

**PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
*MONILINIA FRUCTICOLA***

L. Riccioni, M.T. Valente

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

INDICE

1.DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	259
1.1.Introduzione	259
1.2.Sintomatologia	261
1.3.Epidemiologia	262
1.4.Diagnosi	263
1.5.Normativa fitosanitaria	263
2.PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	264
2.1.Premessa	264
2.2.Flusso di lavoro per l'identificazione di <i>M. fructicola</i>	265
2.3.Estrazione del DNA genomico da micelio	266
2.4.Estrazione del DNA genomico da frutto	267
2.5.METODO 1 (Cotè <i>et al.</i> , 2004)	267
2.6.METODO 2 (Ioos e Frey, 2000)	271
2.7.Confronto tra i due metodi	275
3.DATI DI VALIDAZIONE	276
4.BIBLIOGRAFIA	279
Allegati I - Strumentazione, materiali e reagenti necessari	281

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Monilinia fructicola</i> (Winter) Honey <i>Monilia fructicola</i> Batra (anamorfo)
Tassonomia	Kingdom: Fungi Phylum: Ascomycota Class: Leotiomycetes Subclass: Leotiomycetidae Order: Helotiales Family: Sclerotiniaceae Genus: <i>Monilinia</i>
Avversità	Marciume bruno (dei frutti), moniliosi (dei rametti)
Sinonimi	<i>Sclerotinia fructicola</i> (Winter) Rehm
Categoria fitosanitaria:	Lista A2 EPPO: no. 153

1.1 Introduzione

Monilinia fructicola causa il marciume bruno dei frutti, una delle malattie fungine più importanti delle drupacee (*Prunus* spp.) e delle pomacee (*Pyrus* e *Malus* spp.). La malattia può comunque essere causata anche da altri due funghi appartenenti al genere *Monilinia* (*M. fructigena* e *M. laxa*), e dall'anamorfo *Monilia polystroma* (van Leeuwen *et al.*, 2002), specie molto vicina a *M. fructigena*, presente in Giappone e recentemente segnalata anche in Europa (Anonymus, 2011)

All'interno dei paesi dell'Unione Europea *M. fructicola* viene indicato come un patogeno da quarantena. Fino a poco tempo fa era assente dall'Europa, e solo nel 2001 fu ufficialmente segnalata come presente in alcuni frutteti di peschi nel Département du Gard, nel sud della Francia (EPPO, 2002). E' stata poi segnalata in Spagna (De Cale *et al.*, 2009; EPPO, 2006), in Svizzera e in Ungheria su frutti di drupacee importati (Bosshard *et al.*, 2006 e Petroczy e Palkovics, 2006) e nella Repubblica Cecoslovacca durante una indagine condotta nel 2006 (Duchoslavova *et al.*, 2007; EPPO, 2008). Più recentemente è stata segnalata la sua presenza per la prima volta in Svizzera (Hilber-Bodmer *et al.*, 2010) e in Italia, in Piemonte, su pesche nettarine cultivar Sweet Red and Orion (Pellegrino *et al.*, 2009), in Emilia Romagna (Montuschi *et al.*, 2004) ed infine nel Lazio in campioni raccolti nel 2011 e 2012 (Marinelli *et al.*, 2013). Riguardo la distribuzione geografica nel mondo, è presente principalmente in Nord, Centro e Sud America, Australia e Nuova Zelanda (EPPO/CABI, 2010).

M. fructigena è presente invece in Europa e in parti dell'Asia, ma è assente in Sud America, Australia e Nuova Zelanda (CABI/EPPO, 2000). *M. laxa* è il patogeno più

frequentemente associato al marciume bruno ed è presente in tutte le principali aree di produzione di drupacee e pomacee (CABI/EPPO, 1991). *M. fructicola* in genere attacca maggiormente pesche e nettarine, *M. fructigena* mele e pere, e *M. laxa* albicocche e mandorle (CABI/EPPO, 1997), tutte e tre le specie sono però in grado di infettare una vasta gamma di roseacee appartenenti ai generi *Prunus*, *Malus*, *Pyrus*, *Chaenomeles*, *Crataegus*, *Cydonia* e *Eriobotrya*, ed esistono segnalazioni di *M. fructicola* su uve, fragole e *Rubus* (Visarathanonth *et al.*, 1988; CABI/EPPO, 1997; Washington e Pascoe, 2000; Hinrichs-Berger e Muller, 2010). Per un elenco dettagliato dei potenziali ospiti in Europa del fungo si rimanda all'Appendice 1 del 'Pest Risk Analysis' (P.R.A.) pubblicato su EFSA Journal (2011).

Per quanto riguarda i rischi di introduzione e stabilizzazione del fungo nel territorio UE, il P.R.A. ha concluso che "le merci che hanno più probabilità di essere responsabili della diffusione internazionale del patogeno sono le piante radicate e la frutta fresca, e che, con l'eccezione della frutta secca, la probabilità di ingresso è molto alta. La probabilità di stabilirsi è anche molto alta a causa delle condizioni ambientali nel territorio UE adatte e per la presenza diffusa di specie ospite, suscettibili per la maggior parte dell' anno. Le pratiche colturali e le misure di controllo attualmente applicate contro le altre specie di *Monilinia* non possono impedire la stabilizzazione di *M. fructicola*. La probabilità di diffusione è anche molto elevata a causa dei molteplici modi di dispersione del fungo. L'impatto complessivo in caso di diffusione si considera essere moderato, infatti per il controllo del marciume bruno non sarebbero necessari né misure colturali supplementari, né un aumento dei trattamenti fungicidi".

1.2 Sintomatologia

La malattia può seriamente compromettere il raccolto danneggiando i fiori o causando il marciume dei frutti, sia sulla pianta sia dopo la raccolta. I fiori infetti si imbruniscono e muoiono e, se persistono idonee condizioni di umidità, ciuffi di spore fungine sono prodotte sul tessuto morto. Dal fiore, l'infezione può passare ai rametti, dove il tessuto corticale colpito muore, e appare depresso con un bordo netto. Sulle foglie infette compaiono aree circolari imbrunite, che lasciano un buco sulla foglia e ne provocano la morte e il distacco; l'imbrunimento del tessuto può interessare la foglia intera. Il frutto può essere attaccato in qualsiasi momento, ma in generale la malattia non diventa grave fino a quando i frutti si avvicinano alla maturità. I frutti colpiti cadono o rimangono attaccati all'albero, diventando secchi e avvizziti ("mummie"). La formazione di conidi in sporodochi può verificarsi su tutti gli organi infetti.

La malattia è particolarmente grave se durante la fioritura alti livelli di inoculo sono prodotti in condizioni di tempo umido o piovoso con temperature diurne miti (20-25 °C) e notti fresche. In generale, l'incidenza di infezioni latenti sui frutti immaturi e l'incidenza del marciume bruno sui frutti al momento della raccolta e post-raccolta è influenzata dalla quantità di inoculo, dallo stadio fenologico del frutto al momento dell'infezione e dalle condizioni ambientali (temperatura e umidità).



Sintomi di marciume bruno su melocotogno, con produzione di cuscinetti sporodochiali a circoli di *M. fructigena*



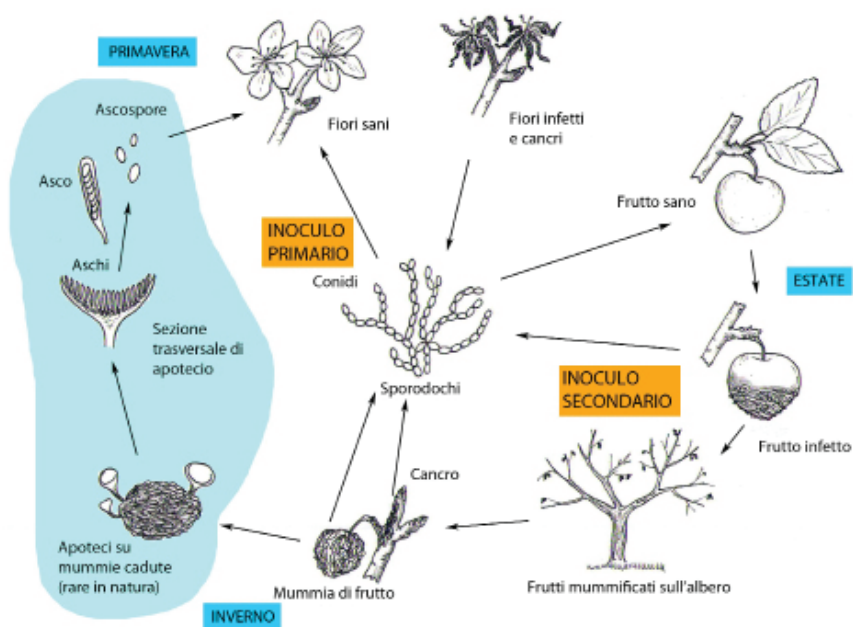
Mummia di susino cv. Angeleno, con produzione di cuscinetti sporodochiali di *M. fructicola*.

1.3 Epidemiologia

M. fructicola sverna sui frutti mummificati, o nei tessuti infetti sugli alberi (rametti, peduncoli e cancri rameali). In primavera e in condizioni di umidità, i conidi prodotti sono dispersi dal vento, infettano i fiori, e da qui l'infezione può passare ai giovani rametti, alle foglie, ed infine ai frutti. L'umidità svolge un ruolo importante nel processo di infezione (germinazione dei conidi e penetrazione). Senza un adeguato periodo di bagnatura (3-15 ore) l'infezione è quasi nulla anche in presenza di grandi quantità di inoculo.

La temperatura è anche molto importante, soprattutto nella produzione di conidi: temperature intorno ai 15 °C favoriscono lo sviluppo di grandi quantità di conidi, con una migliore germinazione e, soprattutto, una maggiore aggressività. Frutti infetti normalmente mummificano, ma se l'infezione si verifica in prossimità della raccolta, il marciume si può sviluppare in post-raccolta.

Il teleomorfo (*Monilinia*), che raramente si vede in *M. fructigena* e *M. laxa*, è invece importante in *M. fructicola*. Sui frutti mummificati che cadono in primavera si formano gli apoteci, che rilasciano le ascospore che, spinte dal vento e in presenza di condizioni di umidità favorevoli, vanno ad infettare i fiori.



designed by Giuseppe di Giambattista and Stefano Scalerio

Ciclo di *Monilinia* spp.

1.4 Diagnosi

Le specie di *Monilinia* (*Monilia*) che causano il marciume bruno delle colture da frutto sono difficili da distinguere l'una dall'altra. L'identificazione è possibile combinando le caratteristiche della coltura, come ad esempio la velocità di crescita, la forma e il colore, con i dati morfologici quali le dimensioni dei conidi e la lunghezza del tubo germinativo. La maggior parte di questi caratteri sono quantitativi e si sovrappongono, quindi l'identificazione deve essere condotta in condizioni standardizzate e partendo da colture pure. Anche così, isolamenti di *M. fructicola* possono essere erroneamente identificati come *M. laxa* e viceversa. Di conseguenza, l'identificazione morfologica da sola non è quasi mai sufficiente per la diagnosi fitosanitaria, anche perché si tratta spesso di materiale deperibile, come la frutta.

Il protocollo EPPO PM 7/18 (2) (EPPO, 2009) raccomanda l'isolamento di *Monilinia* spp. dall'ospite seguito dall'identificazione mediante metodi molecolari. L'applicazione dei suddetti metodi è praticabile anche direttamente dal micelio presente sul frutto stesso.

Diversi metodi di diagnostica molecolare sono stati sviluppati dal 1997 ad oggi per *M. fructicola*. Nell'ambito del Progetto Arnadia, in seguito ad una indagine svolta presso i Servizi Fitosanitari Regionali, sono stati scelti due metodi da validare, uno già riportato nel protocollo EPPO PM 7/18 (EPPO, 2009) e largamente utilizzato dai laboratori fitosanitari in tutta Europa (Ioos e Frey, 2000), l'altro non ancora validato ma che permette di effettuare una multi-analisi delle diverse specie in un unico test (Coté *et al.*, 2004).

1.5 Normativa fitosanitaria

M. fructicola è considerato un organismo pericoloso dall'Unione Europea, pertanto è nell'allegato I, Parte A, Sezione I della **Direttiva 2000/29/EC**, come organismo non presente nel territorio europeo, e la cui introduzione e diffusione va impedita. La Direttiva regola l'importazione e la movimentazione di materiale di *Chaenomeles Lindl.*, *Crataegus L.*, *Cydonia Mill.*, *Eriobotrya Lindl.*, *Malus Mill.*, *Prunus L.*, *Pyrus L.*, destinati alla piantagione, ad eccezione delle sementi, nonché l'importazione di frutta di *Prunus* spp.

Tale Direttiva è stata recepita in Italia mediante il **Decreto Legislativo 19 agosto 2005, n. 214** "Misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali".

Attualmente, *M. fructicola* è stata segnalata in diversi paesi europei, incluso l'Italia. La legislazione europea ed italiana non è stata ancora aggiornata rispetto alla nuova distribuzione del fungo, sebbene l'EPPO lo abbia già fatto spostando *M. fructicola* nella lista A2 dei microrganismi di quarantena.

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

2.1 Premessa

Il protocollo diagnostico descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

Il protocollo diagnostico fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del fungo *Monilinia fructicola* nei laboratori presenti sul territorio italiano preposti alla diagnosi degli organismi da quarantena. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto di risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse circostanze.

La scelta della metodologia diagnostica da validare, secondo i **parametri di validazione** ISO 16140:2003, ISO 17025:2005 ed EPPO PM7/98 (2010), è scaturita da un'attenta rivisitazione delle metodiche riportate nel protocollo EPPO PM7/18 (2) (2009) e della bibliografia prodotta sull'argomento, nonché da un confronto con i Servizi Fitosanitari Regionali.

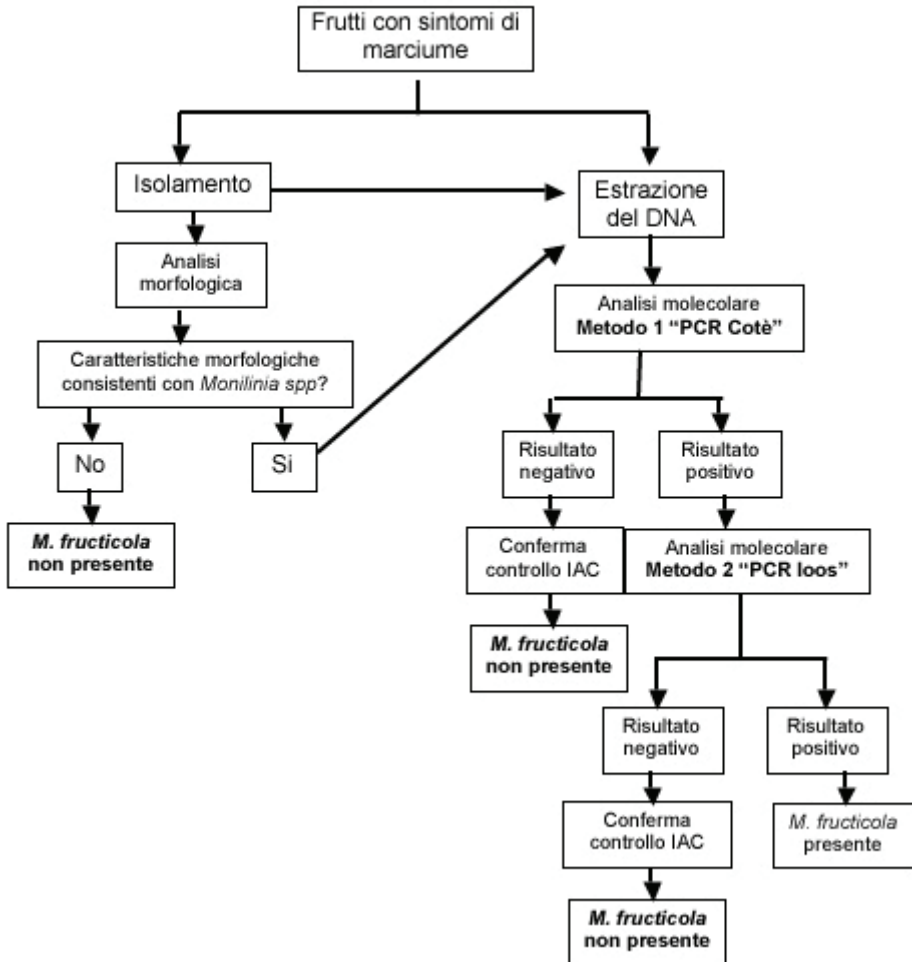
Per la definizione di tali parametri le diverse metodologie di diagnosi sono state effettuate con reagenti e strumentazioni dettagliatamente riportati. Ciò non comporta l'esclusione dell'uso di reagenti e strumentazioni alternative e la modifica di alcune procedure per meglio avvicinarsi agli standard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

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

La valutazione del procedimento di identificazione morfologica, basato sull'isolamento in coltura pura su terreno artificiale e successiva identificazione morfologica di *M. fructicola*, ha dimostrato nelle prove di validazione del progetto Arnadia una insufficiente attendibilità, poiché i caratteri morfologici del fungo e delle specie affini possono sovrapporsi causando errate identificazioni. **Per tale ragione, per l'identificazione di *M. fructicola* da frutti sintomatici si raccomanda l'uso di metodiche molecolari o direttamente da tessuto infetto o da coltura pura, ottenuta con isolamento da tessuto con sintomi di marciume.**

Di seguito vengono descritti due metodi molecolari che permettono di identificare *M. fructicola* e di distinguerla dalle altre specie affini: *M. laxa*, *M. fructigena* e *M. polystroma*: il metodo proposto da Ioos e Frey (2000), designato come metodo 2, descritto nel protocollo EPPO PM7/18 (2) (2009) e già precedentemente validato (Ioos e Iancu., 2008); il metodo descritto da Coté *et al.* (2004), designato come metodo 1, non descritto nel protocollo EPPO ed oggetto delle prove di validazione nel progetto Arnadia. Il metodo in real-time PCR di van Brouwershaven *et al.*, (2009), descritto anch'esso nel protocollo EPPO PM7/18 (2) è altrettanto validato per identificare *M. fructicola* e distinguerla dalle altre 3 specie affini. Poiché non è stato oggetto di valutazione non è riportato in questo protocollo.

2.2 Flusso di lavoro per l'identificazione di *M. fructicola* da frutto



Metodi molecolari

Componente fungina riconosciuta

Metodo 1 (test di identificazione):
 PCR MULTIPLEX con 3 coppie di primer specie-specifici (Cotè *et al.*, 2004)

Regione SCAR (*Sequence-characterized amplified region*) del DNA genomico fungino

Metodo 2 (test di conferma):
 PCR con primer specie-specifici disegnati su Internal Transcribed Sequences (ITS) (Ioos e Frey, 2000)

Regione ITS del DNA genomico fungino

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

Per la purificazione del DNA genomico da micelio cresciuto in piastra Petri su PDA (*Potato Dextrose Agar*) o da porzioni di frutto infetto, è possibile utilizzare un kit commerciale per estrazione del DNA genomico o altro protocollo. Una volta isolato, il micelio può essere conservato a -20°C in attesa di essere processato per l'estrazione di DNA.

Di seguito è riportato il metodo di estrazione descritto da Cenis (1992):

1. Per ottenere il fungo su PDA trasferire un pezzo di pochi millimetri di tessuto infetto (fra sano e malato) su una piastra Petri contenente il terreno di coltura. Dopo pochi giorni si prosegue con il seguente protocollo.
2. Circa 100 mg di micelio grattato dalla piastra di PDA sono trasferiti in tubi tipo Eppendorf da 1,5 ml contenenti 300 µl di *buffer* di lisi (Tris-HCl 200 mM pH 8,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%);
3. il micelio viene omogeneizzato mediante "TissueLyser" o altro *bead beater* per 1 min a 30 Hz. In alternativa, in mancanza dello strumento, il campione può essere omogeneizzato con un pestellino sterile direttamente nella provetta;
4. il lisato ottenuto si lascia in incubazione a 65°C per 10';
5. si aggiungono 150 µl di NaAc 3 M pH 5,2 e si lascia a -20°C per 10';
6. il campione viene centrifugato a 13000x g per 10';
7. il surnatante si trasferisce in un nuovo tubo tipo Eppendorf da 1,5 ml. Il DNA viene quindi precipitato con l'aggiunta di un ugual volume di isopropanolo;
8. dopo 5' di incubazione a temperatura ambiente il campione si centrifuga per 10' a 13000x g;
9. il *pellet* subisce un lavaggio con 500 µl di EtOH 70% e si lascia quindi asciugare a temperatura ambiente per circa 10';
10. il DNA viene risospeso in 50 µl di TE *buffer* (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM) e conservato a -20°C.

Il DNA genomico risultante viene quantificato mediante saggio spettrofluorimetrico. In mancanza di uno spettrofluorimetro, che legge specificamente ed esclusivamente il DNA a doppio filamento, sarà necessario digerire gli acidi nucleici estratti con "DNase-free RNase A" commerciale seguendo le indicazioni della Ditta produttrice. Il DNA così trattato può essere quantificato mediante saggio spettrofotometrico alla lunghezza d'onda di 260 nm. Prima di essere usato come stampo nella reazione di amplificazione PCR, il DNA risultante deve essere diluito 1:10 in acqua sterile. Comunque, la quantità di DNA stampo da usare nella reazione di amplificazione PCR non deve essere inferiore a 25 pg per il metodo 1 e 0,5 pg per il metodo 2.

2.4 Estrazione del DNA genomico da frutto infetto contenente fruttificazioni miceliari

Per la purificazione del DNA genomico da frutto infetto è necessario campionare la parte del frutto sintomatica e preferibilmente contenente fruttificazioni miceliari visibili. Una volta prelevato, il tessuto del frutto sintomatico deve essere tempestivamente congelato in azoto liquido e processato o conservato a -80°C. E' necessario frantumare e polverizzare il tessuto in azoto liquido con mortaio e pestello. La purificazione del DNA deve essere realizzata con opportuni kit commerciali per evitare inibitori dell'amplificazione, e, prima di essere usato come stampo nella reazione di amplificazione PCR, il DNA risultante deve essere diluito 1:10 in acqua sterile. Comunque, la quantità di DNA stampo da usare nella reazione di amplificazione PCR non deve essere inferiore a 25 pg per il metodo 1 e 0,5 pg per il metodo 2.

2.5 Metodo 1

Identificazione molecolare mediante una PCR MULTIPLEX con 3 coppie di primer specie-specifici (Cotè *et al.*, 2004)

La metodica consiste in una *multiplex* PCR con un *primer reverse* comune a *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola* e tre *primer forward* specie-specifici per le tre suddette specie di *Monilinia*. I prodotti di amplificazione discriminano le tre specie in base al diverso peso molecolare (Tabella 1).

TABELLA 1 - Discriminazione di tre specie di *Monilinia* in base al polimorfismo di lunghezza di una specifica regione genomica

<i>Monilinia spp</i> *	Prodotto di PCR (bp)
<i>M. fructicola</i>	535
<i>M. fructigena</i>	402
<i>M. laxa</i>	351

* il metodo è in grado di discriminare anche *Monilinia polystroma*, il cui prodotto di amplificazione è di 425 bp

Amplificazione PCR multiplex

Per la diagnosi molecolare con il metodo dell'amplificazione PCR multiplex i *primer* sono i seguenti (Tabella 2, Cotè *et al.*, 2004):

TABELLA 2 - Primer per l'amplificazione secondo il protocollo di Cotè *et al.*, 2004

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
MO368-5	Primer reverse comune a <i>M. fructicola</i> , <i>M. fructigena</i> , <i>M. laxa</i> , <i>M. polystroma</i>	5'-GCAAGGTGTCAAAACTTCCA-3'
MO368-8R	Primer forward specifico per <i>M. fructigena</i> e <i>M. polystroma</i>	5'-AGATCAAACATCGTCCATCT-3'
MO368-10R	Primer forward specifico per <i>M. fructicola</i>	5'-AAGATTGTCACCATGGTTGA-3'
Laxa-R2	Primer forward specifico per <i>M. laxa</i>	5'-TGCACATCATATCCCTCGAC-3'

I *primer* possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i *primer* ad una concentrazione di 100 µM in tampone TE (Tris-HCl 10 mM ph 7,5; EDTA 1 mM), seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice, e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Si preparano quindi delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM, diluendo la madre in acqua milliQ sterile, e si conservano a -20 °C.

La reazione di amplificazione si allestisce in ghiaccio. Quando si effettuano più reazioni di PCR contemporaneamente occorre preparare, in una singola provetta da 1,5 ml o 2 ml, una soluzione madre (*master mix*) che contenga tutti i reagenti illustrati nella Tabella 3, meno i DNA-stampo, che verranno introdotti direttamente nelle provette di reazione PCR.

1. passare al vortex tutte le soluzioni (eccetto la DNA-polimerasi) dopo averle scongelate;
2. aggiungere, in una provetta da 1,5 ml tenuta in ghiaccio, i volumi richiesti dei vari componenti come indicato in Tabella 3, seguendo l'ordine riportato in tabella;
3. Passare al vortex la *master mix* e centrifugarla per pochi secondi per raccogliere le gocce sul fondo;

TABELLA 3 - reagenti necessari per la preparazione della master mix

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (µl)	Volume per n* Reazioni (µl)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile		5,375	5,375 x n	
2. Tampone di amplificazione	10X	1	1 x n	1 x
3. MgCl ₂	50 mM	0,5	0,5 x n	2,5 mM
4. dNTPs	10 mM	0,2	0,2 x n	0,2 mM
5. Primer MO368-5	10 µM	0,2	0,2 x n	0,2 µM
6. Primer MO368-8R	10 µM	0,2	0,2 x n	0,2 µM
7. Primer MO368-10R	10 µM	0,2	0,2 x n	0,2 µM
8. Primer Laxa-R2	10 µM	0,2	0,2 x n	0,2 µM
9. DNA polimerasi	2 U/µl	0,125	0,125 x n	0,025 U/µl

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

4. Distribuire, con una micropipetta P20, 8 µl di master mix in provette da PCR da 0,2 ml predisposte in ghiaccio, in un apposito portaprovette;
5. Aggiungere 2 µl di DNA stampo in ciascun campione e un equivalente volume di acqua al campione di controllo.

VOLUME TOTALE DI REAZIONE: 10 µl

Una volta pronte, le provette vengono inserite nel termociclatore e sottoposte al seguente ciclo di amplificazione:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	95 °C	2'	1
	95 °C	15"	
Amplificazione	60 °C	15"	35
	72 °C	1'	
Estensione finale	72 °C	3'	1
Step di blocco	4 °C	∞	1

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

Elettroforesi su gel di agarosio

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

1. Preparare il gel di agarosio 1,2% (massa/volume) in TBE 0,5X con il colorante scelto per marcare il DNA: bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0,5 µg/ml (o con altri intercalanti di acidi nucleici vocati allo scopo e di adeguata sensibilità) o GelRed alla concentrazione finale indicata dalla ditta fornitrice
2. Caricare 5 µl del campione amplificato più 1 µl di *loading buffer* 6X in ciascun pozzetto
3. Caricare in un pozzetto un marcatore di peso molecolare idoneo (range circa 50-1000 bp)
4. Correre a 80-120 volt finchè non si ottiene la separazione delle bande del controllo di specificità da includere sempre nell'elettroforesi
5. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V. e fotografare

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

TBE 10X			Loading buffer 6X	
Tris	108	g	Blu di bromofenolo	0,25%
acido borico	55	g	Xilencianolo	0,25%
0,5 M EDTA (pH 8)	40	ml	Glicerolo	30%
Portare ad 1 litro con H ₂ O distillata				
Autoclavare				

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo per ciascuna delle *Monilie* identificabili verrà visualizzata la corrispondente banda specie-specifica (Tabella 1, Foto 1).

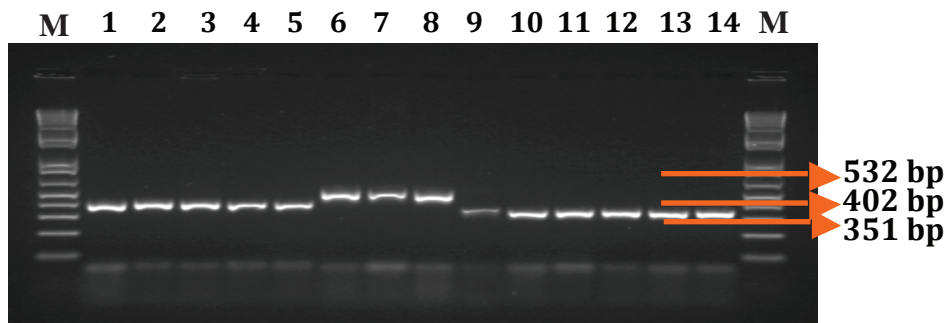


Fig. 1 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di PCR ottenuti con il Metodo 1 su DNA genomico estratto da 5 isolati di *M. fructigena* (pozzetti da 1 a 5), 3 isolati di *M. fructicola* (pozzetti da 6 a 8) e 6 isolati di *M. laxa* (pozzetti da 9 a 14; M, marcatore di peso molecolare)

Uso dei controlli

Vedi capitolo specifico successivo

2.6 Metodo 2

Identificazione molecolare mediante amplificazione PCR con primer specie-specifici disegnati su *Internal Transcribed Sequences (ITS)* (Ioos e Frey, 2000)

Differenze con il metodo precedente:

- non è una analisi multiplex (più specie in un tubo);
- l'analisi è specifica per individuare la sola specie "target" per volta;
- la discriminazione della specie si basa su polimorfismi di sequenza e non di lunghezza.

La specificità è data dai *primer* disegnati su una regione ITS che presenta polimorfismi puntiformi per ciascuna delle tre specie di *Monilinia* discriminabili.

Amplificazione PCR

Per la diagnosi molecolare con il metodo dell'amplificazione PCR su ITS specie-specifica i *primer* sono riportati nella Tabella 4.

TABELLA 4 - *Primer* per l'amplificazione secondo il protocollo di Ioos e Frey 2000

Nome identificativo	Descrizione	Sequenza
ITS1Mfcl	<i>Primer forward</i> specifico per <i>M. fruticola</i>	5'-TATGCTCGCCAGAGGATAATT-3'
ITS4Mfcl	<i>Primer reverse</i> specifico per <i>M. fruticola</i>	5'-TGGGTTTTGGCAGAAGCACACT -3'
ITS1Mlx	<i>Primer forward</i> specifico per <i>M. laxa</i>	5'-TATGCTCGCCAGAGAATAATC-3'
ITS4Mlx	<i>Primer reverse</i> specifico per <i>M. laxa</i>	5'-TGGGTTTTGGCAGAAGCACACC -3'
ITS1Mfgn	<i>Primer forward</i> specifico per <i>M. fructigena</i>	5'-CACGCTCGCCAGAGAATAACC-3'
ITS4Mfgn	<i>Primer reverse</i> specifico per <i>M. fructigena</i>	5'GGTGTTTTGCCAGAAGCACAC-3'

I *primer* possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati ed è **consigliabile che siano PAGE purificati**, per evitare amplificazioni false-positive. E' conveniente diluire i *primer* ad una concentrazione di 100 µM in tampone TE (Tris-HCl 10 mM ph 7,5; EDTA 1 mM), seguendo le istruzioni della Ditta fornitrice, e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Si preparano quindi delle sub-aliquote di circa 50 µl totali alla concentrazione di 10 µM, diluendo la madre acqua milliQ sterile, e si conservano a -20 °C.

La reazione di amplificazione si allestisce secondo le indicazioni scritte nel capitolo 2.5, paragrafo "Amplificazione PCR multiplex" seguendo le condizioni riportate in Tabella 5.

TABELLA 5 - Reagenti per la preparazione della master mix

COMPONENTI	Concentrazione iniziale	Volume per 1 reazione (µl)	Volume per n* Reazioni (µl)	Concentrazione finale
1. Acqua milliQ sterile		13,725	13,725 x n	
2. Tampone di amplificazione	10X	2	2 x n	1 x
3. MgCl ₂	50 mM	0,8	0,8 x n	2 mM
4. dNTPs	10 mM	0,3	0,3 x n	0,15 mM
5. <i>Primer forward</i>	10 µM	0,4	0,4 x n	0,2 µM
6. <i>Primer reverse</i>	10 µM	0,4	0,4 x n	0,2 µM
7. DNA polimerasi	2 U/µl	0,375	0,375 x n	0,0375 U/µl

Distribuire, con una micropipetta P20, 18 µl di *master mix* in provette da PCR da 0,2 ml predisposte in ghiaccio, in un apposito portaprovette.

Aggiungere 2 µl di DNA stampo in ciascun campione e un equivalente volume di acqua al campione di controllo.

VOLUME TOTALE DI REAZIONE: 20 µl

Una volta pronte, le provette vengono inserite nel termociclatore e sottoposte al seguente ciclo di amplificazione:

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	3'	1
	94 °C	30"	
Amplificazione	63 °C	30"	30
	72 °C	1,5'	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	∞	1

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

Elettroforesi su gel di agarosio

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

1. Preparare il gel di agarosio 1,2% (massa/volume) in TBE 0,5X con il colorante scelto per marcare il DNA (bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0,5 µg/ml, o GelRed alla concentrazione finale indicata dalla ditta fornitrice o con altri intercalanti di acidi nucleici vocati allo scopo e di adeguata sensibilità)
2. Caricare 10 µl del campione amplificato più 2 µl di *loading buffer* 6X in ciascun pozzetto. Caricare in un pozzetto un marcatore di peso molecolare idoneo (range circa 50-1000 bp)
4. Correre per circa 30 minuti a 80 volt, facendo riferimento al fronte del colorante.
7. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V. e fotografare

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio: vedi capitolo 2.5, paragrafo "Elettroforesi su gel di agarosio"

Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo per ciascuna delle *Monilie* testate con i corrispondenti "primer ITS" verrà visualizzata una banda di 356 paia di basi (Foto 2).

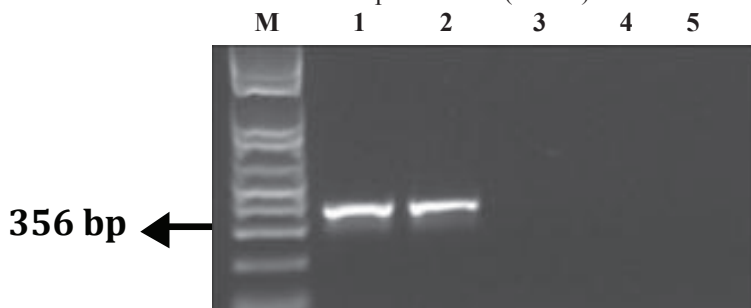


Fig. 2 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di PCR ottenuti con il protocollo di amplificazione di Ioos e Frey con i primer ITS1Mfcl e ITS2Mfcl specifici per *M. fructicola* su DNA genomico estratto da 2 isolati di *M. fructicola* (pozzetti da 1 a 2), 2 isolati di *M. fructigena* (pozzetti da 3 a 4) e 1 isolato di *M. laxa* (pozzetto 5). M, marcatore di peso molecolare.

Uso dei controlli

Per ciascun metodo di diagnosi molecolare descritto, è necessario includere dei controlli di reazione PCR (Fig. 3)

- **Controllo positivo:** reazione di PCR su DNA genomico di un isolato di riferimento di *M. fructicola* precedentemente testato con le coppie di primer previste per entrambi i metodi e diluito al limite di rivelazione. Serve per confermare la correttezza di preparazione della reazione PCR.
- **Controllo negativo:** Miscela di reazione contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA. Serve a monitorare eventuali contaminazioni.
- **Controllo di amplificazione interno (IAC, Internal Amplification Control):** La qualità dell'estrazione del DNA, e quindi la presenza di eventuali inibitori della PCR si possono controllare con DNA chimerico aggiunto alla miscela di reazione ed amplificabile con la stessa coppia di primers utilizzata per il DNA bersaglio, ma che fornisce un amplicone con taglia facilmente distinguibile da quella del DNA bersaglio. Serve a valutare l'amplificabilità del DNA (per maggiori dettagli vedere Cotè *et al.*, 2004). Alternativamente e più semplicemente è possibile controllare la qualità del DNA usando i primer universali ITS1 e ITS4, disegnati sui geni ribosomali fungini, sostituendoli ai primer usati per la diagnosi, e abbassando la temperatura di *annealing* a 50°C.
- **Controllo di specificità:** reazione di PCR su DNA genomico di *M. fructigena* e *M. laxa*, due specie filogeneticamente affini a *M. fructicola*, concentrato a valori medi di rivelazione. Serve per assicurare la specificità del metodo.

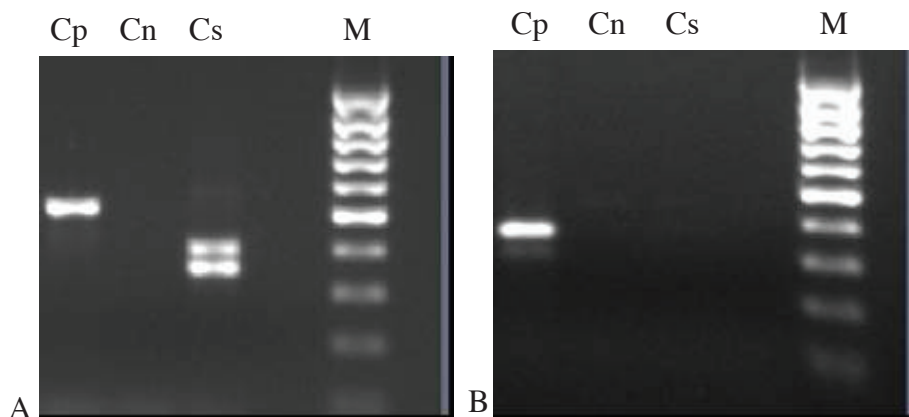


Fig. 3 - Elettroforesi su gel d'agarosio dei controlli di PCR per i metodi 1 (a) e 2 (b); Cp, controllo positivo, Cn, controllo negativo, Cs, controllo specificità. M, marcatore di peso molecolare.

2.7 Confronto tra i due metodi

METODO 1		METODO 2	
Vantaggi	Svantaggi	Vantaggi	Svantaggi
Oltre a rilevare la presenza di <i>Monilinia</i> e <i>Monilia</i> , permette di discriminare la specie in un'unica reazione PCR	Meno sensibile	Più sensibile	Se si vuole identificare la specie è necessario effettuare più amplificazioni, ciascuna con il primer specie-specifico
Più economico			Più costoso (maggior quantità di DNA polimerasi e necessità di primer PAGE-purificati)

Per le analisi di routine per l'identificazione di *M. fructicola* si consiglia l'applicazione del metodo 1 e, in caso di risultato positivo, l'applicazione del metodo 2 per la conferma.

3. DATI DI VALIDAZIONE

Il processo di validazione è consistito nella valutazione di un metodo nuovo, il **Metodo 1**, confrontandolo con un metodo standard, già validato, rappresentato dal **Metodo 2**, sulla base dell'ISO 17025:2005 e del protocollo EPPO PM7/98(1) (2010).

E' stata valutata prima la "abilità" del laboratorio di essere in grado di ottenere i parametri riportati per il metodo standard. Quindi si è verificata la "performance" del nuovo metodo per verificare se risponde ai requisiti minimi. Infine si è validato il nuovo metodo comparando le sue "performance" con quelle del metodo standard. Tali valutazioni sono state eseguite presso i laboratori del CRA-PAV.

Per completare la validazione del Metodo 1, ed in particolare la sua riproducibilità diagnostica è stato organizzato anche un "**Ring test**" comparativo in collaborazione con i seguenti laboratori:

- 1 Laboratorio di Micologia del Servizio Fitosanitario della Regione Emilia Romagna, via Corticella, 133, 40129 Bologna.
Responsabile: Dr.ssa Carla Montischi (CMontuschi@Regione.Emilia-Romagna.it, tel. 051/4159249)
Operatore: Dott.ssa Baschieri Tiziana (TBaschieri@Regione.Emilia-Romagna.it; tel. 051/5278208)
- 2 Laboratorio del Servizio Fitosanitario della Regione Piemonte, Environment Park - palazzina A2, Via Livorno, 60 - 10144 Torino. Responsabile: Dr. Giovanna Mason (giovanna.mason@regione.piemonte.it; tel. 011/4325067 - fax 011/4323710)
- 3 Centro Trasferimento Tecnologico, Unità Fitoiatria, Fondazione Edmund Mach, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via Mach 1, S. Michele all'Adige, 38010 TN
Responsabile: Daniele Prodorutti (daniele.prodorutti@iasma.it, tel. 0461/615109 - fax 0461/615500)
- 4 CRA-PAV, Via C.G. Bertero, 22, Roma.
Responsabile: Dr. Luca Riccioni (luca.riccioni@entecra.it, tel. 06/82070328)
Operatore: Salvatore Vitale (salvatore.vitale@entecra.it)

Sotto vengono riportati i **parametri di validazione** considerati e definiti secondo l'EPPO PM 7/98(1):

- **Sensibilità analitica:** la più piccola quantità di target che può essere rilevata.
- **Sensibilità diagnostica:** capacità del protocollo di rilevare la presenza del patogeno nei campioni infetti o contaminati rispetto ad un metodo standard;
- **Specificità analitica/diagnostica:** capacità del protocollo di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti o non contaminati dal patogeno in esame/rispetto ad un metodo standard;
- **Accuratezza relativa:** il valore risultante dal calcolo della Sensibilità diagnostica e della Specificità diagnostica;
- **Ripetibilità:** corrispondenza dei risultati ottenuti utilizzando lo stesso

protocollo con gli stessi campioni di riferimento e nelle stesse condizioni di lavoro (strumentazioni, operatore, laboratorio), ripetendo la metodica a brevi intervalli di tempo;

- **Riproducibilità:** corrispondenza dei risultati ottenuti utilizzando lo stesso protocollo con gli stessi campioni di riferimento in diversi laboratori.

Campioni: tutte le prove di validazione sono state eseguite su una serie di campioni di riferimento **'target' e 'non target'** rappresentati da isolati di *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa* e *M. polystroma* in coltura e su campioni di pomacee (mela e pera) e drupacee (pesca e susina) inoculate artificialmente con *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa*.

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

18 campioni 'target' rappresentati da diversi isolati di coltura pura di *M. fructicola* e da campioni ospiti inoculati artificialmente con *M. fructicola*.

Campioni di riferimento 'non target': isolati infetti da patogeni simili che colpiscono la stessa specie ospite, da patogeni geneticamente correlati, campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite.

22 campioni 'non target' rappresentati da diversi isolati di coltura pura di *M. laxa*, *M. fructigena* e *M. polystroma*, da campioni vegetali inoculati artificialmente con *M. fructigena* e *M. laxa*, e da campioni vegetali sani.

Metodo standard: PCR ITS (Ioos e Frey, 2000)

Verifica dell'abilità del laboratorio ad ottenere e confermare le «performance» del metodo standard (metodo 2)

Parametri	Valori metodo standard	Conferma
Sensibilità analitica	0,5 pg*	--
Specificità analitica	100%	si
Ripetibilità	100%	si
Riproducibilità	100%	si

*La sensibilità analitica è stata calcolata *de novo*, poichè non è indicata nel lavoro originale.

Metodo da validare: Multiplex PCR (Cotè *et al.*, 2004)

Verifica delle «performance» del metodo da validare (metodo 1)

Parametri	Valori metodo in validazione
Sensibilità analitica	25 pg
Specificità analitica	100%
Ripetibilità	100%

Test comparativo del metodo 1 con il metodo standard (metodo 2)

Parametri	Valori %
Sensibilità diagnostica	54,5*
Specificità diagnostica	100,0
Accuratezza relativa	77,3

*La sensibilità diagnostica del Metodo 1 è risultata bassa, come ci si aspettava, poiché il limite di rivelazione (sensibilità analitica) è pari a 25 pg, contro i 0,5 pg ottenuti con il metodo standard . **Tuttavia tale limite di rilevazione risulta essere sufficiente per la identificazione del target sia quando si analizza il DNA estratto da coltura pura del fungo che quando si analizza il DNA proveniente da tessuto ospite sintomatico, in quanto il limite di rilevamento di 25 pg è il linea con altri i metodi di identificazione molecolari pubblicati.**

Dati di validazione ottenuti con il “RING TEST”

Parametri	Valori % Metodo 1	Valori % Metodo 2
Sensibilità diagnostica	96%	97%
Specificità diagnostica	100%	100%
Accuratezza relativa	98%	99%
Ripetibilità	99%	99%
Riproducibilità	98%	98%

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- Anonymus, 2011. EPPO Reporting Service – Pests & Diseases. Paris, 2011-06-01, n. 6, 4-5.
- BATRA LR., 1991. World Species of *Monilinia*: their Ecology, Biosystematics and Control. Mycologia Memoir, 16. J. Cramer, Berlin (DE).
- BOSSHARD E., M. HILBER-BODMER, H-J. SCHARER, M. BUNTER, B. DUFFY, 2006. First report of the quarantine brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on imported stone fruits in Switzerland. *Plant Disease* 90(12), 1554.
- CABI/EPPO, 1991. *Monilinia laxa*. Distribution Maps of Plant Diseases, Map No. 44, Edition 5. CAB International, Wallingford, UK.
- CABI/EPPO, 1997. *Monilinia fructicola*. In: Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, pp. 530–535. CAB International, Wallingford (GB).
- CABI/EPPO, 2010. *Monilinia fructicola*. Distribution Maps of Plant Diseases, Map No. 50, Edition 8. CAB International, Wallingford, UK.
- CÔTÉ M.J., M-C. TARDIF M.-C., A.J. MELDRUM, 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*. 88, 1219-1225.
- DE CAL A., P. MELGAREJO, 1999. Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease*. 83, 62-65.
- DE CAL, A., I. GELL, I. USALL, P. VINAS, P., MELGAREJO, 2009. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in peach orchards in Ebro Valley, Spain. *Plant Disease* 93, 763.
- DUCHOSLAVOVA, J., I. SIRUCKOVA., E. ZAPLETALOVA, M. NAVRATIL, D. SAFAROVA, 2007. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on various stone fruit and pome fruits in the Czech Republic. *Plant Disease* 91(7), 907.
- EFSA Journal, 2011. Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options, 9(4), 2119, pg 155.
- EPPO, 2002. First report of *Monilinia fructicola* in France. EPPO Reporting Service 2002/003.
- EPPO, 2006. First report of *Monilinia fructicola* in Spain. EPPO Reporting Service 2006/043.
- EPPO, 2008. First record of *Monilinia fructicola* in the Czech Republic. EPPO Reporting Service 2008/050.
- EPPO, 2009. PM 7/18 (2) *Monilinia fructicola*. EPPO Bulletin 39, 337-343.
- EPPO, 2010. PM 7/98 Specific requirements for Laboratories preparing accreditation for plant pest diagnostic activity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 40, 5–22
- HILBER-BODMER, M., M. BUNTER, A. PATOCCHI, 2010. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apricot in a Swiss orchard. *Plant Disease* 94(5), 643.
- HINRICHS-BERGER, J., G. MULLER, 2010. First record of *Monilia fructicola* on blackberry fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117(3), 110-111.
- IOOS R., P. FREY, 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology* 106, 373–378.

- IOOS R., G. IANCU, 2008. Collaborative studies for the validation of PCR-based detection tests. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* **38**, 198–204.
- LANE CR., 2002. A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *laxa*, based on examination of cultural characters. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* **32**, 507– 511.
- MARINELLI E., S. VITALE, MT. VALENTE, L. RICCONI, 2013. Segnalate in Lazio infezioni di *Monilinia fructicola* su drupacee. *Informatore agrario*, **2**, 55-57.
- MONTUSCHI C., G. CEREDI, M. MARI, 2011. *Monilia fructicola* è arrivata anche in Emilia-Romagna. *Agricoltura*, aprile 2011, 90-92.
- PELLEGRINO, C., ML. GULLINO, A. GARIBALDI., D. SPADARO, 2009. First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease* **93**, 668.
- PETROCZY M., L. PALKOVICS, 2006. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. *Plant Disease* **90**(3), 375.
- RAYNER RW, 1970. A Mycological Colour Chart. CAB International, Wallingford (GB). USDA ARS. 2011. *Monilinia fructigena* and related brown rots. Systemic Mycology and Microbiology Laboratory – Nomenclature Fact Sheets.
- VAN BROUWERSHAVEN IR., ML. BRUIL, GCM. VAN LEEUWEN, LFF. KOX, 2010. A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathology*, **59**, 548–555.
- VAN LEEUWEN GCM, HA. VAN KESTEREN, 1998. Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany* **76**, 2042–2050.
- VAN LEEUWEN GCM, RP. BAAYEN, IJ. HOLB, MJ. JEGER, 2002. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp.nov. from *Monilia fructigena*. *Mycological Research* **106**, 444–451.
- VISARATHANONTH N., M. KAKISHIMA, Y. HARADA, 1988. Brown rot of grape berry caused by *M. fructicola*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **54**, 238-241.
- WASHINGTON WS., I. PASCOE, 2000. Disease notes or new records: First record of *Monilinia fructicola* on strawberry fruit in Victoria, Australia. *Australas. Plant Pathology*. **29**, 70.

ALLEGATO I - Strumentazione, materiali e reagenti

Strumentazione

1. Bilancia analitica
2. pHmetro
3. Agitatore magnetico
4. Bagnetto termostato o termoblocco
5. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
6. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
7. Omogeneizzatore “TissueLyser” o altro Beat Beater (non necessario)
8. Mortai e pestelli sterili
9. Frigorifero
10. Congelatore
11. Micropipette dedicate all’amplificazione e calibrate (P2, P10, P20, P50, P100, P200, P1000)
12. Micropipette dedicate all’estrazione dell’acido nucleico e calibrate (P10, P20, P100, P200, P1000)
13. Termociclatore
14. Vortex
15. Apparat per elettroforesi su gel d’agarosio
16. Transilluminatore o altra strumentazione tipo Gel Doc System per visionare e fotografare i gel
17. Spettrofotometro o spettrofluorimetro per dosaggio di DNA

Materiali

1. Carta da laboratorio
2. Pestellini sterili per provette di tipo Eppendorf da 1,5 ml
3. Guanti
4. Portaprovette
5. Provette di tipo Eppendorf sterili da 0,2 ml e 1,5 ml
6. Puntali sterili e puntali con filtro
7. Ghiaccio
8. acqua bi-distillata
9. acqua milliQ sterile
10. Azoto liquido
11. Mortai e pestelli sterili

Reagenti

1. Kit commerciale per estrazione DNA. In alternativa, composti chimici per la preparazione del tampone di estrazione del DNA: Tris, cloruro di sodio, EDTA, SDS, acetato di sodio, isopropanolo, etanolo
2. *DNase-free* RNAasi A commerciale (non necessaria se si dispone di uno spettrofluorimetro)
3. Composti chimici per la preparazione del tampone per l’elettroforesi TBE: Tris, Acido bórico, EDTA

4. Enzima DNA polimerasi più relativo tampone e $MgCl_2$. Le polimerasi consigliate sono: Dynazyme II DNA Polymerase (Finnzymes); Biotaq DNA Polymerase (Bioline); GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega)
5. dNTPs
6. Primer specifici (vedi tabelle 2 e 4)
7. Agarosio per biologia molecolare
8. Bromuro d'etidio o GelRed per la colorazione del DNA
9. Composti chimici per la preparazione del "DNA-Loading buffer": Blu di bromofenolo, xilencianolo, glicerolo
10. Marcatore di peso molecolare (range 50 bp-1000 bp)