**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a virusului TOMATO SPOTTED WILT VIRUS**

**prin real-time RT-PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | **TOMATO SPOTTED WILT VIRUS**  TSWV |
| Metodă /  Referință: | **Real-time RT-PCR (TaqMan)**  OEPP – PM 7/34 |
| Matrice: | **Semințe, material vegetal (frunze, fructe) de tomate și ardei** |
| Țintă: | actin gene |
| Oligonucleotide  Compoziție mix  Reactivi: | |  |  | | --- | --- | | **Denaturare ARN** ( nediluat pentru seminte, diluat 10x pentru plante) : **85°C 5 min**.; |  | | (35 μL proba/extract ARN; pentru martorul pozitiv 3μL extract ARN +27μL AU, dilutie) |     **TSWV-CP-17F** TSWV 5′-CTC TTG ATG ATG CAA AGTCTG TGA-3′  **TSWV-CP-100R** TSWV 5′-TCT CAA AGC TAT CAA CTGAAG CAA TAA-3′  **TSWV-CP-73T** 5′-AGG TAA GCT ACC TCC CAGCAT TAT GGC AAG-3  (Boonham et al., 2001)   |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv**  **kit one step RT-PCR(Stratagene)** | **Ci** | **Cf** | **Vol/ìL 1 rxn** | | AU | - | - | 16.3 | | Tampon Taq kit | 10x | 1x | 2.5 | | MgCl2 kit | 50mM | 5.5mM | 2.75 | | **primer TSWV -CP-17-F** | 10ìM | 150nM | 0.375 | | **primer TSWV -CP-100R** | 10ìM | 150nM | 0.375 | | **sonda TSWV-CP-73T** (FAM) | 10ìM | 150nM | 0.375 | | dNTP kit | 100mM | 0.8mM | 0.2 | | **Sure Start Taq polimeraza kit** | 5U/ìL | 0.625U | 0.125 | | **MMLV**\* (1ìL MMLV + 100ìL AU) | 200U/ìL | 1/100\* | 1 | | Volum mix | - | - | 24 | | Volum ARN | - | - | 1 | | Volum total | - | - | 25 |     Inlocuirea reactivilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului, conform PO BM |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 48°C | 30 min. | 1 ciclu | | 95°C | 10 min. | 1 ciclu | | 95°C | 15 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. |   (Mumford et. al.,2000) |
| Sensibilitate  Limită detecție | Cq < 40 (rezultat pozitiv)  Cq ≥ 40 (rezultat negativ)  35 < Cq < 40 (rezultat incert, testul se repetă) |

A8 PO BM 8 Vers.1/rev.0/03.2021. pag1/1