**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a ciupercii *PHYLLOSTICTA CITRICARPA***

**prin real-time PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | ***Phyllosticta citricarpa*** (***Guignardia citricarpa***)  GUIGCI |
| Metodă /  Referință: | **Real-time PCR (TaqMan)**  OEPP- PM 7/017 (3) - Anexa 4 – test dupa van Gent-Pelzeret al. (2007) |
| Matrice: | **Fructe citrice, miceliu din cultură pură** |
| Țintă: | ITS |
| Oligonucleotide: | Primeri și sondă (van Gent-Pelzeret al. 2007)    **GcF1** 5'-GGT GAT GGA AGG GAG GCC T-3'  **GcR1** 5'-GCA ACA TGG TAG ATA CAC AAG GGT-3'  **GcP1** 5'-AAA AAG CCG CCC GAC CTA CCT TCA-3' etichetată FAM/TAMRA |
| Mărime amplicon | **69** perechi baze pentru *P. citricarpa* sau *P. paracitricarpa*  **229** perechi baze pentru *P. citriasiana* |
| Master mix: | **2X Premix Ex Taq Master Mix (Takara)** |
| Compoziție mix  Reactivi: | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv** | **Ci** | **Cf** | **Vol / µL**  **1 rxn** | | **AU** | - | - | 13.1 | | **2× Premix Ex Taq Master Mix (Takara)** | 2x | 1x | 15 | | **Primer GcF1** | 50 µM | 0,25 µM | 0.15 | | **Primer GcR1** | 50 µM | 0,25 µM | 0.15 | | **sonda GcP1** | 5 µM | 0,10 µM | 0.6 | | Volum mix | - | - | 29 | | Volum ADN | - | - | 1 | | Volum total | - | - | 30 |   Inlocuirea reactivilor / concentratiilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului, conform PO BM 3 |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 95°C | 10 min. | 1 ciclu | | 95°C | 15 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | Cq ˂ 35 și prezența benzii la la 69 pb (rezultat pozitiv - *P. citricarpa* /*P. paracitricarpa*)  Cq ˂ 35 și prezența benzii la la 229 pb (rezultat pozitiv - *P. citriasiana)* |

A4 PO BM 8 Vers.1/rev.1/09.2022 pag1/1