

Protocollo Real-time PCR per la diagnosi di *Xylella fastidiosa* in piante ornamentali

Preparazione e omogeneizzazione dei campioni

Ciascun campione da sottoporre al saggio è formato da 5-10 foglie (a seconda delle dimensioni e consistenza) e parti di fusto raccolti in corrispondenza di presunti sintomi, qualora presenti, o da diverse parti della pianta, affinché il campione sia rappresentativo dell'intera pianta. Per ognuno sono stati prelevati 0,5 g di tessuto comprendente piccioli fogliari, nervatura mediana e piccole porzioni di fusto, che sono stati trasferiti all'interno di bustine per estrazione in cui sono stati aggiunti 5 ml di tampone di estrazione CTAB*. I tessuti sono stati triturati mediante un omogeneizzatore semiautomatico, successivamente 1 ml di estratto del campione è stato trasferito in provetta sterile. Tra un campione e il successivo viene sterilizzata la lama usata per tagliare i tessuti.

Per rilevare eventuali effetti di inibizione della reazione di amplificazione della PCR, dovuti a composti organici o fenolici presenti all'interno dei tessuti vegetali delle specie in oggetto, sono stati preparati dei controlli positivi, aggiungendo una sospensione di cellule di Xf in tampone fosfatico salino al succo di ciascuna specie. Inoltre, sono stati preparati un controllo positivo ed uno negativo rappresentati dal succo vegetale ottenuto, rispettivamente, da una pianta sicuramente infetta da Xf e da una sana.

*CTAB Buffer

2% CTAB (Esadecil-trimetil-ammonio bromuro)

0.1M TrisHCl pH 8 (qualsiasi fornitore), sterilizzato in autoclave 20 mM EDTA (qualsiasi fornitore), sterilizzato in autoclave

1.4 M NaCl (qualsiasi fornitore), sterilizzato in autoclave

1% PVP-40

Estrazione degli acidi nucleici totali

L'estrazione degli acidi nucleici è avvenuta mediante lo strumento automatico "Maxwell®RSC Instrument" (PROMEGA), utilizzando il relativo kit commerciale, secondo le istruzioni del produttore riportate di seguito:

1. incubazione a 65°C per 30 minuti;
2. breve agitazione su vortex e centrifugazione dei campioni a 16.000 g per 10 minuti a temperatura ambiente;
3. trasferimento di 300 µl di surnatante di ciascun campione nei pozzetti della cartuccia precedentemente riempiti con 300 µl di lysis buffer e di 100 µl di elution buffer (forniti dal kit);
4. avvio del protocollo per l'estrazione del DNA.

Qualità e quantità degli acidi nucleici estratti sono state valutate mediante la lettura della densità ottica (OD) a 260 nm e del rapporto OD260/OD280 allo spettrofotometro (Nanodrop 1000).



Saggio real time qPCR per il rilevamento del ceppo ST53 di *X fastidiosa subspecies pauca* (XFP)

Il rilevamento del ceppo ST53 di Xfp è stato eseguito mediante PCR quantitativa in tempo reale, seguendo il protocollo Harper (Harper et al., 2010), con il seguente set di primer specifici:

XF-F (senso) 5' - CAC GGC TGG TAA CGG AAG A-3'

XF-R (antisenso) 5' - GGG TTG CGT GGT GAA ATC AAG-3'

XF-P (sonda) 5' 6FAM - TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC-BHQ-1- 3'

La composizione della miscela di reazione utilizzata per il saggio real time PCR è riportata di seguito

Reagenti	Volume
DNA genomico totale	1 µl
2X master mix per sonda TaqMan	5.5 µL
10 µM Primer senso	0.3 µL
10 µM Primer antisenso	0.3 µL
10 µM TaqMan sonda	0.2 µL
Acqua per analisi molecolare	3.7 µL
Totale	11 µl

La reazione di amplificazione è stata eseguita al termociclatore C1000™ Thermal Cycler con rilevatore della fluorescenza CFX96 Real Time System con software Bio-Rad CFX Manager™ utilizzando le seguenti condizioni:

1 ciclo di pre-incubazione a 50°C per 2 minuti;

1 ciclo a 95°C per 10 minuti;

40 cicli di: 94°C per 10 secondi e 62°C per 40 secondi.

Oltre ai campioni da valutare sono stati processati nella real time: non template control (NTC) costituito da tutti i reagenti della mix real time escluso il DNA da amplificare, necessario per individuare eventuali contaminazioni; controlli negativi e positivi per ciascuna delle specie saggiate, come conferma della qualità del saggio, dei reagenti e delle condizioni di amplificazione utilizzate. I campioni sono stati considerati positivi quando i valori del ciclo soglia (Cq) sono risultati inferiori a 32.



Riferimenti bibliografici

EPPO, PM. 7/24 (4). *Xylella fastidiosa*. EPPO Bull. 2019, 49, 175–227, Appendix 3 e 5.

Harper, S. J., L. I. Ward, e G. R. G. Clover. «Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella Fastidiosa* for Quarantine and Field Applications, 2010. *Phytopathology*[®] 100, n. 12: 1282–88. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>.

Loconsole, G., O. Potere, D. Boscia, G. Altamura, K. Djelouah, T. Elbeaino, D. Frasher, *et al.* 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods, *Journal of Plant Pathology* 96, n. 1: 7–14. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I1.041>.

Loconsole, Giuliana, Stefania Zicca, Lorenzo Manco, Oumaima El Hatib, Giuseppe Altamura, Oriana Potere, *et al.*, 2021. Diagnostic Procedures to Detect *Xylella fastidiosa* in Nursery Stocks and Consignments of Plants for Planting. *Agriculture* 11, n. 10: 922. <https://doi.org/10.3390/agriculture11100922>.

