




UNIONE EUROPEA
Fondo sociale Europeo



"Reti di laboratori Pubblici di Ricerca"
FESR 2007-2013, Asse I, Linea 1.2 - PO Puglia FSE 2007-2013 Asse IV
Intervento "Reti di Laboratori Pubblici di Ricerca"
Progetti cod. 14 - SELGE



REGIONE PUGLIA
Assessorato Sviluppo Economico
e Innovazione Tecnologica
Settore Industria-Industria Energetica

 Consiglio Nazionale delle Ricerche
Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante
UOS Bari



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
SUOLO, DELLA PIANTA E DEGLI

Prot. Selge 76/2015

Bari, 7/05/2015

Al Servizio Fitosanitario Regione Liguria
Dipartimento Agricoltura, Sport, Turismo e Cultura
Settore Fitosanitario Regionale
Viale Brigate Partigiane, 2 - 2p
16129 Genova

Al Servizio Fitosanitario Centrale
Dr. B. Faraglia
c/o MiPAAF
Via XX Settembre, 20
00187 Roma

p.c.
Al Dirigente Responsabile del Servizio Fitosanitario
Regione Puglia
Dott. Silvio Schito
Lungomare N. Sauro, 45/46
70121 BARI

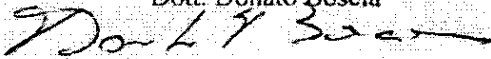
Oggetto: Saggi diagnostici per *Xylella fastidiosa* su campione sospetto di olivo.

Con la presente si trasmette il report diagnostico relativo al campione di DNA ricevuto dal Servizio Fitosanitario della Regione Liguria con nota PG/2015/82776.

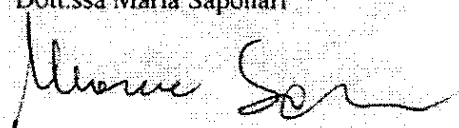
Come si evince dall'allegato, il campione a noi pervenuto ed identificato con la sigla "Liguria" è risultato negativo al saggio molecolare effettuato con tre diverse coppie di primers ed in due test indipendenti.

Restando a disposizione per qualsiasi ulteriore informazione, si porgono cordiali saluti.

Il Responsabile IPSP-CNR UOS Bari
Dott. Donato Boscia



Il Responsabile delle Analisi
Dott.ssa Maria Saponari



Report diagnostico

Accertamento della presenza di *Xylella fastidiosa*

- Data avvio analisi: 6/5/2015
- Data completamento analisi: 7/5/2015
- **Campione soggetto ad analisi:** N. 1 campione di DNA ricevuto dal Servizio Fitosanitario della Regione Liguria con nota PG.2015.82776 del 04/05/2015, ed identificato come campione "Liguria"

1) controllo della qualita' del DNA. Metodo utilizzato: analisi allo spettrofotometro NANODROP

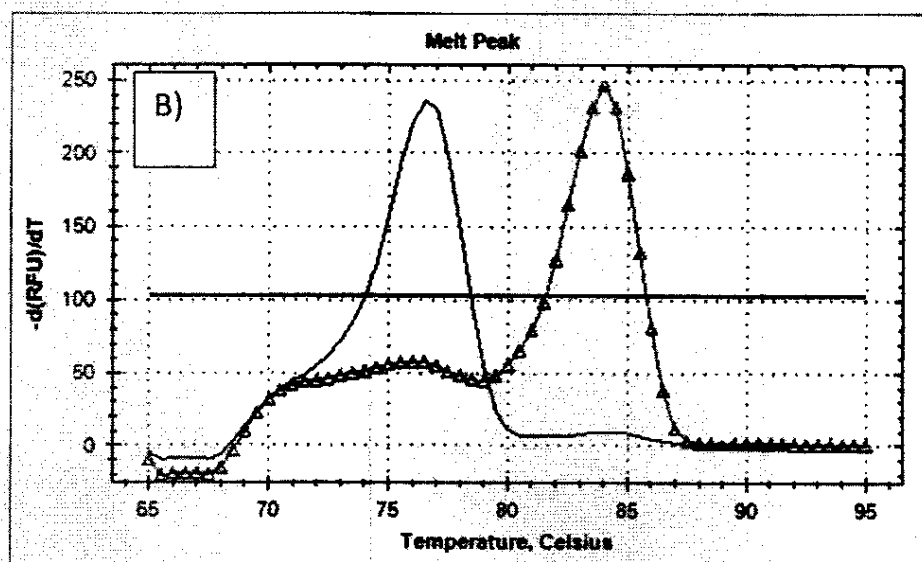
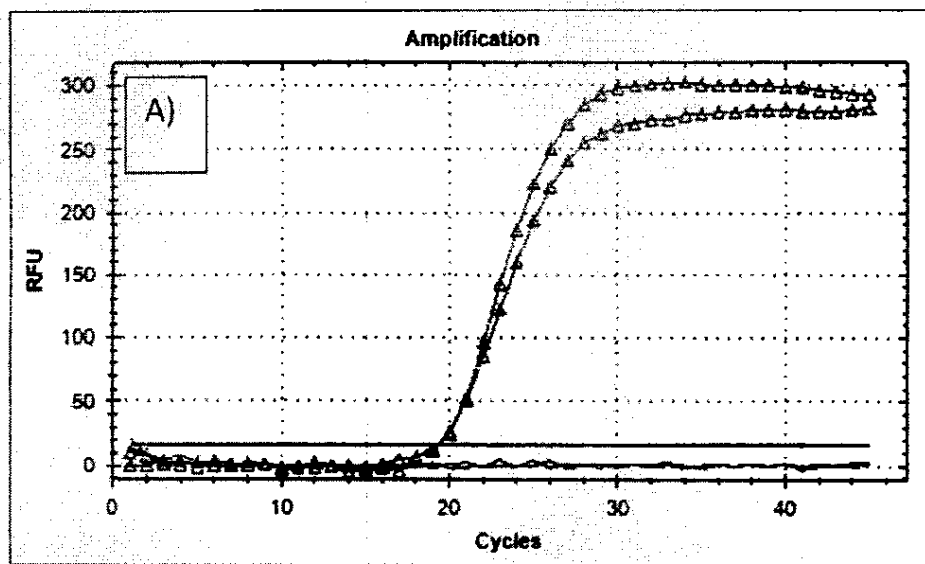
Output della lettura spettrofotometrica:

Date and Time	Nucleic Acid Conc	Unit	A260	A280	260/280	260/230
06/05/2015	0.243	ng/ul	0.243	0.124	1.96	1.9

Risultato: i parametri rilevati rientrano nel range dei valori ottimali, pertanto la preparazione di DNA risulta idonea per le successiva analisi diagnostiche.



Figura 1: Plot di amplificazione PCR in tempo reale. A) risultato ottenuto con i primers di Harper et al., 2010; B) risultato ottenuto con i primers di Francis et al., 2006 con la specifica dell'analisi della curva di melting. Per entrambi i grafici la linea in verde tratteggiata con i triangoli indica il controllo positivo; le linee in blu il campione "Liguria".



Handwritten signature or initials.

Handwritten signature or initials.

2) Saggi Molecolari: a) Saggio amplificazione in tempo reale - qPCR sul campione "Liguria"

Ciclo quantitativo (Cq)	Primo saggio	Secondo saggio
Primer e protocollo Harper et al., 2010 (Fig. 1A)	(0,00) negativo	(0,00)negativo
Primer e protocollo Francis et al., 2006* (Fig. 1B-C)	(0,00) negativo	(0,00) negativo
Valori di riferimento del Controllo Positivo (Fig.1)	Cq=19,8	Cq=21.13 Melt=84.00C**

* Il saggio è stato effettuato con i primer HL 5/6 e con Sybr green. Al termine del saggio è stata analizzata la curva di melting.

**I picchi mostrati nella figura 1B indicano le temperature di melting dell'amplicone ottenuto al termine della reazione di amplificazione genica in tempo reale. Per il controllo positivo si rileva il picco specifico relativo alla temperatura di melting dell'amplicone specifico di *Xylella fastidiosa* subsp. pauca ceppo CoDiRO pari ad 84C. Per il campione "Liguria" non si rileva il picco in corrispondenza dell'amplicone specifico di *Xylella fastidiosa*.

ESITO DEL SAGGIO qPCR: il campione "Liguria" risulta esente da *X. fastidiosa*.

2) Saggi Molecolari: b) Saggio amplificazione convenzionale con primers RST31/33 (Minsavage et al., 1994) (Fig. 2)

Saggio PCR	Primo saggio	Secondo saggio
Primer RST31/33	Negativo*	Negativo*

* Nessuna banda specifica di DNA e' presente nel campione "Liguria" dopo l'analisi elettroforetica

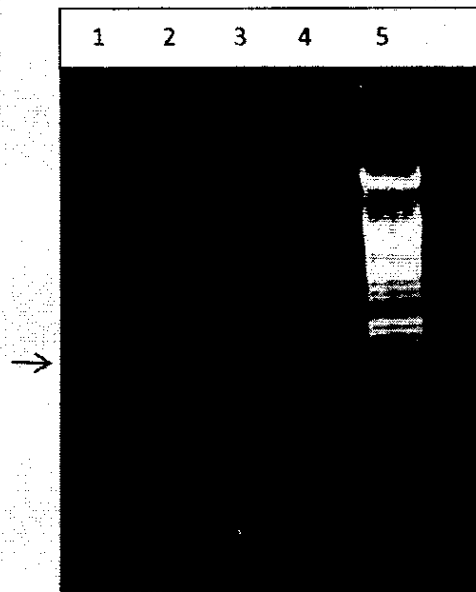


Figura 2: Elettroforesi dei prodotti di amplificazione con i primers RST31/33. La freccia indica l'amplificazione del frammento specifico (733bp) nel controllo positivo. 1)= controllo positivo; 2= campione "Liguria"; 3=controllo sano; 4= controllo in bianco; 5= marker molecolare lambda/HindII.

ESITO DEL SAGGIO PCR: il campione "Liguria" risulta esente da *X. fastidiosa*.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

