

Паспорт технологии
Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1
(Grapevine leafroll-associated virus 1) с помощью ПЦР в реальном времени
(СТО 00668034-142–2022)

Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Технология предназначена для специализированных НИИ, занимающихся селекционно-генетическими исследованиями и селекцией винограда, питомниководческих и виноградарских хозяйств, лабораторий Россельхозцентра для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 при фитосанитарном мониторинге виноградных насаждений или оценке посадочного материала.
Описание технологии	<p>Технология основана на использовании реакции обратной транскрипции и амплификации фрагментов генома вируса с помощью ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR. На первой стадии идентификации на матрице тотальной РНК проводится реакция обратной транскрипции, на второй - ПЦР в реальном времени со специфичными к вирусному геному праймерами. В качестве эндогенного контроля используется реакция с праймерами на ген актина.</p> <p>Этапы идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Экстракция проб тотальной растительной РНК, необходимых для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1, проводится с использованием частиц силики. 2. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляется с помощью набора реактивов MMLV RT по протоколу производителя ЗАО «Евроген». 3. Проведение ПЦР в реальном времени для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 осуществляется по протоколу производителя реактивов HS-qPCR SYBR Blue (ООО «Биолабмикс»). 4. По завершении ПЦР в реальном времени полученные данные обрабатывают с помощью программного обеспечения амплификатора. Для верификации продуктов амплификации осуществляют анализ кривых плавления, что позволяет идентифицировать продукты ПЦР, различающиеся по содержанию GC и длине.
Основные показатели технологии	<p>Технология характеризуется следующими основными показателями:</p> <ul style="list-style-type: none"> – высокая точность, специфичность и чувствительность; – сокращение затрат времени для проведения анализа; – снижение риска контаминации; – воспроизводимость. <p>Наиболее важным конкурентным преимуществом разработанной технологии идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1 на основе ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR является высокая точность детекции, сочетающаяся с оптимизацией времени, что повышает экономическую эффективность проведения анализа.</p>

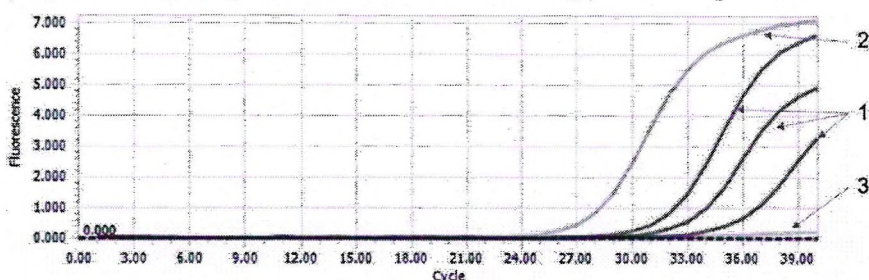
	<p>Конкурентные преимущества достигаются за счет применения молекулярно-генетических методов с использованием полимеразной цепной реакции для детекции вируса скручивания листьев виноградной лозы 1.</p>
<p>Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделов (собственных разработок) Получателя</p>	<p>Для разработки технологии использованы результаты проведения крупномасштабного мониторинга виноградников Республики Крым, Республики Дагестан, Краснодарского и Ставропольского края, Ростовской области на наличие вирусной инфекции. Методом ОТ-ПЦР обнаружены вредоносные вирусы GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFLV, GFkV, GRSPaV. Результаты представлены в публикациях и РИД.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. E Porotikova, U Terehova, V Volodin, E Yurchenko, S Vinogradova. Distribution and Genetic Diversity of Grapevine Viruses in Russia. <i>Plants</i> 10 (6), 1080. https://doi.org/10.3390/plants10061080 2. E.V. Porotikova, E. G. Yurchenko, and S.V. Vinogradova. First Report of 'Candidatus Phytoplasma solani' Associated with Bois Noir on Grapevine (<i>Vitis vinifera</i>) in Krasnodar Region of Russia. <i>Plant disease</i>. 2020. Volume 104, Number 1 https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0508-PDN 3. Porotikova E., Dmitrenko U., Yurchenko E, Vinogradova S. First Report of Grapevine leafroll-associated virus 2 in Russian Grapevines (<i>Vitis vinifera</i>). <i>Plant Disease</i>. 2019, Volume 103, Number 1, Page 164. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0749-PDN (WoS Q1, IF WoS 4,614) 4. Byzova NA, Vinogradova SV, Porotikova EV, Terekhova UD, Zherdev AV, Dzantiev BB. Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus. <i>Biosensors (Basel)</i>. 2018 Nov 15;8(4). pii: E111. doi: 10.3390/bios8040111. (WoS Q1, IF WoS 5,743) 5. Рисованная В.И., Волков Я.А., Володин В.А., Поротикова Е.В., Гориславец С.М., Странишевская Е.П., Камионская А.М., Виноградова С.В. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620355 «Распространение вирусных фитопатогенов винограда <i>Vitis vinifera</i> L. на территории Крыма». Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 17.03.2016г 6. А.М. Камионская, Е.В. Поротикова, В.И. Рисованная, Я.А. Волков, В.А. Володин, И.В. Яковлева, С.М. Гориславец, Е.П. Странишевская, С.В. Виноградова. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016621117 «Распространение бактериальных фитопатогенов винограда <i>Vitis vinifera</i> L. на территории Крыма». Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 16.08.2016г 7. Поротикова Е.В., Камионская А.М., Виноградова С.В. Патент на изобретение «Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления вируса крапчатости винограда (<i>Grapevine fleck virus</i>)». Патент №2644244. Дата регистрации 08.02.2018 г.
<p>Сведения об эффективности и конкурентоспособности технологии</p>	<p>Эффективность и конкурентоспособность технологии подтверждается следующими параметрами:</p> <ul style="list-style-type: none"> – возможность контроля специфичности амплификации без применения дополнительных методов;

– снижение рисков контаминации ПЦР-продуктами, так как отсутствует необходимость проведения электрофоретического анализа;

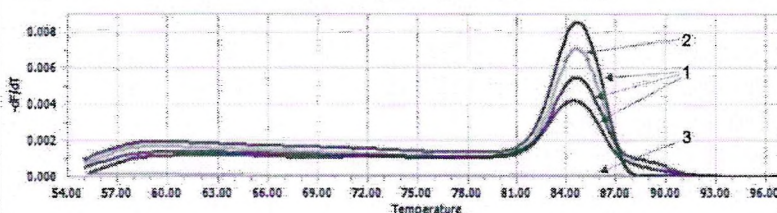
– применение для анализа метода ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR позволяет с высокой точностью, специфичностью и чувствительностью в короткие сроки провести детекцию вируса.

Эффективность технологии была показана при анализе образцов винограда на наличие идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 1. В результате вирус был обнаружен в симптоматичных образцах, что подтверждено с помощью их анализа альтернативным методом детекции.

Кривые амплификации кДНК в анализируемых образцах



Кривые плавления амплифицированных фрагментов кДНК



1 – исследуемые образцы;

2 – положительный контроль на вирус скручивания листьев виноградной лозы 1;

3 – отрицательный контроль.

Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, в том числе селекционных достижениях, использованных в технологии

нет

Руководитель



Егоров Е.А.