**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a bacteriei *CLAVIBACTER SEPEDONICUS***

**prin real-time RT-PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | ***Clavibacter sepedonicus***  CORBSE |
| Metodă /  Referință: | **Real-time PCR (TaqMan)**  OEPP- PM 7/59 - Anexa 9 – test dupa Schaad et al. (1999)  test validat Vreeburg et al. (2016) |
| Matrice: | **tuberculi *Solanum tuberosum*, plante, suspensie colonie pura** |
| Țintă : | **Cms-50** - fragment AND genomic unic (Mills et al., 1997) |
| Oligonucleotide: | Primeri si sonda  **CMS 50-2-F** CGG AGC GCG ATA GAA GAG GA  **CMS 133-R** GGC AGA GCA TCG CTC AGT ACC  **CMS 50-53T** AAG GAA GTC GTC GGA TGA AGA TGC G etichetată FAM, BHQ1  secvențe 5’-3’ |
| Mărime amplicon | - |
| Master mix: | **Go Taq Probe qPCR Master Mix(Promega) / LightCycler 480 Probe Master Mix** |
| Compoziție mix  Reactivi: | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv** | **Ci** | **Cf** | **Vol / µL**  **1 rxn** | | **AU** | - | - | 5.25 | | **TaqMan PCR mix** | 2x | 1x | 12.5 | | **CMS 50-2-F** | 10 µM | 0.3 µM | 0.75 | | **CMS 133-R** | 10 µM | 0.3 µM | 0.75 | | **CMS 50-53T** | 10 µM | 0.3 µM | 0.75 | | Volum mix | - | - | 20 | | Volum ADN | - | - | 5 | | Volum total | - | - | 25 |   Inlocuirea reactivilor 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 | **103  cfu/mL** |

A10 PO BM 8 Vers.1/rev.0/09.2022. pag1/1