

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
PHYTOPHTHORA RAMORUM

S. Vitale, A. Haegi, L. Luongo, A. Belisario

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	321
1.1 Introduzione	321
1.2 Sintomatologia	323
1.3 Morfologia	325
1.4 Epidemiologia	326
1.5 Diagnosi	326
1.6 Normativa fitosanitaria	327
2.METODO DI CAMPIONAMENTO	327
3.PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	329
3.1 Premessa	329
3.2 Diagramma di flusso	332
3.3 Metodo di diagnosi valutato e validato: nested -PCR	333
3.4 Valutazione risultati e punti critici del protocollo	338
4.DATI DI VALIDAZIONE	341
5.BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	346
Allegato I - Strumentazione, materiali e reagenti necessari	347

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

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

1.1 Introduzione

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

In Europa *P. ramorum* è stata segnalata, a partire dal 2001 (Werres *et al.*, 2001), principalmente in vivaio, su rododendro, viburno e azalea. *P. ramorum* non figura al momento negli elenchi degli allegati I e II della Direttiva 2000/29/CE ma è stata inserita nella Alert list dell'EPPO. La diffusione di questo patogeno potrebbe costituire una grave minaccia per la Comunità, pertanto sono state adottate temporaneamente misure fitosanitarie d'emergenza, al fine di impedirne la diffusione ovvero l'introduzione in paesi che al momento risultano esenti dal patogeno (Decisione della Commissione Europea del 19 settembre 2002 e Decreto Ministeriale 28 novembre 2002).

In **Tabella 1** sono riportate le specie ospiti più comunemente attaccate da questo patogeno in Europa.

TABELLA 1 - Ospiti principali di *Phytophthora ramorum* riportati in ambito europeo

Famiglia	Nome scientifico	Parti principalmente attaccate
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i>	Tronco
	<i>Fagus sylvatica</i>	Tronco
	<i>Lithocarpus densiflorus</i>	Tronco
	<i>Quercus</i> spp.	Tronco, rami, foglie
Ericaceae	<i>Vaccinium ovatum</i>	Tronco, rami, foglie
	<i>Rhododendron</i> spp.	Foglie e rami
	<i>Arbutus unedo</i>	Foglie e rami
	<i>Arbutus menziesii</i>	Foglie e rami
	<i>Arctostaphylos</i> spp.	Foglie e rami
	<i>Pieris</i> spp.	Foglie e rami
	<i>Kalmia latifolia</i>	Foglie
Oleaceae	<i>Syringa vulgaris</i>	Tronco, rami, foglie
	<i>Fraxinus excelsior</i>	Foglie e rami
	<i>Osmanthus</i> spp.	Foglie e rami
Taxaceae	<i>Taxus</i> spp.	Tronco, rami, foglie
Hamamelidaceae	<i>Hamamelis virginiana</i>	Foglie e rami
Aceraceae	<i>Acer macrophyllum</i>	Foglie
	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Foglie e rami
Theaceae	<i>Camellia</i> spp.	Foglie e rami
Hippocastanaceae	<i>Aesculus californica</i>	Foglie e rami
	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Foglie e rami
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i>	Foglie e rami
Caprifoliaceae	<i>Viburnum</i> spp.	Foglie, rami e colletto
	<i>Lonicera hispidula</i>	Foglie
Rosaceae	<i>Heteromeles arbutifolia</i>	Foglie e rami
	<i>Rubus spectabilis</i>	Foglie
Taxodiaceae	<i>Sequoia sempervirens</i>	Rametti e foglie
Pinaceae	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Rametti e foglie

1.2 Sintomatologia

Diversi tipi di sintomatologie sono ascrivibili a questo oomicete in relazione al tipo di ospite, qui di seguito si riportano le tre tipologie annoverate nel documento EPPO PM7/66(1):

- 1) **Morte Improvvisa** delle querce o specie arboree dovuta allo sviluppo di cancri letali (Sudden Oak Death -SOD), ovvero presenza di cancri con essudato.
- 2) **Appassimento/avvizzimento dei germogli** per infezioni fogliari e/o infezioni del fusto, rami e branche ovvero per marciume del colletto e delle radici (quest'ultimo segnalato in letteratura su Viburno) (*P. ramorum* shoot dieback).
- 3) **Avvizzimento fogliare** (*P. ramorum* leaf blight).

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

Nel dettaglio:

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

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

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

Appassimento/avvizzimento dei germogli (*P. ramorum* shoot dieback):

Questa tipologia di sintomo è rilevabile su diverse piante ornamentali e/o boschive quali, **rododendro**, **pieris** (noto anche come Asebo), **lillà**, **douglasia** e **viburno** (Figg. 1 e 2).

I sintomi riguardano la chioma, comprendendo foglie e germogli, con lo sviluppo di lesioni che si originano solitamente dall'apice fogliare o dal germoglio progredendo verso la base. Spesso viene interessata la nervatura principale della foglia e le macchie hanno **aspetto oleoso con margine sfumato** a volte con aloni clorotici tipici dei danni da *Phytophthora* (Figg. 1 e 2).

Diverse specie di *Phytophthora*, come pure alcuni patogeni fungini appartenenti ai generi *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Botrytis*, ovvero altre cause, anche di natura abiotica, possono causare sintomi simili a *P. ramorum*.



Fig. 1 - Lesioni fogliari da *Phytophthora ramorum* su viburno rilevate in Italia, nella primavera 2013



Fig. 2 - Particolare di macchie fogliari da *Phytophthora ramorum* su viburno

1.3 Morfologia

Le caratteristiche morfologiche di *P. ramorum* sono schematicamente riportate sul documento EPP0 PM7/66(1)(Anonimo, 2006). Considerando la morfologia espressa sul terreno di coltura semiselettivo P₅ARP(H) a 20°C con 12 ore di fotoperiodo, le colonie sono piuttosto lente nella crescita (circa 2 mm al giorno). Il micelio è debolmente coralloide senza sfiancamenti ifali. Gli sporangi si presentano da ellissoidali ad affusolati, frequentemente in piccoli gruppi, caduchi, con o senza un corto peduncolo, semipapillati di dimensioni 20–32 × 40–80 µm, media 24 × 52 µm, rapporto medio lunghezza/larghezza 2,16, prodotti abbondantemente sulla superficie del mezzo agarizzato. Le clamidospore sono molto comuni nelle colonie più vecchie (dopo 7-10 giorni) sono piuttosto grandi (fino a 80 µm), da ialine a leggermente brune. *P. ramorum* è eterotallica, pertanto i gametangi (strutture sessuali) possono essere prodotti con colture appaiate su agar con pezzi di carota (carrot piece agar – CPA), ovvero su V8, con il complementare mating type utilizzando per l'appaiamento anche *P. cryptogea*.

1.4 Epidemiologia

A partire dal 2001, diversi focolai della malattia sono stati accertati, principalmente su rodododendro e viburno, in diversi paesi europei come Belgio, Danimarca, Francia, Germania, Irlanda, Norvegia, Olanda, Polonia, Regno Unito, Repubblica Ceca, Slovenia, Svezia e Spagna. Recentemente la malattia è stata rinvenuta anche su altre piante ornamentali, sempre in vivaio quali:

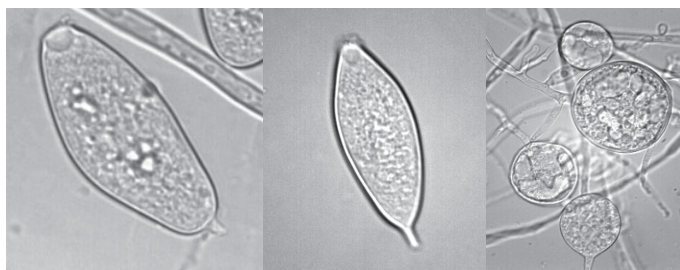


Fig. 3 - Sporangii semipapillati, caduchi con corto peduncolo di *Phytophthora ramorum* (sinistra e centro); clamidospore terminali (destra)

Arbutus, *Camellia*, *Hamamelis*, *Kalmia*, *Laurus*, *Leucothoe*, *Magnolia*, *Pieris*, *Syringa*, *Taxus* e *Vaccinium*. A partire dal 2003, nel Regno Unito e Olanda, sono stati



Fig. 4 - Colonia di *Phytophthora ramorum* su PDA (sinistra) e su agar con pezzi di carota (carrot piece agar - CPA; destra).

osservati i primi sintomi della malattia anche su alcune specie arboree europee come quercia (*Q. cerris*, *Quercus falcata*, *Q. ilex*, *Q. robur*, *Q. rubra*), faggio, frassino, castagno e ippocastano. Le piante colpite si trovavano all'interno di aree boschive o di parchi e, in tutti i casi, in vicinanza di piante di rododendro infette.

In Italia, la malattia è stata riscontrata nel 2002 in seguito ad una intercettazione francese di una pianta di rododendro infetta proveniente da un vivaio di Verbania, in Piemonte (Gullino *et al.*, 2003). Nella primavera 2013 è stata rilevata anche su piante di viburno in alcuni vivai toscani. Le piante presentavano evidenti attacchi alle foglie, giovani getti e rametti florali. Le macchie fogliari così come i cancretti rameali si presentano del tutto simili ai sintomi riportati in letteratura per il rododendro.

Alla luce delle conoscenze attuali, è opportuno porre particolare attenzione sulla eventuale presenza e diffusione del patogeno nel nostro Paese andando a delineare un quadro degli ospiti più frequentemente attaccati.

1.5 Diagnosi

P. ramorum può essere identificata sulla base di parametri morfologici e colturali o attraverso un appropriato metodo molecolare, ovvero combinando sia l'aspetto morfologico sia quello molecolare. Per le metodiche di identificazione sia morfologica sia molecolare si rimanda al protocollo EPPO PM7/66(1) del 2006. Ad integrazione del protocollo ufficiale EPPO, si segnalano per diagnosi molecolare a mezzo di **PCR convenzionale** i protocolli di:

- a) Iosos *et al.* (2006) con primer sviluppati su geni a singola copia GPA e TRP;
- b) Schena *et al.* (2008) con primer sviluppati sulla sequenza genica di Ypt1 ed applicabile sia come singola PCR (single-round PCR) oppure come nested PCR;
- c) Hayden *et al.* (2004) il cui protocollo rappresenta una integrazione del metodo B descritto in EPPO per quel che riguarda le diluizioni del DNA e l'uso di una coppia di primer interni (nested PCR) per aumentarne la sensibilità. Entrambe le coppie di primer sono state disegnate sulla regione dello spaziatore interno trascritto (ITS) del DNA ribosomale.

I primi due metodi (a, b) al momento non sembrano dar luogo a falsi positivi ovvero a 'cross-reaction' con *P. lateralis* mentre, il metodo (c) dà luogo a falsi positivi con *P. lateralis* a fronte, però, di una sensibilità molto elevata.

Per l'identificazione quali-quantitativa a mezzo di Real-time PCR oltre a quanto descritto in EPPO sono disponibili i protocolli di (Hayden *et al.*, 2004; 2006), (Hughes *et al.*, 2006) e (Bilodeau *et al.*, 2007) che prevedono l'utilizzo sia di TaqMan sia di SYBR Green. L'utilizzo di TaqMan è considerato molto più affidabile per accertamenti diagnostici rispetto a SYBR Green.

1.6 Normativa fitosanitaria

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

2. METODO DI CAMPIONAMENTO

Per una più completa trattazione dell'argomento si rimanda alle indicazioni fornite dalla pubblicazione su *P. ramorum* dell'EPPO PM7/66(1)(2006).

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

- Gli attrezzi utilizzati per il prelievo (es.: forbici, lame, sgorbie) devono essere accuratamente disinfettati (con soluzioni concentrate di ipoclorito di sodio/sali quaternari d'ammonio o passati alla fiamma) nella fase di passaggio tra un prelievo e l'altro per evitare di contaminare i campioni di diversa provenienza.
- Prelevare porzioni di organi vegetali che comprendano la zona di passaggio tra tessuti sani e lesionati.
- Quanto più il materiale sarà rispondente a sintomi ascrivibili a *Phytophthora* tanto più il campionamento risulterà efficace.
- Per evitare contaminazioni, i diversi campioni vegetali, devono essere confezionati singolarmente in sacchetti di plastica ed identificati con etichette poste all'interno ed all'esterno della confezione.
- Per riporre il campione utilizzare buste di plastica di dimensioni proporzionate. Campioni vegetali come foglie e germogli possono andare incontro a disidratazione per questo devono essere confezionati in buste di plastica chiuse.
- Il campione, qualora si presentasse bagnato, deve essere tamponato con carta assorbente prima del confezionamento per evitare sia fenomeni di eccessiva condensa sia fenomeni di marcescenza, con sviluppo di microrganismi saprofiti che possono ostacolare l'analisi.

- I campioni durante la fase di campionamento devono essere conservati in contenitore frigo con del ghiaccio artificiale non a diretto contatto con il materiale vegetale per evitarne l'allessatura.
- Se il campionamento è effettuato in parcelle e/o appezzamenti diversi è opportuno indossare soprascarpe per evitare di diffondere il patogeno (eventualmente presente) attraverso le particelle di suolo attaccate alle scarpe che risultano così contaminate.

I sintomi rilevati su viburno nella primavera 2013 sono stati chiaramente a carico degli organi epigei e molto simili a quanto già descritto e diffusamente riportato in letteratura per *Rhododendron*. Pertanto con questo report si vuole evidenziare la necessità di ispezionare le piante di viburno considerando sia la sintomatologia aerea sia quella afferente al colletto.

Il quadro sintomatico su porzioni aeree di viburno può essere così riassunto:

- macchie fogliari bruno-violacee per lo più a carico delle nervature, dal perimetro sfrangiato e circondate da alone idropico di color verde chiaro-giallastro;
- cancri di giovani fusti, dei rametti e del picciolo, di colore bruno scuro con margine idropico, raramente infossati;
- appassimento e disseccamento degli apici floreali per presenza di cancro bruno-violaceo.

Importantissimi sono i tempi di lavorazione: meno tempo intercorre tra il prelievo dei campioni e la lavorazione in laboratorio e maggiori sono le possibilità di isolare *P. ramorum*. Nell'impossibilità di recapitare direttamente, o nell'arco di 24 ore, i campioni al laboratorio di diagnosi, questi possono essere conservati a **basse temperature (4-10°C)** anche per tempi più lunghi di 24 ore. **La qualità del campione è determinante per una corretta diagnosi.**

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

- Per campioni legnosi da tronchi di ospiti arborei, prelevare tessuti vegetali in corrispondenza dei cancri che emettono essudati (bleeding cankers), scegliere il punto di passaggio tra sano e malato. Le porzioni di floema e xilema devono essere asportate come tassello quadrangolare con uno scalpello o lama sterile e riposti in un sacchetto o contenitore sterile a chiusura ermetica.
- Per porzioni vegetali costituite da getti e rametti, prelevare tessuti e/o porzioni vegetali che comprendano il punto di passaggio tra sano e malato.
- Per campioni fogliari raccogliere 4-6 foglie che mostrano alterazioni e sintomi a diversi stadi.
- Il sacchetto sigillato deve essere identificato in maniera univoca con una sigla/codice che verrà riportata sul verbale che andrà completato in ogni sua parte. Compilare il "Verbale di ispezione e prelievo" ed allegarlo al campione.
- Per l'esame morfologico si consiglia di eseguire le osservazioni su colonie allevate su substrati semiselettivi come PARP, P₅ARP, P₅ARP(H), ovvero su substrato non selettivo come agar con pezzi di carota (carrot piece agar – CPA).

Informazioni che possono essere di utilità al processo diagnostico:

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

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

- a) **Stagionalità** – E' importante eseguire i prelievi durante le stagioni di mezzo, in primavera ed in autunno in quanto le condizioni di temperatura ed umidità sono favorevoli all'attività di *P. ramorum* (Moralejo *et al.*, 2009; Vettrano *et al.*, 2010).
- b) **Intervallo di tempo tra il campionamento e l'attività diagnostica** – Come detto in precedenza, la brevità dell'intervallo di tempo che intercorre tra il campionamento e l'attività diagnostica è importante al fine di ottenere un risultato certo. Allo stesso tempo, è fondamentale rispettare una corretta conservazione dei campioni che ne prevenga il disseccamento ed il deterioramento.

3. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

3.1 Premessa

Il protocollo diagnostico qui descritto è il prodotto dell'attività effettuata nell'ambito del Progetto Finalizzato 'ARON-ARNADIA', finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF). **Questo protocollo diagnostico è finalizzato alla individuazione e diagnosi dell'oomicete *Phytophthora ramorum* soggetto a norme fitosanitarie e fornisce le linee guida al fine di operare una corretta diagnosi su materiale vegetale infetto.**

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

La metodologia di laboratorio riportata nel protocollo è stata validata sulla base

dei parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, ripetibilità e riproducibilità.

Per la definizione di tali parametri si è scelto di condurre la metodologia di diagnosi con l'utilizzo dei reagenti e strumentazioni in dotazione a ciascun laboratorio in modo da conoscere la complessiva robustezza del metodo a prescindere da condizioni specifiche legate al laboratorio o all'operatore. Inoltre si è scelto di fornire materiale ospite polverizzato da cui estrarre il DNA con la finalità di validare una metodica capace di dare risultati affidabili e ripetibili indipendenti dal metodo/kit di estrazione impiegato.

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

1. SFR Emilia Romagna, Referente Dott.ssa Carla Montuschi
2. SFR Piemonte, Referente Dott.ssa Giovanna Mason
3. SFR Provincia di Trento–Fondazione Edmund Mach–IASMA, Referente Dott. Daniele Prodorutti
4. SFR Valle D'Aosta, Referente Dott. Fabio Guglielmo
5. SFR Toscana, Referente Dott. Domenico Rizzo
6. CRA-PAV (Roma), Referente Dott.ssa Alessandra Belisario
7. Università degli Studi della Tuscia, Referente Dott.ssa Anna Maria Vettrai

Il test è stato ripetuto da ciascun laboratorio per una seconda volta a distanza di almeno 15 giorni in modo da valutare la **ripetibilità** dei risultati ottenuti all'interno del laboratorio stesso.

Per la ripetibilità, tutti gli esperimenti per lo sviluppo della metodica sono stati ripetuti almeno tre volte con simili risultati. Per ciascun campione sono stati saggiati tre replicati tecnici secondo le linee guida ISO/IEC standard 17025 (*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*) non è stata ancora valutata.

La scelta della metodologia diagnostica, validata secondo i parametri ISO 16140:2003, ISO 17025:2005 ed EPPO Diagnostic PM7/98, è scaturita sulla base di una attenta rivisitazione delle metodiche riportate nella bibliografia prodotta sull'argomento a partire dai protocolli EPPO (2006) e successivi come precedentemente riportato nel capitolo sulla diagnosi. Dal confronto dei diversi protocolli, la scelta è caduta sulla PCR convenzionale, rispetto alla Real-Time PCR, per una maggiore ripetibilità, riproducibilità della metodica nonché per una maggiore rispondenza alle esigenze dei SFR date le competenze e le attrezzature disponibili. **Tra le metodiche disponibili in PCR convenzionale, è stata scelta quella sviluppata da Hayden *et al.* (2004) per l'elevata sensibilità analitica** (diluizione limite dell'estratto iniziale con la quale il protocollo riesce ad individuare il patogeno) che è stata **valutata e validata. Saggi di laboratorio hanno dimostrato che la I PCR (single round PCR) ha una sensibilità di 150 fg che arriva a 1 fg di DNA con la II PCR (nested-PCR).**

A supporto della scelta operata è il recente lavoro pubblicato da Vettrai *et al.*, (2010), che indica la metodica di PCR pubblicata da Hayden *et al.*, (2004) più affidabile a confronto con le altre metodiche. Per quanto concerne la **specificità**, questa è stata verificata anche per comparazione 'in silico' delle sequenze della regione ITS

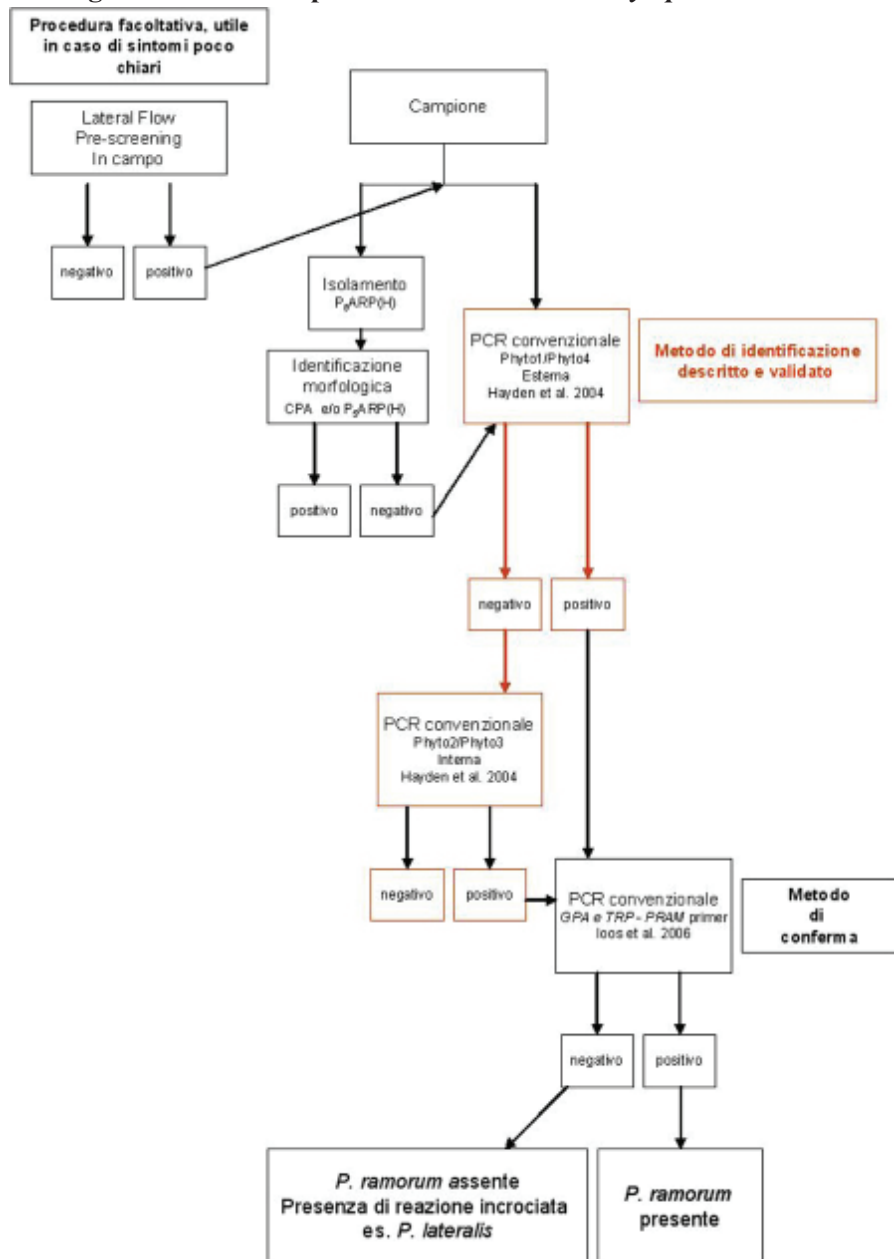
delle più comuni specie di *Phytophthora* presenti nel nostro Paese confermando la possibilità di reazione incrociata con *P. lateralis*.

Undici ceppi di *P. ramorum*, forniti da diverse Istituzioni nazionali ed estere provenienti da ospiti diversi, sono stati saggiati per rilevare una eventuale variazione nella **sensibilità** della metodica. I risultati non hanno rilevato alcuna variazione al riguardo.

La sensibilità e la riproducibilità della metodica sono state saggiate presso il CRA-PAV, preventivamente alla effettuazione del ring-test, utilizzando diversi kit di estrazione per il DNA quali: Qiagen DNeasy Plant Mini Kit; Macherey-Nagel "Nucleospin Plant II"; CTAB; Wizard (Promega) e Invisorb Spin Plant Mini kit. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la corretta diagnosi non viene alterata dal tipo di metodo/kit di estrazione.

Il protocollo di diagnosi molecolare a mezzo di nested-PCR è stato messo a punto dal CRA-PAV con l'utilizzo del kit di estrazione Wizard (Promega).

3.2 Diagramma di flusso per l'identificazione di *Phytophthora ramorum*



N.B. In rosso sono indicate le parti del diagramma di flusso messe a punto e validate in questo lavoro dal CRA-PAV.

3.3 Metodo di diagnosi valutato e validato: nested-PCR

Preparazione del saggio nested-PCR

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

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

Per ogni amplificazione vanno inseriti: un controllo positivo ed un controllo negativo.

Come controllo positivo deve essere utilizzato un campione di DNA estratto da colonia pura di *P. ramorum*.

Il controllo negativo è costituito da acqua sterile distillata microfiltrata caricata al posto del DNA.

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

Estrazione con kit commerciale

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

Nested-PCR

Il protocollo qui di seguito descritto è stato sviluppato sulla base del Metodo B dell'Appendice 4 del protocollo EPPO (Anonimo, 2006) integrato con quanto riportato da Hayden *et al.* (2004) essenzialmente per aumentare la sensibilità diagnostica.

N.B. In variazione al suddetto protocollo EPPO, il DNA estratto da materiale vegetale deve essere diluito 1:100 per limitare l'effetto degli inibitori. Inoltre, i campioni che risultano negativi alla prima amplificazione con la I coppia di primer Phyto1/Phyto4, devono essere sottoposti ad una seconda amplificazione (nested PCR), diluendo l'amplificato della prima PCR 1:500 ed utilizzando la II coppia di primer interni Phyto2/Phyto3, secondo quanto descritto da Hayden *et al.* (loc. cit).

N.B. Cambiare i guanti una volta proceduto alla diluizione dei campioni per evitare contaminazioni nella fase di preparazione della PCR.

1. Primer

I coppia di primer con la quale si ottiene un amplicone di 687 bp

Phyto1	5'-CAT GGC GAG CGC TTG A-3'
Phyto4	5'-GAA GCC GCC AAC ACA AG-3'

Il coppia di primer con la quale si ottiene un amplicone di 291 bp

Phyto2	5'-AAA GCC AAG CCC TGCAC-3'
Phyto3	5'-GGT GGA TGG GGA CGT G-3'

I primer possono essere ordinati ad apposite ditte che li sintetizzano e li consegnano in forma liofilizzata. E' conveniente diluire i primer ad una concentrazione di 50 μ M o 100 μ M in tampone TE (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA) e conservare queste soluzioni madri (stock) a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 ml totali alla concentrazione di 5 μ M o 10 μ M con H₂O distillata microfiltrata sterile per biologia molecolare (working solution) e conservarle a -20 °C.

2. Preparazione alla PCR

- Indossare guanti puliti.
- Usare solo pipette, puntali con filtro e provette sterili e, se si dispone di una cappa di lavoro per PCR, tenerli sotto la luce U.V. per 10 minuti prima di utilizzarli.
- Siglare le provette e metterle in ordine in un porta provette mantenuto in ghiaccio.
- Scongellare i reagenti per preparare la miscela di reazione, di seguito riportata, avendo l'accortezza di porli in ghiaccio.
- Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio.

3. I PCR con la coppia di primer esterni Phyto1/Phyto4

Miscela di reazione per 25 µl di volume totale per campione

Componenti	Concentrazione iniziale	Volume per singola provetta (µl)	Concentrazione finale
buffer 10X	10X	2,5	1X
MgCl ₂	50 mM	1	2,00 mM
dNTPs	2,5 mM	2	0,20 mM
Primer Ph1	5 µM	2,5	0,50 µM
Primer Ph4	5 µM	2,5	0,50 µM
Taq polimerasi	5 U/µl	0,1	0,02 U/µl
H ₂ O		8,15	
	Volume totale	18,75	

Ordine di inserimento

- 1- acqua
- 2- buffer
- 3- cloruro di magnesio (MgCl₂)
- 4- dNTPs
- 5- primer
- 6- enzima (Taq polimerasi)
- 7- DNA

1. La miscela di reazione va opportunamente miscelata con vortex e riportata sul fondo della provetta con una breve centrifugata (mini spin).
2. Distribuire 18,75 µl di miscela di reazione in ciascuna provetta di PCR tenuta in ghiaccio.
3. Aggiungere 6,25 µl di DNA templatato (1:100 del DNA estratto da materiale vegetale polverizzato in azoto), a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.
4. Aggiungere 6,25 µl di acqua distillata microfiltrata sterile nell'ultima provetta di PCR come controllo negativo (senza DNA).
5. Aggiungere 6,25 µl di DNA templatato del controllo positivo che, se ottenuto da coltura pura, deve essere diluito 1:1000.
6. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
7. Inserire le provette nel termociclatore.
8. Avviare la PCR dopo aver selezionato il programma prescelto.

Ciclo di amplificazione

	Temperatura	Tempo	N° di cicli
Denaturazione	94 °C	1'25"	1
	93 °C	35"	
Amplificazione	62 °C	55"	34
	72 °C	50" ⁽¹⁾	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C		
Conservare le provette in frigorifero			

⁽¹⁾aggiungere 5" ad ogni ciclo

4. Elettroforesi su gel di agarosio

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

1. Preparare il gel di agarosio 1% in TBE 1X.
2. Dare una breve centrifugata alle provette contenenti gli amplificati per eliminare l'eventuale condensa formatasi sul tappo, che può provocare al momento della apertura pericolose contaminazioni per aerosol.
3. Caricare complessivi 12 µl per campione (10 µl di amplificato + 2 µl di loading buffer 6X) cambiando il puntale al caricamento di ogni campione.
4. Caricare in un pozzetto il DNA marker idoneo (100 bp o 1KB plus).
5. Correre per circa 40-60 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 15-30 minuti in immersione in una soluzione di 250 µl/1000 ml di bromuro di etidio in TBE 1 o 0,5X. In alternativa al bromuro di etidio si può usare il gel red in soluzione 3X partendo da una soluzione stock 10.000X, da aggiungere direttamente al gel di agarosio seguendo le indicazioni della ditta produttrice.
7. Lavare il gel per circa 5 minuti in H₂O distillata.
8. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V. od altro apparecchio (es. Gel Doc) per l'eventuale presenza della banda a 687 bp.

5. II PCR con la coppia di primer interni Phyto2/Phyto3 da usare in caso di esito negativo ottenuto con la I PCR

Miscela di reazione per 25 µl di volume totale per campione

Componenti	Concentrazione iniziale	Volume per singola provetta (µl)	Concentrazione finale
buffer 10X	10X	2,5	1X
MgCl ₂	50 mM	1	2,00 mM
dNTPs	2,5 mM	2	0,20 mM
Primer Ph2	10 µM	1,25	0,50 µM
Primer Ph3	10 µM	1,25	0,50 µM
Taq polimerasi	5 U/µl	0,1	0,02 U/µl
H ₂ O		10,65	
	Volume totale	18,75	

1. La miscela di reazione va opportunamente omogeneizzata con vortex e riportata sul fondo della provetta con una breve centrifugata (mini spin).
2. Distribuire 18,75 µl di miscela di reazione in ciascuna provetta di PCR tenuta in ghiaccio.
3. Aggiungere 6,25 µl di acqua distillata filtrata sterile nell'ultima provetta di PCR come controllo negativo (senza DNA).
4. Aggiungere 6,25 µl di DNA templatato (1:500 dell'amplificato ottenuto dalla I PCR), a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione, incluso il controllo positivo.
5. Centrifugare brevemente le provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.
6. Inserire le provette nel termociclatore.
7. Avviare la PCR dopo aver selezionato il programma prescelto. Il programma dei cicli della PCR è identico a quello utilizzato per la I PCR e riportato in precedenza.
8. Le modalità di elettroforesi su gel di agarosio e la colorazione del gel seguono la procedura descritta in precedenza.
9. Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V. od altro apparecchio (es. Gel Doc) per l'eventuale presenza della banda a 291 bp.

N.B. Per entrambe le PCR, nel caso di ottenimento di bande deboli, si può ricorrere un gel caricato con 15 µl di amplificato + 3 µl di loading buffer 6X.

3.4 Valutazione dei risultati

Se il saggio è positivo si osserverà una banda di 687 bp nella I PCR o una di 291 bp nella II PCR. La banda dovrà essere alla stessa altezza della banda del controllo positivo.

Nel caso di bande molto deboli nella II PCR si consiglia di ripetere l'intero procedimento partendo dallo stock di DNA ed utilizzando tutti i componenti di reazione nuovi per convalidare o meno l'effettiva esistenza di positività. In ogni caso si consiglia di confrontare i risultati ottenuti con almeno un'altra metodologia.

Punti critici del protocollo

- Il punto debole di questo protocollo, basato su nested-PCR, è l'estrema sensibilità della reazione, che consente di rilevare il patogeno anche se presente in piccole quantità ma che, se non utilizzato correttamente, può dar luogo a falsi positivi dovuti a contaminazioni (reagenti contaminati, estratti contaminati, blocco del termociclatore contaminato, micropipette contaminate, etc.). Si raccomanda, pertanto, di lavorare con ESTREMA attenzione e di avvalersi SEMPRE di controlli negativi sicuri per verificare la validità di ogni evento di amplificazione.
- **Si consideri, come già detto precedentemente, che la I PCR ha una sensibilità pari a 150 fg mentre la II PCR arriva ad amplificare fino a 1 fg di DNA target.**
- Al fine di evitare contaminazioni si raccomanda di:
 - organizzare il laboratorio di diagnosi molecolare, se possibile, con ambienti separati (laboratorio per estrazione, laboratorio per amplificazione e laboratorio per elettroforesi). Se ciò non è possibile, utilizzare assolutamente bancali separati per le tre fasi e set di micropipette dedicate a ciascuna fase. Fare molta attenzione al bancale di elettroforesi, dove si manipolano gli amplificati;
 - cambiarsi i guanti dopo la fase di diluizione del DNA;
 - è consigliabile aliquotare tutti i reagenti ed al primo sospetto di contaminazione, eliminarli tutti e ripartire da aliquote nuove (in caso di contaminazione è molto difficile risalire al reagente o campione contaminato);
 - usare solo acqua sterile per biologia molecolare (se preparata in laboratorio è meglio utilizzare acqua microfiltrata);
 - usare solo puntali sterili con filtro;
 - al momento di caricamento del blocco del termociclatore accertarsi che le provette siano ben chiuse; se al termine di una PCR si ritrovano provette

aperte all'interno del termociclatore (dovute ad una chiusura non ermetica del coperchio o a provette fallate) trattare il blocco con soluzioni di DNasi reperibili in commercio;

- fare molta attenzione alla manipolazione dei campioni amplificati, quando devono essere caricati su gel.

Inoltre si raccomanda di:

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

Nel caso si volesse sottoporre ad identificazione una colonia pura assimilabile a *P. ramorum* si consiglia di utilizzare il protocollo di Ioos *et al.* (2006) che, pur avendo minore sensibilità del metodo qui descritto non ha dimostrato, al momento, reazioni incrociate con altre specie di *Phytophthora*, oltre a *P. ramorum*.

In ogni caso è bene considerare che la nested PCR di Hayden *et al.* (2004) può essere applicata anche su DNA estratto da colonia. In questo caso il DNA deve essere diluito 1:1000 per la I PCR procedendo, poi, secondo quanto precedentemente descritto.

Saggio diagnostico	Caratteristiche
Metodo di diagnosi: nested-PCR	<p data-bbox="560 364 1057 487">Elevata sensibilità: questa caratteristica si è dimostrata di estrema necessità per una corretta diagnosi, in quanto il 50% dei laboratori, che hanno partecipato al ring-test, ha avuto necessità della II PCR per identificare la presenza di <i>P. ramorum</i> nel tessuto ospite infetto.</p> <p data-bbox="560 505 1057 555">Aspetti positivi: elevata affidabilità, ripetibilità, sensibilità e specificità su campioni infetti.</p> <p data-bbox="560 573 1057 622">Aspetti negativi: rischio di falsi positivi per contaminazione in quanto il test è molto sensibile.</p> <p data-bbox="560 640 1057 842">Eventuali falsi positivi con <i>P. lateralis</i>, sebbene quest'ultima specie non sia stata ancora mai segnalata in Italia ed abbia ospiti piuttosto differenti da <i>P. ramorum</i> quali principalmente, <i>Chamaecyparis</i> spp. e <i>Taxus brevifolia</i>. Inoltre le due specie di <i>Phytophthora</i> differiscono grandemente per gli aspetti morfologici, si veda la scheda EPPO (Anonimo, 2009) e la recente pubblicazione di Brasier <i>et al.</i>, (2010).</p> <p data-bbox="560 860 1057 964">L'elevata quantità di DNA (> 50 pg/μl) può produrre falsi positivi, è comunque impossibile ottenere tale quantità da campioni vegetali, eventualmente si può raggiungere con una estrazione da coltura pura.</p> <p data-bbox="560 982 1057 1104">Da alcuni saggi di laboratorio con la nested-PCR sono stati ottenuti amplificati utilizzando DNA estratto da colonie di <i>P. cinnamomi</i>, <i>P. cambivora</i>, <i>P. citricola</i>, <i>P. cryptogea</i>, <i>P. megasperma</i>, <i>P. nicotianae</i> così come segnalato già in letteratura (Davidson <i>et al.</i>, 2003).</p>

Aspetti conclusi della diagnosi per *P. ramorum*

Per una corretta diagnosi, così come raccomandato anche in EPPO (Anonimo, 2006), si consiglia di utilizzare almeno 2 metodiche. Pertanto nel caso di diagnosi positiva si raccomanda di supportare il risultato con saggi morfologici o altra metodica molecolare. A questo proposito, nella procedura qui riportata ed illustrata nel diagramma di flusso (vedi Pag. 332), i risultati positivi ottenuti con nested-PCR debbono essere confermati a mezzo di PCR tradizionale secondo il metodo riportato da Ioos *et al.* (2006), validato a mezzo di ring test (Ioos e Iancu, 2008), che si basa sull'amplificazione a mezzo di coppie di primer disegnati sui geni TRP e GPA. La coppia di primer disegnata sul gene GPA risulta avere, generalmente, una maggiore sensibilità rispetto a quella del gene TRP.

4. DATI DI VALIDAZIONE

Per la validazione dei protocolli diagnostici sono stati calcolati i seguenti parametri [ISO 16140:2003(E)] utilizzando campioni di riferimento.

- **Specificità analitica:**
 - A) *Sensibilità specifica*: capacità del protocollo di rilevare la presenza del patogeno nei campioni sicuramente infetti.
 - B) *Specificità*: capacità del protocollo di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti dal patogeno in esame.
- **Accuratezza**: il valore risultante dal calcolo della sensibilità specifica e della specificità.
- **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, usando diversa attrezzatura.

Tutte le prove di validazione sono state effettuate utilizzando una serie di campioni di riferimento ('target' e 'non target') forniti in modalità *blind* (cieca).

Campioni di riferimento 'target': campioni fogliari ovvero rameali di viburno infettati con *P. ramorum*. I ceppi di riferimento utilizzati per le infezioni artificiali sono stati: AB2 ottenuto da *Viburnum tinus* e fornito dal Central Science Laboratory (CSL) di York (UK) ora Food and Environment Research Agency (FERA), AB188 ottenuto da *Rhododendron* e fornito dal SFR dell'Emilia Romagna.

Dal momento che non è emersa variabilità ceppo dipendente nella sensibilità del metodo sono stati utilizzati indifferentemente campioni vegetali inoculati con i ceppi AB2 o AB188.

Campioni di riferimento 'non target': campioni fogliari ovvero rameali di viburno infettati con specie di *Phytophthora* che colpiscono la stessa specie ospite (es. *P. cactorum*, *P. hedraiandra*, *P. cinnamomi*) (di seguito denominati "NT"), campioni non infetti appartenenti alla stessa specie ospite (di seguito denominati "SANI").

Le prove di validazione sono state effettuate nei differenti laboratori nei mesi di maggio e giugno 2011 e sono state condotte su materiale ospite artificialmente infettato, disidratato in azoto liquido e polverizzato. Poiché *P. ramorum* è un patogeno da quarantena, le polveri ottenute sono state saggiate mediante passaggio in piastra su terreno nutritivo di patata-destrosio agar (PDA) per l'eventuale vitalità dell'oomicete che è risultata **assente**.

Validazione della metodologia diagnostica

Per la validazione del metodo di diagnosi sono stati utilizzati 15 campioni target e non target di riferimento secondo quanto qui di seguito riportato e rappresentato sinteticamente in Tabella 2. Ai campioni vegetali da sottoporre ad estrazione sono stati aggiunti 3 campioni di controllo costituiti da DNA estratto da ospite sano o da altre specie di *Phytophthora*:

- **6 campioni ‘target’** infetti da *P. ramorum* e provenienti da diversi areali geografici italiani:
 - 3 campioni fogliari sintomatici appartenenti a viburno inoculato con *P. ramorum* AB2 o AB188;
 - 3 campioni rameali sintomatici appartenenti a viburno infettati da *P. ramorum* AB2 o AB188;

- **9 campioni ‘non target’ (NT)** rappresentati da materiale infetto da altre specie di *Phytophthora* ovvero da materiale sano proveniente dalla stessa specie ospite:
 - 1 campione fogliare sintomatico appartenente a viburno inoculato con *P. cactorum* AB61;
 - 1 campione fogliare sintomatico appartenente a viburno inoculato con *P. hedraiandra* AB64;
 - 1 campione fogliare sintomatico appartenente a viburno inoculato con *P. cinnamomi* AB96;
 - 3 campioni fogliari sani appartenenti a viburno;
 - 3 campioni rameali sani appartenenti a viburno;

- **3 campioni di ‘controllo’** rappresentati da DNA estratto da ospite sano o da altre specie di *Phytophthora*:
 - 1 campione di DNA proveniente da coltura pura di *P. ramorum*;
 - 1 campione di DNA proveniente da materiale vegetale sano (foglia viburno);
 - 1 campione di DNA proveniente da coltura pura di *P. cactorum* o *P. hedraiandra*.

TABELLA 2 - Campioni di materiale ospite, polverizzati in azoto liquido, utilizzati per i test diagnostici

Patogeno	Natura del campione	N° di campioni
<i>Phytophthora ramorum</i>	Infetto (target)	6
<i>Phytophthora cactorum</i>	Infetto (NT)	1
<i>Phytophthora hedraiaandra</i>	Infetto (NT)	1
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Infetto (NT)	1
Nessun patogeno	Non contaminato (SANO)	6

Le infezioni artificiali del materiale ospite sia fogliare sia rameale sono state condotte con tassello di micelio (5 mm di diametro) prelevato al margine di colonie di *P. ramorum* di circa 10 giorni di età allevate su PDA a 20°C al buio. Le foglie ed i giovani getti di viburno sono stati recisi, disinfettati con ipoclorito di sodio, sciacquati in acqua sterile, asciugati in cappa ed immediatamente inoculati. I tasselli sono stati posti a contatto sulle diverse parti vegetali. Successivamente, sono stati incubati a 20°C in termostato in ambiente confinato, sterile e saturo di umidità mediante piastre petri contenenti agriperlite e carta bibula inumidita con acqua distillata sterile. Dopo 7 giorni i tessuti vegetali con lesioni sono stati prelevati, pestellati in azoto liquido, per ottenere una polvere che è stata conservata in microprovette sterili da 1,5 ml.

Metodo diagnostico: nested-PCR convenzionale

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando i materiali di seguito riportati:

Kit/metodo di estrazione DNA: Qiagen DNeasy Plant Mini Kit; Macherey-Nagel “Nucleospin Plant II”; CTAB; Wizard (Promega).

Marca e tipo di termociclatore: Eppendorf Mastercycler Personal; Miniopticon Two-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad); Mycycler (Bio-Rad); Applied Biosystem “Gene Amp 9700”; Teche “FPR04020”.

Marca e tipo di TAQ: Promega GOTAQ DNAPOLYMERASE (5U/ml); Roche-Taq DNA Polymerase (5U/ml); XtraTaq (Genespin), Eppendorf TAQ DNA Polymerase (5U/ml); BIOTAQ (Bioline- Aurogene).

Marca e tipo di dNTPs: Promega –set di dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 mM); Eppendorf dNTPs; Sigma soluzioni stock 100 mM; Sigma; Promega dNTPs mix; Bioline Aurogene dNTPs mix 2,5 mM.

Ogni laboratorio ha effettuato 2 ripetizioni dell'intero saggio (**I e II test**) a distanza di circa 15 giorni uno dall'altra.

Ogni saggio consiste in due PCR:

- I PCR (Phyto1/ Phyto4) amplicone di 687 bp;
- II PCR (Phyto2/ Phyto3) amplicone di 291 bp.

Il protocollo prevede che tutti i campioni risultati **negativi** alla I PCR vengano utilizzati per la II PCR. I campioni risultati **positivi** alla I PCR non devono essere sottoposti ad altre analisi.

Sono stati calcolati i valori dei parametri di **sensibilità**, **specificità** ed **accuratezza** considerando complessivamente i risultati dalla nested-PCR in riferimento al primo e al secondo test espressi come percentuali secondo quanto riportato nella ISO 16140.

I valori riportati in Tabella 3 riguardano il I test, in particolare nella **colonna A_I** sono riportati i valori più alti ottenuti (il numero di laboratori che hanno ottenuto tali valori è riportato tra parentesi), nella **colonna B_I** sono riportati i valori medi ed in **colonna C_I** i valori corretti dopo l'esecuzione del test chi-quadro che ha portato alla eliminazione di quei valori che presentavano una differenza statisticamente significativa al livello di probabilità del 5% rispetto ai valori medi.

Un laboratorio, tra i sette che hanno partecipato al ring test, è stato eliminato dal computo dei valori parametrici in quanto ha ottenuto falsi positivi su tutti i campioni NT e sani, incluso i campioni di controllo costituiti dal solo DNA. Data l'elevata sensibilità di questo metodo che con la II PCR (Ph2/Ph3) arriva ad evidenziare la presenza di *P. ramorum* fino a 1 fg di DNA, è da ritenersi probabile che il laboratorio in questione, avendo svolto una intensa attività di ricerca su *P. ramorum* e su *P. lateralis*, possa aver avuto problemi di contaminazione.

Da un esame comparativo dei risultati del ring-test si è constatato che il 50% dei laboratori partecipanti ha avuto necessità della II PCR per diagnosticare la presenza di *P. ramorum* nei campioni di tessuto ospite infetto.

TABELLA 3 - Valori di validazione del I test.

Parametri di validazione (%)	I test		
	A _I	B _I	C _I
Sensibilità	100 (6)	100	100
Specificità (<i>versus</i> sani)	100 (6)	100	100
Accuratezza (<i>versus</i> sani)	100 (6)	100	100
Specificità (<i>versus</i> NT)	100 (5)	89	100
Accuratezza (<i>versus</i> NT)	100 (5)	89	100
Riproducibilità		98	100

I valori in colonna A_I e C_I rappresentano la “potenzialità” del metodo, mentre i valori della colonna B_I rispecchiano i valori reali che però possono essere falsati da un errore casuale o dal non rispetto delle procedure dettate dal Protocollo.

I valori riportati in Tabella 4 riguardano il II test effettuato dai differenti laboratori dopo 15 giorni dal I test, secondo il criterio adottato per la Tabella 3: in **colonna A_{II}** sono riportati i valori più alti ottenuti, nella **colonna B_{II}** i valori medi e nella **colonna C_{II}** i valori corretti dopo il test del chi-quadro.

TABELLA 4 - Valori di validazione del II test.

Parametri di validazione (%)	II test		
	A _{II}	B _{II}	C _{II}
Sensibilità	100 (5)	97	97
Specificità (<i>versus</i> sani)	100 (5)	97	97
Accuratezza (<i>versus</i> sani)	100 (4)	97	97
Specificità (<i>versus</i> NT)	100 (5)	89	100
Accuratezza (<i>versus</i> NT)	100 (4)	94	98
Riproducibilità		96	97

I risultati ottenuti con il II test sono importanti per conoscere la **riproducibilità**, parametro che è strettamente legato alla operatività del singolo laboratorio e dipendente da fattori interni come l'operatore (più o meno esperto), la modalità di conservazione dei campioni, presenza di sorgenti di inquinamento, ecc.

Per un confronto più diretto tra i risultati ottenuti con il primo test e quelli relativi al II test si rimanda alla Tabella 5.

TABELLA 5 - Valori di validazione del I e del II test.

Parametri di validazione (%)	Valori medi ⁽¹⁾	
	I test	II test
Sensibilità	100	97
Specificità (vs sani)	100	97
Accuratezza (vs sani)	100	97
Specificità (vs NT)	100	100
Accuratezza (vs NT)	100	98
Riproducibilità ⁽²⁾	100	97

⁽¹⁾ Valori medi corretti dopo chi-quadro (%)

⁽²⁾ riproducibilità è stata valutata mediante ring-test computato su 6 laboratori.

5. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- Anonimo, 2006. EPPO protocol for regulated pests. *Phytophthora ramorum*. EPPO *Bulletin*, **36**, 146-155.
- Anonimo, 2009. *Phytophthora lateralis*. EPPO *Bulletin*, **39**, 43-47.
- BILODEAU GJ., CA. LÉVESQUE, A. DE COCK, C. DUCHAINE, S. BRIÈRE, P. URIBE, FN. MARTIN, RC. HAMELIN, 2007. Molecular Detection of *Phytophthora ramorum* by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using TaqMan, SYBR Green, and Molecular Beacons. *Phytopathology*, **97**(5), 632-642.
- BRASIER CM., AM. VETTRAIÑO, TT. CHANG, A. VANNINI, 2010. *Phytophthora lateralis* discovered in an old growth Chamaecyparis forest in Taiwan. *Plant Pathology*, **59**, 595-603.
- DAVIDSON JM., S. WERRES, M. GARBELLOTO, EM. HANSEN, DM. RIZZO, 2003. Sudden oak death and associated diseases caused by *Phytophthora ramorum*. Plant Health Progress. Online publication doi:10.1094/PHP-2003-0707-01-DG.
- GULLINO C., MC. GAROFALO, F. MORETTI, G. GIANETTI, E. MAINENTI, 2003. Rinvenimento su rododendro di *Phytophthora ramorum*. *L'Informatore Agrario*, **19**, 87-89.
- HAYDEN JK., D. RIZZO, J. TSE, M. GARBELLOTO, 2004. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a Real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, **94**, 1075-1083.
- HAYDEN KJ., K. IVORS, C. WILKINSON, M. GARBELLOTO. 2006. TaqMan real-time chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with comparison of diagnostic methods. *Phytopathology*, **96**, 846-854.
- HUGHES KJD., JA. TOMLINSON, RL. GRIFFIN, N. BOONHAM, AJ. INMAN, CR. LANE, 2006. Development of a one-step real-time polymerase chain reaction assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology*, **96**, 975-981.
- IOOS R., L. LAUGUSTIN, N. SCHENCK, S. ROSE, C. HUSSON, P. FREY. 2006. Usefulness of single copy genes containing introns in *Phytophthora* for the development of detection tools for the regulated species *P. ramorum* and *P. fragariae*. *European Journal of Plant Pathology*, **116**, 171-176.
- IOOS R., G. IANCU. 2008. European collaborative studies for the validation of PCR-based detection tests targeting regulated fungi and oomycetes. EPPO *Bulletin*, **38**, 198-204.
- MORALEJO E., JA. GARCIA-MUNOZ, E. DESCALES, 2009. Susceptibility of Iberian trees to *Phytophthora ramorum* and *P. cinnamomi*. *Plant Pathology*, **58**, 271-283.
- RIZZO DM., M. GARBELLOTO, JM. DAVIDSON, GW. SLAUGHTER, ST. KOIKE, 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease*, **86**, 205-214.
- SCHENA L., JM. DUNCAN, DEL. COOKE, 2008. Development and application of a PCR-based 'moleculartool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology*, **57**, 64-75.
- VETTRAIÑO AM., S. SUKNO, A. VANNINI, M. GARBELLOTO, 2010. Diagnostic sensitivity and specificity of different methods used by two laboratories for the detection of *Phytophthora ramorum* on multiple natural hosts. *Plant Pathology*, **59**, 289-300.
- WERRES S., R. MARWITZ, WA. MAN IN 'T VELD, A. DE COCK, PJM. BONANTS, M. DE WEERDT, K. THEMANN, E. ILIEVA, RP. BAAYEN, 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum. *Mycological Research*, **105**(10), 1155-1165.

ALLEGATO I- Strumentazione, materiali e reagenti

Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Bilancia analitica
5. Cappa chimica aspirante
6. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
7. Centrifuga da banco per provette tipo Eppendorf
8. Congelatore
9. Frigorifero
10. Macchina per produzione di ghiaccio granulare
11. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)
12. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)
13. pHmetro
14. Termociclatore
15. Transilluminatore o altra strumentazione (es.: Gel Doc System) per visionare e fotografare i gel
16. Vortex

Materiali

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

Reagenti

1. Kit commerciale per estrazione DNA
2. Loading buffer per elettroforesi
3. Marker di DNA (100bp o 1KB plus)
4. Primer specifici Ph1/Ph4 e Ph2/Ph3
5. Taq DNA polimerasi, relativo tampone e $MgCl_2$
6. dNTPs
7. Agarosio
8. Tamponi per corsa elettroforetica (es. TBE)
9. Bromuro di etidio ovvero gel red
10. Azoto liquido

Tamponi per gel di agarosio:

TBE 10X

Trizma base	108	g
acido borico	55	g
0,5 M EDTA (pH 8)	40	ml

Portare ad 1 litro con H₂O distillata

Autoclavare a 121°C per 20 min

Loading buffer 6X in TBE

Blu di bromofenolo	0,25%
Xilencianolo FF	0,25%
Glicerolo in H ₂ O distillata	30%

Conservare in frigo a 4°C

Soluzione acquosa di etidio bromuro (10 mg/ml)

Bromuro di etidio	250	μl
TBE 1X	1000	ml
