

**Protocollo diagnostico
per i patogeni terricoli
previsti nella
Certificazione delle Pomacee
(D.M. 20/11/2006)**

A cura di: Haegi Anita, Tizzani Lorenza,
Belisario Alessandra, Infantino Alessandro,
Pucci Nicoletta, Vitale Salvatore, Riccioni
Luca

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 Decreto Ministeriale del 20 novembre 2006, che recepisce direttive della Commissione Europea, stabilisce le "Norme tecniche per la produzione di materiali di moltiplicazione certificati delle Pomoidee"; tra le altre norme esso stabilisce che i materiali di moltiplicazione di categoria "Prebase", "Base" e "Certificato" devono essere prodotti su terreni esenti da *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Phytophthora cactorum*, *Armillariella mellea*, *Nectria galligena* e *Chondrostereum purpureum* e tale esenzione deve essere documentata.

Per alcuni di questi patogeni esistono dei metodi per la diagnosi singola da pianta infetta basati essenzialmente su PCR, esiste anche una metodica basata sul Macroarray per la diagnosi dei principali patogeni aerei del melo (*B. cinerea*, *Penicillium expansum*, *Podosphaera leucotricha*, *Venturia inequalis* ed *Erwinia amylovora*) (Sholberg et al. 2005). Tuttavia manca un protocollo diagnostico atto a documentare contemporaneamente l'assenza o meno di detti patogeni nei terreni o substrati di propagazione/moltiplicazione; il presente lavoro ha inteso colmare questa lacuna. In questo senso si discosta da altri lavori del presente Progetto in quanto **si è trattato di mettere a punto ex novo l'intero protocollo che quindi rappresenta un prodotto innovativo.**

Il **sistema di array su membrana (Macroarray)** è stato considerato il metodo più adatto per poter saggiare la presenza di più patogeni in un campione con un'unica analisi. Questo consiste nel fissare su membrane oligonucleotidi specifici in grado di riconoscere i diversi patogeni (sonde). Quando i campioni devono essere analizzati, si estrae da essi il DNA che opportunamente amplificato e marcato viene fatto reagire con le membrane e ciò permette di determinare la presenza o meno dei patogeni in studio.

In generale, il macroarray dimostra grandi potenzialità in campo diagnostico in quanto permette la diagnosi contemporanea di più patogeni da un singolo campione, ideale per malattie ad eziologia complessa, malattie con sintomatologie comuni ma diversi patogeni coinvolti (per esempio i marciumi radicali), per nuove individuazioni e programmi di monitoraggio, certificazioni nonché diagnostica preventiva (dei terreni per esempio).

Poiché il metodo è stato messo a punto *ex novo*, sono stati valutati solo i parametri di sensibilità analitica e specificità analitica (vedi pagina 18)

Descrizione dei patogeni

Agente causale *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt

Tassonomia Oomycetes
Peronosporales
Pythiaceae

Avversità Marciume del colletto, della corteccia e dei frutti

Ospiti

Questo patogeno può infettare più di 200 specie in 160 generi comprendenti ornamentali legnose (quali il viburno) e fruttiferi (quali il mandorlo, melo, pesco, pero, fragola e noce).

Sintomatologia ed epidemiologia

Il marciume del colletto (crown rot) del melo può essere causato da diverse specie di *Phytophthora*, tra cui *P. cactorum* è sicuramente la più importante. Il marciume del colletto è una malattia del portainnesto che colpisce i tessuti corticali della regione delle radici-colletto; il marciume della corteccia (collar rot) è invece una malattia del nesto che colpisce i tessuti corticali nella parte bassa del tronco. I sintomi sono spesso visibili solo dopo rimozione della corteccia. Questo tessuto è necrotico con colorazioni da arancio a rosso scuro. Un margine netto separa l'area necrotica da quella sana: questa è la zona di maggiore attività del patogeno.

Tutte le specie di *Phytophthora* che colpiscono il melo o il pero sono patogeni del suolo. Una volta introdotti nell'impianto persistono come micelio o oospore nella materia organica o nella terra. Altre sorgenti di inoculo sono le foglie e i frutti caduti. La dispersione delle zoospore avviene per deflusso dell'acqua del terreno, con l'irrigazione o pioggia ed è pertanto associata a condizioni meteorologiche umide o a suoli scarsamente drenati. L'infezione avviene sostanzialmente attraverso ferite o aperture naturali, come stomi o lenticelle. La malattia può essere molto distruttiva su cultivar suscettibili.

Agente causale: *Verticillium dahliae* (Kleb) e *Verticillium albo-atrum* (Reinke et Berthold)

Tassonomia: Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, mitosporic Plectosphaerellaceae

Avversità: avvizzimenti, tracheomicosi

Ospiti

Questi patogeni possono infettare più di 300 specie sia legnose che erbacee, con ampia distribuzione geografica.

Sintomatologia ed epidemiologia

Il micelio vegetativo è ialino, settato e multinucleato. I conidi sono ovoidali o ellissoidali, tipicamente unicellulari, portati in massarelle su fialidi che si inseriscono sul ramo conidioforo con un arrangiamento verticillato, dal quale deriva il nome della specie. Il fungo produce strutture di conservazione (microsclerozi), costituita da ife addensate e intensamente melanizzate. La principale distinzione tra *V. dahliae* e *V. albo-atrum* risiede proprio nella diversa conformazione dei microsclerozi, con aspetto di massarelle di varia dimensione in *V. dahliae* e sotto forma di micelio scuro ispessito in *V. albo-atrum*.

La sintomatologia, pur variando a seconda dell'ospite, presenta caratteristiche comuni quali la comparsa di clorosi e necrosi fogliari e, soprattutto, imbrunimenti a carico dei vasi xilematici. La comparsa di avvizzimenti, talvolta asimmetrici, che procedono in senso acropeto, soprattutto in corrispondenza di giornate particolarmente soleggiate, costituisce un'altra sintomatologia comune a molte specie attaccate, così come la presenza di microsclerozi su tessuti vegetali morti in seguito all'attacco dei patogeni. Grazie a tali strutture, entrambe le specie sono in grado di sopravvivere nel terreno per diversi anni (oltre 10) anche in assenza dell'ospite. Il fungo penetra nell'ospite attraverso soluzioni di continuità presenti nelle radici, procedendo sino ai vasi xilematici dai quali diffonde in senso acropeto e longitudinale. La pianta generalmente reagisce alla presenza del patogeno con l'emissione di gomme e tulle che ostruiscono i vasi, determinando nel contempo i sintomi di avvizzimento. La disseminazione del fungo avviene essenzialmente attraverso il terreno infetto o attraverso le piantine o altri organi riproduttivi infetti (talee, tuberi, etc.). La progressione della malattia è favorita dalla monocoltura ripetuta di specie suscettibili o la mancata adozione di adeguate rotazioni. L'uso di fumigazioni con diversi principi attivi è limitata a colture in serra. Per molte specie erbacee sono disponibili varietà resistenti.

Agente causale *Cylindrocarpon heteronema* (Berk. & Broome) Wollenw.
 Neonectria galligena (Bres.) Rossman & Samuels

Tassonomia Ascomycota
 Hypocreales
 Nectriaceae
Avversità Cancri rameali

Ospiti

Questo patogeno può infettare tra gli altri quercia e faggio, ma è importante soprattutto sul melo.

Sintomatologia ed epidemiologia

I cancri causati da *Nectria galligena* sono tra le malattie più distruttive del melo in Europa. Anche il pero è attaccato ma la malattia è in genere meno severa che in melo. L'attacco si sviluppa principalmente a carico degli organi legnosi, iniziando spesso alla base di rami e gemme o in prossimità di lesioni di origine biotica o meccanica. Per la reazione della pianta e per l'attività del fungo si formano ingrossamenti dei rami e cancri a bersaglio, cui

fa seguito il disseccamento della parte distale del ramo, che facilmente si spezza. Anche i frutti sono colpiti e sviluppano marciumi bruni circolari con pustole bianche che producono numerosi conidi. Lo sviluppo della malattia è lento e la pianta colpita è danneggiata gravemente, ma sopravvive per molti anni. Sui cancri maturano i conidi, in masse di color rosato (sporodochi) e le spore, all'interno di periteci color rosso vivo. L'infezione avviene principalmente per ferite naturali, lesioni fogliari o ferite da potatura.

Agente causale *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.

Tassonomia Basidiomycota
 Agaricales
 Physalacriaceae

Avversità Marciume radicale fibroso

Ospiti

Il genere *Armillaria* comprende nel mondo circa 40 specie che, nel loro complesso, sono in grado di attaccare più di 600 specie, erbacee e legnose. *A. mellea*, in particolare, infetta specie forestali, ornamentali legnose e fruttiferi, soprattutto Angiosperme.

Sintomatologia ed epidemiologia

Nei soggetti attaccati da *A. mellea*, la corteccia delle grosse radici appare esternamente depressa e imbrunita; tra il tessuto corticale e il tessuto legnoso compaiono placche di micelio di colore bianco-crema e la corteccia finisce per staccarsi facilmente dal legno sottostante. La chioma della pianta appassisce e muore, mentre alla base delle piante attaccate compaiono i basidiomi.

Il parassita si propaga nel terreno attraverso cordoni di ife dette rizomorfe, passando dalle piante malate a quelle sane. Negli impianti di fruttiferi, il patogeno permane nel terreno nei residui legnosi dei soggetti morti e rimossi e nelle rizomorfe.

Agente causale *Chondrostereum purpureum*

Tassonomia Basidiomycota
 Polyporales
 Meruliaceae

Avversità Mal del piombo

Ospiti

Colpisce la maggior parte della famiglia delle Rosaceae soprattutto del genere Prunus. In particolare colpisce le pomoideae, come mele e pere, ciliegie e prugni che sono particolarmente sensibili.

Sintomatologia ed epidemiologia

Questa patologia è così detta perché provoca una colorazione metallica delle foglie che assumono un aspetto argentato o piombato. Tuttavia i sintomi sulle foglie sono solo una conseguenza, un aspetto secondario della malattia in sé. L'argentatura è causata da sostanze fitotossiche prodotte dal fungo, che risalgono lungo lo xilema portandosi nelle foglie. Il fungo, infatti, è situato principalmente nel tronco, nelle branche e nei rami. Qui quest'ultimo porta ad alterazioni con conseguente necrosi dei tessuti, che assumono aspetto e consistenza stopposa (carie del legno). Questi tessuti sono soggetti a una progressiva perdita di funzionalità dei vasi xilematici e floematici che, quando raggiunge il suo culmine, può portare alla morte dell'intera pianta. Le basidiospore del fungo, formatesi sui carpofori emersi da piante ormai morte, vengono diffuse attraverso il vento. Queste, giungendo a contatto di una ferita vi penetrano per mezzo di un pro-micelio che si ramifica ripetutamente penetrando nelle cellule del legno e producendo le sopraccitate necrosi. Il decorso della malattia può essere cronico o acuto; nel primo caso i sintomi possono presentarsi con diversa intensità per vari anni, nel secondo caso, invece, la pianta avvizzisce e muore rapidamente senza riuscire nemmeno a mostrare i classici sintomi dell'argentatura sulle foglie. Non essendo presenti principi attivi efficaci contro la malattia, la lotta si basa principalmente su criteri preventivi.

È prima di tutto importante certificare la sanità del materiale di propagazione.

Normativa Fitosanitaria

- **Direttiva CE: 2002/29/CE** concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali.
- **Decreto Ministeriale del 4 maggio 2006** recante disposizioni generali per la produzione materiali di moltiplicazione delle specie arbustive ed arboree da frutto, nonché delle specie erbacee a moltiplicazione agamica.
- **Decreto Ministeriale del 20 novembre 2006** concernente le 'Norme tecniche per la produzione di materiale di moltiplicazione certificati delle Pomoidee.

Analisi molecolare Macroarray

Flusso di lavoro

1 - Preparazione della membrana

- Risospensione degli oligonucleotidi specifici (sonde) in spotting buffer
- Posizionamento degli oligo su piastre elisa
- ‘Spotting’ delle sonde sulla membrana con il pin replicator

2 - Analisi dei campioni

- Estrazione di DNA genomico
- Amplificazione PCR
- Marcatura dei prodotti di PCR con la Fosfatasi Alcalina (AP)

Ibridazione



Lavaggi



Generazione del segnale di chemiluminescenza con CDP-Star (Lastre autoradiografiche o analizzatore di immagini)

MACROARRAY Metodica

Preparazione della membrana

- Individuazione delle sonde specifiche dai dati in letteratura o disegno ex novo
- Schema sperimentale su piastre elisa
- 'Spotting' delle sonde sulla membrana con il pin replicator

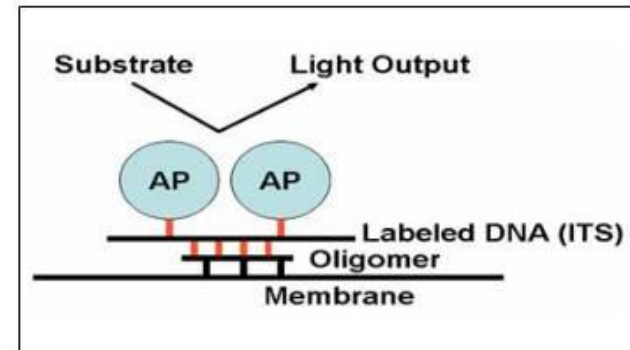


Analisi dei campioni

- Estrazione di DNA genomico
- Amplificazione PCR (ITS per Fungi and Oomycetes)
- Marcatura dei prodotti di PCR con la Fosfatasi Alcalina (AP)

Ibridazione

Lavaggi



Generazione del segnale di chemiluminescenza con CDP-Star

Esposizione e sviluppo di lastre autoradiografiche o uso di analizzatore di immagini

Strumentazione, materiali e reagenti necessari

a) Strumentazione

1. Alimentatore per apparati elettroforetici
2. Apparati elettroforetici orizzontali
3. Bagnetto termostato o termoblocco
4. Bilancia analitica
5. Cappa di lavoro per PCR con luci U.V. (non necessaria)
6. Centrifuga per provette tipo Eppendorf
7. Congelatore
8. Frigorifero
9. Micropipette dedicate all'amplificazione e calibrate (P10, P20, P100, P200, P1000)
10. Micropipette dedicate all'estrazione dell'acido nucleico e calibrate (P10, P20, P100, P200, P1000)
11. Termociclatore
12. Transilluminatore o GelDoc
13. Vortex
14. Pin Replicator
15. Fornetto a UV
16. Stufa (da ibridazione)
17. Eventualmente analizzatore di immagini

b) Reagenti

1. Acqua sterile per biologia molecolare
2. Agarosio, composti chimici per la preparazione del tampone TBE, Gel Red
3. Etanolo
4. Kit commerciale per estrazione DNA da suolo
5. Loading buffer per elettroforesi
6. Marker di DNA (100bp)
7. Primers e dNTPs
8. Taq DNA polimerasi e relativo tampone comprensivo di $MgCl_2$
9. azoto liquido
10. Kit per la marcatura del DNA
11. Membrana nylon N+
12. Reagenti per lo sviluppo di lastre autoradiografiche

c) Materiali

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

1 - Preparazione della membrana

Per l'identificazione dei patogeni richiesta per la Certificazione delle Pomacee in base al DM del 20 novembre 2006 il CRA-PAV ha individuato/modificato o direttamente disegnato *ex novo* 22 oligonucleotidi detector (oligo) specifici o di genere per i 6 patogeni, riportati nella tabella sottostante.

Target	1	2	3
Funghi	ITS4aT	ITS2T	
Oomiceti	Oom3gcT		
<i>Phytophthora spp.</i>	PhyG	PhyA	
<i>Phytophthora cactorum</i>	Cact8T	Cact15T	
<i>Verticillium spp.</i>	Vgn1A	Vgn2A	
<i>Verticillium dahliae</i>	Vda1T	Vda2	
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Val1T		
<i>Armillaria spp.</i>	AR1aT	Ar2fT	
<i>Armillaria mellea</i>	Am1	Am2	
<i>Cylindrocarpon spp.</i>	Cylor		
<i>Nectria galligena</i>	Ch1a	Ch3c	
<i>Chondrostereum purpurem</i>	CP1	CP3Alt	CP4Alt

Questi oligonucleotidi detector vengono ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati, quindi devono essere risospesi in *spotting* buffer (allegato 1) prima di procedere.

Questi oligo devono essere “stampati” su una membrana “Nylon +” tramite un Pin Replicator.

A tale scopo :

- 15 µl di ciascun oligo vengono versati ciascuno in tubo di una piastra ELISA secondo un disegno prestabilito (allegato 2);
- Lavare Pin Replicator secondo protocollo
- tagliare (con un bisturi o le forbici) un rettangolo 5,3cm x 3,3 cm di membrana Nylon +(Hybond+ ;GE Healthcare) e fissarla alla cornice con i buchi-guida;
- Immergere in Pin Replicator nella piastra ELISA, inserire l'apposito perno nel primo punto guida e stampare su membrana;
- ripetere tre volte per il primo punto-guida e tre volte per il secondo punto-guida;
- lavare il Pin Replicator secondo protocollo;
- Lasciare asciugare la membrana X 10 minuti;

- Fissare agli UV per 30 minuti 240 mJ/cm²; per conservare la membrana per più di una settimana fermarsi a questo punto e stoccare la membrana al buio a temperatura ambiente fino all'uso; per l'utilizzo riprendere dagli step successivi. Incubare in 0.5% SDS per 1 ora a 60°C;
- Sciacquare in 100 mM Tris (pH 8.0) per 5 minuti;
- Tenere umido a 4°C fino all'uso.

2 - Analisi dei campioni

Preparazione all'analisi dei campioni

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

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

Per ogni evento di amplificazione vanno inseriti una serie di controlli: controllo positivo, e un controllo negativo acqua.

Il controllo acqua è costituito da acqua caricata al posto del DNA.

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

Per le ricette dei diversi tamponi riferirsi all'allegato 1.

Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico viene estratto con Kit specifici per estrazione di DNA da terreno (tipo UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio, CA) o Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Canada). Una volta scelto il kit di estrazione seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

Macerare accuratamente il campione di suolo. Nei kit citati il limite massimo di terra da saggiare è di 250 mg, tuttavia è consigliabile macerare una quantità di terra in eccesso, i.e. 1g, con azoto liquido e mortaio e pestello e prelevare dopo la macerazione la quantità richiesta dal kit commerciale. Ciò consente di aumentare le possibilità di diagnosticare la presenza dei patogeni in esame, distribuiti erraticamente nel suolo.

Amplificazione in PCR

Il primo passaggio del protocollo è costituita da una amplificazione in PCR di una porzione dell'RNA ribosomale di funghi e oomiceti, in particolare gli spaziatori interni trascritti (ITS) ITS1 e ITS2 e l'RNA 5,8S, una PCR classica molto robusta effettuata con i primers IT5 e ITS4 di White *et al.*(1990) e ITS6 di Cooke *et al.*, (2000) per gli oomiceti.

Primer	Target	Sequenza
ITS5	Forward funghi	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS6	Forward oomiceti	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG
ITS4	Reverse comune	TCCTCCGCTTATTGATATGC

I primers possono essere ordinati ad apposite Ditte che li sintetizzano e li consegnano liofilizzati. E' conveniente diluire i primers ad una concentrazione di 50 μ M in H₂O distillata microfiltrata sterile per biologia molecolare e conservare queste soluzioni madri a -20°C. Preparare, inoltre, delle sub-aliquote di circa 50 μ l totali alla concentrazione di 5 μ M in acqua sterile e conservarle a -20 °C.

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.

Scongelare i reagenti per preparare la miscela di reazione, di seguito riportata, mantenendoli in ghiaccio.

Preparare la miscela di reazione tenendola in ghiaccio.

Miscela di reazione per 25 μ l di volume finale per campione:

Componenti	Concentrazione iniziali	Volume per singola provetta (μ l)	Concentrazione finale
buffer 10X	10 X	2,5	1 X
MgCl ₂ *			1,5 mM
dNTPs	1,25 mM	4	0,2 mM
Primer ITS5	2,5 μ l	2,5	0,25 μ l
Primer ITS6	2,5 μ l	2,5	0,25 μ l
Primer ITS4	2,5 μ l	2,5	0,25 μ l
Taq polimerasi	2U/ μ l	0,25	0.02U/ μ l
H ₂ O		9,75	
Volume totale		24	

*il MgCl₂ è normalmente presente nei buffer 10X forniti con le Taq Polimerasi in modo che la concentrazione finale sia 1,5 mM. Nel caso in cui MgCl₂ sia fornito solo a parte in soluzione di partenza 50mM, aggiungerne 0,75 μ l alla mix, aggiustando relativamente l'acqua.

La miscela di reazione va opportunamente miscelata con vortex e riportata sul fondo della provetta con una breve centrifugata (mini spin).

Aggiungere 1 µl di DNA templato (1/20 del DNA estratto dal suolo), a ciascuna provetta, cambiando puntale ad ogni campione.

Aggiungere 1 µl di acqua distillata filtrata sterile nell'ultima provetta di PCR come controllo negativo (senza DNA).

Distribuire 24 µl di miscela di reazione in ciascuna provetta di PCR tenuta in ghiaccio.

Dare una breve centrifugata alle provette per eliminare eventuali bolle d'aria o gocce di miscela sulle pareti.

Inserire le provette nel termociclatore.

Avviare la PCR dopo aver selezionato il programma prescelto.

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>N° di cicli</i>
Denaturazione	94 °C	3'	1
	94 °C	30"	
Amplificazione	60 °C	30"	35
	72 °C	45"	
Estensione finale	72 °C	10'	1
Step di blocco	4 °C	10'	1
Conservare le provette in frigorifero.			

Elettroforesi su gel di agarosio

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

Preparare il gel di agarosio 1% in TBE1X con µl di Gel Red per 100 ml di gel.

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.

Caricare complessivi 6 µl per campione (5 µl di amplificato + 1 µl di loading buffer 6X). Cambiare il puntale ad ogni campione.

Caricare in un pozzetto il DNA marker idoneo (100 bp o 1KB plus).

Correre per circa 40-60 minuti a 80 volt con un vassoio da 10 cm alloggiato in una cella elettroforetica midi ovvero correre 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.

Osservare il gel mediante un transilluminatore ad U.V od altro apparecchio tipo Gel Doc l'eventuale presenza di una o più bande tra 600-800bp (funghi) e/o 900-1000bp (oomiceti).

Purificazione dell'amplificato

Una volta scelto il kit di purificazione per frammenti PCR seguire scrupolosamente tutte le istruzioni della Ditta produttrice.

Calcolare la concentrazione di DNA tramite corsa su gel d'agarosio con opportuno DNA Ladder, con spettrofotometro (tipo Nanodrop) o fluorimetro.

Marcatura del DNA

IL DNA amplificato viene marcato direttamente con il kit AlkPhos Direct Labelling (GE Healthcare) seguendo esattamente le indicazioni della ditta produttrice. In particolare procedere con i seguenti passaggi:

-Diluire il DNA da marcare ad una concentrazione di 10 ng/μl per un totale di 10 μl (100 ng) in un tubo da 0,2 μl e mettere in ghiaccio. Eseguire tutte le operazioni seguenti in ghiaccio.

-Diluire 20 μl della soluzione di cross-linker con 80 μl di acqua del Kit per ottenere la concentrazione di lavoro, mettere in ghiaccio fino all'uso.

-Denaturare il DNA ponendo il tubo a riscaldare per 5 minuti in acqua bollente, immediatamente raffreddare il DNA su ghiaccio per 5 minuti. Dare uno spin veloce al tubo per raccogliere il contenuto al fondo della provetta.

-Aggiungere 10 μl di Reaction Buffer. Mescolare gentilmente.

-Aggiungere 2 μl di Labelling Reagent. Mescolare gentilmente.

-Aggiungere 10 μl della soluzione di cross-linker precedentemente preparata. Mescolare gentilmente e dare uno spin.

-Incubare la reazione per 30 minuti a 30°C.

. La sonda così preparata può essere usata immediatamente o tenuta in ghiaccio fino a due ore. Alternativamente le sonde marcate possono essere conservate a -20°C in 50% glicerolo.

Ibridazione

-Preventivamente preparare il Buffer di ibridazione fornito dalla casa produttrice secondo le istruzioni (Allegato1), aliquotare in tubi tipo Falcon da 50 ml in aliquote di 10 ml e conservare a -20°C pronte per l'uso.

- Preventivamente accendere il fornello di ibridazione a 54°C (5-6 ore prima dell'uso).
- Per ogni campione prendere un tubo di buffer di ibridazione, scongelarlo e pre-riscaldarlo a 54°C.
- mettere una membrana nel tubo, posizionare questo nel 'girarrosto' del fornello e tenere in pre-ibridazione a 54°C per un ora.
- ibridazione vera e propria: aggiungere la sonda marcata (circa 32 µl) nel buffer e mescolare. Lasciare o/n a 54°C in agitazione (girarrosto).
- preparare il Primary Wash (vedi allegato 1) per il giorno dopo.

Lavaggi ed esposizione

- Riscaldare il primary wash nel bagnetto a 50°C;
- per ogni campione prendere un nuovo tubo Falcon, trasferire la membrana dal tubo di ibridazione a questo nuovo tubo e aggiungervi 30 ml di primary wash a 50°C;
- primo lavaggio nel primary a 50°C per 10 minuti nel fornello;
- buttare il primary wash del tubo e aggiungerne altri 30 ml sempre pre-riscaldato
- secondo lavaggio nel primary a 50°C per 10 minuti nel fornello;
- buttare il primary wash del tubo e procedere in nuove Falcon o cristallizzatori con 2 lavaggi di 30 ml di secondary wash (vedi allegato 1) a Temperatura ambiente di 5 minuti ciascuno;
- togliere il liquido in eccesso dalla membrana toccando un angolo della stessa su una appropriata superficie pulita e porla su uno strato di pellicola trasparente. Non lasciarla mai asciugare;
- Aggiungere 40 µl/cm² di membrana della soluzione CDP-Star fornita dal kit per 10 minuti avendo cura di coprirla con il tappo di una piastra di vetro;
- togliere il liquido in eccesso dalla membrana sempre toccandone un angolo ad una superficie pulita;
- avvolgere la membrana nella pellicola;
- la rilevazione del segnale può a questo punto procedere direttamente in un analizzatore di immagini predisposto per la chemiluminescenza (seguire quindi le istruzioni della ditta fornitrice) o altrimenti per impressione di lastra autoradiografica e successivo sviluppo, in questo secondo caso procedere come segue:
 - riporre la membrana con il DNA verso l'alto in una cassetta da esposizione;
 - trasferirsi in una camera oscura o comunque un luogo che non abbia infiltrazioni di luce. Posizionare sulla membrana una lastra autoradiografica, chiudere la cassetta ed esporre al buio per 2 ore a temperatura ambiente;

-Per lo sviluppo preparare 3 cassette della capienza di 1-2 litri, al buio versare nella prima il liquido per lo sviluppo, nella seconda acqua distillata e nella terza il liquido per il fissaggio;

-Al termine delle due ore di esposizione aprire la cassetta, recuperare la lastra autoradiografica e immergerla per 5 minuti nel liquido dello sviluppo, sciacquarla nella cassetta contenente l'acqua e fissarla per 1-2 minuti nella soluzione di fissaggio;

-lavare la lastra in acqua corrente e attaccarla all'apposita cornice;

-Sempre al buio riporre le soluzioni di sviluppo e fissaggio, dopodichè è possibile accendere la luce;

-lasciare asciugare la lastra e poi esaminarla.

-in base allo schema di posizionamento degli oligonucleotidi detector individuare i segnali positivi i quali rilevano la presenza del patogeno (vedi allegato 2).

Lavori di riferimento

- White, Bruns, Lee and Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in PCR Protocols: A guide to methods and applications. Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- Lee, White and Taylor. 1993. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide Hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. *Phytopathology* 83(2): 177-181.
- Levesque, Harlton and de Cock. 1998. Identification of some oomycetes by reverse dot blot hybridization. *Phytopathology* 88 (3): 213-222.
- Tambong, de Cock, Tinker and Levesque. 2006. Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species. *App. and Environ. Microbiol.* 72 (4): 2691-2706.
- Zhang, McCarthy and Smart, 2008. A microarray system for the detection of fungal and oomycete pathogens of solanaceous crops. *Plant Disease* 92 (6): 953-960.
- Lievens, Brouwer, Vanachter, Levesque, Cammue and Thomma. 2003. Design and development of a DNA array for rapid detection and identification of multiple tomato vascular wilt pathogens. *FEMS Microbiology Letters* 223: 113-122.
- Lievens, Brouwer, Vanachter, Levesque, Cammue and Thomma. 2005. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA array. *Environ. Microbiol.* Doi.
- Sholberg, O’Gorman, Bedford and Levesque. 2005. Development of a DNA microarray for detection and monitoring of economically important apple diseases. *Plant Disease* 89 (11): 1143-1150.
- Evans N. Njambere, Bruce B. Clarke, Ning Zhang. 2011. Dimeric oligonucleotide probes enhance diagnostic microarray performance. *Journal of Microbiological Methods.* Volume 86, Issue 1, Pages 52-61.
- D. E. L. Cooke, A. Drenth, J. M. Duncan, G. Wagels, and C. M. Brasier. 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30, 17–32.

VALIDAZIONE

Per la messa a punto del sistema diagnostico di macroarray sono state definiti i seguenti parametri di validazione:

Sensibilità analitica: la più piccola quantità di target che può essere rilevata.

Al fine di calcolare la sensibilità analitica del sistema macroarray le regioni di DNA target dei diversi funghi sono state clonate in vettori pGEM-T easy (Promega) e quindi la sensibilità è espressa come numero minimo di copie target rilevabile dal sistema. Tuttavia è da rilevare che la sensibilità, essendo dipendente dall'efficienza della PCR, variabile a seconda del tipo di terreno (in base a presenza o meno di inibitori, composizione fisica, etc.), potrebbe risultare inferiore per DNA estratto da terreno.

La quantità minima di copie di ITS target di *Nectria galligena* (uguale per gli ITS target degli altri funghi) rilevate dal macroarray è di **1 fg \approx 200 copie**. Se si considera che una cellula contiene circa 200 copie di DNA ribosomale si può estrapolare che il sistema è in grado di rilevare teoricamente una singola cellula di fungo.

Specificità analitica: capacità del protocollo di NON rilevare la presenza del patogeno nei campioni non infetti dal patogeno in esame.

Tutti gli oligo specie-specifici e genere -specifici sono stati testati con isolati diversi della stessa specie, con specie affini (dello stesso genere) e con specie diverse, in particolar modo con gli altri funghi presenti sul macroarray.

Tutti gli oligo specie-specifici sono risultati specifici al **100%**.

Gli oligo genere-specifici hanno invece uno spettro più ampio per rispondere al quesito di presenza generale di classi di funghi patogeni, non richiesto dal decreto ministeriale ma si pensa importante per il management fitosanitario della coltura. In particolare gli oligo dimerici per *Phytophthora* spp. riconoscono anche *Pythium ultimum*.

Ulteriori dati saranno resi disponibili in seguito alla pubblicazione del presente lavoro.

ALLEGATO 1: SOLUZIONI

Tamponi necessari all'effettuazione del gel di agarosio:

TBE 10X

Tris	108g
Acido borico	55g
0,5M EDTA (pH 8)	40 ml
Portare a 1 l con H ₂ O distillata	
Autoclavare	

Loading buffer 6X in TBE

Blu di bromofenolo	0,25%
Xilencianolo	0,3 %
Glicerolo	60%

Tamponi necessari per il macroarray

Spotting Buffer

- 4µM tampone sodio carbonato , pH 8,4
- 3xSSC [1X SSC è 0.15 M NaCl + 0.015 M sodio citrato]
- 0.01% SDS (N-lauroyl sarcosine)
- 0.004% blu di bromofenolo

Tampone di ibridazione (da kit AlkPhos Gene Labelling, GE Healthcare)

- Alla soluzione per il tampone di ibridazione fornita aggiungere:
- NaCl (di grado analitico) in modo da ottenere una soluzione NaCl 0.5 M.
 - Blocking reagent (fornito dalla casa) fino alla concentrazione finale del 4%(w/v).

Per risultati migliori aggiungere il 'Blocking reagent' lentamente durante l'agitazione. Mescolare a temperatura ambiente per 1–2 ore. Questo buffer può essere usato immediatamente o conservato in aliquote da 10 ml a -15°C-30°C.

Primary wash buffer (1 litro) (da kit AlkPhos Gene Labelling, GE Healthcare)

Quantità da aggiungere	Concentrazione finale
Urea 120 g	2 M
SDS 1 g	0.1% (w/v)

0.5 M Na fosfato H 7.0 100 ml*	50 mM
NaCl 8.7 g	150 mM
1.0M MgCl ₂ 1 ml	1 mM
Blocking reagent 2 g (fornito dal kit)	0.2% (w/v)

*0.5 M Na fosfato può essere preparato usando il Sodio Diidrogeno fosfato (monobasico, NaH₂PO₄.xH₂O) e aggiustarlo a pH 7.0 con idrossido di sodio.

Il primary wash può essere tenuto nel frigorifero a 2–8°C fino ad una settimana.

Secondary wash buffer (da kit AlkPhos Gene Labelling, GE Healthcare)

- 20x stock

Tris base 121 g 1 M

NaCl 112 g 2 M

Aggiustare il pH a 10.0 e portare a 1 litro con acqua.

Questa soluzione può essere conservata fino a 4 mesi in frigo a 2–8°C.

– soluzione di lavoro

Diluire la soluzione stock 1:20 e aggiungere 2 ml/l di 1 M MgCl₂ a dare una concentrazione finale di 2 mM di Magnesio. Preparare fresco ogni volta.

ALLEGATO 2

Schema di caricamento degli oligonucleotide detector su piastre a 96 pozzetti.

ITS4aT 53,78°C	ITS2T 56,07°C	Oom3gcT 54,75°C	PhyG (55,13°C)	PhyA (53,9°C)	Cylor 55,62
Vgn1A 54,78	Vgn2A 54,41	CP3Alt	Cact8T 56,29°C	Cact15T 59,20°C	Ch1a 54,78°C
Vda1T	Vda2T	CP4Alt	AR1aT 55,42°C	AR2fT 54,91°C	Ch3c 54,03
Val1T 54,21°C		CP1	Am1 55,04°C	Am2 55,27°C	SP

Vedi leggenda pag.12.

Ogni piastra da 96 può quindi contenere quattro schemi di caricamento, anche il pin replicator ha 96 pin. Ogni colore caratterizza un genere e relativa specie in studio.

INDICE

Premessa	pag.	3
Descrizione dei patogeni	pag.	4
Normativa fitosanitaria	pag..	7
Analisi Molecolare		
Flusso di lavoro	pag.	9
Strumentazione, materiali e reagenti necessari	pag.	11
Preparazione della membrana	pag.	12
Analisi dei campioni	pag.	13
Lavori di riferimento	pag.	19
Validazione	pag.	20
Allegato 1: Soluzioni	pag.	21
Allegato 2: Schema di caricamento degli oligo detector su piastre	pag.	23