

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO  
PER  
*CERATOCYSTIS PLATANI***

**M. Pilotti , V. Lumia, G. Di Lernia, A. Brunetti**

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	187
1.1 Introduzione	187
1.2 Diffusione all'interno dell'ospite e sintomatologia 2	188
1.3 Agente causale	192
1.4 Miglioramento genetico per la resistenza	193
1.5 Metodiche diagnostiche tradizionali	194
1.6 Normativa fitosanitaria	195
2. METODO DI CAMPIONAMENTO	195
2.1 Scelta delle piante	195
2.2 Il prelievo	195
2.3 Sterilizzazione degli strumenti	196
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	197
3.1 Premessa	197
3.2 Le metodiche sviluppate	198
3.3 Diagramma di flusso per applicazione della diagnosi	198
3.4 Estrazione del DNA	199
3.5 Protocollo Real-Time PCR con EvaGreen	201
3.6 Protocollo Real-Time PCR con sonda Taqman (dual-labelled probe)	202
3.7 Caratteristiche tecniche della Real Time PCR	203
3.8 Punti critici della Real-Time PCR	211
3.9 Elettroforesi su gel d'agarosio	212
4. DATI DI VALIDAZIONE	214
4.1 Risultati della validazione	214
4.2 Conclusioni	219
5. BIBLIOGRAFIA CITATA DI RIFERIMENTO	220
Allegato I - Strumentazione, materiali e reagenti necessari	222

---

## 1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

---

<b>Agente causale</b>	Teleomorph: <i>Ceratocystis platani</i> (J. M. Walter) Engelbr. & T. C. Harr. Anamorph: <i>Thielaviopsis</i> (Paulin-Mahady <i>et al.</i> , 2002)
<b>Tassonomia</b>	Fungo: Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Microascales; Ceratocystidaceae; Ceratocystis
<b>Avversità</b>	Cancro colorato ( <i>Canker stain</i> ) del platano
<b>Sinonimi</b>	<i>Ceratocystis fimbriata</i> Ell. <i>et</i> Halsted f. sp. <i>platani</i> Walter, <i>Endoconidiophora fimbriata</i> (Ellis & Halsted) Davidson f. <i>platani</i> Walter

---

### 1.1 Introduzione

*Ceratocystis platani* (J. M. Walter) Engelbr. & T. C. Harr. è un fungo ascomicete agente causale del cancro colorato, ad oggi la più grave malattia del platano (Walter e Schreiber 1952; McCracken e Burkhardt 1977; Perry e McCain 1988; Panconesi 1999; Pilotti 2002; Ocasio-Morales *et al.*, 2007). Il cancro colorato è in grado di portare a morte individui adulti nell'arco di pochi anni dall'inizio dell'infezione.

La malattia ed il suo agente causale furono descritti per la prima volta negli Stati Uniti d'America nel 1935 su *Platanus orientalis* L. (Jackson e Sleeth 1935). Tuttavia è opinione comune che il fungo fosse presente come patogeno del platano da tempi ben più remoti, essendo diffuso negli USA nei popolamenti naturali di *Platanus occidentalis*, una specie di platano avente una minor suscettibilità al patogeno. Dagli Stati Uniti fu probabilmente introdotta in Europa durante la seconda guerra mondiale, verosimilmente per mezzo degli imballaggi in legno di platano utilizzati per trasportare materiale bellico (Cristinzio *et al.*, 1973; Engelbrecht *et al.*, 2004). La malattia si è diffusa rapidamente in Europa meridionale - Italia, Francia, Svizzera, Spagna e Grecia - ove ha causato la distruzione di alberature urbane e popolamenti naturali (Panconesi 1999; Ocasio-Morales *et al.*, 2007). Generalmente il cancro colorato ha mostrato di diffondersi con una modalità epidemica e distruttiva laddove il platano è utilizzato intensivamente - ad esempio in città, ove sono frequenti alberature monospecifiche, e negli impianti per la produzione di legno. In tali condizioni l'azione antropica - potatura, lavori di scavo in prossimità delle radici con strumenti infetti, danni meccanici casuali - aumenta grandemente il numero di ferite attraverso cui *C. platani* può infettare le piante (McCracken e Burkhardt 1977; Panconesi 1999). Tuttavia, l'impatto della malattia può essere devastante anche in popolamenti naturali che colonizzano le sponde dei corsi d'acqua, come riportato in Francia, Italia e Grecia,

in quanto il flusso d'acqua favorisce significativamente la dispersione dei propaguli fungini e di residui legnosi infetti (Grosclaude *et al.*, 1991; Ocasio-Morales *et al.*, 2007; Panconesi 1999). In tali condizioni l'evento infettivo si avvale di microferite causate sulle radici dai detriti trasportati dal flusso dell'acqua. In generale laddove la densità del popolamento, naturale o artificiale, è alta il patogeno trae vantaggio dalle anastomosi radicali tra platani adiacenti, per passare dalle piante infette a quelle sane (Mutto Accordi 1986; Vigouroux e Stojadinovic 1990). L'importanza di tale modalità per la diffusione di *C. platani* è indirettamente confermata dal fatto che la malattia riesce a progredire inesorabilmente anche in alberature in cui le pratiche di potatura e i lavori di scavo stradale sono stati vietati per molti anni (Pilotti, dati non mostrati).

Nelle foreste naturali del Nord America, in cui il patogeno è probabilmente originario (Engelbrecht *et al.*, 2004), la diffusione e la gravità della malattia sembrano essere minori (Walter 1946; McCracken e Burkhardt 1977). Tale differenza ha almeno tre motivazioni: 1) la minor suscettibilità di *Platanus occidentalis* L. al cancro colorato; 2) i popolamenti non sono generalmente puri cosicché le piante di platano sono più lontane le une dalle altre e separate tra loro da altre specie vegetali, in tal modo risulta anche più difficile la diffusione tramite anastomosi radicale; 3) gli eventi che provocano ferite sono senza dubbio più rari rispetto all'ambiente urbano (Walter 1946; Panconesi 1999).

## 1.2 Diffusione all'interno dell'ospite e sintomatologia

La morte degli alberi sembra essere l'unico esito possibile degli eventi infettivi in *P. × acerifolia* (Ait.) Willd. e *P. orientalis*, indipendentemente dall'età e le dimensioni (Walter e Schreiber 1952; Perry e McCain 1988; Panconesi 1999; Ocasio-Morales *et al.*, 2007).

Il cancro colorato è una malattia vascolare, ma è estremamente aggressivo anche nei confronti dei tessuti legnosi parenchimatici e dei tessuti corticali. Infatti all'interno della pianta la diffusione avviene, longitudinalmente, attraverso i vasi xilematici e, radialmente, lungo i raggi midollari. Nei vasi la presenza del fungo induce la formazione di tille e gel, e di altri prodotti di polimerizzazione che ne occludono il lume (Ferrata, 1979; Clerivet e El Modafar, 1994; El Modafar *et al.*, 1996). Ciò causa un rallentamento della progressione longitudinale del fungo, il quale è comunque in grado, nel tempo, di perforare le occlusioni. In tali condizioni, *C. platani* può fuoriuscire dai vasi attraverso le punteggiature, e diffondere radialmente nei raggi midollari, da dove può colonizzare nuovi vasi, raggiungere il midollo in profondità, oppure invadere perifericamente il cambio e la corteccia, che conseguentemente necrotizzano (D'Ambra e Ferrata, 1975; D'Ambra *et al.*, 1977; Ferrata, 1979).

Nei tessuti legnosi *C. platani* può avere percorso inter e intra-cellulare. Il percorso inter-cellulare si attua mediante degradazione della lamella mediana e della parete primaria e secondaria, dalla quale il fungo può penetrare direttamente nel lume cellulare. Nei raggi e nel parenchima maturi è prevalente la diffusione intracellulare attraverso i porocanali. La presenza del fungo nel lume cellulare determina una generale degenerazione dei sistemi membranosi e dei costituenti citoplasmatici (Mutto Accordi *et al.*, 1978; Ferrata 1979).

La progressione del fungo nei tessuti legnosi provoca estese necrosi di colore grigio-nerastro o marrone. In caso di piante con minore livello di suscettibilità il

tessuto legnoso invasivo mostra anche ampie zone di colore giallo-aranciato (Pilotti *et al.*, 2009). Esternamente la malattia può essere visibile sul tronco come alterazioni cromatiche blu-rossastre più o meno estese (Fig. 1); quando il fungo raggiunge la corteccia, dall'interno del cilindro vascolare attraverso i raggi midollari, le alterazioni cromatiche appaiono come macchie circolari o allungate, le riemergenze (Pilotti, 2002). Nel tempo, la corteccia alterata dissecca, assume un colore marrone-nocciola, si fessura longitudinalmente e alla fine, tende a distaccarsi dal sottostante cilindro vascolare. A questo punto le caratteristiche colorazioni della corteccia non sono più visibili ma è ancora possibile apprezzare le alterazioni di colore sulla superficie esterna del cilindro vascolare (Fig. 2). In ogni caso le colorazioni da cui la malattia prende il nome possono essere osservate su alberi aventi ritidoma liscio e non su quelli con ritidoma rugoso. Sulla vegetazione si verifica un avvizzimento rapido, nei periodi in cui la evapotraspirazione è particolarmente intensa e che può essere localizzato nelle zone di chioma che corrispondono alle parti del cilindro vascolare compromesse dalla malattia oppure possono interessare la totalità della chioma. Alternativamente la pianta, a seconda del livello di suscettibilità alla malattia, può andare incontro ad un deperimento lento manifestando una vegetazione stentata con foglie clorotiche e di dimensioni ridotte e con produzione di ricacci nelle zone ancora vitali, adiacenti alle parti di tronco necrotizzate. Può anche accadere che in prossimità della ripresa vegetativa l'albero fallisca completamente il germogliamento o giunga a morte subito dopo. Soggetti adulti, dal momento dell'infezione, possono essere uccisi nel volgere di pochi anni (per dettagli e ulteriori figure sulla sintomatologia vedi: Pilotti, 2002 e Pilotti *et al.*, 2009).



Fig. 1 - Sintomi di cancro colorato: dapprima la corteccia necrotica assume una colorazione rosso-violacea, successivamente dopo completa disidratazione, assume un colore marrone e tende a distaccarsi dal cilindro vascolare



Fig.2 - Imbrunimenti sulla superficie del cilindro vascolare di un platano ucciso dal cancro colorato. I sintomi sono ancora visibili dopo il distacco della corteccia necrotica e disseccata

### 1.3 Agente causale

*C. platani* è una specie criptica facente parte della specie complessa *C. fimbriata* che include almeno 18 specie criptiche molto simili o identiche tra loro morfologicamente, ma aventi una ben precisa specificità d'ospite, un numero destinato probabilmente ad accrescersi (vedi come esempi: Barnes *et al.*, 2003; Engelbrecht e Harrington 2005; Johnson *et al.*, 2005; Van Wyk *et al.*, 2007). *C. platani* allevato su substrato agarizzato – PDA - a 24°C, forma una colonia con un ritmo di crescita di 0.3-0.5 cm al giorno. La superficie superiore di colore grigiastro sempre più scuro con l'età, e marrone-verdastro-nerastro inferiormente.

Il fungo possiede un teleomorfo (fase sessuata) e un anamorfo (fase asessuata) che convivono.

Gli ascomata del teleomorfo sono periteci di colore marrone-scuro-nerastro aventi base globosa (120-330 µm), munita di filamenti ifali che possono anche essere endoconidiofori, e un lungo collo diritto di colore marrone scuro-nero (400-1000 µm) che termina con un ostiolo circondato da ife erette (o fimbrie, di qui il nome *C. fimbriata*). Gli aschi si dissolvono precocemente e dall'ostiolo fuoriescono le ascospore immerse in una massa mucillaginosa bianco-giallastra. Le ascospore sono di forma ellittica con un lato appiattito (4.0–6.5 µm lunghe – 3.0–4.5 µm larghe, 3.0–4.5 µm spesse), cosicchè viste di profilo assumono la forma di un cappello a bombetta. Non tutti gli isolati sono in grado di produrre periteci o, pur differenziandoli, non tutti sono in grado di produrre ascospore.

L'anamorfo (*Thielaviopsis*) produce tre tipi di endoconidi: (i) endoconidi cilindrici, ialini, con estremità tronche molto variabili in lunghezza (8-43 µm × 3–6 µm); sono comunissimi e distintivi della coltura pura, ma osservabili (più raramente) anche in vivo nei tessuti legnosi delle piante infette; (ii) endoconidi “doliformi” o “a forma di barile”, di colore marrone chiaro con estremità leggermente arrotondate, (6–17 µm × 3.5–9 µm), più rari da osservare; (iii) endoconidi di forma globosa o piriforme, gli aleurioconidi, dotate di doppia parete e di colore marrone o grigio plumbeo, sempre più scuro con l'età (10–20 µm × 6–12 µm), facilmente osservabili sia in coltura pura che nei vasi legnosi (Fig. 3). Tutti e tre i tipi sono prodotti in catene che successivamente si disarticolano. In particolare gli aleurioconidi, facenti parte delle catenule, hanno una estremità basale tronca e leggermente pedunculata ed una apicale arrotondata e larga. Dopo la disarticolazione della catena assumono una forma globosa assai variabile, soprattutto nei tessuti dell'ospite ove può essere condizionata dalla specifica locazione.

*C. platani* può facilmente mutare il fenotipo: singoli settori o l'intera colonia possono assumere un colore grigio chiaro e perdere la capacità di produrre periteci. Talora dopo tempi di conservazione lunghi il micelio può assumere colore bianco e diventa sterile, perdendo la capacità di produrre sia periteci (ed ascospore) che conidi.

Per Bibliografia: Panconesi *et al.* (1999), Engelbrecht e Harrington (2005), OEPP 2003.



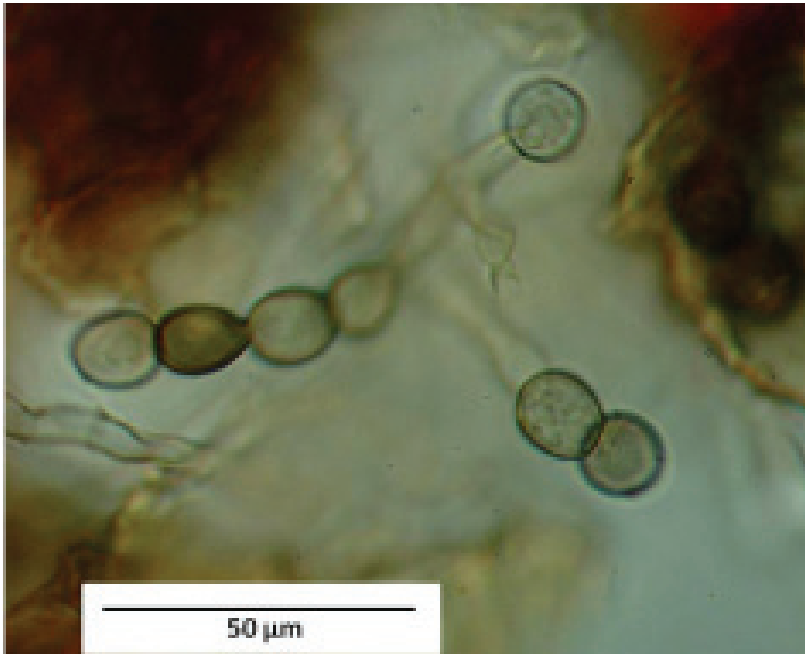


Fig.3 - Aleurioconi ancora uniti in catena, osservati al microscopio ottico in fettine sottili di legno infetto

#### 1.4 Miglioramento genetico per la resistenza

Da svariati anni sono stati intrapresi programmi di selezione per la resistenza. Tali programmi hanno ottenuto dei risultati perseguendo obiettivi distinti:

- i) ricostituzione di *P. × acerifolia* attraverso l'incrocio tra un individuo di *P. occidentalis* resistente al cancro colorato (Mc Cracken, dati non pubblicati) ma ipersuscettibile all'antracnosi, e un individuo di *P. orientalis* suscettibile al cancro colorato (Vigouroux e Olivier, 2004);
- ii) l'ottenimento di fonti naturali di resistenza mediante selezione all'interno della specie *P. × acerifolia* (Pilotti *et al.*, 2009).

Anche se sono stati ottenuti genotipi in grado di sopravvivere all'infezione artificiale con diversi gradi di resistenza, tuttavia tali programmi non sono ancora giunti a conclusione. Infatti è necessario un ulteriore lavoro per definire quantitativamente i livelli di resistenza dei genotipi selezionati e per verificare la ripetibilità del fenotipo di resistenza in condizioni di infezione naturale. Inoltre è necessario selezionare un numero sufficiente di differenti genotipi resistenti la cui diffusione possa scongiurare il rischio di selezione di nuove razze virulente del patogeno, che sarebbe facilitato se un unico genotipo dell'ospite fosse diffuso indiscriminatamente. La diffusione di un unico genotipo resistente è inoltre fortemente sconsigliata poiché provocherebbe l'erosione genetica della specie in quanto *P. × acerifolia* esiste in gran parte in forma di alberature o di impianti artificiali e non come popolamenti naturali.

## 1.5 Metodiche diagnostiche tradizionali

La valutazione dei sintomi, pur non avendo valore diagnostico, orienta nella scelta degli alberi sui quali applicare la diagnosi. I protocolli diagnostici disponibili sono stati redatti in maniera completa in un documento EPPO inserito e consultabile nella lista A2 dei patogeni da quarantena (OEPP/EPPO 2003), (<http://www.eppo.fr/QUARANTINE/listA2.htm>) ed attualmente in revisione. Le metodiche incluse sono le seguenti: 1) osservazione al microscopio degli aleurioconidi del fungo in sezioni sottili di legno (saggio microscopico) (Fig. 3); 2) osservazione dei periteci del fungo o del suo micelio (dal quale osservare ascospore e conidi al microscopio) sviluppatasi su frammenti di legno infetto incubati in camera umida (saggio della camera umida); 3) osservazione dei periteci del fungo su segmenti di ramo di platano decorticati e messi a bagno in acqua ossigenata mediante gorgogliamento, in cui sono tenuti immersi frammenti di legno del campione (saggio del ramo-esca); 4) isolamento di *C. platani* su terreno nutritivo a partire da frammenti di legno (saggio per isolamento) (OEPP/EPPO 2003). Infine anche il saggio carota può essere utilmente utilizzato – inoculazione di carote con frammenti del campione legnoso - che consente lo sviluppo del micelio e dei periteci del fungo dopo incubazione per circa una settimana a 25°C (Moller e de Vay, 1968; Pilotti *et al.*, 2009).

Tutti questi metodi hanno delle limitazioni che abbassano l'efficacia della diagnosi o la rendono impraticabile, soprattutto se devono essere processati numerosi campioni. Ad eccezione del saggio microscopico, tutti i saggi richiedono tempi lunghi, da 5-9 giorni (camera umida, saggio per isolamento e saggio carota) a qualche settimana (saggio del ramo-esca). Ad eccezione del saggio su ramo-esca, tutti i saggi hanno una sensibilità bassa o nulla quando applicati su legno devitalizzato da tempo (OEPP/EPPO 2003; Pilotti dati non mostrati). Il saggio microscopico può fallire in maniera imprevedibile anche quando viene applicato su cancri in attiva diffusione poichè la presenza del patogeno non è sempre associata alla presenza di aleurioconidi visibili al microscopio. Inoltre in legno morto da tempo, gli aleurioconidi tendono a deformarsi e diventare irricognoscibili. L'esito del saggio per isolamento dipende dalla stagione dell'anno in cui viene effettuato, essendo generalmente fine inverno-primavera e autunno, i periodi migliori. Il successo del saggio per isolamento dipende anche dal fatto che il fronte di avanzamento del cancro (la miglior zona per il prelievo) può essere colonizzato da miceti opportunisti che, su terreno nutritivo, crescono molto più velocemente di *C. platani*, il quale rimane pertanto non rilevato. Ad ultimo anche il saggio carota ha una limitazione ben precisa in quanto la carota può marcire prima dello sviluppo delle strutture fungine diagnostiche, a causa dell'azione di una flora microbica endofita o presente nei frammenti di legno inoculati.

**In conclusione, in generale, questi metodi di diagnosi sono in grado di dare risposte positive incontestabili, ma richiedono tempi lunghi e sono indubbiamente soggetti a falsi negativi.**

## 1.6 Normativa fitosanitaria

*Ceratocystis platani* è incluso nella lista EPPO A2 (OEPP/EPPO 1986; OEPP/EPPO 2003). In Italia è in vigore un decreto di lotta obbligatoria al cancro colorato emanato dal Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali – MIPAF. Il decreto stabilisce una serie di misure di lotta che includono il monitoraggio, la profilassi e tentativi di eradicazione [DM 17Aprile 1998 (con note applicative del 19 Giugno 1998) revisionato con DM del 29 Febbraio 2012].

L'applicazione efficace delle misure di lotta dipende in buona parte dalla disponibilità di metodiche di diagnosi efficaci.

## 2. METODO DI CAMPIONAMENTO

### 2.1 Scelta delle piante

La scelta delle piante dalle quali prelevare il campione è sulla base di un attenta valutazione dei sintomi. Anche in presenza di piante che mostrano segni di sofferenza aspecifici o di piante morte da tempo (in cui i caratteristici sintomi del cancro non sono più apprezzabili), è giustificato il prelievo di campioni, sia se gli alberi sono all'interno o nei pressi di zone in cui la malattia è presente, sia all'interno di zone indenni.

### 2.2 Il prelievo

Il prelievo del campione legnoso va preferibilmente effettuato nella zona di reazione del cancro cioè in prossimità del fronte di avanzamento dell'alterazione. Pertanto è necessario individuare la zona di confine tra tessuto corticale necrotico e tessuto corticale ancora vitale. La presenza delle alterazioni cromatiche aiuta nella individuazione di tale zona. Anche l'effettuazione di un sottile graffio sulla superficie corticale, con la lama di un coltello o di un bisturi, permette l'individuazione della zona di reazione, laddove la ferita vira da un colore verde (= corteccia viva) ad uno marrone (= corteccia morta) (Fig. 4). È necessario evitare scortecciamenti vistosi in quanto ciò aumenta la dispersione dei propaguli fungini o di residui legnosi infetti. Il campione va prelevato con un carotatore e il foro deve essere poi richiuso mediante applicazione di colla vinilica addizionata, ad esempio, di ossicloruro di rame. Questa modalità rappresenta la maniera più corretta per il prelievo di campioni sui quali applicare le metodiche molecolari descritte in questo documento ed è *condicio sine qua non* per l'applicazione delle metodiche tradizionali che sono notoriamente inefficienti su legno morto da tempo (vedi paragrafo 1.5). Diversamente, le metodiche molecolari sono risultate efficaci anche su legno necrotizzato da lungo tempo (vedi paragrafo 3).

Ai fini della applicazione dei saggi molecolari il campionamento può essere effettuato in qualsiasi periodo dell'anno.

Il campione va conservato a 4°C ben chiuso in busta di plastica fino al

processamento. Riguardo ai saggi molecolari è bene suddividere il campione in aliquote da 70-100 mg che possono essere sottoposte subito all'estrazione del DNA o essere conservate a -80°C fino al momento dell'estrazione (vedi "estrazione del DNA").



Fig. 4 La scalfitura della corteccia con una lama di bisturi rivela il confine tra zona sana e zona necrotica (zona di reazione del cancro). È utile laddove le colorazioni del ritidoma sono ambigue o lievi, malgrado la presenza di necrosi sottostante. La linea nera, aggiunta come *editing*, rappresenta una previsione del fronte di avanzamento della necrosi.

### 2.3 Sterilizzazione degli strumenti

Ogni strumento utilizzato per ferire e prelevare il campione deve essere accuratamente sterilizzato mediante alcool etilico e, dopo evaporazione di quest'ultimo, mediante fiamma. Tale operazione va sempre ripetuta all'inizio e al termine delle operazioni effettuate su un singolo albero.

### 3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

#### 3.1 Premessa

Di seguito sono descritti due protocolli diagnostici basati su Real-Time PCR che sono il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato "ARNADIA - Armonizzazione della diagnosi e valutazione del rischio di patogeni da quarantena e nocivi ai vegetali e ai prodotti vegetali - Definizione di protocolli di diagnosi di funghi patogeni" finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

I protocolli diagnostici forniscono le linee guida per la diagnosi e l'identificazione molecolare di *C. platani* direttamente da matrice infetta e da effettuarsi nei laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena. L'uso di tali protocolli diagnostici è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie, soprattutto per la salvaguardia di zone indenni dal cancro colorato.

I protocolli diagnostici sono stati sviluppati *ex novo* non essendoci pre-esistenti metodiche molecolari per il rilevamento di *C. platani* da legno di *Platanus*.

Delle metodologie descritte nel protocollo sono stati caratterizzati: efficienza del processo di amplificazione, robustezza (efficienza del processo di amplificazione su matrice ambientale), sensibilità analitica e diagnostica, specificità analitica e diagnostica, selettività.

La validità di un metodo di diagnosi basato su procedimenti di Real-Time PCR sensibili, efficienti, robusti e ripetibili, è stata recentemente confermata dalla applicazione della diagnosi su un elevato numero di campioni prelevati dalle alberature stradali della città di Roma. Tale diagnosi è stata effettuata contemporaneamente mediante Real-Time PCR e saggio microscopico. La comparazione ha chiaramente mostrato come il saggio microscopico sia stato soggetto a numerosi falsi negativi (Pilotti, dati non pubblicati).

**In questo protocollo vengono descritte esclusivamente le metodiche di Real-Time PCR mentre per le metodiche tradizionali si rimanda al protocollo EPPO (OEPP/EPPO 2003).**

Lo sviluppo delle metodiche è riportato in forma di lavoro scientifico nella seguente pubblicazione:

Pilotti M, Lumia V, Di Lernia G, Brunetti A (2012) Development of Real-Time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus* spp. *Eur J Plant Pathol* 134:61–79

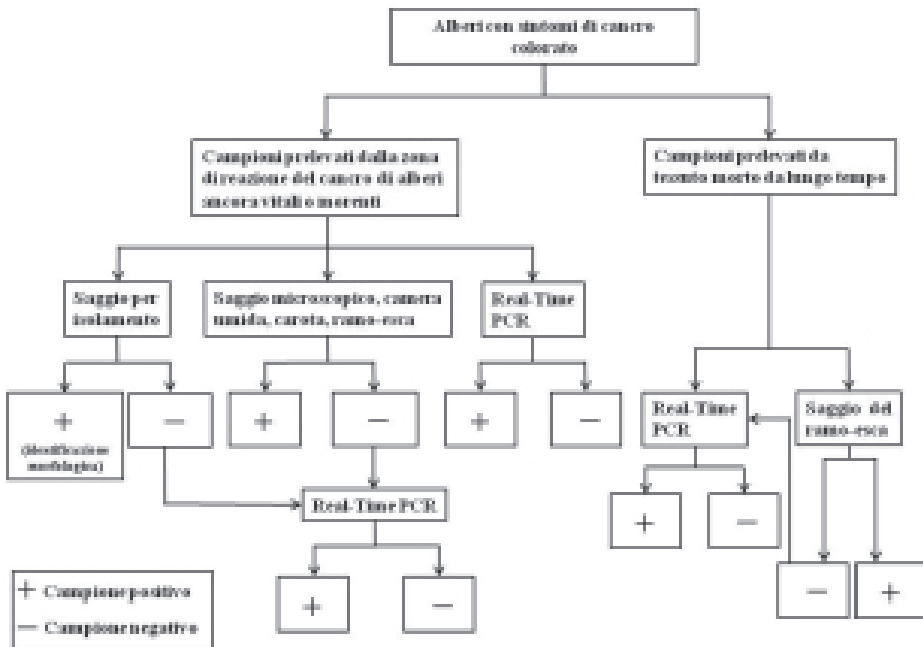
### 3.2 Le metodiche sviluppate

Sono state sviluppate le seguenti metodiche di Real-Time PCR per il rilevamento di *C. platani* (basati sulla stessa coppia di oligonucleotidi):

Metodo diagnostico molecolare	Target di PCR
Real-Time PCR con utilizzo di fluoroforo EvaGreen	Regione ITS del DNA ribosomale (ITS1)
Real-Time PCR con utilizzo di sonda Taqman	Regione ITS del DNA ribosomale (ITS1)

### 3.3 Diagramma di flusso per applicazione della diagnosi

Il seguente diagramma di lavoro esemplifica le fasi della procedura di diagnosi di *Ceratocystis platani*, in alberi affetti da cancro colorato, integrando la Real-Time PCR con le metodiche tradizionali. Il modo di procedere può essere diverso a seconda dei tempi a disposizione, dei costi che si possono sostenere, delle competenze tecniche del laboratorio e del risultato della diagnosi. In particolare, dati i limiti dei saggi tradizionali, il rilevamento negativo ottenuto con tali saggi andrebbe sempre confermato con la Real-Time PCR.



### 3.4 Estrazione del DNA

#### 3.4.1 I campioni

L'estrazione del DNA va applicata sulle seguenti tipologie di campioni:

- Micelio di un isolato di *Ceratocystis platani* allevato in coltura pura, al fine di disporre di un DNA-templato da utilizzare come controllo positivo in Real-Time PCR (vedi anche paragrafo 3.7.4). La colonia fungina pura è ottenibile facilmente inoculando 3 piastre contenenti PDA come terreno nutritivo (*Potato dextrose agar*, Oxoid) ed incubandole in termostato a 25 °C. Quando le colonie hanno occupato la maggior parte dello spazio a disposizione e sono ancora in attiva crescita, raccogliere il micelio con una ansa e depositarlo in una eppendorf. La raccolta del micelio può essere laboriosa in quanto *C. platani* non produce un micelio fioccoso. In ogni caso non raccogliere frammenti di agarosio che ha capacità inibente nei confronti delle Taq polimerasi. Il micelio si può estrarre subito o conservare a -20 o -80°C.
- Legno di platano sano, cioè non infetto da *C. platani* e in ogni caso non necrotico e di aspetto normale. Ciò al fine di disporre di un DNA-templato da utilizzare come controllo negativo in Real-Time PCR (vedi anche paragrafo 3.7.4.).
- Legno di platano necrotico e sicuramente infetto con *C. platani*. Ciò al fine di disporre di un DNA-templato da utilizzare come controllo positivo in Real-Time PCR (vedi anche paragrafo 3.7.4).
- Legno di platano necrotico che rappresenta il campione su cui applicare la diagnosi.

Ogni campione va aliquotato in doppio, pesando circa 70-100mg/aliquota. Se per un fattore casuale il procedimento fallisce, si può ripetere l'estrazione a partire dalla II aliquota. Le aliquote possono essere conservate indefinitivamente a -80°C o, preferibilmente, essere subito estratte. Le aliquote legnose devono essere costituite da frammenti abbastanza piccoli in maniera tale da rendere più agevole la successiva macerazione con pestello e mortaio.

### 3.4.2 Il protocollo di estrazione

- Utilizzare il DNeasy® Plant Mini Kit, QIAGEN (Cat. No. 69104)
- Polverizzare il campione in azoto liquido, in mortai sterilizzati in autoclave (121°C per 20 min.) o in stufa (180°C per 8 ore). Il mortaio ed il pestello vanno raffreddati preventivamente aggiungendo azoto liquido, per un minuto o due. Aggiungere il campione da polverizzare in presenza di azoto liquido.
- Aggiungere il campione polverizzato ad una provetta sterile da 1.5 ml, contenente 400 µl di soluzione di estrazione (AP1) → aggiungere 4µl di RNase A (100mg/ml) → *vortexare* per 1 min. ed incubare a 65°C per 10 min (ogni 3-4 min. *vortexare* brevemente gli estratti).
- Aggiungere 130 µl di soluzione AP2 (per la precipitazione di detergenti, proteine e polisaccaridi) → incubare 5 min. in ghiaccio.
- Centrifugare alla max velocità di una centrifuga da tavola (ad es. 16.000g) per 5 min. a temperatura ambiente.
- Caricare il surnatante nelle colonnine *viola* fornite dal kit → centrifugare per 2 min. (come sopra).
- Recuperare l'eluato facendo attenzione a non contaminarlo con residui del pellet, e caricarlo in provetta-ependorf da 1.5 ml → aggiungere, a temperatura ambiente, 1.5 volumi di AP3/E contenente etanolo, per la precipitazione del DNA.
- Caricare su colonnina *bianca* fornita dal kit e centrifugare 1 min. a velocità  $\geq 6.000g$  ed eliminare l'eluato.
- Lavaggi: caricare 500 µl di soluzione AW nella colonnina e centrifugare 1 min. a velocità  $\geq 6.000g$  ed eliminare l'eluato. Ripetere il lavaggio centrifugando per 2 min. alla max velocità per allontanare il più possibile le tracce di etanolo → posizionare la/le colonnine sotto cappa a flusso laminare per allontanare eventuali residui di etanolo (per 5-10 min.).
- Eluizione finale: caricare 100 µl di soluzione EB direttamente sul filtro della colonnina ed incubare per 15-20 min. a temperatura ambiente → centrifugare 1 min. a velocità  $\geq 6.000g$ . L'eluato ottenuto rappresenta la preparazione finale di DNA. Si può effettuare una seconda eluizione per recuperare il DNA rimasto adeso alla matrice della colonnina (questo passaggio consente comunque rese inferiori alla prima eluizione).

Gli eluati ottenuti possono essere quantificati mediante lettura allo spettrofotometro (o al nanodrop) e analisi su gel di agarosio utilizzando DNA genomico a concentrazione nota come riferimento.

Tuttavia relativamente al DNA estratto da matrice vegetale necrotizzata tali analisi sono da considerarsi puramente indicative del successo del procedimento di estrazione. Infatti in tal caso le rese sono altamente variabili e dipendenti da fattori non controllabili come ad esempio l'entità quanti-qualitativa della flora microbica che colonizza il legno necrotico. Infatti è importante ricordare che il DNA estratto da legno necrotico è un meta-DNA e cioè una mescolanza del DNA genomico di una comunità di microrganismi e di ciò che resta del DNA dell'ospite vegetale.

Quindi per guadagnare tempo è comunque consigliabile procedere con l'allestimento del saggio in Real-Time PCR subito dopo l'estrazione del DNA, e fare successivamente la quantificazione del DNA estratto.



### 3.5 Protocollo Real-Time PCR con EvaGreen

Si descrive la metodica di Real-Time PCR basata sull'utilizzo del fluoroforo EvaGreen.

Preparare la seguente miscela di reazione:

Componenti	Stock	Concentrazione finale	Vol. (µl)
SsoFast™ EvaGreen® Supermix BIO-RAD (dNTPs, Sso7d-fusion polymerase, MgCl <sub>2</sub> , EvaGreen e stabilizzatori)	2X	1X	10
<i>Primer forward</i> 5'-CGTACCTATCTTGTAGTGAGATGAATGC-3'	100 → 10µM	0.5µM	1
<i>Primer reverse</i> 5'-GAGTTTACAGTGGCGGAGACTAFACTG-3'	100 → 10µM	0.5µM	1
Templato	Variabile a seconda della concentrazione della preparazione	variabile (non necessario più di 1-5 ng)	Variabile a seconda della concentrazione della preparazione
Acqua			Variabile a seconda del volume del templato
<b>Volume totale di reazione</b>			<b>20</b>

È stato stabilito di considerare positivo un rilevamento ottenuto con un valore del ciclo soglia (Ct, *threshold cycle*) fino a 37.9

### 3.6 Protocollo Real-Time PCR con sonda Taqman (*dual-labelled probe*)

Si descrive la metodica di Real-Time PCR basata sull'utilizzo di sonda Taqman. I primers sono gli stessi della metodica precedente, basata su EvaGreen.

Preparare la seguente miscela di reazione:

Componenti	Stock	Concentrazione finale	Vol. (µl)
SsoFast™ Probes Supermix BIO-RAD (dNTPs, Sso7d-fusion polymerase, MgCl <sub>2</sub> , e stabilizzatori)	2X	1X	10
<i>Primer forward</i> 5'-CGTACCTAICTTTGTAGTGAGATGAATGC-3'	100 → 10µM	0.5µM	1
<i>Primer reverse</i> 5'-GAGTTTACAGTGGCGAGACTATACTG-3'	100 → 10µM	0.5µM	1
<i>Taqman Probe</i> marcata con FAM (6- carboxy-fluorescein) a 5' e BHQ-1 (Black Hole Quencher™ 1) a 3' 5'-CGGTGCCCTTCAGAAAGGGCCCTACCACC-3'	100 → 20µM	0.3µM	0.3
Templato	Variabile a seconda della concentrazione della preparazione	variabile (non necessario più di 1-5 ng)	Variabile a seconda della concentrazione della preparazione
Acqua			Variabile a seconda del volume del templato
<b>Volume totale di reazione</b>			<b>20</b>

È stato stabilito di considerare positivo un rilevamento ottenuto con un valore del ciclo soglia (C<sub>t</sub>, *threshold cycle*) fino a 37.9

### 3.7 Caratteristiche tecniche della Real-Time PCR

#### 3.7.1 Spettri di assorbanza ed emissione dei fluorofori utilizzati

Reporter e Quencher	Massima assorbanza	Massima emissione	Excitation Led in CFX-96 BioRad	Photo body detector in CFX-96 BioRad
EvaGreen	500nm	530nm	Channel 1 (450-490nm)	Channel 1 515-530nm
6-FAM (6-carboxy-fluorescein) ( <i>reporter</i> )	495nm	518nm	Channel 1 (450-490nm)	Channel 1 515-530nm
BHQ1 (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) ( <i>quencher</i> )	534nm (range 480-580)			

#### 3.7.2 La polimerasi

La polimerasi presente nella supermix BIO-RAD è fusa con una proteina termostabile, l'Sso7d (derivante dal batterio *Sulfolobus solfataricus*) la quale aumenta la capacità di legame della polimerasi alla dsDNA. Ciò aumenta la processività dell'enzima (= numero di nucleotidi incorporati per evento di legame) di almeno 5 volte, permettendo in definitiva il completamento della amplificazione in tempi più rapidi. L'unione della polimerasi alla proteina Sso7d aumenta significativamente anche la tolleranza agli inibitori di PCR presenti nei campioni ambientali, come ad esempio il legno necrotizzato da patogeni.

Si tratta inoltre di un enzima *hot-start*, la cui attività è bloccata mediante anticorpo che viene rimosso ad elevate temperature cioè durante la fase di denaturazione iniziale. Ciò consente di assemblare le reazioni di PCR a temperatura ambiente senza correre il minimo rischio di innesco di polimerizzazioni aspecifiche.

#### 3.7.3 Il fluoroforo EvaGreen e la sonda Taqman

EvaGreen è un fluoroforo con caratteristiche spettrali simili a quelle del ben noto SYBR® Green. Tuttavia a differenza di quest'ultimo, EvaGreen ha una bassissima capacità di inibizione della polimerasi. Per questo è presente nella supermix ad alte concentrazioni e dunque genera segnali di fluorescenza robusti con conseguente incremento della sensibilità del processo.

Generalmente la sonda viene inviata dalla ditta che la sintetizza in forma liofilizzata. Ricostituirla in H<sub>2</sub>O sterile bidistillata e nucleasi-free alla concentrazione di 100µM. Da questa soluzione madre fare alcune sub-aliquote di lavoro alla concentrazione di 20 µM, ognuna monouso (cioè da scongelare una unica volta e da utilizzare completamente). Per la conservazione a lungo termine si consiglia la

concentrazione di 100µM. Conservare la soluzione madre e le sub-aliquote a -20°C ed al buio, essendo la sonda sensibile alla luce.

### 3.7.4 Controlli

Come controlli negativi includere:

- Controllo NTC (“*No Template Control*”) in cui il template è sostituito con H<sub>2</sub>O. Inserirlo ogni 15-20 campioni saggiati. Serve per appurare contaminazioni verificatesi in sede di assemblaggio delle reazioni di PCR o contaminazioni a carico delle soluzioni della *supermix*. **OBBLIGATORIO**
- Un altro controllo NTC è rappresentato da una reazione in cui il template è sostituito con soluzione di estrazione del DNA. Serve per appurare contaminazioni verificatesi in sede di estrazione del DNA.
- Controllo contenente DNA genomico estratto da legno di platano non infetto. Oltre a verificare che i primers e la sonda sono specifici per il *target* molecolare fungino (peraltro già verificato ampiamente in sede di sviluppo del metodo) verifica ulteriormente eventuali contaminazioni in sede di estrazione e di assemblaggio delle reazioni di PCR. **OBBLIGATORIO**
- Un altro controllo negativo, è rappresentato da reazioni contenenti come template meta-DNA estratto da legno necrotico di platano affetto da malattie del legno diverse dal cancro colorato. Serve per verificare che i primers e la sonda sono specifici per il *target* molecolare fungino (peraltro già verificato ampiamente in sede di sviluppo del metodo) e che non si siano verificate contaminazioni in sede di estrazione e di assemblaggio delle reazioni di PCR.

Come controlli positivi includere:

- Reazioni contenenti come template DNA genomico di un isolato di *C. platani* utilizzato come riferimento e/o l’amplicone target clonato in vettore plasmidico (per la preparazione di quest’ultimo vedi Pilotti *et al.*, 2012). È buona norma includere una reazione con concentrazione alta (1-5 ng) e una reazione con una concentrazione bassa (10pg-100fg). **OBBLIGATORI**.
- Reazioni contenenti meta-DNA estratto da legno sicuramente infetto da *C. platani* e già rilevato precedentemente con tali metodiche. **OBBLIGATORIO**

### 3.7.5 Ciclo termico

Uguale per entrambe le metodiche

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione iniziale	96°C	3 min	1
Amplificazione	95°C Denaturazione 66°C <i>Annealing</i> e Polimerizzazione	10 sec 20 sec	40
Estensione finale	72°C	5 min	1
Blocco	4°C		

Conservare le provette in frigorifero o in congelatore se devono essere analizzate su gel d'agarosio oppure eliminare

### 3.7.6 I replicati tecnici

Nel caso si vogliano dedurre delle curve standard nel proprio laboratorio (ad esempio per verificare l'efficienza di PCR o la sensibilità del metodo) includere 3 replicati tecnici per ciascuna diluizione seriale.

Per i campioni oggetto della diagnosi, 2 replicati tecnici sono sufficienti.

### 3.7.7 La curva di melting

Nel caso della metodica basata su EvaGreen impostare il ciclo di melting finale (ad esempio con un incremento di 0.5°C, o meno, al secondo) per la deduzione delle curve di *melting* degli ampliconi prodotti. La curva di *melting* permette di determinare in maniera precisa la temperatura di *melting* del/i prodotti di PCR. La temperatura di *melting* è la temperatura alla quale il 50% dell'amplicone è denaturato. Poiché la temperatura di melting dipende strettamente dalla lunghezza e dalla composizione in basi dell'amplicone, essa è identificativa di ogni tipo di amplicone, con un minimo margine di errore.

Nel caso specifico, abbiamo determinato la temperatura di melting dell'amplicone *target* di *C. platani*: 81-82°C (Fig. 5). Questo significa che in presenza di *C. platani*, la curva mostra un picco a questi valori di temperatura (81, 81.5, 82°C, a seconda di minime variazioni nucleotidiche possedute dalla copia della regione ITS che è stata maggiormente amplificata). Dedurre la curva di melting a fine ciclo di PCR è importante poiché consente di accertare la natura specifica del segnale di fluorescenza ottenuto, che rappresenta il risultato della diagnosi. Se c'è stata una amplificazione aspecifica - amplificazione di altre zone del genoma del microrganismo *target*, amplificazioni sul genoma di microrganismi *non-target*, sintesi di primer dimeri – la curva di melting ci mostrerà picchi diversi (singoli o molteplici) da quello tipico dell'amplicone *target*. Anche se è stato ampiamente verificato in fase di sviluppo e validazione del metodo, che i primers lavorano correttamente cioè in maniera specifica, è sempre utile verificare la natura della curva di melting. La curva di melting permette altresì di verificare in maniera inequivocabile la presenza di contaminazioni sui controlli negativi, quando questi emettono segnali di fluorescenza non attesi.

### 3.7.8 La curva standard

Per dedurre una curva standard è necessario amplificare diluizioni seriali (ad esempio in ordine 10) derivate da un campione a concentrazione nota. In figura 6 sono mostrate le curve di amplificazione di ciascuna diluizione seriale. Ad amplificazione ultimata, il software della macchina deduce la curva standard che mette in relazione i cicli soglia delle diluizioni seriali con le rispettive concentrazioni (Fig. 7).

Le curve standard consentono di calcolare importanti parametri per la valutazione della bontà della metodica di Real-Time PCR che è stata sviluppata.

Efficienza Il coefficiente angolare della equazione della retta, trasformato matematicamente, dà l'esatta misura dell'efficienza di PCR. L'efficienza teorica di PCR è 2 cioè  $E=100\%$ , vale a dire che la quantità di amplicone prodotto raddoppia esattamente ad ogni ciclo. Valutare l'efficienza di PCR significa avere una misura della bontà delle scelte fatte per: estrarre il DNA da campioni ambientali, disegnare i primers e la sonda, stabilire il profilo termico del ciclo di PCR e le concentrazioni dei componenti della reazione. Dunque esperimenti con diluizioni seriali vanno sicuramente fatti in fase di sviluppo del metodo. Generalmente va bene sperimentare 7 diluizioni in ordine 10 ( $10\text{ng} \rightarrow 10\text{fg}$ ).

Linearità La curva standard permette di valutare la linearità dei dati, cioè quanto i punti corrispondenti alle diverse concentrazioni di template (le diluizioni seriali) si adattino sulla stessa linea retta. In altre parole permette di valutare se l'efficienza di PCR è la stessa alle diverse concentrazioni di template. Per  $R^2=1$  si ha perfetta linearità tra i dati. Con tale valore (o per valori che ad esso si avvicinano, 0.98-0.99) si può escludere il fatto che inibitori di PCR condizionino il processo di amplificazione. Al contrario, se così fosse, l'efficienza di PCR sarebbe più bassa per concentrazioni maggiori di template (poiché più alta sarebbe anche la concentrazione dell'inibitore).

Sensibilità analitica Con la curva standard si determina la sensibilità analitica del metodo, cioè la più bassa concentrazione di template o del *target* di amplificazione, che il metodo è in grado di rilevare.

Quantificazione La curva standard è d'obbligo nel caso si voglia fare una quantificazione assoluta

Poiché le metodiche di Real-Time PCR per il rilevamento di *C. platani* sono state sviluppate *ex novo*, sono state dedotte le curve standard per la valutazione dell'efficienza di PCR e della linearità dei dati su differenti tipi di template:

- i) DNA fungino estratto da coltura pura (anche addizionato del DNA genomico dell'ospite);
- ii) vettore plasmidico contenente l'amplicone *target*;
- iii) DNA estratto da legno necrotico morto da 1 e 6 mesi.

Per ciascuna delle due metodiche ogni curva è stata ripetuta almeno due volte ed in triplicato (tabella 1). I valori di efficienza sono risultati sempre compresi nell'intervallo di valori considerato alto-massimo (94-105%) con valori di linearità ( $R^2$ ) di 0.99-1.00. Questo significa che le metodiche molecolari sono robuste poiché nella fase esponenziale della PCR la quantità di amplicone raddoppia o quasi, e non si risente l'effetto di inibitori.

### 3.7.9. Interpretazione dei risultati

Verifica dei controlli I controlli positivi dovrebbero dare curve di amplificazione esponenziali e con valori di Ct inferiori o uguali al valore stabilito come soglia superiore per un rilevamento positivo. Se i valori dei Ct sono superiori a tale valore si considera significativo il rischio che il segnale rilevato sia dovuto a contaminazione.

Per i controlli negativi non si devono avere segnali di fluorescenza superiori alla linea soglia inferiore di fluorescenza stabilito dalla macchina di Real-Time PCR (*threshold line*). La *threshold line* è definita come il livello di fluorescenza al di sopra del quale il segnale di fluorescenza è significativo e può essere utilizzato per identificazione e quantificazione.

Valutazione dei campioni Se le amplificazioni sulle reazioni di controllo danno i risultati sopra descritti, l'analisi di PCR è stata effettuata correttamente e si può procedere alla valutazione dei campioni. Un campione viene considerato positivo se produce una curva di amplificazione esponenziale ed un valore di Ct inferiore o uguale al valore stabilito come soglia superiore per un rilevamento positivo (37.9)

Sarà invece considerato negativo se non produce segnali di fluorescenza al di sopra della *threshold line*.

Ripetere le reazioni in caso di risultati non chiari o contraddittori.

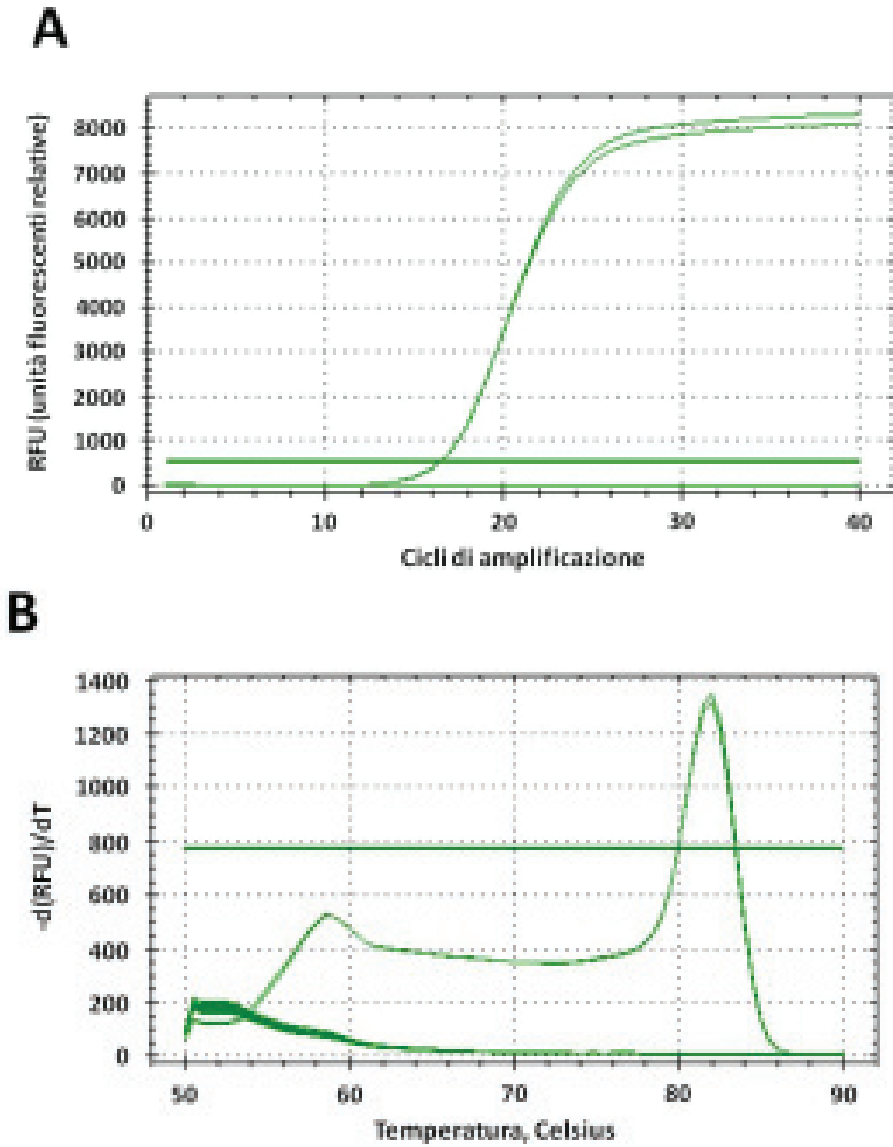


Fig. 5 - Amplificazione in Real-Time PCR con utilizzo di EvaGreen come fluoroforo. (A) Segnale di fluorescenza ottenuto utilizzando come template DNA genomico di *C. platani* (in duplicato). (B) Curva di *melting* ottenuta a fine PCR, sottoponendo la stessa reazione a progressivo riscaldamento fino ad ottenere la denaturazione e a determinare la temperatura di *melting*



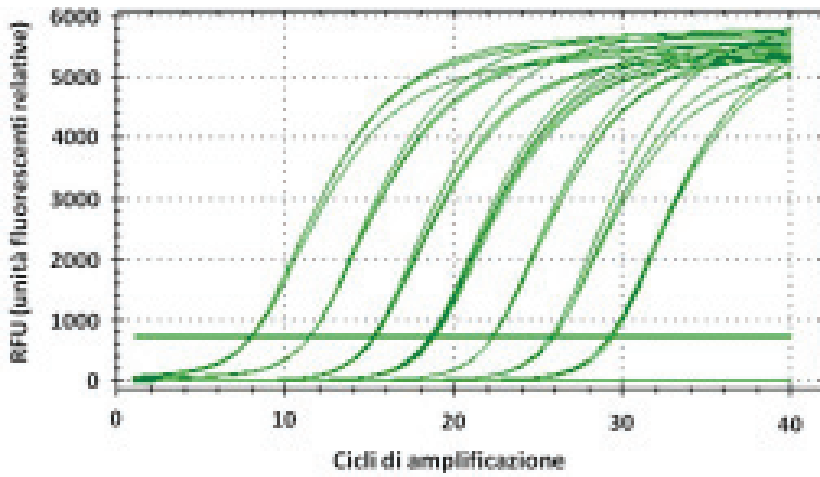


Fig. 6 - Segnali di fluorescenza di diluizioni seriali in ordine 10 di DNA genomico di *C. platani* (10ng → 10fg). Teoricamente i Ct delle diluizioni seriali basate su un fattore 10, si distanziano l'uno dall'altro di 3.32 cicli (se l'efficienza di amplificazione rimane la stessa nelle diverse diluizioni). In questo caso è stato utilizzato il metodo basato sull'utilizzo di EvaGreen

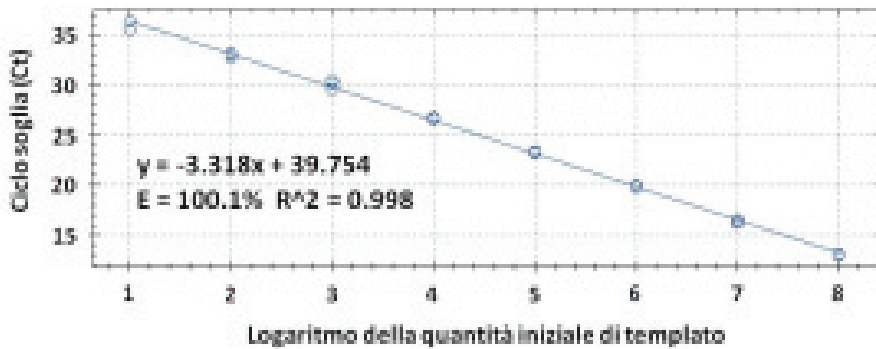


Fig. 7 - Esempio di curva standard dedotta sulla base dei Ct ottenuti con le amplificazioni delle diluizioni seriali di DNA genomico di *C. platani*. Metodo Taqman

PETRIA-PROTOCOLLI DIAGNOSTICI

TABELLA 1 - Efficienza (E) e linearità dei dati (R<sup>2</sup> ed m) delle metodiche di Real-Time PCR, dedotti mediante il calcolo di curve standard basate su amplificazioni di diluizioni seriali (10 ng → 10 fg) di templati diversi (da Pilotti *et al.*, 2012)

Esperimenti	Metodo	Templato <sup>a</sup>	E <sup>b</sup>	R <sup>2</sup> <sup>c</sup>	m <sup>d</sup>
8	EvaGreen	gDNA <i>C. platani</i>	98.1%	0.997	3.367
50	EvaGreen	gDNA <i>C. platani</i>	96.7%	0.998	3.403
67	EvaGreen	gDNA <i>C. platani</i> + gDNA platano	96.5%	0.999	3.408
82	EvaGreen	gDNA <i>C. platani</i> + gDNA platano	94.1%	0.999	3.472
8	EvaGreen	mDNA da LN 1 mese dopo M	101.3%	0.994	3.292
120	EvaGreen	mDNA da LN 1 mese dopo M	100.7%	0.998	3.305
17	EvaGreen	mDNA da LN 6 mesi dopo M	102.3%	0.998	3.267
18	EvaGreen	mDNA da LN 6 mesi dopo M	101.2%	0.996	3.294
75	EvaGreen	pCR®2.1 plasmide	99.9%	0.997	3.325
78	EvaGreen	pCR®2.1 plasmide	98.7%	0.997	3.355
21	Taqman	gDNA <i>C. platani</i>	100.1%	0.998	3.318
66	Taqman	gDNA <i>C. platani</i>	98.7%	0.999	3.355
65	Taqman	gDNA <i>C. platani</i> + gDNA platano	95.4%	0.998	3.436
66	Taqman	gDNA <i>C. platani</i> + gDNA platano	98.9%	0.999	3.348
23	Taqman	mDNA da LN 1 mese dopo M	97.6%	1.000	3.382
24	Taqman	mDNA da LN 1 mese dopo M	98.3%	0.999	3.363
23	Taqman	mDNA da LN 6 mese dopo M	99.3%	0.998	3.339
24	Taqman	mDNA da LN 6 mese dopo M	97.8%	0.995	3.375
112	Taqman	pCR®2.1 plasmide	104.6%	0.999	3.216
122	Taqman	pCR®2.1 plasmide	104.8%	0.998	3.211

<sup>a</sup> gDNA= DNA genomico; mDNA= metaDNA; LN = legno necrotico; M = morte della pianta; <sup>b</sup> E = efficienza di PCR, 100% è il valore teorico massimo ottenibile, che significa il raddoppiamento della quantità di amplicone ad ogni ciclo di PCR; <sup>c</sup> R<sup>2</sup> è una misura della linearità dei dati all'interno della stessa diluizione (cioè tra i replicati tecnici) e tra diluizioni diverse, 1 è il valore che indica massima linearità dei dati; <sup>d</sup> coefficiente angolare dell'equazione della curva standard ( $y = mx + b$ ). (da Pilotti *et al.*, 2012)

### 3.8 Punti critici della Real-Time PCR

- La Real-Time PCR è una tecnica ad elevato *throughput*, che consente di rilevare quantità bassissime di amplicone *target* e di effettuare il rilevamento su un elevato numero di campioni. Tuttavia proprio a causa della sua sensibilità se da una parte si riduce il problema dei falsi negativi, aumenta invece la possibilità di falsi positivi nel caso in cui il DNA dell'organismo *target* contamina, anche se debolmente, reagenti, estratti, il blocco del termociclatore, le micropipette etc. È pertanto necessario lavorare con estrema attenzione ed avvalersi sempre di controlli negativi sicuri per validare la veridicità 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, eliminare le aliquote in uso e ricominciare a lavorare con aliquote nuove (in caso di contaminazione fare ulteriori esperimenti per risalire al reagente o campione contaminato sarebbe oltre che una perdita di tempo anche causa di allargamento a macchia d'olio della contaminazione);
  - usare solo acqua bidistillata sterile debitamente autoclavata e nucleasi-*free*;
  - cambiare i guanti frequentemente durante le operazioni di preparazione delle miscele di reazione e di caricamento dei templati;
  - usare solo puntali sterili con filtro e nucleasi-*free* e cambiarli ogni volta che si passa da un campione all'altro;
  - aprire tutte le provette con gli appositi 'apri-provette' e non farlo con le mani; nel caso si abbia un numero elevato di campioni preferire le piastre per Real-Time PCR oppure le *strip*, alle provette singole. Procedere alle operazioni di caricamento di provette, *strip* o piastre possibilmente sotto cappe per PCR non esposte a correnti d'aria;
  - al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che provette, *strip* o piastre 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 consiglia fortemente di utilizzare la supermix BIO-RAD con la quale la metodica è stata sviluppata. In caso contrario il laboratorio dovrà farsi carico di rivalutare nuovamente lo sviluppo del metodo, soprattutto le caratteristiche di efficienza, robustezza, linearità e sensibilità analitica del processo di amplificazione. L'utilizzo di supermix con Taq polimersi ad attività bloccata (o mediante anticorpo o mediante legame chimico) come quella utilizzata in questo protocollo, dovrebbe essere la regola. Questo tipo di enzima viene chiamato

*Hot Start* poiché diventa attivo solo quando sottoposto alla temperatura di denaturazione iniziale della Real-Time PCR. Ciò consente di assemblare le mix di reazione a temperatura ambiente senza che ci sia il rischio di innesco di attività polimerasica a basse temperature, con successiva formazione di ampliconi aspecifici. Inoltre è altrettanto importante che la polimerasi sia tollerante a inibitori di PCR come quelli presenti in campioni ambientali (es. legno necrotizzato da patogeni)

- Rispettare scrupolosamente le condizioni di conservazione di tutti i reagenti. In particolare una volta prelevata dal congelatore la aliquota di supermix BIO-RAD necessaria per l'analisi, conservare la parte rimanente in frigo. Infatti ripetuti cicli di congelamento e scongelamento sono sconsigliati. Se generalmente si saggiano pochi campioni per ogni corsa di Real-Time PCR, conviene scongelare una prima volta una aliquota della confezione, ripartirla (lavorando in ghiaccio) in sub-aliquote di volume appropriato e ricongelarle. Ciò in maniera tale da utilizzare ogni volta tutta la sub-aliquota scongelata ed evitare la conservazione prolungata a 4°C.

### 3.9 Elettroforesi su gel d'agarosio

Nel caso della Real-Time PCR l'elettroforesi su gel d'agarosio non fa parte della applicazione di *routine*, tuttavia in fase di avvio della procedura può essere utile controllare una volta su gel d'agarosio al 2% gli ampliconi ottenuti (oltre che mediante l'analisi della curva di melting). Tali ampliconi sono delle dimensioni di 95 bp. Caricare su gel l'intera reazione di Real-Time PCR (20 µl).

Per l'analisi elettroforetica del DNA estratto dal fungo o da campioni di legno di platano (sia sano che necrotizzato/infecto) è sufficiente un gel d'agarosio all'1%. Caricare su gel 2 e 8 µl di estratto per ciascun campione. Per analizzare su gel un DNA di tipo genomico (sia organismo-specifico che meta-DNA) è sufficiente una breve corsa elettroforetica che consenta al DNA di entrare all'interno del gel e percorrere non più di 2-3 cm. Per visualizzare il DNA su gel utilizzare coloranti fluorescenti vocati allo scopo, di adeguata sensibilità e compatibili con il sistema di visualizzazione di immagine presente in laboratorio.

Di seguito i tamponi e le soluzioni necessarie per effettuare l'analisi elettroforetica:

---

**Tampone della corsa elettroforetica TAE 50X**

---

Tris-(idrossimetil)-amminometano	242 g
acido acetico glaciale	57.1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml

---

Portare ad 1 litro con H<sub>2</sub>O bidistillata  
 Autoclavare a 121°C per 20 min.

---



---

**Loading buffer 6X**

Da aggiungere ai campioni prima di caricarli su gel

---

Blu di bromofenolo	0,25%
Xilencianolo	0,25%
Glicerolo in H <sub>2</sub> O distillata	30%

---

Usare H<sub>2</sub>O bidistillata autoclavata a 121°C per 20 min  
 Conservare in frigo a 4°C

---

---

## 4. DATI DI VALIDAZIONE

### 4.1 Risultati della validazione

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati in maniera definitiva e/o preliminare i seguenti parametri utilizzando campioni di riferimento.

- **Sensibilità analitica**
- **Specificità analitica**
- **Sensibilità diagnostica**
- **Specificità diagnostica**
- **Selettività**
- **Ripetibilità**

**Campioni di riferimento *target*:** isolati che coprono la diversità genetica e la distribuzione geografica italiana del patogeno oggetto di rilevamento.

**Campioni di riferimento *non target*:** isolati fungini appartenenti a specie diverse da *C. platani* e noti per colonizzare il legno di platano sia come patogeni che come saprotrofi.

- **Sensibilità analitica** Gli esperimenti su diluizioni seriali di DNA genomico di *C. platani*, hanno stabilito che il metodo basato su EvaGreen e sonda Taqman sono in grado di rilevare fino a 10 fg di DNA di *C. platani* per reazione di PCR [cioè 0.5 fg/ $\mu$ l della reazione di PCR o 5 fg/ $\mu$ l del campione da analizzare (2  $\mu$ l)]. I Ct soglia sono risultati 35.1/34.7 per il saggio EvaGreen e 34.3/34.1 per Taqman (riportati i valori di 2 esperimenti, ogni valore è la media di tre replicati tecnici). Su vettore plasmidico contenente l'amplicone target, entrambi i saggi hanno rilevato fino a 100 ag di DNA per reazione di PCR, [cioè 5 ag/ $\mu$ l della reazione di PCR o 50 ag/ $\mu$ l del campione da analizzare (2  $\mu$ l)] (ag= attogrammi; 1ag=1/1000 fg). 100 ag corrispondono a 20 copie del target di amplificazione. I Ct soglia sono risultati: 36.9/37.2 per saggio EvaGreen e 36.8/36.6 per saggio Taqman (riportati i valori di 2 esperimenti, ogni valore è la media di tre replicati tecnici).
- **Specificità analitica** E' stata valutata per entrambi i metodi utilizzando come template il DNA genomico di campioni di riferimento *target* e *non target*. Campioni di riferimento *target*: sono stati rilevati positivamente 26 isolati di *C. platani* reperiti in diverse regioni italiane; Campioni di riferimento *non target*: sono stati esaminati 54 specie/isolati fungini colonizzatori del legno di platano, distinti da *C. platani* (collezione CRA-PAV), e per tutti non si è avuto alcun segnale di fluorescenza al di sopra della linea soglia (Tabella 2).

- **Sensibilità diagnostica** E' stata valutata per entrambi i metodi in due modi:
  - 1) Il rilevamento in 20 campioni legnosi prelevati dai Servizi Fitosanitari (Lazio, Emilia Romagna, Marche) da piante di platano mostranti sintomi di cancro colorato. *C. platani* è stato rilevato nel 100% dei campioni.
  - 2) Il rilevamento in 110 piante infettate artificialmente con *C. platani* e successivamente morte a causa della malattia (dunque da considerare piante sicuramente infette) ed in cui i campioni sono stati prelevati in tempi crescenti dalla morte delle piante, fino a 27 mesi. Sono state analizzate 10 piante per ciascun tempo. Questo esperimento è servito: i) per valutare la capacità dei metodi di rilevare il patogeno in comparazione con metodiche tradizionali - saggio microscopico e saggio carota - e ii) per valutare la capacità dei metodi di rilevare il patogeno in campioni di legno morto da lungo tempo. Con le metodiche Real-Time PCR, *C. platani* è stato rilevato in 109 campioni su 110. Le metodiche di Real-Time PCR hanno mostrato dunque una sensibilità diagnostica del 99.1%. I saggi tradizionali, invece, hanno mostrato una minore efficienza di rilevamento. In particolare: l'efficienza è stata del 100% solo fino a 1 mese dopo la morte delle piante, mentre nei successivi tempi è calata progressivamente. Nel caso del saggio carota si è annullata a 12 mesi dalla morte della pianta. Il saggio microscopico non è stato più effettuato dopo il tempo di 9 mesi (in cui è stato rilevato il 50% dei campioni), a causa della eccessiva durezza e secchezza del campione che rendeva non più attuabile il saggio stesso. Per dettagli su questo esperimento vedi tabella 3 e Pilotti *et al.* (2012). L'analisi della curva di melting del saggio EvaGreen ha sempre confermato i segnali di fluorescenza come specifici.
- **Specificità diagnostica** Con entrambi i metodi sono stati saggiati alcuni campioni di legno necrotico prelevato da piante di platano non infette da *C. platani* ma affette da altre malattie del legno. Per tali campioni non si è avuto alcun segnale di fluorescenza al di sopra della linea soglia.
- **Selettività** È stato verificato che il tempo che intercorre dopo la morte della pianta (fino a 27 mesi) non condiziona l'efficienza di rilevamento nel caso della Real-Time PCR (per entrambi i metodi). Al contrario nel caso del saggio microscopico e del saggio carota il trascorrere del tempo dopo la morte della pianta influisce negativamente sull'efficienza di rilevamento. Vedi anche "Sensibilità diagnostica" al pto (ii) e tabella 3.
- **Ripetibilità** Tutti gli esperimenti per lo sviluppo dei metodi sono stati ripetuti almeno due volte con simili risultati. Per ciascun campione sono stati saggiati tre replicati tecnici (curve standard per la valutazione della efficienza di amplificazione, la linearità dei dati, e la sensibilità analitica) o due replicati tecnici (esperimenti per la sensibilità diagnostica e la specificità analitica e diagnostica). La ripetibilità è stata confermata anche da una minima variabilità tra i replicati tecnici. La ripetibilità secondo le linee guida ISO/IEC standard 17025 (*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*) (EPPO, 2010), non è stata ancora valutata.

TABELLA 2 - Funghi colonizzatori del legno di platano (collezione CRA-PAN) utilizzati per valutare la specificità analitica dei metodi di Real-Time PCR, sviluppati per il rilevamento di *Ceratocystis platani*. I metodi si sono dimostrati altamente specifici in quanto, utilizzando come template il DNA genomico di tali specie fungine, non si è avuto alcun segnale di fluorescenza significativo (da Pilotti *et al.*, 2012)

Codice	Specie fungina	Sequenza identificativa (Numero di accessione in NCBI)	Codice	Specie fungina	Sequenza identificativa (Numero di accessione in NCBI)
FB.101	<i>Acremonium strictum</i>		FB.94	<i>Fusarium solani</i>	
Ag.Ae.1	<i>Agrocybe aegerita</i>		Ga.Re.1	<i>Ganoderma resinaceum</i>	
FB.87	<i>Alternaria</i> sp.		In.sp.1	<i>Inonotus</i> sp.	
FB.105	<i>Apiognomonia veneta</i>		In.sp.2	<i>Inonotus</i> sp.	
FB.74	<i>Arthrinium</i> sp.		FB.81	<i>Lewia infectoria</i>	
FB.95	Ascomycota		FB.61	<i>Mycocalicium victorinae</i>	
FB.23	Ascomycota		FB.43	<i>Nigrospora</i> sp.	
Au.Am.1	<i>Auriculariopsis ampla</i>		FB.77	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	
FB.102	<i>Bionectria ochroleuca</i>		FB.83	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	
Bi.Me.1	<i>Biscognauxia mediterranea</i>		FB.35	<i>Peyronellaea glomerata</i>	
FB.62	<i>Botryosphaeria obtusa</i>		FB.67	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>	
FB. 89	<i>Botryosphaeria parva</i>		FB.13	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	
Ch.Pu.1	<i>Chondrostereum purpureum</i>		FB.72	<i>Phaeosphaeria</i> sp.	
Cop.At.1	<i>Coprinopsis atramentaria</i>		FB.40	Phaeosphaeriaceae	
Cr.Su.1	<i>Cryptosphaeria subcutanea</i>		FB.33	<i>Phialemonium dimorphosporum</i>	
FB.25	<i>Cytospora</i> sp.		FB.97	<i>Phoma exigua</i>	
FB.30	Dothideomycetes		FB.58	<i>Phoma herbarum</i>	
FB.50	Dothideomycetes		FB.103	<i>Phoma macrostoma</i>	
FB.52	Dothideomycetes		FB.38	<i>Phoma</i> sp.	



Codice	Specie fungina	Sequenza identificativa (Numero di accessione in NCBI)	Codice	Specie fungina	Sequenza identificativa (Numero di accessione in NCBI)
FB.91	<i>Dothideomyces</i>		Phom.1	<i>Phomopsis</i> sp.	AY620999
FB.32	<i>Engyodontium album</i>		FB.80	Pleosporales	
E.L.1	<i>Eutypa lata</i>	AY620998	FB.45	Pleosporales	
Ella.S.1	<i>Eutypella scoparia</i>		FB.54	Pleosporales	
Ella.V.1	<i>Eutypella vitis</i>		FB.63	Pleosporales	
Fo.Fo.1	<i>Fomes fomentarius</i>	AY849306	FB.82	Pleosporales	
Flla.sp.1	<i>Fomitiporella</i> sp.		FB.16	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	
F.-FB.A	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	AY620997	Sp.Pa.1	<i>Spongipellis pachyodon</i>	AY849307

TABELLA 3 - Rilevamento di *C. platani* con metodi tradizionali e Real-Time PCR in piante infettate artificialmente e campionate in tempi diversi dopo la morte (da Pilotti *et al.*, 2012)

Tempi (numero di mesi dopo la morte)	0	1	2	3	4	5	6	9	12	18	27
Metodo di rilevamento <sup>a</sup>											
Saggio microscopico <sup>b</sup>	10/10	10/10	7/10	6/10	6/10	9/10	9/10	5/10	N.E.	N.E.	N.E.
Saggio carota	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	5/10	0/10	0/10
Real-Time PCR EvaGreen	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Real-Time PCR Taqman	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

<sup>a</sup> Il legno necrotico è stato campionato da dieci piante per ciascun tempo; quindi si riportano il numero di rilevamenti positivi su dieci; <sup>b</sup> N.E. = non effettuato (il legno era troppo duro e fragile per allestire il saggio correttamente)

## 4.2 Conclusioni

Saggio diagnostico	Caratteristiche
<p><b>Real-Time PCR per rilevare <i>Ceratocystis platani</i> in legno di platano infetto</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Metodo EvaGreen</li> <li>2. Metodo sonda Taqman</li> </ol>	<p>Elevata sensibilità analitica</p> <p>Massima sensibilità diagnostica</p> <p>Elevata ripetibilità</p> <p>Elevata capacità di mantenere inalterata ed elevata l'efficienza di amplificazione anche in campioni di legno devitalizzati da lungo tempo</p> <p>Massima specificità analitica (in base ai numerosi campioni testati)</p> <p><b>Entrambi i metodi si sono mostrati egualmente validi. Si consiglia l'uso del metodo EvaGreen poichè è meno costoso e richiede una operatività più semplice dovuta al non-uso della sonda</b></p> <p>Tempi di esecuzione: i risultati della diagnosi si ottengono con agio all'interno di una giornata di lavoro di un operatore che prevede l'estrazione di circa 15-20 campioni e la successiva analisi in Real-Time PCR. Se si deve estrarre un numero superiore di campioni si consiglia di effettuare in giornate diverse l'estrazione del DNA e l'analisi Real-Time PCR. Generalmente quest'ultima (preparazione delle reazioni, caricamento ed effettuazione del ciclo termico) richiede all'incirca 2 ore.</p>

## 5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BARNES I., J. ROUX, B.D. WINGFIELD, M.J. DUDZINSKY, K.M. OLD, M.J. WINGFIELD, 2003. *Ceratocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. *Mycology*, **95**, 865–871.
- CLERIVET A., C. EL MODAFAR, 1994. Vascular modification in *Platanus acerifolia* seedlings inoculated with *C. fimbriata* f. sp. *platani*. *Forest Pathology*, **24**, 1-10.
- CRISTINZIO M., F. MARZIANO, R. VERNEAU, 1973. La moria del platano in Campania. *Rivista di Patologia Vegetale*, S IV. **9**, 189-214.
- D'AMBRA V., M. FERRATA, 1975. Modalità di diffusione di *Ceratocystis fimbriata* in tessuti di platano. *Rivista di Patologia Vegetale*, S IV. **11**, 51-58.
- D'AMBRA V., M. FERRATA, B. PETROLINI BALDAN, 1977. Growth and behaviour of *Ceratocystis fimbriata* in Plane-tree tissues. *Forest Pathology*, **7**, 351-357.
- EL MODAFAR C., A. CLERIVET, J.J. MACHEIX, 1996. Flavan accumulation in stems of *Platanus x acerifolia* seedlings inoculated with *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, the canker stain disease agent. *Canadian Journal of Botany*, **74**, 1982-1987.
- ENGELBRECHT C.J.B., T.C. HARRINGTON, J. STEIMEL, P. CAPRETTI, 2004. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Molecular Ecology*, **13**, 2995-3005.
- ENGELBRECHT C.J.B., T.C. HARRINGTON, 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycology*, **97**, 57-69.
- EPPO DIAGNOSTIC PM 7/98, 2010. Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *OEPP/EPPO Bulletin*, **40**, 5–22.
- FERRATA M., 1979. Osservazioni sulla tillosi indotta in platano da *Ceratocystis fimbriata* (Ell. et Halst.) Davidson f. *platani* Walter. *Rivista di Patologia Vegetale*, S IV. **15**, 21-27.
- GROSCLAUDE C., R. OLIVIER, J.C. PIZZUTO, C. ROMITI, 1991. Etude experimentale du transport de l'inoculum de *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* par l'eau d'une riviere. *Forest Pathology*, **21**, 168-171.
- JACKSON L.W.R., B. SLEETH, 1935. A new disease affecting *Platanus orientalis* in the Eastern United States. *Phytopathology*, **25**, 22.
- JOHNSON J.A., T.C. HARRINGTON, C.J.B. ENGELBRECHT, 2005. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycology*, **97**, 1067-1092.
- MCCRACKEN F.I., E.C. BURKHARDT, 1977. Destruction of sycamores by canker stain in the midsouth. *Plant Disease Report*, **61**, 984-986.
- MOLLER W.J., J.E. DE VAY, 1968. Carrot as species selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, **58**, 123-124.
- MUTTO ACCORDI S., M. FERRATA, V. D'AMBRA, 1978. Ricerche al microscopio elettronico sul legno di platano invaso da *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Phytopathologische Zeitschrift*, **91**, 39-51.
- MUTTO ACCORDI S., 1986. Diffusione di *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* attraverso le anastomosi radicali. *Informatore Fitopatologico*, **36**, 53–58.

- OEPP/EPPO, 1986. Data sheets on quarantine organisms No. 136, “*Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*”. *OEPP/EPPO Bulletin*, **16**, 21-24.
- OEPP/EPPO, 2003. Data sheets on quarantine organisms Vol. 33 No. 2, PM 7/14(1) “Diagnostic protocols for regulated pests: *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*” (protocol drafted by Annesi T, Motta E and Pilotti M). *OEPP/EPPO Bulletin*, **33**, 249-255.
- OCASIO-MORALES R.G., P. TSOPELAS, T.C. HARRINGTON, 2007. Origin of *Ceratocystis platani* on native *Platanus orientalis* in Greece and its impact on natural forests. *Plant Disease*, **91**, 901-904.
- PANCONESI A., 1999. Canker stain of plane trees: a serious danger to urban plantings. *Journal of Plant Pathology*, **81**, 3-15.
- PERRY E., A.H. McCAIN, 1988. Incidence and management of canker stain in London plane trees in Modesto, California. *Journal of Arboriculture*, **14**, 18–19.
- PILOTTI M., 2002. Le avversità del platano. *Informatore Fitopatologico*, **52**, 9-24.
- PILOTTI M., A. BRUNETTI, L. TIZZANI, O. MARANI, 2009. *Platanus 'acerifolia* genotypes surviving to inoculation with *Ceratocystis platani* (the agent of canker stain): first screening and molecular characterization. *Euphytica*, **169**, 1-17.
- PILOTTI M., V. LUMIA, G. DI LERNIA, A. BRUNETTI, 2012. Development of Real-Time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, **134**, 61–79.
- VAN WYK M., A.O. AL ADAWI, I.A. KHAN, M.L. DEADMAN, A.A. AL JAHWARI, B.D. WINGFIELD, R. PLOETZ, M.J. WINGFIELD, 2007. *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. *Fungal Diversity*, **27**, 213-230.
- VIGOUROUX P.A., B. STOJADINOVIC, 1990. Possibilités d’infection du platane par *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* après contamination de l’eau où se développent des racines blessées. *Forest Pathology*, **20**, 118–121.
- VIGOUROUX A., R. OLIVIER, 2004. First hybrid plane trees to show resistance against canker stain (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*). *Forest Pathology*, **34**, 307-319.
- WALTER J.M., 1946. Canker stain of planetrees. USDA Circular, no. 742. Washington DC.
- WALTER J.M., E.G. REX, R. SCHREIBER, 1952. The rate of progress and destructiveness of canker stain of plane-trees. *Phytopathology*, **42**, 236–239.

## ALLEGATO I Strumentazione, materiali e reagenti

### Strumentazione

1. Agitatore magnetico
2. Alimentatore per celle elettroforetiche
3. Autoclave e/o Stufa
4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Bilancia analitica
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
7. Celle elettroforetiche orizzontali
8. Centrifuga da bancone per provette tipo Eppendorf
9. Distillatore
10. Frigorifero e congelatore
11. Macchina di Real-Time PCR CFX-96 BIO-RAD. Qualsiasi altra macchina per analisi di Real-Time PCR è in teoria utilizzabile purchè in grado di emettere e rilevare luce alle lunghezze d'onda specificate per EvaGreen, 6-FAM e BHQ1 (vedi paragrafo "Caratteristiche tecniche della Real-Time PCR - Spettri di assorbimento ed emissione dei fluorofori utilizzati")
12. Micropipette dedicate all'estrazione di acidi nucleici e calibrate (P2, P20, P100, P200, P1000)
13. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P2, P20, P100, P200, P1000)
14. Misuratore di pH
15. Sistema di imaging per visualizzare i risultati delle analisi elettroforetiche (Es. GelDoc di BIO-RAD)
16. Spettrofotometro (o nanodrop)
17. Vortex

### Reagenti

1. Agarosio
2. Bromuro di etidio
3. Controllo positivo: DNA genomico di *Ceratocystis platani*
4. Controllo positivo: DNA estratto da legno di platano infetto con *Ceratocystis platani*
5. Controllo negativo: DNA genomico di platano sano (non infetto con *Ceratocystis platani*)
6. Kit commerciale per estrazione DNA: DNeasy® Plant Mini Kit, QIAGEN (Cat. No. 69104)
7. Reagenti chimici per elettroforesi su gel d'agarosio [Tris-(idrossimetil)-amminometano, acido acetico, EDTA, Blu di bromofenolo, Xilenecianolo, Glicerolo, Etidio bromuro]
8. Supermix per metodo EvaGreen: SsoFast™ EvaGreen® Supermix BIO-RAD

9. Supermix per metodo Taqman: SsoFast™ Probes Supermix BIO-RAD
10. Primers e sonda specifici per *Ceratocystis platani*

### **Materiali**

1. Acqua bidistillata sterile nucleasi-*free*
2. Azoto liquido
3. Bustine di plastica per raccolta campioni legnosi
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 per Real-Time PCR
8. Provette tipo Eppendorf da 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*