

АНОТАЦІЯ

Рябий М. І. Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення садивного матеріалу винограду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 203 «Садівництво та виноградарство» (20 – Аграрні науки та продовольство). – Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України, Одеса, 2026.

Дисертацію присвячено дослідженню наявності 3-го вірусу *Grapevine leafroll-associated virus 3* хвороби скручування листя виноградної лози *Grapevine leafroll disease*, збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter* на виноградниках Одеської області та розробці сучасної науково обґрунтованої технології оздоровлення виноградної лози від вірусних хвороб *in vitro*.

Літературний аналіз сучасного стану виноградних насаджень у світі показав серйозну проблему поширення вірусних хвороб. Особливо шкідливим є 3-й вірус хвороби скручування листя виноградної лози, який завдає значних економічних збитків виноградарству в різних країнах. Найчастіше ці хвороби поширюються через ввезення зараженого садивного матеріалу, використання для щеплення ураженої прищепної або підщепної лози, а також через недотримання санітарних вимог під час вирощування садивного матеріалу. Їх поширення може бути ефективно обмежено завдяки використанню сертифікованого садивного матеріалу та дотриманню комплексу профілактичних заходів. До них належать закладання насаджень у зонах, вільних від переносників патогенів, своєчасне видалення уражених рослин, контроль чисельності комах і нематод, а також добір толерантних сортів. Проте застосування хімічних засобів проти нематод характеризується обмеженою ефективністю та супроводжується екологічними ризиками, селекція сортів, стійких до вірусів, залишається переважно на експериментальному рівні через відсутність надійних джерел генетичної резистентності. Згідно з даними зарубіжних вчених підтримання належного санітарного статусу виноградної

лози можна забезпечити через застосування біотехнологічних методів оздоровлення – термотерапії, хіміотерапії, як окремо, так і в поєднанні з культурою апікальних меристем. Невелика кількість, а за окремими напрямками відсутність вітчизняних досліджень у цьому напрямку зумовлює актуальність і перспективність вивчення, розроблення та вдосконалення методів оздоровлення винограду в культурі *in vitro*. Тому дослідження, спрямовані на ідентифікацію 3-го вірусу хвороби скручування листя та збудника бактеріального раку виноградної лози, а також на оцінку ефективності різних методів оздоровлення рослин *in vitro* для знешкодження збудників хвороб є актуальними.

У роботі було застосовано комплекс загальноприйнятих у виноградному розсадництві методів: біотехнологічні (для ідентифікації збудників хвороб і оздоровлення винограду в культурі *in vitro*; польові (для проведення фітосанітарного обстеження виноградних насаджень); біометричні (для оцінки стану та динаміки росту вегетативної маси ініціальних експлантів, мікроклонів винограду після оздоровлення); порівняльно-розрахункові (для економічної оцінки системи ідентифікації збудників і оздоровлення винограду); дисперсійного аналізу (для статистичної обробки отриманих експериментальних даних).

Лабораторні дослідження проводили в лабораторії вірусології і мікробіології та відділі розсадництва, розмноження і біотехнології винограду Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України. У роботі використовували як розроблені нами методики, так і державні нормативні документи:

- Методика виконання вимірювань (МВВ-01-19/01-2019). «Виявлення вірусів винограду методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)».
- ДСТУ 3355-96. «Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб у процесі карантинного огляду та експертизи».
- ДСТУ 4390:2005. «Технічні умови. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози».
- ДСТУ 8562:2015. «Маточники та садивний матеріал. Методи виявлення збудників вірусних хвороб та бактеріального раку».

У результаті фітосанітарного обстеження на сортах винограду «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний» було виявлено симптоми скручування листя виноградної лози. Методом імуно-ферментного аналізу (ІФА) було ідентифіковано 3-й вірус хвороби скручування листя. Результати ІФА було підтверджено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Також на рослинах цих сортів було виявлено симптоми хвороби бактеріального раку у вигляді пухлин на місці щеплення, на штамбі та рукавах виноградних рослин. Методом ПЛР було ідентифіковано збудника бактеріального раку виноградної лози.

Для пошуку засобів щодо боротьби з 3-м вірусом хвороби скручування листя винограду сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний» було розроблено ефективні способи оздоровлення садивного матеріалу винограду *in vitro*. Вони ґрунтуються на застосуванні методів апікальних меристем, термотерапії та хіміотерапії.

Для підвищення ефективності методу апікальних меристем було модифіковано поживне середовище МС (спрямоване на збільшення вмісту вітамінів і фітогормонів). У порівнянні зі стандартним середовищем МС, його застосування забезпечувало високу приживлюваність апікальних меристем, стимулювало їх регенераційні процеси та покращувало морфометричні показники мікроклонів. Найвищим регенераційним потенціалом *in vitro* характеризувались апікальні меристеми розміром 0,5–1,0 мм, їх приживлюваність була на рівні 56,0–62,0 %, вони формували по 1,8–2,0 шт. пагонів, висотою 5,8–6,2 мм. Проте найвищий коефіцієнт елімінації вірусу *GLRaV-3* був характерний для апікальних меристем розміром 0,2–0,4 мм (70,5–72,5 %), збільшення розмірів меристем до 0,8–1,0 мм знижувало ефективність оздоровлення до 50,3–51,4 %. Водночас поживні середовища несуттєво впливали на цей показник. Статистичний аналіз підтвердив, що розмір апікальних меристем був визначальним фактором ефективності елімінації вірусу *GLRaV-3*.

Повітряну термотерапію винограду *in vitro* проводили в термокамері протягом 8 тижнів за температури 37 °С та поєднували з культивуванням апікальних меристем двома способами. У першому способі термотерапії

піддавали сформовані мікроклони висотою 6–8 см, після чого виділяли апікальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм і культивували їх на поживному середовищі МС 2. У другому способі спочатку культивували апікальні меристеми на середовищі МС 2, а після їх регенерації та утворення мікропагонів висотою 20–30 мм піддавали термотерапії. Отримані результати підтвердили ефективність застосування комбінації термотерапії *in vitro* та культивування апікальних меристем для оздоровлення винограду від вірусу скручування листя-3 (*GLRaV-3*). Поєднання цих методів давало змогу значно зменшити вірусне навантаження та забезпечувало високий відсоток оздоровлених рослин – 85,0–88,0 %, використання тільки апікальних меристем забезпечувало отримання 60,0–62,0 % оздоровлених рослин. Після застосування комбінованих методів термотерапії та культивування апікальних меристем отримано життєздатні мікроклони винограду з високим регенераційним потенціалом, приживлюваність експлантів становила 51,5–74,0 %. Статистичний аналіз показав, що основним фактором, який визначав варіацію всіх досліджуваних показників – елімінації вірусу, кількості оздоровлених і життєздатних рослин, приживлюваності експлантів, – була саме комбінація апікальних меристем і термотерапії, що формувала від 97,0 до майже 100 % загальної варіації.

Хіміотерапію винограду *in vitro* проводили з застосуванням віруцидних препаратів озельтамівіру та рибавіріну і поєднували з культивуванням апікальних меристем. Озельтамівір у концентраціях 30–40 мг/л проявляв низьку фітотоксичність і забезпечував високу життєздатність експлантів навіть після 90 днів хіміотерапії, рибавірін у високих концентраціях знижував життєздатність і пригнічував розвиток пагонів та коренів. Поєднання обох препаратів із подальшим культивуванням апікальних меристем забезпечувало майже повну елімінацію вірусу (98,0–100 %), тоді як застосування тільки рибавіріну – до 30,0 %, а озельтамівіру – до 89,5 % на 90-й день процесу оздоровлення. Дисперсійний аналіз показав, що життєздатність експлантів, кількість і висота пагонів, коренеутворення та коефіцієнт елімінації вірусу достовірно залежали від способу оздоровлення (хіміотерапія або хіміотерапія + апікальні меристеми) і типу препаратів, які застосовували. Вплив препаратів у варіації результативних

ознак змінювався від 16,68 % (середня довжина кореня) до 78,66 % (висота пагонів), а вплив способу оздоровлення – від 1,61 % (висота пагонів) до 73,97 % (середня довжина кореня). Це свідчить про більший вплив препаратів в ефективності оздоровлення винограду *in vitro*.

Ключові слова: виноград, фітосанітарне обстеження, збудники, шкідливість, поширеність, вірус скручування листя, бактеріальний рак винограду, ІФА, ПЛР, *in vitro*, експлант, поживне середовище, приживлюваність, оздоровлення, коефіцієнт елімінації.

SUMMARY

Riabyi Mykola Improvement of biotechnological approaches for the sanitation of grape planting material. – Qualification scientific work submitted as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 203 Horticulture and Viticulture (20 Agrarian Sciences and Food). – National Scientific Center “V. Ye. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking” of the NAAS of Ukraine, Odesa, 2026.

The dissertation focuses on investigating the occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*, the causal agent of grapevine leafroll disease, and *Rhizobium radiobacter (R. radiobacter)*, the causal agent of grapevine crown gall, in vineyards of the Odesa region, as well as on developing a modern, scientifically substantiated *in vitro* sanitation technology for grapevines affected by viral diseases.

A review of the current condition of grapevine plantations worldwide indicates a serious problem of viral disease spread. *GLRaV-3* is particularly harmful and causes significant economic losses to viticulture in many countries. These diseases are most commonly disseminated through the import of infected planting material, the use of infected scion or rootstock vines for grafting, and failure to comply with sanitary requirements during nursery production. The spread of viral diseases can be effectively limited by using certified planting material and implementing preventive measures, including establishing vineyards in areas free from pathogen vectors, timely removal of infected plants, controlling insect and nematode populations, and selecting tolerant cultivars. However, the effectiveness of chemical nematode control is limited and associated with environmental risks, while breeding for virus resistance remains largely experimental due to the lack of reliable sources of genetic resistance. According to international research, maintaining the sanitary status of grapevines can be achieved by applying biotechnological sanitation methods – thermotherapy and chemotherapy – either individually or in combination with apical meristem culture. The limited domestic research in this field substantiates the relevance and prospects of studying, developing, and improving *in vitro* grape sanitation methods. Therefore, studies aimed

at identifying *GLRaV-3*, the causal agent of grapevine crown gall, as well as assessing the effectiveness of various *in vitro* sanitation methods for pathogen elimination, are both timely and significant.

The study employed a set of methods commonly used in grapevine nursery production: biotechnological methods (for pathogen identification and *in vitro* sanitation), field methods (phytosanitary inspection of grape plantations), biometric methods (assessment of the condition and growth dynamics of initial explants and grape microclones after sanitation), comparative and computational methods (economic evaluation of the pathogen identification and grape sanitation system), and analysis of variance (statistical processing of experimental data). Laboratory research was conducted in the Laboratory of Virology and Microbiology and the Department of Nursery, Reproduction and Biotechnology of Grapes of the National Scientific Center “V. Ye. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking” of the NAAS of Ukraine. The study used both original protocols developed by the author and relevant national regulatory documents:

- Measurement methodology (MBB-01-19/01-2019). “Detection of grapevine viruses by polymerase chain reaction (PCR)” (in Ukrainian).
- DSTU 3355-96. “Agricultural plant products. Sampling methods in the process of quarantine inspection and examination” (in Ukrainian).
- DSTU 4390:2005. “Grape seedlings and grapevine cuttings. Specifications” (in Ukrainian).
- DSTU 8562:2015. “Mother plantations and grape planting material. Methods for detection of pathogens of viral diseases and bacterial crown gall” (in Ukrainian).

Phytopsanitary inspection of the cultivars “Cabernet Sauvignon” and “Odeskyi Chornyi” revealed symptoms characteristic of grapevine leafroll disease. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) identified *GLRaV-3*, and the ELISA results were confirmed by polymerase chain reaction (PCR). In addition, symptoms of grapevine crown gall were observed in the form of tumors at the graft union, on the trunk, and on the arms of grapevines of these varieties. PCR confirmed the presence of the causal agent of grapevine crown gall.

To develop effective approaches for controlling *GLRaV-3* in the cultivars “Cabernet Sauvignon” and “Odeskyi Chornyi”, effective *in vitro* sanitation methods were developed based on apical meristem culture, thermotherapy, and chemotherapy.

To improve the efficiency of apical meristem culture, the MS (Murashige and Skoog) nutrient medium was modified by increasing the content of vitamins and phytohormones. Compared with the standard MS medium, the modified medium ensured a high establishment rate of apical meristems, stimulated regeneration, and improved morphometric characteristics of microclones. The highest *in vitro* regeneration capacity was observed in apical meristems 0.5–1.0 mm in size; their establishment rate reached 56.0–62.0 %, and they produced 1.8–2.0 shoots per explant with a mean shoot length of 5.8–6.2 mm. However, the highest elimination rate of *GLRaV-3* was achieved with apical meristems 0.2–0.4 mm in size (70.5–72.5 %), whereas increasing meristem size to 0.8–1.0 mm reduced sanitation efficiency to 50.3–51.4 %. Nutrient media had a negligible effect on this indicator. Statistical analysis confirmed that apical meristem size was the determining factor for *GLRaV-3* elimination efficiency.

Air thermotherapy of grapevines *in vitro* was performed in a heat chamber for eight weeks at 37°C and combined with apical meristem culture using two approaches. In the first approach, microclones 6–8 cm in height were subjected to thermotherapy, after which apical meristems 0.5–0.7 mm in size were excised and cultivated on MS 2 medium. In the second approach, apical meristems were first cultivated on MS 2 medium, and after regeneration and formation of microshoots 20–30 mm in length, the plantlets were subjected to thermotherapy. The results confirmed the effectiveness of combining *in vitro* thermotherapy with apical meristem culture for the sanitation of grapevines from *GLRaV-3*. This combination significantly reduced viral load and provided a high proportion of sanitized plants (85.0–88.0 %), whereas the use of apical meristem culture alone resulted in 60.0–62.0 % sanitized plants. Following the combined thermotherapy and apical meristem approaches, viable grape microclones with high regeneration potential were obtained, and the establishment rate of explants was 51.5–74.0 %. Statistical analysis showed that the combination of apical meristem culture and thermotherapy was the main factor determining the variability of all

evaluated indicators – virus elimination, number of sanitized and viable plants, and explant establishment rate – accounting for 97.0 % to almost 100 % of total variation.

In vitro chemotherapy was performed using the antiviral agents—oseltamivir and ribavirin – in combination with apical meristem culture. Oseltamivir at concentrations of 30–40 mg/L exhibited low phytotoxicity and ensured high explant viability even after 90 days of chemotherapy, whereas ribavirin at high concentrations reduced viability and inhibited shoot and root development. The combined use of both compounds, followed by apical meristem culture, enabled almost complete virus elimination (98.0–100 %). Ribavirin alone provided elimination of up to 30.0 %, and oseltamivir alone up to 89.5 % by day 90 of the sanitation process. Analysis of variance showed that explant viability, shoot number and length, root formation, and virus elimination coefficient depended significantly on the sanitation method (chemotherapy vs chemotherapy + apical meristem culture) and the type of antiviral agent used. The contribution of antiviral agents to trait variability ranged from 16.68 % (mean root length) to 78.66 % (shoot length), while the contribution of the sanitation method ranged from 1.61 % (shoot length) to 73.97 % (mean root length), indicating a greater influence of the antiviral agents on *in vitro* sanitation efficiency.

Keywords: grapes, phytosanitary inspection, pathogens, harmfulness, prevalence, grapevine leafroll-associated virus, crown gall, ELISA, PCR, *in vitro*, explant, nutrient medium, survival, recovery, elimination coefficient.