6-8 mesi.

Interpretazione del risultato della colorazione IF

1. Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza verde brillante.
- Nota:* Il saggio IF deve essere ripetuto se la colorazione è anomala o se il vetrino di controllo non risulta colorato.

2. Passare ora ad osservare i vetrini di saggio. Verificare prima l'assenza di cellule fluorescenti nei pozzetti di controllo PBS. Cellule fluorescenti nel controllo PBS indicano un legame non specifico del coniugato o contaminazione.
Nota: in questo caso ripetere il saggio.
3. Facendo riferimento ai vetrini di controllo, verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di Cmm nei pozzetti di saggio dei vetrini. L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di anticorpo.
 - › Per ciascun campione in cui non vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è negativo.
 - › Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è positivo.
 - › Le cellule che presentano una colorazione incompleta o aberrante o una debole fluorescenza devono essere ignorate, a meno che non siano numerose. In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio.

2.3 Prove valutative inter-laboratorio

2.3.1 Procedura A

2.3.1.1 Preparazione estratto semi (concentrato finale CF-A)

Aggiungere ad ogni campione di semi 4 ml tampone fosfato sterile 50 mM (PB) per g di seme lasciando imbibire a 2-6°C per 16-24 h; trasferire i campioni in buste Bioreba e rompere con cautela i semi con martello di gomma fino a quando il tampone di estrazione non diviene lattiginoso (3-4 min) (la garza di nylon presente all'interno del sacchettino Bioreba impedirà la fuoriuscita di detriti vegetali). Lasciar riposare il materiale per 5 min a T ambiente, trasferire 10 ml dell'estratto da seme e qualora risultassero presenti detriti o impurità, centrifugare a bassa velocità (180 g per 5 min) e prelevare il surnatante. Lasciar decantare il surnatante e centrifugarlo a 9000 g per 20 min a 4°C. Risospendere il pellet con 1 ml di 50 mM tampone fosfato (PB) per ottenere un concentrato finale (CF-A) da suddividere in 2 eppendorf da utilizzare nei successivi step.

Le due aliquote vanno addizionate del 30% di glicerolo qualora debbano essere mantenute a -20°C a medio-lungo termine per ulteriori accertamenti.

Per identificare possibili inibitori della reazione di amplificazione presenti nella matrice vegetale viene preparato un campione di controllo (ottenuto contaminando l'estratto dei semi con l'aggiunta di cellule del ceppo Cmm di riferimento NCPPB 2979^T con una concentrazione finale di 1000-5000 cellule per ml di PBS) che verrà trattato come gli altri.

2.3.1.2 Estrazione del DNA

Si utilizza il kit QIAGEN: DNeasy® Blood e Tissue Kit su 500µl di concentrato finale CF-A precedentemente centrifugato per 5 minuti a 10.000 rpm per l'ottenimento di un pellet. I campioni sono stati saggiati con i metodi successivi seguendo le procedure riportate nei rispettivi paragrafi indicati (paragrafo 2.2.2.).

2.3.1.3 PCR specifiche

(come descritto nel paragrafo 2.2.3.)

Il DNA estratto dal concentrato finale del campione mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR. I controlli, qualora si parta dalla colonia pura, devono essere trattati con la procedura di denaturazione termica (paragrafo 2.2.3.).

CMM5/6 Dreier *et al.* (1995)

(come descritto nel paragrafo 2.2.3.).

PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) modificato secondo Woudt (dati non pubblicati)
(come descritto nel paragrafo 2.2.3.).

2.3.2 Procedura B

2.3.2.1 Preparazione estratto semi (ES-B)*

Aggiungere ad ogni campione 7,5 mL 0.01M PBS per g di seme lasciando imbibire i semi a temperatura ambiente per 3 giorni in agitazione 120-150 rpm.

Questo passaggio consente la moltiplicazione di cellule di Cmm, è quindi opportuno monitorare la temperatura che deve essere compresa fra 20 e 25 °C. I semi devono essere completamente immersi nel buffer assicurandone il movimento all'interno del contenitore. Trasferire in sacchetti con filtro e lasciare sedimentare i semi per raccogliere l'estratto finale (ES).

L'ES va addizionato del 30% glicerolo qualora debba essere mantenute a -20 °C a medio-lungo termine per ulteriori accertamenti.

*Non prevede l'ottenimento di un concentrato finale in quanto la procedura di 'soaking' permette la moltiplicazione di cellule di Cmm.

2.3.2.2 Immunofluorescenza (IF)

In questa fase del protocollo viene analizzato l'estratto da seme ottenuto secondo la procedura illustrata, eventualmente privato del glicerolo, ed il controllo, seguendo le procedure precedentemente riportate nel paragrafo 2.2.4.

2.3.2.3 Estrazione del DNA

Si processano 500 µl di ciascun ES-B con il kit QIAGEN: DNeasy® Blood e Tissue Kit centrifugando per 5 minuti a 10000 rpm per l'ottenimento di un pellet.

I campioni sono stati saggiati con i metodi successivi seguendo le procedure precedentemente riportate nei rispettivi paragrafi.

Anche in questo caso per identificare possibili inibitori della reazione di amplificazione presenti nella matrice vegetale viene preparato un campione di controllo (seguito la procedura indicata nel paragrafo 2.3.2) che verrà analizzato come gli altri.

2.3.2.4 PCR specifiche

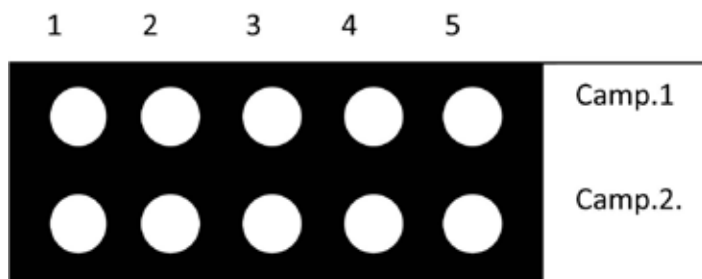
Il DNA estratto dall'ES-B del campione mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR.

Per i controlli, qualora si parta dalla colonia pura, occorre procedere all'estrazione del DNA attraverso la denaturazione termica come descritto nel paragrafo 2.2.3

CMM5/6 Dreier *et al.* (1995)

Come descritto nel paragrafo 2.2.3.

PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) modificato secondo Woudt (dati non pubblicati)
Come descritto nel paragrafo 2.2.3.



3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Valori di validazione

I seguenti parametri di validazione sono stati elaborati secondo i documenti EPPO PM 7/98 (2) ed Iso 16140:2003(E): sensibilità analitica, specificità analitica, sensibilità diagnostica, specificità diagnostica, accuratezza relativa, accordanza e concordanza.

3.2 Prove valutative gruppo di lavoro

3.2.1 Sensibilità analitica (LOD) dei metodi di isolamento, molecolari ed IF

Il limite di rivelazione (LOD), espresso in ufc/ml viene di seguito riportato per ciascun metodo:

Isolamento su mezzi generici e semi-selettivi

ufc/ml	Isolamento su YPGA	Isolamento su Dhavanthari	Isolamento su mSCM
LOD	10 ³ 3:2000	10 ⁶ 3:2000	10 ⁴ 5:2000

IF e metodi molecolari

ufc/ml	IF*	PCR Pastrick and Rainey, 1999	PCR Dreier et al.,1995	PCR Pastrick and Rainey, 1999**
LOD	10 ³ 3:2000	10 ⁵ 1:2000	10 ⁵ 1:2000	--- 1:2000

*I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

- Kit per immunofluorescenza: Neogen Phytodiagnosics (1113-18) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Fluoriscan IF Kit;
- Vetrini per immunofluorescenza: vetrini multipli per microscopio, diametro pozzetti 6 mm Menzel-Gläser Diagnostica e Thermo Scientific cod. X1XER308B#MNZ; vetrini copri oggetto 24 x 60 mm Prestigi di Vemi S.r.l.;
- Microscopio a fluorescenza: Zeiss, Axioskop 2 plus - HAL 100 e Nikon Eclipse 80i.

**Hot Start Immobilase™ DNA Polymerase

3.2.2 Specificità analitica (esclusività ed inclusività)

La specificità analitica è stata valutata a partire da una collezione di ceppi batterici ‘target’ e ‘non target’ (tabelle 1 e 2) utilizzando le tecniche di IF e molecolari precedentemente illustrate (paragrafi 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4).

TABELLA 1 - Isolati ‘target’ (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) provenienti da diversi areali geografici:

“ TARGET”	PROVENIENZA
NCPPB 2979T	UNGHERIA
ISPAVe 1045	SICILIA
NCPPB 382	UK
PVCT 150.8	ITALIA (RG)
PVCT 156.1.1	ITALIA (RG)
PVCT 161.6.1	ITALIA (RG)
PVCT 163.2.3	ITALIA (RG)
PVCT 172.1.1	ITALIA (RG)
PVCT 317.4	EMILIA ROMAGNA
PVCT 342	EMILIA ROMAGNA
PVCT 171.1.1	ITALIA (RG)
PVCT 07265N1	BATTIPAGLIA(SA)

TABELLA 2 - Isolati ‘non target’ rappresentati da isolati batterici appartenenti a differenti generi:

“NON TARGET”	PROVENIENZA
C. MICHIGANENSIS SUBSP. NEBRASKENSIS	NCPPB2581 T STATI UNITI
C. MICHIGANENSIS SUBSP. TESSELLARIUS	NCPPB3664 T STATI UNITI
C. MICHIGANENSIS SUBSP. SEPEDONICUS	NCPPB 2140 REPUBBLICA CECA
PSEUDOMONAS CORRUGATA	CFBP5454 ITALIA
P. MEDITERRANEA	CFBP5447 ITALIA
P. SYRINGAE PV TOMATO	PVCT28.3.1 ITALIA
RALSTONIA SOLANACEARUM	NCPPB 325 STATI UNITI
NON IDENTIFICATO	184.2 ITALIA
NON IDENTIFICATO	184.3 ITALIA
NON IDENTIFICATO	184.4 ITALIA
NON IDENTIFICATO	184.5 ITALIA

L'IF ha prodotto due risultati debolmente positivi con i seguenti ceppi batterici 'non-target':

NCPPB 2581 *C. michiganensis*. subsp. *nebraskensis*

NCPPB 2140 *C. michiganensis*. subsp. *sepedonicus*

e tre risultati debolmente positivi con il seguente ceppo batterico 'non target':

NCPPB 3664 *C. michiganensis*. subsp. *tesselarius*

La PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) ha prodotto un risultato falso positivo con i seguenti ceppi batterici 'non target':

NCPPB 2581 *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

NCPPB 2140 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

NCPPB 3664 *C. michiganensis* subsp. *tesselarius*

PVCT 184.6 Contaminante

La PCR CMM 5/6 Dreier et al. (1995) ha prodotto un risultato falso positivo con il seguente 'non target':

NCPPB 2581 *C. michiganensis*. subsp. *nebraskensis*

I migliori risultati sono stati ottenuti con la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) utilizzando hot start' Immolase TM DNA polimerasi (Bioline) dove tutti gli isolati batterici sono stati correttamente identificati.

3.3 Prove valutative inter-laboratorio

3.3.1 Campioni utilizzati per la validazione

Ai partecipanti sono stati forniti i seguenti campioni (Tab. 3):

- n.11 campioni di 5000 semi ciascuno (1A-11A) che andranno processati come da protocollo A
- n. 11 campioni di 2000 semi ciascuno (1 B-11B) che andranno processati come da protocollo B
- due ceppi come controlli positivi, (CMM NCPPB 2979T e PVCT 156.1.1) liofilizzati, che andranno processati con entrambi i protocolli.

TABELLA 3 - Campioni utilizzati per la validazione dei metodi diagnostici saggiati

Numero di campioni	Livello contaminazione	
	Protocollo A	Protocollo B
2	5000 semi contaminate con 1 seme infetto da Cmm	2000 semi contaminate con 1 seme infetto da Cmm
2	5000 semi contaminate con 3 semi infetti da Cmm	2000 semi contaminate con 3 semi infetti da Cmm
2	5000 semi contaminate con 5 semi infetti da Cmm	2000 semi contaminate con 5 semi infetti da Cmm
2	5000 semi contaminate con 5 semi infetti con un non target (<i>Pseudomonas corrugate</i>)	2000 semi contaminate con 5 semi infetti con un non target (<i>Pseudomonas corrugate</i>)
2	5000 semi non infetti	2000 semi non infetti
1	5000 semi contaminate con 10 semi infetti da Cmm	2000 semi contaminate con 10 semi infetti da Cmm

3.3.2 Metodi molecolari

Per quanto riguarda i risultati relativi ai parametri di validazione ottenuti dall'estratto CF-A ed ES-B per i metodi molecolari (Tabella 4), tutti i laboratori hanno ottenuto risultati insoddisfacenti (non riportati) utilizzando la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) con la Go Taq®Flexi DNA polimerasi (Promega). L'utilizzo dell'Immolase™ Hot Start DNA Polymerase (Bioline) con lo stesso metodo ha invece migliorato l'esito delle analisi dei campioni, compresi quelli alla dose più bassa di contaminazione (1:5000), rilevati in 7 laboratori su 9 per il protocollo A e 5 laboratori su 9 per il protocollo B. Relativamente alla PCR CMM 5-6 (Dreier *et al.*, 1995) per il protocollo A due laboratori non hanno ottenuto alcun risultato alterando così tutti i valori mentre per il protocollo B si sono avuti risultati attendibili soltanto nel caso di due laboratori, ragione per cui i valori di validazione vengono riportati in tabella ma non sono ritenuti soddisfacenti.

TABELLA 4 - Dati di validazione delle performance metodi molecolari per le procedure A e B.

Criterio di valutazione %	PCR PSA8/R Immolase TM DNA polimerasi		PCR CMM 5-6 (Dreier et al. ,1995)	
	CF-A	ES-B	CF-A	ES-B
Sensibilità diagnostica	81,0	84,1	61,9	17,5
Specificità diagnostica	86,1	91,7	94,4	88,9
Accuratezza relativa	82,8	86,9	73,7	43,4
Accordanza	79,8	79,4	70,2	52,2
Concordanza	70,5	87,9	60,1	57,9

3.3.3 IF

I valori di validazione della tecnica di IF sono riportati in Tabella 5.

I risultati ottenuti non appaiono soddisfacenti: in diversi laboratori si sono avuti risultati falsi negativi e positivi, anche in campioni con alti livelli di inoculo. Tutti i parametri si attestano intorno al 50%, in quanto solo i campioni alla più alta dose di inoculo sono stati rilevati positivi. Ciò dipende probabilmente dalla necessità di personale altamente qualificato per il riconoscimento di cellule batteriche al microscopio.

Tabella 5 - Dati di validazione delle performance della tecnica di IF per la procedura B.

Criterio di valutazione %	IFAS
Sensibilità diagnostica	51,8
Specificità diagnostica	59,4
Accuratezza relativa	54,5
Accordanza	52,9
Concordanza	50,1

3.4 Conclusioni

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza accettabili valori di performance per alcuni metodi molecolari saggiati (84-92%) rispetto alla tecnica di IF (50-59%). Fattore indispensabile per ottenere risultati positivi con la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) è l'utilizzo di una polimerasi 'hot-start', come d'altronde indicato nel lavoro originale di Pastrick e Rainey (1999). Le performance di questo metodo appaiono superiori anche rispetto alla PCR CMM 5-6 (Dreier *et al.*, 1995). Diversamente i valori di performance ottenuti utilizzando la PCR PSA8/R Pastrick and Rainey (1999) con la GoTaq® Flexi DNA Polymerase, (Promega) hanno fornito valori di accuratezza inaccettabili (es. 38% con procedura A).

Per quanto riguarda il protocollo di estrazione dei semi si ottengono risultati simili con entrambe le procedure di estrazione utilizzando di seguito la PCR secondo Pastrick e Rainey (1999). Attualmente il protocollo EPPO non prevede una fase di "screening" preliminare che si basi su metodi molecolari, ma suggerisce 2 diagrammi di flusso paralleli che come prima tecnica di diagnosi prevedono rispettivamente l'isolamento e l'IF. Tuttavia l'isolamento è notoriamente una fase critica per questo patogeno sia come tempistica che come possibilità di successo. Il batterio è infatti a lenta crescita e nel caso di matrici come il seme questi possono aver subito trattamenti o possono essere presenti popolazioni antagoniste, fattori che possono inibire la crescita su substrato del patogeno. Per quanto riguarda l'IF, anche i valori ottenuti da questo studio evidenziano risultati insoddisfacenti per le problematiche relative alla necessità di personale qualificato con esperienza nel riconoscimento delle cellule batteriche. Alla luce di quanto sopra riportato, l'utilizzo di saggi molecolari come screening preliminare appare un passaggio utile al fine di valutare in maniera preliminare lo stato fitosanitario di campioni in analisi. Essendo i valori di performance per i metodi molecolari intorno all'80% è comunque auspicabile la messa a punto e/o la validazione di nuovi metodi più sensibili e specifici delle PCR convenzionali, basati su sistemi come la Real Time PCR, la LAMP e la Digital PCR.

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- DHAVANTHARI BV (1988) Comparison of selective media for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **77**, 1694
- DREIER J, BERMPOHL A & EICHENLAUB R ,1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Phytopathology* **85**, 462-468.
- Eppe Diagnostic Pm 7/98 (2010) Specific Requirements For Laboratories Preparing Accreditation For A Plant Pest Diagnostic Activity.
- EPPO, 2004 PM7/42 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO Bulletin 35, 275-283
- EPPO, 2013. PM 7/42(2). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO Bulletin 43 (1), 46-67
- V. OLIVIER, A. BALOCHE, A. DROUIN, C. AUDUSSEAU, S. PAILLARD AND H. SOUBELE 2010 Internal methods comparison study and inter laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds1 Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **40**(2):248 - 256
- PASTRIK KH & RAINEY FA (1999). Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology* **147**, 687-693.
- WATERS C. M. AND BOLKMAN H. A. (1992) An improved semi selective medium and method of extraction for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Phytopathology* **82**, 1072.

ALLEGATO I Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Strumenti

1. autoclave
2. blocco termostato
3. cappa aspirante
4. cella elettroforetica
5. centrifuga
6. frigoriferi +4°C e - 20°C
7. macchina per produzione ghiaccio
8. microscopio a fluorescenza
9. mortai o Stomacher
10. pH-metro
11. piastra agitante con ancorette magnetiche
12. pipette da P-2 a P-1000
13. spettrofotometro
14. termociclatore
15. termostato
16. transilluminatore UV

Reagenti

1. acido borico
2. agar
3. agarosio per elettroforesi
4. CaCO_3
5. D(+)-glucosio
6. EDTA
7. estratto di lievito
8. glicerolo
9. d H_2O
10. d H_2O ultrapura per PCR
11. KH_2PO_4
12. K_2HPO_4
13. MgSO_4
14. NaCl
15. Na_2CO_3

16. NaHCO_3
17. Na_2HPO_4 12 H_2O
18. Na_2HPO_4 2 H_2O
19. NaH_2PO_4 H_2O
20. NaH_2PO_4 2 H_2O
21. NaOH
22. peptone batteriologico
23. D(+)-saccarosio
24. trizma base

Materiali

1. guanti monouso
2. piastre di Petri con diametro 90 mm
3. provette "Eppendorf" da 1,5 ml
4. provette da PCR
5. puntali per P-2 a P-1000 con filtro
6. puntali per P-20 a P-1000 senza filtro
7. vetrini multipli per microscopio
8. vetrini coprioggetto
9. per IFAS: Adgen Phytodiagnosics 1113-17 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 500 test fluoriscan IF Kit;
10. per estrazione DNA: DNeasy® Blood e Tissue Kit (50). QIAGEN
11. per PCR: kit
12. per PCR: coppie di primer CMM 5/6.; PSA8/R
13. per PCR: dNTPs,

Allegato II Tamponi e terreni di crescita

Tampone fosfato di estrazione PB (tampone fosfato 50 mM, pH 7,4):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	19,57 g
KH_2PO_4	1,65 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,5 g
d H_2O fino a	1,0 L

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min, lasciar raffreddare a temperatura ambiente ed aggiungere 0,2 ml di Tween 20 (soluzione 10%) sterile.

Tampone di estrazione PBS (tampone fosfato salino 0,01M, pH 7,2):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
d H_2O fino a	1,0 L

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min, lasciar raffreddare a temperatura ambiente.

Tampone IF (Na-PBS):

NaCl	42,50 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$	0,68 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2 \text{H}_2\text{O}$	8,00 g
d H_2O	5,00 l

Liquido di montaggio (glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato):

Questo liquido si prepara con glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato a pH 9, nelle proporzioni 9:1. La soluzione finale così ottenuta va conservata a 4 °C, con l'accortezza di rinnovarla ogni 6-8 mesi.

Tampone TAE 1X

Tris base	48,40 g
acido acetico glaciale	11,42 ml
EDTA	4,65 g

(oppure 20 ml soluzione 0,5M, pH = 8,0)

d H_2O portare a Vf =	1,00 l
---------------------------------------	--------

Tampone per sedimento (tampone fosfato 10 mM, pH 7,2):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
d H_2O	1,0 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare il pH e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min.

Terreno non selettivo YPGA

Yeast Extract	5 g
Bacto Peptone	5 g
Glucosio	10 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1,0 L

Terreno semi selettivo Dhanvantari (Dhanvantari, 1988, modified)

Glicerolo	10 g
Difco Bacto Pseudomonas agar F	38 g
dH ₂ O	1,0 L
Dopo autoclave (115 °C for 20 min.) aggiungere	
Cycloheximide	0,2 g
Acido nalidixico sodium salt (Sigma Chemicals)	30 mg
Potassio tellurite	10 mg

Terreno semi-selettivo mSCM (Waters C. M. and Bolkman H. A. (1992)

K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2.62 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.25 g
Acido borico	1.5 g
Mannosio	10 g
Estratto di lievito	0.1 g
Agar	12 g
dH ₂ O	1,0 L
Dopo autoclave (115 °C for 20 min.) aggiungere:	
Acido nalidixico	30 mg
Acido nicotinico	100 mg
Cycloheximide	200 m g
Potassio tellurite	13 mg

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
XYLELLA FASTIDIOSA SUBSP. *PAUCA* CEPPO
CoDiRO**

**Loreti S¹., Pucci N¹., Loconsole G^{2,3}., Modesti V¹, Lucchesi S¹.,
Potere O., Saponari M³**

¹Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria –
Centro di Difesa e Certificazione, Via C. G. Bertero, 22, 00156 Roma

²Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università
degli Studi di Bari Aldo Moro, I-70016 Bari

³Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante - IPSP CNR Via Amendola
165/A, - 70126 Bari

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

- 1.1 Introduzione
- 1.2 Posizione tassonomica dell'agente causale
- 1.3 Sintomatologia
- 1.4 Epidemiologia

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

- 2.1 Metodi
 - 2.1.1. Metodi analizzati nel PRE-TEST (fase A)
 - 2.1.2. Metodi analizzati nel test performance study TPS (ring-test) (fase B)
 - 2.1.3 ELISA: Kit Agritest/ Kit Loewe
 - 2.1.4 LAMP : kit Enbiotech
 - 2.1.5 Immunofluorescenza
- 2.2 Estrazione del DNA
 - 2.2.1 Metodo procedura B secondo Loconsole *et al.*, 2014
 - 2.2.2 Metodo secondo il kit DNeasy ® mericon ® Food Kit (Qiagen)
- 2.3 PCR convenzionale
 - 2.3.1 Reazione di amplificazione
 - 2.3.2 Condizioni di amplificazione
 - 2.3.3 Elettroforesi su gel di agarosio
 - 2.3.4 Uso dei controlli
 - 2.3.5 Interpretazione dei risultati:
- 2.4 Real time PCR basata su sistema SybrGreen
 - 2.4.1 Reazione di amplificazione
 - 2.4.2 Condizioni di amplificazione
 - 2.4.3 Uso dei controlli
 - 2.4.4 Interpretazione dei risultati
- 2.5 Singleplex real time PCR basata su sistema TaqMan
 - 2.5.1 Reazione di amplificazione (Master mix Applied Biosystem)
 - 2.5.2 Condizioni di amplificazione
 - 2.5.3 Uso dei controlli
 - 2.5.4 Interpretazione dei risultati
- 2.6 Duplex RT PCR (Harper *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2006).
 - 2.6.1 Reazione di amplificazione
 - 2.6.2 Condizioni di amplificazione
 - 2.6.3 Uso dei controlli
 - 2.6.4 Interpretazione dei risultati
- 2.7 LAMP (Kit Enbiotech
 - 2.7.1 Reazione di amplificazione
 - 2.7.2 Condizioni di amplificazione
 - 2.7.3 Interpretazione dei risultati
- 2.8 LAMP (Kit Qualiplante SAS)

3. VALIDAZIONE

- 3.1 Generalità
- 3.2 Gruppo di lavoro
- 3.3 Campioni target e non-target
 - 3.3.1. Campioni PRE-TEST
 - 3.3.2. Campioni “test performance study “(TPS
 - 3.3.3. Ceppi batterici non target per la valutazione dell’esclusività
- 3.4 Partecipanti al Test Performance Study
- 3.5. Sensibilità analitica (DATI PRE-TEST)
 - 3.5.1 Soglia di sensibilità analitica dei campioni di estratto crudo
 - 3.5.2 Soglia di sensibilità analitica dei campioni di DNA
- 3.6 Specificità analitica (esclusività)
 - 3.6.1. Real time (Francis *et al.*, 2006)
 - 3.6.2 Real time (Harper *et al.*, 2010)
 - 3.6.3 ELISA (Agritest srl)
 - 3.6.4 ELISA (Loewe srl)
- 3.7 Ripetibilità
- 3.8 Sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, accordanza e concordanza (DATI PRE-TEST)
- 3.9 Sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, accordanza e concordanza (dati TPS)
- 3.10 Confronto fra metodi di estrazione del DNA (Loconsole *et al.*, 2013 procedura B; DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN)

4. CONCLUSIONI

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Allegato I-Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Allegato II- Strumentazione e reagenti utilizzati nelle prove valutative inter-laboratorio

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Xylella fastidiosa</i> Wells <i>et al.</i> <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> , ceppo CoDiRO
Tassonomia	Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae
Avversità	Complesso del disseccamento rapido dell'olivo
Categoria fitosanitaria	EU Annex designation:II/A2 EU quarantine organism under Council Directive 2000/29/EC ('Plant Health Directive')

1.1 Introduzione

Xylella fastidiosa (Wells *et al.*) è uno dei batteri vegetali più pericolosi in tutto il mondo, causando una varietà di malattie, con un enorme impatto economico per l'agricoltura. Esempi di malattia causati da *X. fastidiosa* sono la cosiddetta malattia di Pierce della vite, il mal del pennacchio del pesco, la clorosi variegata degli agrumi, e la bruscatura fogliare di ciliegio, mandorlo, olmo, platano e varie altre specie arboree. Originario delle Americhe (Almeida e Nunney, 2015), è stato intercettato in Europa a partire dal 2012, essendo stato individuato in piante di caffè provenienti da alcuni paesi dell'America latina (Legendre *et al.*, 2014; Bergsma-Vlami *et al.*, 2015).

Il batterio è xylem-limited, ossia colonizza e si moltiplica esclusivamente nel sistema xilematico attivo ("alburno" xilema secondario attivo) delle piante ospiti. Le temperature ottimali di crescita e moltiplicazione sono nell'intervallo di 26-28°C.

La sintomatologia indotta dall'infezione è correlata all'occlusione dei vasi xilematici sia per la presenza delle colonie sia per la produzione di un biofilm, con un conseguente stato di stress idrico.

Nel territorio dell'Unione Europea il primo vero e proprio insediamento di *X. fastidiosa* risale all'ottobre 2013, nella regione Puglia, principalmente a carico di uliveti affetti da disseccamento rapido. La malattia è stata denominata sindrome del disseccamento rapido dell'olivo (olive quick decline syndrome-OQDS) e il ceppo di *X. fastidiosa*, considerato il principale agente del OQDS (<http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>), è stato denominato CoDiRO. Sulla base di attività di indagini ufficiali, il resto del territorio italiano è ancora considerato esente dal batterio. Nel mese di luglio del 2015, le autorità francesi hanno segnalato il primo focolaio di *Xylella fastidiosa* nel territorio della Corsica e successivamente nella regione della Provenza-Alpi-Costa Azzurra, interessando prevalentemente la *Polygala myrtifolia* (EPPO, 2015). Il batterio presente nei rispettivi Stati membri ha una diversa epidemiologia che conferma che le fonti d'infezione sono differenti. I ceppi responsabili dei focolai francesi appartengono a *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*.

Le informazioni di seguito riportate si riferiscono a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ceppo CoDiRO responsabile del OQDS.

1.2 Posizione tassonomica dell'agente causale

Da un punto di vista tassonomico sono riconosciute valide dall' International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria (ISPP-CTPPB) due sottospecie, la subsp. *fastidiosa* e la subsp. *multiplex* (Bull *et al.*, 2012) anche se anche la subsp. *pauca*, individuata attraverso studi di ibridazione DNA-DNA, è accettata a livello internazionale (Shaad *et al.*, 2004). Ulteriori sottospecie di *X. fastidiosa* sono state proposte a seguito di analisi "multilocus sequence typing" (MLST), come la subsp. *sandyi*, *tashke*, *morus*. La specie *X. taiwanensis* è stata recentemente proposta (Chen *et al.*, 2014; Marcelletti e Scortichini 2016) sebbene ancora non formalmente riconosciuta dall'ISPP-CTPPB.

La tipizzazione MLST (multilocus sequence typing) (<http://pubmlst.org/Xfastidiosa>), ed il successivo sequenziamento dell'intero genoma (Giampetruzzi *et al.*, 2015) del ceppo CoDiRO ha accertato la sua appartenenza alla sottospecie *pauca*, ma ne costituisce una variante molecolare divergente ed identica ad un ceppo "gemello" presente in Costa Rica isolato da oleandro e caffè (Nunney *et al.*, 2014a).

1.3 Sintomatologia

I sintomi causati da *Xylella fastidiosa* dipendono dall'ospite e dalla combinazione col ceppo/sottospecie. In particolare su olivo in Puglia sono stati descritti: i) bruscatura fogliare ('leaf scorching') con disseccamenti nella parte apicale e/o marginale della lamina fogliare, ii) disseccamenti più o meno estesi a carico della chioma con interessamento dapprima di rami isolati e poi di intere branche e/o dell'intera pianta e iii) imbrunimenti interni del legno a diversi livelli dei rami più giovani, delle branche e del fusto.

Le indagini fitosanitarie condotte inizialmente su piante sintomatiche hanno evidenziato la presenza di diversi agenti parassitari: *Zeuzera pyrina*, *Phaeoacremonium*, *Phaemoniella*, *Pleumostophora*, *Neofusicoccum* (Nigro *et al.*, 2013; 2014) e *X. fastidiosa* (Saponari *et al.*, 2013) che suggerivano potessero agire come un complesso determinando il cosiddetto "Complesso del disseccamento rapido dell'olivo" (CoDiRO) (Martelli, 2013), successivamente rinominato "Sindrome del disseccamento rapido dell'olivo" a seguito dell'evidenza del ruolo marginale o aggravatore svolto rispettivamente dall'insetto e dai funghi (Martelli, 2015).

1.4 Epidemiologia

Le intense attività di monitoraggio hanno accertato che oltre all'olivo, anche le seguenti specie vegetali sono ospiti naturali del batterio: *Acacia saligna*, *Myrtus communis*, *Nerium oleander*, *Polygala myrtyfolia*, *Westringia fruticosa*, *Ramnus alaternus*, *Vinca major*, *V. minor*, *Spartium junceum*, *Rosmarinus officinalis*,

Lippia citriodora, *Grevillea juniperina*, *Asparagus acutifolius*, *Dodonaea viscosa*, *Myoporum insulare*, *Prunus dulcis*, *P. avium*, *Laurus nobilis* (Saponari *et al.*, 2014a). Tuttavia fra le oltre 100 specie spontanee di mono e dicotiledoni saggiate, nessuna è risultata infetta (Susca *et al.*, 2014), così come i 207 campioni di conifere, le 105 palme e le 208 piante succulente prelevate sia nei vivai che nei giardini privati (Potere *et al.*, 2015). Anche il monitoraggio estesamente effettuato su agrumi e vite allevati in appezzamenti adiacenti ad oliveti fortemente colpiti dal OQDS, nonché da vivai ha potuto escludere che entrambe possano essere ospiti vegetali del ceppo CoDiRO, aspetto confermato anche dalle inoculazioni sperimentali in condizioni controllate (Saponari *et al.*, 2014b; Saponari e Boscia 2015).

X. fastidiosa ceppo CoDiRO si trasmette in natura attraverso insetti xilemomizi (xylem-fluid feeding insects) appartenenti all'Ordine Hemiptera, in particolare il principale vettore in Puglia è *Philaenus spumarius* (Saponari *et al.*, 2014c; Elbeaino *et al.*, 2014). Questi insetti sono caratterizzati da un apparato boccale pungente-succhiante in grado di infiggerlo nella pianta per raggiungere lo xilema e nutrirsi del succo xilematico, acquisendo così le cellule batteriche dalle piante infette, per poi trasmetterle a quelle sane. Sono pertanto considerati potenziali vettori di XF tutti gli insetti che in Europa si nutrono della linfa contenuta nello xilema. Questo tipo di trasmissione è di norma molto rapida poiché manca nell'insetto il periodo di latenza (periodo intercorrente tra l'acquisizione del batterio e la capacità dell'insetto di trasferirlo in una pianta sana tramite punture di alimentazione), contribuendo alla diffusione della malattia a breve e medio raggio.

A differenza della maggior parte delle specie batteriche, *X. fastidiosa* non si trasmette per contatto, ma la diffusione su lunghe distanze è operata dall'uomo attraverso il commercio di materiale di moltiplicazione infetto. Il rapporto Efsa ([www://http efsa.europa.eu/it/publications/efsajournal.htm](http://www.efsa.europa.eu/it/publications/efsajournal.htm)) rivela, da una stima parziale dei Servizi fitosanitari, che nel periodo dal 2000 al 2007, in soli 7 Paesi membri dell'UE sono stati introdotti oltre 150 milioni di piante possibili ospiti di *X. fastidiosa* provenienti da paesi terzi.

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1. Metodi

2.1.1. Metodi analizzati nel PRE-TEST (fase A)

A partire da estratto crudo:

- A.1 ELISA (AgriTest)
- A.2 ELISA (Loewe)
- A.3 LAMP-PCR on crude extract (kit Enbitech)

A partire da DNA estratto secondo Loconsole *et al.* 2014 (procedura B):

- A.4 End-point PCR RST 31-33 (Minsavage *et al.*, 1994)
- A.5 Real-time PCR SYBR green (Francis *et al.*, 2006)
- A.6 Real-time PCR TaqMan (Harper *et al.*, 2010)
- A.7 Real-time PCR (Kit Qualiplante)
- A.8 LAMP-PCR on total DNA (kit Qualiplante)
- A.9 LAMP-PCR on total DNA (kit Enbiotech)
- A.10 Real-time PCR internal control (Li *et al.*, 2006)

2.1.2. Metodi analizzati nel test performance study TPS (ring-test) (fase B)

A partire da estratto crudo:

- B.1 ELISA (Agritest)
- B.2 ELISA (Loewe)
- B.3 LAMP (Enbiotech s.r.l.)
- B.4 Immunofluorescenza (IF)

A partire da DNA*:

- B.5 PCR (Minsavage *et al.*, 1994)
- B.6 Real-time SYBR green (Francis *et al.*, 2006),
- B.7 Real-time Taqman (Harper *et al.*, 2010)
- B.8 Multiplex qPCR (Harper *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006)
- B.9 LAMP-PCR (Enbiotech s.r.l.)

* Il DNA è stato estratto con la procedura B descritta da Loconsole *et al.* (2014) e, per cinque dei partecipanti, è stata fatta in parallelo anche secondo il DNeasy[®] mericon[®] Food Kit (Qiagen) modificato

Per la preparazione dei campioni vegetali seguire lo Standart EPPO PM7/24 (2).

2.1.3 ELISA: Kit Agritest/ Kit Loewe

Questo metodo viene applicato su un estratto crudo del campione preparato secondo lo Standart EPPO PM7/24 (2).

I tamponi preparati per lo svolgimento del test vengono preparati seguendo le indicazioni riportate nelle istruzioni dei kit. La sensibilizzazione della piastra ELISA con anticorpo specifico e la disposizione dei campioni sono stati effettuati da tutti i partecipanti seguendo la tabella di seguito riportata:

Schema piastra ELISA Agritest/ Loewe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	-	-	-	-	-
B	(X)	E1	E4	E7	E10	PC	(X)	-	-	-	-	-
C	(X)	E1	E4	E7	E10	PC	(X)	-	-	-	-	-
D	(X)	E 2	E5	E8	E11	<i>buffer</i>	(X)	-	-	-	-	-
E	(X)	E2	E5	E8	E11	<i>buffer</i>	(X)	-	-	-	-	-
F	(X)	E3	E6	E9	E12	HC	(X)	-	-	-	-	-
G	(X)	E3	E6	E9	E12	HC	(X)	-	-	-	-	-
H	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	-	-	-	-	-

N.B: i pozzetti perimetrali, indicati con (X) nello schema, sono stati riempiti con 100 µl del tampone corrispondente al passaggio che si sta effettuando. In fase di sensibilizzazione (a) è stato usato il *coating buffer*, nel passaggio (c) acqua distillata; in (e) il *conjugate buffer*; in (g) il *substrate buffer*.

1. *Sensibilizzazione:* diluire gli anticorpi (anti-Xf-IgG) specifici per *Xylella fastidiosa* (Xf) 1:200(Loewe)/1:500(Agritest) in *coating buffer* e distribuire 100 µl in ciascun pozzetto della piastra. Per esempio nel kit Loewe per preparare 4 ml di soluzione occorre aggiungere 20 µl di anticorpo e 3980 µl di coating buffer. Per il kit Agritest invece si uniranno 8 µl di anticorpo e 3992 µl di coating buffer (abbiamo preparato quantità in eccesso di soluzione). Coprire la piastra con alluminio incubando a 37°C per 4h.
2. *Lavaggio:* rovesciare la piastra per rimuovere il liquido dai pozzetti e lavare gli stessi 4 volte ad intervalli di 3 min circa utilizzando *washing buffer*; all'ultimo lavaggio eliminare ogni traccia di liquido dalla piastra tamponandola con carta da banco.
3. *Preparazione campione ed incubazione con l'antigene:* Aggiungere 100 µl dell'estratto vegetale nei pozzetti secondo lo schema preparato precedentemente; aggiungere 100 µl di soluzione del controllo positivo e negativo nei pozzetti indicati, rispettivamente, come PC e HC; aggiungere 100 µl di acqua distillata nei pozzetti indicati come *buffer*. Coprire la piastra con alluminio ed incubarla per tutta la notte a 4°C. Ripetere il secondo passaggio.
4. *Aggiunta degli anticorpi coniugati ad enzima:* diluire gli anticorpi coniugati (anti-Xf-AP coniugato) 1:200(Loewe)/1:500 (Agritest) in *conjugate buffer*; la diluizione verrà effettuata come già indicato nel primo passaggio). Distribuire 100µl in ciascun pozzetto della piastra. Coprire la piastra con alluminio incubando a 37°C per 4h. Ripetere il secondo passaggio.
5. *Aggiunta substrato:* sciogliere al momento dell'utilizzo il para-nitrofenilfosfato in *substrate buffer* avendo l'accortezza di tenerlo al riparo dalla luce e aliquotare 100 µl in ciascun pozzetto. Incubare a temperatura ambiente (18-25 °C) fino a quando si inizia ad osservare il viraggio dei pozzetti verso il colore giallo; leggere la piastra a 60-120 min utilizzando un lettore di piastre ELISA ($\lambda = 405 \text{ nm}$, se necessario prolungare la reazione tutta la notte).

- in diluizione 1:10. La diluizione dovrà essere effettuata sempre con tampone IF.
3. Trasferire 20 µl di ciascun campione (compresi i controlli), sia nel 'tal-quale' che nelle diluizioni, in 5 replicati (come indicato in figura di seguito)
 4. Far evaporare completamente le goccioline mediante riscaldamento a 60°C per 20 minuti
 5. Fissare le cellule batteriche al vetrino passandolo velocemente sulla fiamma.
 6. I vetrini pronti possono essere conservati a 4°C per qualche giorno fino al momento dell'utilizzo.

Preparazione tamponi/reagenti

1. Tampone IF (Na-PBS) pH 7.2:
 2. (da utilizzarsi per la diluizione degli anticorpi, dell'antisiero, del PC e per i lavaggi)

NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	2 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	5,35g
KCl	1 g
dH ₂ O	5,00 l

Dopo aver sciolto gli ingredienti e misurato il pH, separare il tampone in due aliquote (1 litro, 4 litri) e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min. Successivamente aggiungere all'aliquota di 4 litri 0.1% Tween20 (Tampone IF-Tween che dovrà essere utilizzato per i lavaggi).

1. Antisiero: l'anticorpo primario deve essere preparato in tampone IF (sterile e privo di Tween) nelle diluizioni seriali 1:200-1:500-1:1000-1:1500. Si consiglia di effettuare le diluizioni partendo dalla diluizione 1:200; es: per ottenere la diluizione 1:200 aggiungere 10 µl di antisiero anti-Xf e 1990 µl di tampone IF; da questa prelevare 800 µl ed aggiungere 1200 di tampone IF per ottenere la 1:500; da quest'ultima prelevare 1000 µl ed aggiungere 1000 µl di tampone IF per ottenere la 1:1000; da questa prelevare 667 µl ed unire 333 µl di tampone IF per ottenere 1:1500.
2. Anticorpo secondario coniugato FITC (AbII-FITC): mantenere l'anticorpo liofilizzato fino al suo utilizzo. Risospendere in 1.1 ml di acqua distillata sterile, ed utilizzare diluito in tampone IF 1:200 (vi consigliamo di preparare 5 ml di diluizione 1:200 aggiungendo 4975 ml di tampone IF a 25 µl di coniugato FITC). Il volume rimanente deve essere aliquotato in eppendorf da 50 µl ciascuna e conservato a -70°C per ulteriori utilizzi, in modo da garantirne il corretto mantenimento.

Reazione antigene /anticorpo /FITC

1. Per ciascuna fila trasferire 20 µl di antisiero alle diverse diluizioni, ad eccezione del primo pozzetto di ciascuna fila che verrà invece incubato con il solo tampone IF. In questo modo in ciascuna fila ci sarà il campione da saggiare incubato con tampone IF, e con l'antisiero alle diluizioni 1:200-1:500-1:1000-1:1500 (vedi

figura)

2. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in un recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C.
3. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare accuratamente con tampone IF-*Tween*.
4. Lavare due volte immergendo per 7 minuti nel tampone IF, con una leggera agitazione.

Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula o incubando a 37°C fino a completa asciugatura (operare in penombra, dato che il FITC è sensibile alla luce)

1. Applicare 20 µl dell' AbII-FITC su tutti i pozzetti
2. Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C, al buio.
3. Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare accuratamente con tampone IF-*Tween*.
4. Lavare due volte immergendo per 7 minuti nel tampone IF, con una leggera agitazione, mantenendo i vetrini al buio
5. Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula o incubando a 37°C fino a completa asciugatura.
6. Trasferire con una pipetta 5-10 µl di liquido di montaggio, su ciascun pozzetto e chiudere con un vetrino coprioggetti.

1. *Liquido di montaggio*: glicerolo e buffer fosfato, glicerolo pH 7.6

Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0.15 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	3.2 g
Glicerolo	50 ml
d H ₂ O	100 ml

2. *Visualizzazione vetrini*

Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione del FITC. Ingrandimento: 40x10-100x10 (necessario l'utilizzo di olio ad immersione). Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro.

3. *Interpretazione del risultato della colorazione IF*

1 Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza verde-brillante.

Nota: Il saggio IF deve essere ripetuto se la colorazione è anomala o se il vetrino di controllo non risulta colorato.

2 Passare ad osservare i vetrini di saggio. Verificare prima l'assenza di cellule fluorescenti nei pozzetti di controllo PBS. Cellule fluorescenti nel controllo PBS indicano un legame non specifico del coniugato o contaminazione.

Nota: in questo caso ripetere il saggio.

3 Facendo riferimento ai vetrini di controllo, verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *Xylella fastidiosa* nei pozzetti di saggio dei vetrini. L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di anticorpo.

Per ciascun campione in cui non vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è negativo.

Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è positivo.

Le cellule che presentano una colorazione incompleta o aberrante o una debole fluorescenza devono essere ignorate, a meno che non siano numerose. In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio.

Il presente documento è stato sviluppato sulla base delle indicazioni riportate nei *data sheet* allegati ai *kit* forniti.

2.2 Estrazione del DNA

2.2.1 Metodo procedura B secondo Loconsole *et al.*, 2014

1. Pesare 0.5-0.8 gr di nervatura centrale e piccioli trasferire il materiale in buste resistenti (tipo Stomacher) e aggiungere 2 ml di CTAB. Schiacciare con un martello e/o con un omogenizzatore (Homex, Bioreba).
2. Aggiungere in ogni busta 3 ml di C-TAB e trasferire 1 ml di ciascun campione macerato in una provetta da 2 ml.
3. Incubare per 30 min a 65°C.
4. Centrifugare i campioni a 10.000 rpm per 5 min e trasferire 900 ml in una nuova eppendorf da 2 ml facendo attenzione a non trasferire nessun residuo vegetale.
5. Aggiungere 900 ml di cloroformio e miscelare accuratamente.
6. Centrifugare i campioni a 13.000 rpm per 10 min.
7. Trasferire 700 µl di supernatante in provette da 1,5 ml ed aggiungere 450 µl di 2-Propanolo freddo (che equivale a circa 0,6V).
8. Mescolare invertendo il tubo 2 volte ed incubare a -20°C per 20 min.
9. Centrifugare i campioni a 13.000 rpm per 20 min e scartare il supernatante.
10. Lavare il pellet ottenuto con 1 ml di etanolo al 70%.
11. Centrifugare i campioni a 13.000 rpm per 10 min e gettare l'etanolo.
12. Asciugare i campioni all'aria o utilizzando una pompa a vuoto.
13. Risospendere il pellet ottenuto in 100 µl di H₂O sterile o TE e conservarlo a 4°C per uso immediato (3-4 ore) o a -20°C per conservazione di lungo periodo.

2.2.2 Metodo secondo il kit DNeasy® mericon® Food Kit (Qiagen)

Procedura

1. Pesare 0.5-0.8 gr di nervatura centrale e piccioli trasferire il materiale in buste resistenti (tipo Stomacher) e aggiungere 5 ml del tampone "Food lysis buffer". Schiacciare con un martello e/o con un omogenizzatore (Homex, Bioreba)
2. Trasferire 1ml del liquido in tubo eppendorf da 1.5 ml evitando di prelevare residui vegetali.
3. Incubare per 30 min a 60°C
4. Centrifugare per 3 min a 2500 x g
5. Pipettare 500 µl di cloroformio in una nuova eppendorf da 1.5 ml
6. Trasferire 700 µl del supernatante dello step 3 nell'eppendorf contenente il cloroformio facendo attenzione a non prelevare materiale della fase solida
7. Vortexare con vigore l'eppendorf per 15 s e centrifugare a 14,000 x g per 15 min
8. Pipettare 350 µl di Buffer PB in un nuovo tubo, aggiungere 350 µl della fase acquosa superiore dello step 6 e mescolare vigorosamente con vortex
9. Trasferire tale soluzione in una QIAquick spin column sistemata in un tubo da 2ml. Centrifugare a 17,900 x g per 1 min e scartare il filtrato. Riutilizzare lo stesso tubo nello step 9
10. Aggiungere 500 µl di Buffer AW2* ad una QIAquick spin column, centrifugare a 17,900 x g per 1 min e scartare il filtrato
11. Riutilizzare lo stesso tubo e centrifugare 17,900 x g per 1 min per asciugare la membrana
12. Trasferire la QIAquick spin column in un nuovo tubo da 1.5 ml or 2 ml e pipettare 120 µl di Buffer EB direttamente nella membrana QIAquick
13. Incubare per 1 min a temperatura ambiente (15–25°C), e poi centrifugare a 17,900 x g per 1 min per la eluizione
14. Utilizzare 1 µl (in un volume finale di 11 µl) di DNA per i saggi di PCR convenzionali e quantitativi per la diagnosi di *X. fastidiosa*

Note

* Il Buffer AW2 è fornito come concentrato; prima dell'utilizzo aggiungere l'appropriata quantità di etanolo (96–100%) come indicato sulla confezione per ottenere la working solution.

Tutti i passaggi che prevedono delle centrifugazioni devono essere realizzati a temperatura ambiente (15–25°C) in una centrifuga per eppendorf ed il termine *vortexare* implica un tempo di circa 5–10 s.

2.3 PCR convenzionale

Il presente protocollo è basato su Minsavage *et al.*, 1994

RST31 (forward): 5'-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTGCGATTGC-3'

RST33 (reverse): 5'-CACCATTTCGTATCCCGGTG-3

La reazione di PCR deve essere effettuata utilizzando per ogni isolato il DNA tal quale (TQ) e diluito 1:10 (in acqua sterile).

2.3.1 Reazione di amplificazione

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per reazione (µL)
Acqua milliQ sterile	/	/	9.5
MasterMix 2X*	2x	1x	12.5
RST 31	10µM	0.2 µM	0.5
RST 33	10µM	0.2 µM	0.5
Volume tot PCR Mix			23
Volume DNA			2
Volume tot per reazione			25

*Amplitaq Gold 360 Master Mix (Cod. 4398876)

2.3.2 Condizioni di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	94°C	5 min	1
Amplificazione	94°C	30 sec	35
	55°C	30 sec	
	72°C	45 sec	
Estensione finale	72°C	7 min	1
Step di blocco	4°C	∞	1

2.3.3 Elettroforesi su gel di agarosio

1. Preparare un gel di agarosio 1,2% (massa/volume) in TAE 1X con il colorante scelto per marcare il DNA ("GelRed Nucleic Acid Stain" 1µl/100ml di gel).

2. Caricare 10 µL del campione amplificato più 2 µL di *DNA loading buffer* 6X in ciascun pozzetto.
3. Caricare in un pozzetto un marcatore di peso molecolare idoneo.
4. Applicare una tensione elettrica intorno ai 80-100 V per circa 45 minuti e comunque facendo riferimento al fronte del colorante.
5. Osservare il gel mediante transilluminatore ad U.V. e fotografare.

2.3.4 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione devono essere aggiunti i seguenti controlli:

1. **Controllo negativo di amplificazione (NAC):** reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con acqua sterile. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.
2. **Controllo negativo di isolamento (NIC):** reazione di amplificazione di DNA di olivo non infetto. Serve a confermare la specificità del metodo per l'organismo target e ad monitorare eventuali contaminazioni in fase di estrazione del DNA.
3. **Controllo positivo di amplificazione (PAC):** reazione di PCR su DNA di olivo infetto. Serve per confermare la correttezza della procedura di preparazione della reazione PCR e della sua amplificazione.

2.3.5 Interpretazione dei risultati:

Campioni negativi: assenza della banda di DNA della misura attesa (733 bp).

Campioni positivi: presenza di una banda netta di DNA delle dimensioni attese (733 bp).

I campioni che danno origine ad una banda debole (con DNA non diluito e diluito 1:10) dovranno essere testati nuovamente in real-time PCR per confermare o meno il risultato.

2.4 Real time PCR basata su sistema SybrGreen

Il presente protocollo è basato su Francis *et al.*, 2006.

HL5 5'-AAGGCAATAAACGCGCACTA-3'

HL6 5'-GGTTTTGCTGACTGGCAACA-3'

2.4.1 Reazione di amplificazione

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Vol. per reazione (μL)
Acqua milliQ sterile			3.9
Master Mix *	2x	1x	5.5
HL5	10μM	0.28μM	0.3
HL6	10μM	0.28μM	0.3
Volume tot PCR Mix			10
Volume DNA			1
Volume tot per reazione			11

**Sybr Select Master Mix Applied Biosystem (Cod. 4472942)*

2.4.2 Condizioni di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95°C	5 min	1
Amplificazione ed estensione finale	95°C 60°C	20 sec 40 sec	40
Step di blocco	4°C	∞	1

Melting step 65 °C to 95° C (Incremento 0,5°C 0:05)

2.4.3 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR Real Time devono essere aggiunti i seguenti controlli:

- 1. Controllo negativo di amplificazione (NAC):** reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con acqua sterile. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.
- 2. Controllo negativo di isolamento (NIC):** reazione di amplificazione di DNA di olivo non infetto. Serve a confermare la specificità del metodo per l'organismo target e ad monitorare eventuali contaminazioni in fase di estrazione del DNA.
- 3. Controllo positivo di amplificazione (PAC):** reazione di PCR su DNA di olivo infetto. Serve per confermare la correttezza della procedura di preparazione della reazione PCR e della sua amplificazione.

2.4.4 Interpretazione dei risultati

Campioni negativi: qualora non venga prodotta una curva di amplificazione o se viene prodotta una curva che non presenta un andamento esponenziale.

Notare che frequentemente le curve i cui valori di Ct sono fra 35 e 40 non esibiscono una curva caratteristica. In quest'ultimo caso i campioni devono essere considerati indeterminati.

Campioni positivi: qualora venga prodotta una curva di amplificazione e un picco di melting specifico, ovvero compreso fra 83-85°C

I risultati contraddittori, indeterminati o di difficile interpretazione devono essere ripetuti.

2.5 Singleplex Real Time PCR basata su sistema TaqMan

Il presente protocollo è basato su Harper *et al.* (2010).

Primers gene *rimM* di *X. fastidiosa*

XF-F (forward) 5'-CAC GGC TGG TAA CGG AAG A-3'

XF-R (reverse) 5'-GGG TTG CGT GGT GAA ATC AAG-3'

XF-P (probe) 5' 6FAM -TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC-BHQ-1- 3'

2.5.1 Reazione di amplificazione (Master mix Applied Biosystem)

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Vol. per reazione (μL)
Acqua milliQ sterile	/	/	3.8
Master Mix Fast *	2x	1x	5.5
XF-F	10 μM	0.28 μM	0.3
XF-R	10 μM	0.28 μM	0.3
XF-P	10 μM	0.14 μM	0.1
Volume tot PCR Mix			10
Volume DNA			1
Volume tot per reazione			11

* *Taqman Fast Advanced Master Mix (Cod. 4444557)*

2.5.2 Condizioni di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Preincubazione	50°C	2 min	1
Denaturazione iniziale	95°C	10 min	1
	94°C	10 sec	
Denaturazione ed amplificazione	62°C	45 sec	39
Step di blocco	4°C	∞	1

2.5.3 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR *Real Time* devono essere aggiunti i seguenti controlli:

1. **Controllo negativo di amplificazione (NAC):** reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con acqua sterile. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.
2. **Controllo negativo di isolamento (NIC):** reazione di amplificazione di DNA di olivo non infetto. Serve a confermare la specificità del metodo per l'organismo target e ad monitorare eventuali contaminazioni in fase di estrazione del DNA.
3. **Controllo positivo di amplificazione (PAC):** reazione di PCR su DNA di olivo infetto. Serve per confermare la correttezza della procedura di preparazione della reazione PCR e della sua amplificazione.

2.5.4 Interpretazione dei risultati

Campioni negativi: se un campione produce un valore di Cq = 0.00 (N/A) or >37.00 è da considerarsi negativo.

Campioni positivi: se un campione produce un valore di Cq compreso tra 0.00 < FAM Cq < 37.00 il campione è da considerarsi positivo a *Xylella fastidiosa*.

Il test deve essere ripetuto nel caso di risultati dubbi o contraddittori.

2.6 Duplex RT PCR (Harper *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2006).

Il presente protocollo è basato sulla contemporanea amplificazione di un target specifico (gene *rimM*) per *X. fastidiosa* secondo Harper *et al.* (2010) ed il gene per "plant cytochrome oxidase" (*cox*) come controllo positivo interno (Li *et al.*, 2006)

Primers gene *rimM* di *X. fastidiosa*

XF-F (forward) 5'-CAC GGC TGG TAA CGG AAG A-3'

XF-R (reverse) 5'-GGG TTG CGT GGT GAA ATC AAG-3'

XF-P (probe) 5' 6FAM -TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC-BHQ-1- 3'

Primer gene *cox*

COX-F (forward) 5'-GTATGCCACGTCGCATTCCAGA-3'

COX-R (reverse) 5'-GCCAAACTGCTAAGGGCATTC-3'

COX-P (probe) 5'-Cy5-ATCCAGATGCTTACGCTGG-BHQ-2-3'

2.6.1 Reazione di amplificazione

Reagenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Vol. per reazione (μL)
Acqua milliQ sterile	/	/	5
Master Mix Fast *	2x	1x	11
XF-F	10μM	0.28μM	0.6
XF-R	10μM	0.28μM	0.6
XF-P	10μM	0.18μM	0.4
COX-F	10μM	0.36μM	0.8
COX-R	10μM	0.36μM	0.8
COX-P	10μM	0.36μM	0.8
Volume tot PCR Mix			20
Volume DNA			2
Volume tot per reazione			22

**Taqman Fast Advanced Master Mix Applied Biosystem (COD. 4444557)*

2.6.2 Condizioni di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	95°C	10 min	1
Amplificazione ed estensione finale	94°C	10 sec	39
	62°C	40 sec	
Step di blocco	4°C	∞	1

2.6.3 Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR Real Time devono essere aggiunti i seguenti controlli:

- 1. Controllo negativo di amplificazione (NAC):** reazione di amplificazione in cui il DNA stampo è sostituito con acqua sterile. Serve a monitorare eventuali contaminazioni presenti nei reagenti o in fase di preparazione della reazione.
- 2. Controllo negativo di isolamento (NIC):** reazione di amplificazione di DNA di olivo non infetto. Serve a confermare la specificità del metodo per l'organismo target e ad monitorare eventuali contaminazioni in fase di

estrazione del DNA.

3. **Controllo positivo di amplificazione (PAC):** reazione di PCR su DNA di olivo infetto. Serve per confermare la correttezza della procedura di preparazione della reazione PCR e della sua amplificazione.
4. **Controllo di amplificazione interno (IPC):** co-amplificazione del gene di controllo interno codificante per la citocromo ossidasi (cox) della pianta. Serve a verificare la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR.

2.6.4 Interpretazione dei risultati

Xylella fastidiosa (fluoroforo FAM)

Campioni negativi: Se un campione produce un valore di Cq = 0.00 (N/A) or >37.00 è da considerarsi negativo.

Campioni positivi: Se un campione produce un valore di Cq compreso tra 0.00 < FAM Cq < 37.00 il campione è da considerarsi positivo a *Xylella fastidiosa*.

Citocromo ossidasi (fluoroforo Cy5)

Campione positivo: presenza di curva di amplificazione

Campione negativo: assenza di curva di amplificazione

Qualora il controllo interno non produca la curva di amplificazione è necessario ripetere la reazione sul campione diluito 1:10. Nella eventualità il risultato permanga incerto il risultato deve essere considerato incerto ed va ripetuta l'amplificazione.

2.7 LAMP (Kit Enbitech)

2.7.1 Reazione di amplificazione

1. Prelevare l'appropriato numero di microtubi Primer Mix (ZPXS) forniti dal kit ed aliquotare in essi 22,5 µl di Master Mix (ZLXS) fornita dal kit.
2. Aggiungere 2,5 µl di DNA.
3. Chiudere e vortexare i tubi, centrifugarli brevemente.

2.7.2 Condizioni di amplificazione

Trasferire i tubi in un termociclatore per Real Time PCR, selezionare il filtro FAM impostando le seguenti condizioni di amplificazione.

Temperatura	Tempo	N° di cicli
65°C	1 min	30*
80°C	2 min	1

** ogni min prendere il segnale*

2.7.3 Interpretazione dei risultati

Campioni negativi: se produce $Ct = 0.00$ o >30.00

Campioni positivi: se produce Ct compreso fra 0.00 e 30.00 ($0 < FAM Cq < 30$)

Nel caso di campioni negativi e dubbi ripetere l'amplificazione utilizzando il template diluito 1:10.

2.8 LAMP (Kit Qualiplante SAS)

Per quanto riguarda la procedura utilizzata sono state seguite in dettaglio le informazioni riportate nel foglietto illustrativo del kit.

3. VALIDAZIONE

3.1 Generalità

La scelta delle metodologie diagnostiche validate e la definizione dei parametri di validazione di seguito descritti è scaturita dal lavoro congiunto di un Gruppo di lavoro di esperti (GdL) costituito da varie istituzioni scientifiche. La composizione del GdL viene riportata di seguito. In quest'ambito è stato stabilito di organizzare una fase di PRE-TEST per il calcolo della sensibilità analitica dei metodi che ha coinvolto tre laboratori: CREA-DC (ex CREA-PAV) di Roma, CNR-IPSP di Bari, SF regione Lombardia di Minoprio (CO). Ogni protocollo è stato valutato per l'ottenimento dei parametri di sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, accordanza e concordanza attraverso un TPS inter-laboratorio cui hanno preso parte laboratori dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR) e laboratori di altre strutture pubbliche segnalati dai Servizi. L'esclusività e la ripetibilità sono state valutate presso il CREA-DC. Per la definizione dei suddetti parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati.

Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure, per meglio avvicinarsi agli standard di ogni singolo laboratorio, purché ciò venga adeguatamente validato.

3.2 Gruppo di lavoro

- 1 CREA-DC: S. Loreti
- 2 CNR Bari: M. Saponari
- 3 PPS Lombardia: F. Gaffuri
- 4 PPS Toscana: D. Rizzo
- 5 PPS Liguria: M. Guelfi
- 6 PPS Veneto: A. Saccardi
- 7 PPS Emilia Romagna: S. Boncompagni, A.R. Babini
- 8 PPS Trentino Alto Adige: V. Gualandri
- 9 UNIMI: P. Casati

3.3 Campioni target e non-target

3.3.1. Campioni PRE-TEST

Ciascuno dei tre gruppi ha ricevuto una serie di campioni di estratto di olivo liofilizzato contaminato con una sospensione batterica devitalizzata di *Xylella fastidiosa* ceppo CODiRO diluita a concentrazioni decimali progressive da 10^7 unità formanti colonie ufc/ml a 10 ufc/ml. Sono stati inviati 16 campioni totali come riportato nella Tabella. Ciascuna serie è stata saggiata per l'analisi diretta di estratto crudo e per l'analisi di DNA estratto con il metodo basato sull'utilizzo di C-TAB (procedura B secondo Loconsole *et al.*, 2014). L'attività ha permesso la valutazione della sensibilità analitica dei metodi a partire dall'utilizzo di estratto crudo e DNA purificato.

Serie di campioni utilizzata per l'analisi diretta di estratto crudo e per l'estrazione di DNA ai fini del calcolo della sensibilità analitica dei metodi

Quantità	Matrice	Tipologia campione
14	Estratto di olivo	Inoculato artificialmente da 10^7 a 10 ufc/ml
2	Estratto di olivo	sano

3.3.2. Campioni “test performance study “(TPS)

Ciascun partecipante al TPS ha ricevuto 12 campioni di estratto di olivo liofilizzato contaminato con una sospensione batterica devitalizzata di *Xylella fastidiosa* ceppo CODiRO alle concentrazioni riportate nella tabella successiva (esprese in ufc/ml).

Serie di campioni utilizzata per l'analisi diretta di estratto crudo e per l'estrazione di DNA ai fini del TPS.

Quantità	Matrice	Tipologia campione
3	Estratto di olivo	Inoculato artificialmente con 10^6 ufc/ml
3	Estratto di olivo	Inoculato artificialmente con 10^4 ufc/ml
3	Estratto di olivo	Inoculato artificialmente con 10^3 ufc/ml
3	Estratto di olivo	sano

3.3.3. Ceppi batterici non target per la valutazione dell'esclusività

Presso il CREA-DC è stata effettuata la valutazione dell'esclusività. A tale scopo sono stati utilizzati i ceppi batterici riportati.

Ceppi batterici utilizzati per il calcolo della esclusività. In colonna è riportata la specie di ciascun ceppo, il codice della collezione CREA-DC e l'eventuale codice della collezione originale di provenienza del ceppo.

Codice CREA-PAV	Specie	Altri codici
1000	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> bv1	L.C.58
1001	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> bv2	AT 20 N5
1002	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> bv1	B6
1009	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	
1019	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	NCPPB 411
1028	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	NCPPB 935
1033	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pelargonii</i>	
1040	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pelargonii</i>	
1046	<i>Clavibacter michiganensis</i> pv. <i>michiganensis</i>	
1180	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	
1204	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	
1205	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	
1229	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	
1230	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	
1235	<i>Pantoea agglomerans</i>	ISF 438
1264	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	
1300	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	
1311	<i>Brenneria rubrifaciens</i>	NCPPB 2020T
1312	<i>Brenneria quercina</i>	NCPPB 1852T
1313	<i>Brenneria populi</i>	NCPPB 4249 T

1363	<i>Ralstonia solanacearum</i>	NCPPB 325T
1452	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	IVIA-3287.1
1453	<i>Erwinia amylovora</i>	I 208
1474	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>	NCPPB 1832
1475	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>populi</i>	NCPPB 2987
1479	<i>Xanthomonas arboricola</i>	Uni-Mo 279
1775	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	2766
1788	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	
1822	<i>Agrobacterium vitis</i>	
1824	<i>Agrobacterium vitis</i>	

3.4 Partecipanti al Test Performance Study

1. SELGE/CNR-IPSP/ DiSSPA-Uniba (M. Saponari, G. Loconsole; O. Potere)
PPS Piemonte (C. Morone, G. Mason)
2. PPS Friuli Venezia Giulia (G. Bianchi)
3. PPS Lombardia (F. Gaffuri)
4. PPS Toscana (D. Rizzo)
5. PPS Veneto (A. Saccardi; D. Pasqua di Bisceglie)
6. PPS Emilia Romagna (A. Alessandrini; R. Gozzi)
7. PPS Trentino Alto Adige (V. Gualandri; L. Tessari)
8. PPS Marche (S. Nardi; S. Talevi)
9. PPS Liguria (M. Guelfi)
10. CIHEAM-IAMB (A.M. D'Onghia; M. Digiario)
11. CRSFA (F. Palmisano)
12. Centro di Sperimentazione Agraria e Forestale, Laimburg (A. Gallmetzer;
A. Kraus)
13. Uni-MI (P. Casati)
14. Uni-CT (V. Catara)
15. CREA-DC (N. Pucci; S. Loreti)

3.5. Sensibilità analitica (DATI PRE-TEST)

I valori di sensibilità analitica, espressi in ufc/ml, sono riportati rispettivamente per estratto crudo e DNA nelle tabelle di seguito riportate. I campioni utilizzati per la valutazione di questo parametro sono riportati nel paragrafo 3.3.1. I metodi sono numerati secondo quanto indicato nei paragrafi 2.1.1 e 2.1.2.

3.5.1 Soglia di sensibilità analitica dei campioni di estratto crudo

Viene di seguito rappresentato il valore soglia di sensibilità analitica ottenuta per ciascun metodo a partire da estratto crudo.

	A.1	A.2	A.3 (*)
Sensibilità analitica (ufc/mL)	10^{4-5}	10^5	10^{3-4}

(*) processata in uno strumento di PCR

3.5.2 Soglia di sensibilità analitica dei campioni di DNA

Viene di seguito rappresentato il valore soglia di sensibilità analitica ottenuta per ciascun metodo a partire da DNA estratto secondo **il metodo di Loconsole *et al.* (2014) (procedura B).**

	A.4	A.5	A.6	A.7	A.8	A.9
Sensibilità analitica (ufc/mL)	10^4	10	10^2	10^{1-2}	10^{2-3}	10^3 (*) 10^{1-2} (**)

(*) effettuata con strumento PCR

(**)effettuata con strumento ic-gene of Enbiotech s.r.l.

3.6 Specificità analitica (esclusività)

L'esclusività è stata valutata sui ceppi batterici riportati in paragrafo 3.3.3. Non è stato possibile valutare l'inclusività (verifica di specificità di differenti ceppi di *Xylella fastidiosa*) a causa del divieto di detenzione di ceppi del batterio.

3.6.1. Real time (Francis *et al.*, 2006)

Esclusività: 100%

Note

Xanthomonas arboricola pv. *celebensis* e *Brenneria populi* producevano una curva di amplificazione corrispondente a picchi di melting di 87°C and 87.5°C (diversi dai valori attesi per *X. fastidiosa* pari a 83-85%).

Pantoea agglomerans, *Brenneria quercina*, *Pseudomonas marginalis*, *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargoni* producevano una curva di amplificazione corrispondente a

picchi di melting inconsistenti.

3.6.2 Real time (Harper *et al.*, 2010)

Esclusività: 100%

Nessuna reazione aspecifica.

3.6.3 ELISA (Agritest srl)

Esclusività: 100%

Nessuna reazione aspecifica.

3.6.4 ELISA (Loewe srl)

Esclusività: 100%

Nessuna reazione aspecifica.

3.7 Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata attraverso l'analisi di cinque replicati di campioni contaminati con una concentrazione del batterio.

Ripetibilità : 100%:

1. ELISA Kits (Loewe and Agritest)
2. real-time PCR Taqman (Harper *et al.*, 2010) and SYBR green (Francis *et al.*, 2006)
3. PCR (Minsavage *et al.*, 1994) con campioni diluiti 1/10
4. LAMP-PCR (Enbiotech s.r.l.)

Ripetibilità : 80%

1. PCR (Minsavage *et al.*, 1994) con campioni di DNA non dliuiti

3.8 Sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, accordanza e concordanza (DATI PRE-TEST)

Vengono riportati in tabella i valori dei criteri di performance calcolati come illustrati nella premessa, valutati dai tre laboratori (CREA-DC, IPSP-CNR, Servizio Fitosanitario Lombardia) nell'ambito del PRE-TEST. I valori di ciascun parametro sono espressi in percentuale (%) e riportati rispettivamente per estratto crudo e DNA.

CRITERIO	ESTRATTO CRUDO			DNA					
	ELISA	LAMP	PCR	Real Time			LAMP		
	A.1	A.2	A.3	A.4	A.5	A.6	A.7	A.8	A.9*
Sen. relativa	38	44	67	51	98	91	98	87	71
Spec. relativa	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Accuratezza relativa	51	56	74	61	98	93	98	89	78

* Questo risultato è il frutto di soli 2 laboratori e la reazione LAMP è stata effettuata sullo strumento di real-time PCR.

3.9 Sensibilità e specificità diagnostica, accuratezza, accordanza e concordanza (dati TPS)

I parametri di seguito riportati sono il risultato dell'attività dello studio inter-laboratorio. I valori sono stati calcolati secondo le formule riportate nel paragrafo 3.8. I valori di ciascun parametro sono espressi in percentuale (%) e riportati rispettivamente per estratto crudo e DNA nelle Tabelle successive.

CRITERIO DI VALUTAZIONE	ESTRATTO CRUDO			DNA					
	ELISA	LAMP	IF	PCR	Real Time			LAMP	
	B.1	B.2	B.3	B.4	B.5	B.6	B.7	B.8	B.9*
Sensibilità relativa	33	36	70	36	47	90	100	100	90
Specificità relativa	100	100	97	100	100	100	97	100	100
Accuratezza relativa	50	52	77	57	60	92	100	100	92
Accordanza	49	51	68	74	56	91	99	100	91

Concordanza	49	50	63	55	60	85	99	100	85
-------------	----	----	----	----	----	----	----	-----	----

*Effettuata con l'ic-gene (Enbitech)

3.10 Confronto fra metodi di estrazione del DNA (Loconsole *et al.*, 2013 procedura B; DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN)

Vengono di seguito riportati i risultati dei parametri di validazione di ciascun metodo il cui DNA target è stato processato in parallelo con metodo basato sull'utilizzo di C-TAB (Loconsole *et al.*, 2013, procedura B) e con kit commerciale (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN). Il confronto dei dati di validazione per ciascun metodo ci dà un'indicazione della performance di ciascun metodo di DNA a confronto. A questo proposito vengono riportati i dati di validazione nelle seguenti tabelle.

Valori % di sensibilità, specificità diagnostica e accuratezza relativa ottenuti con ciascun metodo di analisi a partire da DNA estratto con metodo C-TAB (Loconsole et al., 2013, procedura B) e con kit commerciale (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN).

	B.5		B.6		B.7		B.8		B.9	
Sensibilità diagnostica	47	42	90	98	100	100	100	100	94	100
Specificità diagnostica	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100
Accuratezza relativa	60	57	92	98	99	100	100	100	96	100

Estrazione DNA secondo Loconsole *et al.*, 2013, procedura B: utilizzo C-TAB

Estrazione DNA secondo le indicazioni del kit (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN)

Valori % di ripetibilità ottenuti con ciascun metodo di analisi a partire da DNA estratto con metodo C-TAB (Loconsole et al., 2013, procedura B) e con kit commerciale (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN).

	B.5		B.6		B.7		B.8		B.9	
Accordanza	78	87	85	96	100	100	100	100	92	100

Estrazione DNA secondo Loconsole *et al.*, 2013, procedura B: utilizzo C-TAB

Estrazione DNA secondo le indicazioni del kit (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN)

Valori % di riproducibilità ottenuti con ciascun metodo di analisi a partire da DNA estratto con metodo C-TAB (Loconsole et al., 2013, procedura B) e con kit commerciale (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN).

	B.5		B.6		B.7		B.8		B.9	
Concordanza	88	94	92	98	99	100	100	100	95,5	100

Estrazione DNA secondo Loconsole *et al.*, 2013, procedura B: utilizzo C-TAB

Estrazione DNA secondo le indicazioni del kit (DNeasy Mericon FOOD KIT, QIAGEN)

4. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nell'ambito del Test Performance Study oggetto di questo protocollo evidenziano valori ottimali di accordanza e concordanza dei metodi saggiati a supporto della robustezza dei dati ottenuti. Inoltre i valori relativi ai parametri di sensibilità diagnostica, specificità diagnostica e accuratezza relativa sono coerenti mettendo a confronto l'attività del PRE-TEST e quella del TPS, avvalorando la veridicità dei risultati.

Il confronto, per i metodi molecolari, fra l'estrazione del DNA effettuata mediante uso di un kit commerciale e il metodo manuale basato sull'utilizzo del C-TAB, evidenzia la possibilità di usare entrambi avendo ottenuto ottimi valori di accuratezza relativa, variabile a seconda del metodo di diagnosi dal 92-100% per C-TAB e dal 98-100% per il kit commerciale. Il risultato ottenuto con l'utilizzo del kit è dovuto evidentemente alla migliore qualità del DNA e alla standardizzazione del metodo, che si conferma con gli elevati valori di riproducibilità ottenuti (88-100% per C-TAB e dal 98-100% per il kit commerciale). Unica eccezione è il risultato di PCR RST 31-33 in cui il più basso valore di accuratezza relativa ottenuto col kit (57%) rispetto al metodo manuale C-TAB (60%), dipende dalla minore resa di DNA col kit e conseguente inferiore concentrazione di DNA di cui risente il metodo di PCR convenzionale perché meno sensibile rispetto ai metodi LAMP e real-time PCR (per i quali sono sufficienti concentrazioni inferiori di DNA). L'elevata standardizzazione del risultato grazie all'uso del kit è avvalorata dal valore di concordanza, pari al 94% a confronto con l'88% del metodo manuale.

Il PRE-TEST ha avuto come obiettivo principale l'individuazione della sensibilità analitica. Passando in rassegna i vari metodi di diagnosi si evidenziano, per ELISA e PCR (RST31-33), valori bassi di sensibilità analitica (rispettivamente 10^{4-5} e 10^4 cfu/ml) e sensibilità diagnostica (rispettivamente 36-37% e 47%) rispetto ai valori, più elevati, ottenuti con gli altri metodi. Di conseguenza l'utilizzo dell'ELISA si suggerisce per analisi ad ampio spettro da effettuarsi nelle sole aree infette da *X. fastidiosa*. I risultati di real-time PCR evidenziano elevati valori di sensibilità analitica (10^{-10^2} cfu/ml), sensibilità diagnostica (90-100%) e di esclusività (100%). Alcuni risultati inconsistenti (vedi par. 3.6.1) venivano prodotti con il metodo Francis *et al* (2006). Ottimi (100%) sono risultati i valori di performance della multiplex q-PCR (Harper *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006). I metodi basati sull'utilizzo del DNA in real-time PCR risultano quindi molto più efficaci nel rilevare la presenza del patogeno a basse concentrazioni, pertanto si suggerisce l'utilizzo di questi metodi per il monitoraggio in aree pest-free e in particolare per l'analisi di campioni asintomatici (nei quali ci si aspetta una bassa concentrazione del batterio).

Infine il sistema LAMP (Enbiotech srl) è risultato efficace sia a partire da estratto crudo che da DNA. Infatti a partire dall'estratto crudo i valori sono migliori rispetto all'ELISA sia per quanto riguarda la sensibilità analitica (10^{3-4} cfu/ml rispetto a circa 10^5 cfu/ml) sia l'accuratezza relativa (77% rispetto a 50-52%), mentre utilizzando il DNA l'accuratezza relativa (92%) è paragonabile ai valori ottenuti mediante la real-time PCR di Francis *et al.* (2006). La sensibilità analitica ha valori pari a 10^{2-3} cfu/ml quando l'analisi è stata effettuata nello strumento di real-time PCR;

tuttavia analizzando lo stesso DNA nello strumento dedicato (ic-gene, Enbiotech srl) la sensibilità analitica è migliorata producendo valori pari a quelli ottenuti con il metodo di real-time PCR (10^{1-2} cfu/ml). Questi risultati forniscono l'indicazione che il metodo LAMP è idoneo per lo screening preliminare di materiale vegetale avendo il vantaggio di essere applicabile direttamente in campo. In quest'ultimo caso il sistema che prevede l'estrazione diretta dal picciolo deve essere ulteriormente validata e non è stato oggetto di questo studio.

I risultati ottenuti possono così riassumersi:

1. valori ottimali di riproducibilità e ripetibilità attestano la robustezza dei risultati ottenuti.
2. i valori più elevati ottenuti a partire dal DNA estratto col kit commerciale riflettono la migliore standardizzazione di questo rispetto al metodo manuale.
3. ELISA e PCR (RST31-33) presentano minore sensibilità degli altri metodi molecolari e sono quindi consigliabili per analisi da effettuarsi su larga scala in aree infette.
4. la real-time PCR ha valori elevati di sensibilità: è consigliabile il suo utilizzo per le analisi in aree pest-free, in particolare di materiale asintomatico.
5. la multiplex real-time PCR ha dato ottimi risultati.
6. la LAMP è un metodo rapido ed efficace anche a partire da estratto crudo, risultando preferibile all'ELISA per analisi su larga scala.

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ALMEIDA, R. P. P. & NUNNEY L. (2015). How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? Plant Disease, **99**, 1457–1467.
- BERGSMA-VLAMI M, BILT VAN DE JLJ, TJOU-TAM-SIN NNA, VOSSENBERG VAN DE BTLH & WESTENBERG M (2015). *Xylella fastidiosa* in Coffea arabica ornamental plants imported from Costa Rica and Honduras in the Netherlands. Journal of Plant Pathology **97**, 395.
- BULL CT, DE VOER SH, DENNY TP, FIRRAO G, FISCHER-LE SAUX M, SADDLER GS *et al.* (2012) List of new names of plant pathogenic bacteria (2008–2010). Journal of Plant Pathology **94**, 21–27.
- CHEN J, SU CC, DENG WL, JAN FJ, CHANG CJ & HUANG H (2014). Analyses of *Xylella* whole genome sequences and proposal of *Xylella taiwanensis* sp. nov. CDFA Pierce's Disease Control Program Research Symposium. p.92. http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=311469 [last accessed 2016-06-10] EPPO (2015) EPPO Reporting Service 2015/181. *Xylella fastidiosa* detected in Coffea spp. plants imported into Switzerland. <https://gd.eppo.int/reporting/article-5128> [last accessed 2016-06-01].
- ELBEAINO, T., VALENTINI, F., KUBAA, A. K., MOUBARAK, P., YASEEN, T., & DIGIARO, M. (2014). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by 'Olive Quick Decline Syndrome' in Italy. Phytopathologia Mediterranea, **53**, 533–542.
- FRANCIS M, LIN H, CABRERA-LA ROSA J, DODDAPANENI H & CIVEROLO EL (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. European Journal of Plant Pathology **115**, 203–213.
- GIAMPETRUZZI A, CHIUMENTI M, SAPONARI M, DONVITO G, ITALIANO A, LOCONSOLE G *et al.* (2015) Draft genome sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO strain. Genome Announcements **3**(1), 01538–14.
- HARPER SJ, WARD LI & CLOVER GRG (2010) Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. Phytopathology **100**, 1282–1288.
- LEGENDRE B, MISSISSIPI S, OLIVER V, MOREL E, CROUZILLAT D, DURAND K *et al.* (2014) Identification and characterisation of *Xylella fastidiosa* isolated from coffee plants in France. Journal of Plant Pathology **96**, S4.100.
- LI W., J.S. HARTUNG, L. LEVY, 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. Journal of Microbiological Methods **66**, 104–115
- LOCONSOLE G, POTERE O, BOSCIA D, ALTAMURA G, DJELOUAH K, ELBEAINO T *et al.* (2014) Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. Journal of Plant Pathology **96**, 7–14.
- MARCELETTI S & SCORTICHINI M (2016) Genome-wide comparison and taxonomic relatedness of multiple *Xylella fastidiosa* strains reveal the occurrence of three subspecies and a new *Xylella* species. Archives of Microbiology **198**(8), 803–812.
- MARTELLI GP (2015) The current status of the quick decline syndrome of olive in the southern Italy. Phytoparasitica **44**, 1-10.

- MARTELLI GP, BOSCIA D, PORCELLI F & SAPONARI M (2016) The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. *European Journal of Plant Pathology* **144**, 235–243.
- MINSAVAGE GV, THOMPSON CM, HOPKINS DL, LEITE RMVBC & STALL RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**, 456–461.
- NIGRO, F., BOSCIA, D., ANTELM, I., & IPPOLITO, A. (2013). Fungal species associated with a severe decline of olive in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, **95**, 668.
- NIGRO, F., ANTELM, I., & IPPOLITO, A. (2014). Identification and characterization of fungal species associated with the quick decline of olive. *Journal of Plant Pathology*, **96**, S4.101.
- NUNNEY L, SCHUENZEL EL, SCALLY M, BROMLEY RE & STOUTHAMER R (2014) Large-scale intersubspecific recombination in the plantpathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 3025–3033.
- POTERE, O., SUSCA, L., LOCONSOLE, G., SAPONARI, M., BOSCIA, D., SAVINO, V. N., & MARTELLI, G. P. (2015). Survey for the presence of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* strain CoDiRO in some forestry and ornamental species in the Salento peninsula. *Journal of Plant Pathology*, **97**, 373–376.
- SAPONARI M, BOSCIA D, NIGRO F & MARTELLI GP (2013) Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology* **95**, 668.
- SAPONARI, M., BOSCIA, D., LOCONSOLE, G., PALMISANO, F., SAVINO, V. N., POTERE, O., & MARTELLI, G. P. (2014a). New hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO in Apulia. *Journal of Plant Pathology*, **96**, 611.
- SAPONARI, M., LOCONSOLE, G., ALMEIDA, R., COLETTA-FILHO, H., MARTELLI, G. P., & BOSCIA, D. (2014b). Isolation, genotyping and preliminary data on the pathogenicity of *Xylella fastidiosa* CoDiRO strain. *International Symposium on the European Outbreak of Xylella Fastidiosa in Olive*. *Journal of Plant Pathology*, **96**, S4.103.
- SAPONARI, M., LOCONSOLE, G., CORNARA, D., YOKOMI, R. K., DE STRADIS, A., BOSCIA, D., BOSCO, D., MARTELLI, G. P., KRUGNER, R., & PORCELLI, F. (2014c). Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* Salento strain by *Philaenus spumarius* L. (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *Journal of Economic Entomology*, **107**, 1316–1319.
- SAPONARI, M., & BOSCIA, D. (2015). Pathogenicity tests and analysis to verify the susceptibility of grapevines to *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO. Parma: Scientific Report to the European Food Security Agency (EFSA). 30 pp.
- SCHAAD NW, POSTNIKOVA E, LACY G, FATMI MB & CHANG CJ (2004) *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* [corrected], subsp. nov. *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov. and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic Applied Microbiology* **27**, 290–300. [Subsp. *piercei* corrected by subsp. *fastidiosa* in *Systematic Applied Microbiology* **27**, 763].
- SUSCA, L., POTERE, D., MARULLO, S., SAVINO, V. N., VENERITO, P., LOCONSOLE, G., SAPONARI, M., BOSCIA, D., & LA NOTTE, P. (2014). Preliminary results of a survey of weeds as potential hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO. *International*

- Symposium on the European Outbreak of *Xylella fastidiosa* in Olive. Journal of Plant Pathology, **96**, S4.111.
- WELLS, J. M., RAJU, B. C., HUNG, H. Y., WEISBURG, W. G., MANDELCO-PAUL, L., & BRENNER, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to Xanthomonas spp. International Journal of Systematic Bacteriology, **37**, 136–143.

Allegato I Strumenti, reagenti e materiali

Strumenti

1. autoclave
2. blocco termostato
3. cappa aspirante
4. cella elettroforetica
5. centrifuga
6. frigoriferi +4°C e – 20°C
7. macchina per produzione ghiaccio
8. mortai o Stomacher
9. pH-metro
10. piastra agitante con ancorette magnetiche
11. pipette da P-2 a P-1000
12. termociclatore
13. termostato
14. transilluminatore UV

Reagenti

1. acido acetico glaciale
2. agarosio
3. cloroformio
4. 2-propanolo
5. EDTA
6. d H₂O ultrapura
7. etanolo 70%
8. glicerolo
9. KCl
10. Gelred Nucleic Acid Stain (Biotium)
11. NaCl
12. NaH₂PO₄·2H₂O
13. Na₂HPO₄·12 H₂O
14. Trisma base

Materiali

1. guanti monouso

2. provette “Eppendorf” da 1,5 ml
3. provette da PCR e Real Time Pcr
4. puntali per P-2 a P-1000 con filtro
5. puntali per P-20 a P-1000 senza filtro

Materiali Forniti Dal CREA-Pav:

1. Kit Elisa Agritest
2. Kit Elisa Loewe
3. Kit Loewe per Immunofluorescenza
4. Kit Qualiplant Real Time PCR
5. Kit Enbiotech Lamp PCR
6. Kit Qualiplant Lamp PCR
7. DNeasy® Mericon food Kit (50). QIAGEN
8. Amplitaq Gold 360 master mix Thermofisher.
9. Sybr Select master Mix Applied Biosystem
10. Taqman Fast advanced Master mix Applied Biosystem
11. primer: RST31, RST33, HL5, hl6, xf-f, xf-r, cox-f, cox-r
12. SOND: xf-p, cox-p
13. dNTPs,

Indice per autori

Allegato II tamponi e terreni di crescita

In

Tampone TAE 1X

(STOCK 1lt 50X: Tris base 242g, acido acetico glaciale 57,1 ml, EDTA 0,5M, pH = 8,0 100ml)

NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0.15 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	3.2 g
Glicerolo	50 ml
d H ₂ O	100 ml

Tampone IF (Na-PBS) pH 7.2 (10 mM):

NaCl	40 g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	2 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	5,35g
KCl	1 g
dH2O	5,00 l

Dopo aver sciolto gli ingredienti e misurato il pH, separare il tampone in due aliquote (1 litro, 4 litri) e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 min. Successivamente aggiungere all' aliquota di 4 litri 0.1% Tween 20 (Tampone IF-Tween che dovrà essere utilizzato per i lavaggi).

Liquido di montaggio: glicerolo e buffer fosfato pH 7.6