

Паспорт технологии
Методика идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 (Grapevine leafroll-associated virus 3) с помощью ПЦР в реальном времени (СТО 0668034-167–2023)

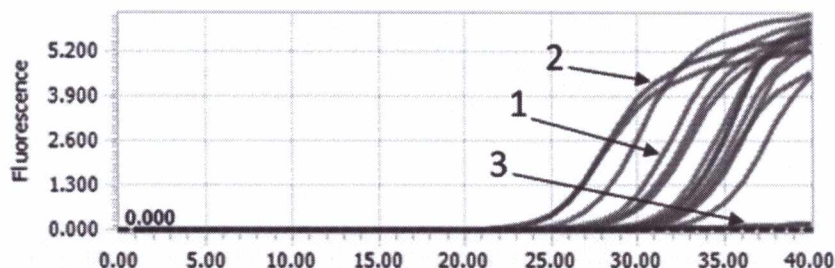
Показатель	Характеристика технологии
Назначение технологии	Технология предназначена для проведения детекции вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 и может быть использована для его идентификации при фитосанитарном мониторинге виноградных насаждений или оценке посадочного материала.
Описание технологии	<p>Технология основана на применении 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 3:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Экстракция проб тотальной растительной РНК, необходимых для идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3, проводится по методу 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 3 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>Метод 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 методики идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3 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>Сведения об использованных при разработке технологии научно-технических заделах (собственных разработках) Получателя</p>	<p>Для разработки технологии использованы результаты проведения крупномасштабного мониторинга виноградников Республики Крым, Республики Дагестан, Краснодарского и Ставропольского края, Ростовской области виноградных насаждений 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. Plants 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 (Vitis vinifera) in Krasnodar Region of Russia. Plant disease. 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 (Vitis vinifera). Plant Disease. 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. Biosensors (Basel). 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 Vitis vinifera 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 Vitis vinifera L. на территории Крыма». Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 16.08.2016г
<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

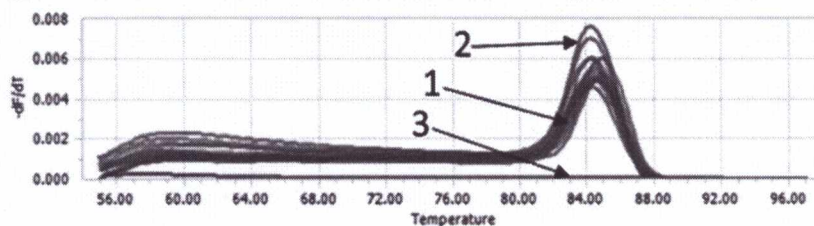
точностью, специфичностью и чувствительностью в короткие сроки провести детекцию вируса.

Эффективность технологии была показана при анализе образцов винограда на наличие идентификации вируса скручивания листьев виноградной лозы 3. 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

Поротикова Е.В., Камионская А.М., Виноградова С.В. Патент на изобретение «Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления вируса крапчатости винограда (Grapevine fleck virus)». Патент №2644244. Дата регистрации 08.02.2018 г.
Предложен набор синтетических олигонуклеотидов для выявления вируса крапчатости винограда (Grapevine fleck virus) с использованием метода полимеразной цепной реакции. Предложенный набор включает праймеры GFkV_F 5'-CCC-TCG-TGT-AAG-CAT-CCA-(C/T)CT-3' и GFkV_R 5'-AAG-ACG-GAG-AGG-AT(T/C)-TC(A/G)-GA-3' и позволяет достоверно обнаруживать вирус крапчатости винограда в симптоматичном и бессимптомном биологическом материале винограда. Предложенный набор может быть использован в молекулярной диагностике биоматериала винограда на наличие в нем вируса крапчатости винограда при закладке новых виноградников, при проведении фитосанитарных обследований и в лабораторной диагностике образцов.

Руководитель



Егоров Е.А.