

PROTOCOLLO DIAGNOSTICO
PER
XANTHOMONAS ARBORICOLA PV. PRUNI (XAP)

**¹G.Perez, ² V. Catara, ¹ N. Pucci, ³ M. Scortichini ,
⁴ E. Stefani, ¹ S. Loreti**

¹Consiglio per la Ricerca e sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

²Dipartimento di Scienze delle produzioni Agrarie e Alimentari -Università degli Studi di Catania, Catania

³CRAFRU, Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in agricoltura - Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma, Roma

⁴Dipartimento di Scienze della Vita - Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

INDICE

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA	427
1.1 Ospite	427
1.2 Sintomatologia	427
1.3 Descrizione del patogeno	429
1.4 Epidemiologia e trasmissione	429
1.5 Diagnosi	429
1.6 Normativa	429
2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI	430
2.1 Diagramma di flusso	431
2.2 Dimensione del campione	432
2.3 Estrazione e concentrazione del patogeno da tessuto vegetale	432
2.4 Rimozione del glicerolo	432
2.5 Isolamento e identificazione sui terreni SP e GYCA	432
2.6 Saggio sierologico: immunofluorescence antibody staining (IFAS)	433
2.7 Estrazione del DNA dal concentrato	435
2.8 Preparazione del template per l'amplificazione PCR	435
2.9 Saggi molecolari	436
2.10 Aspetti critici	438
2.11 Saggi molecolari di recente pubblicazione	439
3. DATI DI VALIDAZIONE	440
3.1 Metodologie	440
3.2 Campioni per la validazione	441
3.3 Valori di validazione ottenuti	442
4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO	447
Allegato I– Strumentazione, materiali e reagenti necessari	448
Allegato II – Descrizione morfologica delle colonie di <i>Xap</i>	450
Allegato III – Substrati e tamponi	451

1. DESCRIZIONE DELLA MALATTIA

Agente causale	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>
Tassonomia	PHYLUM : Proteobacteria. Classe: <i>Gammaproteobacteria</i> Ordine: <i>Xanthomonadales</i> Famiglia: <i>Xanthomonadaceae</i>
Avversità	Cancro batterico delle drupacee Maculatura batterica delle drupacee
Sinonimi	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> <i>Xanthomonas pruni</i>
Acronimi	<i>Xap</i>
Categoria Fitosanitaria	Patogeno incluso nella lista A2 dell'EPPO

1.1 Ospite

Le specie ospiti di *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* sono numerose e appartengono esclusivamente al genere *Prunus*: pesco (*Prunus persica*), susino europeo (*P. domestica*) e susino cino-giapponese (*P. salicina*), albicocco (*P. armeniaca*) ed il *Prunus* cinese ornamentale (*P. japonica*). Altre specie ospiti sono: *P. amygdalis*, *P. avium*, *P. cerasus*, *P. davidiana*, *P. mume* e *P. laurocerasus*.

1.2 Sintomatologia

I sintomi di questa batteriosi possono essere osservati sulle foglie, sui frutti (maculature) e sulle parti legnose (cancri). La gravità della manifestazione sintomatologica è strettamente legata alla quantità d'inoculo presente ed alla suscettibilità della varietà coltivata.

Talvolta i sintomi causati da *X. arboricola* pv. *pruni* possono essere confusi con danni di fitotossicità da prodotti rameici o da infezioni da parte di altri batteri o funghi.

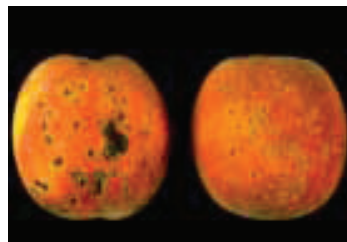
1.2.1 Pesco



Sulle foglie compaiono macchie idropiche, osservabili dapprima nella pagina inferiore, che in seguito diventano scure, necrotiche con tipica forma angolare, circondate da alone clorotico. Ampie aree del lembo possono essere interessate dalla clorosi con conseguente distacco. Spesso sono colpiti gli apici fogliari, che ingialliscono, si deformano e disseccano. Gravi attacchi possono causare la defogliazione di intere branche.

Sui frutti si osservano piccole maculature, leggermente infossate, all'inizio idropiche poi scure e talvolta circondate da un alone verde-giallo; dalle lesioni possono fuoriuscire essudati gommosi. Nei casi più gravi le infezioni dei frutticini portano a deformazioni e rotture dell'epicarpo.

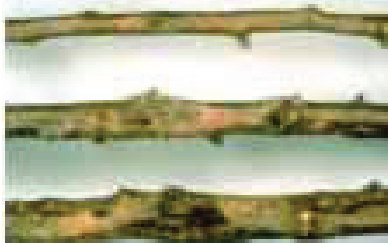
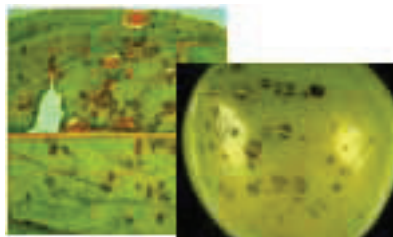
Sui rami possono comparire disseccamenti apicali che si manifestano, negli stadi iniziali, con la formazione di macchie traslucide (cancri primaverili). In un secondo momento assumono una colorazione rosso-nerastra ed evolvono in cancri infossati (cancri estivi).



1.2.2 Susino ed Albicocco

I sintomi su foglie sono simili a quelli del pesco, anche se risulta più frequente il distacco della lamina fogliare in corrispondenza delle aree necrotiche ('impallinatura' della lamina fogliare).

Sui frutti del susino si formano alterazioni circolari, espanse, idropiche successivamente nerastre, infossate e fessurate. Sull'albicocco esse, dapprima piccole e verdi, tendono



successivamente a rigonfiarsi assumendo colorazione rosso-nerastra e determinando deformazioni. Possono essere coperte da gomma. A differenza del pesco, i cancri sui rami continuano a svilupparsi nel corso degli anni (perenni).

1.2.3 Ciliegio

Su ciliegio i sintomi più rilevanti sono a carico dei frutti, che possono risultare deformati. I batteri possono essere isolati sia dall'epidermide che dal nocciolo.

Immagini: www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_pruni/XANTPR_images.htm

1.3 Descrizione del patogeno

X. arboricola pv. *pruni* è un bastoncellare Gram negativo, mobile grazie alla presenza di un flagello. Il batterio è strettamente aerobio, con intervallo ottimale di crescita fra 24 e 29°C. Le sue dimensioni sono 0,2–0,4 × 0,8–1,0 mm.

1.4 Epidemiologia e trasmissione

Le vie d'ingresso del batterio sono gli stomi e le ferite causate da operazioni di potatura, dalla grandine e dalla caduta delle foglie.

D'inverno il batterio sopravvive nei cancri, nelle gemme e nei punti di distacco delle foglie. In primavera ed in autunno si verificano le condizioni ambientali ottimali per l'infezione: ovvero 18-28°C, ed umidità relativa del 70%.

X. arboricola pv. *pruni* è un batterio epifita, quindi può sopravvivere sulla fillosfera senza causare malattia.

1.5 Diagnosi

Isolamento diretto

Metodi sierologici: immunofluorescenza (IFAS)

Tecniche molecolari: reazione a catena della polimerasi (PCR)

1.6 Normativa

1. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO):
Categoria fitosanitaria: EPPO A2 list no. 62, EU Annex designation II/A2.
Standard PM 7/64 (1), 2006, OEPP/EPPO Bulletin 36, 129–133
2. D.Lgs. 19 agosto 2005, n. 214.
Attuazione della direttiva 2002/89/CE concernente le misure di protezione contro l'introduzione e la diffusione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali.

2. PROTOCOLLO DI DIAGNOSI

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 fornisce le linee guida per la diagnosi e l'identificazione del batterio *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* da materiale vegetale asintomatico, nei laboratori preposti alla diagnosi degli organismi di qualità e/o quarantena, presenti sul territorio italiano. L'uso di protocolli diagnostici armonizzati è alla base di un'efficiente applicazione delle misure fitosanitarie e consente il confronto dei risultati ottenuti da diversi laboratori in diverse condizioni operative.

Le metodologie di laboratorio riportate nel protocollo sono state selezionate sulla base dei parametri sensibilità, specificità, accuratezza, sensibilità analitica, inclusività, esclusività, ripetibilità e riproducibilità (ISO 16140:2003).

La scelta delle metodologie diagnostiche da validare e la definizione dei parametri ISO 16140:2003 è scaturita dal lavoro congiunto di un Gruppo di lavoro di esperti costituito da:

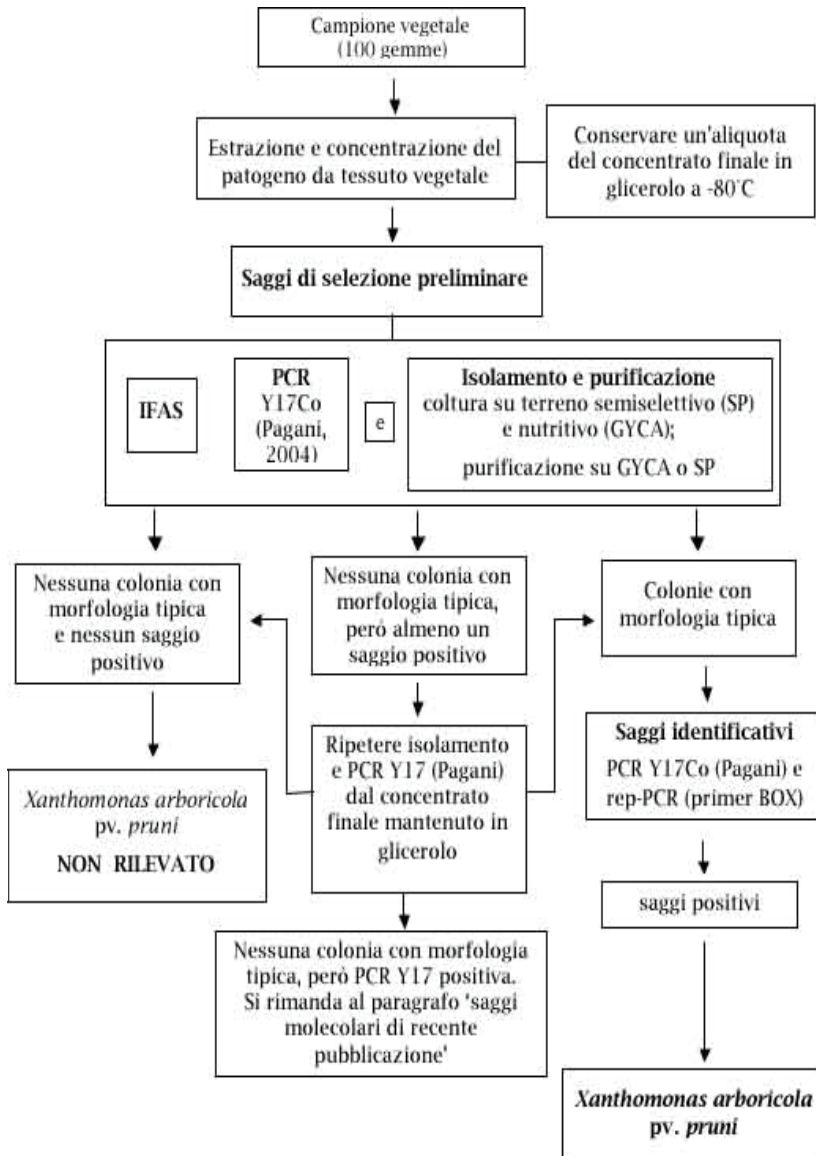
- 1- Dott.ssa Stefania LORETI, CRA-PAV Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale di Roma (Coordinatore del Gruppo)
- 2- Prof.ssa Vittoria CATARA, Università degli Studi di Catania
- 3- Prof. Emilio STEFANI, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia.
- 4- Dott. Marco SCORTICHINI, Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma (CRA-FRU)

La definizione del parametro di riproducibilità è scaturita dall'effettuazione di un ringtest nazionale, al quale hanno partecipato i seguenti laboratori:

- 1- Servizio Fitosanitario Regionale (SFR) Emilia-Romagna
- 2- SFR Friuli-Venezia Giulia
- 3- SFR Piemonte
- 4- SFR Campania
- 5- CAV-Centro Attività Vivaistiche (Tebano)

La stesura del presente protocollo è stata effettuata presso il CRA-PAV e il contenuto del protocollo ha avuto l'approvazione del Gruppo di lavoro di esperti sopra citato.

2.1 Diagramma di flusso



2.2 Dimensione del campione

Un campione di materiale vivaistico consiste in 100 gemme dormienti (per “gemma” si intendono la gemma e la sottostante cicatrice fogliare). Nel caso di piante da frutteto infetto il campione consiste in 100 rami di un anno, dal quale saranno saggiate 100 gemme.

Se devono essere testate piante madri, occorre prelevare 30 rami da ciascuna pianta e da questi saggiare 100 gemme.

2.3 Estrazione e concentrazione del patogeno da tessuto vegetale

- Pestare il campione (100 gemme) in 30 ml di tampone potassio-fosfato 50 mM, pH = 7,0 a temperatura ambiente.
- Filtrare la sospensione con garza sterile e centrifugare per 5 min a 480 x g.
- Trasferire il surnatante in una nuova provetta e centrifugare per 10 min a 12.000 x g
- Scartare il surnatante e risospingere il pellet in 5 ml di tampone.
- Utilizzare questo concentrato finale per l'isolamento, l'IFAS e l'estrazione di DNA.

Conservare a - 80°C una porzione del concentrato, dopo averlo addizionato di glicerolo alla concentrazione finale del 20-30%.

2.4 Rimozione del glicerolo

Qualora il campione sia stato congelato in presenza di glicerolo per il mantenimento a lungo termine è opportuno provvedere alla rimozione del glicerolo. Questa operazione è raccomandata per favorire l'adesione del campione al vetrino da immunofluorescenza e per evitare interferenze durante l'estrazione e l'amplificazione del DNA. Non è necessaria, invece, per l'isolamento su terreno agarizzato.

Il glicerolo può essere rimosso dal campione mediante aggiunta di un egual volume di tampone per sedimentazione, centrifugazione per 15 min a 7000 x g e risospensione del pellet in un volume di tampone per sedimentazione pari al volume di partenza del campione stesso.

2.5 Isolamento e identificazione sui terreni SP e GYCA

Inseminare 50 µl di ciascuno dei campioni, in diluizioni 'tal quale', 1:10 e 1:100 (“serie”), sul substrato semiselettivo SP e in parallelo sul substrato nutritivo GYCA, servendosi di spatole a forma di L (“hockey sticks”). La quantità indicata è valida per piastre di Petri con un diametro di 90 mm.

Come controllo positivo utilizzare ceppi di riferimento di *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* ad una concentrazione di partenza pari a 10⁵-10⁶ ufc (unità formanti colonie)/ml (non superiore, per favorire la crescita di colonie singole sul substrato); è infatti importante disporre di volta in volta di colture di riferimento della stessa età dei campioni da analizzare e cresciute sul medesimo substrato.

Mantenere le piastre in incubazione per 3 giorni a 27°C.

Facendo riferimento alle piastre di controllo, selezionare le colonie con la morfologia caratteristica di *X. arboricola* pv. *pruni* (indicate in seguito come “*Xap-like*”) e purificare tali colonie mediante subcoltura sul terreno nutritivo GYCA.

Identificare le colture pure e confermare che siano di *X. arboricola* pv. *pruni* ricorrendo alle due metodiche di PCR (Pagani, 2004 e BOX-PCR) riportate più avanti.

2.6 Saggio sierologico: IFAS (Immunofluorescence Antibody Staining)

Si raccomanda di preparare i vetrini in doppio e conservarne una serie per un eventuale secondo uso.

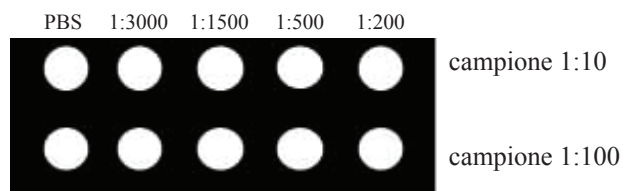
Nota: Qualora si stia procedendo con un campione conservato, occorre effettuare preliminarmente la rimozione del glicerolo.

Nota: Misurare con lo spettrofotometro l’assorbanza di una sospensione di *X. arboricola* pv. *pruni* previamente cresciuto 24-48 ore su NAG o GYCA: $A_{660} = 0,1$ OD corrisponde a circa 1×10^8 ufc/ml.

- Preparare vetrini separati di controllo positivo con una sospensione di 10^6 - 10^7 ufc/ml del ceppo di riferimento. Usare un vetrino in ciascuna serie di prove.
- Preparare diluizioni decimali (1:10, 1:100 e 1:1000) del campione, risospeso nel tampone per sedimento.
- Trasferire con una pipetta un volume standard misurato di sospensione o di campione diluito (per es. 20 μ l è adeguato per un pozzetto di 6 mm di diametro) su una fila di pozzetti del vetrino. L’altra fila può essere utilizzata per un’altra diluizione o per un secondo campione.
- Far evaporare completamente le goccioline a temperatura ambiente "overnight" oppure a 37°C per due ore.
- Fissare le cellule batteriche al vetrino passandolo sulla fiamma.

I vetrini pronti possono essere conservati a 4°C fino al momento dell’utilizzo, entro qualche giorno.

- Preparare il tampone IF in quantità sufficiente per i lavaggi.
- Preparare le diluizioni dell’anticorpo primario secondo le istruzioni dei produttori. Generalmente vengono utilizzate le seguenti diluizioni dell’anticorpo: 1:200, 1:500, 1:1500 e 1:3000 in tampone IF.



Qualora si utilizzi un anticorpo del quale è indicato il “titolo” (TQ) (non dovrebbe essere inferiore a 1:2000), dovranno essere effettuate, almeno, le seguenti diluizioni: “TQ”, diluizione pari al “TQ / 2” (la cosiddetta “working dilution”), “TQ/4”.

- Coprire completamente ciascun pozzetto di saggio con l'appropriata diluizione dell'anticorpo (come indicato in figura). Il volume di anticorpo messo su ciascun pozzetto deve essere almeno equivalente al volume di estratto (cioè per es. 20 µl).
- Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C.
- Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare brevemente con tampone IF.
- Lavare immergendo per 15 minuti nel tampone IF, con una leggera agitazione.
- Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.

Nota: Da questo momento in poi operare in penombra, dato che il coniugato FITC è sensibile alla luce!

- Preparare la diluizione 1:160 dell'anticorpo secondario coniugato di FITC, che andrà distribuita sui pozzetti di tutti i vetrini.
- Coprire i pozzetti di saggio con la diluizione di anticorpo secondario coniugato di FITC.
- Il volume di anticorpo secondario coniugato messo sui pozzetti deve essere identico al volume dell'anticorpo primario (cioè per es. 20 µl).
- Mantenere in incubazione i vetrini su carta umida in recipiente chiuso per 30 minuti a temperatura ambiente oppure in termostato a 26-28°C, al riparo dalla luce
- Scuotere via le goccioline da ciascun vetrino e sciacquare brevemente con tampone IF.
- Lavare (al riparo dalla luce) immergendo per 15 minuti nel tampone IF, con leggera agitazione.
- Rimuovere accuratamente l'umidità in eccesso tamponando delicatamente con carta bibula.
- Trasferire con una pipetta 5-10 µl di liquido di montaggio su ciascun pozzetto e chiudere con un vetrino coprioggetti.

Esaminare i vetrini con un microscopio a epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione di FITC. Esaminare attentamente i pozzetti lungo due diametri ortogonali e lungo il perimetro.

Interpretazione del risultato della colorazione IF

- Esaminare anzitutto il vetrino del controllo positivo. Le cellule devono avere fluorescenza verde brillante.

Nota: Il saggio IF deve essere ripetuto se la colorazione è anomala o se il vetrino di controllo non presenta cellule fluorescenti.

- Passare ora ad osservare i vetrini di saggio. Verificare prima l'assenza di cellule fluorescenti nei pozzetti di controllo PBS. Cellule fluorescenti nel controllo PBS indicano un legame non specifico del coniugato o contaminazione.

Nota: in questo caso ripetere il saggio.

- Facendo riferimento ai vetrini di controllo, verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* nei pozzetti di saggio dei vetrini. L'intensità della fluorescenza deve essere equivalente o maggiore rispetto a quella del ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione di anticorpo.
 - Per ciascun campione in cui non vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica il saggio IF è negativo.
 - Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, il saggio IF è positivo.
 - Le cellule che presentano una colorazione incompleta o aberrante o una debole fluorescenza devono essere ignorate, a meno che non siano numerose. In caso di sospetta contaminazione occorre ripetere il saggio.

2.7 Estrazione del DNA dal concentrato finale

Si utilizza il kit QIAGEN: DNeasy® Plant Mini Kit (Cat. No. 69104), seguendo le istruzioni del produttore.

Protocollo: “Purification of total DNA from plant tissue (Mini Protocol)”

Utilizzare 500 µl di concentrato finale.

Raccogliere le cellule batteriche in un pellet, centrifugando a 10.000 rpm per 10 minuti, poi iniziare dalla risospensione in buffer AP1 (“Risospendere il pellet in 400 µl di tampone AP1”).

Importante: Qualora si stia procedendo con un campione conservato, occorre effettuare preliminarmente la rimozione del glicerolo.

Nota: Dopo i lavaggi col tampone AW, è importante eliminare tutto l'etanolo contenuto nel tampone di lavaggio. Un modo efficace è lasciar asciugare le colonnine aperte sotto cappa per 10 min.

Nota: Per l'eluizione finale si consiglia di utilizzare 70 µl di tampone AE.

L'eluato, contenente il DNA, deve essere mantenuto a -20°C. Se si prevede di utilizzarlo entro una settimana, esso può essere mantenuto a 4°C e in seguito trasferito a -20°C.

2.8 Preparazione del template per l'amplificazione PCR

Il DNA estratto dal concentrato finale del campione mediante il kit commerciale si utilizza direttamente nella reazione di PCR.

Qualora si parta dalla colonia pura, occorre prelevare un'ansata di coltura di 24 – 48 ore. Questa va sospesa in acqua distillata sterile e, in questo caso, l'estrazione del DNA viene effettuata mediante lisi alcalina.

Lisi alcalina (secondo DM 2000 su *Ralstonia solanacearum*, GU serie gen. n. 102 del 4-5-2000):

- preparare una sospensione batterica a concentrazione pari a 10^6 ufc/ml;
- unire 90 μ l di sospensione con 10 μ l NaOH 0,5M;
- mescolare ripetutamente per inversione;
- incubare a 95 – 100°C per 4 min, poi trasferire subito in ghiaccio;
- Quando le sospensioni denaturate si sono raffreddate, centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.
- Utilizzare il surnatante, contenente il DNA, nella reazione di amplificazione.

2.9 Saggi molecolari

2.9.1 PCR Y17 (Pagani, 2004)

Questa fase del protocollo prevede l'analisi mediante PCR di:

- > DNA estratto dal concentrato finale del campione mediante il kit commerciale;
- > sospensioni batteriche delle colonie “*Xap-like*” selezionate durante l'isolamento e sottoposte a lisi alcalina.

Nella reazione di amplificazione occorre inserire, oltre ai campioni, ceppi batterici di riferimento, quali controlli positivi, e l'acqua utilizzata per la preparazione della miscela, quale “bianco”.

Questi controlli interni vanno trattati nel medesimo modo dei campioni da amplificare.

I primer sono i seguenti:

Y17 F 5'-GACGTGGTGATCAGCGAGTCATTC-3'
Y17 R 5'-GACGTGGTGATGATGATCTGC-3'

La dimensione attesa dell'amplicone è di 943 bp.

A 5 μ l di template si aggiungono 45 μ l della seguente Master mix:

reagente	C _{iniz}	V _{reaz}	C _{finale}
dH ₂ O		29,5 μ l	
PCR buffer	5X	10,0 μ l	1X
MgCl ₂	25 mM	3,0 μ l	1,5 mM
dNTPs	5 mM	1,0 μ l	0,1 mM
primer Y17 F	10 μ M	0,5 μ l	0,1 μ M
primer Y17 R	10 μ M	0,5 μ l	0,1 μ M
Taq DNA Polimerasi	5 U/ μ l	0,5 μ l	0,05 U/ μ l = 2,5 U/reazione

Il programma è il seguente:

denaturazione iniziale:	93°C / 5 min
45 cicli:	93°C / 1 min
	55°C / 1 min
	72°C / 2 min
estensione finale:	72°C / 10 min, poi mantenere a 4°C.

Elettroforesi:

Preparare un gel di agarosio 1% in TAE 1X; caricare nei pozzetti 15-20 µl di ciascun prodotto della PCR.

Nota: si può usare anche il TBE 1X.

Per la visualizzazione del DNA su gel utilizzare coloranti fluorescenti vocati allo scopo, di adeguata sensibilità, e compatibili col sistema di visualizzazione di immagine presente in laboratorio.

Interpretazione del risultato della prova PCR:

- i) Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il controllo acqua è negativo e se nei controlli positivi si evidenzia il frammento di DNA specifico per *X. arboricola* pv. *pruni* (943 pb).
- ii) Se nel campione è stato prodotto il frammento di DNA atteso, il campione è positivo.
- iii) Se non si evidenzia il frammento di DNA specifico per *X. arboricola* pv. *pruni*, il campione è negativo.

2.9.2 Rep-PCR (primer BOX)

Questa fase del protocollo si applica unicamente per l'identificazione di colonie "Xap-like" selezionate durante l'isolamento.

La procedura indicata di seguito è la procedura EPPO (PM 7/100 (1): 'Rep-PCR tests for identification of bacteria' secondo Smith *et al.* (2001) e Versalovic *et al.* (1994).

Nella reazione di amplificazione occorre inserire, oltre ai campioni, ceppi batterici di riferimento, quali controlli positivi e guida per la lettura del risultato, e l'acqua utilizzata per la preparazione della master mix, quale "bianco".

Questi controlli interni vanno trattati nel medesimo modo dei campioni da amplificare.

Il primer è il seguente, secondo Versalovic *et al.* (1994).

BOX A1R 5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G - 3'

Il prodotto dell'amplificazione consiste in un pattern di bande (*fingerprinting*).

A 2 µl di template si aggiungono 23 µl della seguente Master mix:

reagente	C _{iniz}	V _{reaz}	C _{finale}
dH ₂ O		13,3 µl	
PCR buffer	5 X	5,0 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5 µl	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,5 µl	0,2 mM
primer BOX A1R	20 µM	2,5 µl	2,0 µM
Taq DNA Polimerasi	5 U/µl	0,2 µl	0,04 U/ µl = 1 U/reazione

Il programma è il seguente:

denaturazione iniziale:	95°C / 7 min
30 cicli:	94°C / 1 min
	53°C / 1 min
	65°C / 8 min
estensione finale:	65°C / 16 min, poi mantenere a 4°C.

Elektroforesi:

Preparare un gel di agarosio 2% in TBE 1X, il gel deve essere lungo almeno 20 cm; caricare nei pozzetti 10 µl di ciascun prodotto della PCR; applicare una tensione elettrica di 90 V per circa 2 ore e mezza (controllare l'ampereaggio).

Nota: si può utilizzare anche il TAE 1X.

Per la visualizzazione del DNA su gel utilizzare coloranti fluorescenti vocati allo scopo, di adeguata sensibilità, e compatibili col sistema di visualizzazione di immagine presente in laboratorio.

Interpretazione del risultato della BOX-PCR:

- i) Confrontare il pattern di bande dei ceppi di riferimento con quello dei singoli campioni.
- ii) Il saggio di amplificazione è attendibile solo se il controllo acqua è negativo e, contemporaneamente, se dai ceppi di riferimento si ottiene un pattern di bande.
- iii) Se non si ottiene un pattern di bande nei ceppi di riferimento e/o nei campioni, l'analisi deve essere ripetuta.
- iv) Se il pattern è uguale a quello ottenuto per i ceppi di riferimento, il campione è positivo.
- v) Se il pattern di bande presenta sostanziali differenze rispetto a quello dei ceppi di riferimento, il campione è negativo.

2.10 Aspetti critici

Per l'ottenimento di un risultato affidabile e per avere un confronto con un controllo comparabile al campione in lavorazione, si consiglia di aggiungere i seguenti controlli da analizzare parallelamente ai campioni:

- 'negative isolation control' (NIC), al fine di monitorare cross-reazioni con il tessuto vegetale dell'ospite e/o contaminazioni durante l'estrazione degli acidi nucleici: inserire un campione di tessuto vegetale non infetto o un estratto in 'bianco' ottenuto col tampone sterile (eventualmente possono essere utilizzate aliquote di estratto di campione precedentemente risultato negativo).

- ‘positive isolation control’ (PIC), al fine di assicurare l’estrazione degli acidi nucleici in quantità e qualità sufficienti: inserire un estratto di campione vegetale contaminato sperimentalmente con l’organismo target alla concentrazione di 10⁶ ufc/ml.

Per i saggi IF e PCR la presenza di *Xap* deve essere rilevata in almeno 10⁶ ufc/ml dei controlli positivi e non deve essere rilevata in nessuno dei controlli negativi.

Nota:

Si può sospettare un’inibizione della PCR se il campione di controllo positivo contenente l’organismo target in sospensione batterica in acqua produce l’amplicone previsto, ma i controlli positivi contenenti *Xap* in estratto vegetale danno risultati negativi. In tal caso è consigliabile effettuare una o più diluizioni decimale del campione e ripetere l’analisi.

2.11 Saggi molecolari di recente pubblicazione

Per completezza d’informazione si riporta la citazione bibliografica di metodiche pubblicate nel corso del 2011 la cui validazione non è stato possibile includere. Con queste metodiche possono essere processati:

- › DNA estratto dal concentrato finale del campione mediante il kit commerciale (come saggio di selezione preliminare);
- › sospensioni batteriche delle colonie “*Xap*-like” selezionate durante l’isolamento (come saggio identificativo).

L’applicazione di tali metodiche può essere effettuata nel caso il campione fornisca, per due volte consecutive, positività col saggio PCR Pagani (2004), ma l’isolamento risulti sempre negativo.

In quest’ultimo caso potrebbe essere applicato uno (o più) dei seguenti saggi molecolari:

- Ballard *et al.*, 2011. Development of a Bio-PCR protocol for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease* 95: 1109-1115.
- Palacio-Bielsa *et al.*, 2011. “Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species”. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (1): 89-97.
- Park *et al.*, 2010. Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *The Journal of Microbiology* 48: 554-558.
- Pothier *et al.*, 2011. “A duplex-PCR method for species- and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*”. *J. Microbiol. Methods* 86 (1): 16-24.
- Pothier *et al.*, 2011a. The ubiquitous plasmid pXap41 in the invasive pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: complete sequence and comparative genomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* 323: 52-60.

Alcune caratteristiche di questi protocolli, come la specificità analitica, vengono discusse da Palacio-Bielsa *et al.* (2012), sebbene nessuno di questi sia stato validato.

Interpretazione del risultato

Nel caso uno o più saggi molecolari riconfermino la positività già ottenuta due volte con la PCR Pagani (2004) la decisione sull'accettare il campione come positivo (malgrado l'isolamento risulti negativo) sarà a discrezione del Servizio Fitosanitario (SF) e in base a valutazioni specifiche sul campione in analisi.

Nel caso uno o entrambi questi saggi risultino negativi il campione potrà essere considerato negativo.

Sulla base dei parametri di validazione di seguito riportati, si sconsiglia, invece, di riapplicare la PCR Pagani (2004) e/o il saggio IFAS sugli estratti vegetali per i seguenti motivi:

- l'IFAS presenta un valore soglia di sensibilità analitica pari a 10^5 ufc/ml, risultando non adeguato al rilevamento del batterio da campioni asintomatici. Anche il valore di sensibilità relativa e di accuratezza sono piuttosto bassi (rispettivamente 52 e 55%).
- la PCR Pagani (2004) presenta un grado di sensibilità relativa e di accuratezza non pienamente soddisfacenti (rispettivamente 52 e 73%).

3. DATI DI VALIDAZIONE

3.1 Metodologie

Le metodologie diagnostiche scelte per la validazione dei protocolli sono le seguenti:

Tipo di saggio	Metodologie validate	Componente biologica riconosciuta
Selezione preliminare	Crescita su substrato agarizzato SP e GYCA	Morfologia della colonia
Selezione preliminare	Saggio sierologico: Immunofluorescenza (IFAS)	Antigene di superficie della cellula batterica
Selezione preliminare	Saggio molecolare: PCR - Pagani (2004)	Acido nucleico (DNA)
Identificazione	Saggi molecolari: PCR protocollo Pagani rep-PCR (primer BOX)	Acido nucleico (DNA)

3.2 Campioni per la validazione

I campioni analizzati consistevano in colonie pure di batteri ‘target’, colonie pure di batteri non ‘target’, estratti vegetali di pesco non contaminati (‘sani’), estratti vegetali contaminati artificialmente con sospensioni batteriche a concentrazioni calibrate ed estratti vegetali di piante naturalmente infette (pesco e susino).

- 12 ceppi batterici ‘target’ provenienti da diversi areali geografici:

Isolati ‘target’	Provenienza
NCPPB 416 [†]	Nuova Zelanda
NCPPB 2588	Sud Africa
NCPPB 3156	Italia
NCPPB 1607	Australia
VR-69	Italia
ISPaVe 1151	Italia
ISPaVe 1224	Italia
I-006	Italia
I-516	Italia
41286	Australia
Uni-MoRe 8	Italia
Uni-MoRe 440	Italia

[†]ceppo tipo

- 10 ceppi batterici ‘non target’ rappresentati da ceppi batterici appartenenti ai Genera *Xanthomonas* e da un ceppo di *Pantoea agglomerans* (sin. *Erwinia herbicola*, epifita componente della fillosfera la cui morfologia delle colonie può essere confusa con quella del patogeno in esame), provenienti da diversi areali geografici:

Isolati ‘non target’	Provenienza
IVIA 3287.1	<i>Xanthomonas arboricola</i> Spagna
Uni-MoRe 279	<i>Xanthomonas arboricola</i> Italia
Uni-MoRe 360	<i>Xanthomonas arboricola</i> Italia
NCPPB 1832	<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i> Nuova Zelanda
NCPPB 935	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i> USA
ISF 1G	<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i> Italia
NCPPB 411	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> Nuova Zelanda
ISPaVe 1032	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> Italia
NCPPB 2987	<i>X. campestris</i> pv. <i>populi</i> UK
ISF 438	<i>Pantoea agglomerans</i> Italia

➤ 19 campioni costituiti da estratti vegetali di pesco e susino:

Quantità	Matrice	Tipologia del campione
12	Estratto di pesco	Inoculati artificialmente, da 10^7 a 10^4 ufc/ml
3	Estratto di pesco	Non contaminati ("sani")
3	Estratto di pesco	naturalmente infetti
1	Estratto di susino	naturalmente infetti

3.3 Valori di validazione

3.3.1 Morfologia delle colonie dei ceppi riferimento ('target' e 'non target') su substrato nutritivo GYCA e semi-selettivo SP

Valori %	Substrato SP	Substrato GYCA
Inclusività	100	100
Esclusività	52	47

3.3.2 Isolamento di colonie (da matrice vegetale) su substrati nutritivi/ selettivi agarizzati SP e GYCA

Isolamento da matrice vegetale:

Valori %	Substrato SP	Substrato GYCA
Sensibilità	39	37
Specificità	100	100
Accuratezza relativa	47	45
Ripetibilità*	83	100
Riproducibilità **	97	93

* La ripetibilità è stata valutata mediante tre ripetizioni del test nel laboratorio UniMoRe (referente Prof. Stefani).

** La riproducibilità è stata valutata mediante ring test effettuato da quattro laboratori dei SFR e dal CAV.

I valori per la validazione di entrambe le metodiche sono stati ottenuti utilizzando:
Piastre Petri: piastre Petri diametro 90 mm Sarstedt cod. 82.1472001 e ANCRIN cod. 18PABNV

Componenti dei terreni:

- Agar technical (Agar no. 3) OXOID cod. LP0013 e Agar Fluka cod. 5039;
- CaCO₃ purissimo, precipitato, anidro, Sigma-Aldrich cod. 12010;
- Cicloesimide (actidione) Sigma-Aldrich cod. C7698;
- Estratto di lievito OXOID cod. LP0021 e Fluka cod. 70161;
- D(+)glucosio OXOID cod. LP0071 e Merk 1040741000;
- K₂HPO₄ Sigma-Aldrich cod. P3786 e Fluka 60355;
- MgSO₄ Carlo Erba cod. 459667 e Fluka 627;
- Peptone batteriologico OXOID cod. LP0037 e BactoPeptone BD cod. 211693;
- D(+)saccarosio Fluka cod. 84100 e Sigma cod. 84097.

3.3.3 Metodo sierologico IFAS:

IFAS da ceppi batterici di riferimento target e non target

Valori %	Kit ADGEN
Inclusività	100
Esclusività	82

IFAS da matrice vegetale come saggio preliminare

Valori %	Kit ADGEN
Sensibilità diagnostica	52
Specificità diagnostica	100
Accuratezza relativa *	55
Ripetibilità*	83
Riproducibilità **	82

* La ripetibilità è stata valutata mediante tre ripetizioni del test nel laboratorio UniMoRe (referente Prof. Stefani).

**La riproducibilità è stata valutata mediante ring test effettuato da quattro laboratori dei SFR e dal CAV.

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit per immunofluorescenza: Adgen Phytodiagnostics 1098-18 *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, 1000 test fluoriscan IF Kit;

Vetrini per immunofluorescenza:

- vetrini multipli per microscopio, diametro pozzetti 6 mm Menzel-Gläser Diagnostica e Thermo Scientific cod. X1XER308B#MNZ;
- vetrini copri-oggetto 24 x 60 mm Prestigi di Vemi S.r.l.;

Microscopio a fluorescenza: Zeiss, Axioskop 2 plus - HAL 100 e Nikon Eclipse 80i.

3.3.4 Metodo molecolare PCR (Pagani, 2004*)

PCR da ceppi batterici di riferimento target e non target

Valori %	PCR (Pagani)	rep-PCR-BOX
Inclusività	100	100
Esclusività	72	91

PCR da matrice vegetale come saggio preliminare

Valori %	Kit ADGEN
Sensibilità diagnostica	69
Specificità diagnostica	100
Accuratezza relativa	73
Ripetibilità*	100
Riproducibilità **	80

* La ripetibilità è stata valutata mediante tre ripetizioni del test nel laboratorio UniMoRe (referente Prof. Stefani).

** La riproducibilità è stata valutata mediante ring test effettuato da quattro laboratori dei SFR e dal CAV.

PCR come saggio identificativo delle colonie *Xap-like* isolate da SP

Valori %	PCR (Pagani)	rep-PCR-BOX
Ripetibilità*	NP	NP
Riproducibilità **	93,0	94,0

NP= dato non prodotto

** La riproducibilità è stata valutata mediante ring test effettuato da quattro laboratori dei SFR e dal CAV.

PCR come saggio identificativo delle colonie *Xap-like* isolate da GYCA:

Valori %	PCR (Pagani)	rep-PCR-BOX
Ripetibilità*	100,0	100,0
Riproducibilità **	94,0	92,0

* La ripetibilità è stata valutata mediante tre ripetizioni del test nel laboratorio UniMoRe (referente Prof. Stefani).

I valori per la validazione sono stati ottenuti utilizzando:

Kit per estrazione del DNA: DNeasy® Plant Mini Kit, QIAGEN (Cat. No. 69104);
 Kit per amplificazione del DNA: GoTaq® Flexi DNA Polymerase kit, Promega (Cat. No. M8305), comprensivo di buffer, MgCl₂ e Taq DNA polimerasi;
 Primers: Y17 F, Y17 R, BOX A1R sintetizzati da Invitrogen;
 dNTPs: dNTP Mix Promega (Cat. No. U1515);
 Termociclatore: Gene Amp® PCR System 9700 Applied Biosystem e Gene Amp® PCR System 2400.

3.3.5 Metodi biologici: patogenicità ed elicitazione della risposta di ipersensibilità (HR)

Valori di validazione relativi al saggio di patogenicità su foglia staccata:

Valori %	Foglia di pesco
Sensibilità	75
Specificità	66

Valori di validazione relativi ai saggio di elicitazione della risposta di ipersensibilità su fagiolino e su foglia di pomodoro (varietà Roma):

Valori %	Fagiolino	Pomodoro
Sensibilità	81	87.5
Specificità	53	45.5

Soglia di sensibilità analitica

Il calcolo della sensibilità analitica è stato effettuato a partire da un estratto di pesco contaminato con concentrazioni calibrate del patogeno a partire da 10^7 ufc/ml a 10^0 ufc/ml in tre ripetizioni. I valori soglia (espressi in ufc/ml) di sensibilità assoluta vengono di seguito riportati per ciascuna metodica.

ufc/ml <	Isolamento	IFAS	PCR Pagani (2004)
Valore soglia	10^5	10^5	10^3

Specificità analitica

La specificità analitica è stata valutata a partire dalla collezione di ceppi batterici 'target' e 'non target' (vedi paragrafo campioni per la validazione) tenendo conto dei risultati falsi. Per ciascuna metodica vengono riportati i risultati attesi positivi e attesi negativi rispettivamente per i ceppi batterici 'target' e 'non target'.

Risultato atteso	IFAS	PCR Pagani (2004)	rep-PCR
Attesi positivi	36/36	48/48	36/36
Attesi negativi	27/33*	9/44°	0/33

* L'IFAS ha prodotto un risultato falso positivo con i seguenti ceppi batterici:

IVIA 3287.1	<i>Xanthomonas arboricola</i>
NCPPB 1832	<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>
NCPPB 935	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>
ISF 1 G	<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>
ISPaVe 1032	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>
NCPPB 2987	<i>X. campestris</i> pv. <i>populi</i>

° La PCR Pagani (2004) ha prodotto un risultato falso positivo con i seguenti ceppi batterici 'non target':

NCPPB 411	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>
NCPPB 1832	<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>
NCPPB 2987	<i>X. campestris</i> pv. <i>populi</i>

e tre risultati falsi positivi con i seguenti ceppi batterici 'non target':

NCPPB 1832	<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>
NCPPB 935	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>

4. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- BALLARD EL., RG. DIETZGEN, LI. SLY, C. GOUK, C. HORLOCK, M. FEGAN, 2011. Development of a Bio-PCR protocol for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease* **95**, 1109-1115.
- DYE DW., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Agricultural Science* **5**, 393-416
- HAYWARD AC., 1960. A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. *Nature* (London) **186**, 405-406.
- PAGANI M.C., 2004. An ABC transporter protein and molecular diagnoses of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing bacterial spot of stone fruits. PhD thesis, North Carolina State.
- PALACIO-BIELSA A., J. CUBERO, MA. CAMBRA, R. COLLADOS, IM. BERRUETE, MM LÓPEZ, 2011. Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (1), 89-97. University, Raleigh, U.S.A.)
- PALACIO-BIELSA A., JF. POTHIER, M. ROSELLO, B. DUFFY, MM. LOPEZ, 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of Cost 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology* **94**, S1.135- S1.146.
- PARK SY., YS. LEE, YJ. KOH, JS. HUR, JS. JUNG, 2010. Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *The Journal of Microbiology* **48**, 554-558.
- POTHIER JF., MC. PAGANI, C. PELLUDAT, DF. RITCHIE, B. DUFFY, 2011. "A duplex-PCR method for species- and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*". *Journal of Microbiological Methods* **86** (1), 16-24.
- POTHIER JF., FJ. VORHÖLTER, J. BLOM, A. GOESMANN, A. PÜHLER, THM. SMITS T., B. DUFFY, 2011a. The ubiquitous plasmid pXap41 in the invasive pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: complete sequence and comparative genomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* **323**, 52-60.
- SMITH NC., J. HENNESSY, D.E. STEAD, 2001. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus*. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 739-748.
- VERSALOVIC J., M. SCHNEIDER, FJ. DE BRUIJN, JR. LUPSKI, 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology* **5**, 25-40.

ALLEGATO I-Strumentazione, materiali e reagenti

Strumentazione e materiali:

1. anse per microbiologia
2. autoclave
3. becco Bunsen
4. blocco termostato (o bagnetto)
5. cappa aspirante
6. cella elettroforetica
7. centrifuga
8. frigoriferi + 4°C e - 20°C
9. macchina per produrre ghiaccio
10. microscopio a fluorescenza
11. mortai o Stomacher
12. pH-metro
13. piastra agitante con ancorette magnetiche
14. pipette da P-2 a P-1000
15. spettrofotometro
16. termociclatore
17. termostato
18. transilluminatore UV
19. vetreria

Reagenti e kit:

1. acido acetico glaciale
2. acido bórico
3. agar
4. agarosio per elettroforesi
5. CaCO₃ (Sigma-Aldrich cod. 12010)
6. D(+)-glucosio
7. EDTA
8. estratto di lievito
9. glicerolo
10. d H₂O (distillata)

11. d H₂O ultrapura per PCR
12. KH₂PO₄
13. K₂HPO₄
14. MgSO₄
15. NaCl
16. Na₂CO₃
17. NaHCO₃
18. Na₂HPO₄-12 H₂O
19. Na₂HPO₄-2 H₂O
20. NaH₂PO₄- H₂O
21. NaH₂PO₄-2 H₂O
22. NaOH
23. peptone batteriologico
24. D(+)-saccarosio
25. trizma base
26. kit di anticorpi per immunofluorescenza
27. kit per estrazione DNA
28. kit per PCR: comprensivo di buffer, MgCl₂ e Taq DNA polimerasi
29. per PCR: coppia di primer Y17 F/R e primer BOX A1R
30. per PCR: dNTPs

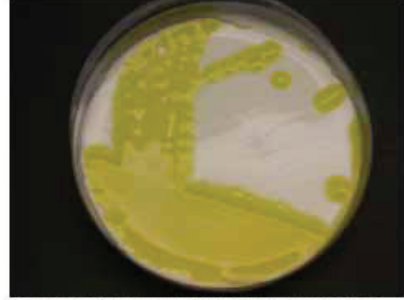
Materiale consumabile:

1. carta bibula
2. tubi centrifugabili da 50 ml
3. garza sterile
4. guanti monouso
5. piastre di Petri con diametro 90 mm
6. provette "Eppendorf" da 1,5 ml
7. provette da PCR
8. puntali per P-2 a P-1000 con filtro
9. puntali per P-20 a P-1000 senza filtro
10. vetrini multipli per microscopio
11. vetrini coprioggetto

ALLEGATO II
Descrizione morfologica delle colonie di
Xanthomonas arboricola* pv. *pruni



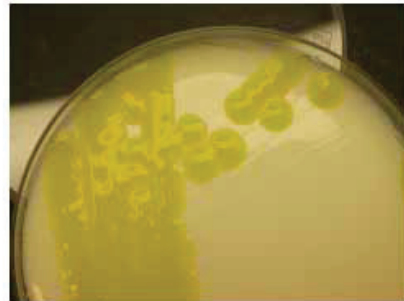
X. arboricola pv. *pruni* NCPPB 2588 su terreno SP



X. arboricola pv. *pruni* NCPPB 2588 su terreno GYCA



X. arboricola pv. *pruni* VR 69 su terreno SP



X. arboricola pv. *pruni* VR 69 su terreno GYCA

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

ALLEGATO III Substrati e tamponi

Tampone potassio-fosfato 50 mM, pH = 7,0

K_2HPO_4	8,71 g
KH_2PO_4	6,81 g
d H_2O	1,0 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare ed eventualmente aggiustare il pH, poi sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.

Tampone per sedimento (tampone fosfato 10 mM, pH 7,2):

$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	2,7 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$	0,4 g
d H_2O	1,0 l

Disciogliere gli ingredienti, controllare ed eventualmente aggiustare il pH, poi sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.

Terreno SP (Hayward, 1960)

Peptone batteriologico	5,00 g
D(+)-Saccarosio	10,00 g
K_2HPO_4	0,05 g
$MgSO_4$	0,25 g
Agar	15,00 g
d H_2O fino a	1,0 l

Disciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.

Lasciar raffreddare a 50 °C ed aggiungere una soluzione all'1% di cicloesimide (actidione) nella proporzione di 10 ml/l

Terreno GYCA (Dye, 1962)

D(+)-glucosio	10 g
Estratto di lievito	5 g
$CaCO_3$	30 g
Agar	20 g
d H_2O fino a	1,0 l

Disciogliere gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 min.

Nota: si raccomanda di utilizzare un carbonato di calcio purissimo, precipitato, anidro, come per esempio quello della Sigma-Aldrich cod. 12010.

Tampone IF (Na-PBS):

NaCl	42,50 g
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0,68 g
Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O	8,00 g
dH ₂ O	5,00 l

Liquido di montaggio (glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato)*:

Questo liquido si prepara con glicerolo e tampone carbonato-bicarbonato a pH 9, nelle proporzioni 9:1. La soluzione finale così ottenuta va conservata a 4°C, con l'accortezza di rinnovarla ogni 6-8 mesi.

Preparazione del tampone carbonato-bicarbonato:

SOLUZIONE A (0,2 M)

Na ₂ CO ₃	2,12 g
d H ₂ O	100 ml

SOLUZIONE B (0,2 M)

NaHCO ₃	1,68 g
d H ₂ O	100 ml

Unire 4 ml di soluzione A con 46 ml di soluzione B e portare a 200 ml. Controllare il pH. Tenere a 4°C.

* In alternativa può essere utilizzato il mezzo di montaggio abitualmente in uso presso il laboratorio.

Tampone TAE 1X

Tris base	48,40 g
acido acetico glaciale	11,42 ml
EDTA	4,65 g (oppure 20 ml soluzione 0,5M, pH = 8,0)
dH ₂ O	portare a V _f = 1,00 l

Tampone TBE 1X

Tris base	108,0 g
acido bórico	55,0 g
EDTA	9,3 g (oppure 40 ml soluzione 0,5M, pH = 8,0)
dH ₂ O	portare a V _f = 1,00 l