

L'aspetto tecnico più difficile nella gestione del verde urbano risulta spesso il ritrovarsi a valutare l'entità di una malattia causata da agenti patogeni vegetali e animali e cercare di prevedere il declino più o meno rapido della pianta colpita



Il gestore del verde è dunque costretto, inizialmente, a scindere la sua diagnosi in tre parti ben distinte:

• FISIOLOGIA

• MECCANICA

• PATOLOGIA

Le malattie più temibili sono quelle che alterano l'integrità delle strutture legnose: anche se non ne pregiudicano la sopravvivenza, possono causarne crolli o schianti di vario tipo

Marciame radicale

Carie

Le carie del legno sono malattie subdole, dato il loro lungo periodo di incubazione. Per anni la pianta colpita non manifesta sintomi esterni specifici anche quando la sua integrità meccanica è irrimediabilmente compromessa



...inoltre i carpofori degli agenti fungini compaiono assai tardivamente quando le strutture legnose sono ormai compromesse e rappresentano l'elemento diagnostico più attendibile ma...

**SIA LA COMPARSA DI CARPOFORI SUL TRONCO,  
SIA LE LORO DIMENSIONI NON SONO  
CORRELABILI ALL'ESTENSIONE DELLA CARIE  
INTERNA**



consentendo, comunque,  
di fornire importanti  
indicazioni sul diverso  
grado di pericolosità per  
la stabilità della pianta

# PROBLEMATICHE DELL'AFFIORAMENTO DI CORPI FRUTTIFERI

Scarsa conoscenza dei  
funghi lignicoli



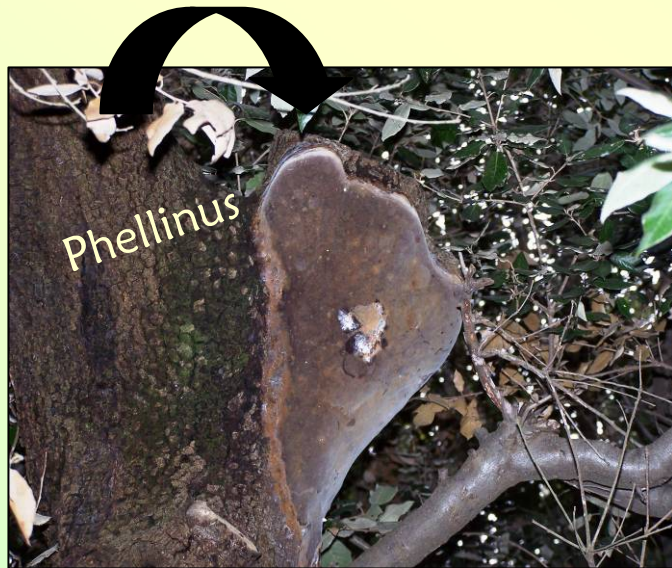
Individuazione:  
fruttificazione poco  
frequente

Localizzazione  
del punto di  
affioramento



Identificazione del fungo: proprio comportamento  
trofico

Le fruttificazioni fungine per essere identificate richiedono una competenza micologica non usuale



La maggior parte di questi organismi è difficilmente identificabile in virtù del fatto che i corpi fruttiferi sono generalmente assenti o compaiono solo tardivamente



Chiavi di riconoscimento analitiche sono basate sulle caratteristiche macroscopiche del basidioma ma soprattutto sugli aspetti microscopici relativi ad esempio al sistema ifale, alle spore, alle strutture imeniali, oltreché sulla reazione delle strutture fungine a particolari sostanze.

### Tabella 1 – Chiave delle specie

Tra parentesi le dimensioni (cm) del basidioma. \* e \*\* indicano rispettivamente la dimensione complessiva di basidiomi multipli e lo sbalzo del pileo dei basidiomi con margine superiore ripiegato (da Gonthier e Nicolotti, 2007).

1. basidioma stipitato
  - 1.1. stipite laterale, da rudimentale a distinto
    - 1.1.1. imenoforo poroide, con pori rotondi e di piccolo diametro
      - 1.1.1.1. superficie sterile lucida, laccata, crostosa, rossastra, con zonature concentriche
        - 1.1.1.1.1. su conifere  
*Ganoderma carnosum* (4-20)
        - 1.1.1.1.2. su latifoglie  
*Ganoderma lucidum* (3-10)
      - 1.1.1.2. superficie sterile lucida ma senza zonature concentriche
        - 1.1.1.2.1. superficie sterile glabra con crosta rossastra  
*Ganoderma resinaceum* (15-50)
        - 1.1.1.2.2. superficie sterile ispida; pileo di consistenza gelatinosa o carnosa  
*Fistulina hepatica* (7-20)
    - 1.1.2. (↓) imenoforo poroide, con pori ampi, irregolari, per lo più allungati  
*Polyporus squamosus* (<50-60)
    - 1.1.3. imenoforo lamellato  
*Pleurotus ostreatus* (4-20)
  - 1.2. stipite centrale
    - 1.2.1. stipite con anello; imenoforo lamellato
      - 1.2.1.1. spore in massa (impronta) chiare; pileo umbonato; superficie sterile con o senza squame  
*Armillaria* spp. (3-13)
      - 1.2.1.2. spore in massa (impronta) brune
        - 1.2.1.2.1. lamelle dapprima biancastre, poi brunastre; pileo non umbonato  
*Agrocybe cylindracea* (3-12)
        - 1.2.1.2.2. lamelle dapprima giallo zolfo, poi verdastre; ampio anello talvolta presente sul pileo  
*Hypoloma fasciculare* (2-6)
    - 1.2.2. stipite senza anello; imenoforo da poroide a lamellato
      - 1.2.2.1. imenoforo poroide, con pori rotondi e di piccolo diametro  
*Polyporus ciliatus* (<6-8)

Diagnosi visive



## Un esempio di chiave di campo per il riconoscimento delle specie più comuni di funghi agenti di carie su piante in piedi



Gonthier P., Nicolotti G. (2007). *Così simili, così diversi. Chiave per il riconoscimento dei più comuni funghi agenti di carie. Acer 3: 47-50.*

I funghi inclusi nella chiave di riconoscimento sono stati scelti sulla base della loro frequenza e/o pericolosità su alberi in piedi.

Per la costruzione della chiave sono stati scelti solamente i caratteri evidenti da osservazioni macroscopiche dei basidiomi o dal loro sezionamento oppure il colore della massa di spore che a maturità il fungo lascia cadere



Ganoderma

A green curved arrow pointing from the text 'Ganoderma' towards the macroscopic image of the fungus.



## *I caratteri selezionati sono*

- 🍄 presenza, assenza punto d'inserzione del gambo o stipite (es. laterale o centrale);
- 🍄 la forma del basidioma (a mensola, resupinato, applanato, unguolato);
- 🍄 il tipo di imenoforo (liscio, con pori o lamelle) e il suo colore;
- 🍄 la forma dei pori e, in generale, le caratteristiche della superficie sterile;
- 🍄 l'odore e il colore della carne del basidioma o contesto (osservato anche attraverso sezioni longitudinali del corpo fruttifero).

Alcune di queste chiavi fanno riferimento a caratteristiche ecologiche dei funghi, come la preferenza d'ospite, cosa abbastanza aleatoria in quanto soltanto pochissimi funghi cariogeni sono caratterizzati da una spiccata preferenza d'ospite.



I nuovi approcci innovativi in  
Patologia Vegetale utilizzano tecniche di biologia molecolare basate  
sull'estrazione del **DNA fungino**



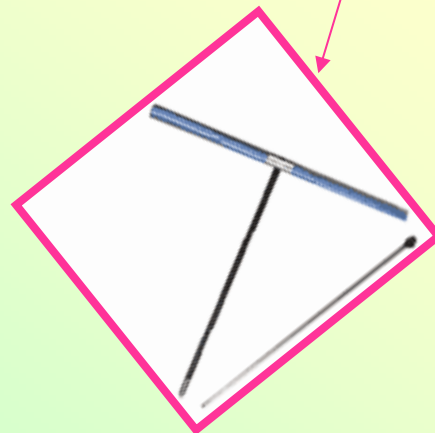
frammenti di legno cariato



campioni di segatura



isolati in piastra



carote prelevate col  
succhillo di Pressler



carpofori, anche in cattivo  
stato di conservazione

Alcuni esempi di isolati  
in piastra



*PHELLINUS*

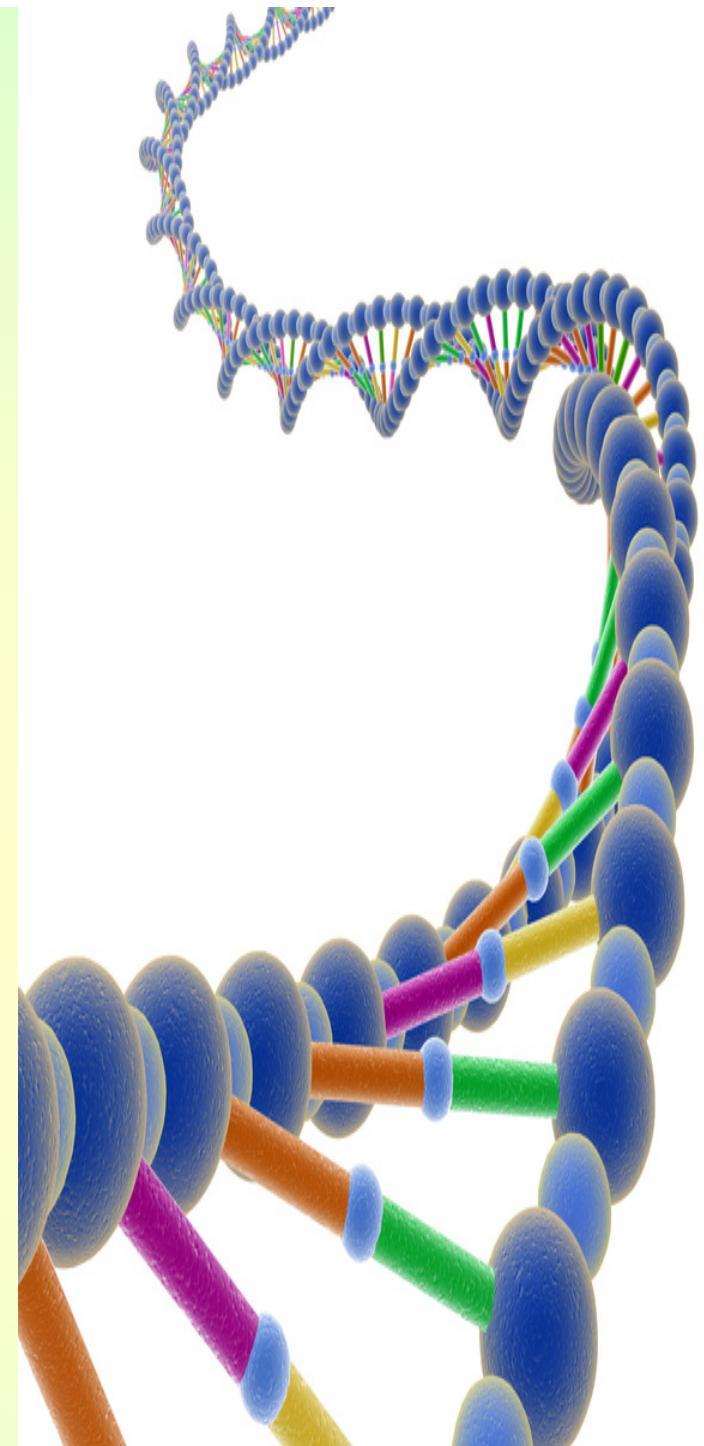
*GANODERMA*

... e di funghi su cui abbiamo lavorato



# Cosa studia la biologia molecolare?

Studia il DNA, le sue funzioni ed i prodotti ultimi delle sue attività, applicando le conoscenze che ne derivano agli aspetti tassonomici, filogenetici, fisiologici, patologici e diagnostici

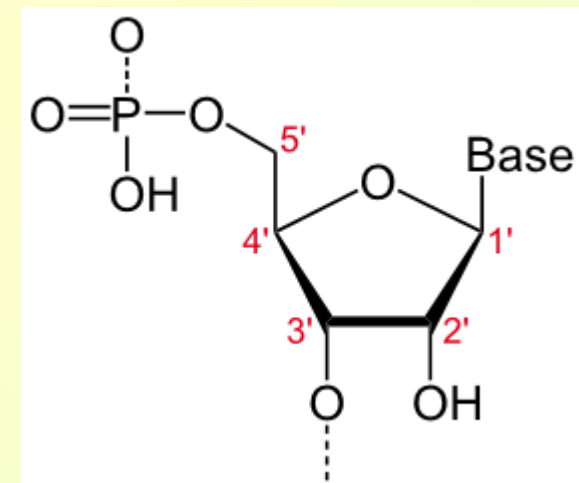
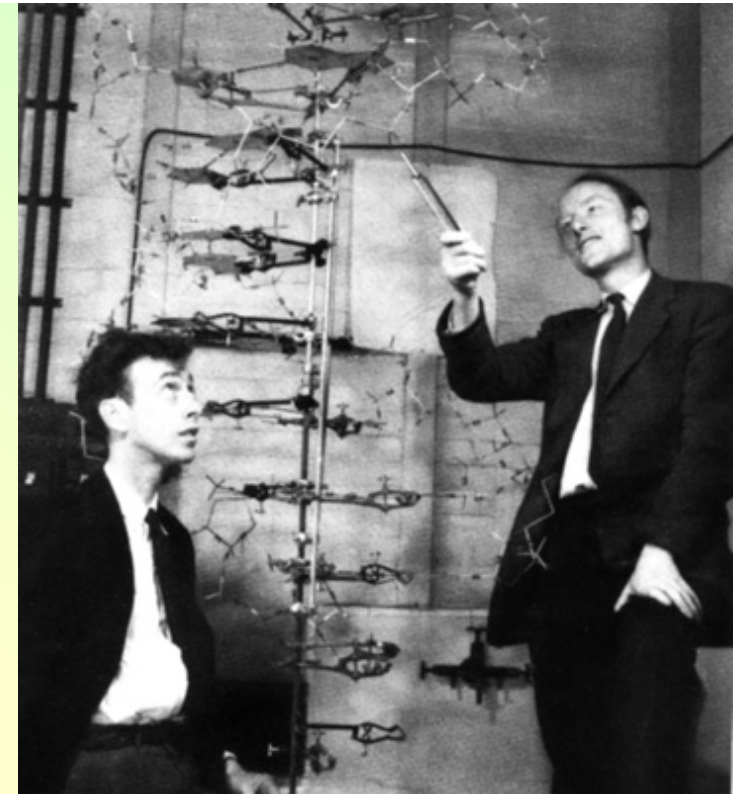


# DNA

(la cui struttura fu scoperta da Watson e Crick  
che ricevettero il Premio Nobel nel 1962)

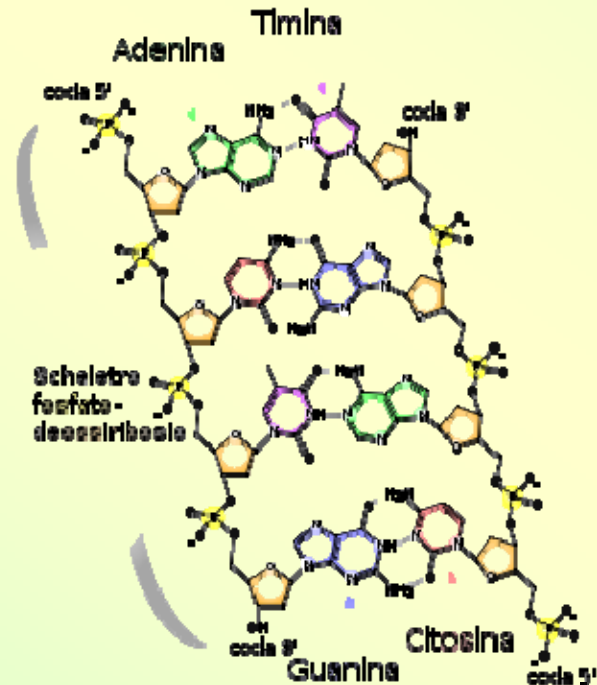
DeoxyriboNucleic Acid:

è una macromolecola  
formata da due  
filamenti antiparalleli  
(orientati in direzione  
5'-3' e 3'-5') avvolti a  
doppia elica e uniti da  
ponti idrogeno



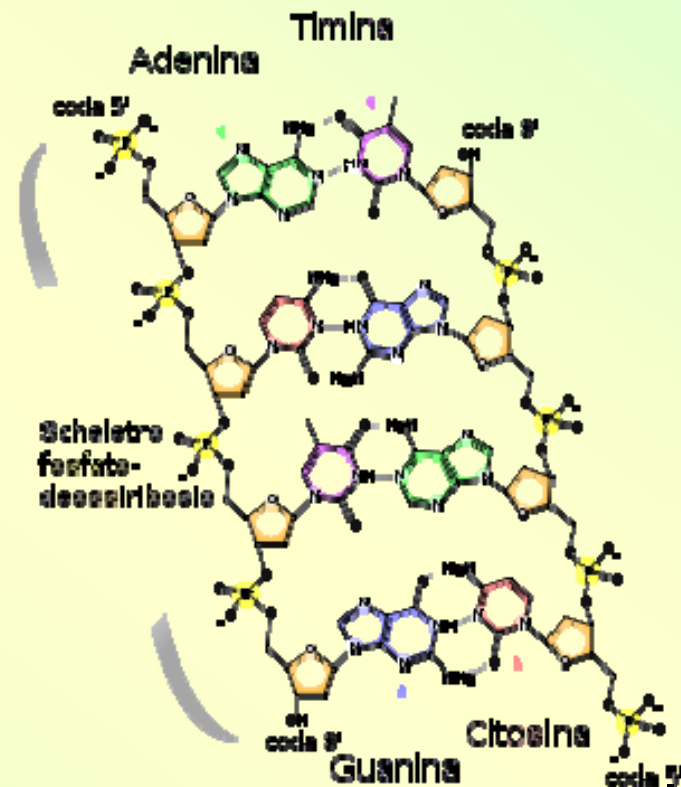
Ciascun filamento è un polimero formato dal susseguirsi di 4 monomeri chiamati **nucleotidi** a loro volta costituiti da:

- zucchero a 5 atomi di C (2'-desossi-D-ribosio);
- base azotata purinica (adenina o guanina);
- base azotata pirimidinica (timina o citosina);
- gruppo fosfato



I nucleotidi di ogni filamento di DNA sono uniti tra loro da un legame covalente che si forma tra l'acido fosforico di un nucleotide e lo zucchero del nucleotide successivo

Il DNA è organizzato in sequenze codificanti e non-codificanti e la sua unità di misura è il bp (paia di basi)



# RNA

## RiboNucleic Acid:

- zucchero è il D-ribosio;
- al posto della timina c'è l'uracile che si lega con l'adenina



## Le differenze tra DNA e RNA

	DNA	RNA
E' FORMATO DA	Doppio filamento	Singolo filamento
ZUCCHERO	2'-Desossi-D-ribosio	D-Ribosio
BASI AZOTATE	A, <u>T</u> , C, G	A, <u>U</u> , C, G
NELLE CELLULE EUCARIOTE SI TROVA	Nel nucleo	Nel nucleo e nel citoplasma

# Dogma centrale della biologia molecolare:



L'informazione genetica per la sintesi proteica è conservata nel DNA sotto forma di un codice (**codice genetico**) in cui la sequenza delle basi determina quella degli aminoacidi nella proteina codificata

# ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

L'estrazione di acidi nucleici è il primo passo nelle applicazioni di biologia molecolare.

Esiste una serie di metodi, tra i quali la scelta si effettua in base al:

- **Materiale di partenza** (organo intero, tessuto, coltura cellulare, sangue, liquido biologico)
- **Tipo di acido nucleico desiderata** (ssDNA, dsDNA, RNA)
- **Applicazione post-estrazione prevista** (PCR, sequencing, cloning, restrizione enzimatica).
- **La qualità dell'acido nucleico estratto** (quantità, purezza)

# LE NUCLEASI

Le nucleasi si trovano sulla pelle, per cui si devono evitare contatti diretti o indiretti tra mani e acidi nucleici.

## Le DNasi (enzimi che degradano DNA)

- richiedono ioni metallici per la loro attività;
- sono termolabili;
- sono **facilmente inattivate** da agenti chelanti e dalla sterilizzazione **in autoclave**.

## Le RNasi (enzimi che degradano RNA)

- ❖ non hanno virtualmente bisogno di cofattori;
- ❖ possono adsorbirsi a vetro e plastica e rimanere attive;
- ❖ sono attive entro un ampio range di pH.
- ❖ **resistono** all'ebollizione prolungata e **alla sterilizzazione in autoclave**.

# ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

Tutte le metodiche per l'estrazione di acidi nucleici utilizzano 3 fasi:

1. Una **lisi cellulare** (spesso combinata con l'inattivazione delle nucleasi cellulari)
2. La **deproteizzazione** del campione lisato
3. La **precipitazione** dell'acido nucleico

## LISI CELLULARE

Spesso la procedura di lisi è un compromesso in quanto deve essere:

- abbastanza **aggressiva** da frammentare il materiale di partenza,
- ma abbastanza **delicata** da mantenere l'integrità dell'acido nucleico.

Le tecniche comuni di lisi si distinguono in base a:

- distruzione **meccanica** (lisi ipotonica);
- trattamenti **chimici** (lisi con detergenti);
- digestione **enzimatica** (lisi con enzimi).

# REAGENTI UTILIZZATI PER LA LISI

## Detergenti

Promuovono la rottura della membrana cellulare e dissociano le proteine dagli acidi nucleici.

(Nonidet-P40, Tween 20, Sodium Dodecyl Sulfate).

## Enzimi

Degradano le proteine di membrana e anche le nucleasi cellulari. (Proteinasi K, Proteasi).

Le moderne soluzioni di lisi usano una combinazione di detergenti e proteinasi K che ne aumenta l'efficacia.

## DEPROTEINIZZAZIONE

- Dopo la rottura delle pareti cellulari e della membrana plasmatica e separazione della frazione solubile da quella insolubile, si otterrà una **miscela complessa** costituita da varie componenti cellulari come **DNA, RNA, lipidi, mono e polisaccaridi, proteine, e sali.**
- La **rimozione delle proteine** dal lisato cellulare è particolarmente importante sia perché tra le proteine sono presenti enzimi capaci di degradare gli acidi nucleici, sia per la presenza di proteine capaci di legarsi agli acidi nucleici **impedendone la funzione e/o la purificazione.**

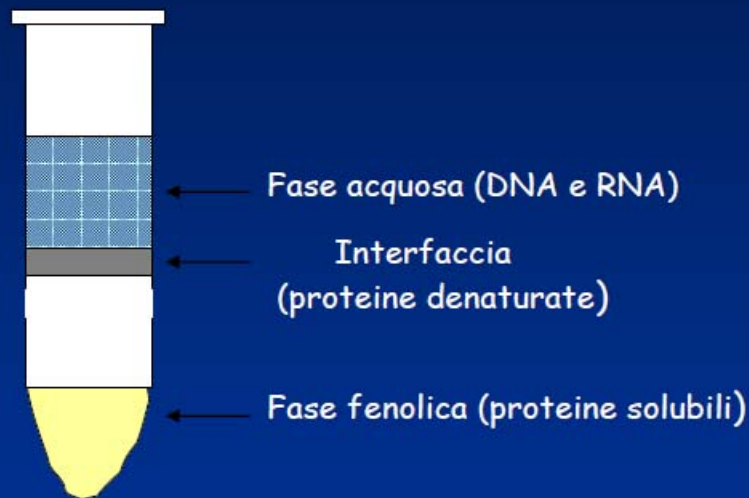


## DEPROTEINIZZAZIONE

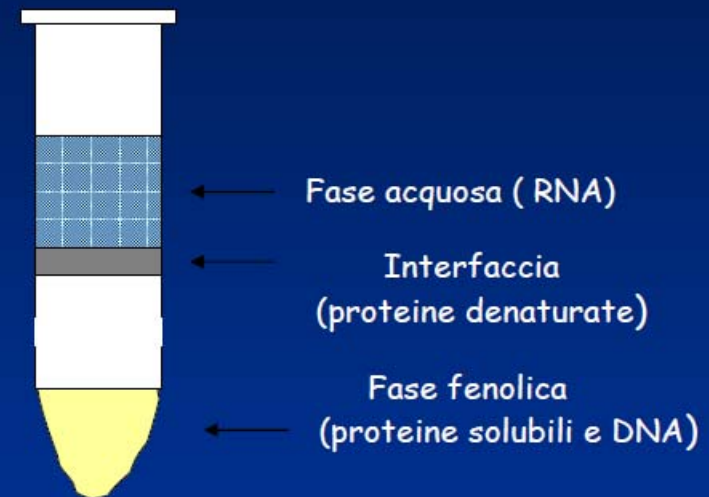
- Rimozione delle proteine dalla soluzione di acidi nucleici.
- Il metodo tradizionale prevede prima un trattamento con **fenolo/cloroformio/alcool isoamilico** (49:49:1) e poi con **cloroformio/alcool isoamilico** (49:1).
  - ❖ È più efficiente se si utilizzano **due solventi organici** anziché uno.

# DEPROTEINIZZAZIONE

pH neutro o alcalino



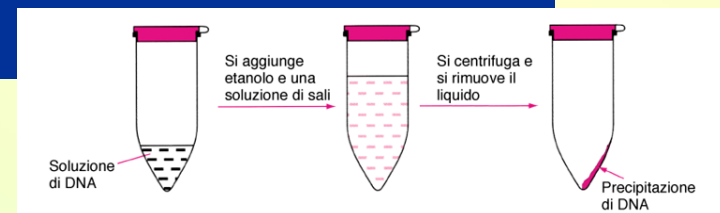
pH acido



E' importante rimuovere ogni traccia di fenolo estraendolo con cloroformio e, in qualche caso estraendo anche eventuali tracce di cloroformio con etere, che, infine verrà eliminato per evaporazione.

# PRECIPITAZIONE

- Gli acidi nucleici precipitano in presenza di **etanolo**.
- Se la quantità di acido nucleico è bassa, un **carrier inerte (glicogeno)** può essere aggiunto per migliorare l'efficienza della precipitazione.
- la maggior parte delle proteine sono insolubili in alcol e co-precipiterebbero in larga misura con gli acidi nucleici se non fossero preventivamente rimosse
- L'**isopropanolo** può essere usato per precipitare il DNA, ma tende a co-precipitare i sali ed è più difficile da eliminare, perché è meno volatile dell'etanolo.
- Generalmente si usano 2 volumi di etanolo a (15' a -20°C) o 0.7 volumi di isopropanolo (5' a temperatura ambiente).



# REAGENTI PER LA PURIFICAZIONE DI DNA

Fenolo pH8	Rimuove le proteine presenti nel lisato
Cloroformio	Migliora l'efficienza dell'estrazione di proteine ed eliminare tracce di fenolo da soluzioni di DNA diluito in acqua
Isoamilico	Crea un'interfase tra la fase acquosa contenente DNA ed il fenolo
Acetato di sodio	Precipita il DNA
Etanolo assoluto	Precipita il DNA
H <sub>2</sub> O distillata	H <sub>2</sub> O sterile autoclavata per inattivare DNAsi

Il DNA estratto può essere conservato a 4°C per tempi brevi o a -70°C per periodi più lunghi.



## **ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCEICI MEDIANTE ADSORBIMENTO SU SILICE**

### **VANTAGGI**

- Estrazioni ottenute in tempi ridotti
- Protocolli facili da seguire
- DNA altamente purificato
- Non prevede l'utilizzo di solventi organici
- Gli inibitori della PCR sono completamente rimossi

### **SVANTAGGI**

- Costi alti per campione rispetto alle procedure tradizionali

# Protocollo di estrazione del DNA

CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*)  
che forma un complesso insolubile con gli acidi nucleici.

*CTAB buffer*  
2% CTAB  
100 mM TrisHCl [pH=8]  
20 mM EDTA,  
1.4 M NaCl  
0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol [before use]  
0.1 mg/mL proteinase K [before use]

Il protocollo è basato su tre fasi:

**LISI:** per lisare la membrana cellulare, il campione viene trattato con un buffer d'estrazione costituito da CTAB, EDTA, Tris HCl. Questo buffer d'estrazione ha anche la funzione di catturare i lipidi e le proteine che costituiscono la membrana cellulare e nucleare. Con NaCl, contenuto sempre nel buffer, si forma un complesso insolubile con il DNA.

**ESTRAZIONE:** in questa fase sono eliminati i polisaccaridi, le proteine ed altri lisati cellulari disciolti in soluzione. Ulteriori residui vengono lavati con cloroformio:

è in grado di denaturare le  
proteine e facilitare la separazione tra fase  
acquosa e fase organica.

**PRECIPITAZIONE:** in questa fase il DNA viene lavato  
con detergenti.

Il DNA viene poi risospeso in acqua.

## Quantificazione del DNA estratto



La purezza del DNA è normalmente determinata sulla base del rapporto (260/280), contro la lettura del bianco.

260 nm è approssimativamente la media delle assorbanze delle quattro basi del DNA. Il DNA puro è caratterizzato dall'assenza di contaminazioni, quali possono essere le proteine o i reagenti usati in fase d'estrazione. ***Un DNA puro mostra un rapporto  $A_{260} / A_{280}$  di circa 1,8.*** Più il rapporto si avvicina a 2 - 2,2 maggiore è la contaminazione con RNA; valori inferiori a 1,8 mostrano invece contaminazione da proteine.

# Materiale di partenza

Frammento di micelio



lizzato in modo da ottenere il DNA genomico mediante il metodo CTAB (*Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide*)



Legno



Incubato su substrati selettivi per permettere l'isolamento di eventuali miceti agenti di carie

I miceli ottenuti sono trasferiti su PDA (*Potato Dextrose Agar*) e MA (*Malt Agar*) per ottenere le colture in purezza

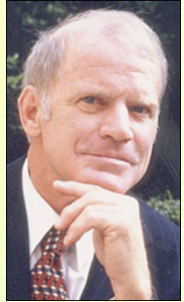
Estrazione con *kit* selettivi per il DNA di patogeni fungini



Il DNA ribosomiale viene amplificato mediante la reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*).



# PCR → Polymerase Chain Reaction



E' una tecnica relativamente che ha rivoluzionato la biologia molecolare.

Ideata da Kary Mullis intorno ai primi anni '80 (in medicina umana per la diagnosi prenatale di anemia falciforme mediante l'amplificazione del gene  $\beta$ -globina), è stata perfezionata e automatizzata al punto da sostituire molte tecniche di clonaggio tradizionale.

Numerosi varianti della PCR base trovano applicazioni, tra l'altro, nella ricerca di base, in diagnostica molecolare e in ambito forense

# PCR

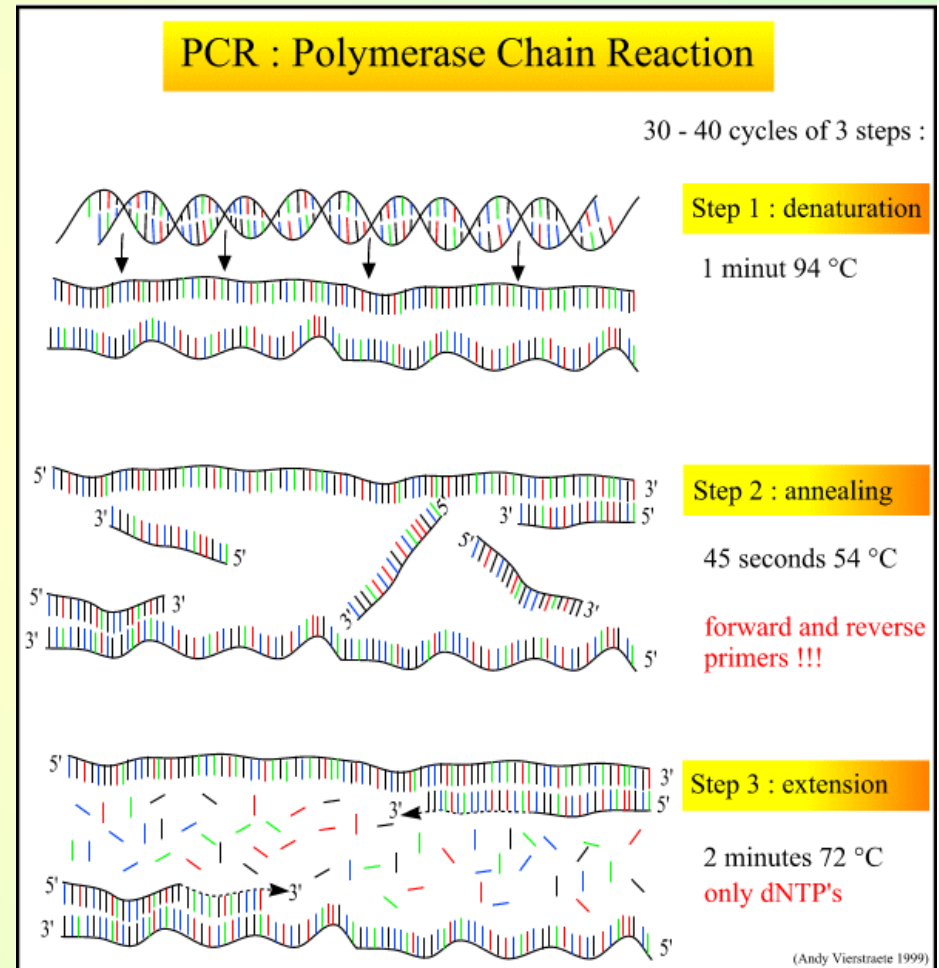
Questa tecnica è estremamente specifica e sensibile in quanto permette :

- l'amplificazione e l'identificazione di tratti genomici propri di un determinato agente fungino;
- l'uso di campioni biologici contenenti un numero esiguo di molecole bersaglio

# L'ABC della PCR



La tecnica della PCR si basa sulla amplificazione di specifici frammenti di DNA a doppia catena, compresi tra le estremità 5' di due "primers" definiti dallo sperimentatore, mediante la ripetizione di un numero "n" di cicli ciascuno dei quali consta di una tappa di denaturazione, una di appaiamento ed una di estensione.



# *Primer*

Generalmente sono di lunghezza compresa tra 18 e 25 bp. Vengono sintetizzati da ditte specializzate in base alla sequenza di DNA alla quale si devono appaiare.

Il *forward* ha una sequenza identica a quella 5'-3' del DNA sottoposto a PCR (*template*)

Il *reverse* presenta una sequenza complementare

# PRIMER UTILIZZATI

**Table 2** Primer sequences, priming regions, melting temperatures and target amplicon size for taxon-specific PCR of wood rot fungi

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')	Tm*	Gene Region	Use in taxon-specific PCR	PCR product size (bp)	Identified taxon	Reference
Armi2R	AAACCCCATATAATCCAATCC	56°C	ITS II	Reverse primer with the forward ITS3	185	<i>Armillaria</i> spp.	This study
Gano2R	TATAGAGTTGTGATAAACGCA	55°C	ITS I	Reverse primer with the forward ITS1-F	226–228	<i>Ganoderma</i> spp.	This study
Heri2R	CAGCCCTGTCCGGCAGT	61°C	nuc LSU	Reverse primer with the forward 25sF	200	<i>Hericium</i> spp.	This study
Hyme2R	TGDCDCCTYGGCGAG	60/64°C	nuc LSU	Reverse primer with the forward F115	111	<i>Inonotus/Phellinus</i> -group	This study
HypoR	GCTACGCTTAGGGGATGCTA	60°C	ITS II	Reverse primer with the forward ITS3	219	<i>H. thouarsianum</i> var. <i>thouarsianum</i>	This study
LaetR	CCGAGCAAACGAATGCAA	54°C	nuc LSU	Reverse primer with the forward 25sF	146	<i>Laetiporus</i> spp.	This study
PerR	ATCTGCAAAGACCGTAAGGT	60°C	ITS II	Reverse primer with the forward ITS3	152	<i>P. fraxinea</i>	This study
Pleu2R	AACCAGGAAGTACGCCTCAC	60°C	nuc LSU	Reverse primer with the forward 25sF	158	<i>Pleurotus</i> spp.	This study
Schi2R	CTCCAGCAGACCTCCACTTC	63°C	ITS II	Reverse primer with the forward ITS3	190	<i>Schizophyllum</i> spp.	This study
Ste2R	GTCGCAACAAGACGCACTAA	58°C	ITS II	Reverse primer with the forward ITS3	231–236	<i>Stereum</i> spp.	This study
TraR	TTCATAGTCTTATGGAAACCGC	58°C	mt SSU	Reverse primer with the forward MS1	220	<i>Trametes</i> spp.	This study
25sF	TGGCGAGAGACCGATAGC	58°C	nuc LSU	Forward			This study
F115	TAAGCGACCCGCTTTGAAAC	58°C	nuc LSU	Forward			This study
ITS1-F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	55°C	nuc LSU	Forward			Gardes and Bruns (1993)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	60°C	5-8S	Forward			White <i>et al.</i> (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATGATATGC	56°C	nuc LSU	Reverse			White <i>et al.</i> (1990)
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	61°C	mt SSU	Forward			White <i>et al.</i> (1990)

\*Tm indicates the salt-adjusted melting temperature (see Howley *et al.* 1979).

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

## ORIGINAL ARTICLE

# A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees

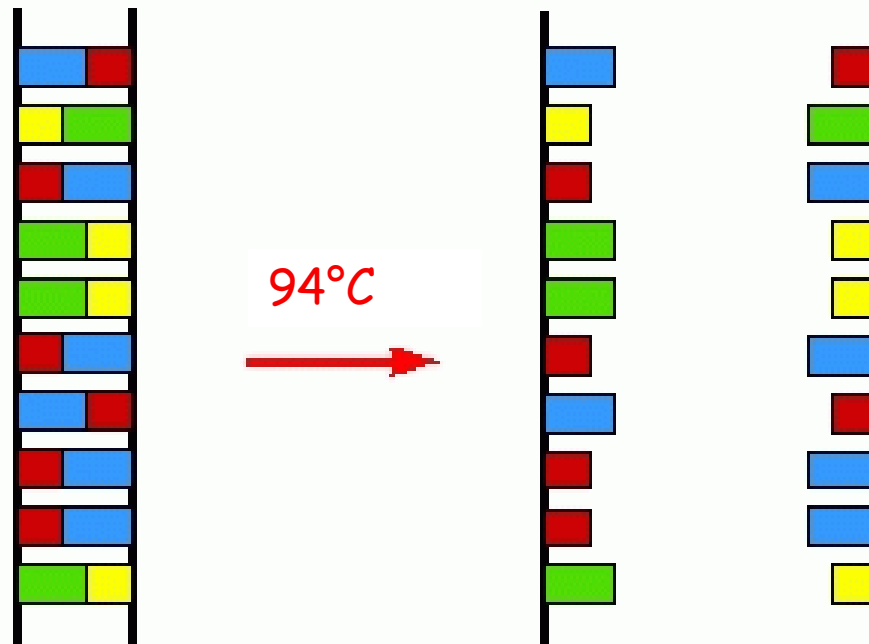
F. Guglielmo<sup>1</sup>, S.E. Bergemann<sup>2</sup>, P. Gonthier<sup>1</sup>, G. Nicolotti<sup>1</sup> and M. Garbelotto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Exploitation and Protection of Agricultural and Forestry Resources, Plant Pathology, University of Torino, Grugliasco, Italy

<sup>2</sup> Ecosystem Sciences Division, Department of Environmental Science, Policy and Management, University of California Berkeley, California, USA

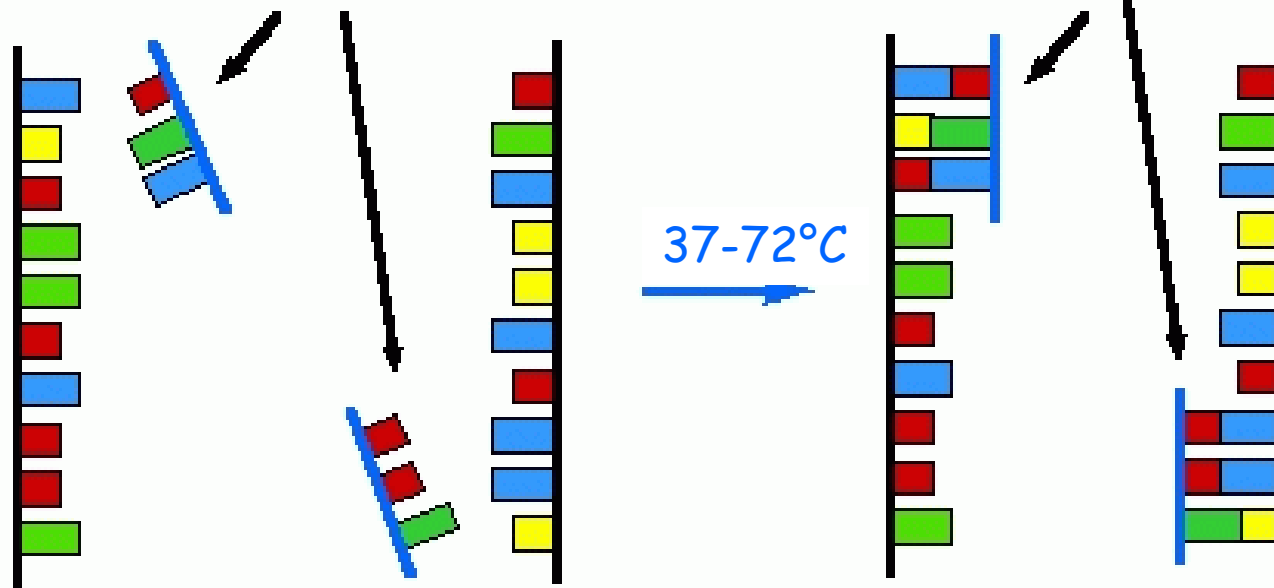
fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



fase 2: ANNEALING

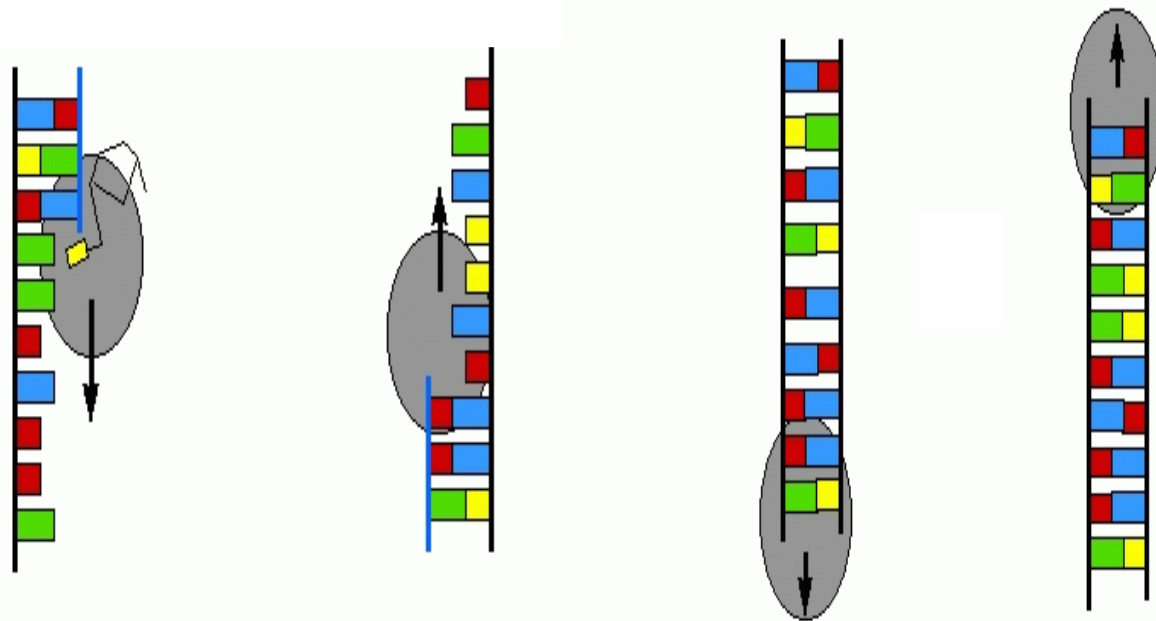
I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo



fase 3:

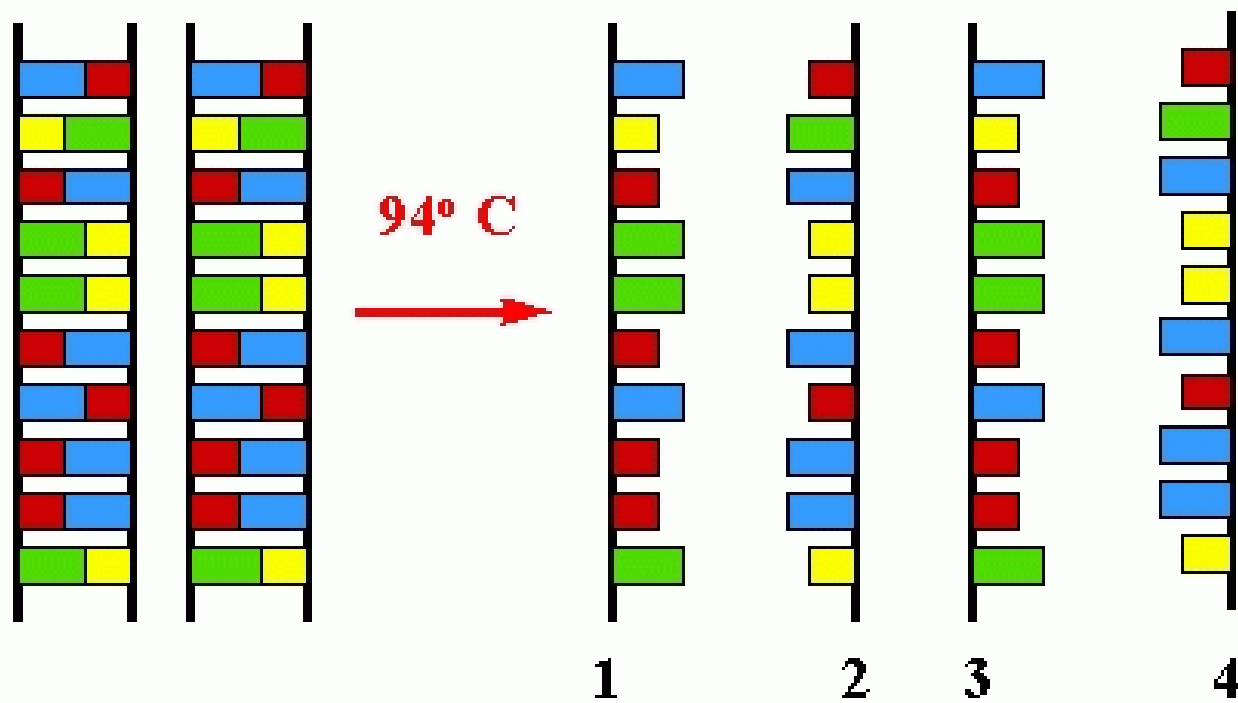
## ESTENSIONE

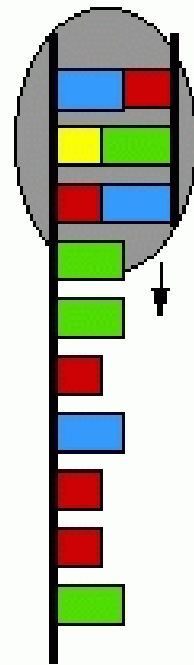
La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce  
2 nuove catene di DNA



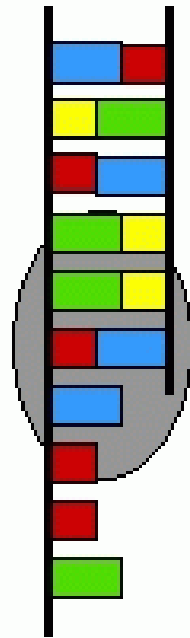


## IL PROCESSO SI RIPETE

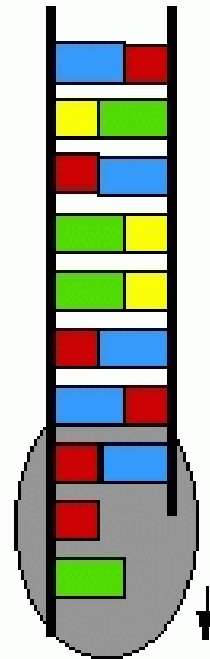




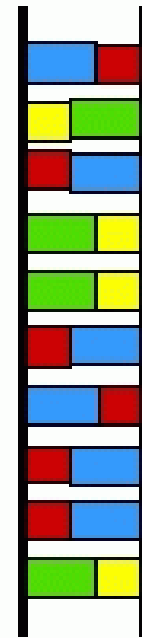
1



2



3



4

Ad ogni ciclo il numero di molecole di DNA "copiato" raddoppia

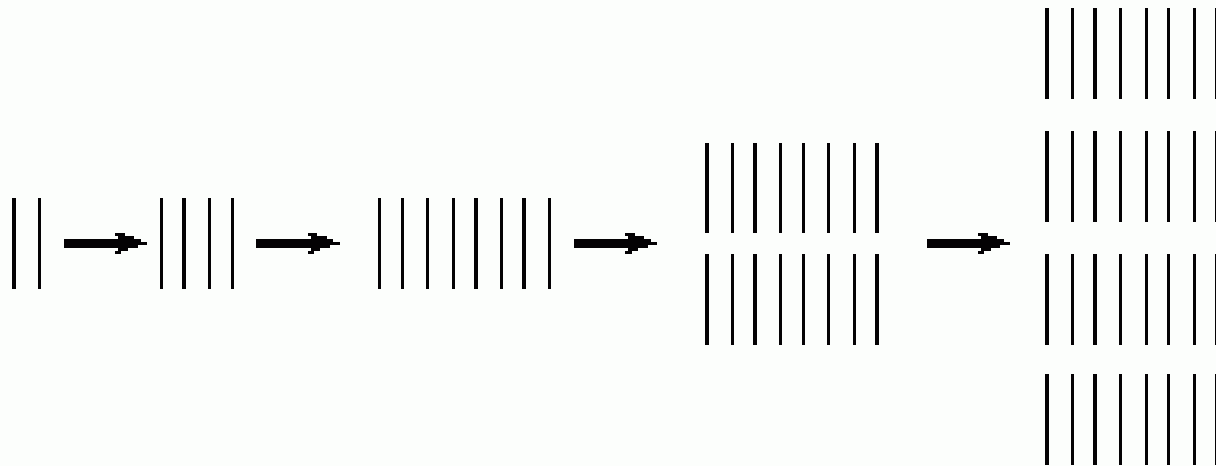
**1**

**2**

**3**

**4**

**5**



# Resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA

---

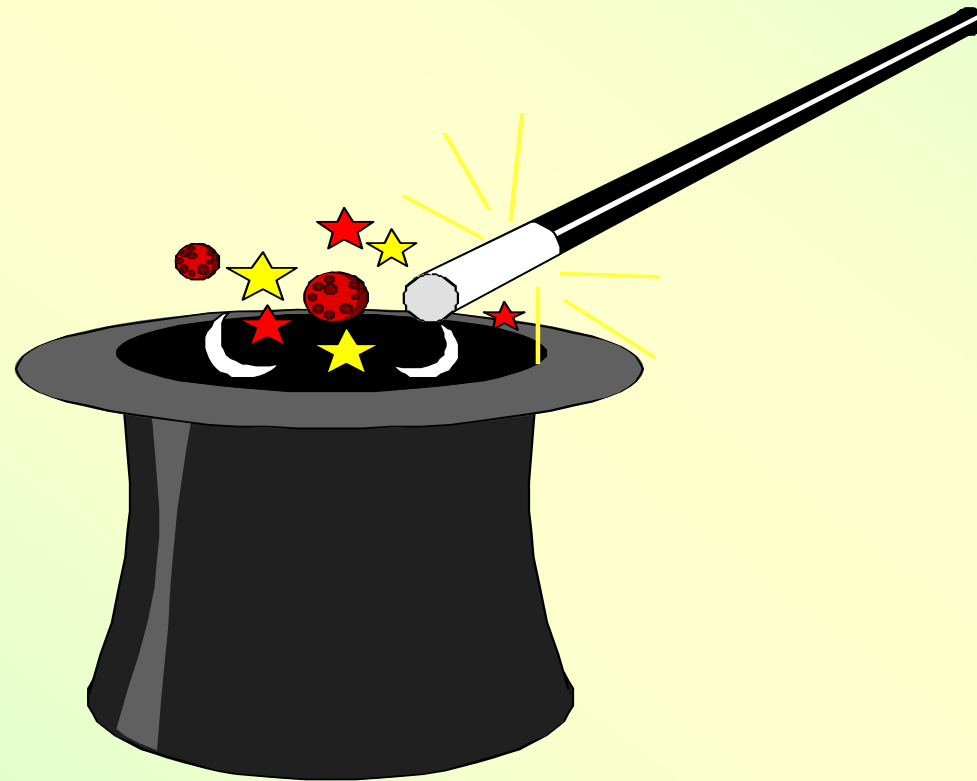
Numero di cicli	Numero di molecole di amplificati
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824

$$Y = N2^n$$

Y= numero molecole di DNA amplificato  
N= numero molecole di DNA di partenza  
n= numero dei cicli di PCR

cosa occorre!

---



- Sequenza da amplificare
- NTP (deossiribonucleotidi trifosfati, come ATP, CTP, GTP, TTP che forniscono le basi azotate per la sintesi del DNA)
- Primer forward e reverse* (sequenze complementari agli estremi della sequenza da amplificare)
- DNA polimerasi (la Taq è estratta da un batterio termofilo, *Thermophilus aquaticus*, in grado di non denaturarsi ad alte temperature)
- Buffer* (i tamponi necessari per la reazione di elongazione)

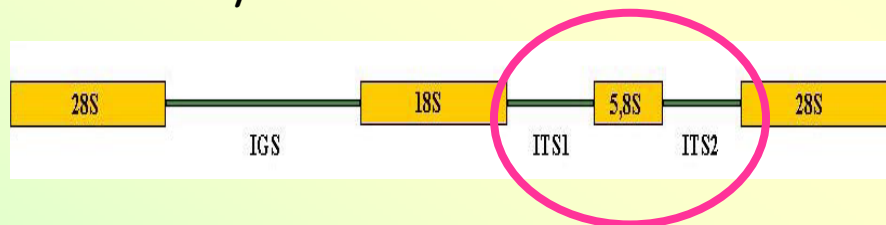


Regioni amplificate: ITS1 e ITS2 ed il gene 5,8S, mediante l'utilizzo del *forward primer* ITS1 ed il *revers primer* ITS4

ITS1: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3'  
ITS4: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'

Perché si usano le regioni l'ITS non codificanti:

1. sono soggette ad alta variabilità di sequenza e quindi utili negli studi evolucionistici;
2. la loro localizzazione tra regioni conservate (18S e 28S) permette l'utilizzo di *primers* universali.



*Internal Transcribed Spacer*

condizioni di reazione:

- ✓ denaturazione a 95 °C per 3 min;
- ✓ 35 cicli (95 °C per 15 s, 55 °C per 20 s e 72 °C per 1 min);
- ✓ *step* a 72 °C per 5 min.

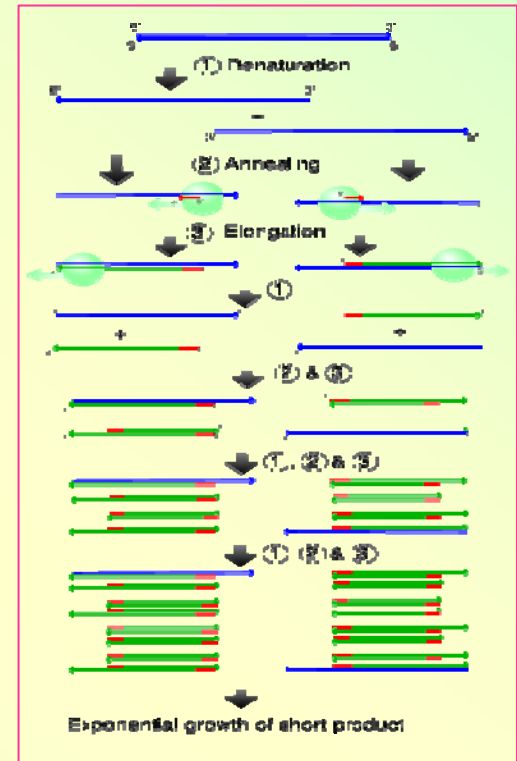
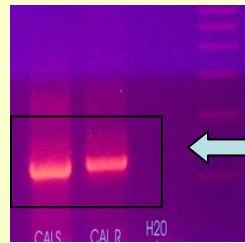


Il DNA amplificato viene corso su *gel* di agarosio e una volta identificata la banda desiderata viene prelevato dal *gel* il frammento e purificato utilizzando *kit* di purificazione *standard*

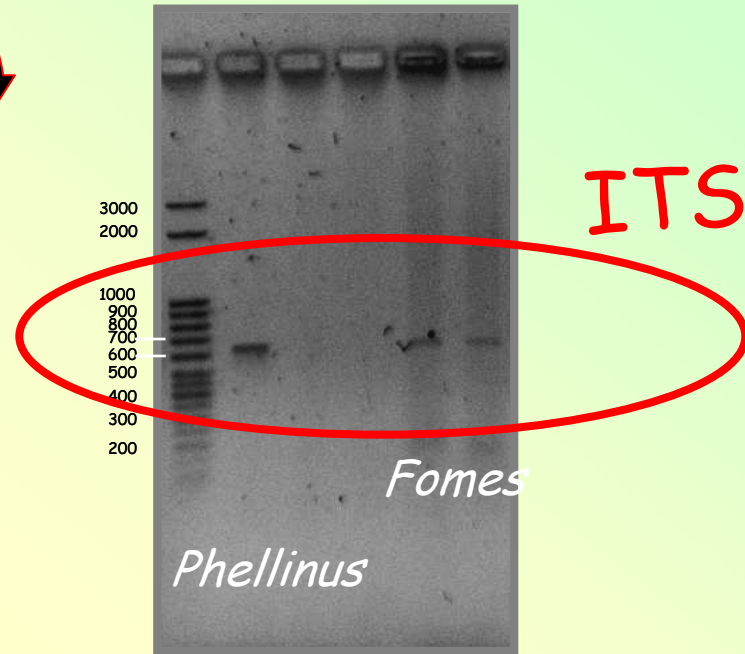
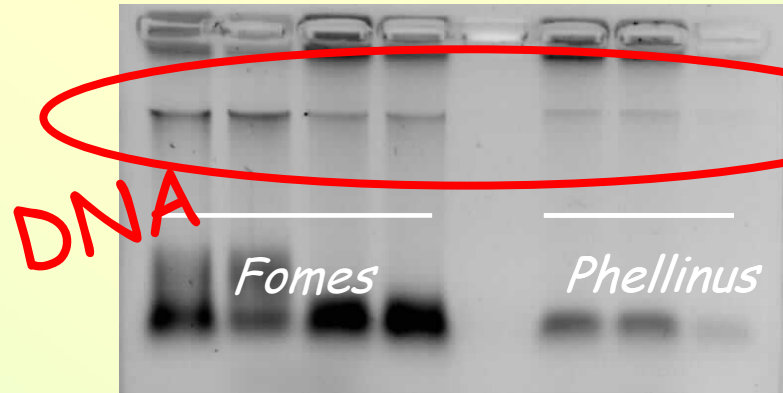
### Purificazione



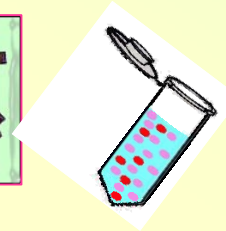
### Corsa elettroforetica







Purificazione



Le sequenze ottenute vengono analizzate, confrontandole con quelle presenti nelle banche dati internazionali, per giungere all'identificazione del genere di fungo isolato

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## Una nostra sequenza:

TGCTGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTGGGATTT  
CAGGTGCGTCGCTTTGCGGCGGCCTCACTCGGCCACGTTTTCTTTACAACTATTGAAGTAACAGAATGTTTATTGATG  
TAACGCATCTATAATACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT  
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG  
TTTGAGTGCATGAAATTCTCAACCTATAAACTTTTGCGGTTTGTAGGGTTGGCTATTGGAGGCTTTTGGCTGGCCCTCG  
TTTGAGTCAGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTTGGTTCCTTGC GGATCGGCTGTGGTGTGATAATGTCTACGCCGCGACC  
GTGAAGCGTTTGGAGAGCTTCTAATGGTCTCGTCAGAGACAGCTTTTATGAACTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACC  
CGCTGAACTTAAGCATAACAAAAAANAAGAAAATTTTTTTT

The screenshot shows the NCBI GenBank entry for Fomes fomentarius isolate AF10. The accession number JF927882.1 is circled in red. The entry includes the following information:

**LOCUS** JF927882 604 bp DNA linear PLN 28-AUG-2011  
**DEFINITION** Fomes fomentarius isolate AF10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
**ACCESSION** JF927882  
**VERSION** JF927882.1 GI:344050156  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Fomes fomentarius  
**ORGANISM** Fomes fomentarius  
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;  
Agaricomycetes; Polyporales; Fomes.  
**REFERENCE** 1 (bases 1 to 604)  
**AUTHORS** Francini,A., Lorenzini,G. and Nali,C.  
**TITLE** Molecular identification of Fomes fomentarius on Quercus ilex  
**JOURNAL** Unpublished



Altre metodiche di  
PCR impiegate

## *Multiplex - PCR*

Prevede l'utilizzo simultaneo di due o più coppie di *primers* che amplificano due o più tratti di DNA bersaglio appartenenti allo stesso fungo od a funghi differenti

Primers specifici vengo disegnati sulla sequenza ottenuta al fine di riconoscere i funghi a livello di genere poiché, di norma, tale livello è sufficiente per mettere a punto un piano di gestione preventiva del rischio, oppure a livello di specie per quei taxa che hanno al loro interno specie con diversa aggressività (es. *Ganoderma* spp., *Inonotus* spp., *Phellinus* spp.)

Reazione di replicazione del DNA nella quale vengono utilizzati più set di primers

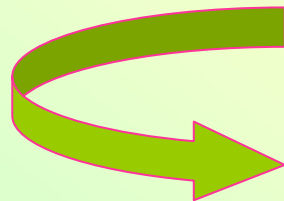
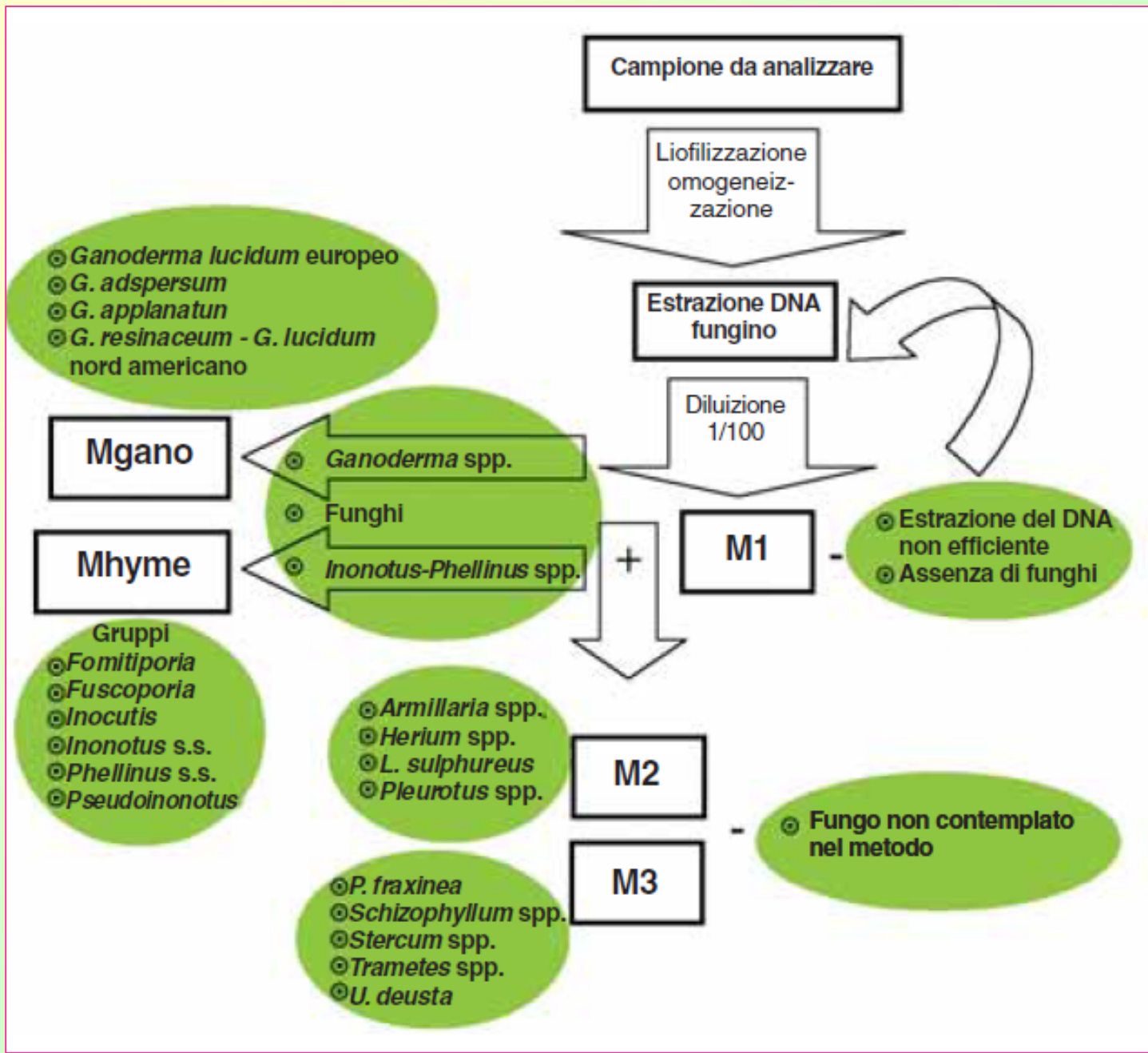


TABELLA 1 - LE CICLIE FAS DELL'ANALISI MULTIPLEX PCR E LE SPECIE FUNGHE IDENTIFICABILI

# Multiplex PCR

Multiplex PCR	Dimensione della banda/ taxon identificabile	Specie diagnosticabili
M1	600-850 bp/ presenza di funghi 226-228 bp/ <i>Ganoderma</i> spp.  111 bp/ <i>Inonotus</i> spp.- <i>Phellinus</i> spp.	- <i>G. adspersum</i> , <i>G. applanatum</i> , <i>G. lucidum</i> , <i>G. resinaceum</i> <i>I. andersonii</i> , <i>I. dryophilus</i> ; <i>I. dryadeus</i> , <i>I. hispidus</i> , <i>I. radiatus</i> , <i>I. tamaricis</i> , <i>P. gilvus</i> , <i>P. igniarius</i> , <i>P. pini</i> , <i>P. punctatus</i> , <i>P. robustus</i> , <i>P. torulosus</i> , <i>P. tremulae</i> , <i>P. tuberculosus</i>
M2	185 bp/ <i>Armillaria</i> spp. 146 bp/ <i>Laetiporus sulphureus</i> 158 bp/ <i>Pleurotus</i> spp. 200 bp/ <i>Hericiium</i> spp.	<i>A. gallica</i> , <i>A. mellea</i> , <i>A. nabsnona</i> <i>L. sulphureus</i> <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i> <i>H. coralloides</i> , <i>H. erinaceum</i>
M3	152 bp/ <i>Perenniporia fraxinea</i> 190 bp/ <i>Schizophyllum</i> spp. 231-236 bp/ <i>Stereum</i> spp.  260 bp/ <i>Ustulina deusta</i> 220 bp/ <i>Trametes</i> spp.	<i>P. fraxinea</i> <i>S. commune</i> , <i>S. radiatum</i> <i>S. hirsutum</i> , <i>S. rugosum</i> , <i>S. sanguinolentum</i> <i>U. deusta</i> <i>T. cervina</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>T. zonatella</i>
Mgano	211 bp/ <i>Ganoderma adspersum</i> 200 bp/ <i>Ganoderma applanatum</i> 193 bp/ <i>Ganoderma lucidum</i> 178 bp/ <i>Ganoderma resinaceum</i>	<i>G. adspersum</i> <i>G. applanatum</i> <i>G. lucidum</i> (provenienza europea) <i>G. resinaceum</i> , <i>G. lucidum</i> (provenienza nord americana)
Mhyme	258 bp/ <i>Fomitiporia</i> 225 bp/ <i>Fuscoporia</i> 254 bp/ <i>Pseudoinonotus</i> 265 bp/ <i>Inocutis</i> 214 bp/ <i>Inonotus</i> s.s. 173 bp/ <i>Phellinus</i> s.s.	<i>P. punctatus</i> , <i>P. robustus</i> <i>P. gilvus</i> , <i>P. torulosus</i> <i>I. dryadeus</i> <i>I. dryophilus</i> <i>I. andersonii</i> , <i>I. hispidus</i> <i>P. igniarius</i> , <i>P. tremulae</i> , <i>P. tuberculosus</i>

Nota: bp = paia di basi (unità di dimensione delle catene di DNA).



# ...si può usare anche la RT PCR

## ANALISI DI MELTING (analisi di dissociazione)

### Validation of a real-time PCR method for the detection of *Phytophthora ramorum*<sup>1</sup>

A. Chandelier<sup>1</sup>, K. Ivors<sup>2</sup>, M. Garbelotto<sup>3</sup>, J. Zini<sup>1</sup>, F. Laurent<sup>1</sup> and M. Cavelier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wallon Agricultural Research Centre, Department of Biological Control and Plant Genetic Resources, rue de Lioux, 4, B-5030 Gembloux (Belgium); e-mail: chandelier@era.wallonie.be

<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, North Carolina State University, 455 Research Drive, Fletcher, North Carolina 28732 (USA)

<sup>3</sup>Ecosystem Sciences Division, ESPM, University of California, 151 Hilgard Hall #3110, Berkeley, California 94720 (USA)



Questi metodi si basano sulla emissione di un segnale fluorescente che avviene in maniera specifica e proporzionale alla quantità di amplificato che si forma

Alla fine dei cicli di amplificazione si fa la cosiddetta analisi di *melting* che consiste in un incremento progressivo della temperatura (da 45°C a 99°C )

Aumentando progressivamente la temperatura si arriva ad un punto (temperatura di *melting*) in cui la sonda sensore si stacca dall'amplificato.

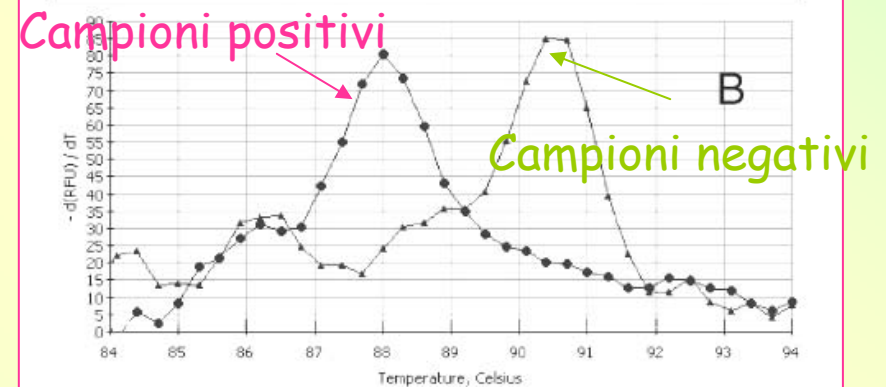
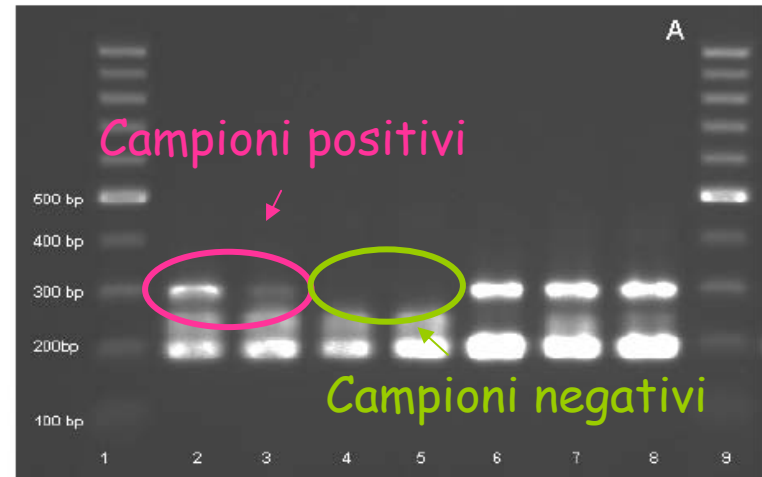


Fig. 1. Detection of *Phytophthora ramorum* by nested polymerase chain reaction with Phyto and 28S primer sets. The Phyto2/Phyto3 amplicon is 291 bp; 28S/28F is at 191 to 194 bp. A, results visualized by gel electrophoresis: lanes 1 and 9, 100-bp size standard; lanes 2 to 3, foliar samples positive for *P. ramorum*; lanes 4 to 5, foliar samples negative for *P. ramorum*, but positive for 28S, indicating successful DNA extraction; lane 6, *P. ramorum* DNA (0.2 ng/ $\mu$ l), lane 7, *P. ramorum* DNA ( $2.6 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ l); lane 8, *P. ramorum* DNA ( $1.3 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ l). B, Results visualized by melt temperature, as reflected in fluorescence. Circles: foliar sample positive for *P. ramorum*. Triangles: foliar sample negative for *P. ramorum*, but positive for 28S.