**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

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

**prin real-time RT-PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | **Tomato brown rugose fruit virus**  TOBRFV |
| Metodă /  Referințe: | **Real-time RT-PCR (TaqMan)**  **OEPP**- PM 7/146(2) **-** test dupa **Menzel & Winter 2021**  **ANSES**/LSV/MA066- Vers. 01 |
| Matrice: | **Material vegetal (semințe,sepale,frunze,fructe) de tomate și ardei** |
| Țintă : | CP și 3'NTR (Menzel și Winter, 2020)  CyOXID (Papayiannis et al, 2011) |
| Oligonucleotide: | Primeri si sonda (Menzel și Winter) - tinta  **ToBRFVqs1** CAA TCA GAG CAC ATT TGA AAG TGC A  **ToBRFVqas2** CAG ACA CAA TCT GTT ATT TAA GCA TC  **ToBRFVp1** ACA ATG GTC CTC TGC ACC TG etichetată FAM/TAMRA  secvențe 5’-3’ /(BHQ1)  Primeri si sonda (Papayiannis et al, 2011) – control intern  **CyOXID-F** 5'- TGG TAA TTG GTC TGT TCC GAT T- 3'  **CyOXID-R**  5’- TGG AGG CAA CAA CCA GAA TG-3’  **CyOXID-Taq**  5’-[Cy5] -ATA GGT GCG CCT GAC ATG GCA TTT CCA CA-[BHQ2] -3’ |
| Mărime amplicon | ~ **100** perechi baze (gel 2% in gel de agaroza) |
| Master mix: | **OneStep RT-PCR TaqMan RNA-to Ct** |
| Compoziție mix  Reactivi: | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv** | **Ci** | **Cf** | **Vol / ìL**  **1 rxn** | | **AU** | - | - | 4,8 | | **Master mix TaqMan** | 2x | 1x | 10 | | **Primer P1550 F** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **Primer P1552 R** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **sondaToBRFV P1553** | 10 µM | 0.25 µM | 0.5 | | **Primer CyOXID- F** | 10 µM | 0.20 µM | 0.4 | | **Primer CyOXID- R** | 10 µM | 0.20 µM | 0.4 | | **sonda CyOXID-TAQ** | 10 µM | 0.10 µM | 0.2 | | **Enzima RT** | 40X | 1X | 0.5 | | Volum mix | - | - | 18 | | Volum ARN | - | - | 2 | | Volum total | - | - | 20 |   Inlocuirea reactivilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului, conform PO BM 3 |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 48°C | 15 min. | 1 ciclu | | 95°C | 10 min. | 1 ciclu | | 95°C | 15 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | ToBRFV poate fi detectat pânã la o diluție de 10-9 plante si 10-8 seminte – conform verificarilor efectuate in laborator si a protocolului OEPP – PM 7/146 (2)  Cut-off 35 conform raportului PT 2022 TOBRFV  Cq < 35 pentru material vegetal, semințe tomate/ardei) ; Cq < 27 pentru control intern  Recomandare seminar EURL seminte TOBRFV(14.02.2023): eliminarea pe cat posibil a controlului pozitiv de extractive |

A3 PO BM 8 Vers.2 / rev.2/ 05.2023. pag1/1