**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a virusului TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS**

**prin real-time RT-PCR (TaqMan)**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | **Tomato brown rugose fruit virus**  TOBRFV |
| Metodă /  Referință: | **Real-time RT-PCR (TaqMan)**  OEPP- PM7/146(1) - test după ISF 2020 (primeri si sonda CaTa28 – Enza Zaden B.V., the Netherlands) |
| Matrice: | **Seminte, material vegetal (frunze, fructe) de tomate si ardei** |
| Țintă: | CP - 3'(NTR) |
| Oligonucleotide: | Primeri și sonda (Enza Zaden B.V.)   |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **CaTa28 Fw** | 5' GGT GGT GTC AGT GTC TGT T 3' |  |  | | **CaTa28 Rv** | 5' GCG TCC TTG GTA GTG ATG T 3' |  |  | | **CaTa28 r** | 5' 6FAM- AGA GAA TGG AGA GAG CGG ACG AGG- BH’1 3' | | | |
| Marime amplicon | **139** perechi baze (gel 2% in gel de agaroza) |
| Master mix: | UltraplexTM 1-step ToughMix (QuantaBio) |
| Compoziție mix  Reactivi: | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactivi** | **Ci** | **Volum/ reactie (µL)** | **Cf** | | **AU** | N.A. | 11.75 | - | | **UltraPlex 1-step ToughMix** | 4 x. | 6.25 | 1 x. | | **CaTa28 Fw** | 10 µM | 0.75 | 0.3 µM | | **CaTa28 Rv** | 10 µM | 0.75 | 0.3 µM | | **CaTa28 Pr** | 10 µM | 0.5 | 0.2 µM | | Volum mix |  | 20.0 |  | | ARN |  | 5.0 |  | | Volum total |  | 25.0 |  |   Inlocuirea reactivilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului, conform PO BM 3 |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 50°C | 10 min. | 1 ciclu | | 95°C | 3 min. | 1 ciclu | | 95°C | 10 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. | |
| Sensibilitate  Limita detectie | ToBRFV poate fi detectat pana la o dilutie de **10-6** (din extract ARN) – conform ISF2020  **Cq < 35** = material vegetal (frunze, fructe) **Cq < 30** (seminte) |

Reguli pentru interpretarea rezultatelor RT-PCR pentru ținta ToBRFV (fluorofor FAM)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Rezultat | Matrice | | Interpretare |
| Frunze / Fructe | Semințe |
| Absența curbei caracteristice  sau : | fără Cq | fără Cq | **Negativ** |
| Prezenta curbei caracteristice si : | Cq ≥ 35 | Cq ≥ 35 | **Negativ** |
| Cq < 35 | Cq < 30 | **Pozitiv** |
| 30 ≤ Cq < 35 |  | (\*) |

(\*) Pentru probele de frunze sau fructe cu Cq : 30 <Cq <35, se efectuează o a doua analiză dintr-o nouă extracție. Dacă după analiză, interpretarea rezultatului indică un Cq <35, proba este declarată „pozitivă”

A2 PO BM 8 Vers.1/rev.1/09.2022. pag1/1