**AUTORITATEA NAŢIONALĂ FITOSANITARĂ**

**LABORATORUL NAŢIONAL**  **FITOSANITAR**

**Detecția calitativă a virusului PEPINO MOSAIC VIRUS**

**prin real-time RT-PCR**

|  |  |
| --- | --- |
| Organism  Dăunător: | **Pepino mosaic virus**  PepMV |
| Metodă /  Referință: | **Real-time RT-PCR (TaqMan)**  Instruire NIB – Slovenia – detecția PepMV prin real-time RT-PCR - 2009  (Ling et.al.,2007) |
| Matrice: | **Semințe, material vegetal (frunze, fructe) de tomate și ardei** |
| Țintă: | gena **TGB2** |
| Mărime amplicon | **107** perechi baze |
| Compoziție mix  Reactivi:  Oligonucleotide | |  |  | | --- | --- | | **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) |   ampificare – două mixuri (unul pentru țintă și unul pentru control intern)   |  |  |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | | **Reactiv** (one step RT-PCR kit - Stratagene) | | **MIX 1** | **Ci** | **Cf** | V/1rxn  μL |  | |  | | Tampon | | Kit Stratagene | 10x | 1x | 1 |  | | MgCl2 | | Kit Stratagene | 50mM | 5.5mM | 1.1 |  | | dNTP | | Kit Stratagene | 20mM | 0.8mM | 0.4 |  | | Sure start Taq | | Kit Stratagene | 5U/μL | 0.05U/μL | 0.1 |  | | MMLV | |  |  | 1MMLV/100AU | 0.4 |  | | **Total** | |  |  |  | **3** |  | | **Reactiv** (jumătate din mixul 1, cu primerii și sonda pt. țintă) | | **MIX 2 (LING)** |  |  | V/1rxn  μL |  | |  | | **Mix 1 – tinta** | | PepMV |  |  | **3** |  | | AU | |  |  |  | 3.8 |  | | Primer 1F1 | |  | 10μM | 0.2μM | 0.2 |  | | Primer 2F2 | |  | 10μM | 0.2μM | 0.2 |  | | Primer 3F1 | |  | 10μM | 0.2μM | 0.2 |  | | Primer 4F2 | |  | 10μM | 0.2μM | 0.2 |  | | Sonda 1 | |  | 10μM | 0.4μM | 0.4 |  | | **Total mix LING** | |  |  |  | **8** |  | |  |  | **+ 2** μL ARN |  | | **Reactiv** (jumătate din mixul 1, cu primerii și sonda pt. controlul intern) | | **MIX 3 (COX)**  **Control intern** |  |  | V/1rxn  μL |  | |  | | **Mix 1 -** | |  |  |  | **3** | | AU | |  |  |  | 2.4 | | Primer COX-F | |  | 10μM | 0.9μM | 0.9 | | Primer COX-rw | |  | 10μM | 0.9μM | 0.9 |  | | Sonda COX-P | |  | 2.5μM | 0.2μM | 0.8 |  | | **Total mix COX** |  |  |  |  | **8** |  |   **+ 2** μL ARN   |  | | --- | | **Primer 1 F1** 5’ ACTCCTAGAGCTGACCTCAC 3’  **Primer 2 F2** 5’ TCTCCAGCAACAGGTTGGTA 3’  **Sonda 1** 5’ [FAM ] TGTCAGCTTGCATTTACTTCCAAAA [TAMRA] 3’ |   **Primer 3 F1** 5’ ACTCCTAGAGCTGATCTTAC 3’  **Primer 4 F2** 5’ TCACCTGCAACTGGTTGATA 3’ (pentru toate izolatele de Pepino)     |  | | --- | | **Primer COX-RW** 5’ CAACTACGGATATATAAGRRCCRRAACTG 3’  **Primer COX- F** 5’ CGTCGCATTCCAGATTATCCA 3’  **Sonda COX-P** 5’ FAM – TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT 3’ |   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 | Testul poate detecta o samânțã infectatã artificial (în 5000 semințe sãnãtoase), conform Gutierrez-Aguirreet al., 2009 – PM7/113(1)  Cq ≤ 37 (rezultat pozitiv)  Cq ≥ 40 (rezultat negativ)  37 < Cq < 40 (rezultat incert, testul se repetă) |