**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a bacteriei  *XYLELLA FASTIDIOSA***

**prin real-time PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | ***XYLELLA FASTIDIOSA***  XYLEFA |
| Metodă /  Referință: | **Real-time PCR (TaqMan)**  **OEPP – PM 7/24 (4)**  Harper et al., 2010 (erratum 2013) |
| Matrice: | **Frunze mature cu petioli (din partea bazala a plantei)l / lastari (plante gazda), vectori - insecte** |
| Țintă: | 16S rRNA-proteina RimM |
| Oligonucleotide: | **XF-F** 5’-CAC GGC TGG TAA CGG AAG A-3’  **XF-R** 5’-GGG TTG CGT GGT GAA ATC AAG-3’  **XF-P**  5’-6-FAM -TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC-BHQ-1-3’ |
| Marime amplicon | - |
| Master mix: | **TaqMan Universal Master Mix (Roche)** |
| Compoziție mix  Reactivi: | |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv** | **Ci** | **Cf** | **Vol / ìL**  **1 rxn** | | **AU** | - | - | 6.6 | | **2× TaqMan Master Mix Universal (Roche)** | 2x | 1x | 10 | | **Primer XF-F** | 10 µM | 0,3 µM | 0.6 | | **Primer XF-R** | 10 µM | 0,3 µM | 0.6 | | **sonda XF-P** | 10 µM | 0,10 µM | 0.2 | | Volum mix | - | - | 18 | | Volum ADN | - | - | 2 | | Volum total | - | - | 20 | |  |  |  |  |   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 | | 94°C | 10 sec. | 40 cicluri | | 60°C | 40 sec. | |
| Sensibilitate  Limită detecție | Cq ˂ 35 |

A5 PO BM 8 Vers.1/rev.1/09.2022 pag1/1