**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a ciupercii *FUSARIUM CIRCINATUM***

**prin SYBR Green real-time PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | ***FUSARIUM CIRCINATUM***  GIBBCI |
| Metodă /  Referință: | **SYBR Green real-time PCR**  **OEPP- PM 7/91 (2)** - Anexa 3 (Schweigkofler *et al.*2004) |
| Matrice: | părți aeriene, semințe, miceliu din cultură pură – plante gazdă (*Pinus* spp., etc) |
| Țintă: | rDNA IGS |
| Oligonucleotide: | **Primer CIRC 1A** 5’CTT GGC TCG AGA AGG G3’  **Primer CIRC 4A** 5’ACC TAC CCT ACA CCT CTC ACT3’ |
| Mărime amplicon | **360** perechi baze |
| Master mix: | **colorant EVA GREEN, kit Stratagene – Sure Start Taq DNA polimerază** |
| Compoziție mix  Reactivi: | Inlocuirea reactivilor / concentratiilor utilizati, comporta ajustarea corespunzatoare a mixului, conform PO BM 3   |  |  | | --- | --- | | **Reactiv** | **Cf / volum** | | AU | până la 25 μL | | Tampon Taq | 1x | | MgCl2 | 5 mM | | dNTP | 0,25 mM | | SYBR Green dye | 1,25 μL | | primer CIRC1A | 0,5 μM | | primer CIRC4A | 0,5 μM | | Taq polimeraza | 0.05 U/μL | | Volum mix | 18,75 μL | | Volum ADN | 6,25 μL | | Volum total | 25 μL | |
| Parametrii și condiții de amplificare: | |  |  |  | | --- | --- | --- | | temperatură | durată | Nr. cicluri | | 95°C | 3-10min.(functie de enzima utilizată) | 1 ciclu | | 94°C | 35 sec. | 45 cicluri | | 66°C | 55 sec. | | 72°C | 50 sec. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | 10 pg țintã / tub reacție PCR- conform Schweigkofler *et al.*2004, PM 7/91(2)   * proba va fi consideratã pozitivã dacã produce o curbã de amplificare exponențialã și dacã ampliconul are valoarea așteptatã a temperaturii de topire * probã va fi consideratã negativã dacã nu produce o curbã de amplificare sau dacã produce o curbã care nu este exponențialã sau dacã ampliconul nu are un o valoare așteptatã a temperaturii de topire.   Valoarea temperaturii de topire este de 88.0 ± 0.5°C  **NOTĂ** – CONFIRMAREA IN CAZUL UNEI PROBE CU REZULTAT POZITIV SE FACE CU O ALTĂ METODĂ REAL TIME PCR (TAGMAN) |

A9 PO BM 8 Vers.1/rev.0/03.2021. pag1/1