

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
GIBBERELLA CIRCINATA SU SEME**

T. ANNESI, D. DE SIMONE

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	227
1.1 Introduzione	227
1.2 Sintomatologia	228
1.3 Morfologia	228
1.4 Epidemiologia	228
1.5 Normativa Fitosanitaria	229
2. METODI DI CAMPIONAMENTO	229
3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	230
3.1 Premessa	230
3.2 Diagramma di flusso	232
3.3 Isolamento da seme (A) ed identificazione morfologica (A1)	232
3.4 Isolamento da seme (A) ed identificazione molecolare (A2)	237
3.5 Arricchimento ed estrazione DNA per analisi diretta da seme (B)	241
3.6 Analisi diretta da seme con PCR convenzionale (B1)	242
3.7 Analisi diretta da seme con dual-labelled probe real time PCR (B2)	244
4. DATI DI VALIDAZIONE	247
5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	251
Allegato I - Strumentazione, materiali, reagenti e substrati necessari	252

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Gibberella circinata</i> Nirenberg and O'Donnell 1998 (teleomorfo) <i>Fusarium circinatum</i> Nirenberg and O'Donnell 1998 (anamorfo)
Tassonomia	<i>Fungi – Ascomycota - Hypocreales - Gibberella</i> (teleomorfo) <i>Fungi - Mitosporic fungi – Tuberculariales – Fusarium - section Liseola</i> (anamorfo)
Avversità	Cancro resinoso del pino
Sinonimi	<i>Fusarium subglutinans f. sp. pini</i> Hepting; <i>F. moniliforme</i> Sheldon var. <i>subglutinans</i> Wollenweber <i>F. lateritium f. sp. pini</i> Hepting; <i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenweber & Reinking) Nelson et al. <i>f. sp. pini</i> Correll et al. 1991

1.1 Introduzione

Gibberella circinata è responsabile della malattia conosciuta come “Cancro resinoso del pino” registrata per la prima volta nel 1946 negli USA (Nord Carolina) su *Pinus* spp. Il patogeno può infettare numerose specie di *Pinus* e *Pseudotsuga menziesii* e la sua presenza è stata segnalata sia in vivaio che in foresta. In Nord America i principali ospiti nativi includono *Pinus elliottii*, *Pinus palustris*, *Pinus patula*, *Pinus radiata*, *Pinus taeda*, *Pinus virginiana*, *Pinus contorta* e *Pinus strobus*. In Europa, dal 2004 ad oggi, il patogeno è stato segnalato su *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus radiata* e *Pseudotsuga menziesii* (Tabella 1). *G. circinata* è presente anche in Messico, in America centrale (Haiti), in sud America (Cile), in Africa (Sud Africa) ed in Asia.

TABELLA 1 - Stati dell'UE in cui è stata segnalata la presenza del patogeno e rispettivi ospiti

Specie	Nazione	Bibliografia
<i>Pinus radiata</i>	Spagna, Portogallo	Landeras et al., 2005; Bragança et al., 2009
<i>Pinus halepensis</i>	Italia	Carlucci et al., 2007
<i>Pinus pinaster</i>	Spagna, Portogallo	Landeras et al., 2005; Bragança et al., 2009
<i>Pinus nigra</i>	Spagna	Pérez-Sierra et al., 2007
<i>Pinus pinea</i>	Spagna, Italia	Carlucci et al., 2007
<i>Pinus sylvestris</i>	Spagna	Perez-Sierra et al., 2007
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Francia	EPO, 2009a

1.2 Sintomatologia

Possono essere colpite dal patogeno piante in qualsiasi stadio di sviluppo: piantine in vivaio o piante adulte.

In vivaio: *Gibberella circinata* può essere presente sia nei tessuti del seme (**seed-borne**) che sulla superficie esterna come contaminante, o nel terreno (**soil-borne**). In vivaio, quindi, il patogeno può causare **morie nei semenzali** in pre o post-emergenza (“damping-off”) o produrre necrosi sulle radici e al colletto di **giovani piantine**, con successivo disseccamento degli aghi. Sotto la corteccia, in prossimità del colletto, si possono osservare tessuti imbruniti ed impregnati di resina. È importante ricordare che si tratta di patologie alle quali possono contribuire con gli stessi sintomi anche altre specie di patogeni fungini presenti nel terreno.

Piante adulte: Sulle **piante adulte** il sintomo più caratteristico è il **cancro** che si può sviluppare sia sul tronco che sulle branche, **con abbondante produzione di resina che impregna anche il legno sottostante** e può provocare il disseccamento dei germogli apicali e degli aghi al di sopra del punto di infezione (diventano clorotici poi rossi, quindi bruni). I vecchi cancri possono essere osservati durante tutto l’anno. Il patogeno può infettare anche grandi radici esposte e danneggiate da ferite con un conseguente generale deperimento della pianta (EPPO diagnostic protocol for *Gibberella circinata* - EPPO, 2009b).

1.3 Morfologia

Le caratteristiche morfologiche micro-macroscopiche di *Fusarium circinatum* sono dettagliatamente descritte da Nirenberg & O’Donnell (1998) e Britz *et al.* (2002). Le colonie di *F. circinatum* su Potato Dextrose Agar mostrano una crescita media di 4,7 mm/gg a 20 C°. Il micelio aereo è pressoché bianco, un pigmento violetto o porpora scuro diffonde dal centro della colonia. In coltura, su substrato Spezieller-Nährstoffarmer Agar, produce abbondanti macroconidi e microconidi. I macroconidi sono tipicamente 3-settati, leggermente ricurvi, 32–48 x 3,3–3,8 µm; i microconidi sono obovoidi, principalmente non settati, talvolta con un setto, aggregati in false teste. Possono essere presenti conidiofori mono e polifalidici. Caratteristica distintiva per la specie è la presenza di ife sterili attorcigliate; le clamidospore sono assenti.

1.4 Epidemiologia

Localmente la dispersione del patogeno può avvenire attraverso microconidi e macroconidi ad opera del vento, di insetti, uccelli o per spostamenti di terreno.

In nuove aree la dispersione può aver luogo attraverso la commercializzazione di seme infetto, o contaminato esternamente, o di materiale vegetale infetto destinato alla piantagione. Il patogeno può sopravvivere per uno o più anni anche nel legno infetto.

1.5 Normativa fitosanitaria

Gibberella circinata è inserita nella lista A2 dell'EPPO. Il patogeno è soggetto alla Decisione della Commissione 2007/433/EC del 18 giugno 2007 che prevede "Misure d'emergenza provvisorie per impedire l'introduzione e la diffusione nella Comunità di *Gibberella circinata*". In particolare definisce la movimentazione di vegetali del genere *Pinus* L., e della specie *Pseudotsuga menziesii* destinati alla piantagione, compresi semi e coni utilizzati ai fini della moltiplicazione (GU 22.6.2007 L161/66)

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:161:0066:0069:IT:PDF>

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Il numero dei semi da analizzare in un lotto per rilevare il patogeno deve essere stabilito con criteri statistici. A tale proposito, si possono consultare le tabelle 1 e 2 riportate in ISPM no. 31 *Methodologies for sampling of consignments* (IPPC 2008), che indicano il numero dei semi da analizzare in relazione alla taglia del lotto, al livello di confidenza (P) e ai diversi livelli di contaminazione che si vogliono rilevare nel lotto stesso. Il numero di semi varierà anche in funzione del metodo scelto per l'identificazione del patogeno. Ad esempio l'ISTA, relativamente al metodo che prevede la posa dei semi su piastra, propone un campione di 400 semi (ISTA, 2011). Per ovviare alla conta dei semi, procedura laboriosa, il campione da analizzare può essere ottenuto pesando gli stessi. A tale scopo, si può consultare la tabella 2, sotto riportata, tratta dal protocollo EPPO PM 7/91 (1) 2009b, che indica il peso medio di 1000 semi di molte specie di *Pinus* e di *Pseudotsuga menziesii* (accertarsi che non ci siano state perdite di peso durante la conservazione). I semi da analizzare non dovranno essere sterilizzati in quanto *Gibberella circinata* può essere presente sia all'interno del seme che sulla superficie esterna. Si ricorda che gli strumenti utilizzati per il prelievo e il conteggio dei semi devono essere accuratamente disinfettati (con soluzioni concentrate di ipoclorito di sodio o passati alla fiamma) nella fase di passaggio tra un prelievo e l'altro per evitare di contaminare i campioni di diversa provenienza.

I diversi campioni di seme devono essere confezionati singolarmente in sacchetti di plastica ed identificati con etichette poste all'interno ed all'esterno della confezione.

Meno tempo intercorre tra il prelievo dei campioni e la lavorazione in laboratorio e maggiori sono le possibilità di rilevare *G. circinata*. In alternativa, i campioni devono essere conservati a basse temperature (4-10°C).

TABELLA 2 - Peso medio di 1000 semi di diverse specie di *Pinus* e *Pseudotsuga*.

Specie	Peso indicativo (g)	Specie	Peso indicativo (g)
<i>Pinus aristata</i>	22	<i>Pinus mugo</i> subsp <i>Pumilio</i>	6
<i>Pinus armandi</i>	245	<i>Pinus nigra</i> subsp <i>koekelare</i>	21
<i>Pinus banksiana</i>	4	<i>Pinus nigra</i> var <i>austriaca</i>	20
<i>Pinus bungeana</i>	130	<i>Pinus nigra</i> var. <i>calabrica</i>	18
<i>Pinus brutia</i>	53	<i>Pinus nigra</i> var. <i>corsicana</i>	15
<i>Pinus canariensis</i>	120	<i>Pinus nigra</i> subsp. <i>salzmannii</i>	16
<i>Pinus cembra</i>	350	<i>Pinus palustris</i>	75
<i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i>	5	<i>Pinus parviflora</i>	125
<i>Pinus coulteri</i>	330	<i>Pinus pinaster</i>	55
<i>Pinus eldarica</i>	62	<i>Pinus pinea</i>	95
<i>Pinus densiflora</i>	18	<i>Pinus ponderosa</i>	42
<i>Pinus gerardiana</i>	295	<i>Pinus pumila</i>	105
<i>Pinus griffithi</i>	58	<i>Pinus radiata</i>	29
<i>Pinus halepensis</i>	18	<i>Pinus rigida</i>	7
<i>Pinus jeffreyi</i>	110	<i>Pinus strobus</i>	14
<i>Pinus koraiensis</i>	460	<i>Pinus sylvestris</i>	7
<i>Pinus lambertiana</i>	300	<i>Pinus tabuliformis</i>	32
<i>Pinus leucodermis</i>	25	<i>Pinus taeda</i>	27
<i>Pinus montanauncinata</i>	9	<i>Pinus thunbergii</i>	14
<i>Pinus uncinata</i>	19	<i>Pinus wallichiana</i>	50
<i>Pinus mugo</i> subsp <i>mugo</i>	7	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	13

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

3.1 Premessa

Gibberella circinata può essere identificata sulla base di parametri morfologici delle colonie o attraverso metodi molecolari, ovvero combinando sia l'aspetto morfologico sia quello molecolare. Si ribadisce che diversi fattori biotici e abiotici possono causare sintomi simili a quelli prodotti da *G. circinata*, la corretta determinazione dell'agente causale dovrà quindi essere supportata da analisi di laboratorio che prevedono per la diagnosi da seme e da pianta l'utilizzo di diverse metodologie descritte nel protocollo EPPO PM 7/91 (1) del 2009) (EPPO 2009b).

La scelta dei metodi da validare in questo protocollo (secondo i parametri ISO 16140:2003, EPPO Diagnostic PM7/98) è scaturita da un'attenta rivisitazione delle metodiche riportate nel protocollo EPPO PM7/91 (1) (2009b) e della bibliografia prodotta sull'argomento (Ioos *et al.* 2009).

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

- **Sensibilità analitica**
- **Sensibilità diagnostica**
- **Specificità diagnostica**
- **Accuratezza relativa**
- **Ripetibilità**
- **Riproducibilità**

La definizione del parametro di riproducibilità è stata conseguita, solo per il metodo A1 (vedi in seguito) ed il metodo A2 (vedi in seguito), con l'effettuazione di un *ring test* nazionale eseguito presso i seguenti laboratori:

- 1- SFR Campania, Referente Dr. ssa Paola Sprigno
- 2- SFR Emilia Romagna, Referente Dr. ssa Carla Montuschi
- 3- SFR Piemonte, Referente Dr. Giannino Giannetti
- 4- SFR Veneto, Referente Dr. Alberto Saccardi
- 5- CRA-PAV Roma, Referente Dr.ssa Tiziana Annesi

La semente utilizzata nelle prove è stata gentilmente fornita dal Corpo Forestale dello Stato - Ufficio Territoriale per la Biodiversità di Pieve S. Stefano (AR).

I metodi selezionati e validati in questo protocollo sono i seguenti:

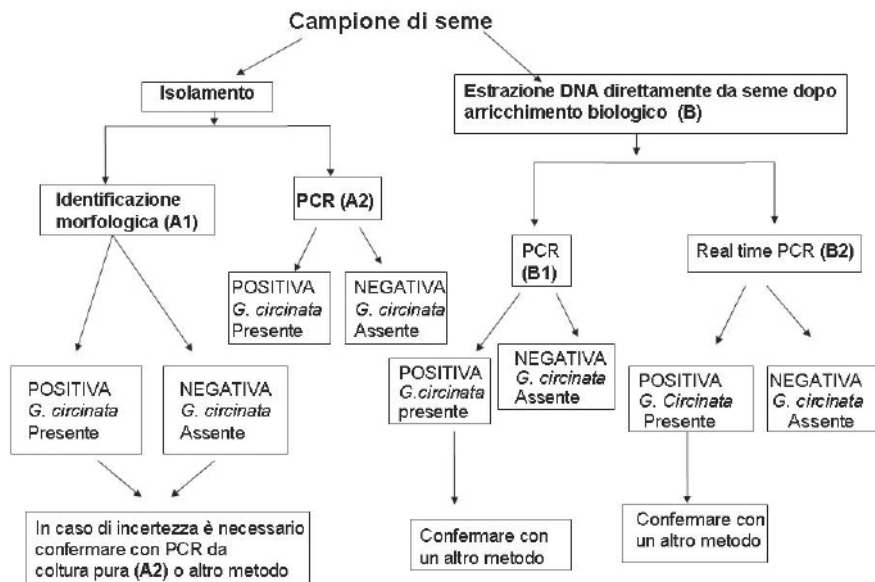
A. Isolamento del patogeno su substrato semiselettivo seguito da:

- A1. Identificazione morfologica
- A2. Identificazione molecolare con PCR convenzionale

B. Analisi diretta da seme dopo la procedura di arricchimento biologico (Ioos *et al.*, 2009):

- B1 PCR convenzionale
- B2. Dual-labelled probe Real-time PCR

3.2 Diagramma di flusso



3.3 isolamento da seme (a)- identificazione Morfologica (a1)

Strumentazione, materiali, reagenti e substrati sono riportati in allegato I

Procedura

Prepare il substrato DCPA e procedere all'isolamento del patogeno dal seme:

Isolamento di *Fusarium circinatum* dal seme

Il seme deve essere testato tal quale, senza alcun trattamento superficiale.

- Posare i semi (almeno 400 semi/campione) in piastre Petri (mediamente 10 semi in ciascuna piastra ma il numero può variare in base alle dimensioni del seme) contenenti il substrato selettivo DCPA (Foto 1).
- Incubare le piastre a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) e luce alternata (fotoperiodo di circa 12 ore)
- Durante l'incubazione **effettuare osservazioni periodiche e frequenti**. Trasferire prontamente tutte le colonie riferibili a *Fusarium* spp in piastre Petri contenenti PDA e in piastre Petri contenenti il substrato SNA. Incubare le colture

a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) ed effettuare osservazioni dopo circa 8-10 giorni.

L' **identificazione morfologica** è basata sulle descrizioni di Nirenberg and O'Donnell (1998) e Britz *et al.*, (2002) brevemente schematizzate:

Caratteristiche morfologiche su PDA

Le colonie presentano il micelio aereo pressochè bianco con colorazione viola al centro (Foto 2),

Caratteristiche morfologiche microscopiche sul substrato SNA (esaminare sia i preparati su vetrino che direttamente la piastra al microscopio ottico x 100 -200)

a) Ife sterili “attorcigliate” distintive per la specie (Foto 3-4). In realtà le Ife sterili attorcigliate sono prodotte anche da *F. pseudocircinatum*, specie Africana, ma le due specie possono essere distinte in quanto *F. pseudocircinatum* produce corte false catene quando si sviluppa al buio a 20°C (Nirenberg & O'Donnell 1988).

b) **Microconidi** obovoidi, principalmente non settati, talvolta con un setto, aggregati in false teste, abbondanti, non sono portati in catena (Foto 5).

c) **Conidiofori** mono e polifialidici (Foto 6).

d) **Macroconidi** con cellula apicale curva e cellula basale poco sviluppata. Solitamente con tre setti, $32-48 \times 3,2 \times 3,8 \mu\text{m}$. Spesso difficili da trovare.

e) Le **clamidospore** sono assenti.

Valutazione dei risultati

Per una corretta identificazione le caratteristiche sopra descritte devono essere tutte verificate.

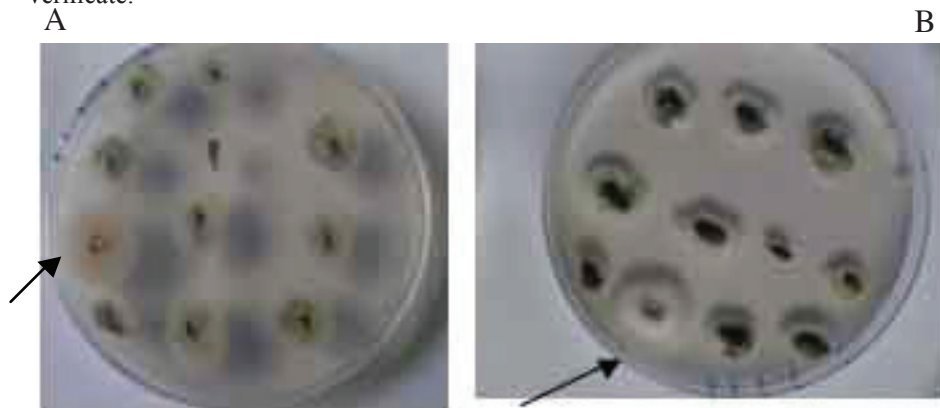


Fig. 1 - Colonia di *Fusarium circinatum* su DCPA: retro (A) con sfumature color salmone e fronte (B) della piastra.



Fig. 2 - Colonia di *Fusarium circinatum* su PDA: fronte (A) e retro (B) della piastra.

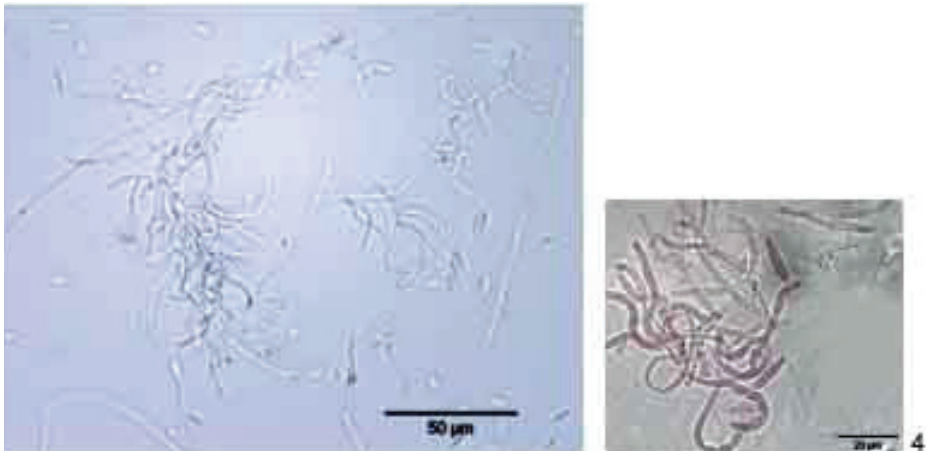


Fig. 3-4 - Ife sterili attorcigliate

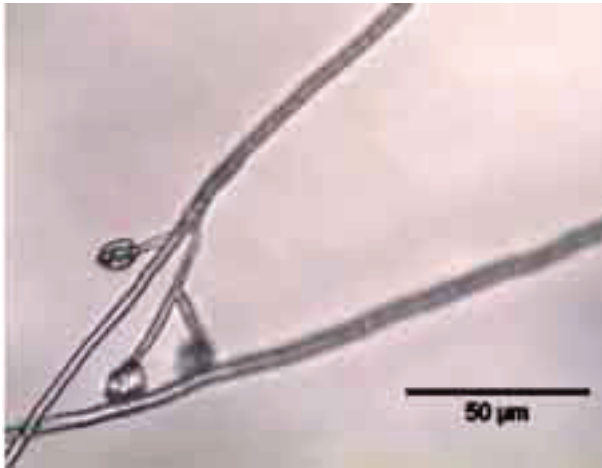


Fig. 5. - Microconidi aggregati in false teste (x200)

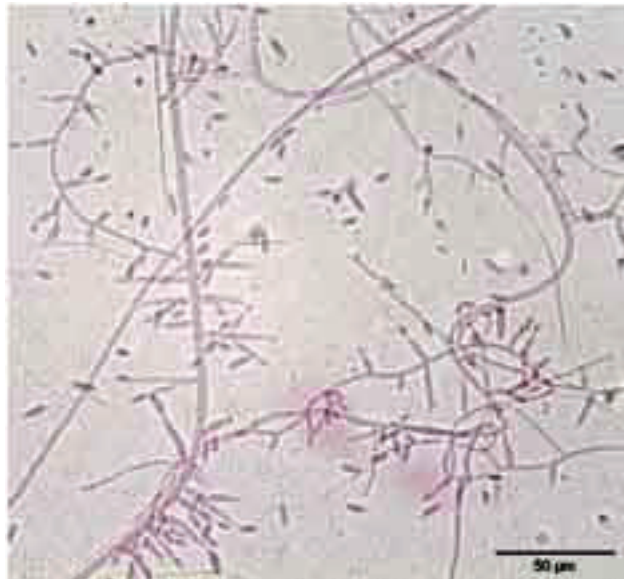


Fig. 6. - Conidiofori (monofialidi e polifialidi)

Caratteristiche e punti critici del protocollo

Il DCPA è un substrato efficace per isolare colonie di *Fusarium* spp. ma altre colonie fungine si possono moderatamente sviluppare. Relativamente ai semi di *P. pinea* è stato osservato, nelle nostre condizioni, uno sviluppo di contaminanti superiore alle altre specie e, date anche le dimensioni, si consiglia di non incubare più di 5 semi/piastra.

È, inoltre, importante porre attenzione nella preparazione del substrato, utilizzando i prodotti e le dosi indicate, altrimenti lo sviluppo dei funghi ubiquitari eventualmente presenti sui semi potrebbe ostacolare l'isolamento di *Fusarium* spp e la successiva identificazione

Per la successiva identificazione morfologica di *F. circinatum* è **indispensabile che l'operatore abbia ottima competenza nello specifico**, altrimenti può esserci il rischio che vengano rilevati falsi positivi o falsi negativi. L'identificazione molecolare con PCR dovrà, comunque, essere sempre eseguita **in caso di risultato dubbio**.

Il metodo non richiede costose attrezzature ma è molto laborioso (ad esempio per preparazione dei substrati, per la posa dei semi su DCPA).

Il completamento di tutte le fasi richiede almeno 16-18 gg.

È riportato in letteratura (Storer *et al.*, 1998) che il metodo della posa dei semi su agar potrebbe non essere in grado di rilevare eventuali propaguli quiescenti del fungo all'interno del seme.

3.4 Isolamento da seme (A) - identificazione molecolare (A2)

Strumentazione, materiali e reagenti necessari sono riportati in allegato I

Estrazione del DNA

Nelle nostre prove il Nucleospin Plant II ® ha dato buoni risultati (un Kit di estrazione che dimostri di essere equivalente in qualità e quantità di DNA estratto può essere utilizzato). Nel caso in cui si utilizzi il kit Nucleospin Plant II ® procedere secondo le indicazioni del protocollo del kit integrate con quanto riportato sotto:

Inserire tra i campioni anche un controllo negativo costituito da acqua distillata sterile microfiltrata. Questo permetterà di accertare (nella successiva PCR convenzionale o Real time-PCR) l'assenza di contaminazioni durante le fasi di estrazione.:

Punto 5.1 del manuale: "Standard protocol for genomic DNA":

IMPORTANTE: ricordarsi di scaldare il buffer PE a 70°C

Step 1 Raccogliere in una eppendorf circa 100 mg di micelio (o circa 100 µl)

Step 2a Aggiungere 400 µl di tampone di lisi PL1 (invece di PL2) e 10 µl di RNAsy ed incubare a 65°C per circa 30 min.

Step 2b No

Step 3 Centrifugare per 5 min a 11000 x g prima di trasferire il surnatante nella colonnina viola.
Trasferire il surnatante in NucleoSpin® Filter (viola).
Centrifugare per 2 min a 11000 x g

Step 4 Eliminare la colonnina viola, aggiungere 450 ml di buffer PC e pipettare più volte su e giù per 5 volte.

Step 5 Trasferire un massimo di 700 ml della mix dello step 4 nelle colonnine nucleospin Plant II Column (verdi), centrifugare a 11000 g per 1 minuto. Eliminare il liquido passato attraverso la colonna. Nel caso in cui la mix sia superiore a 700 ml ripetere lo step 5.

Step 6 Aggiungere 400 ml di tampone PW1, centrifugare 1 minuto a 11000 g

gettare il liquido passato attraverso la colonna.
 Aggiungere 700 ml di tampone PW2 centrifugare a 11000 x g per 1 minuto
 e gettare il liquido passato attraverso la colonna.
 Aggiungere infine 200ml di buffer PW2, centrifugare a 11000 x g per 2
 minuti, trasferire quindi la colonnina verde in una eppendorf da 1,5 ml.

Step 7 Aggiungere nella colonnina verde 50 ml di buffer PE (alla temperatura di 70°C) ed incubare a 70°C per 5 minuti Effettuare un solo passaggio di eluizione con 50 ml di buffer PE al posto di due passaggi. Centrifugare a 11000 x g per 1 minuto per separare il DNA.

PCR convenzionale

IMPORTANTE: prima di iniziare le procedure per la PCR quantificare il DNA estratto e calcolare il volume (µl) necessario per avere una quantità di DNA templato compresa tra 5-10 ng.

Primer CIRC1A: CTT GGC TCG AGA AGG G

Primer CIRC4A: ACC TAC CCT ACA CCT CTC ACT

I primers possono essere ordinati a ditte preposte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. È conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 100 mM in acqua distillata microfiltrata sterile per biologia molecolare e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote alla concentrazione di 10 mM in H₂O distillata microfiltrata sterile per biologia molecolare e conservarle a -20 °C.

Componenti	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per singola provetta (µl)
PCR buffer	10X	1x	2,5
MgCl ₂	20 mM	2,0	2,0 (*)
dNTPs	10 mM	0,25 mM	0,625
Primer CIRC1A	10 µM	0,5 µM	1,25
Primer CIRC4A	10 µM	0,5 µM	1,25
Taq polimerasi	5 U/µl	0,05 U/µl	0,25
DNA templato		5-10 ng	da determinare
H ₂ O			portare a 25

(*) Attenzione la quantità può variare se MgCl₂ è presente nel tampone. Non si deve aggiungere se si utilizza Fermentas DreamTaq polymerase.

1. La master mix va opportunamente mescolata con il vortex e riportata sul mon-

- do della provetta con un breve passaggio alla centrifuga (mini spin).
2. Distribuire la master mix in ciascuna provetta di PCR tenuta in ghiaccio.
 3. Aggiungere i μl di DNA template calcolati (il volume finale di ogni provetta di PCR sarà 25 μl)
 4. Utilizzare come **controllo positivo** il DNA del fungo estratto da una colonia di sicura identificazione e quantificato.
 5. Aggiungere acqua filtrata sterile in quantità pari al DNA template nella provetta utilizzata come **controllo negativo** (senza DNA).

Impostare le seguenti condizioni di reazione:

1. 94°C per 3 min
 2. 94°C per 35 s
 3. 66°C per 55 s
 4. 72°C per 50 s
- Gli step da 2 a 4 sono ripetuti per 37 cicli
5. 72°C per 12 min

Elettroforesi su gel di agarosio

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

TAE 10X	
Trizma base	48,4 g
Acido acetico glaciale	11,4 ml
EDTA 0,5M pH8/8,5	20 ml
Portare a 1 litro con H ₂ O distillata	
Autoclavare	

Loading buffer: 6x DNA loading Dye Fermentas

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

1. Preparare il gel di agarosio 1% in TAE 1X.
2. Dare una breve centrifugata alle provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento dell'apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
3. Caricare complessivi 6 ml per campione (5 ml di amplificato + 1 ml di loading buffer 6x). Cambiare il puntale ad ogni campione.
4. Caricare in un pozzetto il DNA marker idoneo (100 bp).

5. Correre per circa 60-90 minuti a 80 volt con un vassoio da 10 cm alloggiato in una cella elettroforetica midi ovvero correre per circa 60 minuti a 100 volt con un vassoio da 20 cm (double deck gel) alloggiato in una cella maxi. Si faccia riferimento al fronte del colorante per stimare l'avanzamento dei campioni.
6. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per circa 15/30 minuti in una soluzione di Bromuro di Etidio (0,5µg/ml) oppure nel colorante Gel Red, seguendo le indicazioni della ditta produttrice.
7. Lavare il gel per circa 5 minuti in acqua.
8. Osservare il gel mediante un transilluminatore U.V. e fotografarlo

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 360 bp. La banda dovrà essere alla stessa altezza della banda del controllo positivo. Nessuna banda dovrà essere evidenziata nel controllo negativo.

Caratteristiche e punti critici del protocollo

Il DCPA è un substrato efficace per isolare colonie di *Fusarium* spp. ma altre colonie fungine si possono moderatamente sviluppare. Relativamente ai semi di *P. pinea* è stato osservato, nelle nostre condizioni, uno sviluppo di contaminanti fungini superiore alle altre specie e, date anche le dimensioni, si consiglia di non incubare più di 5 semi/piastra.

È, inoltre, importante porre attenzione nella preparazione del substrato, utilizzando i prodotti e le dosi indicate, altrimenti lo sviluppo dei funghi ubiquitari eventualmente presenti sui semi potrebbe ostacolare l'isolamento di *Fusarium* spp

La successiva identificazione molecolare del patogeno, basata sull'estrazione del DNA da coltura pura (PDA) e PCR, permette di ridurre notevolmente il rischio di rilevare falsi positivi o falsi negativi per errata o dubbia identificazione morfologica.

Il metodo è laborioso nella preparazione dei substrati e nella posa dei semi su DCPA.

Il tempo di esecuzione richiede almeno 12-14 gg.

È riportato in letteratura (Storer et al., 1998) che il metodo della posa dei semi su agar potrebbe non essere in grado di rilevare propaguli quiescenti del fungo all'interno del seme.

3.5 Analisi diretta da seme arricchimento biologico estrazione del dna (B)

Strumentazione, materiali e reagenti necessari sono riportati in allegato I Arricchimento biologico (Ioos *et al.*, 2009)

Il campione da analizzare deve essere disposto in un contenitore sterile (Easy flask, Nunc, Roskilde, Denmark o in beute di vetro Pyrex/Duran), le cui dimensioni varieranno in base alla grandezza e al numero di semi da testare, tenuto conto che i semi dovrebbero essere possibilmente distribuiti in un solo strato o, in uno strato sottile. Aggiungere, quindi, PDB sterile fino a coprire i semi quasi completamente. Ad esempio, per campioni costituiti da 400 semi di *P. halepensis*, o *P. nigra* o *P. pinaster* si possono utilizzare beute da 500 ml con circa 35 ml di PDB, mentre per *P. pinea* si possono utilizzare beute da 2 litri con circa 300-350 ml di PDB. I semi di *P. pinea*, hanno consistenza legnosa, sono difficili da frantumare con un frullatore comune (scegliere un modello adatto) e devono, quindi, essere in precedenza sminuzzati accuratamente (utilizzando un pestello e facendo attenzione a non disperdere materiale). Ogni contenitore (semi + brodo) deve essere messo ad incubare a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 72 ore.

Dopo l'incubazione, il contenuto della beuta deve essere versato asetticamente nel bicchiere del frullatore e lavorato per circa 1,5/2 minuti. In questa fase, se necessario, si può aggiungere acqua o PDB sterili. Per ogni campione devono essere prelevati e trasferiti in eppendorf da 1,5 ml due sottocampioni di 500 ml ciascuno. Da entrambi i sottocampioni dovrà essere estratto il DNA totale secondo il protocollo del kit di estrazione utilizzato.

E' importante, per evitare contaminazioni durante le operazioni, eseguire un'attenta sterilizzazione del bicchiere del frullatore (ad esempio con ipoclorito al 2% per circa 20 minuti) e del piano di lavoro ogni qualvolta si analizzi un nuovo campione.

Per le procedure di estrazione del DNA vedere quanto descritto al punto 3.4 Inserendo tra i campioni un controllo negativo costituito da seme sicuramente non infetto o da 500 µl di PDB sterile.

3.6 B1– PCR convenzionale

Strumentazione, materiali e reagenti necessari sono riportati in allegato 1 (1.3)

PCR convenzionale

Primer CIRC1A: CTT GGC TCG AGA AGG G

Primer CIRC4A: ACC TAC CCT ACA CCT CTC ACT

Componenti	Concentrazioni iniziali	Concentrazione finale	Volume per singola provetta (µl)
PCR buffer	10X	1x	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,5	2,5 (*)
dNTPs	10 mM	0,25 mM	0,625
Primer CIRC1	10 µM	0,5 µM	1,25
Primer CIRC4	10 µM	0,5 µM	1,25
Taq polimerasi	5 U/µl	0,05 U/µl	0,25
DNA templatato			6,25
H ₂ O			10,375

(*) Può variare se il MgCl₂ è presente nel tampone. Se si utilizza Fermentas DreamTaq polymerase aggiungere solo 0,5 µl.

- La master mix va opportunamente mescolata con il vortex e riportata sul fondo della provetta con un breve passaggio in centrifuga (mini spin).
- Distribuire la master mix in ciascuna provetta di PCR tenuta in ghiaccio.
- Aggiungere 6,25 µl di DNA templatato.

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

- Un **controllo positivo** costituito dal DNA del fungo estratto da una coltura di sicura identificazione e quantificato.
- Un **ulteriore controllo positivo** costituito dal DNA del fungo estratto da coltura pura, alla diluizione limite rilevata con la PCR (*LOD*). Questo ulteriore controllo permette di valutare se un risultato negativo può essere legato ad una scarsa efficienza della PCR stessa.
- Un **controllo negativo** (senza DNA) ottenuto aggiungendo 6,25 µl di acqua filtrata sterile, al posto del DNA templatato, nella provetta con la miscela di reazione.

Impostare le seguenti condizioni di reazione:

- 1) 94°C per 3 min
 - 2) 94°C per 35 s
 - 3) 66°C per 55 s
 - 4) 72°C per 50 s
- Gli step da 2 a 4 sono ripetuti per 37 cicli.
- 5) 72°C per 12 min

Elettroforesi su gel di agarosio

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

TAE 10X	
Trizma base	48,4 g
Acido acetico glaciale	11,4 ml
EDTA 0,5M pH8/8,5	20 ml
Portare ad 1litro con H ₂ O distillata	
Autoclavare	

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

1. Preparare il gel di agarosio 1% in TAE 1X.
2. Dare una breve centrifugata alle provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento dell'apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
3. Caricare complessivi 6 ml per campione (5 ml di amplificato + 1 ml di loading buffer 6X). Cambiare il puntale ad ogni campione.
4. Caricare in un pozzetto il DNA marker idoneo (100 bp).
5. Correre per circa 60-90 minuti a 80 volt con un vassoio da 10 cm alloggiato in una cella elettroforetica midi ovvero correre per circa 60 minuti a 100 volt con un vassoio da 20 cm (double deck gel) alloggiato in una cella maxi. Si faccia riferimento al fronte del colorante per stimare l'avanzamento dei campioni.
6. Estrarre il gel dalla cella e trasferirlo per circa 15/30 minuti in una soluzione di Bromuro di Etidio (0,5µg/ml) oppure nel colorante Gel Red, seguendo le indicazioni della ditta produttrice.
7. Lavare il gel per circa 5 minuti in acqua.
8. Osservare il gel mediante un transilluminatore U.V. e fotografarlo

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo, si osserverà una banda di 360 bp. La banda dovrà essere alla stessa altezza della banda osservata nei controlli positivi, nessuna banda dovrà essere evidenziata nei controlli negativi.

Caratteristiche e punti critici del protocollo

Il metodo permette di analizzare agevolmente un maggior numero di semi per ciascun campione ma è necessaria un'appropriata ed efficiente preparazione del campione da cui estrarre il DNA dopo l'arricchimento. Questa fase di lavoro è molto delicata perché falsi positivi o falsi negativi, possono verificarsi se il materiale non è lavorato accuratamente

Per ciascun campione dovranno essere raccolti due sottocampioni. Da ciascun sottocampione dovrà essere estratto il DNA ed eseguita la PCR.

Il metodo richiede un tempo di esecuzione di circa 4-5 gg,

Un punto critico è la minore sensibilità diagnostica rispetto agli altri metodi, riscontrata per il più basso livello d'infezione testato (1 seme infetto su 399 sani).

In caso di risultati incerti o contraddittori ripetere l'analisi con altri metodi (il protocollo EPPO PM 7/91 (1), 2009b propone, oltre ai metodi proposti, il sequenziamento: vedi appendice 5).

Non è stato possibile validare il metodo per il parametro della Riproducibilità.

3.7 Analisi diretta da seme dopo arricchimento B2 – dual-labelled probe real time PCR

Strumentazione, materiali e reagenti necessari sono riportati in allegato 1 (1.4)

REAL TIME-PCR

Primer FCIR-F:	TCG ATG TGT CGT CTC TGG AC
Primer FCIR-R:	CGA TCC TCA AAT CGA CCA AGA
FCIRC-P Probe:	FAM-CGA GTC TGG CGG GAC TTT GTG C-BHQ1

Prepare uno schema del caricamento dei campioni sulla piastra per PCR. **Tutti i campioni devono essere ripetuti in triplo.** Utilizzare la numerazione dei campioni da saggiare per siglarne la posizione nello schema di caricamento. Inserire i controlli: **positivo (PC)**, **negativo (NC)** e **acqua (H₂O)**. Inserire un **ulteriore controllo positivo** corrispondente al limite di detenzione del test (**LOD**), ossia la diluizione limite di DNA fungino rilevabile. Tale controllo, effettuato a partire da DNA estratto da una colonia di *G. circinata* di sicura identificazione, permetterà di verificare l'efficienza della Real time-PCR

Togliere tutti i reagenti ed i campioni dal congelatore e agitarli capovolgendo i tubi tra le dita; poi, collocarli e mantenerli in ghiaccio per tutta la preparazione delle mix fino a caricamento campioni.

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

Preparare la mix in un'area dedicata solo a questo scopo (si consiglia di preparare la mix sotto una cappa per PCR)

In un tubo sterile da 1.5 o 2.0 ml preparare la mix per il numero richiesto di campioni

Master mix (*)	concentrazione finale
PCR buffer (fornito con la Taq Polimerasi)	1x
dNTP (ciascuno)	0,20 mM
MgCl ₂	5,0 mM
primer FCIR-F	0,2 µM
primer FCIR-R	0,2 µM
probe FCIR-P	0,1 µM
Taq Polimerasi	0,025 U/µl
DNA templat	25–50 ng
H ₂ O	portare a 25 µl

Se si utilizza la Mastermix Sensimix II Probe Mastermix Bioline, poiché la quantità di MgCl₂ nel tampone è pari a 3 mM finale, è necessario aggiungere una quantità adeguata di MgCl₂ per ottenere una concentrazione finale pari a 5 mM.

La master mix va opportunamente mescolata con il vortex e riportata sul fondo della provetta con una breve centrifugata (mini spin).

- Distribuire la mastermix in ciascun pozzetto nella piastra secondo lo schema preparato in precedenza.
- Aggiungere i µl di DNA templat calcolati (il volume finale di pozzetto sarà 25 µl)
- Controllare che non siano presenti bolle d'aria sul fondo del pozzetto, in quanto potrebbero alterare la lettura dello strumento.

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

- Un **controllo positivo** costituito dal DNA del fungo estratto da colonia di sicura identificazione e quantificato (5-10 ng) .
- Un **ulteriore controllo positivo costituito** dal DNA del fungo alla diluizione limite rilevabile dalla Real time-PCR (**LOD**). Questo ulteriore controllo permette di valutare se un risultato negativo può essere legato ad una bassa efficienza della PCR stessa.
- Un **controllo negativo** (senza DNA) ottenuto aggiungendo acqua filtrata sterile al posto del DNA templat, ma nella stessa quantità, nella provetta con la miscela di reazione.

Condizioni di Real time-PCR

1. 95°C per 10 min
2. 95°C per 15 s
3. 70°C per 55 s

Gli step 2 e 3 devono essere ripetuti per 40 cicli, la fluorescenza deve essere monitorata alla fine di ogni step di annealing/extension

Valutazione dei risultati

Collocare la barra orizzontale indicante il threshold ad un livello leggermente sopra il background di fluorescenza determinato dal controllo negativo.

I campioni con valori di $Ct < 39$ dopo l'aggiustamento del threshold possono essere considerati positivi. Per campioni con valori di Ct compresi tra 39 e 40 ($39 < Ct < 40$) ripetere l'analisi con la stessa o altre metodiche. Anche nel caso di risultati "borderline", contraddittori o dubbi (come ad esempio il caso in cui il valore di Ct del campione risulti superiore al Ct_{LOD} , il caso in cui i valori di Ct delle tre repliche di uno stesso campione risultino discordanti, ecc..) ripetere l'analisi con la stessa o altre metodiche.

Caratteristiche e punti critici del protocollo

Il metodo permette di analizzare agevolmente un maggior numero di semi per ciascun campione (anche 1000) ma è necessaria un'appropriata ed efficiente preparazione del campione da cui estrarre il DNA dopo l'arricchimento. Questa fase di lavoro è molto delicata perché falsi positivi o falsi negativi, possono verificarsi se il materiale non è lavorato accuratamente

La real-time PCR è una reazione molto sensibile, che consente di rilevare un numero elevato di campioni positivi ma che, se non utilizzata correttamente, può dare **falsi positivi**. 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.

Per ciascun campione dovranno essere raccolti due sottocampioni. Da ciascun sottocampione dovrà essere estratto il DNA, testato in triplicato con la Real time-PCR.

Richiede un tempo di esecuzione di circa 4-5 gg,

Non è stato possibile validare il metodo per il parametro della Riproducibilità.

4. DATI DI VALIDAZIONE

Tutte le prove di validazione sono state eseguite con seme artificialmente infettato (Ioos *et al.*, 2009) utilizzando l'isolato CBS 117843 di *Fusarium circinatum*

Campioni di riferimento 'target': semi di *Pinus nigra*, *P. pinea*, *P. pinaster* e *P. halepensis* infettati artificialmente con *Fusarium circinatum*

Campioni di riferimento 'non target': semi di *Pinus nigra*, *P. pinea*, *P. pinaster* e *P. halepensis* infettati artificialmente con isolati di *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*; campioni delle stesse specie di *Pinus* non infettati.

Per la validazione dei metodi diagnostici **A1** e **A2** sono stati preparati e analizzati **48** campioni, **12** campioni per ciascuna delle 4 specie in studio: *Pinus pinea*, *P. nigra*, *P. halepensis* e *P. pinaster*, così articolati:

6 campioni 'target' infettati con *F. circinatum*

3 campioni costituiti ciascuno da 1 seme infettato su 400

3 campioni costituiti ciascuno da 10 semi infettati su 400

3 campioni 'non target'

3 campioni costituiti ciascuno da 6 semi infettati con *Fusarium* spp. su 400

3 campioni 'non target'

3 campioni costituiti ciascuno da 400 semi esenti da infezione.

In particolare, per l'espletamento del *ring test*, relativo ai metodi **A1 e **A2**, dodici campioni di riferimento ('target' e 'non target') costituiti da seme di *Pinus nigra* sono stati forniti ai laboratori dei SFR in modalità *blind* (cieca).**

Per la validazione dei metodi diagnostici **B1** e **B2** sono stati utilizzati **68** campioni, **17** campioni per ciascuna delle 4 specie in studio: *Pinus pinea*, *P. nigra*, *P. halepensis* e *P. pinaster*, così articolati:

11 campioni 'target' infettati con *F. circinatum*:

5 campioni costituiti ciascuno da 1 seme infettato su 400

3 campioni costituiti ciascuno da 4 semi infettati su 400

3 campioni costituiti ciascuno da 10 semi infettati su 400

3 campioni ‘non target’

3 campioni costituiti ciascuno da 10 semi infettati con *Fusarium* spp. su 400

3 campioni ‘non target’

3 campioni costituiti ciascuno da 400 semi esenti da infezione.

Isolamento del patogeno su substrato semiselettivo ed identificazione morfologica (A1)

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti substrati:

Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA) (Andrews & Pitt,1986; modificato da Ioos *et al.*, 2004)

Potato Dextrose Agar (PDA)

Spezieller- Nahrstoffarmer Agar (SNA) (Gerlach & Nirenberg, 1982).

TABELLA 3.

Parametri	Valori %
Sensibilità diagnostica	100
Specificità diagnostica	100
Accuratezza relativa	100
Riperibilità	100
Riproducibilità	92

La **Riproducibilità** è stata valutata sulla base dei risultati di 4 laboratori.

Isolamento del patogeno su substrato semiselettivo seguito da identificazione molecolare con PCR convenzionale (A2)

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i seguenti substrati e materiali:

Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA) (Andrews & Pitt,1986; modificato da Ioos *et al.*, 2004;).

Potato Dextrose Agar (PDA)

Kit di estrazione DNA: Macherey-Nagel “Nucleospin Plant II”; Qiagen DNeasy Plant Mini.Kit

Marca e tipo di termociclatore: Eppendorf Mastercycler

Marca e tipo di TAQ: Fermentas DreamTaq polymerase (5U/ml; Promega GoTaq DNA polymerase (5U/ml);

Marca e tipo di dNTPs: Fermentas dNTP mix 10 mM each.

Marker per DNA: GeneRuler 100bp Plus DNA ladder Fermentas.

TABELLA 4.

Parametri	Valori %
Sensibilità diagnostica	100
Specificità diagnostica	100
Accuratezza relativa	100
Sensibilità analitica	10 ⁻⁴ ng di DNA
Ripetibilità	100
Riproducibilità	100

La **Riproducibilità** è stata valutata sulla base dei risultati di 3 laboratori

La **Sensibilità analitica** è stata calcolata con diluizioni progressive fino a 10⁻⁶ ng di DNA

Analisi diretta da seme dopo la procedura di arricchimento biologico - PCR convenzionale (B1)

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando il substrato e materiali di seguito riportati:

Potato dextrose broth (PDB)

Kit di estrazione DNA: Macherey-Nagel “Nucleospin Plant II”; Qiagen DNeasy Plant Mini Kit.

Marca e tipo di termociclatore: Eppendorf Mastercycler.

Marca e tipo di TAQ: Fermentas DreamTaq polymerase 5u/ml; Promega GoTaq DNA polymerase (5U/ml);

Marca e tipo di dNTPs: Fermentas dNTP mix 10 mM each

Marker per DNA: GeneRuler 100bp Plus DNA ladder Fermentas

TABELLA 5

Parametri	Valori %
Sensibilità diagnostica	81,8
Specificità diagnostica	100
Accuratezza relativa	88,2,
Sensibilità analitica	10 ⁻⁴ ng di DNA
Ripetibilità	100

La **Sensibilità analitica** è stata calcolata con diluizioni progressive fino a 10⁻⁶ ng di DNA.

Analisi diretta da seme dopo la procedura di arricchimento biologico- Real-time PCR (B2)

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando il substrato e materiali di seguito riportati:

Potato dextrose broth (PDB)

Kit di estrazione DNA: Macherey-Nagel “Nucleospin Plant II”; Qiagen DNeasy Plant kit.

Marca e tipo di termociclatore: Biorad CFX 96 Real Time System, C1000 Thermalcycler.

Marca e tipo di TAQ: Sensimix II Probe Mastermix Bioline.

Primers e Probe: Sintetizzati da Eurofins.

Piastre: Hard-Shell plates clear well shell (Bio-Rad).

Pellicola per piastre: Microseal B Adhes seal (Bio-Rad).

TABELLA 6

Parametri	Valori %
Sensibilità diagnostica	97,7
Specificità diagnostica	100
Accuratezza relativa	98,5
Sensibilità analitica	10 ⁻⁶ ng di DNA
Ripetibilità	100

La **Sensibilità analitica** è stata calcolata con diluizioni progressive fino a 10⁻⁸ ng di DNA

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- ANDREWS S., J. PITT, 1986. Selection medium for *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *Applied and Environmental Microbiology* **5**, 1235–1238.
- BRAGANÇA H, E. DIOGO, F. MONIZ, P. AMARO, 2009. First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*. Instituto Nacional de Recursos Biológicos I.P., Quinta do Marquês, Edifício da exEFN, 2780 - 159 Oeiras, Portugal, 93.
- BRITZ H, TA. COUTINHO, MJ. WINGFIELD MJ, WFO. MARASAS, 2002. Validation of the description of *Gibberella circinata* and morphological differentiation of the anamorph *Fusarium circinatum*. *Sydowia* **54**, 9–22.
- CARLUCCI A, L. COLATRUGLIO, S. FRISULLO, 2007. First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease*, **91**, 1683-1683.
- EFSA Panel on Plant Health, 2010. EFSA Journal 8(6): 1620 on line <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1620.pdf>
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2005. *Gibberella circinata*. Data sheets on Quarantine pests. EPPO Bulletin 35, 383–386
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2009a. Situation of *Gibberella circinata* in France. EPPO Reporting services 2009/93, n°5. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2009b. Diagnostic protocol on *Gibberella circinata*. EPPO standard for identification PM 7/91 (1), 2009. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Bulletin 39, 298-309.
- IPPC, 2008. ISPM no. 31 Methodologies for sampling of consignments <https://www.ippc.int/publication/methodologies-sampling-consignments>.
- IOOS R, A. BELHADI, M. MENEZ, 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum, and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* **158**, 351–362.
- IOOS R, C. FOURRIER, G. IANCU, TR. GORDON, 2009. Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time PCR using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathology* **99**, 582–590.
- ISTA (International Seed Testing Association). Detection of *Fusarium circinatum* on *Pinus taeda* and *P. elliotii* (Pine). International Rules for Seed Testing Annex to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland. 7-009 2011.
- LANDERAS E, P. GARCIA, Y. FERNANDEZ, M. BRANA, O. FERNANDEZ-ALONSO, S. MENDEZ-LODOS, A. PEREZ-SIERRA, M. LEON, P. ABAD-CAMPOS, M. BERBEGAL, R. BELTRAN, J. GARCIA-JIMENEZ, J. ARMENGOL, 2005. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant Disease*, **89**, 1015-1015.
- NIRENBERG HI, K. O'DONNELL, 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, **90**, 434-458.
- PEREZ-SIERRA A, E. LANDERAS, M. LEON, M. BERBEGAL, J. GARCIA-JIMENEZ, J. ARMENGOL, 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological Research*, **111**, 832-839.

ALLEGATO I -Strumentazione, materiali e substrati

Metodi A, A1 e A2

Strumentazione

1. Microscopio ottico
2. Stereomicroscopio
3. Termostato
4. Distillatore
5. Bilancia analitica
6. Agitatore magnetico
7. Autoclave

Materiali

1. Guanti
2. Piastre Petri
3. Pinzette

Substrati

Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA).

Permette di isolare *Fusarium* spp.

Bacteriological peptone: 15,0 g

KH_2PO_4 : 1,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$: 0,5 g

Chloramphenicol: 0,2 g

2,6-dichloro-4-nitroanilin (dichloran) (0,2% W/V in ethanol, 1,0 mL): 2 mg

Crystal Violet (0.05%W/V in water, 1,0 mL): 0,0005 g

Agar Technical: 15 g

Acqua distillata: portare ad 1.0 L

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min

Spezieller- Nährstoffarmer Agar (SNA).

Per l'identificazione di *Fusarium circinatum* sulla base delle caratteristiche morfologiche.

KH_2PO_4 : 1,0 g

KNO_3 : 1,0 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g

KCl: 0,5 g

Glucosio: 0,2 g

Saccarosio: 0,2 g

Technical agar: 15,0 g

Acqua distillata: portare ad un 1,0 L

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min

Potato dextrose agar(PDA).

Permette di valutare l'aspetto, il colore e lo sviluppo della colonia

Metodi A2 e B1

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato
4. Bilancia analitica
5. Cappa chimica aspirante
6. Centrifuga da banco per provette tipo Eppendorf
7. Congelatore
8. Frigorifero
9. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
10. Micropipette calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)
11. Termociclature
12. Transilluminatore o altra strumentazione tipo Gel Doc System per visionare e fotografare i gel
13. Vortex

Reagenti

1. Kit commerciale per estrazione DNA
2. Loading buffer per elettroforesi
3. Marker di DNA (100bp o 1KB plus)
4. Primers specifici CIRC1A e CIRC4A
5. Taq DNA polimerasi e relativo tampone e $MgCl_2$
6. dNTPs
7. Agarosio
8. Tamponi per corsa elettroforetica (es. TAE)
9. Bromuro di etidio e GelRed

Materiali

1. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la PCR
2. Guanti
3. Mortai e pestelli
4. Carta da laboratorio
5. Porta provette
6. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
7. Provette da 1,5
8. Piastre Petri
9. Pinzette

Metodo B

Strumentazione

1. Bagnetto termostato
2. Bilancia analitica
3. Agitatore magnetico
4. Centrifuga da banco per provette tipo Eppendorf
5. Congelatore
6. Frigorifero
7. Termostato
8. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
9. Micropipette calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)
10. Vortex
11. Frullatore con lame in acciaio inox (seghettate tritaggiaccio, bicchiere in vetro); Microtron MB 550 mixermill (Kinematica, Lucern, Switzerland) (Ioos *et al.*, 2009).

Reagenti

1. Kit commerciale per estrazione DNA

Materiali

1. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la PCR
2. Guanti
3. Carta da laboratorio
4. Porta provette
5. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
6. Provette da 1,5
7. Easy flask, (Nunc, Roskilde, Denmark) oppure beute di vetro Pyrex/Duran.

Substrato

Metodo B2

Strumentazione

1. Bilancia analitica
2. Agitatore magnetico
3. Centrifuga da banco per provette tipo Eppendorf
4. Congelatore
5. Frigorifero
6. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
7. Micropipette calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)
8. Termociclatore per real time
9. Vortex

Reagenti

1. Kit commerciale per estrazione DNA
2. Primers specifici FCIR-F; FCIR-R
3. Probe FCIR-P
4. Sensimix II Probe Mastermix

Materiali

1. Puntali sterili per micropipette, assolutamente con filtro per la PCR
2. Guanti
3. Carta da laboratorio
4. Porta provette
5. Provette da 0,2 o 0,5 ml per PCR
6. Provette da 1,5
7. Piastre 96 pozzetti per real time-PCR
8. Pellicole adesive per chiusura piastre da 96 pozzetti