**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a viroidului POTATO SPINDLE TUBER VIROID**

**prin real-time RT-PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | **Potato spindle tuber viroid**  PSTVd |
| Metodă /  Referință: | **Real-time RT-PCR (TaqMan)**  OEPP- PM7/138(1) - Anexa 6 – test dupa **Boonham 2004** |
| Matrice: | **Semințe, material vegetal (frunze,fructe) de tomate și ardei**  **Tuberculi *Solanum tuberosum*** |
| Țintă : | - |
| Oligonucleotide: | Primeri si sonda  **PSTV-231-F** GCC CCC TTT GCG CTG T **PSTV-296-R** AAG CGG TTC TCG GGA GCT T **PSTV-251T** CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGT AGC CGA  etichetată FAM/TAMRA  secvențe 5’-3’ |
| Mărime amplicon | - |
| Master mix: | **TaqMan RNA-to Ct** |
| Compoziție mix  Reactivi: | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv** | **Ci** | **Cf** | **Vol / ìL**  **1 rxn** | | **AU** | - | - | 8.89 | | **TaqMan RNA-to Ct** | 2x | 1x | 12.5 | | **PSTV-231-F** | 10 µM | 0.34 µM | 0.85 | | **PSTV-296-R** | 10 µM | 0.34 µM | 0.85 | | **PSTV-251T** | 10 µM | 0.114 µM | 0.285 | | **Enzima RT** | 40X | 1X | 0.625 | | Volum mix | - | - | 24 | | Volum ARN | - | - | 1 | | Volum total | - | - | 25 |   Inlocuirea reactivilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului, conform PO BM 3 |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 48°C | 30 min. | 1 ciclu | | 95°C | 2 min. | 1 ciclu | | 95°C | 15 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | Testul poate detecta PSTVd, dar si alti viroizi(TCDVd si TPMVd) – un rezultat pozitiv trebuie confirmat prin secventierea ampliconului obtinut prin PCR conventional.  In cazul semintelor de tomate, testul poate detecta cu o probabilitate de 95%, o samanta infectata dintr-o subproba de 1000 seminte. |

A12 PO BM 8 Vers.1/rev.0/09.2022. pag1/1