

PREMESSA

I protocolli diagnostici descritti in questo volume sono il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (DM 19738/7303/08 del 29/12/2008).

I protocolli forniscono le linee guida per la diagnosi e l'identificazione di patogeni delle piante (funghi, batteri, fitoplasmi, virus e viroidi) nei laboratori preposti alla diagnosi degli organismi di qualità e/o quarantena, presenti sul territorio italiano. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati 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 (inclusività per le colture batteriche), specificità diagnostica (esclusività per le colture batteriche), selettività, accuratezza, sensibilità analitica (limite di rilevabilità), specificità analitica, ripetibilità e riproducibilità (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98).

Per l'ottenimento di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state eseguite con reagenti e strumentazioni 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 di esperti (GdL)** costituito da varie istituzioni scientifiche di comprovata esperienza nello studio del patogeno oggetto di diagnosi. La composizione degli specifici GdL è riportata all'interno di ogni protocollo. Infine, ogni protocollo è stato valutato, per l'ottenimento del valore della riproducibilità, da un ring test *inter* laboratorio a cui hanno preso parte laboratori dei servizi fitosanitari regionali (SFR) e laboratori privati. Anche in questo caso, all'interno di ogni specifico protocollo è riportata la lista dei laboratori che hanno partecipato alla valutazione ed armonizzazione dello stesso.

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 PM 7/98 (2010)]*, utilizzando campioni target e non target di riferimento:

- **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.).
- **Esclusività:** assenza di interferenza da parte di un saggio a partire da una collezione di ceppi batterici in coltura pura 'non target' (ovvero capacità di un saggio di NON rilevare falsi positivi).
- **Sensibilità diagnostica:** capacità del saggio di rilevare la presenza del patogeno 'target' nei campioni di riferimento contaminati o sicuramente infetti.
- **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'.
- **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.
- **Sensibilità analitica (limite di rilevabilità):** la più piccola quantità di entità infettiva individuata dal saggio mediante utilizzo di concentrati vegetali contaminati sperimentalmente con sospensioni dei patogeni 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.
- **Specificità analitica:** capacità del metodo utilizzato di NON rilevare la presenza di altri microrganismi (*cross-reaction*);
- **Ripetibilità:** 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)
- **Riproducibilità:** la percentuale di ottenimento dello stesso risultato da due identici campioni, analizzati in due laboratori differenti, da differenti operatori.

* EPPO Diagnostic PM 7/98 (2010) *Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity.*

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

ISO 17025 (2005) *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*

Le prove di validazione sono state effettuate utilizzando una serie di campioni di riferimento ('target' e 'non target').

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 sottospecie) 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: $A/(A+B)^a$

% Specificità diagnostica: $D/(C+D)^b$

% Accuratezza relativa: $A + D/(A+B+C+D)$

^a e ^b vengono utilizzati per il calcolo dei dati di validazione rispettivamente dei parametri inclusività ed esclusività, valutati su colture pure di ceppi batterici di riferimento.

Per la 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. I valori sono stati calcolati verificando quante volte lo stesso risultato veniva ripetuto a prescindere dal fatto che fosse infetto o meno (es. campione 1 +, +, +, campione 2 +, +, -, campione 3 +, +, - ecc)

% Ripetibilità: C/N

C = risultati concordanti

N = campioni totali

Per la Riproducibilità si applica lo stesso metodo della ripetibilità, solo che le analisi vengono eseguite in differenti laboratori, usando gli stessi reagenti, lo stesso protocollo e gli stessi campioni.

% Riproducibilità : SC/SN

SC = sommatoria dei risultati concordanti per ogni campione

SN = sommatoria del numero di laboratori che ha analizzato ogni campione

Indice del volume/ *volume index*

Premessa	455
Protocollo diagnostico per '<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>' (AP)	461
Protocollo diagnostico per '<i>Candidatus Phytoplasma prunorum</i>' (ESFY)	491
Protocollo diagnostico per '<i>Guignardia citricarpa</i>'	517
Protocollo diagnostico per '<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>' e '<i>Tomato chlorosis virus</i>' su pomodoro	545
Protocollo diagnostico per i virus della vite coperti da norme fitosanitarie: GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3, GVA, GVB, ArMV, GFLV, GFkV	567

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
‘*CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI*’
(AP)**

**G. Pasquini¹, L. Ferretti¹, A. Bertaccini², P.A. Bianco³,
P. Casati³, E. Costantini¹, M. Martini⁴, C. Marzachi⁵,
S. Palmano⁵, S. Paltrinieri²**

¹Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura – Centro di Ricerca per la
Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

²DipSA, Patologia Vegetale, *Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna

³DISAA, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano

⁴DISA, Università di Udine

⁵Istituto di Virologia Vegetale-CNR, Torino

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	463
1.1 Caratteristiche genomiche	463
1.2 Sintomatologia	463
1.3 Epidemiologia e trasmissione	464
1.4 Diagnosi	464
1.5 Normativa fitosanitaria	465
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	465
2.1 Campionamento a fine stagione vegetativa	465
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	466
3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche	468
3.2 Estrazione del DNA da matrice vegetale	469
3.3 Metodo diagnostico 1: PCR	470
3.4 Metodo diagnostico 2: PCR nested	473
3.5 Metodo diagnostico 3: SYBR Green real-time PCR	480
4. DATI DI VALIDAZIONE	483
4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche	483
4.2 Metodo diagnostico 1: PCR diretta	484
4.3 Metodo diagnostico 2: PCR nested	485
4.4 Metodo diagnostico 3: SYBR Green real-time PCR	486
5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	487
Allegato I - Strumenti, materiali e reagenti necessari	488

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali' (Seemüller and Schneider, 2004; IRPCM, 2004)
Tassonomia	Classe: Mollicutes Gruppo ribosomico: 16SrX (AP - Apple proliferation group) Sottogruppo: 16SrX-A
Ceppi individuati	AT-1, AT-2, AP-15
Avversità	Scopazzi del melo
Acronimo	AP (<i>Apple proliferation</i>)
Ospiti	melo
Vettori	<i>Cacopsylla melanoneura</i> Förster, <i>C. picta</i> Förster (syn. <i>C. costalis</i>)

1.1 Caratteristiche genomiche

Nel 2008 è stata ottenuta una sequenza completa del genoma di '*Ca. P. mali*' (Kube *et al.*, 2008) che ha evidenziato la presenza di un cromosoma lineare di 602 Kb caratterizzato da un basso contenuto di GC (21,4%) e da un ridotto numero di sequenze codificanti per proteine (496).

1.2 Sintomatologia

Come per tutte le fitoplasmosi i sintomi indotti da '*Ca. P. mali*' sono conseguenti allo squilibrio fisiologico-ormonale indotto dalla presenza del fitoplasma nei tessuti floematici della pianta. I sintomi osservabili in campo sono diversi e possono essere o meno contemporaneamente presenti sulla pianta. Il sintomo più caratteristico, in grado di indicare con certezza la presenza della malattia anche se presente da solo, è rappresentato dalle 'scope'. Queste risultano particolarmente evidenti in inverno, associate alla presenza di legno arrossato, non maturo, di consistenza elastica e a rami con internodi raccorciati e dall'andamento anomalo. Per tutti gli altri sintomi osservabili, invece, l'associazione certa con la malattia è subordinata alla contemporanea presenza di almeno due sintomi, come di seguito specificato:

- arrossamento e mele piccole;
- arrossamento e stipole ingrandite;
- stipole e mele piccole;
- clorosi e scope;
- ritorni a fiore tardivi e scope

I sintomi possono interessare solo alcune parti della pianta e compaiono sia alla ripresa vegetativa - fioritura (ripresa anticipata, vegetazione lussureggiante, mazzetti florali con stipole ingrandite e, soprattutto in presenza di ritorni di freddo, foglioline arrossate) sia a fine stagione (presenza di scope, foglie di consistenza cartacea e con stipole ingrandite, arrossamenti fogliari, clorosi, filloptosi precoce, ritorni a fiore, mele piccole).

Da sottolineare che non tutte le piante infette manifestano sintomi e che, talvolta, su piante sintomatiche si può assistere ad una regressione temporanea dei sintomi per alcuni anni o alla loro definitiva scomparsa, sebbene la pianta continui a rimanere infetta per tutto il suo ciclo di vita.

1.3 Epidemiologia e trasmissione

La diffusione in natura di AP avviene ad opera di insetti vettori che trasmettono il fitoplasma con una modalità di tipo persistente-propagativo. In Italia i vettori accertati di 'Ca. P. mali' sono le psille *Cacopsylla picta* Förster e *C. melanoneura* Förster (Frisinghelli *et al.*, 2000; Tedeschi *et al.*, 2002; Tedeschi e Alma, 2004). Entrambe le specie compiono una sola generazione all'anno, svernando come adulti su piante rifugio, abitualmente rappresentate da conifere. Da questi ricoveri invernali gli adulti re-immigranti si spostano sulle piante di melo a partire da fine gennaio (*C. melanoneura*) e marzo/aprile (*C. picta*). Qui si compie l'ovideposizione e lo sviluppo della nuova generazione che si alimenta sull'ospite arboreo fino al raggiungimento dello stadio adulto, per poi tornare nei siti di svernamento.

In natura la trasmissione di 'Ca. P. mali' può avvenire anche attraverso ponti radicali formati spontaneamente fra piante contigue, con una percentuale di trasmissibilità, nelle condizioni di campo, che può risultare anche molto elevata (Vindimian *et al.*, 2002; Ciccotti *et al.*, 2008).

Infine, un ruolo importante nella diffusione di AP è rivestito dal materiale vivaistico, come dimostrato dal rinvenimento di piante infette da 'Ca. P. mali' già prima dell'impianto. In tal senso, occorre sottolineare che la trasmissione del fitoplasma può essere realizzata anche attraverso le comuni tecniche di moltiplicazione vegetativa, quali l'innesto, a partire da materiale di propagazione infetto.

1.4 Diagnosi

Sebbene per questo fitoplasma siano stati prodotti anticorpi monoclonali per l'esecuzione del test sierologico ELISA, la diagnosi di 'Ca. P. mali' si basa essenzialmente su metodi molecolari in grado di rilevare ed amplificare il DNA del fitoplasma, dopo estrazione dello stesso dalla matrice vegetale.

1.5 Normativa Fitosanitaria

Trattandosi di un patogeno da quarantena, inserito nella lista A2 dell'EPPO, 'Ca. P. mali' è soggetto a lotta obbligatoria definita, a livello normativo, dal D.M. 23 febbraio 2006 (GU n. 61 del 14-3-2006): "Misure per la lotta obbligatoria contro il fitoplasma Apple Proliferation Phytoplasma". Tale decreto scaturisce in considerazione di una serie di provvedimenti fitosanitari nazionali già vigenti e, in particolare:

- 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;
- 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;
- 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"
- A seguito della organizzazione del servizio nazionale di certificazione volontaria del materiale di propagazione vegetale delle piante da frutto (D.M. del 24 luglio 2003, G.U. 240 del 15 ottobre 2003), tale patogeno è soggetto alle disposizioni contenute nel D.M. del 20 novembre 2006 recante le "Norme tecniche per la produzione di materiale di propagazione vegetale certificato di Pomoidee".

2. METODO DI 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 Campionamento a fine stagione vegetativa

Campo

Periodo. Seconda metà di ottobre-inizio novembre.

Matrice. La matrice migliore è costituita da nervature fogliari.

Tipologia del campione. Raccogliere 20-30 foglie dalle varie porzioni sintomatiche della chioma. Le foglie devono essere integre, non in avanzato stato di senescenza e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o biotici di altra natura. Prelevare solo foglie con nervature integre, prive di necrosi e/o imbrunimenti.

Mantenimento del campione. Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica. Deve essere assolutamente evitata l'esposizione diretta ai raggi del sole e la vicinanza a fonti di calore.

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.

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 (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 protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione di 'Ca. P. mali' agente degli scopazzi del melo (*Apple proliferation* - AP) nei laboratori presenti sul territorio italiano. 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.

Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base della loro sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità.

Per la definizione di tali parametri le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazione dettagliatamente specificati e di seguito riportati. Ciò non esclude l'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 e la definizione dei parametri è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

- CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma - Coordinatore del Gruppo (Graziella Pasquini, Luca Ferretti, Elisa Costantini);
- CNR-IVV, Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino (Cristina Marzachi, Sabrina Palmano);
- DISAA, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi Milano (Piero Attilio Bianco, Paola Casati);
- DipSA, Patologia vegetale, Università di Bologna (Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri);
- DISA, Università di Udine (Marta Martini).

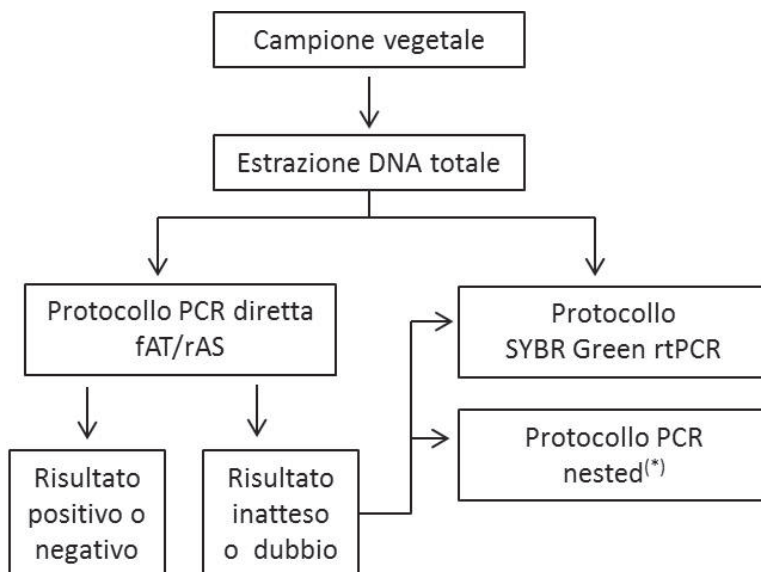
La diagnosi di ‘*Ca. P. mali*’ può essere effettuata su base molecolare per riconoscimento del DNA fitoplasmatico, mediante:

- metodo 1: PCR
- metodo 2: PCR nested
- metodo 3: SYBR Green real-time PCR (rtPCR)

La definizione del parametro di riproducibilità è scaturita dall’effettuazione di un ringtest nazionale a cui hanno partecipato i laboratori dei seguenti Servizi Fitosanitari Regionali (SFR):

- 1- SFR Provincia autonoma di Bolzano/ Centro di Sperimentazione di Laimburg; referenti: Thomas Letschka, Andreas Gallmetzer
- 2- SFR Regione Friuli Venezia Giulia; referente: Gian Luca Bianchi
- 3- SFR Regione Piemonte; referenti: Paola Gotta, Giovanna Mason
- 4- SFR Regione Lombardia; referenti: Andrea Taddei, Marica Calvi
- 5- SFR Regione Emilia-Romagna; referenti: Patrizia Grillini, Assunta D’Anniballe
- 6- SFR Regione Sardegna/ Agris Sardegna Cagliari; referente: Annamaria Repetto

3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche



(*) Nel caso in cui non si disponesse di termociclatore per real time PCR

- E' possibile saggiare il campione vegetale, prelevato in opportuna fase vegetativa (vedi capitolo campionamento), attraverso l'uso di una PCR diretta con i primers fAT/rAS oppure utilizzando il protocollo di real time PCR.
- Nel caso in cui con il protocollo di PCR diretta si ottengano risultati dubbi (campione sintomatico negativo o banda non perfettamente identificabile) ripetere l'analisi con la rt PCR.
- Nel caso in cui non si dispone di un termociclatore per real time si può sostituire la rtPCR con una PCR nested.

3.2 Estrazione del DNA da matrice vegetale

Il protocollo di estrazione del DNA totale (TDNA) dalle matrici vegetali è comune a tutti i protocolli descritti.

L'estrazione del DNA viene effettuata mediante utilizzazione di kit commerciale.

I kit commerciali prevedono generalmente l'uso di azoto liquido per la macerazione iniziale del tessuto vegetale. Nel caso non si disponga di azoto liquido in laboratorio, si può procedere con un protocollo alternativo, di seguito riportato.

a) Estrazione mediante utilizzo di azoto liquido

Polverizzare accuratamente il tessuto vegetale (nervature fogliari o tessuto sottocorticale) in azoto liquido (è consigliabile polverizzare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e, successivamente, prelevare la quantità richiesta dal kit commerciale; ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del patogeno anche in caso di una sua distribuzione erratica nei tessuti della pianta).

Prelevare 0,1 g di tessuto polverizzato e metterlo in una provetta da 2 ml quindi procedere con l'estrazione seguendo scrupolosamente le istruzioni del kit fornite dalla Ditta produttrice.

b) Estrazione senza utilizzo di azoto liquido

Nel caso in cui non si dispone di azoto liquido si può procedere come segue:

- pesare 0,5 g di tessuto vegetale (nervature fogliari o tessuto sottocorticale) e collocarli in una bustina 'Bioreba';
- aggiungere nella bustina 3 ml di tampone di estrazione (2,5% CTAB, 100 mM Tris pH8, 1,4 M NaCl, 50 mM EDTA pH8, 1% PVP-40, 0,5% acido ascorbico aggiunto poco prima dell'uso; preparare i tamponi utilizzando H₂O e reagenti sterili);
- macerare accuratamente il campione;
- prelevare dalla bustina 400 µl di lisato e trasferirlo in una provetta da 2 ml;
- aggiungere 4 µl di RNase A (100 mg/ml) e porre ad incubare a 65°C per 10 minuti;
- proseguire secondo le istruzioni del kit.

3.3 Metodo diagnostico 1: PCR

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

3.3.1 Preparazione del saggio PCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua).

Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da '*Ca. P. mali*' e da una pianta sicuramente esente da '*Ca. P. mali*', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare sempre indossando guanti e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

3.3.2 Saggio PCR

Primers

Per la diagnosi di '*Ca. P. mali*' in PCR si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

fAT: 5'- CATCATTTAGTTGGGCACTT- 3' (*)

rAS: 5'- GGCCCCGGACCATTATTATT- 3' (*)

(*)Smart *et al.*, 1996.

I primers possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 50 µM in dH₂O sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20 °C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione d'uso di 5 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Esecuzione del saggio

- Indossare guanti puliti.
- Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X Taq DNA polimerasi buffer (inclusente anche 1,5 mM MgCl₂)
 200 µM ciascun dNTP
 0,25 µM ciascun primer (fAT/rAS)
 1,25 U enzima Taq DNA polimerasi
 1 µl DNA totale estratto (TDNA)

Volume totale: 25 µl con acqua sterile

- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
- Distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
 Aggiungere 1 µl dell'estratto di TDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione. Nel controllo in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua.
- Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	95 °C	5'	1
Amplificazione	94 °C	30"	35
	56 °C	75"	
	72 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	7'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Conservare le provette a 4°C in frigorifero.

3.3.3 Elettroforesi su 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.

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 µl di amplificato da ciascun campione e miscelarli con 1 µl di loading buffer 6X. Caricare ciascun campione in un pozzetto, cambiando il puntale ad ogni campione;
4. caricare in un pozzetto un idoneo marker (dimensione 1Kb);
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 µg/ml di etidio bromuro;
7. lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O;
8. visualizzare la corsa ponendo il gel su un transilluminatore ad UV.

3.3.4 Valutazione dei risultati

Per il protocollo di PCR, se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 500 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

Qualora nei controlli in bianco e/o nel controllo sano siano visibili bande alla stessa altezza del controllo positivo, il saggio non è attendibile e va ripetuto.

Punti critici del protocollo

Il punto debole del protocollo è legato alla alta sensibilità della tecnica PCR che, se da un lato consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi dall'altro, può dare falsi positivi o provocare contaminazioni in laboratorio (a livello di estratti, reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, etc.), se non utilizzata correttamente. 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). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micropipette 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 sostituirli con aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
- usare solo acqua sterile 'nucleasi-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 TDNA);
- aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
- usare solo puntali sterili con filtro;
- in fase 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.

Si raccomanda, inoltre, di:

- 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 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;
- 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.

3.4 Metodo diagnostico 2: PCR nested

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

3.4.1 Preparazione del saggio

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua).

Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da '*Ca. P. mali*' e da una pianta sicuramente esente da '*Ca. P. mali*', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare sempre indossando guanti e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

3.4.2 Saggio PCR nested

Il saggio prevede una doppia amplificazione genica mediante PCR diretta seguita da PCR nested.

Primers

Per la diagnosi di 'Ca. P. mali' in PCR nested si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

1 - PCR diretta (*primers universali*)

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

16S-Sr: 5'-GGTCTGTCAAACTGAAGATG-3' (**)

(*) Deng and Hiruki, 1991

(**) Lee *et al.*, 2004

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

fO1: 5'-CGGAAACTTTTAGTTTCAGT-3' (*)

rO1: 5'-AAGTGCCCACTAAATGAT-3' (*)

(*) Lorenz *et al.*, 1995

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 µM in dH₂O sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione d'uso di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Esecuzione del saggio: PCR diretta

- Indossare guanti puliti.
- Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X Taq DNA polimerasi buffer (includente anche 1,5 mM MgCl₂)

200 µM ciascun dNTP

0,4 µM ciascun primer (P1/16S-Sr)

0,625 U enzima Taq DNA polimerasi

1 µl DNA totale estratto (TDNA)

Volume totale: 25 µl con acqua sterile

- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.

- Distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
- Aggiungere 1 µl dell'estratto di TDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione. Nel controllo in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua.
- Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
Amplificazione	94 °C	1'	36
	55 °C	1'	
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	8'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Conservare le provette a 4°C in frigorifero.

Esecuzione del saggio: PCR nested

- Indossare guanti puliti.
- 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 1:30 del prodotto di PCR diretta (es: 58 µl di H₂O per 2 µl di amplificato).
- 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.
- 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.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata, mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X Taq DNA polimerasi buffer (inclusente anche 1,5 mM MgCl₂)
 200 µM ciascun dNTP
 0,4 µM ciascun primer (fO1/rO1)
 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi
 1 µl DNA amplificato in PCR diretta

Volume totale: 25 µl con acqua sterile

- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare (quelli della PCR diretta più un controllo acqua specifico per la PCR nested) e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
- Distribuire 24 µl di miscela di reazione in ciascuna provetta, mantenendole in ghiaccio.
- Prelevare 1 µl della diluizione 1:30 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.
- Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
	94 °C	1'	
Amplificazione	50 °C	1'	38
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	8'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Conservare le provette a 4°C in frigorifero.

3.4.3 Elettroforesi su 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.

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 µl di amplificato da ciascun campione e miscelarli con 1 µl di loading buffer 6X. Caricare ciascun campione in un pozzetto, cambiando il puntale ad ogni campione;
4. caricare in un pozzetto un idoneo marker (dimensione 1Kb);
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 µg/ml di etidio bromuro;
7. lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O;
8. visualizzare la corsa ponendo il gel su un transilluminatore ad UV.

3.4.4 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 1050 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

Qualora nei controlli in bianco e/o nel controllo sano siano visibili bande alla stessa altezza del controllo positivo, il saggio non è attendibile e va ripetuto. Eventualmente, si può effettuare la corsa elettroforetica degli amplificati ottenuti in PCR diretta e se i controlli in bianco e il controllo sano risultano 'puliti' si può ripetere la sola PCR nested, partendo da nuove diluizioni.

Punti critici del protocollo

Il punto debole è legato alla alta sensibilità della tecnica PCR che, se da un lato consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi dall'altro, può dare falsi positivi o provocare contaminazioni in laboratorio (a livello di estratti, reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, etc.), se non utilizzata correttamente. Nel caso 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. Si raccomanda, pertanto, di lavorare con estrema attenzione (in particolare in fase di esecuzione delle diluizioni) 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). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micropipette 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 sostituirli con aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
- usare solo acqua sterile 'nucleasi-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 TDNA);
- in fase di preparazione del saggio di PCR nested, sostituire i guanti dopo aver manipolato gli amplificati di PCR diretta per l'esecuzione delle diluizioni;
- aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
- usare solo puntali sterili con filtro;
- in fase 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.

Si raccomanda, inoltre, di:

- 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 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;
- 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.

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

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

Loading buffer 10X in TBE	
Blu di bromofenolo	0,3%
Xilencianolo	0,3%
Glicerolo	60%

Soluzione di etidio bromuro 0,5 µg/ml	
Etidio bromuro	50 mg
acqua	100 ml
Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua	

Acqua bidistillata DEPC	
DEPC	0,1%
Lasciare 12 ore a temperatura ambiente in bottiglia chiusa, possibilmente sotto cappa a flusso laminare	
Autoclavare 121°C per 20'	

3.5 Metodo diagnostico 3: SYBR Green real-time PCR (rtPCR)

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

3.5.1 Preparazione del saggio SYBR Green rtPCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla in un opportuno schema cartaceo, in cui vengono anche riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo e più controlli negativi (campioni sani e controlli in bianco). Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da '*Ca. P. mali*' e da una pianta sicuramente esente da '*Ca. P. mali*', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

Distribuire i controlli bianchi all'interno della piastra alternando un controllo ogni 20 campioni e caricare almeno due controlli sani, uno come primo campione e uno come ultimo nell'ordine di caricamento sulla piastra.

3.5.2 Saggio SYBR Green rtPCR

Primers

Per la diagnosi di '*Ca. P. mali*' mediante SYBR Green rtPCR si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:



(*)Galetto *et al.*, 2005

I primers possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 30 μM in dH_2O sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C . Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 μl totali alla concentrazione d'uso di 3 μM in acqua sterile e conservarle a -20°C .

Esecuzione del saggio

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare sempre indossando guanti e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

- Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (lo stesso camice non deve essere stato utilizzato nella manipolazione di amplificati o durante la fase di estrazione dei campioni).
- Indossare guanti puliti.
- Preparare la miscela di reazione in un area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
- Disporre le piastre ottiche sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore (se si utilizzano provette ottiche in luogo delle piastre non siglarle per nessun motivo poichè il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del termociclatore).
- Scongelare i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione sotto specificata.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X SYBR Green Master Mix
 300 nM primer fAP₂ (3 µM)
 300 nM primer rAP₂ (3 µM)

Volume totale: 25 µl con acqua sterile

- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 23 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, Master Mix, primers; mescolare e mantenere in ghiaccio.
- Distribuire 23 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto.
- Cambiare area di lavoro e caricare 2 µl di estratto di TDNA con una micropipetta dedicata solo a questo scopo.
- Inserire la piastra (o le provette) nel termociclatore ed avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma:

<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
95 °C	5'	1
95 °C	15''	45
57 °C	1'	
<i>Curva di Melting</i>		
95 °C	1'	1
65 °C	1'	1
0,5° C/ciclo fino a 95 °C		

- Controllare i risultati mediante visualizzazione delle curve di Melting.

3.5.3 Valutazione dei risultati

Considerare positivi tutti i campioni con temperatura di Melting (TM) e picco di Melting (PM) coincidenti con quelli del controllo positivo.

Punti critici del protocollo rtPCR

Il punto debole della rtPCR è che si tratta di una reazione altamente sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, micropipette 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, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per la preparazione della mix e laboratorio per l'amplificazione). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali o aree separate per le tre fasi e set di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione nell'area dove si maneggiano amplificati e non portare gli amplificati nell'area dedicata alla preparazione della miscela di reazione;
- tenere i componenti e i reagenti aperti il minor tempo possibile;
- 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 'nucleasi-free' (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
- cambiare i guanti ogni qual volta si sospetta di averli contaminati durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TDNA);
- aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
- usare SOLO puntali sterili con filtro;
- in fase di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse o che la pellicola per la copertura delle piastre sia ben sigillata; 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;
- pulire periodicamente i bancali e l'equipaggiamento con una soluzione di sodio ipoclorito al 10%;
- rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.

Nella real-time effettuata con chimica SYBR Green può succedere di ottenere curve di amplificazione con valori di *Ct* riferibili ad un campione positivo anche con i controlli negativi. Ciò è dovuto al SYBR Green che, essendo un intercalante aspecifico del DNA, può legarsi anche a primers dimerizzati. L'unico metodo di valutazione della positività di ciascun campione è la verifica della corrispondenza della temperatura e del picco di Melting con il controllo positivo, indipendentemente dai valori di *Ct* osservati.

4. DATI DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri, utilizzando campioni di riferimento:

- **sensibilità specifica**
- **specificità**
- **accuratezza**
- **sensibilità analitica**
- **ripetibilità**
- **riproducibilità**

Campioni di riferimento ‘target’: isolati di ‘*Ca. P. mali*’ che coprono la diversità genetica e la distribuzione geografica del patogeno.

Campioni di riferimento ‘non target’: i) isolati di fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi nell’ambito del gruppo 16SrX; ii) patogeni geneticamente correlati (batteri fitopatogeni associati allo stesso ospite vegetale); iii) campioni non infetti appartenenti alla stessa specie vegetale ospite.

Le prove di validazione sono state effettuate su campioni raccolti a fine stagione vegetativa, a partire da nervature fogliari prelevate da piante sintomatiche.

4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche

Per la validazione dei metodi diagnostici sono stati utilizzati 30 campioni di riferimento di cui:

- **20 campioni ‘target’** infetti da ‘*Ca. P. mali*’ e provenienti da diversi areali geografici italiani;
- **5 campioni ‘non target’** rappresentati da DNA di batteri fitopatogeni comunemente associati a pomacee e campioni infetti da fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi dal 16SrX-A, come di seguito specificato:
 - 1 estratto di DNA di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolato da pero;
 - 1 estratto di DNA di *Erwinia amylovora* isolato da melo;
 - 2 campioni infetti da ‘*Ca. P. prunorum*’ (sottogruppo ribosomico 16SrX-B);
 - 1 campione infetto da ‘*Ca. P. pyri*’ (sottogruppo ribosomico 16SrX-C);
- **5 campioni ‘non target’** rappresentati da piante di melo esenti da infezione di ‘*Ca. P. mali*’.

4.2 Metodo diagnostico 1: PCR diretta

Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit commerciali per estrazione DNA totale da tessuto vegetale: DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106)

Enzima Taq polimerasi: GoTaq DNA polimerasi, Promega Corporation (cat. #M3175)

dNTPs: Promega, Cat N° C1141

Primers sottogruppo- specifici: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Bustine in plastica per estrazione campioni vegetali: Bioreba (cod. 430100)

Termociclatore: MJ PTC200, Applied Biosystems 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

Marker per DNA: GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas (#SM0311)

Parametri	Valori
Sensibilità	81%
Specificità	100%
Accuratezza	90,5%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	89,1%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10⁻⁶.

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁶.

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sei laboratori.

4.3 Metodo diagnostico 2: PCR nested

Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit commerciali per estrazione DNA totale da tessuto vegetale: DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106)

Enzima Taq polimerasi: GoTaq DNA polimerasi, Promega Corporation (cat. #M3175)

dNTPs: Promega, Cat N° C1141

Primers: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Bustine in plastica per estrazione campioni vegetali: Bioreba (cod. 430100)

Termociclatore: MJ PTC200, Applied Biosystems 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

Marker per DNA: GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas (#SM0311)

Parametri	Valori
Sensibilità	83%
Specificità	100%
Accuratezza	91,5%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻³
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	63,6%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10⁻⁶.

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁶.

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sei laboratori.

4.4 Metodo diagnostico 3: SYBR Green rtPCR

Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit estrazione DNA totale da tessuto vegetale: DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106);

SYBR Green: KAPA SYBR® FAST Master Mix (2X) ABI Prism™, Kapa Biosystems (cod. KK4604); iQ™ SYBR Green I Supermix, Bio-Rad (cod. 170-8880)

Piastre: Fast Optical 96-W Barcoded Plate (cod N8010560), Applied Biosystems; iQ 96-Well PCR Plates (cod. 223-9441), Bio-Rad

Pellicola per piastre rt PCR: Optical Adhesive Covers (cod. 4311971), Applied Biosystems; Optical Sealing Tapes (cod. 223-9444), Bio-Rad

Bustine in plastica per estrazione campioni vegetali: Bioreba (cod. 430100)

Termociclatore: ABI Prism 7500 Fast Real-Time System, Applied Biosystems; Bio-Rad iCycler (Bio-Rad)

Primers: sintetizzati da Invitrogen Ltd.

Parametri	Valori
Sensibilità	83%
Specificità	100%
Accuratezza	91,5%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻⁵
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	90,9%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10⁻⁶.

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁶.

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sei laboratori.

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- CICCOTTI A.M., P.L. BIANCHEDI, P. BRAGAGNA, M. DEROMEDI, M. FILIPPI, F. FORNO, L. MATTEDI, 2008. Natural and experimental transmission of *Candidatus Phytoplasma mali* by root bridges. *ISHS Acta Horticulturae*, **781**, 459-464.
- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbiol. Methods*, **14**, 53-61.
- FRISINGHELLI C., L. DELAITI, MS. GRANDO, D. FORTI, ME. VINDIMIAN, 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *J Phytopathol*, **148**, 425-431.
- GALETTO L., D. BOSCO, C. MARZACHI, 2005. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescente dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Annals of Applied Biology*, **147**, 191-201.
- IRPCM, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.
- LEE I.M., M. MARTINI, C. MARCONE, S.F. ZHU, 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**, 337-347.
- LORENZ K.H., B. SCHNEIDER, U. AHRENS, E. SEEMULLER, 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, **85**, 771-776.
- KUBE M., B. SCHNEIDER, H. KUHLE, T. DANDEKAR, K. HEITMANN, A.M. MIGDOLL, R. REINHARDT, E. SEEMÜLLER, 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics*, **9**, 306. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/306>
- SEEMÜLLER E. AND B. SCHNEIDER, 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1217-1226.
- SMART CD., B. SCHNEIDER, CL. BLUMQUIST, LJ. GUERRA, NA. HARRISON, U. AHRENS, KH. LORENZ, E. SEEMULLER, BC. KIRKPATRICK, 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on the sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**, 2988-2993.
- TEDESCHI R., A. ALMA, 2004. Transmission of Apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economical Entomology*, **97**, 8-13.
- TEDESCHI R., D. BOSCO, A. ALMA, 2002. Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal Econ Entomol*, **95**, 544-551.
- VINDIMIAN M.E., A.M. CICCOTTI, M. FILIPPI, M. SPRINGHETTI, M. DEROMEDI, 2002. Trasmissione di Apple Proliferation (AP) tramite anastomosi radicale. *Petria*, **12**, 375.

Allegato I - Strumentazione, materiali e reagenti

Protocollo PCR e protocollo PCR nested

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Bilancia analitica
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
7. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore
9. Frigorifero
10. Micropipette calibrate dedicate alla PCR (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
11. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione dell'acido nucleico (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. pHmetro
13. Termociclatore
14. Transilluminatore
15. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile 'nucleasi-free'
2. Agarosio, composti chimici per tampone TBE, bromuro d'etidio
3. Azoto liquido
4. Kit commerciale per estrazione DNA
5. Etanolo
6. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
7. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
8. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
9. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
10. PVP-40 (*se non si dispone di azoto liquido*)
11. Acido ascorbico (*se non si dispone di azoto liquido*)
12. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
13. Primers universali
14. Primers 16SrX-specifici
15. Primers 16SrX-A/C-specifici
16. dNTPs
17. Controllo negativo (*campione sicuramente esente da 'Ca. P. mali'*).
18. Controllo positivo (*campione infetto da 'Ca. P. mali'*)
19. Loading buffer per elettroforesi
20. Marker di DNA (1 Kb)

Materiali

1. Bustine di plastica per estrazione (tipo 'Universal', Bioreba)
2. Puntali sterili con filtro per micropipette dedicate alla PCR
3. Guanti
4. Mortai e pestelli
5. Carta da laboratorio
6. Portaprovette
7. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette da 1,5 e 2 ml

Protocollo SYBR Green rtPCR

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V.
7. Congelatore
8. Distillatore
9. Frigorifero
10. Micropipette calibrate dedicate alla rtPCR (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
11. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione dell'acido nucleico (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. Omogeneizzatore tipo Homex
13. pHmetro
14. Termociclatore per real time PCR
15. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile 'nucleasi-free'
2. Azoto liquido
3. Kit commerciale per estrazione DNA
4. Etanolo
5. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
6. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
7. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
8. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
9. PVP-40 (*se non si dispone di azoto liquido*)
10. Acido ascorbico (*se non si dispone di azoto liquido*)

11. SYBR Green Master mix
12. Primers 16SrX-A-specifici
13. Controllo negativo (*campione sicuramente esente da 'Ca. P. mali'*).
14. Controllo positivo (*campione infetto da 'Ca. P. mali'*)

Materiali

1. Bustine di plastica per estrazione (tipo 'Universal', Bioreba)
2. Carta da laboratorio
3. Guanti
4. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti
5. Piastre da 96 pozzetti per real time o provette ottiche specifiche
6. Provette da 1,5 e 2 ml
7. Puntali sterili con filtro per micropipette dedicate alla rtPCR

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
'*CANDIDATUS*
PHYTOPLASMA PRUNORUM'
(ESFY)**

**G. Pasquini¹, A. Bertaccini², P.A. Bianco³,
P. Casati³, E. Costantini¹, L. Ferretti¹, M. Martini⁴, C. Marzachi⁵,
S. Palmano⁵, S. Paltrinieri²**

¹Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura – Centro di Ricerca per la
Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

²DipSA, Patologia Vegetale, *Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna

³DISAA, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano

⁴DISA, Università di Udine

⁵Istituto di Virologia Vegetale-CNR, Torino

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	493
1.1 Sintomatologia	493
1.2 Epidemiologia e trasmissione	494
1.3 Diagnosi	494
1.4 Normativa fitosanitaria	494
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	495
2.1 Campionamento a fine riposo vegetativo	495
2.2 Campionamento a fine stagione vegetativa	496
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	497
3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche	498
3.2 Estrazione del DNA da matrice vegetale	499
3.3 Metodo diagnostico 1: PCR nested	500
3.4 Metodo diagnostico 2: TaqMan real-time PCR	506
4. DATI DI VALIDAZIONE	510
4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche	510
4.2 Metodo diagnostico 1: PCR nested	511
4.3 Metodo diagnostico 2: TaqMan real-time PCR	512
5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	513
Allegato I - Strumenti, materiali e reagenti necessari	514

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma prunorum' (Seemüller and Schneider, 2004; IRPCM, 2004)
Tassonomia	<i>Classe</i> : Mollicutes <i>Gruppo ribosomico</i> : 16SrX (AP - Apple proliferation group) <i>Sottogruppo</i> : 16SrX-B
Cepi individuati	GSFY1
Avversità	Giallume europeo delle drupacee
Acronimo	ESFY (<i>European stone fruit yellows</i>)
Ospiti	albicocco, susino cino-giapponese, susino europeo (solo raramente sintomatico), pesco, mandorlo, diverse specie selvatiche e ornamentali di <i>Prunus</i> .
Vettori	<i>Cacopsylla pruni</i> Scopoli

1.1 Sintomatologia

Il sintomo più caratteristico delle infezioni da '*Ca. P. prunorum*' è rappresentato dall'emissione anticipata delle foglie durante il riposo vegetativo. Questo sintomo, conseguente agli squilibri ormonali indotti dalla presenza del fitoplasma, consente una facile identificazione in campo delle piante infette che, in questa fase, si distinguono agevolmente dalle piante sane, ancora prive di foglie perché in riposo o in piena fioritura. Successivamente, nel corso della stagione vegetativa, si ha la progressiva comparsa di alterazioni cromatiche (ingiallimenti e/o arrossamenti) e di consistenza della lamina fogliare e delle nervature principali dovute alla mancata traslocazione della linfa elaborata conseguente all'occlusione meccanica e alla degenerazione dei tubi floematici. In particolare, a primavera inoltrata, le porzioni di pianta colpite dalla malattia presentano foglie clorotiche e di taglia ridotta. A tali alterazioni si accompagna, nel corso dell'estate-autunno, una caratteristica deformazione della lamina fogliare che si ripiega 'a doccia' con i margini rivolti verso l'alto e un'anomala proliferazione di gemme dormienti con produzione di germogli secondari e fiori. A causa di un'estesa necrosi del tessuto floematico si può osservare, infine, anche la comparsa di un caratteristico imbrunimento del legno al di sotto della corteccia (leptonecrosi). I frutti risultano più piccoli e deformi. Generalmente tali sintomi compaiono inizialmente solo su qualche ramo o branca per poi estendersi all'intera chioma con conseguente morte della pianta nell'arco di 2-5 anni, in funzione della suscettibilità alla malattia del portinnesto e della varietà e della virulenza del ceppo del patogeno.

1.2 Epidemiologia e trasmissione

Il fitoplasma è trasmesso in natura dallo Psillide *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 1998; 2001) specie strettamente oligofaga che si alimenta su diverse specie spontanee e coltivate di *Prunus* (ospite primario). L'insetto compie una sola generazione all'anno svernando come adulto su piante di conifere (ospite secondario), su cui migrano a partire dal mese di luglio. A febbraio gli adulti svernanti si riportano sulle piante di *Prunus* (reimmigranti) dove avviene l'ovideposizione e lo sviluppo della nuova generazione. Il fitoplasma è trasmesso in maniera persistente sia dagli adulti di nuova generazione sia dai reimmigranti; quest'ultimi trasmettono il fitoplasma acquisito nel corso dell'anno precedente (Carraro *et al.*, 2004).

'*Ca. P. prunorum*' può essere trasmesso da pianta a pianta tramite innesto. Tale trasmissione può avvenire anche nel corso della stagione invernale dal momento che il fitoplasma è presente sulla parte aerea della pianta anche durante la fase di riposo vegetativo. Il fitoplasma non è, invece, trasmissibile mediante il seme.

1.3 Diagnosi

Come per tutti i fitoplasmi, la diagnosi di '*Ca. P. prunorum*' si basa essenzialmente su metodi molecolari in grado di rilevare ed amplificare il DNA del fitoplasma, dopo estrazione dello stesso dalla matrice vegetale. L'impossibilità di coltivare questi patogeni *in vitro* e la loro generalmente scarsa capacità immunogenica ne impediscono, infatti, una identificazione su base morfologica o sierologica.

1.4 Normativa Fitosanitaria

- 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;
- 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"
- A seguito della organizzazione del servizio nazionale di certificazione volontaria del materiale di propagazione vegetale delle piante da frutto (D.M. del 24 luglio 2003, G.U. 240 del 15 ottobre 2003), tale patogeno è soggetto alle disposizioni contenute nel D.M. del 20 novembre 2006 recante le "Norme tecniche per la produzione di materiale di propagazione vegetale certificato di Prunoidee".

2. METODO DI 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 Campionamento a fine riposo vegetativo

Campo

Periodo. Il periodo prossimo alla fine del riposo invernale (fine gennaio-febbraio) risulta particolarmente idoneo per una facile e sicura individuazione delle piante infette da 'Ca. P. prunorum'. A causa, infatti, dell'anticipo vegetativo indotto dal fitoplasma, in questo periodo le piante infette si individuano facilmente poiché mostrano già le foglie rispetto alle piante sane ancora prive di foglie o con i soli fiori.

Poiché il fitoplasma è presente sulla parte area della pianta anche durante tutto il periodo invernale, l'esecuzione di saggi diagnostici alla fine del riposo vegetativo è da ritenersi attuabile ed affidabile.

Matrice. La matrice migliore è costituita da tessuto floematico sottocorticale ottenuto da rametti di 1-2 anni.

Tipologia del campione. Il campione deve essere rappresentativo delle varie porzioni sintomatiche della chioma. I rametti devono essere integri non devono, cioè, presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o a fattori biotici di altra natura.

Mantenimento del campione: Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica.

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 essere processati il prima possibile, per cui devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 24 ore.

Laboratorio

I rametti possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 15 giorni. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico (i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o comparsa di muffe non devono essere processati, perché i risultati potrebbero non essere attendibili).

Eliminare la corteccia grattando leggermente la superficie dei rametti con un bisturi, quindi prelevare il tessuto floematico sottocorticale grattando, con lo stesso bisturi, più in profondità.

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

2.2 Campionamento a fine stagione vegetativa

Campo

Periodo. Fine estate-inizio autunno.

Matrice. La matrice migliore è costituita da nervature fogliari.

Tipologia del campione. Raccogliere 20-30 foglie dalle varie porzioni sintomatiche della chioma o dall'intera chioma. Le foglie devono essere integre e non in avanzato stato di senescenza e non devono presentare alterazioni dovute a fattori abiotici o biotici di altra natura. Prelevare solo foglie con nervature integre, prive di necrosi e/o imbrunimenti.

Mantenimento del campione. Il materiale vegetale deve essere asciutto e deve essere posto in bustine di plastica, che vanno mantenute in borse termiche. Deve essere assolutamente evitata l'esposizione diretta ai raggi del sole e la vicinanza a fonti di calore.

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.

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 (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 protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione di 'Ca. P. prunorum' agente del giallume europeo delle drupacee (*European stone fruit yellows* - ESFY) nei laboratori presenti sul territorio italiano. 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. Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base della loro sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità.

Per la definizione di tali parametri le diverse metodologie di diagnosi sono state applicate utilizzando reagenti e strumentazione specifici, di seguito riportati in dettaglio. Ciò non esclude l'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 e la definizione dei parametri è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

- CRA-PAV, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma - Coordinatore del Gruppo (Graziella Pasquini, Luca Ferretti, Elisa Costantini);
- CNR-IVV, Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino (Cristina Marzachi, Sabrina Palmano);
- DISAA, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano (Piero Attilio Bianco, Paola Casati);
- DipSA, Patologia Vegetale, *Alma Mater Studiorum*, Università di Bologna (Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri);
- DISA, Università di Udine (Marta Martini)

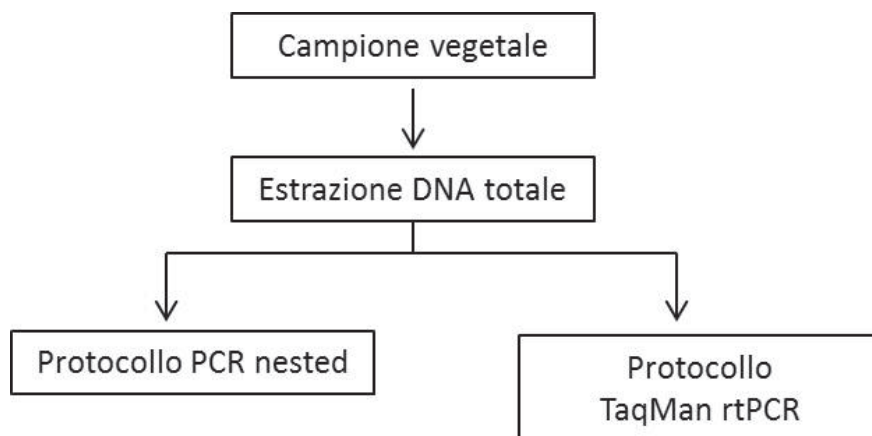
La diagnosi di 'Ca. P. prunorum' può essere effettuata su base molecolare per riconoscimento del DNA fitoplasmatico, mediante:

- metodo 1: PCR nested
- metodo 2: TaqMan real-time PCR (rtPCR)

La definizione del parametro di riproducibilità è scaturita dall'effettuazione di un ringtest nazionale a cui hanno partecipato i laboratori dei seguenti Servizi Fitosanitari Regionali (SFR):

- 1- SFR Provincia autonoma di Bolzano/ Centro di Sperimentazione di Laimburg; referenti: Thomas Letschka, Andreas Gallmetzer
- 2- SFR Regione Friuli Venezia Giulia; referente: Gian Luca Bianchi
- 3- SFR Regione Piemonte; referenti: Paola Gotta, Giovanna Mason
- 4- SFR Regione Lombardia; referenti: Andrea Taddei, Marica Calvi
- 5- SFR Regione Emilia-Romagna; referenti: Patrizia Grillini, Assunta D'Anniballe
- 6- SFR Regione Sardegna/ Agris Sardegna Cagliari; referente: Annamaria Repetto
- 7- SFR Regione Marche; referente: Lucio Flamini

3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche



- E' possibile saggiare il campione vegetale, prelevato in opportuna fase vegetativa (vedi capitolo campionamento), attraverso l'uso di una PCR diretta effettuata con i primers P1/16S-Sr, seguita da una PCR nested effettuata con i primers fO1/rO1 oppure utilizzando il protocollo di TaqMan real time PCR.

3.2 Estrazione del DNA da matrice vegetale

Il protocollo di estrazione del DNA totale (TDNA) dalle matrici vegetali è comune a tutti i protocolli descritti.

L'estrazione del DNA viene effettuata mediante utilizzazione di kit commerciale.

I kit commerciali prevedono generalmente l'uso di azoto liquido per la macerazione iniziale del tessuto vegetale. Nel caso non si disponga di azoto liquido in laboratorio, si può procedere con un protocollo alternativo, di seguito riportato.

a) Estrazione mediante utilizzo di azoto liquido

Polverizzare accuratamente il tessuto vegetale (nervature fogliari o tessuto sottocorticale) in azoto liquido è consigliabile polverizzare una quantità di tessuto vegetale in eccesso e, successivamente, prelevare la quantità richiesta dal kit commerciale; ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del patogeno anche in caso di una sua distribuzione erratica nei tessuti della pianta).

Prelevare 0,1 g di tessuto polverizzato e metterlo in una provetta da 2 ml quindi procedere con l'estrazione seguendo scrupolosamente le istruzioni del kit fornite dalla Ditta produttrice.

b) Estrazione senza utilizzo di azoto liquido

Nel caso in cui non si dispone di azoto liquido si può procedere come segue:

- pesare 0,5 g di tessuto vegetale (nervature fogliari o tessuto sottocorticale) e collocarli in una bustina 'Bioreba';
- aggiungere nella bustina 3 ml di tampone di estrazione (2,5% CTAB, 100 mM Tris pH8, 1,4 M NaCl, 50 mM EDTA pH8, 1% PVP-40, 0,5% acido ascorbico aggiunto poco prima dell'uso; preparare i tamponi utilizzando H₂O e reagenti sterili);
- macerare accuratamente il campione;
- prelevare dalla bustina 400 µl di lisato e trasferirlo in una provetta da 2 ml;
- aggiungere 4 µl di RNase A (100 mg/ml) e porre ad incubare a 65 °C per 10 minuti;
- proseguire secondo le istruzioni del kit.

3.3 Metodo diagnostico 1: PCR nested

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

3.3.1 Preparazione del saggio

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo in bianco (acqua).

Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti da una pianta sicuramente infetta da '*Ca. P. prunorum*' e da una pianta sicuramente esente da '*Ca. P. prunorum*', rispettivamente. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare sempre indossando guanti e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.

3.3.2 Saggio PCR nested

Il saggio prevede una doppia amplificazione genica mediante PCR diretta seguita da PCR nested.

Primers

Per la diagnosi di '*Ca. P. prunorum*' in PCR nested si suggerisce l'utilizzo dei seguenti primers:

1 - PCR diretta (*primers universali*)

P1: 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' (*)
16S-Sr: 5'-GGTCTGTCAAACTGAAGATG-3' (**)

(*) Deng and Hiruki, 1991

(**) Lee *et al.*, 2004

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

f01: 5'-CGGAACTTTTAGTTTCAGT-3' (*)
r01: 5'-AAGTGCCCACTAAATGAT-3' (*)

(*) Lorenz *et al.*, 1995

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 μ M in dH₂O sterile (seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20 °C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 μ l totali alla concentrazione d'uso di 10 μ M in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Esecuzione del saggio: PCR diretta

- Indossare guanti puliti.
- Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X Taq DNA polimerasi buffer (includente anche 1,5 mM MgCl₂)
 200 μ M ciascun dNTP
 0,4 μ M ciascun primer (P1/16S-Sr)
 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi
 1 μ l DNA totale estratto (TDNA)

Volume totale: 25 μ l con acqua sterile

- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 μ l) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
- Distribuire 24 μ l di miscela di reazione per ciascuna provetta.
- Aggiungere 1 μ l dell'estratto di TDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione. Nel controllo in bianco, aggiungere una pari quantità di acqua.
- Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma:

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
Amplificazione	94 °C	1'	36
	55 °C	1'	
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	8'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Conservare le provette a 4°C in frigorifero.

Esecuzione del saggio: PCR nested

- Indossare guanti puliti.
- 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 1:30 del prodotto di PCR diretta (es: 58 µl di H₂O per 2 µl di amplificato).
- 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.
- 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.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata, mantenendoli in ghiaccio.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X Taq DNA polimerasi buffer (includente anche 1,5 mM MgCl₂)
 200 µM ciascun dNTP
 0,4 µM ciascun primer (fO1/rO1)
 0,625 U enzima Taq DNA polimerasi
 1µl DNA amplificato in PCR diretta

Volume totale: 25µl con acqua sterile

- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 24 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare (quelli della PCR diretta più un controllo acqua specifico per la PCR nested) e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, buffer, dNTPs, primers, enzima; mescolare e mantenere in ghiaccio.
- Distribuire 24 µl di miscela di reazione in ciascuna provetta, mantenendole in ghiaccio.

- Prelevare 1 µl della diluizione 1:30 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.
- Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma.

Ciclo

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	2'	1
Amplificazione	94 °C	1'	38
	50 °C	1'	
	72 °C	2'	
Estensione finale	72 °C	8'	1
Blocco della reazione	4 °C	10'	1

Conservare le provette a 4°C in frigorifero.

3.3.3 Elettroforesi su 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.

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 µl di amplificato da ciascun campione e miscelarli con 1 µl di loading buffer 6X. Caricare ciascun campione in un pozzetto, cambiando il puntale ad ogni campione;
4. caricare in un pozzetto un idoneo marker (dimensione 1Kb);
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 µg/ml di etidio bromuro;
7. lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O;
8. visualizzare la corsa ponendo il gel su un transilluminatore ad UV.

3.3.4 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 1050 bp che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

Qualora nei controlli in bianco e/o nel controllo sano siano visibili bande alla stessa altezza del controllo positivo, il saggio non è attendibile e va ripetuto. Eventualmente, si può effettuare la corsa elettroforetica degli amplificati ottenuti in PCR diretta e se i controlli in bianco e il controllo sano risultano ‘puliti’ si può ripetere la sola PCR nested, partendo da nuove diluizioni.

Punti critici del protocollo

Il punto debole è legato alla alta sensibilità della tecnica PCR che, se da un lato consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi dall’altro, può dare falsi positivi o provocare contaminazioni in laboratorio (a livello di estratti, reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, etc.), se non utilizzata correttamente. Nel caso 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. Si raccomanda, pertanto, di lavorare con estrema attenzione (in particolare in fase di esecuzione delle diluizioni) 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). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micropipette 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 sostituirli con aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
- usare solo acqua sterile ‘nucleasi-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 TDNA);
- in fase di preparazione del saggio di PCR nested, sostituire i guanti dopo aver manipolato gli amplificati di PCR diretta per l’esecuzione delle diluizioni;
- aprire tutte le provette con gli appositi ‘apri-provette’ e non farlo con le mani;
- usare solo puntali sterili con filtro;
- in fase 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.

Si raccomanda, inoltre, di:

- 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 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;
- 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.

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

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

Loading buffer 10X in TBE	
Blu di bromofenolo	0,3%
Xilencianolo	0,3%
Glicerolo	60%

Soluzione di etidio bromuro 0,5 µg/ml	
Etidio bromuro	50 mg
acqua	100 ml
Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua	

Acqua bidistillata DEPC	
DEPC	0,1%
Lasciare 12 ore a temperatura ambiente in bottiglia chiusa, possibilmente sotto cappa a flusso laminare	
Autoclavare 121°C per 20'	

3.4 Metodo diagnostico 2: TaqMan real-time PCR (rtPCR)

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

3.4.1 Preparazione del saggio TaqMan rtPCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla in un opportuno schema cartaceo, in cui vengono anche riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione inserire: un controllo positivo e più controlli negativi (campioni sani e controlli in bianco). Come controllo positivo e negativo deve essere utilizzato TDNA estratto da campioni provenienti, rispettivamente, da una pianta sicuramente infetta da '*Ca. P. prunorum*' e da una pianta sicuramente esente da '*Ca. P. prunorum*'. Nel controllo in bianco il TDNA target è sostituito da una pari quantità di acqua.

Distribuire i controlli bianchi all'interno della piastra alternando un controllo ogni 20 campioni e caricare almeno due controlli sani, uno come primo campione e uno come ultimo nell'ordine di caricamento della piastra.

3.4.2 Saggio TaqMan rtPCR

Primers e sonde TaqMan

Per la diagnosi di '*Ca. P. prunorum*' mediante TaqMan rtPCR si suggerisce l'utilizzo dei primers e delle sonde di seguito specificati:

1 - primers e sonda ESFY

qAP-16S-F: 5' - CGAACGGGTGAGTAACACGTAA -3'^(*)

qAP-16S-R: 5' - CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA -3'^(*)

Sonda qESFY16S: 5' - FAM-TAACCTGCCTCTCAGGCG- MGB- 3'^(**)

^(*)Baric *et al.*, 2004

^(**)Pignatta *et al.*, 2008

2 - primers e sonda 18S (*controllo endogeno*)

18S DISTA -F: 5' - TGACGGAGAATTAGGGTTTCGA - 3'^(*)

18S DISTA -R: 5' - CTTGGATGTGGTAGCCGTTTC - 3'^(*)

Sonda 18S: 5' - NED-CGG AGA GGG AGC CTG-MGB 3'^(*)

^(*)Minguzzi *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2007

I primers e la sonda possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano. I primers vengono consegnati liofilizzati mentre le sonde MGB sono, generalmente, fornite come soluzioni alla concentrazione di 100 μ M.

Diluire i primers alla concentrazione d'uso di 100 μ M in dH₂O sterile e suddividerli in aliquote da mantenere a -20 °C.

Conservare la soluzione madre della sonda (100 μ M) a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 μ l totali ad una concentrazione d'uso di 4 μ M in dH₂O sterile da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione e conservarle a -20 °C. La soluzione madre e le aliquote della sonda devono essere mantenute rigorosamente al buio.

Esecuzione del saggio

- Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili da maneggiare sempre indossando guanti e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenere tutto sotto luce UV per 10 minuti prima dell'uso.
- Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per real time PCR (lo stesso camice non deve essere stato utilizzato nella manipolazione di amplificati o durante la fase di estrazione dei campioni).
- Indossare guanti puliti.
- Preparare la miscela di reazione in un area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
- Disporre le piastre ottiche sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore (se si utilizzano provette ottiche in luogo delle piastre non siglarle per nessun motivo poichè il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del termociclatore).
- Scongeler i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione sotto specificata.

Miscela di reazione unitaria (concentrazioni finali):

1X KAPATM PROBE FAST Universal qPCR Master Mix^(*) (Kapa Biosystems)

900 nM primer qAP-16S-F (10 μ M)

900 nM primer qAP-16S-R (10 μ M)

150 nM primer 18S-F (10 μ M)

150 nM primer 18S-R (10 μ M)

100 nM sonda qESFY16S (4 μ M)

75 nM sonda 18S (4 μ M)

2 μ l estratto DNA totale (TDNA)

Volume totale: 25 μ l con acqua sterile

^(*)l'utilizzo di questo prodotto commerciale è indispensabile per l'ottimale riuscita del protocollo

- Se si utilizza un termociclatore ABI Prism (Applied Biosystems) aggiungere alla miscela di reazione il ROX (1X) fornito insieme alla Master Mix, riducendo il quantitativo di acqua per mantenere invariato il volume di reazione.
- Calcolare i quantitativi esatti per ogni reattivo (volume 23 µl) in funzione del numero totale di campioni da saggiare e preparare la miscela di reazione secondo il seguente ordine: acqua, Master Mix, primers, sonda; mescolare e mantenere in ghiaccio.
- Distribuire 23 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto.
- Cambiare area di lavoro e caricare 2 µl di estratto di TDNA con una micropipetta dedicata solo a questo scopo.
- Inserire la piastra (o le provette) nel termociclatore ed avviare la PCR dopo aver impostato il seguente programma:

<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
95 °C	10'	1
95 °C	15''	40
60 °C	1'	

- Controllare i risultati mediante visualizzazione delle curve di amplificazione e del valore di *Ct* di ciascun campione.

3.4.3 Valutazione dei risultati

Per stabilire se un campione è da considerare positivo occorre conoscere il valore del *Ct* soglia ('cut-off') al di sopra del quale i campioni devono essere considerati negativi. Poiché il 'cut-off' può variare da laboratorio a laboratorio in funzione di diversi fattori (tipo di termociclatore, software utilizzato, manualità dell'operatore, ecc.), è necessario che ciascun laboratorio che adotti un protocollo di real-time PCR con chimica TaqMan effettui delle analisi preliminari in modo da utilizzare analiticamente il sistema, definendo il proprio valore di *Ct* soglia. A tal fine, si dovrà procedere come di seguito specificato (Mehle *et al.*, 2013):

- analizzare, mediante il protocollo di rtPCR sopra descritto, diluizioni progressive di almeno due campioni sicuramente positivi e di uno sicuramente negativo (analizzare almeno 5 diluizioni per ciascun campione, con fattore di diluizione pari a 10);
- caricare la piastra replicando 5 volte ciascuna diluizione;
- terminato il ciclo di amplificazione individuare l'ultimo gruppo di ciascun campione in cui non si osservano curve di amplificazione in alcune delle repliche caricate;
- calcolare la media fra i valori di *Ct* più alti ottenuti da ciascun campione nel relativo gruppo individuato, arrotondare il valore ottenuto al mezzo successivo ed aggiungere 0,5 al valore ottenuto (es.: se la media fra i *Ct* più alti per ciascun gruppo è pari a 35,5 considerare 36,0 e aggiungere 0,5 a questo valore; 36,5 sarà il *Ct* soglia);

- considerare positivi tutti i campioni con un valore di C_t minore o uguale al C_t soglia ('cut-off') così determinato.

Punti critici del protocollo rtPCR

Il punto debole della rtPCR è che si tratta di una reazione altamente sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, micropipette 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, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per la preparazione della mix e laboratorio per l'amplificazione). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali o aree separate per le tre fasi e set di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione nell'area dove si maneggiano amplificati e non portare gli amplificati nell'area dedicata alla preparazione della miscela di reazione.
- tenere i componenti e i reagenti aperti il minor tempo possibile.
- 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 nucleasi-free (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua DEPC);
- cambiare i guanti ogni qual volta si sospetta di averli contaminati durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti TDNA);
- aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani;
- usare solo puntali con filtro sterili;
- al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse o che la pellicola per la copertura delle piastre sia ben sigillata; 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.
- pulire periodicamente i bancali e l'equipaggiamento con una soluzione di sodio ipoclorito al 10%

Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.

4. DATI DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri, utilizzando campioni di riferimento:

- **sensibilità specifica**
- **specificità**
- **accuratezza**
- **sensibilità analitica**
- **ripetibilità**
- **riproducibilità**

Campioni di riferimento ‘target’: isolati di ‘*Ca. P. prunorum*’ che coprono la diversità genetica e la distribuzione geografica del patogeno.

Campioni di riferimento ‘non target’: i) isolati di fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi nell’ambito del gruppo 16SrX; ii) patogeni geneticamente correlati (batteri fitopatogeni associati allo stesso ospite vegetale); iii) campioni non infetti appartenenti alla stessa specie vegetale ospite.

Le prove di validazione sono state effettuate su campioni raccolti alla fine del riposo vegetativo (utilizzando tessuto sottocorticale come matrice) e a fine stagione vegetativa (utilizzando nervature fogliari come matrice).

4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche

In entrambi i periodi di campionamento, per la validazione dei metodi diagnostici sono stati utilizzati 28 campioni di riferimento, di cui:

- **21 campioni ‘target’** infetti da ‘*Ca. P. prunorum*’, provenienti da diversi areali geografici italiani, così ripartiti:
 - 7 campioni sintomatici di albicocco;
 - 9 campioni sintomatici di susino cino-giapponese;
 - 3 campione asintomatici di susino europeo;
 - 2 campioni sintomatici di pesco
- **4 campioni ‘non target’** rappresentati da DNA di batteri fitopatogeni comunemente associati a drupacee e campioni infetti da fitoplasmi appartenenti a sottogruppi ribosomici diversi dal 16SrX-B, come di seguito specificato:
 - 1 estratto di DNA di *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolato da albicocco;
 - 2 campioni infetti da ‘*Ca. P. mali*’ (sottogruppo ribosomico 16SrX-A, ceppo AP e AT rispettivamente);
 - 1 campione infetto da ‘*Ca. P. pyri*’ (sottogruppo ribosomico 16SrX-C);
- **3 campioni ‘non target’** rappresentati da specie ospiti di ‘*Ca. P. prunorum*’, esenti da infezione di ESFY, così ripartiti:
 - 1 campione di albicocco esente da ESFY;
 - 1 campione di susino esente da ESFY;
 - 1 campione di pesco esente da ESFY.

4.2 Metodo diagnostico 1: PCR nested

Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit commerciali per estrazione DNA totale da tessuto vegetale: DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106)

Enzima Taq polimerasi: GoTaq DNA polimerasi, Promega Corporation (cat. #M3175)

dNTPs: Promega, Cat N° C1141

Primers universali (PCR diretta) e gruppo X-specifici (PCRnested): sintetizzati da Invitrogen Ltd.

Bustine di plastica per estrazione campioni vegetali: Bioreba (cod. 430100)

Termociclatore: MJ PTC200, Applied Biosystems 9700

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

Marker per DNA: GeneRuler™ 1Kb DNA ladder, Fermentas (#SM0311)

Parametri	I campionamento (tessuto sottocorticale)	II campionamento (nervature fogliari)
Sensibilità	86%	86%
Specificità	100%	100%
Accuratezza	93%	93%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻³	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità	n.s.	68,7% ⁽³⁾

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10⁻⁶.

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁶.

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori.

n.s. = non saggiato

4.3 Metodo diagnostico 2: TaqMan rtPCR

Valori di validazione

I valori per il calcolo dei parametri di validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit estrazione DNA totale da tessuto vegetale: DNeasy Plant Mini Kit Qiagen (cat. no. 69106)

Master Mix: KAPA™ PROBE FAST ABI Prism 2X qPCR Master Mix (cod. KK4706); KAPA™ PROBE FAST Universal 2X qPCR Master Mix (cod. KK4702), Kapa Biosystems

Piastre: Fast Optical 96-W Barcoded (cod N8010560) Applied Biosystems

Pellicola per piastre rtPCR: Optical Adhesive Covers (cod. 4311971), Applied Biosystems

Bustine plastica per estrazione campioni vegetali: Bioreba (cod. 430100)

Termociclatore: ABI Prism 7500 Fast Real-Time System, Applied Biosystems

TaqMan probe e primers: sintetizzati da Applied Biosystems

Parametri	I campionamento (tessuto sottocorticale)	II campionamento (nervature fogliari)
Sensibilità	100%	86%
Specificità	100%	100%
Accuratezza	100%	93%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻³	10 ⁻³
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità	n.s.	80%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata su tre campioni di riferimento target diluiti in estratto di DNA di pianta sana. Per ciascun campione sono state realizzate diluizioni progressive fino a 10⁻⁶.

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione le diluizioni dell'estratto dal tal quale fino a 10⁻⁶.

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un ringtest effettuato da sette laboratori.

n.s. = non saggiato

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BARIC S., J. DALLA-VIA, 2004. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, **57**, 135-145.
- CARRARO L., F. FERRINI, G. LABONNE, P. ERMACORA, N. LOI, 2004. Seasonal infectivity of *Cacopsylla pruni*, the vector of European stone fruit yellows phytoplasma. *Annals of Applied Biology*, **144**, 191-195.
- CARRARO L., N. LOI, P. ERMACORA, 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 695-700.
- CARRARO L., R. OSLER, N. LOI, P. ERMACORA, E. REFATTI, 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology*, **80**, 233-239.
- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable Mollicutes. *Journal of Microbiol. Methods*, **14**, 53-61.
- IRPCM, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.
- LEE I.M., M. MARTINI, C. MARCONE AND S.F. ZHU, 2004. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, **54**, 337-347.
- LORENZ K.H., B. SCHNEIDER, U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, **85** (7), 771-776.
- 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: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 938 (M. Dickinson and J. Hodgetts eds.). J.M. Walker, School of Life Sciences, University of Hertfordshire, Hatfield, 253-268.
- MINGUZZI S., C. RATTI, C. LANZONI, C. RUBIES AUTONELL, N. REGGIANI, C. POGGI POLLINI, 2010. Detection and relative quantification of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' by spot real-time RT-PCR TaqMan assay. *Petria*, **20** (2), 219-220;
- OSMAN F., C. LEUTENEGGER, D. GOLINO, A. ROWHANI, 2007. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of Grapevine leafroll associated virus 1-5 and 9. *Journal of Virological Methods*, **141**, 22-29.
- PIGNATTA D., C. POGGI POLLINI, L. GIUNCHEDI, M. GOBBER, P. MORELLI, F. FORNO, L. MARTEDI, E. ROPELATO, 2008. A Real-time PCR assay for the detection of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFYP) in plant propagation material. *Acta Horticulturae*, **781**, 499-503.
- SEEMÜLLER E. AND B. SCHNEIDER, 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1217-1226.

Allegato I - Strumentazione, materiali e reagenti

Protocollo PCR nested

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Bilancia analitica
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
7. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore
9. Frigorifero
10. Micropipette calibrate dedicate alla PCR (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
11. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione dell'acido nucleico (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. pHmetro
13. Termociclatore
14. Transilluminatore
15. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile 'nucleasi-free'
2. Agarosio, composti chimici per tampone TBE, bromuro d'etidio
3. Azoto liquido
4. Kit commerciale per estrazione DNA
5. Etanolo
6. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
7. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
8. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
9. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
10. PVP-40 (*se non si dispone di azoto liquido*)
11. Acido ascorbico (*se non si dispone di azoto liquido*)
12. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
13. Primers universali
14. Primers 16SrX-specifici
15. dNTPs
16. Controllo negativo (*campione sicuramente esente da 'Ca. P. prunorum'*)
17. Controllo positivo (*campione infetto da 'Ca. P. prunorum'*)
18. Loading buffer per elettroforesi
19. Marker di DNA (1 Kb)

Materiali

1. Bustine di plastica per estrazione (tipo 'Universal', Bioreba)
2. Puntali sterili con filtro per micropipette dedicate alla PCR
3. Guanti
4. Mortai e pestelli
5. Carta da laboratorio
6. Portaprovette
7. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette da 1,5 e 2 ml

Protocollo TaqMan real-time PCR

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
6. Cappa aspirante
7. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V.
8. Congelatore
9. Distillatore
10. Frigorifero
11. Micropipette calibrate dedicate alla rtPCR (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. Micropipette calibrate dedicate all'estrazione dell'acido nucleico (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
13. Omogeneizzatore tipo Homex
14. pHmetro
15. Termociclatore per real time PCR
16. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile 'nucleasi-free'
2. Azoto liquido
3. Kit commerciale per estrazione DNA
4. Etanolo
5. CTAB (*se non si dispone di azoto liquido*)
6. NaCl (*se non si dispone di azoto liquido*)
7. Tris (*se non si dispone di azoto liquido*)
8. EDTA (*se non si dispone di azoto liquido*)
9. PVP-40 (*se non si dispone di azoto liquido*)
10. Acido ascorbico (*se non si dispone di azoto liquido*)
11. Master Mix per real time PCR

12. Primers 16SrX-specifici
13. Sonda 16SrX-B-specifica
14. Primers e sonda specifici per 18S (*controllo endogeno*)
15. Controllo negativo (*campione sicuramente esente da 'Ca. P. prunorum'*)
16. Controllo positivo (*campione sicuramente infetto da 'Ca. P. prunorum'*)

Materiali

1. Bustine di plastica per estrazione (tipo 'Universal', Bioreba)
2. Carta da laboratorio
3. Guanti
4. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti
5. Piastre da 96 pozzetti per real time o provette ottiche specifiche
6. Provette da 1,5 e 2 ml
7. Puntali sterili con filtro per micropipette dedicate alla rtPCR

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER *GUIGNARDIA CITRICARPA*

L. Riccioni, M.T. Valente

Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per la
Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	519
1.1 Introduzione	519
1.2 Ciclo biologico	520
1.3 Sintomatologia	521
1.4 Diagnosi	522
1.5 Normativa fitosanitaria	523
2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	525
2.1 Premessa	525
2.2 Flusso di lavoro per l'identificazione di <i>G. citricarpa</i> da frutto	526
2.3 Estrazione del DNA genomico da micelio cresciuto in piastra o prelevato da frutto	527
2.4 Metodo 1: identificazione molecolare mediante PCR convenzionale (Bonants <i>et al.</i> , 2003)	527
2.5 Metodo 2: identificazione molecolare mediante PCR Real Time (van Gent-Pelzer <i>et al.</i> , 2007)	530
3. DATI DI VALIDAZIONE	532
3.1 Valutazione delle "performance" dei metodi	532
3.2 "Ring Test"	533
3.3 Validazione Metodo 1	537
3.4 Validazione Metodo 2	538
4 BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	539
Allegato I - strumentazione, materiali e reagenti necessari	541
Allegato II - strumentazione e reagenti utilizzati nel "Ring Test"	543

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

<i>Agente causale</i>	Teleomorfo: <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely Anamorfo: <i>Phyllosticta citricarpa</i> (McAlpine) Van der Aa
<i>Tassonomia</i>	Fungo; Ascomycota; Dothideomycetes; Botryosphaeriales; Botryosphaeriaceae; <i>Guignardia</i>
<i>Avversità</i>	Macchia nera degli agrumi (Citrus Black Spot o CBS)
<i>Sinonimi</i>	<i>Phoma citricarpa</i> McAlpine <i>Phyllostictina citricarpa</i> (McAlpine) Petrak
<i>Categoria fitosanitaria</i>	Lista EPPO A1 no. 194

1.1 Introduzione

Guignardia citricarpa Kiely è un fungo ascomicete agente causale della macchia nera degli agrumi (CBS, Citrus Black Spot) una delle più importanti malattie di specie appartenenti al genere *Citrus*, presente in molte delle maggiori aree agrumicole nel mondo, inclusi Asia, Australia, Sud America, Sud Africa, America Centrale e regione Caraibica (CABI/EPPO, 1998; EPPO/CABI, 1997; CABI 2006). La prima descrizione ufficiale della malattia risale al 1895 (Benson, 1895) in un agrumeto australiano. Successivamente fu segnalata per la prima volta in Sud Africa nel 1929 (Doidge, 1929) e con il tempo le segnalazioni furono sempre più numerose e distribuite in diverse parti del mondo (Tabella 1). La diffusione di *G. citricarpa* in continenti precedentemente esenti dalla malattia sembra essere legata principalmente all'importazione di materiale vivaistico piuttosto che attraverso frutta infetta. La malattia non è stata ancora segnalata nel Nord America e in Europa.

TABELLA 1-distribuzione geografica delle segnalazioni di CBS

Località	Bibliografia
Indie occidentali	Calavan, 1960
India	Brodrick, 1969
Argentina	Garran, 1996
Bhutan, Cina, Indonesia, Kenya, Mozambico, Zambia, Zimbabwe	European Union, 1998
Filippine, Swaziland, Taiwan, Uruguay, Venezuela	Timmer, 2000
Nigeria	Baayen <i>et al.</i> , 2002

Quasi tutte le specie e varietà di agrumi coltivate sono suscettibili al CBS: *C. limonia*, *C. nobilis*, *C. poonensis*, *C. tankan*, pompelmo (*C. paradisi*), limone (*C. limon*), limetta (*C. aurantifolia*), mandarino (*C. reticulata*), arancio (*C. sinensis*). L'arancio amaro (*C. aurantium*) sembra essere resistente. La malattia colpisce sia le foglie che i frutti; i sintomi caratteristici sono macchie scure, lesioni a chiazze sulla buccia del frutto che rendono i frutti colpiti non commercializzabili sul mercato del fresco. Spesso, nelle infezioni più gravi, si ha la caduta prematura dei frutti riducendo drasticamente le rese (Kotzè, 2000). Anche i frutti asintomatici al momento della raccolta possono ancora sviluppare la malattia durante il trasporto o la conservazione (Kotzè, 1996), diventando a loro volta fonti di inoculo. Attualmente le strategie di controllo della malattia si basano sull'utilizzo preventivo di fungicidi a base di rame (solfato di rame, idrossido di rame, ossicloruro di rame) oppure a base di strobilurine, o di fungicidi sistemici, come il benzimidazolo. Pratiche colturali come la rimozione della frutta infetta, la potatura equilibrata, con successivo allontanamento dal campo delle ramaglie e bruciatura delle stesse, contribuiscono a ridurre la diffusione del patogeno.

Recentemente è stata identificata una diversa specie di *Guignardia*, *G. mangiferae* (anamorfo *Phyllosticta capitalensis*, Baayen *et al.*, 2002), un endofita spesso associato a piante del genere *Citrus*, e a diversi altri generi (Chiu, 1955; MConie, 1964), molto simile e facilmente confondibile con *G. citricarpa*. Queste specie non patogene erano considerate in passato delle forme saprofite (Sutton e Waterston, 1966) o forme avirulente di *G. citricarpa* (Kotzè, 2000). *G. mangiferae* può essere distinta da *G. citricarpa* mediante caratterizzazione colturale, morfologica e molecolare e non è mai stato riportato essere causa di sintomi di maculatura nera degli agrumi (Baayen *et al.* 2002); *G. mangiferae* è talvolta stata isolata da frutti di *Citrus* con piccole macchie (<2 mm), ma in questi casi il fungo potrebbe essere presente in forma endofita, prima della formazione di tali lesioni ad opera di altre specie patogene. Recentemente sintomi di maculatura nera simili a quelli causati da *G. citricarpa* sono stati osservati su frutti di *Citrus maxima* intercettati in merce d'importazione proveniente dall'Asia (Wulandari *et al.*, 2003). In questi frutti sono stati osservati picnidi e conidi molto simili a quelli di *G. citricarpa*, ma successivamente identificati come appartenenti ad una diversa specie, *P. citrisiana*. Attualmente *P. citrisiana* è stata segnalata solo in Asia, dove sembra sia causa di CBS solo su specie di *C. maxima*.

1.2 Ciclo biologico

Lo sviluppo della malattia è influenzato dalle condizioni climatiche e dalla fase fenologica dell'agrumeto.

La fase asessuale dell'agente causale compare solitamente sulle lesioni dei frutti e delle foglie, rami secchi, peduncoli dei frutti e, in abbondanza, sulle foglie cadute sul suolo del frutteto (Kotzè, 1981). La fase sessuale compare di solito sulle foglie cadute a terra prima che si sviluppino gli ascocarpi: essi si sviluppano durante l'anno sui residui vegetali che ricoprono il terreno.

La malattia si diffonde nell'agrumeto attraverso macroconidi e ascospore. In genere impiega diversi anni prima che i sintomi vengano osservati (Kotzè, 1981). I macroconidi

richiedono acqua sia per il trasporto che per la germinazione (Wager, 1952). Essi vengono dilavati dalle gocce di pioggia, dai rami secchi o da vecchi peduncoli e, giunti a contatto con i frutti suscettibili, li infettano. Una volta germinati, il fungo penetra il frutto sia in presenza che in assenza di ferite, o attraverso abrasioni della buccia provocate da grandine, o grazie a danni da insetti. La longevità dei macroconidi varia di zona in zona. In Australia, per esempio, la loro capacità di germinazione non supera il mese (Kiely, 1949), mentre in Sud Africa mantengono la loro capacità germinativa fino a 5 mesi (Wager, 1952). Il ruolo dei macroconidi nella diffusione della malattia è considerato di minore importanza se paragonato a quello delle ascospore; queste, trasportate dal vento, sono considerate la fonte primaria di inoculo (Kotzè, 1981; Zheng, 1983). I residui fogliari che ricoprono il suolo rappresentano la principale sorgente di ascospore che si sviluppano a partire dagli ascocarpi in circa 50-180 giorni; la loro maturazione dipende dal succedersi di periodi di pioggia alternati a periodi di asciutto e da temperature favorevoli (Kotzè, 1981). L'eccesso di pioggia promuove la colonizzazione sulle foglie di funghi saprofiti competitori del patogeno, limitando la formazione degli pseudotecii e la conseguente formazione di ascospore. Durante le precipitazioni le ascospore mature vengono espulse fino ad un centimetro di altezza dalla superficie; esse vengono successivamente diffuse dal vento e dall'acqua. Una volta raggiunti i frutti o le foglie suscettibili, le ascospore formano un appressorio che, attraverso un'ifa di penetrazione, perfora la cuticola dell'ospite. Tra la cuticola e lo strato superiore delle cellule epidermiche si sviluppa quindi il tessuto miceliare, fase corrispondente allo stadio latente dell'infezione (Kotzè, 1981). I fiori e i frutti sono suscettibili all'infezione dall'antesi fino a circa 16 settimane dopo (Kellerman e Kotzè, 1979). L'infezione è seguita, in genere, da un lungo periodo di latenza che varia in funzione dei diversi climi.

1.3 Sintomatologia

I frutti possono presentare diversi tipi di sintomi a seconda dello stadio fenologico del frutto al momento dell'infezione e dalle condizioni ambientali (temperatura e umidità). I sintomi che possono presentare i frutti sono molto variabili, tanto da generare spesso confusione nel loro riconoscimento e classificazione (Shuepp, 1961; Kotzè, 2000). Attualmente i sintomi sui frutti possono essere classificati in 4 principali tipologie d'infezione (per le figure vedere il protocollo EPPO PM 7/17, 2009):

1. **Macchia nera** o punto nero: lesioni superficiali con un'area centrale che va dal grigio al marrone con un bordo marrone scuro di 3-10 mm di diametro; questo sintomo è il più comune e compare quando il frutto inizia a maturare, prima del viraggio di colore (Kotzè, 1981; 2000). Spesso si possono individuare, con l'aiuto di una lente d'ingrandimento o con uno stereomicroscopio, i picnidi all'interno delle macchie, che si presentano come piccoli puntini neri, leggermente rialzati, su fondo grigio o marrone.
2. **Macchie a lentiggini**: macchie di piccole dimensioni (1-3 mm di diametro), leggermente depresse nella buccia, di colore variabile dal grigio al marrone, o rossiccio o marrone chiaro. Spesso presentano un bordo rosso scuro o marrone

e possono trovarsi associate come “spot satelliti” alle macchie nere maggiori. I picnidi sono raramente presenti.

3. Falsa melanosi: generalmente compare su frutti verdi in forma di piccole lesioni in rilievo che vanno dal marrone scuro al nero, spesso circondate da puntini scuri (FUNDECITRUS, 2005). Le lesioni sono prive di picnidi, e possono fondersi col progredire della stagione (CABI, 2006). Questo tipo di sintomi si osserva in agrumeti dove *G. citricarpa* è presente da molto tempo (FUNDECITRUS, 2005).
4. Macchia virulenta: le macchie possono fondersi per formare degli “spot virulenti”, sintomi che compaiono verso la fine della stagione e che rappresentano la forma più dannosa della malattia poiché si estendono in profondità all’interno della buccia, provocando la caduta prematura del frutto e gravi perdite post-raccolta. Le macchie virano dal marrone al nero, sviluppano una consistenza dura e possono arrivare a coprire interamente la superficie del frutto. In questa tipologia di sintomi possono essere presenti i picnidi (Kotzé, 1981).

Altre due tipologie di sintomi sono state osservate sui frutti affetti da CBS, anche se con minore frequenza:

- Macchie frastagliate: lesioni superficiali, dal giallo al marrone, con una consistenza liscia e senza contorni definiti. Le lesioni compaiono quando il frutto è ancora verde e possono coprire gran parte della superficie del frutto. Queste macchie sono considerate una variante della falsa melanosi (Goes, 2001).

- Macchie spezzate: lesioni superficiali, leggermente rialzate, spezzate all’interno, di taglia variabile, con margini irregolari e assenza di picnidi. Appaiono su frutti che hanno più di 6 mesi (Goes *et al.*, 2000). In Brasile questo sintomo è stato associato a infestazioni di acaro della ruggine degli agrumi (FUNDECITRUS, 2005).

1.4 Diagnosi

I funghi fitopatogeni associati alla maculatura nera degli agrumi sono generalmente indistinguibili tra loro attraverso i soli dati sintomatologici. I sintomi sui frutti causati da *G. citricarpa* possono essere molto simili a quelli causati da *P. citriasiana*, *Alternaria alternata* pv *citri*, *Colletotrichum* spp., *Diaporthe citri*, *Mycosphaerella citri*, *Septoria* spp., danni di tipo meccanico o da insetti (Snowdon, 1990). In particolare *A. alternata* pv *citri* e *Colletotrichum* spp., possono causare sintomi molto simili a quelli della macchia nera. Per l’identificazione dell’agente causale, quindi, è richiesto l’isolamento del patogeno e la sua identificazione morfologica e molecolare. La diagnosi per la presenza di *G. citricarpa* proposta nel presente lavoro, quindi, parte o dall’isolamento in coltura dell’agente causale, l’analisi morfologica degli isolati per l’identificazione del genere e l’analisi molecolare per l’identificazione della specie o dall’analisi molecolare direttamente da tessuto infetto. Le specie appartenenti al genere *Guignardia* (*Phyllosticta*) hanno infatti caratteri morfologici simili e la conferma più sicura dell’identità del patogeno si ottiene con l’analisi molecolare. Diversi metodi di diagnostica molecolare sono stati sviluppati per l’identificazione di *G. citricarpa*. Nell’ambito del Progetto Arnadia, sono stati scelti due metodi da validare, riportati

entrambi nel protocollo EPPO PM 7/17 (Eppo, 2009), che mi permettono entrambi di distinguere *G. citricarpa* da *G. mangiferae* e da *P. citriasiana*, e sono largamente utilizzati dai laboratori fitosanitari in tutta Europa. Il primo metodo, identificato come Metodo 1, si basa su una PCR con una coppia di primer selettivi e non discriminanti per *G. citricarpa* e *P. citriasiana* (Bonants *et al.*, 2003), mentre il secondo metodo, identificato come Metodo 2, si basa su una PCR Real Time con una coppia di primer e una sonda *dual-labeled* entrambi *G. citricarpa*-specifici (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007). Nel Metodo 1 in caso di positività, in particolare se l'ospite è *C. maxima*, è necessario procedere al sequenziamento dell'amplificato o alla esecuzione del Metodo 2 per discriminare *G. citricarpa* da *P. citriasiana*.

Come mostrato dal diagramma di flusso di lavoro riportato in seguito, per l'identificazione di *G. citricarpa* da frutti sintomatici, una volta confermata la presenza di *Guignardia spp.* mediante l'isolamento ed il successivo riconoscimento morfologico, si procede attraverso una conferma con metodi molecolari, eseguendo direttamente l'analisi da tessuto infetto o da coltura pura del fungo.

1.5 Normativa fitosanitaria

G. citricarpa è considerato organismo nocivo ed è inserito nella lista A1 dell'European and Mediterranean plant protection organization (EPPO). L'attuale regolamentazione fitosanitaria dell'Unione Europea (direttiva 2000/29/CE del Consiglio, allegato II), per impedirne l'introduzione, regola l'importazione e la movimentazione di Vegetali di *Citrus* L., *Fortunella* Swingle, *Poncirus* Raf., e relativi ibridi, ad eccezione delle sementi. E' ammessa l'importazione di agrumi proveniente da Paesi riconosciuti esenti da *G. citricarpa* (Decisione 2006/473/CE e 2013/253/UE), o altrimenti devono essere rispettate alcune condizioni fra cui le piante e i frutti d'importazione devono essere esenti da sintomi causati da tale patogeno.

DIRETTIVA DEL CONSIGLIO 2000/29/CE, dell'8 maggio 2000, concernente le misure di protezione contro l'introduzione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità.

Decreto Legislativo 19 agosto 2005, n. 214 "Misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali".

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2006/473/CE, del 5 luglio 2006, che riconosce taluni paesi terzi e talune regioni di paesi terzi come indenni da *Xanthomonas campestris* (tutti i ceppi patogeni nei confronti di *Citrus*), *Cercospora angolensis* Carv. & Mendes e *Guignardia citricarpa* Kiely (tutti i ceppi patogeni nei confronti di *Citrus*).

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2013/253/UE, del 29 maggio 2013, che modifica la decisione 2006/473/CE per quanto riguarda il riconoscimento di taluni paesi terzi e di talune regioni di paesi terzi come indenni da *Xanthomonas campestris* (tutti i ceppi patogeni nei confronti di *Citrus*), *Cercospora angolensis* Carv. & Mendes e *Guignardia citricarpa* Kiely (tutti i ceppi patogeni nei confronti di *Citrus*).

2. PROTOCOLLO 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. Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del fungo *G. citricarpa* 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 (EPPO 2010), è scaturita da un'attenta rivisitazione delle metodiche riportate nel protocollo EPPO PM7/17 (EPPO, 2009) e della bibliografia prodotta sull'argomento, nonché da un confronto con i Servizi Fitosanitari Regionali.

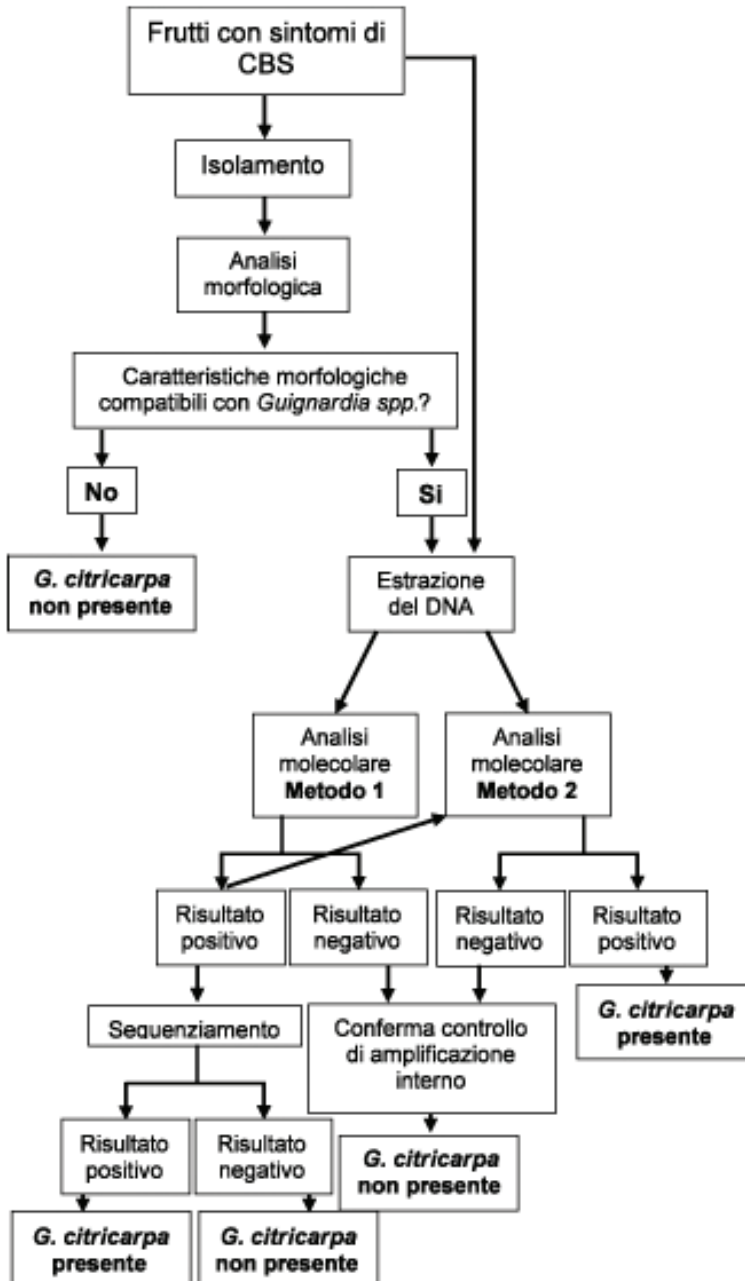
Le procedure d'isolamento del patogeno non sono state oggetto di validazione nel presente lavoro, pertanto i protocolli proposti per tali scopi si basano sulla letteratura riportata sull'argomento (EPPO, 2009).

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.

Come mostrato dal diagramma di flusso di lavoro riportato in seguito, per l'identificazione di *G. citricarpa* da frutti sintomatici, si può procedere sia attraverso un'identificazione molecolare direttamente da tessuto (es. buccia con sintomi di macchie brune), oppure attraverso un'identificazione morfologica di colture fungine ottenute in terreno artificiale da isolamento di tessuto sintomatico, e successiva conferma con il metodo molecolare, là dove ottengo un micelio con certe o dubbie caratteristiche di *G. citricarpa*.

Di seguito vengono descritti due metodi molecolari riportati entrambi nel protocollo EPPO PM 7/17, (EPPO, 2009) e validati nell'ambito del progetto Arnadia largamente utilizzati dai laboratori fitosanitari in tutta Europa. Il primo metodo, identificato come Metodo 1, si basa su una PCR con una coppia di primer specifici per *G. citricarpa*, ma che non permettono di distinguerla da *P. citriasiana* (Bonants *et al.*, 2003), e necessita in caso di positività di una conferma o con il sequenziamento o con l'applicazione del metodo successivo. Il secondo metodo, identificato come Metodo 2, si basa su una PCR Real Time con una coppia di primer e una sonda *dual-labeled* entrambi *G. citricarpa*-specifici (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007).

2.2 Flusso di lavoro per l'identificazione di *G. citricarpa* da frutto



2.3 Estrazione del DNA genomico da micelio cresciuto in piastra o prelevato da frutto

Per la purificazione del DNA genomico da micelio cresciuto in piastra Petri su PDA (*Potato Dextrose Agar*) o da porzioni di frutto sintomatico, è possibile utilizzare un kit commerciale (consigliato per il tessuto vegetale). Nell' Allegato I viene riportato il kit utilizzato nelle prove di validazione. Prima di essere processato, il tessuto deve essere polverizzato in azoto liquido con mortaio e pestello. Sia il tessuto infetto che il micelio possono essere conservati a -80°C, dopo essere stati congelati in azoto liquido, in attesa di essere processati per l'estrazione di DNA. Il DNA genomico risultante viene quantificato mediante saggio fluorimetrico. In mancanza di un fluorimetro, che legge specificamente ed esclusivamente il DNA a doppio filamento, sarà necessario digerire gli acidi nucleici estratti con "DNase-free RNase A" commerciale seguendo le indicazioni della Ditta produttrice. Il DNA così trattato può essere quantificato mediante saggio spettrofotometrico alla lunghezza d'onda di 260 nm.

2.4 Metodo 1: identificazione molecolare mediante PCR convenzionale (Bonants *et al.*, 2003)

Il metodo si basa sull'amplificazione di una regione target costituita da una sequenza ITS (Internal Transcribed Spacer) che genera un amplicone di 490 bp. I primer sono selettivi per *G. citricarpa* e *P. citriasiana* ma non sono in grado di discriminare le due specie tra di loro. Le sequenze di ciascun primer sono riportate in Tabella 2 (Bonants *et al.*, 2003):

TABELLA 2 - sequenze dei primer per l'amplificazione secondo il protocollo di Bonants *et al.*, 2003

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
GcF3	Primer forward specifico per <i>G. citricarpa</i> e <i>P. citriasiana</i>	5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT -3'
GcR7	Primer reverse specifico per <i>G. citricarpa</i> e <i>P. citriasiana</i>	5'- TGT CCG GCG GCC AG -3'

I primer liofilizzati si diluiscono ad una concentrazione di 100 µM in tampone TE (TrisHCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice e conservati a -20°C in aliquote da 50 µl. Si preparano le *working solution* alla concentrazione di 10 µM, diluendo in acqua milliQ sterile le aliquote "madri", da utilizzare al momento o conservare a -20°C.

Allestire la reazione di amplificazione in ghiaccio. In una singola provetta da 1,5 ml si prepara una soluzione madre (*master mix*) contenente tutti i reagenti illustrati nella Tabella 3, meno i DNA-stampo, da introdurre direttamente nelle provette di reazione PCR. Tutte le soluzioni (eccetto la DNA-polimerasi) dopo essere state scongelate devono essere vorticate pochi secondi con il vortex; in una provetta da 1,5 ml tenuta in ghiaccio, si aggiungono i volumi richiesti dei vari componenti nell'ordine indicato in Tabella 3, e miscelati tra loro con vortex; si consiglia di centrifugare per pochi secondi la *master mix* per raccogliere le gocce sul fondo.

TABELLA 3 - volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione PCR del Metodo 1

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (μl)	Volume per N* Reazioni (μl)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile		17,4	16,4 x n	
2. Tampone di amplificazione	10X	2,5	2,5 x n	1X
3. MgCl ₂	50 mM	0,75	0,75 x n	1,5 mM
4. dNTPs	10 mM	0,15	0,15 x n	0,06 mM
5. Primer GcF3	10 μM	1,5	1,5 x n	0,6 μM
6. Primer GcR7	10 μM	1,5	1,5 x n	0,6 μM
7. DNA polimerasi	5 U/μl	0,2	0,2 x n	0,04 U/μl

* nel numero N di reazioni PCR da eseguire viene considerato un campione in più (N+1) per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante.

Distribuire 23 μl di *master mix* in provette da PCR da 0,2 ml predisposte in ghiaccio, in un apposito portaprovette; aggiungere 2μl di DNA stampo in ciascun campione e un equivalente volume di acqua al campione di controllo negativo.

VOLUME TOTALE DI REAZIONE: 25 μl

Una volta pronte, inserire le provette nel termociclatore e sottoporle al seguente ciclo di amplificazione:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	2'	1
	94 °C	30"	
Amplificazione	65 °C	30"	30
	72 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	∞	1

N.B.: le provette sono tenute in ghiaccio fino a che il termociclatore non raggiunge la temperatura di denaturazione (94°C). Una volta arrivato a temperatura possono essere sistemate nella macchina.

Dopo l'amplificazione, 10 μl del campione amplificato più 2 μl di *loading buffer* 6X (blu di bromofenolo 0.25%, glicerolo 30%) sono analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio 1% (massa/volume) preparato in tampone TBE 0,5X come descritto da Sambrook *et al.* (1989) con il colorante Gel Red alla concentrazione finale di 0,5X. In ogni corsa elettroforetica caricare il marcatore di peso molecolare. Eseguire l'elettroforesi in tampone TBE 0,5X finché le bande del marcatore molecolare siano ben separate. A fine corsa osservare il gel mediante transilluminatore ad U.V. e fotografarlo.

Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR è necessario includere i seguenti controlli:

Controllo positivo: reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *G. citricarpa* precedentemente testato e valutato per la sua amplificabilità.

Controllo negativo: miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve a monitorare eventuali contaminazioni.

Controllo di amplificazione interno (IAC, Internal Amplification Control): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR sono state controllate amplificando il DNA con i primer universali ITS4 e ITS5 secondo le condizioni descritte da White *et al.* (1990).

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo per *citricarpa* verrà visualizzata la corrispondente banda specie-specifica (Figura 1).

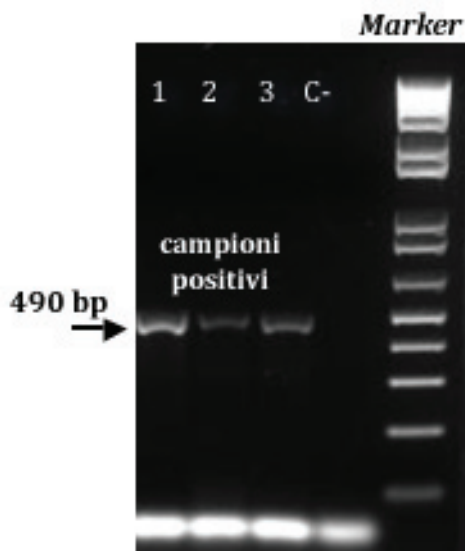


Fig. 1 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di PCR ottenuti con il protocollo di amplificazione su DNA genomico estratto da 3 isolati di *G. citricarpa* (pozzetti da 1 a 3) e relativo controllo negativo (C-).

2.5 Metodo 2: identificazione molecolare mediante PCR Real Time (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007)

La regione target dell'amplificazione è costituita dalla sequenza ITS e genera un amplicone di 69 bp. Le sequenze di ciascun primer e della sonda fluorogenica sono selettive per la sola specie *G. citricarpa* e sono riportate in Tabella 4 (van Gent-Pelzer *et al.*, 2007). La sonda è marcata al 5' con il *reporter* FAM e al 3' con il *quencher* TAMRA.

TABELLA 4 - Primer e sonda per l'amplificazione secondo il protocollo di van Gent-Pelzer *et al.*, 2007

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
GcF1	Primer <i>forward</i> specifico per <i>G. citricarpa</i>	5'- GGT GAT GGA AGG GAG GCC T -3'
GcR1	Primer <i>reverse</i> specifico per <i>G. citricarpa</i>	5'- GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT -3'
GcP1	Sonda <i>dual labeled</i> specifica per <i>G. citricarpa</i>	FAM 5'- AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA -3' TAMRA

I primer e la sonda liofilizzati si diluiscono ad una concentrazione di 100 µM in tampone TE (TrisHCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice e conservati a -20°C in aliquote da 50 µl. Si preparano le *working solution* alla concentrazione di 10 µM, diluendo in acqua milliQ sterile le aliquote "madri", da utilizzare al momento o conservare a -20°C.

Allestire la reazione di amplificazione a temperatura ambiente, dal momento che la DNA polimerasi utilizzata è una Taq *hot-start* (vedi Allegato I). In una singola provetta da 1,5 ml si prepara una soluzione madre (*master mix*) contenente tutti i reagenti illustrati nella Tabella 5, meno i DNA-stampo, da introdurre direttamente nelle provette di reazione PCR. Tutte le soluzioni dopo essere state scongelate devono essere vorticate pochi secondi con il vortex; in una provetta da 1,5 ml, si aggiungono i volumi richiesti dei vari componenti nell'ordine indicato in Tabella 5, e miscelati tra loro con vortex; si consiglia di centrifugare per pochi secondi la *master mix* per raccogliere le gocce sul fondo.

Per ogni campione preparare 3 repliche tecniche.

TABELLA 5 - Volumi e concentrazioni dei reagenti per l'amplificazione PCR Real Time del Metodo 2

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (µl)	Volume per n* reazioni (µl)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile		11,2	11,2 x n	
2. Master Mix	2X	15	15 x n	1 x
3. Primer GcF1	10 µM	0,75	0,75 x n	0,25 µM
4. Primer GcR1	10 µM	0,75	0,75 x n	0,25 µM
5. Sonda GcP1	10 µM	0,3	0,3 x n	0,1 µM

* nel numero n di reazioni PCR da eseguire viene considerato un campione in più (n+1) per fare in modo che il volume della *master mix* non sia limitante.

Distribuire 28 µl di *master mix* nelle provette o nei pozzetti della piastra destinati al termociclatore Real Time; aggiungere 2 µl di DNA stampo in ciascun campione e un equivalente volume di acqua al campione di controllo negativo.

VOLUME TOTALE DI REAZIONE: 30 µl

Una volta pronti, inserire i campioni nel termociclatore Real Time e sottoporli al ciclo di amplificazione riportato nello schema di seguito. Il ciclo di amplificazione è stato leggermente modificato rispetto al protocollo originale di riferimento (EPPO PM 7/17, 2009; van Gent-Pelzer *et al.*, 2007) per aumentare la specificità del metodo: la temperatura di annealing/estensione è stata portata a 65°C invece che 60°C e il tempo di annealing/estensione a 30" invece che 1'.

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	10'	1
Amplificazione	denaturazione	94 °C	15"
	annealing/estensione	65 °C	30"

Inserire la rilevazione del segnale di fluorescenza nello step di annealing/estensione a 65°C.

Uso dei controlli

In ogni esperimento di amplificazione PCR *Real Time* sono stati inseriti i seguenti controlli:

Controllo positivo Real Time: reazione di PCR su DNA genomico di un isolato target di riferimento di *G. citricarpa* diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR.

Controllo negativo: miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve a monitorare eventuali contaminazioni.

Controllo di amplificazione interno (IAC, Internal Amplification Control): la qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR sono state controllate amplificando il DNA con i primer universali ITS4 e ITS5 secondo le condizioni descritte da White *et al.* (1990).

Valutazione dei risultati

Il campione è considerato positivo per la presenza di *G. citricarpa* se il segnale di amplificazione è rilevato in corrispondenza di un ciclo soglia (Ct) inferiore al Ct del controllo positivo Real Time di riferimento diluito al limite di rivelazione (vedere uso dei controlli). 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 *G. citricarpa* (Figura 2).

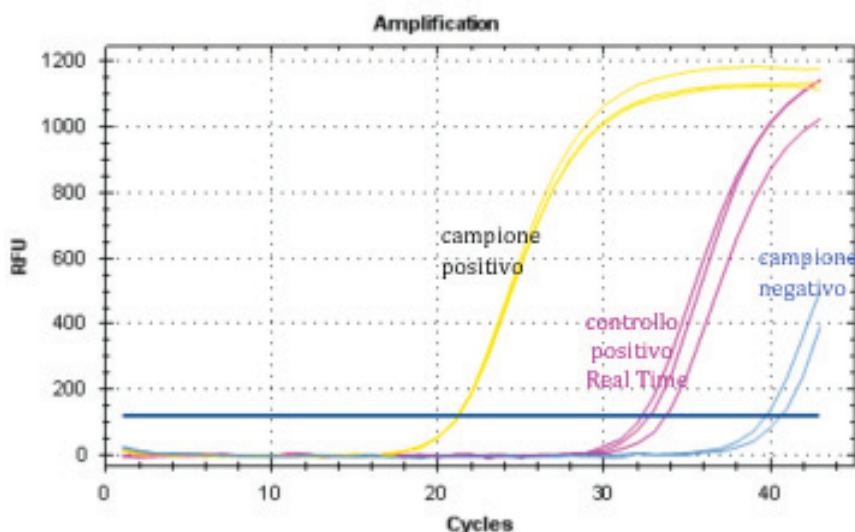


Fig. 2 - Curve di amplificazione in PCR Real Time confrontate con il controllo positivo.

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, (EPPO 2010), utilizzando materiale di riferimento riportato (Tabella 6) e facendo riferimento ai protocolli diagnostici "standard" pubblicati in letteratura (PM 7/17, EPPO 2009; Bonants *et al.*, 2003; van Gent-Pelzer *et al.*, 2007) con piccole modifiche e adattamenti specificati. Di seguito vengono riportati i **parametri di validazione** considerati e definiti secondo il documento EPPO PM 7/98:

- **Sensibilità analitica:** la più piccola quantità di target che può essere rilevata.
- **Specificità analitica:** capacità del protocollo di non rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti o non contaminati dal patogeno in esame.
- **Ripetibilità:** 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)
- **Riproducibilità:** la percentuale di ottenimento dello stesso risultato da due identici campioni, analizzati in due laboratori differenti, in diverse condizioni di lavoro.

Tali valutazioni sono state eseguite presso i laboratori del Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (CRA-PAV).

TABELLA 6 - elenco dei campioni di riferimento *target* e *non target* utilizzate per la validazione

Campioni di riferimento <i>target</i>	Riferimento	Campioni di riferimento <i>non target</i>	Riferimento
<i>G. citricarpa</i>	CBS* 828.97	<i>G. mangiferae</i>	CBS 120490
<i>G. citricarpa</i>	CBS 102374	<i>G. mangiferae</i>	ER** 1897
<i>G. citricarpa</i>	CBS 127455	<i>P. citriasiana</i>	ER 1891
<i>G. citricarpa</i>	CBS 127451	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	ER 1063
		<i>Mycosphaerella sp.</i>	ER 1800

* database del CBS, Centraalbureau voor Schimmelfcultures-Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, The Netherlands).

** isolati appartenenti alla collezione "ER" del CRA-PAV, identificati mediante sequenziamento ITS4 X ITS5 (White *et al.*, 1990).

3.2 "Ring Test"

Per completare la validazione di entrambi i Metodi, verificarne la validità e l'efficacia e valutare quanto l'uso di diversi reagenti e strumentazioni in diversi laboratori, con diversi operatori, possa influire sui valori di *performance* dei test è stato organizzato uno studio comparativo inter-laboratori ("Ring Test"). In questo studio sono stati valutati i seguenti parametri di validazione:

- **Sensibilità relativa (o diagnostica):** capacità di un metodo alternativo di rilevare la presenza del target nei campioni di riferimento contaminati o sicuramente infetti.
- **Specificità relativa (o diagnostica):** capacità di un metodo alternativo di non rilevare la presenza del target nei campioni di riferimento non infetti o non contaminati dal patogeno target.
- **Accuratezza relativa:** grado di corrispondenza tra la risposta ottenuta dal metodo e la risposta attesa dal materiale di riferimento.
- **Accordanza (o ripetibilità):** percentuale di "chance" di ottenere lo stesso risultato da due identici campioni analizzati nello stesso laboratorio in condizioni di ripetibilità (stesso operatore, stessa attrezzatura, stessi reagenti)
- **Concordanza (o riproducibilità):** percentuale di "chance" di ottenere lo stesso risultato da due identici campioni analizzati in due laboratori diversi.

In totale 7 laboratori hanno partecipato al Ring Test per la validazione del Metodo 1 e 6 laboratori per la validazione del Metodo 2 (Tabella 7). In Allegato II vengono riportati i reagenti e la strumentazione utilizzata dai diversi laboratori partecipanti.

TABELLA 7 - Elenco dei laboratori partecipanti al “Ring Test” per i Metodi 1 e 2 proposti nel presente lavoro

Laboratorio partecipante	Indirizzo	Metodo testato
Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna	Via di Corticella, n° 133, 40129 Bologna	1 e 2
ERSA-Servizio Fitosanitario, chimico, ricerca, sperimentazione ed assistenza tecnica	Via Sabbatini, 5, 33050 Pozzuolo del friuli (UD)	1 e 2
Fondazione Edmund Mach. Unità Protezione delle piante e biodiversità agroforestale Dipartimento Sperimentazione e servizi tecnologici, Centro Trasferimento Tecnologico	Via Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN)	1 e 2
Centro di Ricerca Sperimentazione e Formazione in Agricoltura “Basile Caramia”	Via Cisternino 281, 70010 Locorotondo (BA)	1 e 2
Laboratorio Fitopatologico Servizio Fitosanitario Regionale c/o Fondazione Minoprio	Viale Raimondi, 54, 22070 Vertemate con Minoprio (CO)	1 e 2
Servizio Studi ambientali, qualità delle produzioni e fitopatologico dell'Agris Sardegna DIRVE	V.le Trieste, 111, 09123 Cagliari	1
Laboratorio di diagnostica fitopatologica e di biologia molecolare Servizio Fitosanitario Regione Toscana	Via Ciliegiole 99, 51100, Pistoia (PT)	1 e 2

Prima di procedere al “Ring Test”, ciascun laboratorio partecipante ha eseguito un pre-test su campioni noti (Tabella 8) al fine valutare le proprie *performance* in termini di sensibilità analitica, specificità⁷ (valutata su una specie no-target filogeneticamente più affine alla specie target) per entrambi i Metodi e di efficienza di amplificazione Real Time per il Metodo 2.

TABELLA 8 - Preparazione dei campioni usati per il pre-test

Campione	Quantità saggiate	Metodo
<i>G. citricarpa</i>	2 ⁻¹ ng; 2 ⁻² ng; 2 ⁻³ ng; 2 ⁻⁴ ng;	1
	1 ⁻¹ ng; 1 ⁻² ng; 1 ⁻³ ng; 1 ⁻⁴ ng; 1 ⁻⁵ ng; 1 ⁻⁶ ng	2
<i>G. mangiferae</i>	1 ng	1
<i>P. citriasiana</i>	1 ⁻³ ng	2

I risultati ottenuti da ciascun laboratorio hanno soddisfatto i criteri stabiliti e riportati in Tabella 9

TABELLA 9- valori minimi stabiliti dal laboratorio organizzante per i criteri considerati in entrambi i metodi

	Sensibilità analitica Metodo 1	Specificità Metodo 1	Sensibilità analitica Metodo 2	Efficienza di amplificazione Metodo 2	Specificità Metodo 2
Limiti stabiliti dal laboratorio organizzante	20 pg	Nessuna “cross reaction”	10 fg	90%<x<110%	Nessuna “cross reaction”

In Tabella 10 è riportato lo schema dei campioni inviati a ciascun laboratorio e testati per il “Ring Test”. I campioni sono stati preparati come segue: diverse estrazioni di DNA dello stesso isolato sono state unite ed omogeneizzate (“mix madre”). Per ogni laboratorio sono stati preparati 6 campioni positivi e 6 campioni negativi per ciascun metodo. Dalle mix madri sono state preparate delle sub-mix alle concentrazioni d’uso diluendo il DNA in tampone TrisHcl 5 mM pH 8.5; le sub-mix sono state infine aliquotate nei diversi campioni da spedire (tabella 10). Il DNA di ogni campione è stato valutato per la sua amplificabilità mediante PCR con i primer ITS4 X ITS5 (White *et al.*, 1990). L’omogeneità e la stabilità dei campioni sono state confermate analizzando i campioni per ciascun metodo 3 giorni e 10 giorni dopo la data dell’ultima consegna dei campioni ai laboratori partecipanti.

Per ciascun metodo è stato inserito un controllo positivo per essere usato come riferimento e termine di confronto nell’analisi dei risultati.

TABELLA 10 - Preparazione dei campioni usati per il “Ring Test”

	Codice identificativo campione	DNA <i>G. citricarpa</i>	DNA <i>G. mangiferae</i>	DNA <i>P. citriasiana</i>
METODO 1	01	0	100 pg/μl	0
	02	100 pg/μl	0	0
	03	0	0	0
	04	20 pg/μl	0	0
	05	0	100 pg/μl	0
	06	100 pg/μl	0	0
	07	0	0	0
	08	20 pg/μl	0	0
	09	0	0	0
	10	0	100 pg/μl	0
	11	20 pg/μl	0	0
	12	100 pg/μl	0	0
	C+	20 pg/μl	0	0
METODO 2	13	10 fg/μl	0	0
	14	50 fg/μl	0	0
	15	50 fg/μl	0	0
	16	0	0	0
	17	10 fg/μl	0	0
	18	0	0	0
	19	0	50 fg/μl	50 fg/μl
	20	50 fg/μl	0	0
	21	0	0	0
	22	0	50 fg/μl	50 fg/μl
	23	10 fg/μl		
	24	0	50 fg/μl	50 fg/μl
	C+	5 fg/μl	0	0

Specificità relativa, sensibilità relativa, accuratezza relativa, accordanza e concordanza sono state calcolate dai dati forniti da ciascun partecipante. Le formule di calcolo di ciascun criterio di valutazione sono indicate in Tabella 11.

TABELLA 11 - Acronimi e formule utilizzate per l'analisi dei risultati del "Ring Test". PA, veri positivi; PD, falsi positivi; ND, falsi negativi; NA, veri negativi; S, PA+NA; n, numero di campioni; L, numero di laboratori

CRITERIO DI VALUTAZIONE	FORMULA
Sensibilità relativa (SeR _i)	$PA/(PA+ND)$
Specificità relativa (SpR _i)	$NA/(NA+PD)$
Accuratezza relativa (AcR _i)	$(PA+NA)/(PA+PD+ND+NA)$
Accordanza (R _i)	$[S(S-1) + (n-S)(n-S-1)]/n(n-1)$
Concordanza (C _i)	$[2S(S-nL)+nL(nL-1) - (R_i)nL(n-1)]/n^2L(L-1)$

3.3 Validazione Metodo 1

I parametri di validazione del Metodo 1 sono stati calcolati secondo le modalità descritte in Tabella 7 del documento EPPO PM 7/98 del 2010: per la sensibilità è stato eseguito un saggio con 8 diluizioni seriali 1:5 di 3 isolati *target* contenenti un quantitativo fisso di DNA ospite (*Citrus limon*, 1 ng); per la specificità sono stati saggiati tutti gli isolati *non target* ad un valore medio di rilevanza. La ripetibilità è stata valutata saggiando un campione con DNA al limite di rilevamento e poco sopra, replicato 8 volte e ripetuto in tre esperimenti; la riproducibilità è stata valutata secondo quanto descritto per la ripetibilità, ma in momenti diversi e, ove possibile, con differenti operatori. I dati ottenuti sono riportati nella Tabella 12:

TABELLA 12 - dati di validazione ottenuti per il Metodo 1

Parametri	Valori metodo 1
Sensibilità analitica	20 pg
Specificità analitica	100%
Ripetibilità	100%
Riproducibilità	100%

I risultati ottenuti dal "Ring Test" mostrano che il metodo 1 ha ottenuto il 100% per tutti i criteri di valutazione saggiati, confermando la robustezza dei protocolli proposti (Tabella 13).

TABELLA 13 - Analisi dei valori medi dei criteri di *performance* ottenuti da ciascun laboratorio per il Metodo 1.

Criteri di <i>performance</i>	METODO 1
Sensibilità relativa	100%
Specificità relativa	100%
Accuratezza relativa	100%
Accordanza	100%
Concordanza	100%

3.4 Validazione Metodo 2

I parametri di validazione del Metodo 2 sono stati valutati secondo le modalità descritte nel precedente paragrafo usate per il Metodo 1, fatta eccezione per la sensibilità analitica che è stata calcolata mediante un saggio con 8 diluizioni seriali 1:10 di 3 isolati *target* contenenti un quantitativo fisso di DNA ospite (*Citrus limon* 1 pg/μl). I dati ottenuti sono riportati in Tabella 14:

TABELLA 14 - dati di validazione ottenuti per il Metodo 2.

Parametri	Valori metodo 2
Sensibilità analitica	10 fg
Specificità analitica	100%
Ripetibilità	100%
Riproducibilità	100%

Come il Metodo 1, anche il Metodo 2 ha ottenuto il 100% per tutti i criteri di valutazione saggiati (Tabella 15).

 TABELLA 15 - Analisi dei valori medi dei criteri di *performance* ottenuti da ciascun laboratorio per il Metodo 2

Criteri di <i>performance</i>	METODO 2
Sensibilità relativa	100%
Specificità relativa	100%
Accuratezza relativa	100%
Accordanza	100%
Concordanza	100%

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BAAYEN R.P., BONANTS P.J.M., VERKLEY G., CARROLL G.C., VAN DER Aa H.A., DE WEERDT M., VAN BROUWERSHAVEN I.R., SCHUTTE G.C., MACCHERONI W., DE BLANCO C.G., AZEVEDO J.L., 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G-mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, **92**, 464–477.
- BENSON A.H., 1895. Black spot of the orange. *Agricultural Gazette of New South Wales*, **6**, 249–51.
- BONANTS P.J.M., CAROLL G.C., DE WEERDT M., VAN BROUWERSHAVEN I.R., BAAYEN R.P., 2003. Development and validation of a fast PCR-based method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology*, **109**, 503–513.
- BRODRICK H.T., 1969. Physiological studies with *Guignardia citricarpa* Kiely. *DSc Thesis*, University of Pretoria, Pretoria.
- CABI, 2006. Crop protection compendium edition. *CAB International*, Wallingford (GB).
- CABI/EPPO, 1998. Distribution maps of plant diseases. *CAB International*, Wallingford (GB) N. 204.
- CALAVAN E.C., 1960. Black spot of *Citrus*. *Californian Citograph*, **46**, 4, 18, 22–24.
- CHIU R.J., 1955. Studies on black spot of citrus. *Journal of Agriculture and Forestry*, **9**, 186–203.
- DOIDGE E.M., 1929. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. *South African Journal of Science*, **26**, 320–325.
- EPPO PM 7/98 (1), 2010. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, **40**, 5–22.
- EPPO PM 7/17(2), 2009. *Guignardia citricarpa*. *EPPO Bulletin*, **39**, 318–327.
- EPPO/CABI, 1997. *Guignardia citricarpa*. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, Eds. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M., *CAB International*, Wallingford, pp. 773–781.
- EUROPEAN UNION of 1998. Commission decision of 8 January 1998 recognising certain third countries and certain areas of third countries as being free of *Xanthomonas campestris* (all strains pathogenic to Citrus), *Cercospora angolensis* Carv. et Mendes and *Guignardia citricarpa* Kiely (all strains pathogenic to Citrus). *Official Journal of European Communities*, **L15**, 41–42.
- FUNDECITRUS, 2005. <http://www.fundecitrus.com.br>.
- GARRÁN S.M., 1996. Citrus black spot in the northeast of Entre Rios: aetiology, epidemiology and control. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, Sun City, South Africa, **1**, 466–471.
- GOES A., 2001. A mancha preta dos frutos citricos causada por *Guignardia citricarpa*. *Fitopatologia Brasileira*, **26**, 245–246.
- GOES A., DE BALDASSARI R.B., FEICHTENBERGER E., SPOSITO M.B., VILDOSA C.I.A., 2000. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Brazil. (Abstr.). *Proceeding International Society Citriculture*, **1**, 145.

- KELLERMAN, C.R.; KOTZÉ, J.M. (1973) A single application of benomyl controls citrus black spot. *Citrus and Sub-tropical Fruit Journal* No. 476, pp. 19, 20, 22
- KIELY, T.B., 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. *Agricultural Gazette of New South Wales*, **60**, 17-20.
- KOTZÉ J.M., 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant disease Reporter* , **65**, 945–950.
- KOTZÉ J.M., 1996. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Proceedings of International Society of Citriculture*, pp. 1296–1299.
- KOTZÉ J.M., 2000. Black spot. In: Compendium of Citrus Diseases, 2nd edn. Eds. Timmer L.W., Garnsey S.M., Graham J.H.,. *APS Press*, St Paul Minnesota., pp. 23–25.
- MCONIE K.C., 1964. The latent occurrence in citrus and other hosts of *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. *Phytopathology*, **54**, 40–43.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY (US).
- SCHUEPP H., 1961. Studies on *Guignardia citricarpa*, the agent of black spot disease on citrus. *Phytopathologische Zeitschrift* **40**, 258–271.
- SNOWDON A.L., 1990. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables,. General Introduction and Fruits. *Wolfe Scientific Ltd*, London (GB). **Vol. I**.
- SUTTON B.C., WATERSTON J.M., 1966. *Guignardia citricarpa*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. *CAB International*, Wallingford (GB), n. 85.
- TIMMER L.W., 2000. Black spot. in Compendium of Citrus Diseases. Eds. Timmer L.W., Garnsey S.T., Graham J.H., *APS Press*, St Paul, Minnesota., pp. 40-45.
- VAN GENT-PELZER M.P.E., VAN BROUWERSHAVEN I.R., KOX L.F.F., BONANTS P.J.M., 2007. A Taqman PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa*. *Journal of Phytopathology*, **155**, 357–363.
- WAGER V.A., 1952. The black spot disease of citrus in South Africa. *Union of South Africa, Department of Agriculture, Science Bulletin*, **303**, 1–52.
- WHITE T.J., BURNS T., LEE TAYLOR J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., , *San Diego, Academic Press*, pp. 315–322.
- WULANDARI N.F., TO-ANUN C., HYDE K.D., DUONG L.M., GRUYTER J., MEFFERT J.P., GROENEWALD J.Z., CROUS P.W., 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia, *Fungal Diversity* **34**, 23–39.
- ZHENG, X.M., 1983. Studies on the black spot of citrus (*Guignardia citricarpa* Kiely). *Journal of the South China Agricultural College*, **4**, 53-60.

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. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
8. Apparat per elettroforesi orizzontali su gel d'agarosio Bio-Rad
9. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
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 dedicate all'estrazione di acidi nucleici e calibrate (P20, P100, P200, P1000)
15. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P100, P200, P1000)
16. Misuratore di pH
17. Sistema di *imaging* per visualizzare i risultati delle analisi elettroforetiche GelDoc XR+ (Bio-Rad)
18. Fluorimetro Qubit .1 (Invitrogen) o in alternativa spettrofotometro

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. DNA polimerasi MIX per Real Time PCR "Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2x)" (Thermo Scientific; cat. k0231)
6. Primer e sonda specifici per *G. gitricarpa*
7. Enzima DNA polimerasi "Biotaq DNA Polymerase" (Bioline; Cat. BIO-21040)
8. Marcatore di peso molecolare per DNA "1 kb Plus DNA Ladder" (Invitrogen; Cat. 10787-018)
9. RNasi A commerciale non necessaria se si dispone di un fluorimetro

Materiali

1. Azoto liquido
2. Ghiaccio granulare
3. Acqua bidistillata sterile nucleasi-*free*
4. Guanti monouso
5. Mortai e pestelli autoclavati
6. Piastre da 96 pozzetti (con pellicole adesive) o strip o provette singole specifiche per Real-Time PCR
7. Porta provette
8. Provette tipo Eppendorf da 0,2, 1,5 e 2 ml
9. Puntali per micro pipette, nucleasi-*free* e con filtro
10. Vetreria varia o materiale plastico monouso o autoclavata e/o nucleasi-*free*

Allegato II: Strumentazione e reagenti utilizzati nel “ring test”

TABELLA 8 - Reagenti, termociclatori e sistemi di rivelazione utilizzati dai laboratori partecipanti al “ring test”

METODO 1						
	DNA polimerasi o Master Mix	dNTPs	Termociclatore	Tipo di gel per elettroforesi	Colorante per acidi nucleici	Sistema acquisizione immagini
LAB01	iTaq DNA polymerase (Bio-Rad)	dNTPS Mix 10 mM (Bio-Rad)	Bio-Rad iQ5	Elettroforesi su chip mediante Agilent BioAnalyzer 2100	H373	Agilent BioAnalyzer 2100 (elaborazione digitale gel da cromatogramma)
LAB02	GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega)	PCR Nucleotide Mix (Promega)	GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems	Agarosio GellyPhor (Euroclone)	EuroSafe Nucleic Acid Stain (Euroclone) SYBR	GEL DOC 2000, Bio-rad
LAB03	Platinum Taq polymerase (Invitrogen)	dNTPS Mix 10 mM (Promega)	Mastercycler personal Eppendorf	UltraPure Agarose (Invitrogen)	Safe DNA gel stain (Invitrogen)	GEL DOC, Bio-rad
LAB04	1 DNApolimera i Go-Taq (Promega)	dNTPs 100mM (Invitrogen)	Veriti Thermal Cycler Applied Biosystem	Pre-cast gel E-GELS 2% (Invitrogen)	/	E-GEL IBASE POWER SYSTEM Life Technologies
LAB05	Master Mix Dream Taq (ex Fermentas)	/	myCycler, Bio-rad	Agarosio (IBI Scientific)	GelRed (Biotum)	GEL DOC, Bio-rad
LAB06	GoTaq Green Master Mix 2x (Promega)	/	GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems	Agarosio, (SIGMA, A9539)	bromuro di etidio 10 mg/ml (Sigma, E1510)	GEL DOC XR Universal Hood II, Bio-Rad
LAB07	/	/	/	/	/	/

METODO 2			
	DNA polimerasi o Master Mix	Termociclatore Real Time	Software per analisi dati
LAB01	2x SuperMix (Bio-Rad)	Bio-Rad CFX	Bio-Rad CFX manager 3.0
LAB02	TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)	Step One Plus Applied Biosystems	Step One Software, for StepOne e StepOnePlus; v2.2.2
LAB04	TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)	7300 Real Time PCR System, AppliedBiosystem	7300 SDS Software, v1.3
LAB05	2X sSO Fast SuperMix, Biorad	Bio-Rad CFX	Bio-Rad CFX manager 3.0
LAB06	Platinum qPCR super Mix-UDG (Invitrogen, 11730-025)	Light Cycler 480, Roche	Light Cycler 480 Software release 1.5.0 SP3 (1.5.0.39)
LAB07	/	Bio-Rad CFX	Bio-Rad CFX manager 3.0

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
TOMATO INFECTIOUS CHLOROSIS VIRUS
E
TOMATO CHLOROSIS VIRUS
SU POMODORO**

**A. Manglli¹, M. Ciuffo², T. Mascia³, S.W. Davino⁴, D. Gallitelli³,
M. Turina², L. Tomassoli¹**

¹ Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura
Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

²Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino

³ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli
Studi di Bari “Aldo Moro”, Bari

⁴Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (SAF), Gruppo di Patologia Vegetale,
Università degli Studi di Palermo, Palermo.

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	547
1.1 Ospite	547
1.2 Sintomatologia	548
1.3 Morfologia e struttura dell'agente eziologico	548
1.4 Epidemiologia e trasmissione	548
1.5 Diagnosi	549
1.6 Normativa fitosanitaria	549
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	549
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	550
3.1 Premessa	550
3.2 Diagramma di flusso	551
3.3 One step RT-PCR	552
3.4 Real Time RT-PCR (RT-qPCR)	556
4. DATI DI VALIDAZIONE	561
4.1 Campioni utilizzati per la validazione	561
4.2 Valori di validazione ottenuti	561
4.3 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche	563
5 BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	564
Allegato I - strumenti, materiali e reagenti necessari	565

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

<i>Agenti causali</i>	<i>Tomato chlorosis virus</i>
	<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
	Virus
<i>Tassonomia</i>	Famiglia: <i>Closteroviridae</i>
	Genere: <i>Crinivirus</i>
<i>Avversità</i>	Giallume internervale su pomodoro
<i>Acronimi</i>	ToCV - TICV

1.1 Ospite

La malattia, indicata generalmente “giallume internervale del pomodoro”, è causata da ToCV e TICV in infezione singola o mista. Identificati per la prima volta in California (TICV, Duffus *et al.*, 1996) e in Florida (ToCV, Wisler *et al.*, 1998), essi si sono diffusi rapidamente in molti paesi del Bacino Mediterraneo provocando un aggravio dello stato fitosanitario della coltura protetta di pomodoro già gravemente colpita dalla malattia dell'accartoccimento fogliare giallo (TYLCD). In Italia, TICV e ToCV sono stati segnalati per la prima volta all'inizio degli anni 2000 e ormai si ritiene che siano endemici in moltissime aree serricole destinate alla produzione di pomodoro da mensa. TICV è stato segnalato negli anni 2001-2002 in Liguria, Lazio, Campania, Sardegna, nel 2006 in Calabria, nel 2011 in Puglia e più recentemente in Sicilia. Nelle stesse regioni ToCV è presente dal 2001. Questi crinivirus sono stati riscontrati in infezioni naturali anche su altre specie botaniche di interesse agrario (TICV: carciofo, lattuga, scarola, tomatillo; ToCV: tomatillo), specie ornamentali (TICV: petunia, ranuncolo; ToCV: zinnia) e specie spontanee (TICV: *Chenopodium album* e *C. murale*; ToCV: *Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Plantago major* e *Cucurbita moschata*).

1.2 Sintomatologia



I sintomi sono rilevabili solo su foglie.

I due virus causano sulle piante una sintomatologia molto simile che si manifesta con clorosi ed ingiallimento internervale delle foglie basali. Queste risultano anche ispessite, coriacee e fragili al tatto e progressivamente compaiono arrossamenti, imbrunimenti e necrosi internervali. I virus si replicano nelle cellule floematiche causando alterazioni al metabolismo nutrizionale, motivo questo di frequente associazione del sintomo a carenze nutrizionali, in particolare di magnesio e manganese.

Dalla letteratura e da quanto osservato

in campo nelle aree italiane, i due virus non provocano danni diretti sui frutti ma in caso di infezione precoce si può registrare un forte calo produttivo nel numero di frutti per palco e nelle dimensioni che risultano ridotte.



1.3 Morfologia e struttura dell'agente eziologico

TICV e ToCV hanno un genoma costituito da due molecole di RNA a singola elica di polarità positiva, denominate RNA1 e RNA2 ed incapsidate separatamente in particelle virali di tipo filamentoso di una lunghezza variabile tra 800-850 nm per ToCV e 850-900 nm per TICV. Le due molecole di RNA codificano sia proteine non strutturali, le cui funzioni non sono per tutte note, sia proteine strutturali (RNA2) (Liu *et al.*, 2000; Wintermantel *et al.*, 2005 e 2008).

1.4 Epidemiologia e trasmissione

TICV e ToCV sono trasmessi dagli aleurodidi di serra, famiglia Aleyrodidae, in modo semi-persistente. L'insetto, dopo aver acquisito le particelle virali alimentandosi per tempi superiori ad un minuto su piante infette, è in grado di ritenere il virus e trasmetterlo con efficienza a piante sane per alcuni giorni. Per TICV, il tempo di permanenza nel vettore specifico *Trialeurodes vaporariorum* è di circa quattro giorni; nel caso di ToCV è stato evidenziato un tempo di ritenzione pari a due giorni in *Bemisia tabaci* (biotipi B e Q) e di un solo giorno in *T. vaporariorum*.

La malattia può manifestarsi in serra per tutto l'arco dell'anno produttivo in funzione dell'andamento climatico che può favorire la proliferazione degli aleurodidi e la presenza di piante serbatoio per i due virus.

La tecnica culturale di defogliazione dei palchi bassi delle piante di pomodoro sembra ridurre gli effetti della malattia sulla singola pianta.

1.5 Diagnosi

La diagnosi dei due virus può essere effettuata mediante le tecniche molecolari che rilevano l'acido nucleico virale, dopo opportuna estrazione dalla matrice vegetale, mediante l'uso di oligonucleotidi specifici per il riconoscimento di RNA virale.

1.6 Normativa fitosanitaria

TICV e ToCV sono inseriti nella lista A2 dell'EPPO per gli organismi regolati da norme per la quarantena.

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Un corretto campionamento è un presupposto fondamentale per l'attendibilità del risultato di qualsiasi saggio diagnostico. 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 con la metodologia indicata;
- il corretto mantenimento del campione vegetale sino alla consegna al laboratorio;
- la rapida spedizione al laboratorio di diagnosi.

Campionamento: per la determinazione di ToCV e TICV in pomodoro si consiglia di analizzare sempre la matrice "foglia". Buona regola è prelevare sempre foglie ben sviluppate mostranti sempre i sintomi di clorosi o giallume internervale fogliare, non in fase di senescenza o affetta da altri stress biotici e abiotici.

Mantenimento del campione: il materiale vegetale deve essere fresco, asciutto e deve essere posto in bustine di plastica opportunamente chiuse.

Rintracciabilità del campione: ogni campione deve essere opportunamente contrassegnato con una sigla riconducibile all'azienda e al lotto in cui è stato effettuato il prelievo.

Spedizione del campione: i campioni raccolti devono essere lavorati il prima possibile, per cui devono arrivare al laboratorio di diagnosi entro 48 ore. I campioni fogliari possono essere mantenuti a 4°C non oltre i 7 giorni. Conservazioni più lunghe possono inficiare il risultato del saggio diagnostico.

I campioni vegetali alterati nella consistenza, ad esempio per la presenza di imbrunimenti o marciume o muffe, non devono essere ritenuti idonei all'esecuzione dell'analisi, perché i risultati risulterebbero inattendibili.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

3.1 Premessa

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione dei due virus responsabili del "giallume internervale del pomodoro" (TICV e ToCV) su pomodoro ai laboratori preposti alla diagnosi degli organismi coperti da normative fitosanitarie. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di una efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze.

Per la definizione di tali parametri, le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazione dettagliatamente riportati (Allegato I). 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 e la definizione dei parametri di validazione è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro** costituito da **esperti** afferenti alle seguenti istituzioni:

- 1- CRA-Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Coordinatore del Gruppo)
- 2- CNR-IVV Istituto di Virologia Vegetale del CNR Sezione di Torino
- 3- DISSPA Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"
- 4- SAF Università degli Studi di Palermo.

che ha tenuto conto dei metodi di diagnosi pubblicati su lavori scientifici e dal gruppo EUPHRESKO (informazioni fornite da FERA, United Kingdom)

La definizione del parametro di "riproducibilità" è scaturita dall'effettuazione di un *ring test* nazionale a cui hanno partecipato i laboratori dei seguenti Servizi Fitosanitari Regionali (SFR):

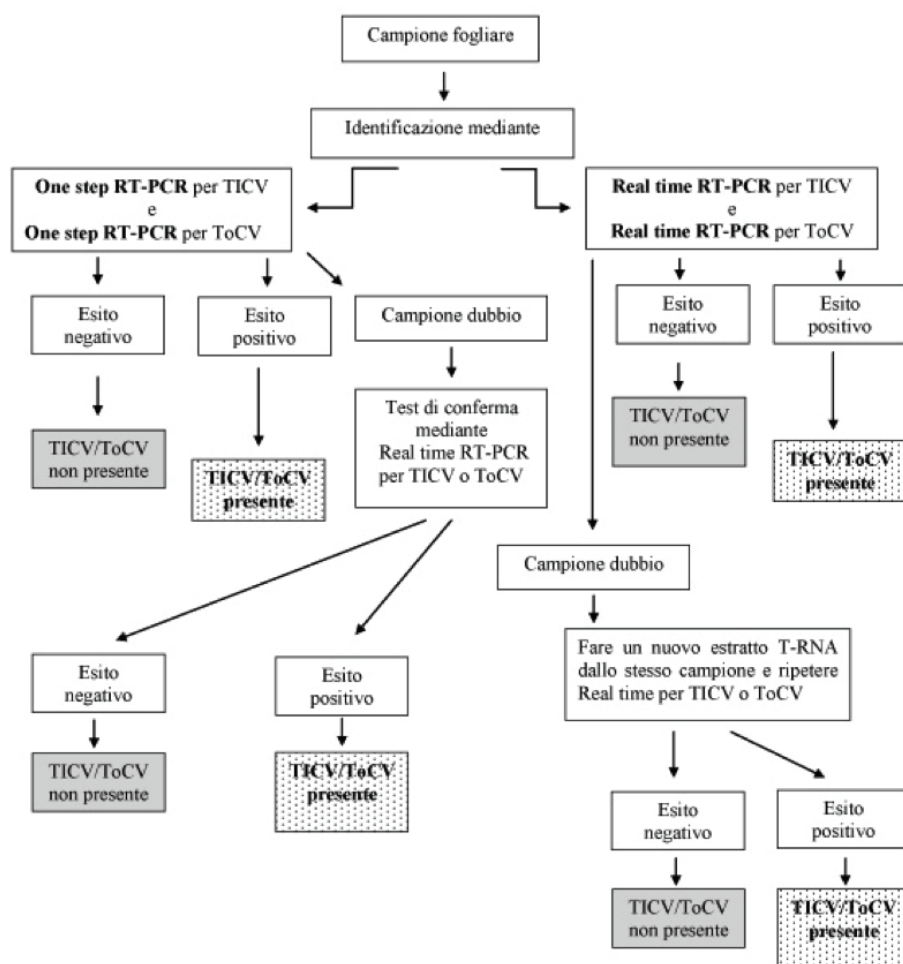
- 1- SFR Val d'Aosta, referente Dr. Fabio Guglielmo
- 2- SFR Piemonte, referenti Dr. Paola Gotta e Dr. Giovanna Mason
- 3- SFR Sardegna, Laboratorio Fitopatologico AGRIS, referente Dr. Annamaria Repetto
- 4- SFR Sicilia, Laboratorio Università di Catania, referenti Dr. Giuseppe Campo e Prof. Mario Davino.

Inoltre, ha partecipato il laboratorio International Plant Analysis and Diagnostics (I.P.A.D.), referente Dr. Giuseppe Durante.

I metodi diagnostici inseriti nel presente protocollo per la identificazione di TICV e ToCV sono:

Metodo diagnostico	Componente virale riconosciuta
Molecolare: one step RT-PCR	acido nucleico virale
Molecolare: real time RT-PCR (RT-qPCR)	acido nucleico virale

3.2 Diagramma di flusso



3.3 One step RT-PCR

3.3.1 Preparazione del saggio RT-PCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, controllo negativo e un controllo "bianco". Si consiglia di non superare il numero di 20 campioni per evento di amplificazione (compresi i controlli).

Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa specie vegetale dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta da TICV o ToCV (a seconda del test che si vuole effettuare) e da una pianta sicuramente esente da entrambi i crinivirus.

Il controllo "bianco" è costituito da acqua RNase-free caricata al posto dell'estratto di RNA.

3.3.2 Estrazione dei campioni con kit commerciale

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat no. 74904 per 50 campioni)

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo provette sterili e puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della ditta produttrice del kit di estrazione. Macerare accuratamente il tessuto fogliare con mortaio e pestello sterili in presenza di azoto liquido (*). E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso rispetto a quella necessaria e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette. Includere sempre nella prova l'estrazione di un controllo sicuramente esente dall'infezione (primo da estrarre) e un controllo sicuramente infetto dal virus (ultimo da estrarre), appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggiata.

(*) Nel caso in cui non si disponga di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può procedere come segue, utilizzando il tampone fosfato 0,1M pH 7,2 (sterile):

- Pesare 0,5 g di tessuto vegetale e collocarli in una bustina per estrazione tipo 'Bioreba' cat no. 480100.
- Aggiungere 2,5 ml di tampone nella bustina.
- Macerare il campione.
- Trasferire 100 µl di omogenato in una provetta da 2 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit.

3.3.3 Esecuzione RT-PCR

Oligonucleotidi

Per la diagnosi di ToCV e TICV, gli oligonucleotidi suggeriti, disegnati nella regione codificante per la proteina HSP70, sono i seguenti:

ToCV-172 (forward)	5'- GCTTCTGAAACTCCGTCTTG - 3'	Louro <i>et al.</i> , 2000
ToCV-610 (reverse)	5'- TGTCGAAAGTACCGCCACC - 3'	
TICV-32 (forward)	5'- TCAGTGCGTACGTTAATGGG - 3'	Vaira <i>et al.</i> , 2002
TICV-532 (reverse)	5'- CACAGTATACAGCAGCGGCA - 3'	

Gli oligonucleotidi possono essere ordinati ad apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati o in sospensione a concentrazione nota. E' conveniente diluire gli oligonucleotidi ad una concentrazione di 100 µM in dH₂O sterile (seguendo le istruzioni della ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Preparazione del saggio

- Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da laboratorio. Indossare guanti monouso.
- Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenerli sotto la luce U.V. per 10 minuti prima di utilizzarli.
- Sigllare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione sotto specificata mantenendoli in ghiaccio.
- Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio.

Miscela di reazione per TICV e ToCV in reazione singola

Componenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
dH ₂ O RNase free	9,5	-
2X Reaction Mix (PCR buffer)	12,5	1X
Oligonucleotide (forward) (10 µM)	0,5	0,2 µM
Oligonucleotide (reverse) (10 µM)	0,5	0,2 µM
SuperScript III RT/ Platinum® Taq Mix	1,0	-
RNA totale estratto (RNA)	1,0	
Totale	25,0	

Procedimento

- Mescolare bene la soluzione.
- Distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
- Aggiungere l'estratto di RNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
- Accertarsi che tutta l'aliquota della miscela di reazione sia sul fondo della provetta. Eventualmente centrifugare per pochi secondi.
- Inserire le provette nel termociclatore.
- Avviare la RT-PCR dopo aver impostato o selezionato il programma specifico.

Ciclo

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Trascrizione inversa	50 °C	30'	1
Denaturazione	94 °C	5'	1
	94 °C	30"	
Amplificazione	57 °C	30"	33
	72 °C	60"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1

3.3.4 Elettroforesi su gel di agarosio

Per l'esecuzione del saggio seguire le seguenti tappe operative:

- Preparare il gel di agarosio 1,0 % in TBE1X.
- 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.
- Caricare 10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 2 µl di loading buffer 10X. Cambiare il puntale ad ogni campione.
- Caricare in un pozzetto un marker idoneo (range circa 50-1000 bp).
- Correre per circa 30-40 minuti a 100 Volt, facendo riferimento al fronte del colorante che non deve uscire dal gel.
- Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per 15-30 minuti circa in una soluzione 0,5 µg/ml di etidio bromuro oppure colorante gel-red diluito 1:20.000.
- Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O.
- Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V., fare la fotografia e conservare la foto (tiff o jpg) da allegare al foglio di lavoro.

3.3.5 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserverà una sola banda di:

~ 500 bp per TICV

~ 439 bp per ToCV

che avrà migrato alla stessa altezza della banda del controllo positivo in corrispondenza della banda di riferimento del marker. La presenza di altre bande più deboli indica una reazione di amplificazione non specifica e il test deve essere ripetuto.

Nessuna banda deve essere presente nel controllo negativo e nel controllo "bianco".

Punti critici

- a) Il punto debole della RT-PCR è la sensibilità di reazione, che da una parte consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma dall'altra, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi o provocare delle contaminazioni nel laboratorio (reagenti, blocco del termociclatore, micropipette, 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.
- b) 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). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micropipette 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 RNase-free;
 - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti RNA);
 - usare solo puntali sterili con filtro;
 - al momento di caricamento nel 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 provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNase reperibili in commercio.
- c) Controllare sempre l'etichetta dei reagenti, in particolare quella degli enzimi, prima di effettuare le opportune diluizioni (la concentrazione in Unità/μl di enzima possono variare in funzione del lotto utilizzato).
- d) Mantenere in ghiaccio le provette contenenti la miscela di reazione, durante la preparazione della 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.
- f) 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.

Tamponi necessari alla corsa elettroforetica

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

Loading buffer 10X in TBE	
Blu di bromofenolo	0,3%
Xilencianolo	0.3%
Glicerolo	60%

Soluzione di etidio bromuro 0,5 mg/ml	
Etidio bromuro	50 g
acqua	100 ml
Diluire questa soluzione 1:1000 in acqua	

3.4 Real Time RT-PCR (RT-qPCR)

3.4.1 Preparazione del saggio RT-qPCR

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli. Ciascun campione deve essere replicato 2 volte nell'esperimento. Preparare lo schema della piastra direttamente con il programma fornito dalla Real Time o farne uno cartaceo, su cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli:

- controllo "bianco" ogni 20 campioni costituito dalla miscela di reazione in cui vengono aggiunti 1 µl di acqua RNase-free al posto dell'estratto;
- controllo negativo ogni 20 campioni costituito da un campione sicuramente esente da TICV e ToCV, appartenente alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni da saggiare, preparato congiuntamente agli altri;
- controllo positivo costituito da un campione sicuramente infetto dal TICV/ToCV, preparato congiuntamente agli altri.

3.4.2 Estrazione con kit commerciale:

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat. no. 74904 per 50 campioni)

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta. Usare solo puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della ditta produttrice del kit di estrazione. Macerare accuratamente il tessuto fogliare con mortaio e pestello sterili in presenza di azoto liquido (*). E' consigliabile macerare una quantità di tessuto vegetale in eccesso rispetto a quella necessaria e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza del virus, che può non essere distribuito uniformemente nei tessuti delle piante infette. Includere sempre nella prova l'estrazione di un controllo sicuramente esente dall'infezione (primo da estrarre) e un controllo sicuramente infetto dal virus (ultimo da estrarre), appartenente alla stessa specie vegetale e alla stessa matrice saggata.

(*) Nel caso in cui non si disponga di azoto liquido (previsto nelle istruzioni dei kit commerciali) si può procedere come segue, utilizzando il tampone fosfato 0,1M pH 7,2 (sterile):

- Pesare 0,5 g di tessuto vegetale e collocarli in una bustina 'Bioreba'.
- Aggiungere 2,5 ml di tampone nella bustina.
- Macerare il campione.
- Trasferire 100 µl di omogenato in una provetta da 2 ml e proseguire seguendo il protocollo del kit.

3.4.3 Esecuzione del saggio RT-qPCR

Oligonucleotidi e sonde

Per la diagnosi di TICV e ToCV si utilizzano gli oligonucleotidi e sonda TaqMan di seguito riportati:

TICV- 463 for 5'- GCGGGACATTTTTATCATATGC -3'

TICV- 577 rev 5'- TCAGCCCAACATCTTGTAGTTGTT -3'

TICV – 497 probe 5'FAM - CGTCAGGTCACCCAAACGCTCTAAGG – MGB 3'

disegnati nella regione codificante per la proteina capsidica CP - Tiberini *et al.*, 2011

ToCV- 258 for	5'- GTCTGTTCCGGCTGATTACAAGT -3'
ToCV- 331 rev	5'- AATTGAAACCCAAAGAGGAACAAA -3'
ToCV – P probe	5'FAM - TGGGCAGAGACTTTTCATGCAGGCA – MGB 3'

disegnati nella regione codificante per la proteina HSP70 – Morris *et al.*, 2006.

Per la reazione di controllo sul gene endogeno (cytochrome oxidase) del campione vegetale si utilizzano gli oligonucleidi e la sonda TaqMan di seguito riportati:

COX F	5'-CGTCGCATTCCAGATTATCCA-3'
COX R	5'-CAACTACGGATATATAAGRRCCRRAACTG-3'
COX SOL 1511T probe	5'-VIC-AGGGCATTCCATCCAGCGTAAGCA-MGB 3'

Gli oligonucleotidi e le sonde possono essere ordinati ad apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati o in sospensione a concentrazione nota.

Diluire gli oligonucleotidi alla concentrazione d'uso di 100 µM in dH₂O sterile e mantenere a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 µl totali ad una concentrazione d'uso di 10 µM in dH₂O sterile e conservarle a -20°C da utilizzare nella preparazione della miscela di reazione.

E' conveniente diluire la sonda ad una concentrazione di 50 µM in dH₂O sterile e conservare la soluzione madre a -20 °C. Preparare, quindi, delle sub-aliquote di circa 20 µl totali ad una concentrazione d'uso di 5 µM in dH₂O sterile e conservarle a -20°C. La soluzione madre e le aliquote DEVONO essere mantenute rigorosamente al buio.

Preparazione del saggio

- Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta.
- Indossare un camice dedicato alla preparazione della mix per RT-qPCR (un camice che non deve essere stato utilizzato nella manipolazione di amplificati o durante la fase di estrazione dei campioni).
- Usare solo provette e puntali con filtro sterili da maneggiare SEMPRE indossando guanti monouso.
- Indossare guanti puliti.
- Sterilizzare sotto UV pipette, puntali con filtro, portaprovette.
- Preparare la mix in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR).
- Se si utilizzano provette NON siglarle per nessun motivo (il pennarello altera la lettura della fluorescenza emessa all'interno del termociclatore).
- Se si utilizzano piastre disporle sull'apposito supporto in dotazione con il termociclatore.
- Scongellare i reagenti mantenendoli in ghiaccio per preparare la miscela di reazione di seguito specificata.

- Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio.
- Distribuire 24 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta o pozzetto.
- Cambiare area di lavoro e caricare 1 µl di estratto (RNA) con una micropipetta dedicata SOLO a questo scopo.
- In caso di utilizzo di piastra, chiuderla con pellicola specifica.
- Effettuare una breve centrifuga.
- Inserire le provette o la piastra nel termociclatore.
- Avviare la RT-qPCR dopo aver impostato o selezionato il programma.

Miscele di reazione singole per TICV o ToCV o COX

Componenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
dH ₂ O RNase free	8,875	
2X Master Mix	12,5	1X
40X RNase Inhibitor	0,625	1X
10 µM Forward primer	0,75	(0,3 µM)
10 µM Reverse primer	0,75	(0,3 µM)
5 µM TaqMan probe	0,5	(0,1 µM)
Totale	24	

Ciclo

Temperatura	Tempo	N° di cicli
48 °C	30'	1
95 °C	10'	1
95 °C	15''	40
60 °C	1'	

Controllare i risultati mediante la visualizzazione del grafico delle curve di amplificazione e del valore Ct di ciascun campione.

3.4.4 Valutazione dei risultati

Una volta stabilito il limite soglia (*threshold*):

- considerare **positivi** tutti i campioni che il software del termociclatore riporta con un valore di $Ct < 38-40$ per il virus e per il rispettivo controllo interno (COX) tenendo conto del valore del Ct del controllo sano;
- considerare **negativi** i campioni con un valore di $Ct > 38-40$ per il virus tenendo conto del Ct del controllo positivo e con il rispettivo controllo interno (COX) a un valore di $Ct < 38-40$;
- i campioni con un valore di $Ct > 40$ devono essere analizzati di nuovo se il rispettivo controllo interno (COX) ha un analogo valore di $Ct > 40$.

3.4.5 Punti critici

- a. Il punto debole della RT-qPCR è l'elevata sensibilità di reazione, che da una parte consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma dall'altra, se non utilizzata correttamente, può dare campioni falsi positivi a causa delle contaminazioni all'interno della piastra o tra i microtubi durante il caricamento dei singoli estratti di RNA o nella preparazione della miscela. 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.
- b. Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:
 - organizzare il laboratorio, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per la preparazione della mix e laboratorio per l'amplificazione). Se ciò non è possibile utilizzare assolutamente bancali o aree separate per le tre fasi e una serie di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione nell'area dove si maneggiano amplificati e non portare gli amplificati nell'area dedicata alla preparazione della miscela di reazione;
 - tenere i componenti e i reagenti aperti il minor tempo possibile;
 - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminare tutte le aliquote in uso e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
 - usare solo acqua sterile RNase-free;
 - cambiare i guanti ogni qual volta si sospetta di averli contaminati durante le operazioni di preparazione della miscela di reazione e di caricamento dei target (estratti RNA);
 - usare SOLO puntali sterili con filtro;
 - al momento del caricamento nel blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse o che la pellicola per la copertura delle piastre sia ben sigillata;
 - pulire periodicamente i bancali e l'equipaggiamento con una soluzione di sodio ipoclorito al 10%.
- c. Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.

4. DATI DI VALIDAZIONE

Le prove di validazione sono state effettuate sulla sola specie di pomodoro (*Solanum lycopersicum*) utilizzando matrice fogliare.

4.1 Campioni utilizzati per la validazione

Complessivamente per i test di validazione sono stati utilizzati 30 diversi campioni di riferimento così distribuiti:

- **12 campioni ‘target’ infetti da TICV** comprendenti isolati provenienti da diversi areali geografici
- **12 campioni ‘target’ infetti da ToCV** comprendenti isolati provenienti da diversi areali geografici
- **2 campioni ‘non target’** costituiti da materiale **infetto da altri patogeni virali** appartenenti al genere *Crinivirus*:
 - 1 campione infetto da **TICV** o **ToCV** rispettivamente per il test ToCV o TICV
 - 1 campione infetto da *Lettuce infectious yellows virus (LIYV)*
 - 1 campione infetto da *Beet pseudo yellows virus (BPYV)*
- **1 campione ‘non target’** costituito da materiale **infetto da altro patogeno virale** del pomodoro in coltura protetta
 - 1 campione infetto da *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*
- **3 campioni ‘non target’** costituiti da matrice fogliare da piante di pomodoro **esenti da infezione virale**.

Per la valutazione della “riproducibilità” è stato utilizzato un numero inferiore di campioni escludendo quelli “non target” (n. 4) infetti da altri agenti virali. I test sono stati eseguiti con campioni ‘*blind*’: i campioni sono stati saggiati da un operatore che non ne conosceva la natura e la storia.

4.2 Valori di validazione ottenuti

4.2.1 Metodo diagnostico molecolare RT-PCR

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit commerciale per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit Qiagen - cod. 74904 dopo prove comparative con altri due kit commerciali;

Miscela di reazione: Superscript III one-Step RT-PCR System con Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen cat. No 12574-018 per 25 reaction) che contiene:

50 µl di SuperScript III RT/Platinum Taq

1 ml di Soluzione tampone 2X (0,4 mM per ciascun dNTP, 3,2 mM MgSO₄)

500µl di 5 mM MgSO₄

Oligonucleotidi specifici per T1CV e ToCV: sintetizzati da Invitrogen Ltd

Termociclatore: Biorad: MJ PTC200, MJ Chromo4, CFX96, CFX 1000, iCycler, S1000 thermal Cycler, Mini Opticon; Eppendorf-Mastercycler personal; Techne Progene; BIOMETRA - THERMOCYCLER T1

Transilluminatore: Biorad Geldoc 2000

Marker per DNA: BenchTop 100bp Dna ladder (100 lanes) G 7541 Promega Corporation

Parametri	Valori ToCV	Valori T1CV
Sensibilità diagnostica	100%	100%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	100%
Specificità analitica	100%	100%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²	10 ⁻⁵
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	99%	99%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10⁻¹⁰

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per cinque volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di due estratti/virus

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un *ring test* effettuato da quattro laboratori dei SFR, un laboratorio privato e CRA-PAV.

4.2.2 Metodo diagnostico molecolare Real time RT-PCR

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Master mix: TaqMan One step RT- PCR Master Mix cod. 4309169 Applied Biosystem

Piastre: Reaction Plate 96-W no barcode cod N8010560 Applied Biosystem

Pellicola per piastre rt PCR: Optical Adesive Covers cod. 4311971 Applied Biosystem

Termociclatore: Applied Biosystem: ABIPRISM 7000 e 7500 Fast, StepOne Plus; Biorad: MJ Chromo4, MiniOpticon CFX96;

Sonda TaqMan e oligonucleotidi: sintetizzati da Sigma, Applied Biosystem e Biofab Research

Parametri	Valori ToCV	Valori TICV
Sensibilità diagnostica	100%	100%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza relativa	100%	100%
Specificità analitica	100%	100%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%
Riproducibilità ⁽³⁾	100%	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata fino ad una diluizione dell'estratto di 10⁻¹⁰.

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando come campione due diluizioni risultate a media e bassa intensità di rilevamento su gel di agarosio di due estratti/virus nei test di RT-PCR.

⁽³⁾ La riproducibilità è stata valutata mediante un *ring test* effettuato da due laboratori dei SFR e CRA-PAV.

I valori di validazione ottenuti hanno consentito la stesura del Protocollo Diagnostico EPPO PM 7/118.

4.3 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
Saggio molecolare one step RT-PCR	Tempi di esecuzione: 8 ore per l'analisi di circa 20 campioni (esclusa estrazione) Vantaggi: buona sensibilità analitica e accuratezza; consente sequenziamento del virus Svantaggi: tecnica laboriosa e legata all'utilizzo di specifici reagenti
Saggio molecolare Real time RT-qPCR	Tempi di esecuzione: 4 ore per l'analisi di circa 20 campioni (esclusa estrazione) Vantaggi: maggiore sensibilità analitica Svantaggi: tecnica laboriosa, legata all'utilizzo di specifici reagenti e che richiede personale altamente specializzato. In diverse prove, i valori di Ct 38-40 anche per non target Consigliato per analisi su piccoli numeri e campioni dubbi in RT-PCR

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- DUFFUS JE, HY LIU, GC WISLER, 1996. Tomato infectious chlorosis virus – A new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 219-226.
- EPPO STANDARD PM 7/118 (1), 2013. *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus*. *Eppo Bulletin* **43** (3), 462-470.
- LIU HY, GC WISLER, JE DUFFUS, 2000. Particle lengths of whitefly transmitted criniviruses. *Plant Disease* **84**, 803–805
- LOURO D, GP ACCOTTO, AM VAIRA, 2000. Occurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 590-592
- MORRIS E, E STEEL, P. MITH, N BOONHAM, N SPENCE, I BARKER, 2006. Host range studies for *Tomato chlorosis virus*, and *Cucumber vein yellowing virus* transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 265-273
- TIBERINI A, A MANGILLI, V CAVALIERI, C RAPISARDA, L TOMASSOLI, 2011. Multiplex Real Time RT-PCR for *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato plants and whiteflies. Atti del XVII Convegno SIPaV – Bologna 12-14 Settembre 2011, p.92.
- VAIRA AM, GP ACCOTTO, M VECCHIATI, M BRAGALONI, 2002. *Tomato infectious chlorosis virus* causes leaf yellowing and reddening of tomato in Italy. *Phytoparasitica* **30**, 290-294
- WINTERMANTEL WM, GC WISLER, AG ANCHIETA, HY LIU, AV KARASEV, IE TZANETAKIS, 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* **150**, 2287-2298.
- WINTERMANTEL WM, AA CORTEZ, AG ANCHIETA, A GULATI-SAKHUJA, LL HLADKY, 2008. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. *Phytopathology* **98**, 1340-1345
- WISLER GC, RH LI, HY LIU, DS LOWRY, JE DUFFUS, 1998. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted phloem-limited, bipartite clostero-virus of tomato. *Phytopathology*, **88**, 402-409.

ALLEGATO I – strumentazione, materiali e reagenti

One step RT-PCR

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Alimentatore per apparati elettroforetici
3. Apparati elettroforetici orizzontali
4. Bagno termostato o termoblocco
5. Bilancia analitica
6. Cappa aspirante
7. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non indispensabile)
8. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
9. Congelatore
10. Distillatore
11. Frigorifero
12. Macchina produttrice di ghiaccio
13. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P2, P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
14. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
15. Misuratore di pH
16. Termociclatore
17. Transilluminatore
18. Vortex

Reagenti

1. 2- mercaptoetanolo o sodio metabisolfito
2. Acqua RNase free
3. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, TAE, bromuro d'etidio, Gel Red
4. Azoto liquido (non indispensabile)
5. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da TICV/ToCV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata
6. Controllo positivo, sicuramente infetto da TICV/ToCV
7. Etanolo
8. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat no. 74904 per 50 campioni)
9. Superscript III one-Step RT-PCR System con Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen cat. No 12574-018)
10. Loading buffer per elettroforesi
11. Marker di DNA (100bp)
12. Oligonucleotidi specifici per TICV e ToCV
13. Tampone fosfato 0,1 M pH 7,2

Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore (per macerazione con tampone fosfato)
2. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la RT-PCR

3. Guanti
4. Carta da bancone
5. Mortai e pestelli sterili (macerazione con azoto liquido)
6. Portaprovette
7. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette da 1.5 e 2 ml

Real time RT-qPCR

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non indispensabile)
4. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
5. Congelatore
6. Frigorifero
7. Macchina produttrice di ghiaccio
8. Micropipette dedicate all'estrazione e calibrate (P2, P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
9. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
10. Misuratore di pH
11. Omogeneizzatore
12. Termociclatore per real time
13. Vortex

Reagenti

1. Acqua sterile RNase free
2. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen cat. no. 74904 per 50 campioni)
3. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione da TICV/ToCV ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
4. Controllo positivo, sicuramente infetto da TICV/ToCV
5. TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystem Cod. N. 4309169)
6. RNase inhibitor (incluso nel kit ABI Master Mix)
7. Oligonucleotidi e sonda specifici per TICV o ToCV
8. Oligonucleotidi e sonda specifici per controllo endogeno per pianta

Materiali

1. Bustine di plastica per omogeneizzatore
2. Carta da bancone
3. Guanti
4. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti
5. Piastre da 96 pozzetti per real time o provette ottiche specifiche
6. Provette da 1,5 e 2 ml
7. Puntali sterili per micropipette con filtro

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER I VIRUS DELLA VITE COPERTI DA NORME FITOSANITARIE: GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3, GVA, GVB, ArMV, GFLV, GFkV

**F. Faggioli¹, F. Anaclerio², E. Angelini³, M. G. Antonelli¹, N. Bertazzon³,
G. Bianchi⁴, P. Bianchedi⁵, P. A. Bianco⁶, S. Botti⁷, P. Bragagna⁵, M.
Cardoni⁷, P. Casati⁶, R. Credi⁸, E. De Luca², G. Durante⁹, C. Gianinazzi⁹,
G. Gambino¹⁰, V. Gualandri⁵, D. Luison¹, A. Luvisi¹¹, U. Malossini⁵, F.
Mannini¹⁰, P. Saldarelli¹², F. Terlizzi⁸, E. Triolo¹¹, N. Trisciuzzi¹³,
M. Barba¹**

¹Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura – Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Via C.G. Bertero, 22, 00156 Rome. Italy;

²Vivai Cooperativi Rauscedo, Rauscedo, Italy;

³CRA – Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano Veneto, Italy;

⁴ERSA – Friuli Venezia Giulia; Pozzuolo del Friuli, Italy;

⁵Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario San Michele all'Adige, Italy;

⁶DISA - Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali - Produzione, Territorio, Agroenergia, Università degli Studi di Milano, Italy;

⁷Centro Attività Vivaistiche, Tebano, Italy;

⁸Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna,

⁹Italy; IPAD Lab, Lodi, Italy;

¹⁰CNR – Istituto di Virologia Vegetale, UOS di Grugliasco, Italy;

¹¹Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose “G. Scaramuzzi”, Università di Pisa., Italy;

¹²CNR – Istituto di Virologia Vegetale, UOS di Bari, Italy;

¹³CRSA – Basile Caramia, Locorotondo, Italy

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	569
1.1 GLRaV 1, 2 e 3	569
1.2 GVA	571
1.3 GVB	573
1.4 ArMV	575
1.5 GFLV	576
1.6 GFkV	579
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	580
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	581
3.1 Applicazione delle diverse metodologie diagnostiche	583
3.2 Metodo diagnostico ELISA	584
3.3 Metodo diagnostico di Multiplex RT-PCR	596
4. DATI DI VALIDAZIONE	604
4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche da campioni legnosi	604
4.2 Metodo diagnostico ELISA	606
4.3 Metodo diagnostico Multiplex RT-PCR	612
5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	613
Allegato I - strumenti, materiali e reagenti necessari	614

1. DESCRIZIONE DELLE MALATTIE E DEI RELATIVI AGENTI EZIOLOGICI

1.1 GLRaV 1, 2 e 3

Agenti causali	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> <i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>
Tassonomia	Famiglia: Closteroviridae Genere: Ampelovirus	Famiglia: Closteroviridae Genere: Closterovirus
Avversità	Complesso dell'accartocciamento fogliare (GLRaV 1 e GLRaV 3) e disaffinità d'innesto (GLRaV 2)	
Acronimi	GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3	

1.1.1 Ospite

E' forse la virosi della vite più diffusa al mondo. All'accartocciamento fogliare sono associati numerosi virus alcuni dei quali non chiaramente inquadrati tassonomicamente. Tra le cultivar di vite europea (*Vitis vinifera* L.) più sensibili all'accartocciamento fogliare ci sono: Pinot nero, Cabernet franc, Cabernet Sauvignon, Carmenère, Merlot, Barbera, Riesling, Cortese, Chardonnay. GLRaV 2 può essere trasmesso meccanicamente a diverse specie di *Nicotiana*, utilizzate per il mantenimento e la moltiplicazione del virus

1.1.2 Sintomatologia

I sintomi consistono nel ripiegamento verso il basso della lamina fogliare, che assume consistenza coriacea e colorazione gialla o rossa vinosa (Foto1 e 2) a seconda che colpisca varietà ad uve bianche o rosse.

I primi sintomi sono visibili in estate per poi intensificarsi col procedere della stagione fino a raggiungere la massima espressione in autunno. Sulla pianta, la progressione della sintomatologia è acropeta, iniziando a manifestarsi dalla parte basale dei tralci fino ad interessare le zone apicali.

Questa virosi causa il ritardo e la non uniformità nella maturazione dei grappoli, che risultano tra l'altro meno numerosi. Il risultato è uno scadimento qualitativo (basso tasso zuccherino, anomalo profilo aromatico e contenuto tannico) delle uve e del vino. GLRaV 2 è associato anche ad una forma di incompatibilità di innesto che si verifica quando viti infette vengono innestate su alcuni portainnesti, quali Kober 5BB, Teleki 5C, 1103 Paulsen (Foto 3 e 4).

Asintomatiche risultano invece le piante di alcuni portainnesti americani.



Fig. 1 - accartocciamento fogliare sulla cv Primitivo infetta da GLRaV 3



Fig. 2 - accartocciamento fogliare sulla cv Primitivo indotto da GLRaV 2



Fig. 3 - moria di giovani piante di un accessione della cv Red Globe infetta da GLRaV 2 ed innestata su portinnesto suscettibile



Fig. 4 - vitalità di piante della stessa accessione di Red Globe innestata sullo stesso portinnesto dopo risanamento

1.1.3 Morfologia

I vari GLRaV sono costituiti da particelle filamentose di lunghezza variabile da 1400 a 2200 nm.

1.1.4 Epidemiologia e trasmissione

La diffusione della virosi è causata prevalentemente dall'uomo, con l'impiego di materiale di propagazione infetto. La trasmissione naturale da vite a vite avviene invece ad opera di alcune specie di Pseudococcidi (generi *Planococcus* e *Pseudococcus*) ed una di Coccidi (*Pulvinaria vitis*) nella trasmissione di GLRaV 1 e 3.

1.1.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante

Saggio biologico: metodo dell'indexaggio su cv sensibili a bacca nera di *V. vinifera* L. (Pinot nero, Cabernet franc, Carmenère, Merlot)

Saggio sierologico: ELISA

Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.1.6 Normativa Fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

1.2 GVA

Agente causale	<i>Grapevine virus A</i>
Tassonomia	Famiglia: Betaflexiviridae Genere: Vitivirus
Avversità	Scanalatura del Kober del complesso del legno riccio "Kober stem grooving"
Acronimo	GVA

1.2.1 Ospiti

Oltre che vite, che ne è l'ospite naturale, GVA può infettare artificialmente anche altri ospiti non naturali, quali *Nicotiana benthamiana* e *N. clevelandii*, utilizzati a scopi sperimentali per il mantenimento del virus.

1.2.2 Sintomatologia



Foto 1 - sintomi classici di legno riccio sul fusto

FUSTO

La sintomatologia di questa virosi è abbastanza complessa. I sintomi si manifestano sul fusto nel piede formato dai portainnesti ibridi americani (es. Kober 5BB); la corteccia si presenta ingrossata e rugosa. Nel legno sottostante si osservano butterature ed infossature longitudinali (Foto 1).



Foto 2: acinellatura dolce su cv Victoria affetta da legno riccio

GRAPPOLO

In alcuni casi, viti affette da legno riccio causato da GVA presentano forti acinellature dei grappoli che compromettono la resa quali/quantitativa della produzione (Foto 2).

1.2.3 Morfologia

Il virus è costituito da particelle filamentose della lunghezza di circa 800 nm, con un genoma di ~7.4 kb.

Foto di C. Pirolo, DPPMA-Bari

1.2.4 Epidemiologia e trasmissione

GVA è un virus trasmesso da alcune specie di cocciniglie appartenenti ai generi *Planococcus*, *Pseudococcus*, *Heliococcus* e *Neopulvinaria*.

1.2.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante:

Saggio biologico: metodo dell'indexaggio su portainnesto *V. Berlandieri* x *V. riparia* Kober 5BB

Saggio sierologico: ELISA

Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.2.6 Normativa Fitosanitaria

- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 dicembre 2011 - Linee guida per l'esenzione di analisi fitosanitarie su campi di piante madri

1.3 GVB

Agente causale	<i>Grapevine virus B</i>
Tassonomia	Famiglia: Betaflexiviridae Genere: Vitivirus
Avversità	Suberosi corticale del complesso del legno riccio; “Corky bark” (CB)
Acronimo	GVB

1.3.1 Ospite

Gli ospiti naturali appartengono alle diverse specie di *Vitis*. GVB può essere trasmesso meccanicamente alla solanacea *Nicotiana occidentalis*, utilizzata per il mantenimento e la moltiplicazione del virus.

1.3.2 Sintomatologia

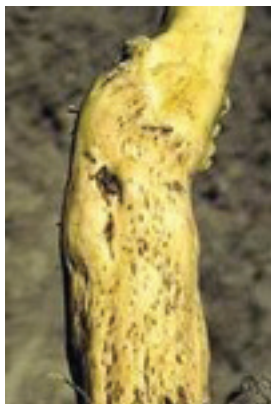


Foto 1: butterature del legno



Foto 2 - suberosi corticale su giovane pianta di LN33

GVB causa fessurazioni e/o suberificazioni corticali sui tralci di più anni (Foto 1) e/o sul fusto di indicatori di vite sensibili quali l'ibrido LN33 (Foto 2).

Le piante presentano un ritardo vegetativo e un deperimento più o meno evidente.

1.3.3 Morfologia

GVB è costituito da particelle filamentose della lunghezza di circa 800 nm.

1.3.4 Epidemiologia e trasmissione

GVB è trasmesso in modo semi-persistente da cocciniglie dei generi *Pseudococcus* e *Planococcus*.

1.3.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante:

Saggio biologico (facoltativo): metodo dell'indexaggio su ibrido "LN33"

Saggio sierologico: ELISA

Saggio molecolare: RT-PCR

1.3.6 Normativa fitosanitaria

- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite

1.4 ArMV

Agente causale	<i>Arabid Mosaic Virus</i>
Tassonomia	Famiglia: <i>Secoviridae</i> Sottofamiglia: <i>Comovirinae</i> Genere: <i>Nepovirus</i>
Avversità	Mosaico dell'arabis Degenerazione infettiva della vite
Acronimo	ArMV

1.4.1 Ospiti

Il virus prende il nome dalla specie *Arabid hirsuta*, da cui fu isolato per la prima volta nel 1944. ArMV ha un largo spettro di ospiti appartenenti a circa 30 famiglie botaniche. Gli ospiti principali sono fragola, luppolo, lampone, *Rheum* spp., *Sambucus nigra* e *Vitis* spp.

1.4.2 Sintomatologia

La sintomatologia più comune nei vari ospiti varia dal nanismo e deperimento delle piante alla comparsa di maculature e necrosi fogliari.

Su vite i sintomi sono quelli della degenerazione infettiva e mosaico giallo descritti per il GFLV (vedi scheda).

1.4.3 Morfologia

Le particelle virali, con un genoma bipartito, sono isometriche con un diametro di circa 30 nm. La virulenza di ArMV varia a seconda dell'ospite da cui è isolato.

1.4.4 Epidemiologia e trasmissione

Il virus è trasmesso dal nematode *Xiphinema diversicaudatum* anche se non si esclude il coinvolgimento di altri nematodi appartenenti alla famiglia *Longidoridae*. La trasmissione per contatto sembra essere un evento abbastanza raro.

Per alcune specie è stata accertata la trasmissione per seme, anche se questa evidenza assume scarsa importanza per le piante propagate per via vegetativa.

In vite il virus, la cui diffusione è dovuta soprattutto all'impiego di materiale di propagazione infetto, è spesso rinvenuto in infezioni miste insieme a GFLV.

1.4.5 Diagnosi

Dato l'elevato numero di specie ospiti, il saggio biologico (facoltativo) può essere effettuato utilizzando diverse piante indicatrici erbacee: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum* cv. White Burley, *Phaseolus vulgaris* cv. The Prince e *Petunia hybrida*. Quest'ultima specie è particolarmente indicata anche per la conservazione e la purificazione degli isolati. Il periodo migliore per prelevare campioni per i saggi biologici (foglie) è la primavera. Oppure si può effettuare con saggi biologici legnosi usando *V. rupestris* du Lot o *V. rupestris* St. George, come per il GFLV.

La migliore matrice per i saggi di laboratorio è il legno raccolto durante il riposo vegetativo.

Saggio sierologico: ELISA

Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.4.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

1.5 GFLV

Agente causale	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
Tassonomia	Famiglia: <i>Secoviridae</i> Sottofamiglia: <i>Comovirinae</i> Genere: <i>Nepovirus</i>
Avversità	Arricciamento o degenerazione infettiva della vite
Acronimo	GFLV

1.5.1 Opsite

GFLV è uno dei primi virus identificati su vite. L'ospite naturale è *Vitis* spp., ma il virus può infettare, in seguito ad inoculazione artificiale, anche altre specie (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*).

1.5.2 Sintomatologia

La sintomatologia dipende dai ceppi virali, dal vitigno e dalle condizioni ambientali.



Foto 1 - foglie prezzemolate e asimmetriche di un'accezione della cv Italia infetta da ceppo malformante di GFLV



Foto 2- foglie decolorate di un'accezione della cv Italia infetta da ceppo cromogeno di GFLV



Foto 3- fasciazione del rachide ed aborto florale su grappolo della cv Italia

Foto di C.Pirola, DPPMA-Bari

GFLV causa: 1) malformazioni nello sviluppo di foglie e germogli (degenerazione) e 2) “mosaico giallo” o “giallume infettivo” delle foglie. Le viti malate si individuano facilmente in campo nella stagione primaverile; successivamente, sulle foglie emesse nella stagione estiva, i sintomi si attenuano. Le piante infette danno produzione quantitativa (perdite anche del 50%) e qualitativa scadente.

FOGLIE

Le foglie assumono una forma a ventaglio con dentellatura acuta ed asimmetria del lembo (Foto 1). Le lamine fogliari (e nervature) possono presentare aree con decolorazioni giallo-cromo (mosaico giallo). La superficie appare arricciata, rugosa (Foto 2).

TRALCI

I tralci presentano un accentuato accorciamento degli internodi, fasciazione che può interessare anche il grappolo (Foto 3) e biforcazione degli apici, emissione anormale di femminelle.

GRAPPOLO

Sul grappolo si osserva l'irregolare sviluppo e maturazione delle bacche (acinellatura) che si riflette in perdite quantitative e in una riduzione del tenore zuccherino (Foto 4).



Foto 4- danni alla produzione con acinellatura verde

1.5.3 Morfologia

GFLV è un virus poliedrico con un diametro di 28 nm sierologicamente abbastanza uniforme. Nelle preparazioni purificate è possibile distinguere tre componenti denominate T (Top), M (Middle) che contiene RNA2 e B (Bottom) che contiene sia RNA2 che RNA1. Il capside di GFLV si compone di 60 subunità.

1.5.4 Epidemiologia e trasmissione

Il virus viene trasmesso in condizioni naturali dal nematode *Xiphinema index*. Il gene CP è determinante per la specificità di trasmissione da parte di questo nematode. Sospetti coinvolgimenti di altre specie appartenenti al genere *Xiphinema* non hanno mai trovato conferma sperimentale.

Nella lunga distanza, la diffusione della virosi è stata favorita dal trasporto e commercializzazione di materiale di propagazione infetto.

1.5.5 Diagnosi

Il momento migliore per effettuare la diagnosi in pieno campo è il periodo primaverile quando risulta facilitato il riconoscimento dei sintomi. Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante Saggio biologico (facoltativo): metodo dell'indexaggio su *V. rupestris* du Lot, *V. rupestris* St.George

Saggio sierologico: ELISA (DAS-ELISA).

Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.5.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite.
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

1.6 GFkV

Agente causale	<i>Grapevine fleck virus</i>
Tassonomia	Famiglia: <i>Tymoviridae</i> Genere: <i>Maculavirus</i>
Avversità	Maculatura infettiva della vite
Acronimo	GFkV

1.6.1 ospite

Il virus ha come ospiti diverse specie appartenenti al genere *Vitis*, in cui resta solitamente latente, ad eccezione di *V. rupestris* su cui causa la maculatura infettiva, una virosi descritta per la prima volta in California

1.6.2 Sintomatologia



I sintomi causati da GFkV sono evidenti su alcuni portainnesti americani di *Vitis rupestris* (cv. St. George). Sulla maggior parte degli altri portinnesti e su tutte le cultivar di vite europea (*Vitis vinifera*) rimangono invece latenti.

FOGLIE

Nelle foglie giovani si osservano schiarimenti delle nervature di terzo e quarto ordine con spot visibili in controluce. I ceppi più virulenti possono causare anche malformazioni e

distorsioni della lamina fogliare. La primavera è il periodo migliore per effettuare monitoraggi in campo, successivamente la sintomatologia si attenua.

foto: ucce.ucdavis.edu/files/datastore

1.6.3 Morfologia

Il virus è costituito da particelle isometriche di ca. 30 nm di diametro. E' un virus a singola elica di RNA.

1.6.4 Epidemiologia e trasmissione

GFkV è trasmissibile solo per innesto. Al momento non sono noti vettori del virus.

1.6.5 Diagnosi

Il legno prelevato durante il periodo di riposo vegetativo viene utilizzato per successive analisi condotte mediante:

Saggio biologico (facoltativo): metodo dell'indexaggio su piante indicatrici (*Vitis rupestris* cv. St. George e *Vitis rupestris* cv du Lot).

Saggio sierologico: ELISA

Saggio molecolare: RT-PCR, real Time RT-PCR

1.6.6 Normativa fitosanitaria

- Direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio.
- D.M. 8 febbraio 2005 - Norme di commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 7 luglio 2006 - Recepimento della direttiva n. 2005/43/CE della Commissione del 23 giugno 2005, che modifica gli allegati della direttiva n. 68/193/CEE del Consiglio, relativa alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione vegetativa della vite.
- D.M. 24 giugno 2008 - Modifica del protocollo tecnico di selezione clonale della vite
- D.M. 13 Dicembre 2011 - Linee guida per l'esecuzione di analisi fitosanitarie sui campi di piante madri

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Per la diagnosi degli 8 virus della vite la matrice da utilizzare in tutti i protocolli è il tessuto floematico ottenuto da materiale legnoso raccolto nel periodo invernale.

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:

Periodo: Tutto il periodo di riposo vegetativo.

Matrice: La matrice migliore è costituita da tralci lignificati dell'anno.

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.

Tutti i campioni vegetali che manifestano imbrunimenti o inizio di muffa o seccumi non devono essere processati.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione degli 8 virus della vite coperti da norme fitosanitarie (Direttiva n. 2005/43/CE; D.M. 8 febbraio 2005; D.M. 7 luglio 2006; Decreto 24 giugno 2008, D.M. 13/12/2011): *Grapevine leafroll associated virus 1, 2 e 3* (GLRaV-1, -2 e -3), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Grapevine virus A e B* (GVA e GVB), *Grapevine fleck virus* (GFkV). La diagnosi è stata effettuata 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.

Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base della loro sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98)..

Per la definizione di tali parametri 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 secondo i parametri ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98 è scaturita dal lavoro congiunto di un **Gruppo di lavoro di esperti** costituito da:

- Francesco Faggioli CRA-PAV, Coordinatore del gruppo del lavoro
- Francesco Anaclerio, Vivai Cooperativi Rauscedo
- Elisa Angelini, CRA-VIT
- Pier Luigi Bianchedi, IASMA - Fondazione Edmund Mach

- Gianluca Bianchi, ERSa-Friuli Venezia Giulia
- Piero Attilio Bianco, Università di Milano
- Michele Borgo, CRA-VIT
- Simona Botti, CAV –Tebano
- Paola Bragagna, IASMA - Fondazione Edmund Mach
- Marco Cardoni, CAV -Tebano
- Paola Casati, Università di Milano
- Rino Credi, Università di Bologna
- Giorgio Gambino, CNR – IVV Grugliasco
- Valeria Gualandri, IASMA - Fondazione Edmund Mach
- Andrea Luvisi, Università di Pisa
- Umberto Malossini, IASMA - Fondazione Edmund Mach
- Franco Mannini, CNR – IVV Grugliasco
- Gian Luca Mordenti, C.I.V.V. Ampelos
- Pasquale Saldarelli, CNR – IVV Bari
- Federica Terlizzi, Università di Bologna
- Enrico Triolo, Università di Pisa
- Nicola Trisciuzzi – CRSA “B. Caramia”

La definizione del parametro di riproducibilità per i saggi ELISA 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
- CNR – IVV Bari
- CRA-PAV
- CRA-VIT
- CRSA “B. Caramia”
- CSAF LAIMBURG
- ERSa – Friuli Venezia Giulia
- IASMA
- IPAD LAB Lodi
- SFR Emilia Romagna
- SFR Lombardia
- SFR Valle d'Aosta
- Università di Bologna
- Università di Milano
- Università di Pisa
- Vivai Cooperativi Rauscedo

Per il saggio molecolare il ring test è stato effettuato dai seguenti laboratori:

- CAV
- CNR – IVV Bari
- CNR – IVV Grugliasco
- CRA-PAV
- CRA-VIT
- ERSa - FVG
- IASMA

- IPAD LAB Lodi
- Università di Bologna
- Università di Milano

Le metodologie scelte per la validazione dei protocolli diagnostici sono le seguenti:

Metodo diagnostico	Componente virale riconosciuta
Sierologico: ELISA diretta o indiretta	proteina capsidica
Molecolare: multiplex RT-PCR	acido nucleico virale (RNA)

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
Saggio diagnostico ELISA	Tempi di esecuzione: 36 ore per l'analisi di circa 80 campioni contro 8 virus. Aspetti positivi: economicità, elevata affidabilità e specificità, semplicità di esecuzione, disponibilità di antisieri di differenti ditte Aspetti negativi: minore sensibilità per alcuni virus (in particolare GVA, GVB, GLRaV-2) Consigliato per analisi massali e previsto per legge nello screening iniziale del protocollo di selezione clonale
Saggio molecolare multiplex RT-PCR	Tempi di esecuzione: 10 ore per l'analisi di circa 20 campioni contro 8 virus. Aspetti positivi: elevata affidabilità, specificità e sensibilità; possibilità di diagnosi multipla con un unico saggio Aspetti negativi: tecnica laboriosa e legata all'utilizzo di specifici reagenti; minore sensibilità per alcuni virus con genoma variabile (in particolare ArMV e GLRaV-2) Consigliato per analisi su piccoli numeri, specialmente per materiale di esportazione e per i campioni risultati sani all'analisi ELISA nel protocollo di selezione clonale (dove è previsto per legge)

3.2 Metodo diagnostico ELISA

Consiste in una reazione specifica antigene (virus)-anticorpo che avviene su un supporto solido, i pozzetti di una piastra ELISA, e che viene visualizzata mediante una reazione colorimetrica. Verranno descritte differenti varianti del saggio in funzione del numero e dell'ordine in cui i reagenti verranno utilizzati.

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

Vengono utilizzati kit sierologici commerciali e l'efficienza del saggio riportata dalla Ditta produttrice è correlata ai test di qualità effettuati nelle condizioni di lavoro espressamente riportate nel relativo foglietto di istruzioni.

Seguire, quindi, attentamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice. In particolare effettuare scrupolosamente tutte le diluizioni dei reagenti riportate.

Utilizzare la diluizione del campione consigliata. Non modificare il tampone di estrazione.

Si riportano le procedure del saggio valido per tutte le varianti.

3.2.1 Preparazione dei tamponi

Il tampone carbonato per la sensibilizzazione delle piastre, il tampone coniugato ed il tampone PBS (che può essere preparato alla concentrazione 10X da utilizzare come stock di partenza) possono essere preparati precedentemente e mantenuti in laboratorio, a temperatura ambiente. Controllare accuratamente il pH del tampone carbonato perché è determinante per l'adesione degli anticorpi alla plastica dei pozzetti.

Il tampone per il substrato può essere preparato prima e mantenuto a 4 °C al riparo dalla luce.

Il tampone di estrazione deve essere sempre preparato poco prima dell'utilizzo e mantenuto a 4°C o in ghiaccio.

E' importante utilizzare i tamponi entro 30 gg. dalla preparazione. E' possibile arrivare fino a 6 mesi se i tamponi vengono aggiunti di sodio azide (0,2g/L).

3.2.2 Preparazione del saggio ELISA

Stabilire il numero di piastre ELISA necessario e preparare un opportuno schema cartaceo per piastra, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni piastra è possibile caricare 41 campioni più un controllo sano, uno infetto ed un bianco. Come controllo positivo e negativo possono essere utilizzati quelli forniti dai kit commerciali oppure possono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una vite sicuramente infetta dal virus oggetto di studio e da una vite sicuramente esente da virus, rispettivamente. In questo caso i controlli devono essere macerati congiuntamente ai campioni da saggiare. Il controllo bianco è costituito da tampone di estrazione da caricare al posto del campione vegetale.

Ciascun campione deve essere replicato su due pozzetti, compresi il controllo sano, quello infetto ed il tampone.

Otto pozzetti di bordo saranno riempiti con tampone, i valori però non saranno considerati nel calcolo del rumore di fondo (vedi il capitolo 'Valutazione dei risultati'). Pulire accuratamente e disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta, da sostituire ad ogni fase.

3.2.3 Estrazione del virus dal campione da analizzare

La matrice utilizzata per il saggio di tutti i virus è il tessuto floematico, ottenuta seguendo le fasi di seguito elencate:

Fase 1 Rimozione dello strato corticale esterno (ritidoma) fino a mettere a nudo il tessuto floematico.

Fase 2 Prelievo del floema mediante raschiamento con bisturi o coltellino.

Fase 3 Il tessuto floematico ottenuto DEVE essere posto in MORTAIO e polverizzato con azoto liquido e successivamente aggiunto del tampone di estrazione o, in alternativa, direttamente macerato con pestello in presenza di tampone di estrazione nel rapporto peso/volume 1/10.

Fase 4 Lasciare macerare il floema ottenuto dalla fase 3 a contatto con il tampone di estrazione per 2-3 ore a freddo (4 °C o in ghiaccio).

In alternativa è possibile l'utilizzo di una fresa per macinare/polverizzare il campione

Fase 1 Il campione può essere trattato in due modi: con rimozione dello strato corticale esterno (ritidoma) oppure trattato integralmente. In questo caso l'unica accortezza è di aumentare la quantità di campione a contatto con il tampone di estrazione.

Fase 2 Prelievo del floema, congiuntamente agli altri tessuti del tralcio legnoso, mediante macinazione/polverizzazione tramite una fresa (tipo GRANEX o artigianale), con raccolta del materiale campionato in contenitori di plastica.

Fase 3 Aggiungere il tampone di estrazione ai tessuti campionati in rapporto 1/10; macerare direttamente a freddo (4 °C o in ghiaccio) per 2-3 ore oppure (opzionale) omogeneizzare meccanicamente prima di lasciare a freddo (4 °C o in ghiaccio) per 2-3 ore.

E' necessario siglare sempre ogni singolo campione.

- Durante le operazioni di preparazione mantenere i mortai in ghiaccio o in cella fredda a 4 °C.
- Mantenere i campioni via via macerati in ghiaccio o a 4 °C.

3.2.4 Valutazione dei risultati

Seguire l'evoluzione della reazione colorimetrica con attenzione nelle prime fasi, prendendo come riferimento il controllo positivo.

I risultati sono attendibili fino a che i controlli negativi non superano l'assorbanza di 0,2 OD.

Quantificare la colorazione tramite lettura in un apposito fotometro a 405nm. Fare almeno 3 letture a partire dall'inizio della colorazione del controllo positivo (o del

primo campione risultato infetto) e proseguire fino a che il controllo negativo non supera l'assorbanza di 0,2 OD.

Lo sviluppo del colore può essere bloccato aggiungendo 50 µl/pozzetto di sodio idrossido 3M.

Background o rumore di fondo (A) = media dei controlli negativi (eccetto gli 8 pozzetti della prima colonna).

Threshold o limite soglia (B). $B = A \times 2,5$ se questo valore risulta superiore o uguale a 0,1 OD, in caso contrario il valore soglia sarà pari a 0,1 OD.

Campione positivo: $\geq B$

Campione negativo: $< B$

3.2.5 Procedura del saggio di ELISA diretta o DAS-ELISA (utilizzata per i virus ArMV, GFLV, GLRaV 1, 2 e 3 di AgriTest, tutti gli antisieri di Bioreba e ArMV, GFLV, GLRaV 1, 3 e ArMV+GFLV di Sediag)

Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici.

Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta del kit in tampone carbonato 1X.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del Kit specifico (generalmente 100 o 200 µl).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone carbonato.

Estrazione del virus dai campioni

Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

Lavaggio della piastra

Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni

Caricare i campioni (100 o 200 µl per pozzetto, secondo quanto riportato dalla Ditta produttrice del kit) seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione). Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.

Riempire con tampone anche i pozzetti di bordo.

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Quando si preleva la soluzione macerata fare attenzione a non versare nei pozzetti residui vegetali solidi.

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

- Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.

Distribuzione anticorpo specifico coniugato

Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare 100 o 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato.

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.

Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

- Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.

Caricamento del substrato

Caricare 100 o 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.6 Procedura del saggio di ELISA indiretta o DASI-ELISA (utilizzata per i virus GVA e GFkV di Agritest e GVA, GLRaV 2 e GFkV di Sediag)

Sensibilizzazione della piastra ELISA con gli anticorpi specifici

Diluire gli anticorpi, secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (generalmente 100 o 200 µl).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone carbonato

Estrazione del virus dai campioni

Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio

3- Lavaggio della piastra

Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni

Caricare i campioni (100 o 200 µl per pozzetto secondo quanto previsto dalla Ditta produttrice) seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

- Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.

Distribuzione del secondo anticorpo specifico

Diluire il secondo anticorpo alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare 100 o 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato

Lavaggio della piastra

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dell'anticorpo coniugato

Diluire il coniugato alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare 100 o 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato.

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.

Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Mantenere il substrato al buio prima dell'uso..

Lavaggio della piastra

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

- Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.

Caricamento del substrato

Caricare 100 o 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.7 Procedura ELISA con pre - sensibilizzazione con proteina A per il virus GVA di Agritest

Pre - sensibilizzazione con Proteina A

Diluire la Proteina A, secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Distribuire la soluzione di Proteina A per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (200 µl).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Per la migliore ripetibilità del saggio è consigliabile lo stoccaggio della Proteina A suddivisa in aliquote minime (es. per una piastra) o in alternativa utilizzare in un'unica soluzione tutto il contenuto della proteina A e sensibilizzare le piastre relative che potranno essere conservate a -20°C. E' questo un passaggio fondamentale dal momento che la Proteina A va incontro ad un degradamento se congelata e scongelata più volte
- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone carbonato

Lavaggio della piastra

Dopo l'incubazione della piastra iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Sensibilizzazione della piastra ELISA con anticorpi specifici.

Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X. Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (200 µl).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

Estrazione del virus dai campioni

Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

Lavaggio della piastra

Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione dei campioni

Caricare 200 µl di ogni campione per pozzetto seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- *Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.*

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato. Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

- Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.

Distribuzione degli anticorpi specifici coniugati

Diluire il secondo anticorpo alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.

Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Caricamento del substrato

Caricare 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

3.2.7 Procedura ELISA con sensibilizzazione diretta dell'antigene per il virus GVB di Agritest

Estrazione del virus dai campioni

Seguire quanto sopra indicato nelle procedure del saggio.

Sensibilizzazione della piastra ELISA direttamente con i campioni – Distribuzione dei campioni.

Caricare 200 µl di ogni campione per pozzetto seguendo lo schema (eliminare gli 8 pozzetti esterni), replicando ciascun campione in due pozzetti. Includere un controllo

positivo, un controllo negativo (pianta sana) e un controllo bianco (caricare il tampone di estrazione al posto del campione).

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone di estrazione.

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra con PBS-T fino a completa rimozione di ogni residuo di tessuto vegetale.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

- Questa fase di lavaggio è molto critica e va fatta con attenzione.

Sensibilizzazione della piastra ELISA con anticorpi specifici.

Diluire gli anticorpi secondo quanto riportato sull'etichetta in tampone carbonato 1X. Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Distribuire la soluzione di anticorpi per ciascun pozzetto nella quantità indicata dalla Ditta produttrice del kit specifico (200 µl)

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

Lavaggio della piastra

Dopo l'incubazione della piastra con gli anticorpi, iniziare il lavaggio.

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato.

Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Distribuzione degli anticorpi specifici coniugati

Diluire il secondo anticorpo alla diluizione e nel tampone riportato dalla Ditta produttrice.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Caricare 200 µl della soluzione ottenuta per ciascun pozzetto.

Coprire la piastra con pellicola trasparente o con l'apposito coperchio.

Incubare in camera umida alla temperatura e per il tempo richiesti dalla Ditta produttrice.

- Se ci sono pozzetti inutilizzati non lasciarli asciutti, ma riempirli col tampone coniugato

Preparazione del substrato

Preparare il substrato 5 minuti prima dell'uso.

Aggiungere al Tampone substrato 5 minuti prima dell'uso il 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate alla concentrazione di 1 mg/1ml. Si consiglia di utilizzarlo nella formulazione commerciale in tavolette.

Mescolare bene la soluzione ottenuta.

Mantenere il substrato al buio prima dell'uso.

Lavaggio della piastra

Fare il numero di lavaggi con PBS-T riportato sulle istruzioni per il tempo indicato. Asciugare la piastra battendola su carta da laboratorio, fino ad eliminare bolle o residui di tampone.

Caricamento del substrato

Caricare 200 µl della soluzione di substrato per ciascun pozzetto. Coprire la piastra con un foglio di alluminio ed incubarla a temperatura ambiente fino alla comparsa della colorazione.

Punti critici dell'ELISA

- a. Essendo l'ELISA una reazione antigene-anticorpo che avviene su un supporto solido la scelta della piastra è molto importante perché influisce sul legame degli anticorpi e sull'eventuale background della reazione. Esistono diversi tipi di piastre ELISA in commercio: a fondo piatto o a fondo conico, ad alta, media e bassa capacità di legame con gli anticorpi, dovuta a pre-trattamenti del materiale plastico. Si consiglia di cambiare il tipo di piastra o il lotto utilizzato nel caso si osservino fenomeni ripetuti di background (giallo diffuso sui controlli negativi) o reazioni molto deboli. Accertarsi, comunque, che la piastra sia specifica per il saggio ELISA (esistono in commercio molti tipi di piastre a 96 pozzetti dedicate ad altri scopi).
- b. Nello schema del test riportare anche il numero di lotto del kit sierologico (può essere determinante per la uniformità di alcuni risultati).
- c. Utilizzare il kit sierologico entro la data di scadenza.
- d. Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti.
- e. Controllare con accuratezza il pH dei tamponi utilizzati, perché è determinante per la loro efficienza.
- f. Controllare almeno una volta al mese la taratura delle micro pipette utilizzate.
- g. L'efficienza del test ELISA è strettamente dipendente da una buona macerazione del campione vegetale, effettuare con molta cura le operazioni di preparazione del campione.
- h. La reazione di legame antigene-anticorpo che avviene all'interno dei pozzetti della piastra ELISA è efficiente e specifica solo se ad ogni passaggio vengono eliminati i reagenti che non si sono legati. Le fasi di lavaggio sono, quindi, molto importanti per la buona riuscita del test. Il lavaggio manuale mediante uso di una bottiglia a spruzzo è il più efficiente. Se si utilizzano macchinari per il lavaggio automatico delle piastre ELISA è NECESSARIO controllare ogni settimana la perfetta pulizia ed efficienza di ogni canale di lavaggio. In particolare, dopo il caricamento dei campioni fare molta attenzione ad eliminare qualunque residuo di materiale vegetale (le piastre devono risultare assolutamente trasparenti).
- i. Controllare sempre le etichette dei reagenti del kit ed i fogli di istruzione della Ditta produttrice prima di effettuare le opportune diluizioni (possono variare in funzione del lotto utilizzato).
- j. Le soluzioni di anticorpo o coniugato devono essere effettuate secondo le istruzioni, in contenitori di vetro o di polietilene (o opportuna plastica a bassa

- capacità di legame delle proteine) poco prima dell'uso.
- k. Tenere le piastre ELISA sempre coperte con pellicola trasparente o l'apposito coperchio durante le incubazioni.
 - l. Controllare sempre la pulizia e le condizioni asettiche dei contenitori in cui vengono preparati e mantenuti i tamponi.
 - m. Utilizzare guanti per la manipolazione delle piastre ELISA o fare molta attenzione a non toccare il fondo delle piastre.
 - n. I pozzetti delle righe e colonne esterne della piastra possono essere soggetti al cosiddetto "effetto bordo", dovuto al contatto con l'aria, che si evidenzia con la colorazione gialla dei pozzetti indipendentemente dall'avvenuta reazione antigene-anticorpo. Caricare i campioni sempre su doppio pozzetto in modo da evitare che entrambi risultino collocati solo su tali righe e colonne. Se l'effetto bordo si ripete costantemente, usare per il saggio solo i pozzetti centrali ed eliminare i pozzetti di bordo, riempiendoli con tampone.

Tamponi necessari per l'effettuazione del test ELISA

Tampone carbonato (sensibilizzazione delle piastre)		
Na_2CO_3	1,59	g
NaHCO_3	2,93	g
NaN_3	0,20	g
H_2O distillata fino ad 1 litro		
pH 9,6		

Tampone di lavaggio PBS - T	
NaCl	8,00 g
KH_2PO_4	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KCl	0,20 g
Tween 20 *	0,50 ml
H_2O distillata fino ad 1 litro di soluzione	
pH 7,4	

*Si consiglia di preparare una soluzione di Tween 20 al 10% e di aggiungere 5 ml.

Tampone coniugato 1

In PBS pH 7,4

PVP MW 24000	20,00	g
BSA (bovine serum albumin)	2,00	g
Tween 20	0,50	ml

Tampone coniugato 2

TRIS	2,40	g
NaCl	8,00	g
PVP K25 (MW 24000)	20,00	g
Tween 20	0,50	ml
BSA (bovine serum albumin)	2,00	g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,20	g
KCl	0,20	g
NaN ₃	0,20	g
H ₂ O distillata fino ad 1 litro di soluzione		
pH 7,4 (con aggiunta di HCl)		

Tampone di estrazione

TRIS - HCl	37,2	g
TRIS – base	32,00	g
NaCl	8,00	g
PEG (MW 6000)	10,00	g
PVP MW 24000	20,00	g
NaN ₃	0,20	g
Tween 20	0,50	ml
H ₂ O distillata fino ad 1 litro di soluzione		
pH 8,2		

Tampone substrato	
dietanolamina	97 ml
H ₂ O distillata fino ad 800 ml di soluzione	
Portare il pH a 9,8 mediante aggiunta di HCl	
Portare ad 1 litro con acqua distillata	
Aggiungere 0,20 g di NaN ₃	

La miscela deve essere agitata per 3-4 ore prima dell'uso

3.3 Metodo diagnostico di Multiplex RT-PCR

Preparazione del saggio Multiplex RT-PCR (Gambino and Gribaudo, 2006)

Preparare un elenco dettagliato dei campioni da saggiare e siglarli in modo da riportare la sigla sulle provette da PCR.

Preparare un opportuno schema cartaceo, in cui vengono riportati tutti i dati dell'esperimento.

Per ogni evento di estrazione ed amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, controllo negativo per ogni specie saggiata e un controllo acqua. Si consiglia di non superare il numero di 30 campioni per evento di estrazione/amplificazione (compresi i controlli).

Come controllo positivo e negativo devono essere utilizzati campioni di materiale vegetale, appartenenti alla stessa matrice e alla stessa specie dei campioni saggiati, provenienti da una pianta sicuramente infetta dai virus e da una pianta sicuramente esente dai virus, rispettivamente.

Il controllo acqua è costituito da acqua caricata al posto del RNA totale del campione da saggiare.

Disinfettare il piano di lavoro e coprirlo con fogli di carta da banco. Usare solo provette e puntali con filtro sterili da usare SEMPRE indossando guanti monouso.

Estrazione con kit commerciale Qiagen + Tampone MacKenzie (MacKenzie *et al.*, 1997)

Seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

Rimuovere lo strato corticale esterno (ritidoma) dai tralci legnosi fino a mettere a nudo il tessuto floematico. 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.

Inserire sempre l'estrazione di un controllo sicuramente infetto dal virus e un controllo sicuramente esente dall'infezione virale, appartenente alla stessa specie vegetale ed alla stessa matrice saggiata.

- Pesare 0,25 g di tessuto floematico
- Polverizzare il tessuto in azoto liquido in mortaio e pestello autoclavati.
- Aggiungere 1,7 ml di tampone MacKenzie e 17 µl di β-mercaptoetanolo e mescolare.

- Collocare il tutto in un eppendorf e centrifugare a 12000 rpm per 6 min.
- Trasferire 1 ml di surnatante in eppendorf da 1,5 ml aiutandosi con un puntale cui è stata tolta la punta.
- Aggiungere 100 µl di Sarkosyl 20% ad ogni provetta.
- Incubare a 70 °C per 10 minuti agitando periodicamente i tubi.
- Versare il contenuto caldo nelle prime colonnine del kit.
- Centrifugare a 12.000 rpm per 2'.
- Prelevare il percolato senza toccare il pellet, trasferirlo in una nuova provetta eppendorf e aggiungere 500 µl di Et-OH assoluto freddo e mescolare delicatamente con la pipetta.
- Versare 700 µl della soluzione nelle seconde colonnine del kit.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato e ripetere per la restante soluzione.
- Aggiungere 700 µl di tampone RW1 a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Aggiungere 500 µl di tampone RPE (già addizionato di Et-OH) a ciascuna colonnina rosa.
- Centrifugare a 10000 rpm per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
- Ripetere il passaggio centrifugando a 10000 rpm per 2 minuti. Eliminare l'eluato.
- Centrifugare a vuoto a 12.000 rpm per 1 minuto
- Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 50 µl di acqua RNase free. Ripetere il passaggio 2 volte
- Centrifugare a 10000 rpm per 1'.
- Eliminare la colonnina e mettere 15-20' a -80 °C prima di usare.

Per 1 l di tampone.

Tampone MacKenzie pH 5		
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

Trattamento con Dnasi

E' una fase importante per il controllo interno della vite per eliminare tracce di DNA. Seguire i seguenti passaggi:

1. Diluire 1 µg di RNA in 8 µl di H₂O DEPC
2. aggiungere 1 µl di 10X tampone di reazione
3. aggiungere 1 µl di enzima Dnasi
4. lasciare a temperatura ambiente per 15'
5. aggiungere 1 µl di stop solution (EDTA 50mM)
6. incubare a 65°C per 10'
7. trasferire in ghiaccio e proseguire o congelare a -80 °C

Trascrittasi inversa (sintesi cDNA)

Utilizzare RNA trattato con Dnasi

1. aggiungere 1 µl di dNTP (10 mM)
2. aggiungere 1 µl di random nonamers (50 µM)
3. incubare a 65 °C per 5 minuti e trasferire i campioni in ghiaccio
4. aggiungere 4 µl di 5X First. Strand buffer
5. aggiungere 2 µl di 0.1 M DTT
6. aggiungere 1 µl di RNase-Inibhitor
7. aggiungere 1 µl di M-MLV – reverse transcriptase
8. incubare a 25 °C per 10 minuti, 37 °C per 1 ora e 70 °C per 15 minuti su termociclatore
9. trasferire i campioni in ghiaccio e proseguire o congelare a -20 °C

Multiplex RT-PCR

Primer

Per la diagnosi dei virus della vite mediante il protocollo Multiplex RT-PCR vanno utilizzati i primer riportati nella sottostante tabella:

Nome	Sequenza 5'-3'	Gene	bp amplificato
18S-M1	CGCATCATTCAAATTTCTGC	controllo interno RNA vite	844 bp
18S-M2	TTCAGCCTTGCGACCATACT		
GLRaV2-CP1	GGTGATAACCGACGCCTCTA	prot capsidica	543 bp
GLRaV2-CP2	CCTAGCTGACGCAGATTGCT		
GVB-M1	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	putat RNA binding protein	460 bp
GVB-M2	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG		
ArMV-AN1	ATGCTGATGTTGGAGTTGCTCT	prot capsidica	416 bp
ArMV-AN3	AGTGGCACTAAACCACAAAGC		
GLRaV3-M3	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	prot capsidica	336 bp
GLRaV3-N2	TGCGGCATTAATCTTCATTG		
GVA-6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	prot capsidica	272 bp
GVA-6862R	TCGAACATAACCTGTGGCTC		
GLRaV1-M3	TCTTTACCAACCCGAGATGAA	prot capsidica	232 bp
GLRaV1-M4	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG		
GFKV-M1	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	prot capsidica	179 bp
GFKV-M2	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG		
GFLV-M3	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	RNA polim RNA dip	118 bp
GFLV-M4	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG		

I primer possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primer ad una concentrazione di 10 o 100µM in dH₂O sterile (secondo quanto riportato nella tabella della pagina seguente e seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice) e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

Preparazione del saggio

1. Indossare guanti puliti
2. Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenerli sotto la luce U.V. per 10 minuti prima di utilizzarli
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
5. Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio

Miscela di reazione per ogni campione

<i>Miscela di reazione</i>	<i>Ordine di inserimento</i>
2,75 µl di buffer 10X	1- acqua
1,6 µl di MgCl ₂ (50 mM)	2- buffer
0,75 µl di dNTP (10mM)	3 - MgCl ₂
3,25 µl di primer mix multiplex	4- dNTPs
0,25 µl di Platinum Taq polimerasi	5- primer
2 µl di cDNA	6- enzimi
14,4 µl H ₂ O sterile	
Volume totale: 25 µl con acqua sterile RNasi-free	

Miscela primer multiplex

Primer	Quantità per 1 campione
18S-M1	0,1 µl (10 µM)
18S-M2	0,1 µl (10 µM)
GLRaV2-CP1	0,1 µl (100 µM)
GLRaV2-CP2	0,1 µl (100 µM)
GVB-M1	0,2 µl (10µM)
GVB-M2	0,2 µl (10 µM)
ARMV-9	0,1 µl (100 µM)
ARMV-10	0,1 µl (100 µM)
GLRaV3-M3	0,1 µl (100 µM)
GLRaV3-N2	0,1 µl (100 µM)
GVA-6591F	0,075 µl (100 µM)
GVA-6862R	0,075 µl (100 µM)
GLRaV1-M3	0,375 µl (10 µM)
GLRaV1-M4	0,375 µl (10 µM)
GFKV-M1	0,5 µl (10µM)
GFKV-M2	0,5 µl (10µM)
GFLV-M3	0,075 µl (100 µM)
GFLV-M4	0,075 µl (100 µM)
TOTALE x 1 campione	3,25 µl

1. Mescolare bene la soluzione.
2. Distribuire 23 µl di miscela di reazione per ciascuna provetta.
3. Aggiungere il cDNA a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
4. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
5. Inserire le provette nel Termociclatore.
6. Avviare la RT-PCR dopo aver selezionato il programma prescelto.

Ciclo

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	2'	1
Amplificazione	94 °C	30''	35
	55 °C	60''	
	72 °C	90''	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	10 °C	10'	1

Conservare le provette in frigorifero.

Elettroforesi su gel di agarosio

Per l'esecuzione del saggio seguire le seguenti tappe operative:

1. Preparare il gel di agarosio 2,5% in TBE 0,5X.
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.
2. Caricare 5-10 µl del campione in ciascun pozzetto, dopo aver aggiunto 1 µl di loading buffer 10X. 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 60-90' 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 µg/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.

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserveranno bande specifiche alle altezze predefinite (Foto 1 e 2), come da tabella dei primer riportata in precedenza.

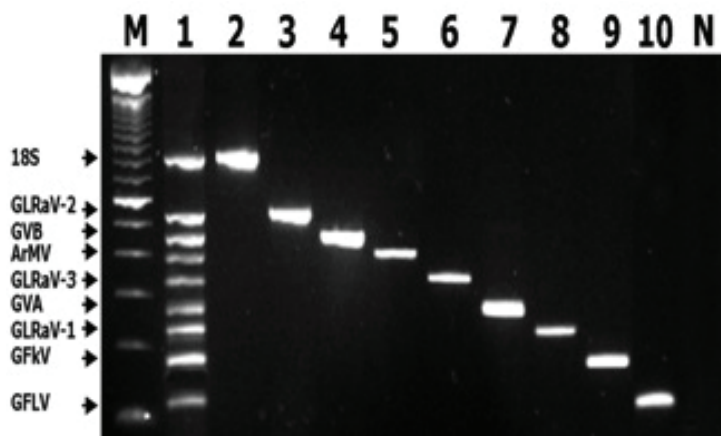


Foto 1 - Gel ottenuto utilizzando target “predefiniti”. 2 = controllo sano; 3 = controllo positivo GLRaV 2, 4 = controllo positivo GVB; 5 = controllo positivo ArMV; 6 = controllo positivo GLRaV 3; 7 = controllo positivo GVA; 8 = controllo positivo GLRaV 1; 9 = controllo positivo GFKV; 10 = controllo positivo GFLV. N = controllo bianco; 1 = tutti i controlli insieme (sano e positivi). M = marker 100 bp

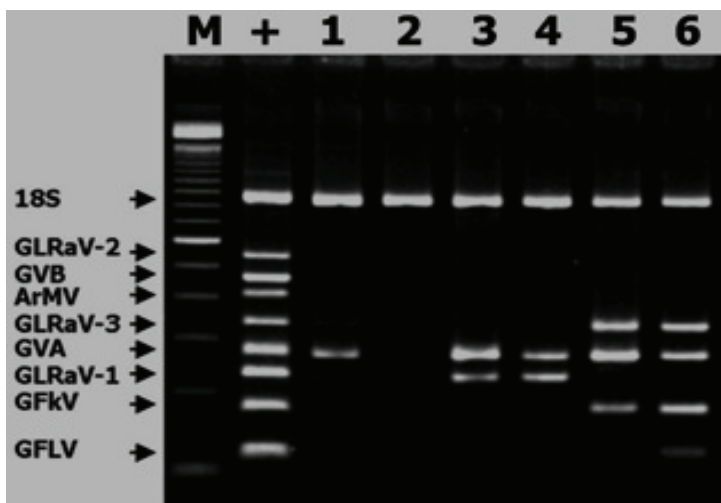


Foto 2 - Gel ottenuto analizzando sei campioni ignoti. 1 = campione infetto da GVA; 2 = campione sano; 3 e 4 = campioni infetti da GVA e GLRaV 1; 5 = campione infetto da GLRaV 3, GLRaV 1 e GVA; 6 = campione infetto da GLRaV 3, GLRaV 1, GVA e GFLV; + = insieme dei controlli (sano e positivi); M = marker 100 bp

Foto: G. Gambino – CNR –IVV Grugliasco

Punti critici del protocollo

- Il punto debole della RT-PCR è la sua estrema sensibilità, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può 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). 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);
 - aprire tutte le provette con gli appositi “apri - provette” e non farlo con le mani;
 - 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- E’ importante utilizzare un marker idoneo per la valutazione dell’altezza delle bande

4. DATI DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri (ISO/IEC standard 16140:2003; ISO/IEC standard 17025:2005; EPPO standard PM7/98) utilizzando campioni di riferimento.

- Sensibilità specifica
- Specificità
- Accuratezza relativa
- Sensibilità analitica
- Ripetibilità
- Riproducibilità

Tutte le prove di validazione sono state effettuate utilizzando una serie di campioni di riferimento ('target' e 'non target') forniti in modalità blind (cieca).

Campioni di riferimento 'target': isolati che rappresentano la diversità genetica, la distribuzione geografica e le diverse varietà e/o specie ospiti del patogeno.

Campioni di riferimento 'non target': isolati infetti da altri virus che colpiscono la stessa specie ospite, da patogeni geneticamente correlati (nel caso dei virus vegetali stesso genere), campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite.

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 tralci lignificati.

4.1 Validazione delle metodologie diagnostiche da campioni legnosi

Per la validazione del protocollo sierologico sono stati utilizzati 122 campioni target e non target di riferimento sia di *Vitis vinifera* L. che di *Vitis* spp. (portainnesti) distribuiti secondo quanto riportato nella tabella sottostante e comprensivi di 20 campioni pool costituiti da 4 parti di tessuto sano ed una parte di tessuto infetto:

Virus	Infezione singola	Infezione mista
GLRaV 1	11	12
GLRaV 2	3	13
GLRaV 3	9	20
GVA	5	22
GVB	3	5
ArMV	6	5
GFLV	8	12
GFkV	7	10
Non target	7	

Per la validazione del protocollo molecolare di multiplex RT-PCR sono stati utilizzati 30 campioni target e non target di riferimento sia di *Vitis vinifera* L. che di *Vitis* spp. (portainnesti) distribuiti secondo quanto riportato nella tabella sottostante comprensivi di

Virus	Infezione singola	Infezione mista
GLRaV 1	2	4
GLRaV 2	2	5
GLRaV 3	4	4
GVA	1	8
GVB	1	3
ArMV	3	2
GFLV	1	2
GFkV	1	5
Non target	3	

Tutti gli isolati, pervenuti dal CNR-IVV di Bari, CNR-IVV- Grugliasco, CRSA di Locorotondo, ERSA-FVG, Università di Pisa, Università di Milano, Fondazione E. Mach – IASMA S. Michele a/A, CAV di Faenza, Vivai Cooperativi di Rauscedo, CRA-VIT di Conegliano e CRA-PAV di Roma, sono stati preventivamente controllati per mezzo di saggio sierologico e molecolare in singola RT-PCR.

4.2 Metodo diagnostico ELISA

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando 3 diversi tipi di antisieri, ed i seguenti materiali, reagenti e strumenti.

Di seguito sono riportati gli antisieri (Kit sierologici) le piastre ELISA, ed i dettagli di reagenti e delle strumentazioni utilizzate per le prove di validazione:

Virus	Kit sierologico
GLRaV-1	Agritest, Bioreba, Sediag
GLRaV-2	Agritest, Bioreba, Sediag
GLRaV-3	Agritest, Bioreba, Sediag
GVA	Agritest, Bioreba, Sediag
GVB	Agritest
ArMV	Agritest, Bioreba, Sediag
GFLV	Agritest, Bioreba, Sediag
GFkV	Agritest, Bioreba, Sediag
GFLV + ArMV	Bioreba, Sediag
GLRaV 1 + GLRaV 3	Bioreba

Piastra ELISA: Nunc maxisorp F96 735-0199

Substrato: Sigma S=942 TAB;

Mortai, bisturi, coltelli

Azoto liquido

Fresa GRANEX o modello artigianale simile: apparecchiatura meccanica alimentata da motore elettrico, dotata di una ruota dentata (tipo fresa) per la macinazione/polverizzazione integrale (midollo, xilema/floema e corteccia) o parziale (midollo, xilema/floema) del campione legnoso di tralcio, dotati di un dispositivo convogliatore del macinato nella provetta di estrazione.

Lettore per piastre ELISA: Labsystems Multiskan EX e Plus, Dynatech MR5000, BIO-TEK instruments, inc EL800

Micropipette: Gilson, Eppendorf, Labsystems

Lavaggio manuale delle piastre

Di seguito vengono riportati i valori dei parametri di validazione ottenuti per singolo virus:

GLRaV-1

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	89%	94%	96%
Specificità	97%	100%	100%
Accuratezza	93%	96%	98%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%	100%
Riproducibilità	92%	91%	92%
Valori campioni pool			
Sensibilità	85%	61%	77%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	89%	93%	84%
Ripetibilità	100%	100%	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GLRaV-2

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	86%	67%	87%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	90%	77%	91%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	2 ⁻²	2 ⁻²	2 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	94%	92%	92%
Riproducibilità	88%	82%	82%
Valori campioni pool			
Sensibilità	85%	61%	21%
Specificità	100%	100%	95%
Accuratezza	89%	93%	53%
Ripetibilità	100%	100%	92%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 2⁰ a 2⁻⁴

⁽²⁾: La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GLRaV-3

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	81%	90%	97%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	84%	92%	97%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%	100%
Riproducibilità	98%	91%	92%
Valori campioni pool			
Sensibilità	66%	97%	100%
Specificità	94%	100%	93%
Accuratezza	75%	98%	98%
Ripetibilità	100%	94%	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GVA

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	74%	46%	87%
Specificità	100%	100%	96%
Accuratezza	80%	58%	89%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Ripetibilità ⁽²⁾	95%	100%	100%
Riproducibilità	92%	73%	88%
Valori campioni pool			
Sensibilità	73%	30%	82%
Specificità	100%	75%	100%
Accuratezza	81%	43%	87%
Ripetibilità	95%	86%	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GVB

Valori campioni singoli	Agritest
Sensibilità	86%
Specificità	100%
Accuratezza	92%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	2 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità	100%
Valori campioni pool	
Sensibilità	n.t.
Specificità	n.t.
Accuratezza	n.t.
Ripetibilità	n.t.

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 2⁰ a 2⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

ArMV

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	64%	48%	50%
Specificità	85%	95%	96%
Accuratezza	74%	71%	72%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%	100%
Riproducibilità	94%	93%	96%
Valori campioni pool			
Sensibilità	64%	42%	43%
Specificità	94%	100%	97%
Accuratezza	81%	76%	74%
Ripetibilità	100%	100%	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GFLV

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	75%	82%	77%
Specificità	96%	92%	92%
Accuratezza	80%	84%	81%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%	100%
Riproducibilità	94%	91%	91%
Valori campioni pool			
Sensibilità	65%	90%	79%
Specificità	100%	93%	94%
Accuratezza	79%	91%	85%
Ripetibilità	100%	86%	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GFkV

Valori campioni singoli	Agritest	Bioreba	Sediag
Sensibilità	85%	90%	30%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	88%	92%	46%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	100%	95%
Riproducibilità	92%	86%	88%
Valori campioni pool			
Sensibilità	72%	47%	42%
Specificità	100%	100%	100%
Accuratezza	84%	70%	67%
Ripetibilità	100%	100%	95%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

GLRaV 1+ 3

Valori campioni singoli	Bioreba
Sensibilità	84%
Specificità	100%
Accuratezza	90%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻²
Ripetibilità ⁽²⁾	100%
Riproducibilità	92%
Valori campioni pool	
Sensibilità	81%
Specificità	94%
Accuratezza	85%
Ripetibilità	100%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

ArMV + GFLV

Valori campioni singoli	Bioreba	Sediag
Sensibilità	88%	67%
Specificità	62%	67%
Accuratezza	82%	67%
Sensibilità analitica ⁽¹⁾	10 ⁻¹	10 ⁻¹
Ripetibilità ⁽²⁾	100%	96%
Riproducibilità	93%	74%
Valori campioni pool		
Sensibilità	79%	47%
Specificità	62%	67%
Accuratezza	73%	53%
Ripetibilità	86%	83%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

4.3 Metodo diagnostico Multiplex RT-PCR

Valori di validazione

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Mortai, bisturi, coltelli

Azoto liquido

kit commerciali per estrazione RNA totale da tessuto vegetale: RNeasy Plant Minikit cod. 74904 **Qiagen**

Trattamento con DNAsi: Dnasi-**Invitrogen** (cod. 18068-015).

Prodotti pr la trascrittasi inversa: dNTP (**Sigma** cod. D7295); random nonamers (**Sigma** Cod R7647); 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); enzima Dnasi (**Invitrogen** cod. AM2224)

primers specifici: sintetizzati da **Invitrogen Ltd**

Termociclatore: MJ PTC200, **BioRad iCycler**, **Biometra T-Professional**

Transilluminatore: **Biorad Geldoc 2000**

marker per DNA: Bench Top 100bp DNA ladder 100 lanes **Promega Corporation** cod. G 7541

Amplificazione multipla: Platinum Taq polimerasi (**Invitrogen** cod. 10966-018)

Virus/Valori	Sensibilità	Specificità	Accuratezza	Sensibilità analitica	Ripetibilità	Riproducibilità
GLRaV-1	74%	100%	94%	10 ⁻²	100%	70%
GLRaV-2	84%	98%	85%	10 ⁻²	95%	83%
GLRaV-3	100%	93%	95%	10 ⁻³	100%	100%
GVA	96%	99%	98%	10 ⁻²	100%	94%
GVB	100%	100%	100%	10 ⁻²	100%	90%
ArMV	92%	99%	98%	10 ⁻²	100%	100%
GFLV	68%	100%	90%	10 ⁻³	100%	76%
GFkV	95%	95%	95%	10 ⁻²	100%	95%
Totale 8 virus	89%	98%	95%	10⁻²	99%	90%

⁽¹⁾ La sensibilità analitica è stata valutata con diluizioni dell'estratto da 10⁰ a 10⁻⁴

⁽²⁾ La ripetibilità è stata valutata ripetendo per tre volte l'esperimento utilizzando tre campioni diluiti da 2⁰ a 2⁻²

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- GAMBINO G. I. GRIBAUDO, 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA as *internal control*. *Phytopathology* **96**(11): 1223-1229.
- MACKENZIE D.J., M.A. MCLEAN., S. MUKERJI, M. GREEN, 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* **81**, 222-226.

ALLEGATO I -Strumentazione, materiali e reagenti necessari

Strumentazione, materiali e reagenti necessari per metodo ELISA diretta e indiretta

Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Bilancia analitica
3. Distillatore
4. Frigorifero e congelatore
5. Incubatore termostatico (37°C)
6. Lavatore di piastre automatico (opzionale)
7. Lettore piastre ELISA (Fotometro)
8. Micro pipette dedicate e calibrate (P10, P20, P50, P200, P1000, P5000)
9. Pipetta multicanale (opzionale)
10. Fresa per polverizzazione del legno o omogeneizzatore (opzionale)
11. pH metro
12. Bisturi o coltelli

Reagenti

1. Kit sierologico ELISA
2. Reagenti chimici per i tamponi (PBS, PBS-T, tampone carbonato, tampone di estrazione, tampone coniugato, tampone per substrato)
3. Substrato (para-nitro-fenilfosfato - PNP)
4. Controllo positivo, sicuramente infetto dai virus target ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.
5. Controllo negativo, sicuramente esente da infezione dai virus target ed appartenente alla stessa specie vegetale saggiata.

Materiali

1. Acqua distillata
2. Fogli di carta per ricoprire i banchi da lavoro
3. Carta da laboratorio
4. Rotoli di carta di alluminio
5. Guanti monouso
6. Pellicola trasparente
7. Mortai e pestelli
8. Piastre polistirene a 96 pozzetti per ELISA ad alta capacità di legame con gli anticorpi
9. Puntali per micro pipette di tutti i volumi adeguati alle pipette sopra indicate
10. Vetreria varia o materiale plastico monouso
11. Lame da bisturi
12. Azoto liquido (opzionale)

Seguire, quindi, attentamente **TUTTE le istruzioni della Ditta produttrice del kit sierologico utilizzato**. In particolare effettuare scrupolosamente tutte le diluizioni dei reagenti riportate. Utilizzare la diluizione del campione nel rapporto 1/10 peso/volume. Non modificare i tamponi indicati.

Strumentazione, materiali e reagenti necessari per il saggio di Multiplex RT-PCR

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato o termo blocco
4. Bilancia analitica ed Agitatore magnetico
5. Cappa aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (opzionale)
7. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore -20°C e -80°C, Frigorifero
9. Spettrofotometro
10. Micro pipette dedicate all'amplificazione e calibrate (da P10, a P1000)
11. Micro pipette dedicate all'estrazione RNA e calibrate (da P10, a P1000)
12. pH metro
13. Termociclatore
14. Transilluminatore
15. Vortex

Reagenti

1. 2- mercaptoetanolo o sodio metabisolfito
2. Acqua DEPC o Acqua RNase free
3. Acido acetico
4. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, bromuro d'etidio o Gel Red
5. Controlli negativi e positivi
6. dNTP's e Random nonameri (Sigma)
7. Enzima M-MLV Reverse Transcriptase e relativo tampone comprensivo di DTT (Ditiodithiothreitol) Invitrogen
8. Enzima DNase Invitrogen
9. Enzima RNase inhibitor Invitrogen
10. Etanolo assoluto (ET-OH)
11. Kit commerciale per estrazione RNA - RNeasy Plant mini Kit Qiagen
12. Loading buffer per elettroforesi
13. Marker di DNA (100bp)

14. Primer specifici per i diversi virus della vite
15. Platinum Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
Invitrogen
16. Azoto liquido
17. Guanidina isotiocianato
18. Sarkosyl - Sodio lauril sarcosina
19. Sodio acetato
20. EDTA
21. PVP-40

Materiali

1. Puntali sterili per micro pipette, assolutamente con filtro per la PCR
2. Guanti, Vetreria, Carta da laboratorio, Acqua distillata sterile
3. Mortai e pestelli autoclavati e sterilizzati
4. Bisturi
5. Azoto liquido
6. Porta provette
7. Provette sterili da 0,2 o 0,5 ml per PCR
8. Provette sterili da 1,5 e 2 ml

Indice per autori/*Authors Index*

Anaclerio F.	567	Gambino G.	567
Angelini E.	567	Gianinazzi C.	567
Antonelli M. G.	567	Gualandri V.	567
Barba M.	567	Luison D.	567
Bertaccini A.	461- 491	Luvisi A.	567
Bertazzon N.	567	Malossini U.	567
Bianchedi P.	567	Manglli A.	545
Bianchi G.	567	Mannini F.	567
Bianco P. A.	461-491-567	Martini M.	461-491
Botti S.	567	Marzachi C.	461-491
Bragagna P.	567	Mascia T.	545
Cardoni M.	567	Palmano S.	461-491
Casati P.	461-491-567	Paltrinieri S.	461-491
Ciuffo M.	545	Pasquini G.	461- 491
Costantini E.	461-491	Riccioni L.	517
Credi R.	567	Saldarelli P.	567
Davino S.W.	545	Terlizzi F.	567
De Luca E.	567	Tomassoli L.	545
Durante G.	567	Triolo E.	567
Faggioli F.	567	Trisciuzzi N.	567
Ferretti L.	461-491	Turina M.	545
Gallitelli D.	545	Valente M.T.	517

