**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a bacteriilor *CLAVIBACTER SEPEDONICUS* si *RALSTONIA SOLANACEARUM* prin multiplex real-time RT-PCR cu control intern**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | ***Clavibacter sepedonicus*** si/sau ***Ralstonia solanacearum***  CORBSE, RSSC(filotip II) |
| Metodă /  Referință: | **Real-time PCR (TaqMan)**  OEPP- PM7/59 / EURL ILVO PT 2020 – test dupa Massart et al., 2014 - test validat in scopul detectiei si identificarii *Clavibacter sepedonicus / Ralstonia solanacearum* |
| Matrice: | **tuberculi *Solanum tuberosum*** (asimtomatici), plante, suspesie colonie pura |
| Țintă : | **rRNA (ITS)** |
| Oligonucleotide: | Primeri si sonde, secvențe 5’-3’  **MultiClav\_F** TGG TTT CTT GTC GGA CCC TTT  **MultiClav\_R** CGT CCA CTG TGT AGT TCT CAA TAT ACG  **MultiClav\_P** CGT CGT CCC TTG AGT GG etichetată FAM, MGB  **MultiRaso\_F** CGC GGA GCA TTG ATG AGA T  **MultiRaso\_R** TCG TAA TAC TGG TTG ATA CAA TCA CAA C  **MultiRaso\_P** CTC GCA AAA ACG C etichetată VIC, MGB  **MultiPot\_F** GGT TTC GTA ATG TTC CTC ACC AA  **MultiPot\_R** AAA GGT ATT TAT CCA GCA GTA GAT CCT T  **MultiPot\_P** CAT GGT TGA CGT TGA AT etichetată NED, MGB |
| 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** | - | - | 3.5 | | **TaqMan PCR mix** | 2x | 1x | 10 | | **Primer MultiClav\_F** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **Primer MultiClav\_R** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **sonda MultiClav\_P** | 10 µM | 0.1 µM | 0.2 | | **Primer MultiRaso\_F** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **Primer MultiRaso\_R** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **sonda MultiRaso\_P** | 10 µM | 0.1 µM | 0.2 | | **Primer MultiPot\_F** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **Primer MultiPot\_R** | 10 µM | 0.3 µM | 0.6 | | **sonda MultiPot\_P** | 10 µM | 0.25 µM | 0.5 | | Volum mix | - | - | 18 | | Volum ADN | - | - | 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 | | 95°C | 15 min. | 1 ciclu | | 95°C | 20 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 1 min. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | 5 x **103  cfu/mL** |

A11 PO BM 8 Vers.1/rev.0/09.2022. pag1/1