

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Рябий Микола Ігорович

УДК 634.836.7:581.19:631.547:631.811.98:631.537

ДИСЕРТАЦІЯ
УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРИЙОМІВ
ОЗДОРОВЛЕННЯ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ВІНОГРАДУ

203 – Садівництво та виноградарство

20 – Аграрні науки та продовольство

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М. І. Рябий

Науковий керівник: **Конуп Людмила Олександрівна**,
доктор сільськогосподарських наук, старший дослідник

Одеса – 2026

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 штабмі 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.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Конуп Л., Pikovskiy M., **Riabyi M.**, Kyryk M., Konup A. Bacterial tumor of grapevine and prospects for its biological control. *Plant and Soil Science*. 2024. Vol. 15, No. 4. P. 54–67. <https://doi.org/10.31548/plant3.2024.54> (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів).
2. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Застосування методу апікальних меристем для розмноження винограду *in vitro*. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2024. № 2. С. 55–61. <https://doi.org/10.32782/2310-0478-2024-2-55-61> (Особистий внесок Рябого М. І.: пошук та аналіз літературних джерел, розробка плану протоколу культивування апікальних меристем, відбір, підготовка зразків, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, статистична обробка даних).
3. Конуп Л. О., **Рябий М. І.**, Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., Чистякова В. Л., Вуек А. О., Кирик М. М., Власов В. В. Коротковузля виноградної лози на виноградниках Одеської області: діагностика та перспективи оздоровлення методом термічної обробки. *Карантин і захист рослин*. 2025. № 1. С. 14–19. DOI: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2025.1.14-19> (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів).
4. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Оздоровлення винограду у культурі тканин і органів *in vitro*. *Аграрні інновації*. 2025. №. 33. С. 121–129. DOI <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2025.33.20> (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, відбір і підготовка зразків, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, обґрунтування

висновків, підготовка матеріалу до публікації).

5. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Практичні аспекти оздоровлення винограду в культурі *in vitro*. *Таврійський науковий вісник*. 2025. Вип. 146. Частина 1. С. 114–126. DOI <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2025.146.1.13> (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, відбір і підготовка зразків, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, обґрунтування висновків, підготовка матеріалу до публікації).

Статті у зарубіжних періодичних наукових виданнях:

Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Хіміотерапія винограду *in vitro*. *The scientific heritage* (Budapest, Hungary). 2025. No. 175. P. 3–9. DOI: 10.5281/zenodo.18077199 (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, відбір і підготовка зразків, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

Публікації, у яких засвідчено апробацію матеріалів дисертації:

1. Конур L., Vlasov V., Конур A., Chistyakova V., Nikolaeva N., **Riabyi M.**, Курык M., Pikovskiy M. Detection and identification of grapevine leafroll associated virus 1, 3, 4 (strain 9) isolates in south of Ukraine. *Proceedings of the 20th Congress of the International Council for the Study of Virus & Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)* : materials of the international conference (Thessaloniki, September 25–29, 2023). Thessaloniki, 2023. P. 159–160. (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень).
2. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Особливості культивування апікальних меристем винограду у культурі тканин і органів *in vitro*. *Perspectives of contemporary science: theory and practice* : Proceedings of VI International Scientific and Practical Conference (Lviv, July 22–24, 2024). Львів, 2024. С.

13–18. (Особистий внесок Рябого М. І. пошук літературних джерел та їх аналіз, розробка плану протоколу культивування апікальних меристем, проведення лабораторних досліджень та обґрунтування отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

3. Zelenianska N., **Riabyi M.** Determination of the regeneration potential of grape apical meristems *in vitro*. *International Conference on Science, Innovations and Global Solutions* (Poland, July 31, 2024). Poland, 2024. P. 310–313. (Особистий внесок Рябого М. І. аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень з культивування апікальних меристем, обґрунтування отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

4. **Рябий М. І.** Ідентифікація збудників вірусних і бактеріальних хвороб винограду. *Perspectives of contemporary science: theory and practice* : матеріали 12-ї міжнар. наук.-практ. конф. (м. Львів, 13–15 січня 2025 р.). Львів, 2025. С. 36–41. (Особистий внесок Рябого М. І. аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень, обґрунтування отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

5. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Статистичне обґрунтування окремих показників культивування апікальних меристем винограду. *Latest research in the development of science and education* : матеріали XXVI International scientific and practical conference (June 30 – July 02, 2025). Prague, Czech Republic, 2025. P. 7–11. (Особистий внесок Рябого М. І. аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

6. Конуп Л. О., **Рябий М. І.** Методи діагностики вірусу скручування листя винограду – “*GRAPEVINE LEAF ROLL-ASSOCIATED*” і оздоровлення виноградної лози від цього збудника. Тези доповідей XVI з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (м. Київ, 2–6 червня 2025 р.). Київ, 2025. С. 282. (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень).

7. **Рябий М. І.**, Зеленянська Н. М. Метод термотерапії для оздоровлення винограду від збудника хвороби скручування листя-3. *Innovation and modern technologies for the development of science* : Abstracts of II International Scientific and Practical Conference (Prague, January 12–14, 2026). Prague, Czech Republic, 2026. P. 11–16. (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

8. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Застосування методів культури тканин і органів *in vitro* для оздоровлення сільськогосподарських культур. *Новітні технології сучасного суспільства* : матеріали I науково-практичної конференції (м. Харків – м. Люблін, 21–23 січня 2026 року). Україна – Польща, 2026. С.43–45. (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалу до публікації).

Статті, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Конуп Л. О., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., **Рябий М. І.** Фітоплазмова інфекція на виноградних рослинах сорту Шардоне і оздоровлення їх методом термотерапії. *Вісник виноградарства і виноробства*. 2023. Вип. 2. С. 58–63. (Особистий внесок Рябого М. І.: аналіз літературних джерел, проведення лабораторних досліджень).

ЗМІСТ

	Стор
АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	16
...	
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ	I 18
ТЕРМІНІВ.....	
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1 ХРОНІЧНІ ХВОРОБИ ВИНОГРАНОЇ ЛОЗИ ТА МЕТОДИ ЇХ ОЗДОРОВЛЕННЯ (огляд літератури).....	27
1.1. Вірусна хвороба скручування листя.....	27
1.2. Бактеріальний рак	38
1.3. Ідентифікація сортів молекулярно-генетичними методами.....	43
1.4. Біотехнологічні методи оздоровлення винограду.....	46
Висновки до розділу 1.....	57
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	62
2.1. Польові досліді (фітосанітарне обстеження виноградних насаджень).....	62
.	
2.2. Лабораторні методи ідентифікації збудників вірусних хвороб і бактеріального раку виноградної	64

I	ОРГАНІВ	<i>IN</i>	97
	<i>VITRO</i>		
4.1.	Метод	апикальних	97
	меристем.....		
4.2.	Метод		106
	термотерапії.....		
4.3.	Метод хіміотерапії.....		119
	Висновки до розділу 4.....		135
РОЗДІЛ 5 ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОЗДОРОВЛЕННЯ			
ВИНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН І ОРГАНІВ <i>IN</i>			
	<i>VITRO</i>		140
..			
	Висновки	до	розділу 147
5.....			
	ВИСНОВКИ.....		149
.			
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ПО ЗАСТОСУВАННЮ			
РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВОГО 153			
ДОСЛІДЖЕННЯ.....			
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ 156			
ДЖЕРЕЛ			
ДОДАТКИ..... 184			
.			

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

ННЦ «ІВіВ ім. В.Є Таїрова» НААН України – Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова» Національної
академії аграрних наук України

ІФА – імуноферментний аналіз

GLD – *Grapevine leafroll disease* – хвороба скручування листя виноградної
лози

GLRaV3 – (*Grapevine leafroll-associated virus 3*) 3-й вірус хвороби
скручування листя

R. radiobacter – (*Rhizobium radiobacter*) збудник бактеріального раку
виноградної лози

ОЩ₄₀₅ (OD₄₀₅) – оптична щільність при довжині хвилі 405 нм

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РЧ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу

МС – поживне середовище Мурасіге і Скуга

ГК – гіберелова кислота

6-БАП – 6-бензиламінопурин

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксифенова кислота

ІОК – індоліл-3-оцтова кислота

ТДЗ – тідіазурон

НОК – α -нафтилоцтова кислота

АМ – апікальні меристеми

ТТ – термотерапія

ХТ – хіміотерапія

КЕ – коефіцієнт елімінації

ВСТУП

Актуальність теми. Віруси завдають значної шкоди виноградникам у всьому світі; їх кількість є значною, і з кожним роком з'являються нові форми, що уражують виноградні рослини. Вони негативно впливають на приживлюваність рослин на постійному місці, формування габітусу кущів, вихід продуктивної лози з куща, щеплених саджанців зі шкілки, а також на довговічність виноградних кущів. Використання для розмноження інфікованих вірусами чубуків прищеп і підщеп призводить до поширення уражених рослин у виноградних насадженнях, що супроводжується зниженням ефективності їх експлуатації та збільшенням економічних витрат.

У зв'язку з необхідністю інтенсифікації виноградарства все більшого значення набуває розробка високоефективних технологій виробництва оздоровленого садивного матеріалу винограду.

На теперішній час, в умовах антропогенних систем, поширення та шкідливість фітопатогенів внаслідок появи нових штамів вірусів та розмноження ураженого садивного матеріалу суттєво зростають. Найбільш шкідливі віруси здатні призводити до втрат від 20 до 70 % врожаю. Тому аналіз поширення вірусних і бактеріальних хвороб, прогнозування їх розвитку, знищення вогнищ карантинних об'єктів та створення безвірусного розсадництва винограду є актуальними завданнями системи захисту рослин [132].

За даними багатьох дослідників, поширення хвороб вірусної та бактеріальної етіології на виноградних насадженнях можна ефективно контролювати шляхом виробництва та використання сертифікованого садивного матеріалу, протестованого на наявність вірусів. Це знижує потенціал зараження, особливо в регіонах, де поширені переносники патогенів [69]. Створення виноградників у зонах, вільних від переносників

(зокрема нематод), також сприяє зменшенню поширення вірусів [40]. До ефективних профілактичних заходів належать: видалення кущів із вираженими симптомами захворювання та сусідніх рослин, знищення залишкових коренів, застосування хімічного або біологічного контролю комах-переносників і нематод, а також використання толерантних або стійких до вірусів та переносників сортів винограду. Проте хімічний контроль нематод часто є малоефективним, екологічно небезпечним і потенційно шкідливим для людини. Створення резистентних сортів розглядається як перспективний напрям, однак на практиці воно обмежується переважно експериментальними генотипами або модельними рослинами, оскільки джерела генетичної стійкості виноградної лози до вірусів наразі відсутні.

Найефективніше підтримання необхідного санітарного статусу виноградної лози забезпечується завдяки біотехнологічним методам оздоровлення, серед яких найбільш поширеними є: термотерапія *in vivo* та *in vitro* [133, 176], хіміотерапія [139], культура меристем і верхівок пагонів [142, 143], соматичний ембріогенез [49], а також електротерапія та кріотерапія [43]. Основним обмеженням останніх трьох методів є низька ефективність та ризик індукції генетичних змін у клітинах рослини. Найвищу ефективність в отриманні безвірусних рослин винограду показало поєднання термо- або хіміотерапії з культурою меристеми чи верхівок пагонів, що забезпечує стабільне оздоровлення рослинного матеріалу. В Україні дослідження з використанням зазначених біотехнологічних підходів для оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro* практично не проводилися, що зумовлює актуальність і перспективність даного напрямку досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на базі лабораторії вірусології і мікробіології, акредитованої відповідно до міжнародного стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2019 і відділу розсадництва, розмноження та біотехнології

винограду Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України в межах науково-дослідних робіт Національної академії аграрних наук України: «Дослідження масштабів ураженості виноградних насаджень Півдня України вірусними, фітоплазмовими і бактеріальними хворобами винограду, діагностика та створення системи оздоровлення від них при виробництві сертифікованого посадкового матеріалу» (номер державної реєстрації 0121U107838).

Мета та завдання дослідження. Метою досліджень було вивчення поширення, шкідливості основних вірусних і бактеріальних хвороб винограду на півдні України та розробка науково обґрунтованих способів оздоровлення *in vitro*.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати наступні завдання:

1. Провести фітосанітарне обстеження виноградників Одеської області, виявити збудників вірусних хвороб і бактеріального раку винограду.
2. Оцінити шкідливість 3-го вірусу хвороби скручування листя виноградної лози та обґрунтувати необхідність оздоровлення садивного матеріалу.
3. Удосконалити методи діагностики вірусів (полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу).
4. Провести ПЛР діагностику зразків виноградної лози різних сортів на наявність вірусів хвороби скручування листя винограду і бактеріального раку.
5. Провести ідентифікацію сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний», які використовують для виробництва сертифікованого садивного матеріалу.
6. Розробити протокол культивування апікальних меристем винограду та оздоровлення рослин за їх використання *in vitro*.
7. Розробити ефективні способи проведення термотерапії та хіміотерапії винограду *in vitro*, які забезпечать і високий рівень елімінації вірусу хвороби скручування листя, і оптимальний рівень регенерації, розвитку ініціальних

експлантів, мікроклонів винограду після оздоровлення.

8. Визначити коефіцієнт елімінації *GLRaV-3* після різних способів оздоровлення винограду в культурі *in vitro*.

9. Оцінити економічну ефективність оздоровлення винограду в культурі *in vitro*.

Об'єкт дослідження – ідентифікація 3-го вірусу хвороби скручування листя виноградної лози і збудника бактеріального раку та оздоровлення винограду сортів «Одеський чорний» і «Каберне Совіньйон», уражених цими фітопатогенами.

Предмет дослідження – 3-й вірус (*Grapevine leafroll-associated virus 3*) хвороби скручування листя виноградної лози (*Grapevine leafroll disease*), збудник бактеріального раку виноградної лози (*Rhizobium radiobacter*), морфогенез ініціальних експлантів, мікроклонів винограду після різних способів оздоровлення.

Методи досліджень. У дослідженні було застосовано комплекс загальноприйнятих у виноградному розсадництві методів:

- *біотехнологічні* – для ідентифікації збудників (серологічний (імуноферментний аналіз (ІФА)), молекулярно-генетичний (метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (РЧ-ПЛР)) та оздоровлення винограду *in vitro*;
- *польові* – для проведення фітосанітарного обстеження виноградних насаджень;
- *біометричні* – для оцінки стану та динаміки росту вегетативної маси ініціальних експлантів, мікроклонів винограду після оздоровлення за різних способів;
- *порівняльно-розрахункові* – для економічної оцінки системи ідентифікації збудників та оздоровлення винограду від вірусних і бактеріальних хвороб;
- *дисперсійного аналізу* – для статистичної обробки отриманих

експериментальних даних.

Наукова новизна. Наукова новизна отриманих результатів дисертаційної роботи розкривається у таких положеннях.

Вперше:

- ідентифіковано 3-й вірус хвороби скручування листа виноградної лози методом ПЛР зі зворотною транскрипцією у режимі реального часу;
- проведено секвенування геному ізолятів агробактерій, виділених із виноградної лози на насадженнях Одеської області. Показано, що майже всі вони є вірулентними, генетично відрізняються між собою і, в основному, мають: октопінову Tі-плазмиду, яка відповідає за їхню патогенність;
- розроблено протокол культивування апікальних меристем винограду та їх використання для оздоровлення мікроклонів від збудника хвороби скручування листа винограду;
- розроблено ефективний спосіб проведення хіміотерапії *in vitro* для ефективної елімінації мікроклонів винограду від *GLRaV-3*;
- доведено ефективність елімінації *GLRaV-3* шляхом комбінації різних способів оздоровлення винограду *in vitro*;
- визначено основні фактори впливу на ефективність оздоровлення винограду *in vitro*.

Удосконалено:

- метод ПЛР для ідентифікації 3-го вірусу хвороби скручування листа та збудника бактеріального раку виноградної лози;
- склад поживного середовища для культивування апікальних меристем винограду;
- спосіб проведення термотерапії *in vitro* для ефективної елімінації винограду від *GLRaV-3*.

Набули подальшого розвитку:

- процес ідентифікації патогенних і непатогенних штамів агробактерій на основі типу Tі-плазмиди (октопінові і нопалінові) та фрагментів *virD2* і

virF генів одночасно, що і обумовлює високу вірулентність;

- встановлення шкідливості 3-го вірусу хвороби скручування листя;
- визначення коефіцієнту елімінації *GLRaV-3* у культурі тканин і органів *in vitro* після різних способів оздоровлення;
- етапи культивування винограду в культурі тканин і органів *in vitro*.

Практичне значення. Проведено візуальне обстеження виноградних насаджень в Одеській області, виявлено та ідентифіковано 3-й вірус хвороби скручування листя на сортах винограду «Одеський чорний» і «Каберне Совінйон». Вперше було показано, що завдяки удосконаленню методу ПЛР у реальному часі можна ідентифікувати одразу декілька збудників, а саме 3-й вірус хвороби скручування листя і збудника бактеріального раку виноградної лози. Вперше показано, що секвеновані штами агробактерій були генетично різноманітними і представлені кількома геномовидами, більшість із яких несуть онкогенні Ті-плазмиди і є збудниками бактеріального раку виноградної лози. Розроблені та удосконалені способи оздоровлення винограду у культурі тканин і органів *in vitro* сприятимуть виробництву здорового садивного матеріалу винограду особливо цінних сортів та клонів різних категорій якості.

Наведені способи оздоровлення винограду *in vitro* пройшли виробничу перевірку та застосовуються для вирощування мікроклонів технічних сортів винограду для ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України, про що свідчить акт впровадження (Додаток А. 1).

Результати, отримані під час виконання дисертаційної роботи з питань ідентифікації збудників шкідливих вірусних і бактеріальних хвороб винограду, сучасних методів оздоровлення винограду від них та технології вирощування мікроклональних саджанців винограду високих біологічних категорій якості, пройшли апробацію і використовуються в освітньому процесі під час підготовки аспірантів, які навчаються за ОНП «Виноградарство» в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України (Додаток

A. 2).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота виконана здобувачем як самостійне наукове дослідження. Автором здійснено широкий інформаційний пошук і комплексний аналіз наукових джерел за тематикою роботи, сформульовано мету та завдання досліджень. Для отримання наукових результатів автором дисертації особисто було розроблено схеми та закладено лабораторні досліди, виконано обробку і узагальнення даних дослідження, підготовлено публікації за матеріалами згідно з темою дисертації. Обґрунтування та опрацювання висновків, тексту дисертації написані особисто здобувачем. Окремі факти та закономірності інтерпретувались із урахуванням порад та консультацій наукового керівника і фахівців ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» НААН України.

Секвенування і філогенетичний аналіз виділених ізолятів агробактерій проводили спільно з колегами кафедри ботаніки та патології рослин Університету штату Орегон (США).

У спільних наукових працях, опублікованих у співавторстві, права співавторів не порушено, авторство здобувача становить 60,0 – 70,0 %. Усім колегам, хто допомагав у виконанні цієї роботи, автор висловлює щирю подяку.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на:

- ✓ Засіданнях вченої ради ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України з 2022 по 2026 рр..
- ✓ The 20th Congress of the International Council for the Study of Virus & Virus-like Diseases of the Grapevine (Thessaloniki, Greece, 25-29 September 2023).
- ✓ The VI International Scientific and Practical Conference «Perspectives of contemporary science: theory and practice» (Lviv, Ukraine, 22-24 July 2024).
- ✓ The International Conference on Science, Innovations and Global Solutions

(Poland, July 31, 2024).

- ✓ The 12th International scientific and practical conference “Perspectives of contemporary science: theory and practice” (Lviv, Ukraine, January 13-15, 2025).
- ✓ The XXVI International scientific and practical conference «Latest research in the development of science and education» (Prague, Czech Republic, June 30 – July 02, 2025).
- ✓ XVI з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (м. Київ, Україна, 2–6 червня 2025 року).
- ✓ The II International Scientific and Practical Conference «Innovation and modern technologies for the development of science» (Prague, Czech Republic, January 12-14, 2026).
- ✓ I науково-практичній конференції «Новітні технології сучасного суспільства» (м. Харків – м. Люблін, Україна – Польща, 21–23 січня 2026 року).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, у тому числі: 5 статей у виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, 1 стаття – у зарубіжному виданні, 1 стаття у іншому науковому виданні, 8 публікацій – матеріали і тези конференцій (Додаток Б).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 194 сторінках комп'ютерного тексту, у тому числі 155 – основного тексту, що складається з анотації, списку скорочень, вступу, п'яти розділів, висновків і практичних рекомендацій. Містить 14 таблиць, 24 рисунки і 3 додатки. У списку використаних джерел 229 найменувань, із яких 220 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ХРОНІЧНІ ХВОРОБИ ВИНОГРАНОЇ ЛОЗИ ТА МЕТОДИ ЇХ ОЗДОРОВЛЕННЯ (огляд літератури)

1.1. Вірусна хвороба скручування листя

Виноградна лоза вважається одним із найважливіших носіїв вірусів рослин, маючи близько 70 задокументованих різних вірусних та вірусоподібних агентів [166]. Серед них віруси, пов'язані з хворобою скручування листя виноградної лози *Grapevine leafroll disease (GLD)*, які є найпоширенішими та мають важливе економічне значення у всьому світі; *GLD* уражає технічні, столові та підщепні сорти винограду [167]. Наразі відомо шість різних вірусів, пов'язаних із хворобою скручування листя виноградної лози (*GLRaV*), які мають номери *GLRaV-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-7* та *-13*. *GLRaV* належать до родини *Closteroviridae* та поділяються на три роди: *Ampelovirus (GLRaV-1, -3, -4, -13)*, *Closterovirus (GLRaV-2)* та *Velarivirus (GLRaV-7)* [44]. У межах роду *Ampelovirus* було сформовано дві підгрупи, де *GLRaV-1*, *-3* та *-13* віднесені до підгрупи I, а *GLRaV-4* – до підгрупи II [78]. Віруси *GLD* переважно локалізуються у клітинах, пов'язаних із флоемою, та характеризуються нерівномірним розподілом у рослинах [169]. Хоча загально визнано, що етіологія *GLD* є складною, і відноситься до кластеровірусів (*Closteroviridae*), асоційованих із хворобою, саме вірус скручування листя винограду 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*) несе назву як «основний етіологічний агент», що сприяє розвитку хвороби і є найнебезпечнішим вірусом цієї хвороби. Частинки *GLRaV-3* є гнучкими нитками, розміром 1800x12 нм, що демонструють чітку перехресну смугастість. Вони мають спіральну структуру та містять приблизно 10 білкових субодиниць на виток спіралі, яка має довжину близько 3,5 нм [147]. 34 kDa основний білок оболонки (CP) покриває всю довжину віріонів, за

винятком 50-го кінця (близько 100 нм). 50-й кінець вірусного геному, ймовірно, інкапсидований структурою віріонного хвоста, подібно до структури інших членів родини *Closteroviridae*, яка включає білки, кодовані ORF4 (HSP70h), ORF5 (p55) та ORF7 (CPm) вірусного геному, і може бути інструментом у визначенні міжклітинного та системного транспорту [77]. Геном являє собою одноланцюгову молекулу РНК, що становить приблизно 5,0 % ваги частинки.

Хвороба GLD є однією з основних вірусних хвороб виноградної лози (*Vitis vinifera* L.), яка, ймовірно, походить зі «Старого Світу» і поширилася по всьому світу переважно через комерційне переміщення садивного матеріалу. Є докази того, що симптоми скручування листя винограду зустрічалися у Європі та інших регіонах Середземноморського басейну і Близького Сходу до появи філоксери (*Dactulosphaira vitifoliae*) і поширилися зі сходу Сполучених Штатів у середині дев'ятнадцятого століття [90]. Опис у старій європейській літературі як «почервоніння» листя, аномальний стан сортів винограду з червоними ягодами, що полягає у ранньому знебарвленні листя, яке накопичувало вуглеводи та проявлялося згортанням пластинок униз. Цей стан часто пояснювали фізіологічними розладами та називали «rougeau» у Франції та «rossore» в Італії. Наявність сухих пагонів винограду в гербаріях, зібраних на північно-східній Сицилії між 1880 та 1888 роками демонструють різний ступінь знебарвлення листя. Симптоми скручування листя спостерігали на виноградниках тих країн, де виноград вирощувався століттями, наприклад, на Кіпрі [119], Ємені [148], частині Китаю [181], у Вірменії та південній Туреччині, які були вільні від філоксери.

Етіологія *GLD* залишалася невизначеною, до тих пір, поки успішна передача шляхом щеплення з винограду на виноград не довела його інфекційну природу. Хоча було встановлено, що *GLD* є інфекційним захворюванням, можливо, вірусного походження, його збудник був невідомим. Прорив стався наприкінці 1970-х років, коли у тонких зрізах

флоемної тканини та листках уражених *GLD* лоз було виявлено частинки, подібні до кластеровірусів. Це свідчило про те, що цей тип вірусів може бути збудником захворювання. Такий висновок невдовзі був підтверджений ультраструктурними дослідженнями листя, уражених *GLD* лоз [86, 61]. Другий прорив стався, коли ідентифікували [101] два серологічно неспоріднені кластеровірусоподібні віруси в очищених препаратах із симптоматичного листя винограду, із довжиною частинок 2200 нм та 1800 нм, відповідно. Ці два віруси були позначені як віруси, асоційовані з вірусом скручування листя 1 та 2 (*GLRaV-1* та *GLRaV-2*). Третій серологічно неспоріднений вид, що було спочатку припущено, а потім доведено, що його передають псевдококцидні борошністі червці [185], був включений до асоційованих із *GLD* після перегляду номенклатури вірусів [51]. Подальші дослідження в Європі [101, 102, 229] та США [117] виявили ще п'ять серологічно неспоріднених кластероподібних вірусів, пов'язаних із комплексом *GLD*. Впровадження молекулярних технологій, особливо нуклеотидного секвенування, виявило кластеровірусів понад 10, але потім було запропоновано суттєву консолідацію, яка зменшила їх кількість до п'яти [147]. Але, вірус *GLRaV-3* залишається безперечним первинним агентом, пов'язаним із *GLD*.

Симптоми хвороби скручування листя. Симптоми хвороби скручування листя винограду можуть значно відрізнятися залежно від сезону, сорту винограду та кліматичних умов. Крім того, деякі сорти можуть бути повністю безсимптомними, як наприклад, окремі підщепи та окремі білі сорти *Vitis vinifera*. Саме вони можуть служити джерелом передачі цієї хвороби іншим сортам, які проявлятимуть низку симптомів. Навесні розпускання бруньок та розвиток пагонів часто затримуються на лозах, уражених хворобою скручування листя. Зазвичай це короткочасне явище, яке триває тільки декілька тижнів. Симптоми скручування листя вперше проявляються на початку-середині літа, часто з'являються раніше на лозах,

які зазнають водного стресу. Кількість та вираженість цих симптомів збільшуються і проявляються ближче до пізньої осені (рис. 1.1).



Рис. 1.1 Симптоми *GLRaV-3* на білому (А) і червоному (Б) сортах винограду (зелені прожилки на жовтому та червоному фоні) [180]

У червоних сортів виноградної лози розвиваються кольорові плями, які з часом збільшуються та зливаються, так що більша частина міжжилкової поверхні листка має червоне або червонувато-фіолетове забарвлення з вузькою смужкою листової тканини навколо первинних та вторинних жилок, яка залишається зеленою. У більшості червоних сортів *GLD* викликає почервоніння міжжилкових ділянок, тоді як первинні та вторинні жилки залишаються зеленими. Листя деяких червоних сортів, особливо з інтенсивно забарвленими ягодами, набуває однорідного червоного кольору без зелених жилок. У білих сортів виноградної лози міжжилкова ділянка може стати хлоротичною. Цей симптом часто буває ледь помітним, а може бути і зовсім непомітним.

Наприкінці осені краї листя скручуються вниз, проте ступінь скручування листя значно змінюється серед уражених сортів. Білі сорти, такі як «Шардоне», проявляють виражене скручування листя до моменту збору врожаю, тоді як сорти «Thompson Seedless» та «Sauvignon Blanc» проявляють

незначне скручування листя або взагалі його немає. У цих білих сортів хворобу *GLD* майже неможливо виявити візуально. Американські підщепи зазвичай є безсимптомними носіями пов'язаних вірусів, за винятком зниження сили росту кущів.

GLRaV можуть виникати як самостійні або змішані інфекції різних комбінацій, і як наслідок цього, прояв та вираженість симптомів буде різним [145, 146]. Загалом, віруси *GLRaV-1*, *GLRaV-3* та більшість штамів *GLRaV-2* викликають сильно виражені симптоми хвороби *GLD*, тоді як віруси *GLRaV-4* та *GLRaV-7* викликають тільки легкі прояви симптомів або вони можуть бути зовсім відсутні. Поки що мало що відомо про патогенність та симптоматику нещодавно виявленого вірусу *GLRaV-13* [120].

Пізньої осені краї листя починають скручуватися вниз, що відповідає назві хвороби [78]. Симптоми білоягідних сортів, які проявляються у вигляді легкого пожовтіння або хлоротичної плямистості, зазвичай ледь помітні, що ускладнює візуальну оцінку хвороби. Більше того, деякі білі сорти *Vitis vinifera*, більшість підщеп та дикі види *Vitis* можуть бути повністю безсимптомними, що робить діагностику хвороби на основі симптомів недостатньо надійною [166]. Отже, ризик поширення хвороби є великим, якщо для розмноження та щеплення використовуються неперевірені підщепи [219, 149, 147].

Оскільки виноград розмножується вегетативно ці віруси зазвичай заносяться на виноградники через інфікований садивний матеріал із подальшим локальним поширенням деяких вірусів *GLRaV* переносниками, такими як борошнистий червець та деякими видами м'яких щитівок [209].

Сорти винограду, стійкі до хвороби скручування листя. Ступінь прояву симптомів та втрати врожаю через *GLD* залежать від комбінації вірусів, сортів, підщеп, клімату, ґрунту та технології культивування. Хоча деякі сорти є симптоматичними, джерел стійкості до *GLD* у сортів та клонів *V. vinifera* ще не виявлено [219]. Реакції на інфекцію різними вірусами *GLD*

або їх комбінаціями у різних підщеп значно відрізняються. Наприклад, було помічено, що сорти винограду на підщепах «Freedom» та «Harmony» сильно уражалися цими вірусами, на відміну від тих, що були щеплені на інших підщепах [95]. Повідомлялося, що штами *RG* та *PN GLRaV-2* викликають летальну сумісність щеп у певних комбінаціях прищеп та підщеп. Щеплення *V. vinifera* та підщепи: «Couderc 1616», «Kober 5BB», «Teleki 5C», «Couderc 3309» та «Paulsen 1103» виявилось найбільш чутливим [35].

Діагностика вірусів хвороби скручування листя. На сьогодні жодного ефективного методу лікування *GLD* у польових умовах не існує. Отже, для зменшення поширення хвороби можна застосовувати тільки профілактичні заходи, у тому числі своєчасну діагностику латентних форм вірусів хвороби скручування листя. У деяких країнах були створені програми сертифікації для вирощування та поширення здорового садивного матеріалу винограду. Ці програми передбачають тестування на наявність *GLD* та інших хвороб із метою отримання та підтримання оздоровленого рослинного матеріалу, який можна одержати за допомогою стратегій елімінації вірусів, що включають термотерапію, культивування апікальних меристем [192], соматичний ембріогенез [91] і навіть хіміотерапію експлантів, вирощених *in vitro* [174]. Як стратегія управління хворобами, виробникам наразі рекомендується під час закладання нових виноградників висаджувати сертифікований садивний матеріал, отриманий із підщеп, протестованих на віруси. У районах, де це неможливо, підщепи слід ретельно перевіряти на наявність вірусів за допомогою лабораторних тестів. Максимальне просторове відокремлення нових насаджень від старих, уражених вірусом, має знизити швидкість його поширення. Знищення заражених лоз, у яких діагностовано віруси, пов'язані з *GLD*, також має зменшити їх поширення. Крім того, доцільно обмежити переміщення сільськогосподарської техніки між виноградниками, оскільки це може сприяти поширенню борошнистого червця.

Отже, окрім висаджування сертифікованого садивного матеріалу

винограду, вільного від вірусів, одним із найпоширеніших підходів є ідентифікація заражених рослин та їх подальше викорчовування. На сьогоднішній день для виявлення вірусів, пов'язаних із *GLD*, у рослинному матеріалі застосовується кілька методів, включаючи біологічне індексування, серологію, методи на основі нуклеїнових кислот та секвенування наступного покоління.

Біологічне індексування. До кінця 1980-х років єдиним надійним методом тестування на *GLD* було індексування різних сортів винограду за біологічними індикаторами. Невелику бруньку-щепу від рослини-кандидата для тестування прищеплювали на індикаторний сорт винограду [187, 71]. Рослини-індикатори з прищепленим матеріалом висаджували в полі та спостерігали протягом щонайменше двох сезонів для виявлення розвитку симптомів вірусного захворювання [218]. *V. vinifera* cvs «Cabernet Franc», «Pinot Noir», «Cabernet Sauvignon» або «Barbera» можуть використовуватися як господар-індикатор, залежно від сортових властивостей та/або кліматичних умов, за яких вирощується індикатор.

Зелене щеплення – це ще один біологічний метод індексування, який застосовують для скринінгу виноградного матеріалу на наявність вірусів, зокрема *GLRaV-3* [178]. Зелені пагони або бруньки прищеплюють на зелені пагони сортів-індикаторів, що дозволяє спостерігати за розвитком симптомів навіть на віддалено споріднених видах *Vitis* [213].

Біологічне індексування деревних індикаторів є трудомістким, тривалим та залежить від успішної інокуляції асоційованих вірусів [218]. Нерівномірний розподіл вірусу, варіації штамів у межах асоційованих видів вірусів, низький титр вірусу та відсутність експресії симптомів також можуть впливати на результати, отримані за допомогою індексування [71]. Проте біологічне індексування виявляє саме захворювання, а не окремі асоційовані віруси. Хоча цей метод може ефективно виявляти захворювання, він потребує участі кваліфікованого вірусолога для підтвердження діагнозу і

частково спирається на суб'єктивні візуальні спостереження.

У цьому контексті було розроблено кілька діагностичних методів для своєчасного виявлення захворювань, серед яких найбільш актуальними є серологічний та молекулярний аналізи [48, 188]. Серологічні, методи, такі як імуноферментний аналіз (ІФА), використовуються для виявлення вірусних білків, що дозволяє проводити високопродуктивний скринінг [48, 129].

Серологічні методи діагностики. Було розроблено багато різних форматів серологічних діагностичних методів; до них належать імуноферментний аналіз (ІФА), імунофлуоресценція (ІФ) та імуно-стріп-тести [195]. Хоча ІФА не такий чутливий, як методи на основі нуклеїнових кислот, його надійність та масштабованість роблять його популярним для рутинного тестування великих партій саджанців і лози для виявлення вірусів, пов'язаних із *GLD*, що використовуються для розмноження [217].

Методи на основі нуклеїнових кислот. Як альтернатива, для виявлення вірусного геномного матеріалу застосовуються молекулярні методи, засновані на зворотній транскрипції, з подальшою полімеразною ланцюговою реакцією (ЗТ-ПЛР), які забезпечують високу чутливість [188]. Останніми роками методи на основі нуклеїнових кислот усе частіше використовуються для розробки діагностичних тестів для рослинних патогенів. ПЛР із зворотною транскрипцією була розроблена для патогенів із РНК-геномами [217], таких як більшість вірусів винограду, включно з *GLRaV-3*. Геномна РНК *GLRaV-3* є гетерогенною, і на сьогоднішній день відомо шість генетичних варіантів вірусу [121, 98, 214, 134].

Також була успішно застосована точкова ПЛР для виявлення фітопатогенів у рослинах, де невелика крапля соку з черешків листя виноградної лози поміщається на фільтрувальний папір та використовується як шаблон для ПЛР [171].

Іншою альтернативою традиційній ПЛР є метод петлевої ампліфікації нуклеїнової кислоти (*LAMP*). Метод *LAMP* ґрунтується на ізотермічній

ампліфікації цільової послідовності за допомогою ДНК-полімерази та чотирьох праймерів, що розпізнають шість цільових ділянок. Цей метод застосовували для виявлення вірусів, зокрема *GLRaV-3*, шляхом додавання зворотної транскриптази до протоколу *LAMP (RT-LAMP)* [180].

Секвенування наступного покоління. Сучасна діагностика хвороб виноградної лози спирається на методи ІФА або нуклеїнових кислот для виявлення вірусів, які в минулому були пов'язані з хворобами [32]. Хоча ці методи можуть бути дуже специфічними та надійними, вони не враховують внесок інших відомих або невідомих вірусів, які можуть бути задіяні в етіології захворювання. Також можуть існувати різні штами вірусу, які можуть залишатися невиявленими, якщо використовуються високоспецифічні протоколи ПЛР у реальному часі. Було показано, що використання метагеномного секвенування для встановлення загального вірусного комплексу зразка дозволяє уникнути цих обмежень сучасної діагностики рослинних вірусів [32, 70].

Незалежно від обраної методики, невідомі віруси або нові штами відомих вірусів можуть залишатися невиявленими, що призводить до хибнонегативних результатів [48]. В останні роки спектральні сенсори виявилися перспективним інструментом для діагностики захворювань, оскільки вони не залежать від генетичної чи фенотипової інформації про патогени. Ці датчики фіксують характеристики листя рослин у значній частині, зазвичай, у видимому VIS: 400–700 нм електромагнітному спектрі, ближньому інфрачервоному NIR: 700–1000 нм та короткохвильовому інфрачервоному у діапазонах SWIR: 1000–2500 нм [160]. Для аналізу можна використовувати або весь спектральний діапазон (гіперспектральний), або тільки вибрані спектри (мультиспектральний) [118]. Спектральні структури листя змінюються у відповідь на біохімічні та біофізичні зміни, спричинені абіотичними та біотичними стресами, такими як вірусні інфекції [47]. Оскільки спектральні датчики дозволяють об'єктивно та неінвазивно

оцінювати ознаки рослин, вони добре підходять для відстеження динаміки процесів, таких як розвиток симптомів. Сенсорні технології вже застосовують для розрізнення спектральних відбитків рослин, інфікованих вірусом, від здорових рослин [206]. У польових випробуваннях успішно було проведено мультиспектральні та гіперспектральні підходи для виявлення вірусу ламкості тюльпанів (*TBV*) у тюльпанів, а також вірусу картоплі *Y* (*PVY*) у рослин картоплі та томатів [100, 184, 182, 183]. Було проведено кілька досліджень із використанням тепличних рослин для виявлення вірусу плямистого в'янення томатів (*TSWV*) [215], вірусу жовтих жилок картоплі (*PYVV*) [64], вірусу зеленої плямистості огірка (*CGMMV*) [137] або вірусу жовтого листа томатів (*TYLCV*) [140]. У роботі Afonso A. M. [34] показано, що два сорти цитрусових, інфікованих вірусом цитрусових (*citrus tristeza virus*, *CTV*), який належить до кластеровірусів, тісно пов'язані з вірусом *GLRaV-2*. Дослідження показало, що 3-й вірус скручування листа уражує рослини півонії [158, 159]. Для виявлення симптомів *GLD* також використовують портативний спектродіометр (350–2500 нм) для збору даних гіперспектрального відбиття відокремлених здорових, безсимптомних та симптоматичних листків, тим самим досягаючи точності класифікації до 81,0 % [168]. Подібні дослідження були показані у роботах [112, 141], де використовували метод дистанційного зондування з повітря для отримання мультиспектральних та гіперспектральних зображень відповідно. Ці дослідження були направлені на виявлення вірусів *GLRaV-1* та *GLRaV-3* у біло- та червоноягідних сортів *Vitis* за допомогою гіперспектральної візуалізації в діапазоні 400–2500 нм.

Взаємодія між господарем і патогеном, передача *GLRaV-3*. Біологія векторної передачі *GLRaV-3* досліджена недостатньо, незважаючи на її очевидне значення для поширення хвороби в природних умовах. Поширення *GLRaV-3* через заражений рослинний матеріал досі залишається поширеним і має значне економічне та карантинне значення. Стратегії обмеження

розповсюдження цього вірусу ґрунтуються на виробництві здорового садивного матеріалу, який використовується у програмах сертифікації [190]. Немає доказів механічної передачі *GLRaV-3* через обрізку або інші методи догляду за рослинами. Єдиним засобом поширення патогену є векторна передача *GLRaV-3*. Роботу над векторною передачею вірусу *GLRaV-3* розпочали Rosciglione and Gugerli (1987) [186] та Engelbrecht and Kasdorf (1990) [82], які продемонстрували, що виноградний борошнистий червець (*Hemiptera, Pseudococcidae*), *Planococcus ficus*, був вектором *GLD*. Ця робота сприяла новим дослідженням, які призвели до ідентифікації кількох нових комах-переносників *GLRaV-3* та подальшої роботи над з'ясуванням поширення хвороби в польових умовах. Було встановлено, що передача *GLRaV-3* відбувається за допомогою різних видів борошнистих червців та кількох видів м'яких щитівок (*Coccidae*) [209], але мало що відомо про параметри, які впливають на ефективність передачі цього вірусу. Хоча м'які щитівки є експериментальними переносниками *GLRaV-3*, вони не вважаються епідеміологічно важливими [144].

Економічний вплив *GLRaV-3* на виноградні рослини. *GLRaV-3* завдає значних економічних збитків у виноградарському і виноробному виробництвах. Вірус *GLRaV-3* знижує врожайність (на 20,0–40,0 %), розмір кластерів, затримує дозрівання плодів, змінює колір ягід шляхом зниження вмісту антоціанів, збільшує титруючу кислотність, зокрема вміст яблучної та винної кислот, змінює хімічний склад фруктового соку шляхом зменшення вмісту розчинних твердих речовин. Вина, виготовлені з ягід, зібраних із кущів, інфікованих *GLRaV-3*, містять менше пігментів, фенолів, танінів і спирту порівняно з винами з ягід здорових рослин [38, 93, 204]. *GLRaV-3* спричиняє різке зниження фотосинтезу листків [103], вмісту вільних амінокислот (валін, метіонін, глутамінова кислота) у ягодах, збільшує вагу шкірки та м'якоті [40]. Аналіз транскриптоми показав зміну процесу дозрівання ягід, зокрема генів, що беруть участь у біосинтезі антоціанів та

метаболізмі цукру, у інфікованих *GLRaV-3* сортів *V. vinifera* сорту «Cabernet Sauvignon». Аналогічно, у листках інфікованих *GLRaV-3* сортів *V. vinifera* сорту «Merlot» порівняно зі здоровими лозами спостерігається збільшення кількості ключових генів, що беруть участь у процесі біосинтезу флавоноїдів, що призводить до затримки синтезу антоціанів, кверцетину та мірицитину [103, 104].

1.2. Бактеріальний рак

Бактеріальний рак – це найнебезпечніша хронічна бактеріальна хвороба виноградної лози, яка дуже поширена на виноградниках у всьому світі та завдає великої шкоди [130], але не включена до (європейських) карантинних списків, хоча включена до схеми сертифікації Європейської організації захисту рослин (EPPO). РМ 4/8 (2): РМ 4/8 (2): Патогенно-перевірений матеріал сортів та підщеп винограду [172].

Через відсутність карантинних вимог щодо бактеріального раку, садивний матеріал винограду під час експорту в Україну раніше не перевіряли на наявність латентної інфекції. Ймовірно, це призвело до збільшення кількості уражених рослин [157]. Виявлення прихованої інфекції під час імпорту, експорту та безпосередньо на насадженнях є критично важливим для запобігання спалахам хвороби і підтримання продуктивності виноградників [136].

Сорти винограду мають різну чутливість до збудника бактеріального раку. Рівень їхнього ураження залежить від сортових особливостей, кліматичної зони вирощування та специфіки штамів збудників (*Agrobacterium vitis* та *Agrobacterium radiobacter*) [57, 122, 92]. Встановлено, що у рослин, уражених бактеріальним раком, урожайність знижується на 10,0–20,0 %, вміст цукру в ягодах – у середньому на 15,0–20,0 %. Крім того, погіршуються біометричні та технологічні показники, затримується

визрівання лози [58, 222]. Континентальний клімат України, періодичні заморозки та механічні пошкодження багаторічної деревини сприяють прояву симптомів бактеріального раку винограду (до 50,0 %) [156, 157]. Відомо, що морозобоїни суттєво підвищують рівень ураження винограду цією хворобою [59, 212]. Оскільки бактеріальний рак є системним хронічним захворюванням, ефективні засоби лікування практично відсутні. Основними заходами боротьби залишаються профілактика та своєчасне виявлення латентної інфекції за допомогою сучасних методів діагностики, зокрема ПЛР [107, 157, 88].

Бактеріальний рак спричиняють штами пухлиногенних бактерій *Agrobacterium vitis* (*A. vitis*) та *Agrobacterium tumefaciens* (*A. radiobacter*), які здатні тривалий час перебувати в рослині в латентному стані до настання сприятливих для прояву симптомів умов [58, 212]. Збудник хвороби уражає не тільки виноградну лозу, а й сотні інших дводольних рослин, де основним патогеном виступає переважно *A. tumefaciens* [94]. Ця хвороба винограду відома вже понад 100 років [59]. Перші відомості про її інфекційну природу з'явилися у 1897 році в Італії, а вже у 1907 році в США було вперше виділено збудника, який отримав назву *Agrobacterium tumefaciens* [200]. Це грамнегативна паличкоподібна бактерія, що уражає понад 140 видів рослин, переважно дводольних покритонасінних та голонасінних. Шляхом інокуляції різних видів рослин автори продемонстрували здатність цього патогену індукувати утворення пухлин (рис. 1.2).

Систематика *Agrobacterium spp.* змінювалася багато разів. Результати біохімічних та ДНК-досліджень показали, що *Agrobacterium spp.*, виділені з виноградної лози, утворюють окрему групу і відрізняються від інших ізолятів, виділених із інших плодових, ягідних та квіткових рослин [173]. Поєднання філогенетичних і геномних досліджень показали, що агробактерії *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium*, *Pararhizobium* та *Shinella* споріднені на рівні роду, що називається комплексом

Agrobacterium-rhizobium (ARC) [220].



А

Б

Рис. 1.2. Симптоми бактеріального раку винограду:

А – пухлина на штабмі лози; Б – ураження однорічної рослини [208]

У межах групи ARC види, традиційно відомі як *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* та *Agrobacterium vitis* класифікуються як біовари 1 (BV1), 2 (BV2) та 3 (BV3) відповідно. Спочатку *A. tumefaciens* вважався біоваром-3, але пізніше був ідентифікований як вид і названий *Agrobacterium vitis* [173]. Хоча іноді використовуються *A. radiobacter* (*A. tumefaciens* біовар 1) та *A. rhizogenes* (раніше *A. tumefaciens* біовар 2) [128, 30, 92].

Подальші молекулярні дослідження, засновані на багатолокусному послідовному аналізі (MLSA), показали, що пухлиногенні бактерії виноградної лози, класифіковані як *Agrobacterium vitis*, відрізняються від усіх інших штамів *Agrobacterium/Rhizobium* на рівні роду та були віднесені до відродженого роду *Allorhizobium* [163, 108, 135]. Згідно зі стандартною систематикою *A. tumefaciens* – це альфапротеобактерія родини *Rhizobiaceae*, яка включає азотофіксуючі симбіонти бобових. На відміну від азотфіксуючих симбіонтів, види *Agrobacterium*, що продукують пухлини, є патогенними та не приносять користі рослині. Назва цієї бактерії нещодавно була оновлена як *Rhizobium radiobacter*.

Сучасні дослідження підтвердили, що геном різних штамів *Rhizobium radiobacter* (*A. tumefaciens*) містить специфічні типи Ті-плазмід, які кодують синтез різних опінів – похідних амінокислот. Саме Ті-плазміда є безпосередньою причиною розвитку бактеріального раку. Фактично ця бактерія виступає «природним генним інженером», здатним переносити фрагмент власної ДНК (Т-ДНК) у рослинну клітину, змушуючи її синтезувати метаболіти (опіни), необхідні для виживання патогену. Окремі типи Ті-плазмід відповідають за синтез октопіну та агропіну [46]. Це дозволило класифікувати агробактерії на групи незалежно від їхнього генетичного походження: штамми, що індукують «октопінові» пухлини, зазвичай мають шорстку поверхню, тоді як «нопалінові» – переважно гладку [96]. Здатність штаму індукувати утворення конкретного типу пухлини залежить від наявності відповідної Ті-плазмиди. Обмін плазмідами між штамми завжди призводить до зміни типу опінів, що синтезуються в індукованій пухлині [85].

Штами видів *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes* характеризуються наявністю великих плазмід, що називаються відповідно Ті-плазмідами (індукують утворення пухлин) або Rі-плазмідами (індукують розвиток коренів). Штами *A. vitis*, як правило, містять саме Ті-плазміди. Відомо, що Rі-плазміди було виявлено і в бактеріях, які не належать до роду *Agrobacterium*, а лабораторні дослідження підтвердили можливість наявності у таких мікроорганізмів і Ті-плазмід. Встановлено, що різні види *Agrobacterium* представлені як вірулентними, так і авірулентними штамми [123, 124, 125]. Вірулентність детермінується низкою генів, а авірулентні штамми, як правило, втрачають локуси, необхідні для онкогенезу [203]. Пухлиногенез індукують лише вірулентні штамми, що містять Ті- або Rі-плазміди [125]. Цей процес головним чином залежить від експресії генів вірулентності (*vir*-генів), які забезпечують перенесення Т-ДНК у геном клітини-хазяїна. Після інтеграції Т-ДНК у геном еукаріотичної клітини остання трансформується і починає

синтезувати опіни [96]. Цикл ураження рослин збудником бактеріального раку був детально описаний ще у 1988 році [33] (рис. 1.3).

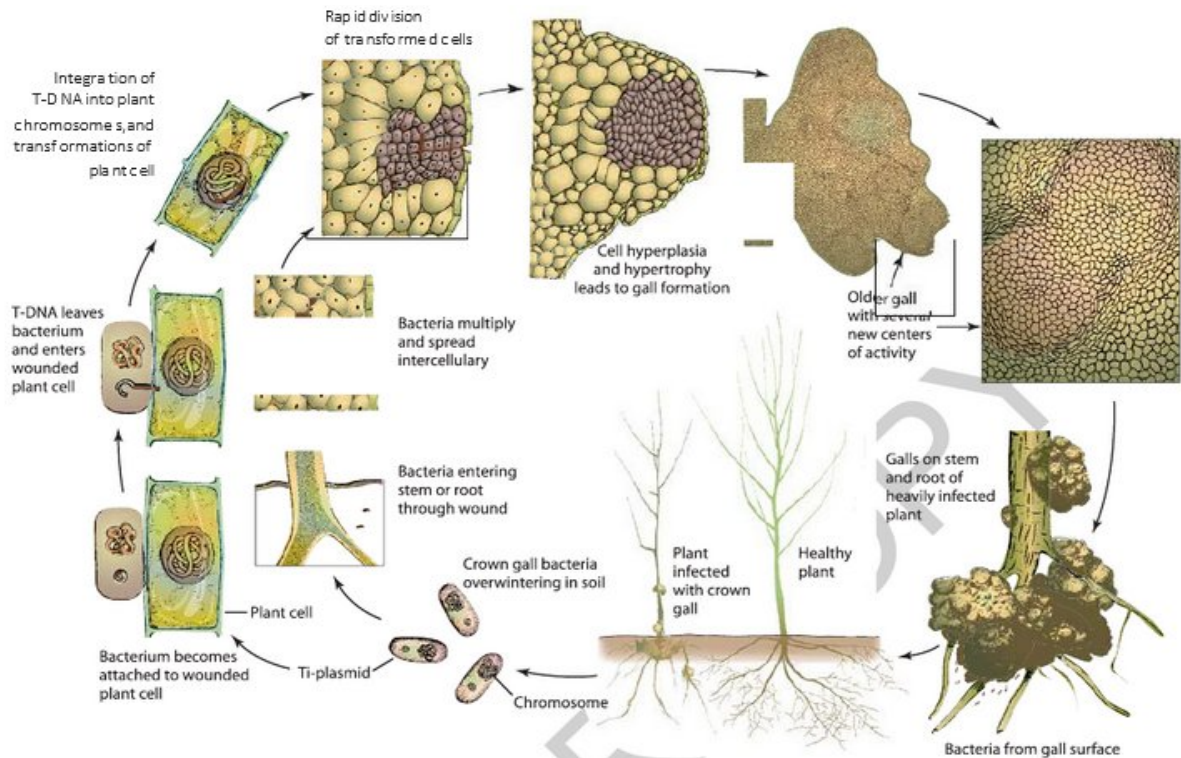


Рис. 1.3 Цикл захворювання, спричиненого збудником бактеріального раку *Rhizobium radiobacter* [33]

При вирощуванні бактерії на поживному середовищі при температурі $+30^{\circ}\text{C}$ і вище вона втрачає Ті-плазмиду і вірулентність, що може бути використано при оздоровленні цінних сортів винограду. Встановлено, що усі сорти винограду уражуються цим збудником, стійких сортів до нього немає.

Діагностика хвороби бактеріальний рак виноградної лози. На жаль засобів захисту виноградних рослин від збудника бактеріального раку досі не встановлено. Тому на першому плані стають профілактичні методи, а саме фітосанітарне обстеження виноградників, маточних насаджень, лоза яких використовуються для виробництва садивного матеріалу. А також діагностика латентних форм збудника та ідентифікація пухлин. Для цього використовуються серологічні (ІФА) і молекулярно-генетичні методи

досліджень (ПЛР класична і ПЛР у реальному часі). З метою детекції вірулентних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* винограду використовуються універсальний набір праймерів (VCF/VCR), оснований на послідовності *virC* оперону [193], які застосовуються для перевірки виноградних рослин при виробництві садивного матеріалу. Для виявлення вірулентних і авірулентних штамів було запропоновано пари праймерів до ділянок генів *virD2* *VirD2A/VirD2C* і *ipt* *CYT/CYT'*, що кодують ендонуклеазу та ізопентенилтрансферазу [107]. Враховуючи велике різноманіття штамів агробактерій найбільш ефективним є мультиплексна ПЛР, яка включатиме праймери як до патогенних, так і непатогенних штамів [46].

1.3. Ідентифікація сортів молекулярно-генетичними методами

Точна ідентифікація сортів є важливою вимогою для кожного процесу, пов'язаного з використанням ресурсів виноградної лози та похідних продуктів. Досягнення, отримані протягом останніх років, дозволили одночасний аналіз кількох молекулярних маркерів, здатних ідентифікувати сорти винограду.

Протягом багатьох років кілька випадків одомашнення та інтрогресії (процес проникнення генів одного виду у генофонд іншого виду), зазвичай через гібридизацію та зворотне схрещування призвели до значного генетичного різноманіття видів *Vitis vinifera* [79]. Внаслідок природної гібридизації та тривалої антропогенної селекції на сьогодні описано приблизно 10 000 сортів винограду. Окрім технічних та столових сортів, значну роль відіграють спеціалізовані форми, які використовуються як підщепи для забезпечення стійкості насаджень [151]. Серед існуючого різноманіття зустрічаються сорти з однаковими назвами, що фактично є різними генетичними формами (омоніми), а також один і той самий сорт під різними назвами (синоніми). Через це самої тільки назви недостатньо для

достовірної ідентифікації. Точне визначення сорту є критичною вимогою для всіх процесів, пов'язаних із вирощуванням винограду та його переробкою, що зумовлює потребу в розробці надійних стратегій генотипування [60].

Наразі для оцінки генетичного різноманіття винограду зазвичай використовуються молекулярні маркери.

Мікросателітний (SSR) аналіз – це широко використовуваний інструмент для ідентифікації та диференціації сортів винограду. SSR-аналіз допомагає зрозуміти генетичне різноманіття виноградних лоз.

Цей метод використовує короткі, повторювані послідовності ДНК (мікросателіти) для створення унікального генетичного «відбитка» для кожного сорту, який можна використовувати для підтвердження його ідентичності, ідентифікації клонів та аналізу походження.

Для сорту «Каберне Совіньйон» за допомогою SSR-аналізу було підтверджено походження від батьківської пари «Каберне Фран» та «Совіньйон Блан». Цей метод дозволяє не тільки ідентифікувати сорт на основі унікального генетичного профілю, а й розрізнити його численні клони. «Каберне Совіньйон» характеризується високим рівнем клонового різноманіття, що включає такі лінії, як R 5, VCR 8, VCR 11, VCR 19, ISV 2, ISV 105, ISV 117, ISVFV 5, ISVFV 6, а також французькі клони серії «Intra-Entav» (15, 169, 338, 685). Каталог «Каберне Совіньйон FPS» налічує близько 80 клонів, понад половину з яких отримано в Німеччині, Аргентині, Чилі та Каліфорнії. Попри високі технологічні властивості, цей сорт є надзвичайно вразливим до вірусних захворювань та збудника бактеріального раку [204].

Перевіряючи ідентичність сорту, SSR-аналіз може допомогти у виявленні та лікуванні вірусних захворювань, які можуть впливати на його продуктивність.

Поряд із технологічним прогресом, досягнутим протягом останніх років, тепер можливо одночасно аналізувати кілька маркерів для ідентифікації сортів винограду за короткий проміжок часу [211]. Серед

різних доступних молекулярних маркерів, прості послідовні повтори (SSR) наразі є кращими для ідентифікації сортів. Міжнародна організація виноградарства та вина (OIV) створила панель із дев'яти сателітних маркерів SSR, що характеризуються динуклеотидними повторюваностями та очікуваним розміром алеля від 121 до 288 пар основ для генотипування виноградної лози (список дескрипторів сортів винограду та видів *Vitis* OIV, 2023), і вона стала основою для кількох баз даних *Vitis*, які містять профілі цих SSR для великої кількості сортів, як наприклад, Міжнародний каталог сортів *Vitis* (VIVC) [151], з метою стандартизації аналізу маркерів, які проводилися у різних лабораторіях.

Метод SSR-аналізу, що застосовується для ідентифікації сортів винограду, зазвичай базується на ампліфікації маркерів за допомогою мультиплексної ПЛР із подальшим розділенням фрагментів шляхом капілярного електрофорезу. Ця методологія успішно використовується для аналізу свіжих рослинних зразків (листя, коренів, лози) [75]. Незважаючи на те, що OIV рекомендує застосування SSR-маркерів для сортової ідентифікації, їхнє виявлення безпосередньо у вині може бути ускладненим через деградацію ДНК та значний розмір SSR-локусів.

Альтернативний підхід на основі ПЛР дозволяє виявляти варіації в послідовностях ДНК за їхньою температурою плавлення, яка залежить від нуклеотидного складу та довжини ампліконів. У реакційну суміш додають інтеркаляційний барвник із високою флуоресценцією, що зв'язується з дволанцюжковою ДНК. Під час етапу денатурації після завершення ПЛР барвник вивільняється, а рівень флуоресценції знижується зі зростанням температури. Це дозволяє генерувати унікальні криві плавлення для кожного зразка та розрізняти їх між собою [179].

Така технологія «закритої пробірки» мінімізує кількість маніпуляцій, що забезпечує швидкий, економічно ефективний та високочутливий аналіз [39].

1.4. Біотехнологічні методи оздоровлення винограду

Виробництво сертифікованого садивного матеріалу винограду в Україні, відповідно до регламентуючих документів Європейського Союзу, передбачає відсутність ураження лози та щеплених саджанців винограду вірусами коротковузля, мозаїки резухи, першим і третім серотипами вірусу скручування листя, вірусом мармуровості, вірусами А і В винограду. В Україні, останнім часом, виставляють вимоги і щодо контролю садивного матеріалу винограду на відсутність фітоплазмової інфекції та бактеріального раку [27, 172, 16]. Оскільки обіг садивного матеріалу в світовому масштабі є одним із основних чинників поширення вірусних хвороб винограду [152, 54].

Виявлення вірусів і, зокрема, ідентифікація інфікованих рослин є важливим і необхідним етапом у разі використання виноградних рослин у програмах виробництва садивного матеріалу, а також під час створення нових сортів та клонів. Це суттєво знижує потенціал зараження, особливо в регіонах, де поширені переносники патогенів [145, 215]. Створення виноградників у зонах, вільних від переносників (зокрема нематод), також сприяє зменшенню як локального, так і віддаленого поширення вірусів [40].

До ефективних профілактичних заходів належать: видалення кущів із вираженими симптомами захворювання та сусідніх рослин, знищення залишкових коренів, застосування хімічного або біологічного контролю комах-переносників і нематод, а також використання толерантних або стійких до вірусів та переносників сортів винограду. Проте хімічний контроль нематод часто є малоефективним, екологічно небезпечним і потенційно шкідливим для людини. Створення резистентних сортів розглядається як перспективний напрям, однак на практиці воно обмежується переважно експериментальними генотипами або модельними рослинами, оскільки джерела генетичної стійкості виноградної лози до вірусів наразі відсутні.

Найефективніше підтримання необхідного санітарного статусу рослин виноградної лози забезпечується завдяки біотехнологічним методам оздоровлення [74, 175, 50, 150], серед яких найбільш поширеними є: термотерапія *in vivo* та *in vitro* [133, 176], хіміотерапія [139], культура меристем і верхівок пагонів [62, 63], соматичний ембріогенез [49], а також електротерапія та кріотерапія [43]. Основним обмеженням останніх трьох методів є низька ефективність та ризик індукції генетичних змін у клітинах рослини. Найвищу ефективність в отриманні безвірусних рослин винограду показало поєднання термо- або хіміотерапії з культурою меристеми чи верхівок пагонів, що забезпечує стабільне оздоровлення рослинного матеріалу.

Метод апікальних меристем. Одним із способів отримання рослин винограду, вільних від вірусних, мікоплазмових хвороб та бактеріального раку, є метод культури апікальних меристем [84, 65, 152, 202]. Його використання для оздоровлення рослин ґрунтується на принципі, згідно з яким у напрямку до верхівки пагона вміст збудників хвороб поступово зменшується, а апікальна меристема зазвичай є вільною від бактерій, вірусів і фітоплазм. Вона являє собою конус клітин, що активно діляться, завдовжки 0,1–1,0 мм [13, 45, 83, 21].

У науковій літературі існують різні підходи до пояснення причин відсутності збудників хвороб в апікальних меристемах та ефекту оздоровлення регенованих рослин. Одні дослідники пов'язують низький вміст або повну відсутність вірусів у верхівковій зоні меристеми з підвищеною концентрацією ауксинів, здатних пригнічувати вірусну реплікацію. Інші пояснюють цей феномен антагоністичними взаємодіями між синтезом білків і нуклеїнових кислот клітин та утворенням вірусного нуклеопротеїду. Також висловлюється припущення, що швидкість поширення вірусів між клітинами є нижчою порівняно зі швидкістю росту меристематичної тканини, внаслідок чого верхівка пагона значно випереджає

вірусну інвазію. Крім того, вирізання меристеми супроводжується травмуванням тканин, що тимчасово зумовлює недоступність відповідних ферментів, у результаті чого реплікація вірусу припиняється, а вірусна РНК піддається деградації. Отже, зменшення розмірів ініціального експланта (0,1–0,3 мм) підвищує ймовірність отримання безвірусних рослин. Багатьма авторами наукових праць підтверджено ефективність цього методу для винограду, однак рівень оздоровлення був різним. Водночас більшість дослідників сходяться на думці, що повне елімінування вірусів із ізольованих клітин не відбувається. Ймовірно мова йде про істотне зниження концентрації вірусних частинок до рівня, за якого їх неможливо виявити стандартними методами діагностики, а за наявності у поживному середовищі противірусних інгібіторів відбувається інактивація інфекції [5, 161, 2].

Наукових праць із цього напрямку досліджень у виноградарстві та виноградному розсадництві небагато, і вони переважно представлені роботами зарубіжних учених.

Так, Varba M. та ін. у своїх дослідженнях експериментально довели, що застосування культури меристем забезпечувало елімінацію *GFLV* у 54,0 % випадків, тоді як рівень оздоровлення від *GLRaV-1* і *GLRaV-3* знаходився у межах 73,0–93,0 % [41].

За даними Koruza B., Jelaska S. у рослин, регенерованих із меристем розміром 0,2–0,4 мм трьох клонів сорту «Refošk», віруси *GLRaV-1* і *GLRaV-3* не виявляли, проте частка рослин у яких не виявили інфекцію *GFLV* становила тільки 60,0 % [131].

У дослідженнях Fayek M. A. та ін. встановлено, що культивування меристем розміром 0,5 мм протягом 6 місяців сприяло отриманню 75,0 % рослин, вільних від *GFLV* та 82,5 % рослин без *GLRaV-1* у сорту «Flame Seedless» [89]. Разом із тим, у генотипі «Thompson Seedless» використання меристем розміром 1 мм дозволило досягнути елімінації *GFLV* на рівні 85,0 %, а *GLRaV-1* – на рівні 87,5 % [223, 224].

Hassan M. отримав повністю здорові рослини винограду клонів сортів «Fakhri 4», «Peykani 4.14», «Sultana 4.08», «Asgari 4.15» and «Shaste Arous 4.11» від вірусу коротковузля та скручування листя винограду. Для культивування він використовував меристеми, розміром 0,1-0,2 мм на поживному середовищі ½ МС з 0,5 мг/л 6-БАП [109].

Попри досягнуті позитивні результати, існують проблеми, що обмежують практичне використання та рекомендацію цього методу [37, 110]. Однією з основних проблем є складність виділення меристеми максимально малих розмірів, а також численні вимоги до забезпечення її життєздатності та індукції процесів регенерації. Зокрема, поява адвентивних бруньок біля основи експланта спостерігається через 40–45 днів, формування зачатків пагонів із адвентивних бруньок – приблизно через 60 днів, а повноцінний розвиток рослин – орієнтовно через 90 днів.

При цьому науковці зазначають, що відсоток елімінації патогенів залежить від генотипу рослини, типу вірусу та складності виділення меристеми [99, 54]. Окрім того, аналіз літературних джерел свідчить, що, незважаючи на наявність позитивних результатів оздоровлення винограду за допомогою методу культури апікальних меристем, в Україні такі дослідження не проводилися.

Особливості регенерації апікальних меристем. Ефективність технології культивування апікальних меристем залежить від того, яка кількість ініціальних експлантів буде морфогенно активною, успішно приживатися на поживному середовищі та регенерувати у рослини *in vitro* з високим коефіцієнтом розмноження [14, 1]. Одержання таких експлантів залежить від їх розмірів і складу поживного середовища для культивування [23, 24, 20].

Так, Mostafa F. M. A., Shaaban M. M. , Doaa S. Elazab and Kamel M.T. для введення у культуру тканин і органів *in vitro* винограду сортів «Конкорд» (*Vitis labrusca L*), «Томпсон безнасінний», «Красуня безнасінна» та «Кінг

Рубі» (*Vitis vinifera*) у якості ініціальних експлантів використовували верхівкові меристеми та вузлові живці (1,0–2,0 см). Їх культивували на поживному середовищі МС з додаванням 6-БАП та кінетину у кількості 1,0 мг/л і α -НОК у кількості 0,01 мг/л. Автори показали, що саме на цьому поживному середовищі приживлюваність ініціальних експлантів була найвищою (87,5–100 %) протягом трьох пасажів, подальше пасажування знижувало цей показник. Проте автори не вказують які за розмірами верхівкові меристеми використовували для введення в культуру, а приживлюваність і подальший розвиток ініціальних експлантів винограду розглядали як результат впливу кількості проведених пасажів [162].

Sabbadini S., Capriotti L., Limeria C., Navacchi O., Tempesta G., Mezzetti B. розробляли протоколи регенерації *in vitro* для сортів винограду «Глера», «Верментіно», «Санджовезе», «Томпсон безнасінний», підщеп «Польсен 1103» та «Ріхтер 110», які передбачали застосування у якості ініціальних експлантів апікальні меристеми. Проте останні вводили в культуру тканин і органів *in vitro* з метою одержання калюсних культур [191]. Butiuc-Keul A., Coste A. також вказують на необхідність використання культури апікальних меристем винограду з подальшим соматичним органогенезом, як альтернативу класичній селекції і виведення сортів винограду, стійких до біотичного та абіотичного стресу [60].

Nadra K., Maqsood A., Ishfaq H., Nadeem A., Shaghef E. and Muhammad A. для отримання рослин-регенерантів сорту «Кінг Рубі» після стерилізації культивували на безгормональному поживному середовищі МС. І тільки через 3-4 тижні новоутворені пагони переносили на гормонвмісні поживні середовища (ГК, 6-БАП, кінетин або гліцин) для пасажування, укорінення та одержання калюсних культур [127].

Diab A. A., Khalil S. M., Ismail R. M. також розробили ефективний протокол мікророзмноження винограду сорту «Spero» *in vitro*, на основі регенерації з експлантатів верхівок пагонів для масового виробництва

садивного матеріалу. Проте, автори індукували калус із апікальних меристем та пазушних бруньок на середовищі C₂D, яке доповнювали 4 мг/л 6-БАП, проліферацію пазушних бруньок – на середовищі C₂D, яке доповнювали 1 мг/л ГК та 0,1 мг/л кінетину [73].

Вітчизняних робіт з даного питання практично немає. У роботі Теслюк Н. І. показано ефективність використання меристемних верхівок із листовими зародками розміром 1,5–2,5 мм для збільшення коефіцієнту розмноження винограду шляхом одержання множинних пагонів [28]. Люта І. досліджувала вплив складу поживного середовища *in vitro* на розвиток апікальних меристем винограду різних сортів і показала, що агаризовані середовища з вмістом 1,0 мг/л 6-БАП, 1,0 мг/л ГК та 0,5 мг/л ІОК є оптимальними для мікроклональної регенерації верхівкових меристем в умовах *in vitro*. Але автор не наголошує на розмірах верхівкових меристем, які використовувала у роботі [19].

Отже, напрям застосування методу апікальних меристем для отримання оздоровленого садивного матеріалу винограду залишається відкритим і перспективним для роботи. Недостатньо вивчено механізми регенерації апікальних меристем у процесі мікроклонального розмноження та оздоровлення рослин *in vitro*. Вітчизняні дослідження з цього питання, зокрема щодо нових цінних сортів і клонів української селекції, відсутні. Це обґрунтовує необхідність розроблення ефективних протоколів виробництва здорового садивного матеріалу винограду *in vitro*.

Термотерапія. Термотерапія – це метод оздоровлення рослин від вірусних інфекцій, який полягає у впливі підвищеної температури на рослинний матеріал протягом певного часу. Загалом ефективність термотерапії підвищується зі збільшенням температури та тривалості термічної обробки. Зазвичай процедуру здійснюють за температури 35–45 °С протягом 4–6 тижнів, залежно від виду рослини, типу вірусу та особливостей їх взаємодії. Режим термообробки має бути оптимально збалансованим, щоб

забезпечити життєздатність рослини та водночас інактивацію вірусного патогену, що в результаті дозволяє отримати рослини, вільні від вірусів [138, 216, 80, 36, 66, 67, 215, 116, 87, 54].

Термотерапія винограду в культурі *in vitro* ґрунтується на зниженні швидкості реплікації вірусу під дією високих температур (35–45 °С). Після обробки теплом рослини можуть давати безвірусні тканини, а відсутність судинних елементів у меристемі ускладнює потрапляння вірусу до меристематичного купола. Якщо такі тканини ізолювати та вирощувати *in vitro*, можна отримати рослини, ідентичні материнській. Комбінація культури тканин (культивування апікальних меристем) і термотерапії дозволила елімінувати віруси з різних видів винограду [42, 97, 55, 154]. Так, термотерапія при 38 °С протягом 150 днів із використанням трьох дистальних бруньок для мікророзмноження забезпечувала 100 % елімінацію чотирьох серотипів вірусу скручування листя у *Vitis vinifera* («Black Seedless»). Аналогічно, застосування підвищеної температури (36–38 °С) протягом 60–70 діб до інфікованих експлантів сорту «Räuschling» у поєднанні з культурою меристеми забезпечувало повну елімінацію вірусу *GLRaV-1* [201].

Hatzinikolakis H. K., Roubelakis-Angelakis K. A., Leonhardt W. довели, що високий відсоток безвірусних рослин можна отримати також за рахунок *in vitro* термотерапії вузлових фрагментів. Однак апекси розміром 5,0 мм під час термотерапії *in vitro* некротизували вже після 8 тижнів, тому автори рекомендували використовувати вкорінені мікропагони. Через два місяці практично всі мікроклони були безвірусними [110].

Румунські вчені Buciumeanu E., Vişoiu E. повідомили про елімінацію *GFLV*, *GLRaV-3* і *GFkV* методом *in vitro* культури та/або *in vivo* термотерапії [56].

Дослідження, проведені в останні роки, які відображають сучасний стан застосування термотерапії та культури меристем для отримання

безвірусного матеріалу винограду так само показують їх ефективність. Мілжани V. та співавтори застосовували *in vivo* термотерапію ($t = 36\text{--}38\text{ }^{\circ}\text{C}$, 6 тижнів) у поєднанні з *in vitro* мікрощепленням апікальних меристем (0,1–0,2 мм) на сіянці підщепи «Violla» (*V. labrusca* × *V. riparia*) для елімінації восьми вірусів та двох віроїдів винограду. Хоча загальна регенераційна здатність мікрощеплень була низькою, для всіх вірусів було досягнуто 100% елімінації, тоді як для віроїдів показники були нижчими – 39,2 % для *HSVd* та 42,6 % для *GYSVd-1* [155].

В. Křížan, E. Ondrušiková та співавтори досліджували ефективність термотерапії *in vitro* та *in vivo* для елімінації вірусу коротковузля винограду (*GFLV*) у трьох генотипів підщеп. В обох випадках термотерапію проводили протягом 45 днів за температури $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Автори встановили, що ефективність обох способів була подібною, проте перевагу надали методу *in vivo*, оскільки він дозволяє отримати більшу кількість апікальних сегментів із оброблених рослин, скорочує період культивування *in vitro* та зменшує ризик соматичної (сомаклональної) мінливості [133].

У дослідженні Panattoni A. та Triolo E. створено *in vitro* колекцію рослин «Б×Р Кобер 5ББ», які експериментально інфікували вірусами *GVA*, *GFLV*, *GFkV*, *GLRaV-1* і *GLRaV-3*, після чого проводили *in vitro* термотерапію у вегетаційній камері ($t = 37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 діб). Санітарний стан рослин оцінювали за допомогою ІФА та ПЛР у реальному часі. Результати засвідчили повну ерадикацію *GFLV*, відсутність ефекту щодо *GFkV*, а також різний рівень оздоровлення для інших вірусів: 70,2 % для *GVA*, 25,1 % для *GLRaV-1* та 24,7 % для *GLRaV-3* [176].

В Україні це питання вивчали в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН. Мулюкіна Н. А. та співавтори вивчали вірус скручування листя винограду з огляду його розповсюдження у різних типах колекцій винограду та у зв'язку з температурно-вологісним режимом вегетаційного сезону. Встановили, що найнижчий ризик виявлення вірусної інфекції був у клоновому репозиторії,

найвищий - у ампелографічній колекції, на клонових дослідних ділянках першого вегетативного потомства та в промислових виноградниках, де здійснюється клоновий добір [165]. Але автори не розглядали питання оздоровлення виноградних рослин від вказаного патогену.

Наукові праці Мілкус Б. Н., Щербіни А. В. присвячені оздоровленню винограду сортів «Голубок», «Рубін таїровський» та двох селекційних форм в культурі *in vitro*. Автори роботи показали, що введення верхівкових меристем, розміром 0,5-0,8 мм на поживне середовище Чі і Пул та подальше проведення термотерапії при температурі 38 °С протягом 6-15 тижнів призводило до елімінації збудників мармуровості (через 8 тижнів термотерапії) та скручування листя винограду (через 15 тижнів термотерапії) [29].

Конуп Л. О., Конуп А. І. та ін. проводили оздоровлення лози та саджанців сорту «Шардоне» від фітоплазмової інфекції та почорніння деревини шляхом водної термотерапії. Для цього використовували спеціально сконструйований пристрій, який здатен підтримувати постійну температуру та перемішування води. Показано, що після обробки саджанців та лози винограду гарячою водою (протягом 30 хвилин при 50 °С) симптоми ураження почорнінням деревини та фітоплазми були відсутніми, а вічка залишалися не ушкодженими [17, 18]. Ці дослідження загалом підтверджують ефективність термотерапії як методу оздоровлення садивного матеріалу винограду, однак у них не передбачалося проведення подібних робіт у культурі тканин і органів *in vitro*.

Отже, аналіз літератури свідчить, що термотерапія є ефективним методом елімінації вірусів винограду, особливо при поєднанні з культивуванням апікальних меристем або мікросщепленням. Проте, вона залежить від низки факторів: сорту та клону винограду, типу і концентрації вірусу, температури та тривалості термообробки, а також розміру й фізіологічного стану ізольованих меристем. Оптимізація цих параметрів є

ключовою для підвищення ефективності оздоровлення винограду. Переваги термотерапії *in vitro* полягають у можливості контролювати умови середовища, стандартизувати дослід та об'єктивно оцінювати чутливість вірусів до теплового стресу. Проте слід враховувати й обмеження застосування цього методу: високі температури можуть викликати загибель експлантів, процес є тривалим та трудомістким, не завжди забезпечує повну елімінацію вірусів.

Хіміотерапія. Хіміотерапія – це метод оздоровлення рослин *in vitro*, який полягає у застосуванні хімічних препаратів або антивірусних речовин для пригнічення або руйнування вірусного матеріалу в тканинах рослини без негативного впливу на їх життєздатність. Застосування хіміотерапевтичних препаратів у культурі *in vitro* з метою отримання безвірусного садивного матеріалу різних рослин викликало багато запитань щодо їх можливої фітотоксичності для експлантів [210, 111, 177, 114]. Більшість авторів у своїх роботах довели наявність фітотоксичного впливу цих препаратів, але, разом з тим, вони показали їх ефективність для оздоровлення рослин за умови застосування в комплексі з іншими способами оздоровлення [115, 197, 126, 81, 227, 228].

Хіміотерапія винограду *in vitro* полягає у вирощуванні мікроклонів із інфікованих експлантів на поживному середовищі, доповненому віруцидними препаратами. Серед віруцидних препаратів, що застосовуються для елімінації різних типів вірусів у садових рослин (у т.ч. і винограду), найчастіше використовували рибавірин, 5-азацитидин (AZA), ациклогуанозин, азидотимідин, 2,4-діоксо-гексагідро-1,2,5-тріазин (DHT), дигідроксі-пропіладенін (DHPA), озельтамівір, мікофенолову кислоту (6-(4-гідрокси-6-метокси-7-метил-3-оксо-1,3-дігідроізобензофуран-5-іл)-4-метилгекс-енова кислота) (MPA), селеназол (2-β-D-рибофуранозилселеназол-4-карбоксамід) (SE), 3-дезаутидин (DZD), ціаногунанідин тощо [106, 215, 115, 114, 113]. Проте їх застосування у культурі *in vitro* викликає багато запитань

щодо можливої фітотоксичності для експлантів.

Найчастіше для хіміотерапії винограду *in vitro* застосовують препарати рибавірин і озельтамівір, які були протестовані за різних концентрацій, терміну впливу, як окремо, так і у комбінації [215]. Ряд авторів вивчали можливість елімінації вірусів винограду під впливом інших антивірусних речовини – дигідроксипропіладенін, дарунавір, ізопринозин та ін. І за певних умов їх застосування мало позитивний вплив [174, 199].

Дослідження Guță I. C. та ін. показали, що рибавірин має фітотоксичний ефект, виражений у зниженні швидкості розмноження та високій некротизації ініціальних експлантів. При концентрації 40 мг/л рибавірину, генотип винограду «Сапег», інфікований *GFkV*, характеризувався зниженням швидкості розмноження у 3-4 рази після першого і другого субкультивування відповідно, після трьох послідовних обробок експлант гинув [104, 105]. В інших дослідженнях цього ж автора показано, що озельтамівір викликав інтенсивне розростання додаткових бруньок після першої субкультури, які не повністю розвивалися та диференціювалися [103]. Але, навіть комбінація 40 мг/л рибавірину з 40–80 мг/л осельтамівіру не спричинила загибелі експлантатів після трьох обробок, а тільки викликала зниження швидкості розмноження [54]. Така поведінка обумовлена, з одного боку, різним фітотоксичним ефектом віруцидів, а з іншого – толерантністю генотипів винограду до віруцидів та різним регенераційним потенціалом.

Для елімінації *GLRaV-3* у рослин «*Vitis champini*» *in vitro* Hu G., Yafeng Dong, Zunping Zhang, Xudong Fan, Fang Ren застосовували рибавірин (15 та 25 мкг/мл), термотерапію (37 °C) та їх комбінацію. Вони встановили, що фітотоксичність рибавірину тривала до 30 днів, а висока температура на початку обробки пошкоджувала рослини, хоча одночасно могла стимулювати і їх ріст. Виживання експлантів було найнижчим за термотерапії проведеної окремо (23,3 %). Але при комбінації хіміотерапії та термотерапії воно дорівнювало 41,0–47,0 %. Оцінка елімінації вірусу за

допомогою RT-PCR показала, що комбінована обробка була найефективнішою: при 20-добовій обробці R15+T та R25+T рівень елімінації перевищував 80,0 %, при окремій хіміотерапії *GLRaV-3* зберігався у всіх регенерованих рослинах, а при термотерапії – елімінація досягала 42,9 % [113].

Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. розробили різні хіміотерапевтичні підходи для елімінації тісно пов'язаних вірусів винограду *GLRaV-1* та *GLRaV-3* у культурі *in vitro*. Для елімінації вірусів використовували хімічні препарати (інгібітори IMPDH (інозитмонофосфатдегідрогенази), пуринові інгібітори та інгібітори нейрамінідази) і термотерапію. Всі методи дозволили отримати безвірусні експлантати, проте ефективність залежала від типу вірусу: для *GLRaV-1* найбільш ефективними були інгібітори IMPDH (72 % – тіазофурин, 40,0 % – рибавірин), для *GLRaV-3* – інгібітор нейрамінідази озельтамівір (78,0 %) та пуринові інгібітори 6-тіогуанін (75,1 %). Термотерапія характеризувалася подібною ефективністю (>55 %) для обох вірусів, проте не була повністю селективною [175].

Проте, метод хіміотерапії має і ряд недоліків, які пов'язані з життєздатністю експлантів, залежністю ефективності від генотипу рослини та типу вірусу, тривалим часом регенерації нових рослин. Тому необхідно вивчати і розробляти альтернативні методи блокування вірусної реплікації.

Висновки до розділу 1

1. Сучасна стратегія отримання якісного садивного матеріалу винограду базується на трьох основних етапах: по-перше, системному моніторингу фітосанітарного стану насаджень для своєчасного виявлення симптомів вірусних і бактеріальних хвороб; по-друге, точній ідентифікації їхніх збудників; по-третє, розробці вітчизняної технології оздоровлення лози, що відповідає вимогам світових стандартів.

У багатьох країнах світу, зокрема в Україні, дуже поширені хвороба скручування листя винограду і бактеріальний рак виноградної лози, які наносять значні збитки виноградарству.

Серед шкідливих вірусних хвороб винограду виділяється 3-й вірус скручування листя, симптоми якого проявляються у вигляді скручування листя, наявності почервоніння міжжилкових ділянок, при цьому первинні та вторинні жилки залишаються зеленими. Сортів і клонів стійких до цього збудника немає. Збитки врожайності від ураження цим вірусом досягають 20,0–40,0 %. *GLRaV-3* спричиняє різке зниження фотосинтезу листя в післязбиральний період. Вина, виготовлені з ягід кущів інфікованих *GLRaV-3* характеризуються меншим вмістом барвних речовин, фенолів, танінів та спирту порівняно з винами, виготовленими з ягід здорових кущів.

Для ідентифікації вірусів хвороби скручування листя виноградної лози використовують різні лабораторні методи: серологічні методи (ІФА), молекулярно-генетичні методи (ПЛР), біологічне індексування та секвенування геному хвороби. Серед цих методів ідентифікації найбільш поширеними є ІФА і ПЛР.

2. Серед бактеріальних хвороб винограду бактеріальний рак є одним із найнебезпечніших. Симптоми якого проявляються у вигляді пухлин на різних частинах виноградних рослин. Бактеріальний рак вважається раньовою інфекцією, симптоми якого проявляються після пошкоджень морозами, градом, гризунами, механічних пошкоджень технікою. Сортів і клонів стійких до цього збудника немає. Для ідентифікації агробактерій найчастіше використовують ПЛР аналіз і секвенування геному хвороби.

3. Вірусні та інші патогенні інфекції виноградної лози суттєво знижують врожайність, пригнічують ріст, скорочують тривалість життя кущів, погіршують технологічні властивості ягід і якість вина. Вони поширюються вегетативним шляхом та через переносників, а природно-кліматичні умови півдня України сприяють високій імовірності розповсюдження збудників.

Тому оздоровлення садивного матеріалу винограду є надзвичайно актуальним завданням для забезпечення продуктивності, стабільності та конкурентоспроможності виноградарства.

Біотехнологічні методи, зокрема культура апікальних меристем, термо- та хіміотерапія є найбільш ефективними підходами для отримання безвірусного садивного матеріалу винограду. Застосування цих методів у культурі *in vitro* дозволяє значно знизити рівень вірусної інфекції при збереженні життєздатності та генетичної стабільності рослин.

Дослідження зарубіжних авторів підтверджують високу ефективність методу культури апікальних меристем для елімінації вірусів винограду, зокрема *GFLV*, *GLRaV-1*, *GLRaV-3*. Ефективність оздоровлення за такого підходу становить 54,0–93,0 % і залежить від генотипу рослин, типу вірусу та розміру меристем. Проте низка питань залишається дискусійною – це визначення оптимальних розмірів експлантів для балансу між елімінацією та регенерацією, підбір гормонального складу поживних середовищ, а також умов культивування залежно від сорту чи клону.

Більшість існуючих робіт описують отримання регенерантів через етап калюсної культури. Оскільки такий шлях не завжди гарантує генетичну стабільність матеріалу (через ризик соматичної мінливості), його рідко застосовують для промислового розмноження, частіше використовуючи у селекції. Це зумовлює актуальність індивідуального підбору параметрів оздоровлення – від розміру меристем до складу поживних середовищ – для кожного конкретного сорту та клону винограду.

В Україні не проводили дослідження щодо оздоровлення винограду з використанням методу апікальних меристем, у т.ч. і роботи з розробки протоколу культивування апікальних меристем винограду. Переважна більшість наукових результатів у цьому напрямку отримана зарубіжними вченими, що підкреслює відкритість і перспективність даної проблеми для українського сертифікованого розсадництва, особливо щодо нових сортів та

клонів вітчизняної селекції.

4. Термотерапія є ефективним методом елімінації вірусів винограду та інших багаторічних культур. Високі температури (35–45 °С) знижують швидкість реплікації вірусу, а відсутність судинних елементів у меристемі обмежує проникнення вірусу до меристематичного купола. Поєднання термотерапії з культивуванням апікальних меристем або мікрощепленням дозволяє отримати високий відсоток безвірусних рослин.

Зарубіжні дослідження свідчать, що термотерапія *in vitro* є ефективним методом елімінації вірусів винограду, зокрема *GFLV*, *GLRaV-1*, *GLRaV-3*, *GfKV* та *GVA*, і в окремих випадках забезпечує до 100 % оздоровлення для певних вірусів і сортів. Водночас результативність цього підходу визначається сукупністю чинників, серед яких генотип винограду, тип вірусного патогену, температура і тривалість теплової обробки, а також розмір і фізіологічний стан ізольованих меристем. Незважаючи на наявні позитивні результати, залишаються недостатньо з'ясованими питання оптимізації режимів термотерапії *in vitro* щодо вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*) для сортів різного напрямку використання, впливу тривалого теплового стресу на життєздатність експлантів, ефективності методу за наявності складних інфекційних комплексів і віроїдів, а також ролі фізіологічного стану меристем у формуванні кінцевого результату оздоровлення.

В Україні дослідження з застосування термотерапії для оздоровлення винограду *in vitro* проводилися протягом 1996-1999 років, однак вони не набули подальшого розвитку та характеризуються неоднозначністю отриманих результатів. Основні наукові здобутки з цього питання представлені переважно працями зарубіжних авторів. Це підтверджує актуальність проблеми та визначає її як перспективний напрям для подальшого вивчення, зокрема в контексті адаптації методики до вітчизняних сортів винограду.

5. Хіміотерапія *in vitro* є ефективним методом елімінації вірусів винограду, проте її результативність суттєво залежить від типу вірусу, сорту винограду, типу та концентрації віруцидного препарату, а також фізіологічного стану ініціальних експлантів або мікроклонів. Дослідження зарубіжних авторів показали, що ряд віруцидних препаратів (рибавірин, озельтамівір, дарунавір, ізопринозин, пуринові інгібітори, інгібітори нейрамідідази та ін.) можуть забезпечувати високий рівень елімінації винограду від *GLRaV-3*, *GLRaV-1*, *GFLV* та *GfKV*, проте при цьому деякі з них часто проявляють високу фітотоксичність, інші суворо використовуються тільки для лабораторних досліджень і є недоступними для роботи в Україні.

Разом з тим, аналіз опублікованих досліджень підтверджує, що найвищу ефективність санації забезпечує поєднання хіміотерапії з іншими методами оздоровлення, зокрема термотерапією, культивуванням апікальних меристем.

Недоліками хіміотерапії залишаються висока фітотоксичність деяких препаратів, тривалість обробки та регенерації рослин, залежність результату від генотипу та типу вірусу. Для кожного сорту чи підщепи винограду необхідно індивідуально підбирати препарати та їх робочі концентрації, оптимізувати режими обробки, щоб зменшити токсичність та підвищити рівень санації.

В Україні дослідження щодо хіміотерапії винограду від *GLRaV-3* не проводились, тому питання адаптації методу до вітчизняних сортів та підщеп залишаються відкритими і потребують подальшого вивчення, що робить цей напрямок досліджень актуальним і перспективним.

Основні положення цього розділу викладені в таких наукових працях автора зі списку використаних джерел [129, 18, 130, 15].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА УМОВИ ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота виконувалась в лабораторії вірусології і мікробіології та відділі розсадництва, розмноження і біотехнології винограду ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України протягом 2022-2026 рр. на сортах винограду – «Одеський чорний» та «Каберне Совіньйон», які використовуються для отримання сертифікованого садивного матеріалу.

«Одеський чорний» («Алікант Буше» х «Каберне-Совіньйон») – технічний сорт винограду пізнього строку дозрівання (160-165 днів при сумі активних температур 3000-3200 °С). Урожайність висока та стабільна 12,0-13,0 т/га. Сила росту пагонів середня, визрівання лози 80-90 %. Відносно стійкий до сірої гнилі ягід та оїдіуму, відрізняється підвищеною зимостійкістю.

«Каберне Совіньйон» («Каберне Фран» х «Совіньйон») – технічний сорт винограду пізнього строку дозрівання (143-165 днів при сумі активних температур 3100-3300 °С). Урожайність середня 6,0-9,0 т/га. Сила росту пагонів висока, визрівання лози 70-90 %. Стійкий до мільдю та сірої гнилі ягід, відрізняється підвищеною морозостійкістю.

2.1. Польові дослідження (фітосанітарне обстеження виноградних насаджень)

У 2022-2025 рр. проводили фітосанітарне обстеження виноградних насаджень на наявність кущів із симптомами вірусних хвороб і бактеріального раку. Були обстежені виноградні насадження в Одеській області: маточні та селекційні насадження ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України (25 га), виноградники ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім.

В. Є. Таїрова», ТОВ «Агрофірма Шабо» (58,62 га), шкілка ТОВ «Виноград Одеса» (0,915 га) (рис. 2.1).



Рис. 2.1 Фітосанітарне обстеження виноградних насаджень ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» (2023 р.)

Фітосанітарне обстеження і відбір зразків виноградних рослин для подальшого дослідження проводили відповідно до нормативного документу ДСТУ 3355-96. «Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб у процесі карантинного огляду та експертизи». Відбір зразків проводили за зовнішніми симптомами хвороби, а також без симптомів для виявлення латентної форми вірусів і збудника бактеріального раку.

Для виявлення 3-го вірусу хвороби скручування листя відбирали нижнє листя та здерев'янілі пагони. Для виявлення збудника бактеріального раку використовували пухлини, а також здерев'янілі чубуки. Зразки використовували одразу для виділення РНК/ДНК вірусу/бактерій або зберігали при -18°C протягом місяця.

2.2. Лабораторні методи ідентифікації збудників вірусних хвороб і бактеріального раку виноградної лози

Для ідентифікації вірусів відбір зразків необхідно проводити в залежності від максимального накопичення вірусних частинок у різних частинах виноградних рослин у весняно-літній період, а саме максимальне накопичення відбувається у червні-липні, якщо пропустити цей період, то можна отримати недостовірні результати, через що будемо мати негативні наслідки. Тому цей період дослідження дуже важливий для проведення тестування випробувального матеріалу.

Успіхи в дослідженнях вірусу *GLRaV-3* за останні роки включають вироблення антитіл та подальшу розробку діагностичних тест-систем; секвенування геному; передачу та епідеміологічні дослідження, що підтверджують *GLRaV-3* як основного збудника *GLD*.

Для виявлення 3-го вірусу скручування листя винограду використовували метод ІФА і ЗТ-ПЛР у реальному часі.

Матеріалом для дослідження були сорти винограду «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний».

Роботу виконували на лабораторному обладнанні ПЛР-лабораторії, яке пройшло калібрування в Національному науковому центрі «Інститут метрології» (м. Харків).

Для ідентифікації вірулентних штамів агробактерій використовували колекційні штами з Американської колекції типових культур (ATCC): C-58 і Fa-2.

Відбір, зберігання і підготовку зразків проводили згідно стандарту ISO 16578: 2013 (EPPO 2013).

Для ідентифікації 3-го вірусу скручування листя і збудника бактеріального раку відбирали зразки виноградної лози, листя, пухлини та коріння.

2.2.1. ІФА-ELISA для виявлення 3-го вірусу хвороби скручування листя винограду

Для виявлення 3-го вірусу хвороби скручування листя використовували комерційну тест-систему (*AgriTest*, Італія), для прояву реакції аглютинації п-нітрофенілфосфат (п-НФФ) (*Serva*, Німеччина).

Для проведення ІФА готували буфера (г/л):

PBS – буфер (рН 7,4): NaCl – 8,0; KH_2PO_4 – 0,2; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 2,17; KCl – 0,2; NaN_3 – 0,2; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$;

Екстракційний буфер (рН 7,4): PBS – буфер 1 літр: полівінілпірролідон К-25 40 000 (PVP) – 10,0; Na_2SO_4 – 1,3; курячий альбумін – 2,0;

Відмивний буфер (рН 7,4): PBS – буфер 1 літр: твін-20 – 0,5 мл;

Покривний буфер (рН 9,6): Na_2CO_3 – 1,5; NaHCO_3 – 2,93; NaN_3 – 0,2; Твін 20 – 0,5; Кон'югатний буфер (рН 7,4):

Промивальний буфер – 100 мл; полівінілпірролідон К-25 40 000 (PVP) – 2 %; бичачий сироватковий альбумін (BSA) – 0,05 %;

Субстратний буфер (рН 9,8): діетаноламін – 97 мл; NaN_3 – 0,2.

Досліджувані зразки виноградної лози (1,0 г) ретельно подрібнювали у гомогенізаторі (Tube-mill control, ІКА, Китай), змішували з екстракційним буфером у співвідношенні 1:15 (рН = 7,4) і вносили у комірки мікропланшет (200 мкл).

Випробування проводили за етапами, згідно інструкції до комерційного набору. Реакцію зупиняли 20 % розчином NaOH. Результати аналізували на лабораторному приладі «BioSan» (Латвія) при оптичній щільності 406 нм і порівнювали з контрольними зразками.

Наявність жовтого забарвлення у комірках мікропланшет свідчило про наявність 3-го вірусу скручування листя винограду у порівнянні з контрольними зразками, що надавалися у тест-системі.

2.2.2. ПЛР у реальному часі для ідентифікації збудників бактеріального раку і 3-го вірусу хвороби скручування листя винограду

Для ідентифікації збудника бактеріального раку на виноградниках Одеської області було відібрано рослини з симптомами (пухлинами) та визначено наявність латентної стадії хвороби. Для виділення агробактерій *Rhizobium vitis* використовували чубуки, коріння, та пухлини довжиною 5 см. Досліджуваний матеріал попередньо промивали водопровідною водою, стерилізували 0,5 % розчином гіпохлориту натрію 5 хвилин і промивали стерильною дистильованою водою. Просушували, фламбували, нарізали на невеличкі шматочки, розміром 5 мм і розтирали в ступці зі стерильним піском.

Селективний посів. Гомогенат у кількості 100 мкл наносили на чашки Петрі з напівселективним поживним середовищем Рой та Сассера (г/л): $MgSO_4$, 0,20; K_2HPO_4 , 0,90; KH_2PO_4 , 0,70; адонітол 4,00; NaCl 0,20; борна кислота 4,00; триметоприм 0,02; агар-агар 20. Червоні колонії з білою облямівкою, типові для агробактерій, пересівали у пробірки з картопляним агаром, інкубували протягом 1-2 днів при 27 °C та зберігали при 4-5 °C для подальшої ідентифікації.

Виділення ДНК агробактерій. Ідентифікацію ізолятів агробактерій проводили за допомогою ПЛР згідно з Vini et al. (2008) [46]. Виділення матричної ДНК із клітинних суспензій проводили за методикою [205], використовуючи колонії, вирощені на картопляному агарі. Суспензію ($OD_{600}=1,2$) готували у стерильній деіонізованій воді та інкубували протягом 10 хвилин при 95°C у воді з Triton X-100 (1,0 %) та азидом натрію (0,25 %), реакцію проводили на льоду. Зразки центрифугували протягом 5 хвилин при 5700 g, а супернатант, що містив нуклеїнові кислоти, використовували для ПЛР [31]. Зразки ДНК зберігали тиждень при 5 °C або при -18 °C протягом року.

Виділення ДНК також проводилося безпосередньо з тканини виноградної лози, включаючи пухлини [205]. Для виділення ДНК використовувалися реагенти, що включали лізис клітин (SDS, STAV, протеїназа К). 2-меркаптоетанол, фенол та хлороформ використовувалися для подальшого очищення ДНК від білків та інших забруднень, включаючи органічні кислоти (винну, яблучну, лимонну), пектини, клітковину, таніни, флавоноїди, антоціани, стероїди, токофероли та інші сполуки [107]. Всі ці забруднення можуть перешкоджати наступному етапу ПЛР. Відомо, що через генетичне різноманіття штамів *Agrobacterium*, розроблені праймери не завжди ідентифікують певні ізоляти агробактерій, що призводить до хибних результатів, тому існувала необхідність використовувати різні пари праймерів для генних ділянок [46].

Для ідентифікації вірулентних ізолятів агробактерій використовували ПЛР у реальному часі, використовуючи специфічні праймери до ділянки гену *rehA*, що кодує полігалактуроназу та до ділянок генів ендонуклеази *VirD2* плазмідної патогенності і *VIRF* факторів вірулентності [107] і праймери до послідовностей генів *virC* Ti-плазмідної

PGF/PGR GATCG(G/C)GTCCAATG(CT)TGT/ATATCCATCGATC(TC)CTT,
розмір амплікону (427 bp) [205];

virD2A/virD2C ATGCCCGATCGAGCTCAAGT/

TCGTCTGGCTGACTTTCGTCAATAA (розмір амплікону 224 bp);.

VIRFF1/VIRFR2 F:TGAAGAGCGGTGTCGTGCTG/

R: AATCAGCGGCTTGCAGGTCT (розмір амплікону 382 bp) [46]. Праймери виготовлялися на замовлення у фірмі Simesta ВААЛ (Україна). ПЛР-тести проводили в термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія) в реакційному об'ємі 20 мкл із використанням наступної суміші: 1× ПЛР-буфер (20 мМ Tris-HCl, pH 8,7, 20 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, 0,4 мкМ кожного праймера, 1 U ДНК Taq-полімерази (ThermoFisher Scientific, USA, Литва) та 5 мкл ДНК з бактеріальних ізолятів

або контролів (ПЛР-буфер як НК) та ДНК контрольних штамів: 8628; C-58. Термічний профіль становив: 96 °С – 1 хв, 34 цикли (при 94 °С – 20 с, температура відпалу для праймерів – 20 с та 72 °С - 40 с із кінцевим подовженням при 72 °С – 5 хв). Температура відпалу 54 °С використовувалася для VirD2A/Vir2C та 52°С для VCF3/VCR3.

Результати аналізували за допомогою електрофорезу на 1,4 % агарозному гелі в 1 TBE-буфері та візуалізували використовуючи відеосистему Biosom під УФ-світлом (довжина хвилі 312 нм) після фарбування бромистим етидієм. В якості маркеру довжини фрагментів ДНК використовувався стандарт молекулярної маси O'RangeRuler 100 п.н.-500 п.н. DNA Ladder, Invitrogen (ThermoFisher Scientific, USA).

Секвенування. Визначення вірулентності виділених ізоляті агробактерій проводили за допомогою їх секвенування. Для виділення ДНК із бактеріальних культур використовували набір Wizard DNA Purification Kit (Promega; Madison, WI). Концентрацію ДНК вимірювали за допомогою флуориметру Qubit (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA). Для створення бібліотеки секвенування з геномної ДНК використовували набір реактивів Oxford Nanopore Native Barcoding 24 v14 (SQK-NBD114-24). Бібліотеки фрагментів секвенували на проточних кюветах MinION та/або PromethION (FLO-MIN114 та FLO-PRO114M) на Oxford Nanopore MinION та/або P2 Solo з базовим викликом SUP. Для збирання ридів секвенування використовували Flye v.2.9 з опціями “--scaffold --nano-hq”. Для візуалізації фрагментів і їх оцінки якості використовували програму Bandage v.0.8.1 [221]. Для анотування генів, характеристики мобільних генетичних елементів та інших геномних локусів, а також ідентифікації та класифікації онкогенних плазмід *Agrobacterium* використовували програми Beav v.1.0 і Vakta v.1.8.2 [196]. Для завантаження загальнодоступних геномів штамів комплексу агробактерій/ризобій використовували набори даних із генбанку NCBI

v.15.24.0 [194]. Необроблені дані секвенування та збірки геномів були завантажені в NCBI GenBank під програму BioProject PRJNA1093479

Філогенетичний аналіз. Для генерації філогенії мультилокусного аналізу послідовності (MLSA) використовували AutoMLSA2 v.0.9.0 з опцією «--allow_missing 4» [72]. Трансльовані послідовності 23 генів із штаму 1021 *Sinorhizobium meliloti* використовували як контроль для ідентифікації гомологів секвенованих нових штамів, а також набори даних із генбанку NCBI [227]. IQ-TREE v.1.6.12 з опціями «--bb 1000 --alrt 1000» використовувався для створення філогенетичних дерев [170]. Пакет R ggtree використовувався для побудови дерева філогенії [225].

*Секвенування та філогенетичний аналіз виділених та ліофілізованих нами агробактерій, що виявилися патогенними, було проведено колегами кафедри ботаніки та фітопатології Університету штату Орегон (США) в рамках договору про творче співробітництво.

Ідентифікація 3-го вірусу хвороби скручування листя винограду. Ідентифікацію 3-го вірусу проводили методом ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у режимі реального часу. Зразки для проведення ЗТ-ПЛР готували згідно методики [22], листя або зішкріб здерев'янілих пагонів, у кількості 100 мг, поміщали у гомогенізатор (Tube-mill control, ІКА, Китай) ретельно подрібнювали, заливали 2 мл екстракційного (GGB) буферу: Na_2CO_3 – 1,59 г/л, NaHCO_3 – 2,93 г/л, 2 % PVP-40, 0,2 % BSA, 0,5 г/л Tween-20, 10 г/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (рН 9,0) і інкубували при 95 °С 10 хв. в термостаті «Драй-блок» TDB-120 (Biosan, Латвія). Після цього зразки витримували в холодильнику 3 год при +4 °С.

Виділення РНК вірусів проводили згідно методики [189], а саме: 2 μl зразка вносили в 23 μl реакційної суміші ($\text{H}_2\text{O}_{\text{деіон}}$ – 12,0 μl ; 10 \times ПЦР-буфер – 2,5 μl ; сахароза + крезол – 2,5 μl ; 4 mM dNTP – 1,25 μl (1,76 mM -2,84 μl); DTT (дітіотрейтол)– 1,24 μl ; pr1 (10 pmol) – 1,25 μl ; pr2 (10 pmol) – 1,25 μl , Taq-полімераза (2,5 u/ μl) (ThermoFisher Scientific, USA, Литва) – 0,25 μl ,

ревертаза (200 u/μl) (RevertAid™ M-MuLV, ThermoFisher Scientific, USA, Литва) – 0,04 μl, Mg²⁺ (50 mM) – 0,75 μl, покривали шаром олії для ПЛР і проводили ЗТ-ПЛР.

Крім того виділення тотальної РНК здійснювалось за допомогою наборів для виділення нуклеїнових кислот Thermo scientific genomic DNA purification kit (США), Thermo scientific plant RNA purification kit (США) та Ambition purelink RNA mini kit (США).

При використанні комерційних наборів виділення також проводилось за інструкціями виробників: у першому випадку (Thermo scientific plant RNA purification kit) гомогенізований матеріал змішується з 500 мкл лізуючого буферу, інкубувався 3 хвилини на водяній бані за температури 56°C, центрифугувався 5-10 хвилин при 8-9 тисяч обертів за хвилину. Отриманий надосад переносився та змішувався з 96 % етиловим спиртом за допомогою піпетування. Суміш переносилась у колонку і центрифугувалась 1 хвилину. Після цього додавались 700 мкл відмивочного буферу 1, центрифугувалось. Після центрифугування додавалось 500 мкл відмивочного буферу 2 і знову центрифугувалось. Цей крок повторювали двічі. Потім йшло додаткове центрифугування з метою просушки мембрани колонки. Після кожного етапу з центрифугуванням вміст мікропробірки спустошувався. Для елюції використовувались 50 мкл води без рибонуклеаз.

У другому випадку, гомогенізувались листові пластинки в рідкому нітрогені, після додавання 500 мкл ТЕ буфера, проводилось центрифугування 1 хв. за 8 тисяч обертів на хвилину. До відібраного надосаду додавалось 20 мкл 2-меркаптоетанолу і лізуючий буфер, після чого знову проводилось центрифугування 3 хвилини за 8 тисяч обертів на хв., відбиралось 500 мкл середньої фракції, додавалось до неї 500 мкл етанолу. Після цього відбиралось 700 мкл зразку, що переносився в колонку, центрифугувався 2 хвилини за 8 тисяч обертів на хв., утворений осад зливався – тотальна РНК мала залишитись на мембрані колонки. У колонку додавався Wash Buffer 1,

проводилось центрифугування 1 хвилину за 8 тисяч обертів на хв., і те, що проходило крізь колонку зливалось знову, додавалось 700 мкл Wash Buffer 2, проводилось центрифугування 1 хвилину за 8 тисяч обертів на хв., за необхідності попередня дія повторювалась знову. Після цього пуста колонка центрифугувалась 1 хвилину за режиму в 8 тисяч обертів на хв., додавалось 40 мкл вільної від РНКаз води.

Отримана тотальна РНК зберігалась у холодильнику за -20°C .

Ампліфікацію продуктів ЗТ-ПЛР проводили у реальному часі на ампліфікаторі Rotor Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd, Австралія). Реакційна суміш, у кількості 20 мкл включала: $\text{H}_2\text{O}_{\text{деіон}}$ – 8,5 мкл; $10\times$ ПЦР-буфер – 2,5 мкл; сахароза + крезол – 2,5 мкл; 4мМ dNTP – 2,5 мкл (1,76 мМ – 2,84 мкл); DTT – 1,24 мкл; прямий праймер – 0,5 мкМ; зворотний праймер – 0,5 мкМ; флуоресцентний зонд - 0,1 мкМ, Taq-полімераза (2,5 μl) (Pfu DNA, ThermoFisher Scientific, USA, Литва) – 0,25 мкл; ревертаза (200 μl) (RevertAidTM M-MuLV, ThermoFisher Scientific, USA, Литва) – 0,04 мкл; Mg^{2+} – 3,0 мМ і 5 мкл НКЗ, або ПКЗ, або внутрішній контроль, або досліджуваний зразок (Osmana et al., 2008). Концентрація прямого, зворотного праймерів, флуоресцентного ДНК-зонду були підібрані емпірично. Використовували наступні праймери: прямий, зворотний і флуоресцентно мічений ДНК-зонд: GLRaV-3 56f – AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA – прямий; GLRaV-3 285 r – GTATTGGACTACSTTTCGGGAAAAT – зворотний; GLRaV-3 181p – CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACA – ДНК-зонд. У реакції застосовували наступний протокол зворотної транскрипції і ампліфікації: 50°C – 2 хв., 95°C – 15 хв. і 45 циклів 95°C – 15 сек. і 57°C – 1 хв.

Мікросателітний аналіз. У дослідження були взяті технічні сорти винограду «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний». Для оздоровлення сорту «Каберне Совіньйон», ураженого 3-м вірусом хвороби скручування листя виноградної лози і збудником бактеріального раку попередньо

ідентифікували цей сорт. Для цього проводили мікросателітний аналіз із використанням мікросателітних маркерів: серія серія VVS – VVS2. Було проаналізовано дванадцять мікросателітних локусів (VVMD5 та VVMD7 [53]; VVMD25, VVMD27, VVMD28 та VVMD32 [52]; VVS2 [208]; VrZAG62 та VrZAG79 [198]; VvIv35 [153]; VChr5c та VChr9a [68]. Екстракцію загальної ДНК із зразків листя проводили методом СТАВ [76]. Екстраговані зразки ДНК елюювали в буфері 0,1x TE (Tris-HCl 100 мМ, EDTA 0,1 мМ). Відібрані SSR були ампліфіковані за допомогою трьох ПЛР-реакцій. Підготовлені аліквоти праймерів мали робочу концентрацією 10 мкМ. Реакційна суміш для ПЛР (об'єм 25 мкл) містила: 20 нг геномної ДНК, 200 мкмоль кожного dNTP, 1 – 2.5 ммоль MgCl₂ (залежно від типу праймерів), 0,01 % твін-20, 1 од. Таq-полімерази, 0,2 мкмоль кожного праймеру. Ампліфікацію проводили за допомогою термоциклера Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія) згідно протоколу: 94 °C - 15 хв, потім 38 циклів по 94 °C/30 с, 56 °C/90 с та 72 °C/60 с, з кінцевим етапом подовження при 72 °C протягом 30 хв. Візуалізацію фрагментів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ 8 %) у буфері 1 x TBE за допомогою відеосистеми UVP Bioimaging Systems EC3. Використовували маркери молекулярної ваги pBR 322 DNA / Bsu R1 (Hae III) (ThermoFisher Scientific, USA): 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11, 8.

2.3. Оздоровлення винограду *in vitro*

У польових умовах шляхом проведення візуальної селекції винограду були виявлені кущі з візуальними симптомами хвороби скручування листя винограду. З даних кущів було взято верхівки пагонів для введення у культуру тканин і органів *in vitro*, а також зразки для ідентифікації збудника хвороби скручування листя винограду шляхом лабораторного тестування.

Матеріалом для роботи були апікальні меристеми, одновічкові мікрочубуки, мікроклональні рослини технічних сортів винограду, які використовували у роботі («Одеський чорний» та «Каберне Совіньйон»).

Роботи, пов'язані з розмноженням та оздоровленням рослин винограду в культурі тканин і органів *in vitro* здійснювали в асептичних умовах ламінарних та культуральних боксів. Фізичні параметри культивування: температура 24–25 °С, 16-годинний фотоперіод, освітлення 2500 – 3000 лк., вологість повітря 60–70 %.

Введення ініціальних експлантів, пасажування, укорінення та адаптацію мікроклонів винограду *in vitro* проводили згідно прийнятої в установі технології [6].

У культуру *in vitro* вводили меристеми розміром: 0,2–0,4 мм (з одним, двома листковими примордіями); 0,5–0,7 мм (з двома, трьома листковими примордіями); 0,8–1,0 мм (з одним, двома покривними листочками).

Роботу по ізоляції апікальних меристем проводили під мікроскопом МБС-9 при 16-кратному збільшенні за допомогою сегмента леза. Визначення лінійних розмірів ізолюваної меристеми проводили за допомогою окуляр-мікрометра до МБС-9.

Культивування здійснювали на модифікованих поживних середовищах – МС 1, МС 2 та МС (стандарт). Для введення в культуру *in vitro* ініціальних експлантів винограду використовували поживне середовище, що містило 0,5 мг/л 6-БАП і 0,1 мг/л ІОК, для мікророзмноження, укорінення та проведення переадаптації – поживне середовище, що містило 0,2 мг/л 6-БАП і 0,3 мг/л ІОК та половинну кількість макросолей, для культивування апікальних меристем – поживне середовище, що містило збільшену кількість вітамінів, фітогормонів та гіберелової кислоти.

Поживні середовища розливали у культуральні ємності по 30 мл і автоклавували при температурі 120 °С, 1,0 атм. 15 хв.

Термотерапію винограду in vitro проводили в термокамері протягом 8

тижнів за температури 37 °С з 16-годинним фотоперіодом і використанням холодного білого флуоресцентного світла (2-3 тис. лк.). Температуру збільшували поступово, починаючи з 25 °С.

Для проведення *хіміотерапії* у поживне середовище МС, перед автоклавуванням додавали віруцидні препарати – рибавірин та озельтамівір. Концентрації препаратів встановлювали на основі оцінки фітотоксичності [36].

Хіміотерапію проводили протягом трьох пасажувань по 30 днів кожне (загалом 90 днів). Після чого частину рослин переносили на свіжі поживні середовища МС для мікророзмноження, укорінення та переадаптації, а частину використовували для виділення апікальних меристем із подальшим їх культивуванням.

Кількість ініціалей для кожного варіанту досліджень дорівнювала 30 шт., по 10 шт. у повторності. Кожен експлант представляв одне повторення і оцінювався індивідуально.

Ініціальні експланти та сформовані рослини культивували у скляних ємкостях діаметром 40 мм, висотою 150 мм. Об'єм поживного середовища дорівнював 30 мл. У цих ємкостях рослини знаходились і під час оздоровлення за різними методами.

Схема проведення досліджень:

Дослід 1. Оздоровлення винограду методом апікальних меристем, визначення умов їх культивування.

Варіант 1 – МС 1+апикальні меристеми розміром 0,2–0,4 мм;

Варіант 2 – МС 1+апикальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм;

Варіант 3 – МС 1+апикальні меристеми розміром 0,8–1,0 мм;

Варіант 4 – МС 2+апикальні меристеми розміром 0,2–0,4 мм;

Варіант 5 – МС 2+апикальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм;

Варіант 6 – МС 2+апикальні меристеми розміром 0,8–1,0 мм;

Варіант 7 – МС (стандарт)+апикальні меристеми розміром 0,2–0,4 мм;

Варіант 8 – МС (стандарт)+апикальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм;

Варіант 9 – МС (стандарт)+апикальні меристеми розміром 0,8–1,0 мм.

Дослід 2. Оздоровлення винограду методом термотерапії.

Варіант 1 – Термотерапія мікроклональних рослин + подальше виділення і культивування апікальних меристем;

Варіант 2 (Контроль 1) – Культивування мікроклональних рослин без термотерапії + подальше виділення і культивування апікальних меристем;

Варіант 3 – Культивування апікальних меристем + подальша термотерапія мікропагонів;

Варіант 4 (Контроль 2) – Культивування апікальних меристем без термотерапії.

Дослід 3. Оздоровлення винограду методом хіміотерапії.

Роботу проводили за наступною схемою:

3.1. Елімінація GLRaV-3 на основі проведення хіміотерапії

Варіант 1.1 – Рибавірин, 15 мг/л;

Варіант 1.2 – Рибавірин, 20 мг/л;

Варіант 1.3 – Рибавірин, 25 мг/л;

Варіант 1.4 – Озельтамівір, 30 мг/л;

Варіант 1.5 – Озельтамівір, 40 мг/л;

Варіант 1.6 – Озельтамівір, 80 мг/л;

Варіант 1.7 – Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 30 мг/л;

Варіант 1.8 – Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 40 мг/л;

Варіант 1.9 – Контроль (базове поживне середовище).

3.2. Елімінація GLRaV-3 на основі хіміотерапії та методу апікальних меристем

Варіант 2.1 – Рибавірин, 15 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.2 – Рибавірин, 20 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.3 – Рибавірин, 25 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.4 – Озельтамівір, 30 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.5 – Озельтамівір, 40 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.6 – Озельтамівір, 80 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.7 – Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 30 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.8 – Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 40 мг/л + апікальні меристеми;

Варіант 2.9 – Контроль (базове поживне середовище) + апікальні меристеми.

У процесі оздоровлення винограду *in vitro* за різними способами визначали: приживлюваність ініціальних експлантів (%), кількість життєздатних мікроклонів та мікропагонів (%), рівень регенерації ініціальних експлантів (%), біометричні показники росту та розвитку вегетативної маси мікроклонів (кількість утворених пагонів, коренів (шт.), їх висоту та довжину (см), коефіцієнт елімінації (КЕ (%)) = $(N_2/N_1) \cdot 100$, де N_1 – загальна кількість рослин, що проходили оздоровлення, шт.; N_2 – кількість оздоровлених рослин, шт.). Визначення коефіцієнту елімінації вірусу *GLRaV-3* проводили через 90 днів хіміотерапії, через 6 місяців після її завершення та через 90 днів культивування апікальних меристем.

Економічну оцінку оздоровлення винограду *in vitro* проводили за показниками: загальні витрати на одержання оздоровлених мікроклонів (грн.), собівартість оздоровлених мікроклонів (грн.), прибуток (грн.), рівень рентабельності процесу оздоровлення (%).

Достовірність отриманих результатів оцінювали за допомогою програми StatSoft Statistica.

Препарати, які використовували у роботі.

Рибавірин – противірусний препарат нуклеозидної природи, який у рослинництві застосовують переважно в біотехнологічних і селекційних роботах для оздоровлення рослин від вірусних інфекцій. Препарат здатний пригнічувати реплікацію вірусної РНК, що призводить до зниження активності вірусів у клітинах рослин. За хімічною природою рибавірин є

синтетичним нуклеозидним аналогом (похідним гуанозину), який містить рибофуранозильну частину, сполучену з триазольним кільцем. Завдяки структурній подібності до природних нуклеозидів рибавірин здатний імітувати будівельні блоки РНК і ДНК, що впливає на процеси реплікації вірусного генетичного матеріалу.

Озельтамівір – противірусний препарат, який в експериментальній фітовірусології розглядають як засіб для зниження активності окремих РНК-вірусів рослин. У рослинних системах його застосування має переважно дослідницький характер і використовується головним чином у лабораторних умовах. Препарат може впливати на процеси поширення вірусних часток у рослинних тканинах, зменшуючи ступінь ураження. За хімічною будовою озельтамівір є складною органічною сполукою з циклоалкеновою основою, у структурі якої наявні ацетамідна група (NH–CO–CH₃), аміногрупа (NH₂), алкілоксифункціональний замісник (1-етилпропокси) та карбоксилатний (естерний) фрагмент.

Висновки до розділу 2

1. Для виявлення симптомів ураження виноградних рослин збудниками вірусної хвороби і бактеріального раку проводили візуальне обстеження виноградників в Одеській області, зразки рослин із характерними симптомами відбирали для ідентифікації збудників восени та протягом року. Проте візуальний контроль не дозволяє визначити ураження кущів латентною формою збудників.
2. Для ідентифікації 3-го вірусу хвороби скручування листя використовували серологічний метод ІФА-ELISA, а також ЗТ-ПЛР у реальному часі, що дозволяє у короткий термін виявити фітопатогени. Для виділення ізолятів агробактерій використовували напівселективне поживне

середовище, які потім ідентифікували методом ПЛР.

3. Ідентифікацію виділених ізолятів агробактерій проводили методом ПЛР, а для виявлення їхньої патогенності і наявності Ті-плазмиди, що відповідає за вірулентність, проводили секвенування цих ізолятів.

4. Матеріалом для досліджень з оздоровлення винограду *in vitro* були апікальні меристеми, одновічкові мікрочубуки та мікроклональні рослини технічних сортів винограду («Одеський чорний» та «Каберне Совінйон»). Ініціальні експланти для введення в культуру *in vitro* отримували з верхівок пагонів кущів із візуальними симптомами хвороби скручування листя винограду. Для верифікації вірусної інфекції здійснювали лабораторне тестування зразків мікроклонів винограду та верхівок вегетативних пагонів.

5. Культивування експлантів та мікроклонів винограду *in vitro* проводили в асептичних умовах на модифікованих поживних середовищах МС 1, МС 2 та стандартному МС із різними концентраціями фітогормонів, мінеральної основи та вітамінів. Поживні середовища автоклавували при 120 °С, 1 атм., 15 хв. Фізичні параметри культивування: температура 24–25 °С, 16-годинний фотоперіод, освітленість 2500–3000 лк, вологість повітря 60–70 %.

6. Дослідження із оздоровлення винограду проводили за трьома дослідями:

Дослід 1 – Оздоровлення методом апікальних меристем із варіантами меристем різних розмірів (0,2–1,0 мм) та різних поживних середовищ (МС 1, МС 2, стандарт), з оцінкою регенерації та приживлюваності меристем.

Дослід 2 – Оздоровлення методом термотерапії за температури 37 °С протягом 8 тижнів, із оцінкою впливу термічного режиму на мікроклони та культивування апікальних меристем.

Дослід 3 – Оздоровлення методом хіміотерапії з застосуванням віруцидних препаратів (рибавірин та озельтамівір) у різних концентраціях, у тому числі в комбінації з апікальними меристемами, із подальшим мікророзмноженням та оцінкою ефективності елімінації вірусу *GLRaV-3*.

7. Оцінювання ефективності оздоровлення проводили за коефіцієнтом елімінації вірусу *GLRaV-3* та станом ініціальних експлантів і мікроклонів винограду після застосування різних методів оздоровлення. Показники включали визначення приживлюваності експлантів, їх життєздатність та біометричні характеристики розвитку вегетативної маси мікроклонів. Достовірність отриманих результатів визначали за допомогою програмного забезпечення *StatSoft Statistica*.

РОЗДІЛ 3

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ ХВОРОБИ СКРУЧУВАННЯ ЛИСТЯ ТА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ВІНОГРАДНОЇ ЛОЗИ

3.1. Фітосанітарне обстеження виноградних насаджень

У результаті обстеження виноградних насаджень на деяких виноградних рослинах сорту «Одеський чорний» були виявлені симптоми, а саме: листя згорталось у вигляді трикутника, мало легке пожовтіння і хлоротичну плямистість, проте жилки залишалися зеленими (рис. 3.1).



А

Б

Рис 3.1 А – симптоми хвороби скручування листя на сорті «Одеський чорний» (ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», липень 2023 р.)
Б - симптоми хвороби скручування листя на сорті «Одеський чорний» (ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», червень 2024 р.)

На рис. 3.1 показано симптоми вірусної хвороби скручування листя виноградної лози.

У рослин із характерними зовнішніми ознаками ураження спостерігалось зниження вмісту цукрів та підвищення кислотності ягід. Крім того, пригнічувався розвиток кущів, що зрештою призводило до їхньої загибелі та спричиняло суттєві економічні збитки.

Під час фітосанітарного обстеження ділянок, призначених для заготівлі сертифікованої лози, на сортах «Каберне Совіньйон» та «Одеський чорний» було виявлено симптоми бактеріального раку. На пагонах зафіксовано пухлини, які у червні-серпні були дрібними, зеленого або рожевого кольору. Згодом вони поступово збільшувалися, ставали горбистими, твердими та темніли. Такі новоутворення перешкоджали сокоруху та спричиняли дефіцит елементів живлення, що загрожувало загибеллю кущів. Використання підщеп і прищеп, заготовлених із таких рослин, призвело б до подальшого поширення інфекції (рис. 3.2).



Рис. 3.2 Симптоми хвороби бактеріального раку на сорті «Одеський чорний» (1) і «Каберне Совіньйон» (2, 3) (Одеська область, 2023 рік)

На рис. 3.2 показано симптоми бактеріального раку виноградної лози сорту «Одеський чорний»: 1 – пухлина утворилася на місці щеплення прищепи і підщепи, 2 – пухлина утворилася на штабмі; 3 – пухлина утворилася на рукаві.

Фітосанітарне обстеження виноградників у господарствах Одеської області виявило рослини з ознаками вірусного скручування листя та куці, уражені бактеріальним раком (табл. 3.1)

Таблиця 3.1

**Сорти виноградних рослин різних господарств Одеської області,
що мали симптоми ураження збудниками вірусних хвороб і
бактеріального раку винограду (2023-2025 рр.)**

Сорт, клон винограду	Господарство	Збудники	
		<i>GLRaV</i>	<i>R. radiob.</i>
«Каберне Совіньйон»	ТОВ «Агрофірма Шабо»	-	+
«Каберне Совіньйон»	ДП «ДГ «Таїровське»	+	-
«Одеський чорний»		-	+
«Каберне Совіньйон»	Селекційна ділянка ННЦ «ІВіВ ім В. Є. Таїрова»	-	-
«Одеський чорний»	Клоно-дослідна ділянка ННЦ «ІВіВ ім В. Є. Таїрова»	+	-
«Одеський чорний»	ТОВ «Виноград- Одеса»	-	-
«Каберне-Совіньйон» /«БхР Кобер 5 ББ» 211161		-	-

Бактеріальний рак – це хвороба, яка може досить довгий час знаходитися у прихованій (латентній) формі і проявлятися через появу ушкоджень, а саме сезонна обрізка та агротехнічні заходи, пошкодження морозами, градом, гризунами. Пухлини виникають на місці поранення. У результаті аналізу щорічного моніторингу візуального обстеження встановлено, що кількість рослин із симптомами бактеріального раку збільшується і це є наслідком саме наявності латентної форми збудника (рис. 3.3).

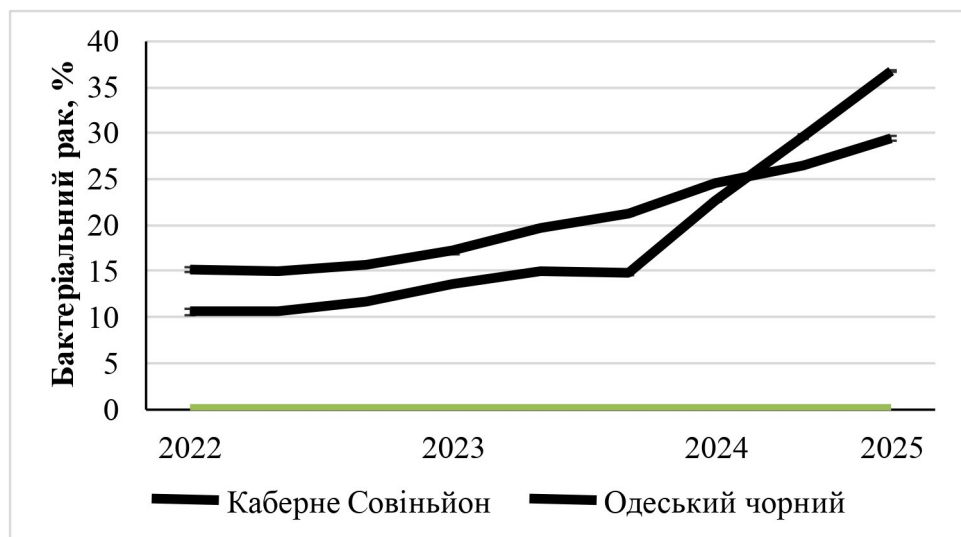


Рис. 3.3 Динаміка (%) симптомів ураження збудником бактеріального раку (*R. radiobacter*) сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний» за період 2022-2025 років на виноградниках в Одеській області

Наведено середні значення; \pm стандартна похибка (\pm SEM). Двофакторний дисперсійний аналіз із повтореннями показав, що як фактори А (сорт), так і В (рік дослідження), а також їх взаємодія (АхВ) суттєво впливали на відсоток уражених рослин ($p < 0,05$). Це свідчить про нестабільність реакції сортів залежно від умов року, що слід враховувати під час сортового районування та фітосанітарного прогнозування.

Як свідчать дані рис. 3.3, упродовж періоду обстеження виноградників Одеської області спостерігалася тенденція до збільшення кількості кущів із симптомами бактеріального раку. Найвищий показник був у 2025 році, що

можна пояснити переходом латентної форми збудника в активну за сприятливих для нього умов у придбаному садивному матеріалі.

Для хвороби скручування листя винограду збільшення кущів винограду з симптомами за період обстеження виноградників з 2022 по 2025 рр. ми не спостерігали (рис. 3.4).

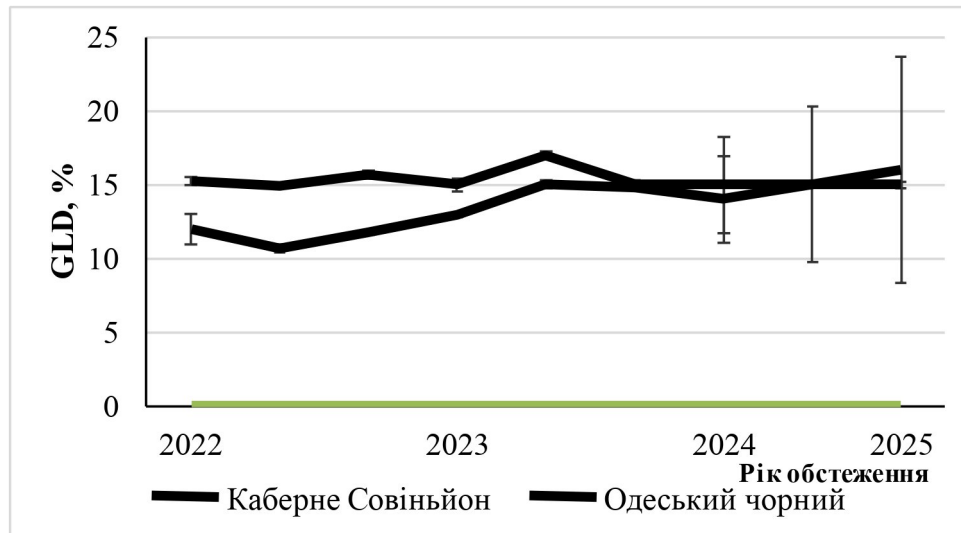


Рис. 3.4 Динаміка (%) симптомів ураження хворобою скручування листя винограду (*GLD*) сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний» за період 2022-2025 років на виноградниках в Одеській області

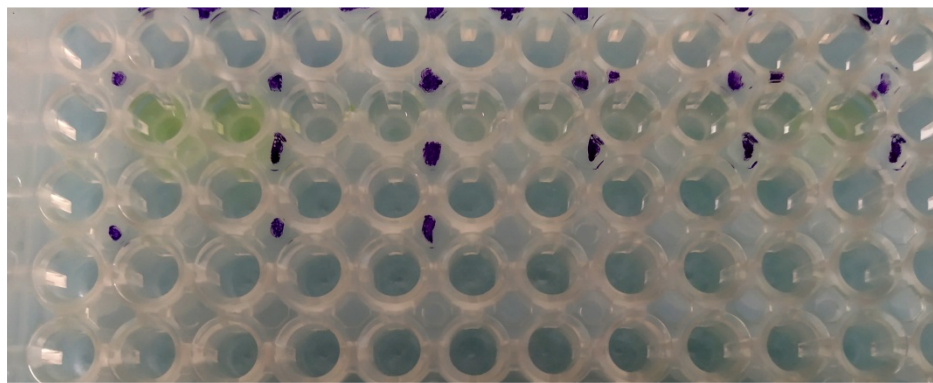
Наведено середні значення; \pm стандартна похибка (\pm SEM). Двофакторний дисперсійний аналіз із повтореннями показав, що як фактори А (сорт), так і В (рік дослідження), а також їх взаємодія (АхВ) суттєво впливали на відсоток уражених рослин ($p < 0,05$). Це свідчить про нестабільність реакції сортів залежно від умов року, що слід враховувати під час сортового районування та фітосанітарного прогнозування.

Проте, скручування листя не означає наявності вірусу, подібні симптоми можуть бути при фізіологічних відхиленнях, після обробки гербіцидами, ураження фітоплазмами. Крім того, при виробництві саджанців наявність латентної інфекції сприяє поширенню вірусу. Для цього необхідно проводити ідентифікацію фітопатогенів із використанням сучасних лабораторних методів, таких як ІФА і ПЛР.

3.2. Ідентифікація 3-го вірусу хвороби скручування листя виноградної лози

Для вірогідної ідентифікації збудників хвороби скручування листя сучасними лабораторними методами велике значення має правильний сезонний відбір зразків, що відповідає максимальному титру накопичення вірусу, а саме відбір верхівкового молодого листя з кущів, які мали відповідні симптоми, а також безсимптомні для виявлення латентної інфекції.

Було відібрано 30 зразків із кущів сорту «Каберне Совіньйон» 15 з симптомами і 15 безсимптомні і 30 зразків сорту «Одеський чорний» у такій же кількості відповідно. Для діагностики хвороби спочатку використовували метод ІФА-ELISA, а потім, для підтвердження результату, ЗТ-ПЛР у реальному часі (рис. 3.5).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Рис. 3.5 Ідентифікація вірусів скручування листя методом ІФА:
2–3 позитивний контроль 3-го вірусу скручування листя з комерційного набору (жовте забарвлення); 4–5 – негативний контроль (PBS- буфер);
10–11 – зразки виноградних рослин сорту «Одеський чорний»

У результаті ідентифікації фітопатогену методом ІФА було встановлено ураження сорту «Одеський чорний» 3-м вірусом хвороби

скручування листя, але сигнал оптичної щільності був слабким і для підтвердження збудника була проведена його ідентифікація методом ЗТ-ПЛР з флуоресцентною детекцією (рис. 3.6).

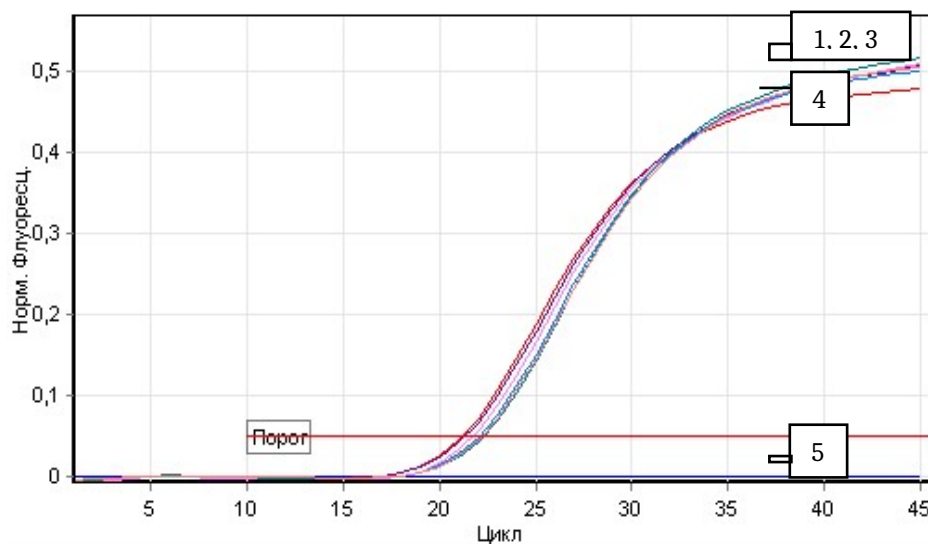


Рис. 3.6 Детекція *GLRaV-3* хвороби скручування листя винограду методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу: 1, 2 – *GLRaV-3* у рослині сорту «Одеський чорний»; 3 – *GLRaV3* у рослині сорту «Каберне Совіньйон»; 4- ПКЗ, позитивний зразок 3-й вірус скручування (ІФА); 5 – НКЗ, негативний зразок (ПЛР-буфер)

Також встановлено, що не всі зразки досліджених сортів виявилися зараженими цим вірусом, хоча і мали симптоми скручування.

Результати ІФА були підтверджені за допомогою ПЛР у реальному часі з використанням відповідного набору праймерів. Це дослідження було проведено також у рамках щорічного моніторингу наявності 3 вірусу скручування листя, який проводиться для розуміння епідеміології цих вірусів та фітосанітарного стану виноградників на півдні України.

Зразки рослин, які показали наявність 3-го вірусу методом ІФА, були використані як позитивний контроль під час скринінгу зразків виноградної лози методом ЗТ-ПЛР у реальному часі. В основі ПЛР із зворотною транскрипцією лежить використання мічених ДНК-зондів, комплементарних

нуклеїновим кислотам і гібридизують тільки з відповідними нуклеотидними послідовностями РНК вірусу.

Для удосконалення ЗТ-ПЛР були оптимально підібрані умови для виявлення інтенсивності флуоресцентного сигналу в реакції, а саме: відповідні праймери, мічені зонди, реакційна суміш і концентрація іонів магнію. У дослідженні використовували різні концентрації іонів Mg^{2+} від 1 мМ до 5 мМ. Було встановлено, що оптимальною концентрацією іонів магнію для ідентифікації РНК-вого вірусу хвороби скручування листя є 2,5 мМ. Таким чином було підтверджено наявність ураження виноградних кущів сорту «Одеський чорний» і «Каберне Совіньйон» 3-м вірусом хвороби скручування листя винограду.

Також удосконалено та вперше в Україні застосовано метод мультиплексної ЗТ-ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією для ідентифікації 3-го вірусу хвороби скручування листя і збудника бактеріального раку винограду (рис. 3.7).

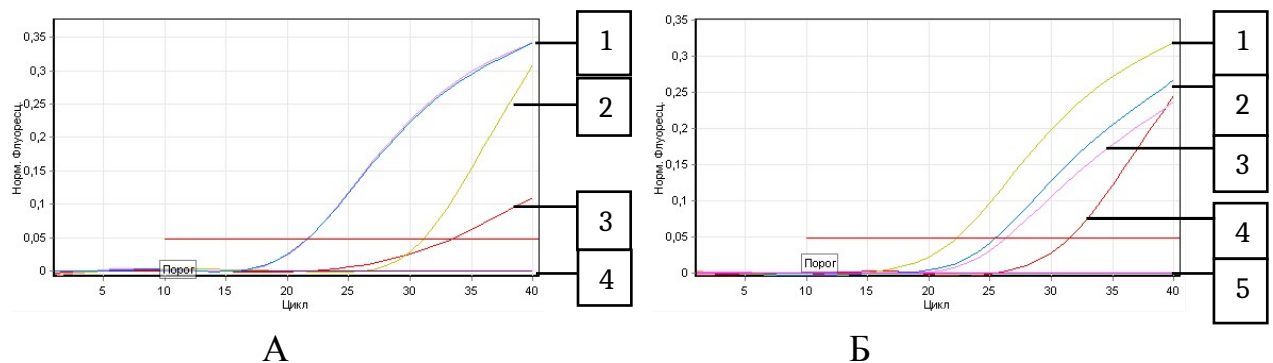


Рис. 3.7 Ідентифікація збудників хвороб виноградної лози методом

ПЛР у режимі реального часу:

А – виявлення збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter*:

1 – ПКЗ, позитивний зразок музейний штам *A. tumefaciens* 8628;

2 – *Rhizobium radiobacter*, виявленого на сорті «Каберне Совіньйон»,

3 – *Rhizobium radiobacter*, виявленого на сорті «Каберне Совіньйон»; 4 – НКЗ;

Б – виявлення *GLRaV-3*:

1 – *GLRaV-3* в рослинах сорту «Каберне Совіньйон»;

2 – ПКЗ, 3, 4 – *GLRaV-3* у рослинах сорту «Одеський чорний»; 5 – НКЗ

Запропонований метод виявився чутливішим, ніж передбачено стандартом ЕРРО щодо обов'язкового тестування за допомогою ІФА. Він дає змогу виявити на 35 % більше латентно інфікованих рослин. Відсутність стадії електрофорезу мінімізує ризик контамінації, а наявність внутрішнього зонда суттєво підвищує специфічність аналізу та скорочує час проведення реакції [25, 15].

3.2.1 Оцінка шкідливості 3-го вірусу хвороби скручування листя виноградної лози

За результатами фітосанітарного обстеження на сортах «Каберне Совін'йон» та «Одеський чорний» виявлено рослини з ознаками скручування листя. За допомогою методів ІФА та ЗТ-ПЛР у цих зразках ідентифіковано вірус скручування листя винограду-3 (*GLRaV-3*). Моніторинг розвитку хвороби підтвердив деструктивний вплив вірусу на фізіологічний стан рослин. Зокрема, ураження спричиняло деградацію хлорофілу в листках, недорозвиненість грон, зниження цукристості та підвищення кислотності ягід. Такі зміни зумовлені пошкодженням флоемної (луб'яної) тканини, що призводить до некрозу або закупорювання ситоподібних трубок і ураження паренхімних клітин. Руйнування хлоропластів у хворих рослинах, а також порушення процесів синтезу й оновлення хлорофілу призводять до значного пригнічення росту кущів, зниження якості врожаю, а в окремих випадках – до загибелі виноградників.

Порушення синтезу хлорофілу, водного обміну та кореневого живлення суттєво пригнічують інтенсивність фотосинтезу у вірусозаражених рослин. Оскільки всі фізіологічні процеси в організмі винограду взаємозумовлені, зниження фотосинтетичної активності негативно впливає на загальний метаболізм. Зокрема, деградація хлорофілу та сповільнення

фотосинтезу призводять до закономірного зниження цукристості ягід у хворих рослин.

Передчасне старіння листя вірусозаражених рослин, зумовлене деградацією хлорофілу, пригніченням росту кореневої системи та загальним ослабленням життєздатності організму, стає причиною серйозних деструктивних змін. Зокрема, це призводить до порушення водного режиму, зниження активності дихальних ферментів та розладів білкового обміну.

Системні порушення обміну речовин, спричинені вірусною інфекцією, призводять до незадовільного визрівання лози та суттєвого зниження в ній вмісту вуглеводів.

Глибокі порушення обміну речовин в інфікованих рослинах зрештою негативно позначаються на їхньому рості, врожайності та довговічності (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Вплив вірусу скручування листя на показники росту та врожайності
винограду сорту «Одеський чорний» (2024 р.)**

Варіант	Кількість кущів, шт.	Приріст, см; %		Врожай винограду, кг, %	
		см	%	кг	%
Контроль	10	24	100	3,7	100
Вірус скручування листя	10	17	71	1,9	51,3

Аналіз даних таблиці свідчить про суттєвий негативний вплив вірусу скручування листя на вегетативну масу та врожайність кущів. Середній приріст однорічних пагонів в інфікованих рослин становив 17 см, що складає тільки 71,0 % від показника здорових контрольних кущів (24 см). Аналогічна тенденція спостерігалася і при оцінці врожайності: середній врожай з одного

ураженого куща становив 1,9 кг (51,3 % від контролю), у здорових рослин цей показник дорівнював 3,7 кг. Достовірність отриманих результатів підтверджена методами математичної статистики.

Аналіз якісних показників урожаю виявив суттєві розбіжності між здоровими та інфікованими кущами. Вміст цукрів у ягодах уражених рослин дорівнював у середньому 17,8 г/100 см³, у здорових контрольних зразках цей показник дорівнював 20,0 г/100 см³. Разом з тим спостерігали збільшення титрованої кислотності соку: у хворих на скручування листя рослин вона складала 13 г/дм³, що на 30 % перевищувало показник здорових кущів (10 г/дм³).

Вино, виготовлене з інфікованого винограду, характеризувалося зниженим вмістом спирту та менш інтенсивним забарвленням. Крім того, такі виноматеріали характеризуються низькою концентрацією фенольних і дубильних речовин, слабо вираженим сортовим ароматом та підвищеною титрованою кислотністю, що суттєво знижує їхню дегустаційну цінність.

3.3. Ідентифікація збудника бактеріального раку винограду

У результаті обстеження виноградних насаджень були виявлені кущі винограду з симптомами бактеріального раку, як на молодих, так і на плодоносних виноградниках сортів «Каберне Совіньйон», «Одеський чорний», із яких відбирали зразки для виділення ізолятів агробактерій.

Для ідентифікації збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter* спочатку проводили виділення агробактерій на поживному середовищі Рой і Сассера або безпосередньо з пухлини чи чубуків лози. Бактерії інкубували протягом 7-10 діб при температурі 27 °С. На середовищі Рой і Сассера вирости характерні колонії червоного кольору з білою облямівкою (рис. 3.8). Отримані бактерії пересівали у пробірки з картопляним агаром та інкубували

протягом доби за температури 27 °С, після чого ідентифікували методом ПЛР.

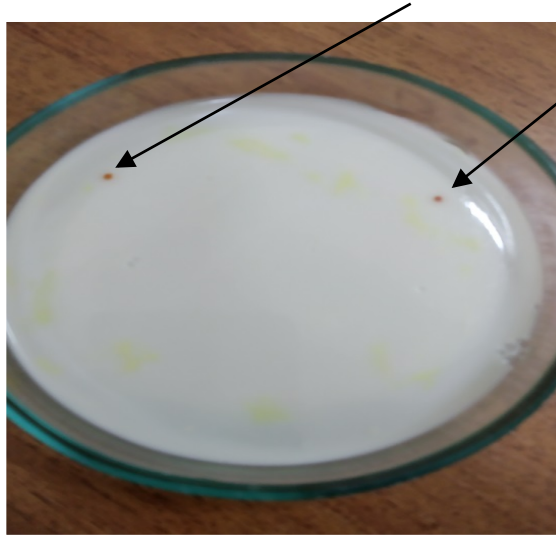


Рис. 3.8 Колонії агробактерій на напівселективному поживному середовищі Рой і Сассера

За результатами аналізу з використанням різних пар праймерів встановлено, що більшість виділених ізолятів агробактерій і контрольних штамів дали позитивну реакцію з парою праймерів VCF3/VCR3. Це підтверджує вірулентність ізолятів та наявність у них Tі-плазмід нопалінового або октопінового типу (рис. 3.9).

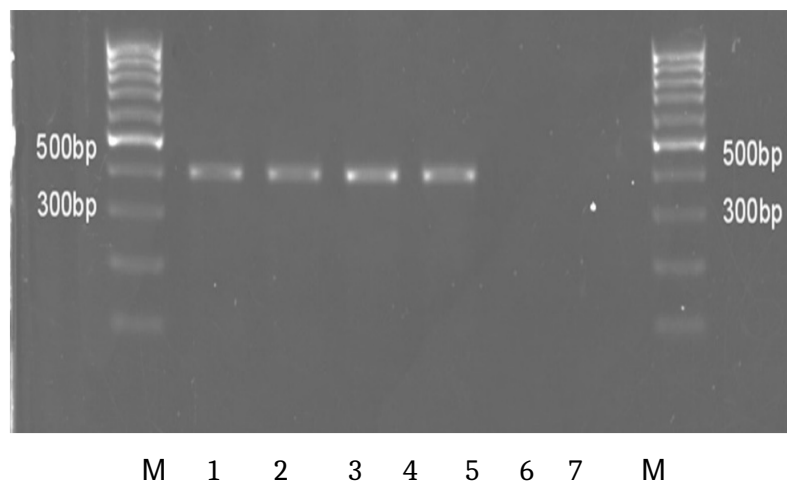


Рис. 3.9 Результати ПЛР із праймерами VCF3/ VCR3:

M – маркер молекулярної маси ДНК розмір 100 п.н. (*ThermoFisher Scientific, USA, USA*); 1 – позитивний контроль музейний штам *A. tumefaciens* 8628; 2 -

позитивний контроль музейний штам *A. tumefaciens* C-583; 3 – патогенні ізоляти в зразках виноградної лози сорту «Каберне Совінйон»; 4- патогенні ізоляти в зразках виноградної лози сорту «Одеський чорний»; 5, 6 – непатогенні ізоляти агробактерій; 7 – негативний контроль (ПЛР-буфер)

У результаті ПЛР-дослідження були виявлені патогенні ізоляти агробактерій, які були перевірені на видовий склад методом секвенування (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Штами агробактерій, геноми яких були секвеновані (2023 р.)

Штам	Господар	Район виділення	Онкогенна плазмід	Локалізація
0d	<i>Vitis vinifera</i>	Одеська область	pTi Type I.a (nopaline)	міжряддя
229	<i>Vitis vinifera</i>	Одеська область	pTi Type II (octopine)	виноград
315	<i>Vitis vinifera</i>	Одеська область	-	виноград
371	<i>Vitis vinifera</i>	Одеська область	-	виноград
387	<i>Vitis vinifera</i>	Одеська область	-	виноград
55	<i>Vitis vinifera</i>	Одеська область	-	виноград

Виділені ізоляти агробактерій досить різноманітні та належать до різних груп видів (так званих «геномовидів») *Allorhizobium* біовару 1 (BV1), включаючи G1, G4, G7 та G14 (рис. 3.10). Незважаючи на те, що вони були виділені з виноградної лози, жоден із ізолятів не є агробактерією біовару 3 (BV3). Декілька штамів несуть онкогенні плазмід, які були класифіковані раніше за опублікованою схемою [220]. Штам 229 несе плазмід рТі типу II (октопіновий тип), тоді як штам 0d несе плазмід рТі типу I.a (нопаліновий тип). Цікаво, що штам 0d було виділено саме у міжрядді виноградників, всі інші штами, виділені з виноградної лози та пухлин.

Секвеновані штами позначені червоними крапками. Основні види

агробактерій (біовари) заштриховані та позначені. Ключові групи видового рівня позначені в біоварі 1. Дерево має середину кореня, кольором позначена опора гілки.

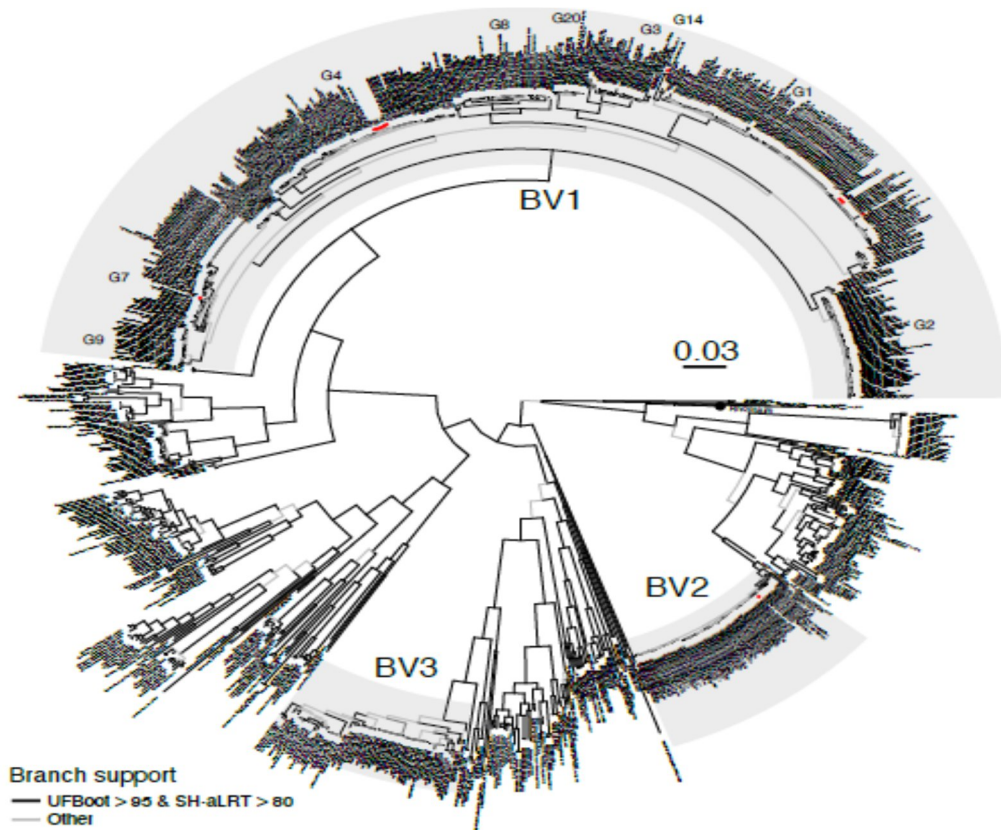


Рис. 3.10 Філогенія й аналіз мультилокусної послідовності різних агробактерій/ризобій

Гілки з ультрашвидким завантаженням (UFBoot) > 95% і підтримкою SH-aLRT > 80% позначені чорним, інші гілки позначені сірим кольором.

Згідно з даними рис. 3.10, секвенування геному виділених ізолятів показало, що, попри їхнє походження з виноградної лози, майже всі штами належать до біовару 1 *A. tumefaciens*. Вони містять нопалінову Tі-плазмідну (pTі Type I.a) та ідентифікуються як вірулентний вид *Rhizobium radiobacter*. Досліджені штами є генетично різноманітними і представляють кілька геномних груп BV1. Більшість із них несуть онкогенні Tі-плазмідні, характерні для агробактерій із широким колом господарів, що дозволяє їм успішно колонізувати винограду лозу. Кілька штамів є

близькоспорідненими та несуть один і той самий онкогенний тип плазмід, що свідчить про те, що вони можуть бути представниками клональної патогенної лінії. Встановлено, що збудником бактеріального раку на виноградниках півдня України є агробактерії виду *Rhizobium radiobacter*. Результати ПЛР аналізу виділених ізолятів агробактерій і секвенування геному показали, що більшість ізолятів агробактерій відносяться до октопінового типу плазмід (pTi Type II) і тільки один ізолят агробактерій (Od) мав нопалінову Ti-плазмиду (pTi Type I.a). Таким чином аналізуючи ізоляти агробактерій, їх геном, типи опінів можна визначити географічне місце походження садивного матеріалу виноградних рослин.

3.4. Ідентифікація сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний»

Для ідентифікації сортів винограду спочатку аналізувалися ампелографічні характеристики сортів. Слід також враховувати внутрішньосортові варіації, тобто клони, які можуть значно фенотипово розрізнятися, фактично маючи ідентичні алельні профілі. Для подолання цих лімітуючих факторів використовуються молекулярні маркери, для ідентифікації, диференціації та характеристики виноградних рослин, наприклад AFLP-аналіз (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) та SSRP-аналіз (*Simple Sequence Repeats Polymorphism*) [3]. У дослідженнях для порівняння характеристик SSR-локусів, були використані порівняльні характеристики сортів виноградних рослин отриманих у різних науково-дослідних центрах за шістьма локусами (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, vrZAG62, vrZAG79) [207, 4].

За допомогою мікросателітного аналізу було ідентифіковано сорти винограду «Каберне Совіньйон» (табл. 3.4) та «Одеський чорний» (табл. 3.5). Використання ДНК-маркерів за специфічними мікросателітними локусами

дозволило підтвердити, що рослини з симптомами ураження вірусом скручування листя 3 та збудником бактеріального раку справді належать до сортів «Каберне Совіньйон» та «Одеський чорний».

Таблиця 3.4

**Характеристика мікросателітних локусів зразка сорту
«Каберне Совіньйон»**

Мікросателітні локуси і характеристика генотипів (п.н)						
VVS2	VVMD7	VVMD 27	VRZAG 62	VRZAG 79	VVMD 28	VVMD 32
140	245	179	195	258	249	259
154	246	189	199	259	248	255

Таблиця 3.5

**Характеристика мікросателітних локусів зразка сорту
«Одеський чорний»**

Мікросателітні локуси і характеристика генотипів (п.н)						
VVS2	VVMD7	VVMD 27	VRZAG 62	VRZAG 79	VVMD 28	VVMD 32
148	279	191	176	279	258	281
169	291	194	187	282	289	292

Висновки до розділу 3

1. Обстеження насаджень винограду сортів «Каберне Совіньйон» та «Одеський чорний» в Одеській області протягом 2022–2025 років підтвердило наявність куців із симптомами скручування листя та бактеріального раку. Оскільки ці сорти мають вагомe технологічне значення для регіону, поширення згаданих захворювань становить суттєві ризики для виноградарства. Для діагностики хвороб і ідентифікації збудників хвороби скручування листя і бактеріального раку було застосовано лабораторні

методи: вірусу скручування листя: серологічний – ІФА-ELISA і молекулярно-генетичний – ЗТ-ПЛР у реальному часі, для збудника бактеріального раку: ПЛР у реальному часі. За допомогою цих методів було ідентифіковано 3-й вірус (*Grapevine leafroll-associated virus 3 GLRaV3*) хвороби скручування листя (*Grapevine leafroll disease GLD*) і збудника бактеріального раку (*Rhizobium radiobacter*). Метод ЗТ-ПЛР для *GLRaV3* було удосконалено за рахунок підбору умов проведення реакції та розроблена мультиплексна ПЛР у режимі реального часу для ідентифікації вірусу і збудника бактеріального раку одразу в одній реакції.

2. Обґрунтовано шкідливість вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*), яка проявляється у порушенні синтезу хлорофілу, зниженні якості та кількості врожаю, затримці розвитку кущів, а в окремих випадках – у повній загибелі уражених рослин.

3. Методом секвенування було доведено, що віділені нами ізоляти агробактерій є патогенними виду *Rhizobium radiobacter* і більшість ізолятів агробактерій відносяться до октопінового типу плазмід (pTi Type II). Філогенетичний аналіз показав, що на основі аналізу ізолятів агробактерій, їх гену, типів опінів можна визначити географічне місце походження садивного матеріалу виноградних рослин.

4. За допомогою мікросателітного аналізу методом ПЛР було ідентифіковано сорти винограду «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний», які виявилися ураженими *GLRaV3* і *Rhizobium radiobacter*.

5. Доведено, що отримання здорового садивного матеріалу винограду неможливе без лабораторного тестування лози. Цінні сорти, що мають важливе господарське значення, у разі зараження вірусами потребують обов'язкового оздоровлення для їх збереження та запобігання втраті генофонду.

Основні положення цього розділу викладені в таких наукових працях автора зі списку використаних джерел [129, 130, 25, 15].

РОЗДІЛ 4

ОЗДОРОВЛЕННЯ ВИНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН І ОРГАНІВ *IN VITRO*

4.1. Метод апікальних меристем

На першому етапі роботи визначали оптимальні умови для культивування апікальних меристем винограду. Ефективність технології культивування апікальних меристем залежить від кількості ініціальних експлантів, здатних проявляти морфогенну активність, успішно приживатися на поживному середовищі та регенерувати *in vitro* у рослини з високим коефіцієнтом розмноження. Одержання таких експлантів визначається, зокрема, їх розмірами та складом поживного середовища для культивування.

Апікальні меристеми сорту «Каберне Совіньйон» вводили у культуру тканин і органів *in vitro* на три типи поживних середовищ МС – МС 1, МС 2, МС (стандарт).

Проведені дослідження показали, що на першому етапі культивування (2 – 3 тижні) частина меристем (45,0–70,0% залежно від розміру експланта), некротизувала і відмирала. На нашу думку, відмирання апікальних меристем у процесі культивування відбувалося і через пошкодження апікальних структур у процесі їх виділення. Ті меристеми, які залишилися давали початок розвитку мікропагонів.

Визначення показника приживлюваності апікальних меристем на досліджуваних поживних середовищах показало, що найбільше життєздатних меристем було отримано з ініціальних експлантів розміром 0,5–0,7 мм (30,0–56,0 %) та 0,8–1,0 мм (33,0–58,0 %). З ініціальних експлантів розміром 0,2–0,4 мм життєздатних меристем було менше – їх кількість знаходилась на рівні 25,0–38,0 % (рис. 4.1).

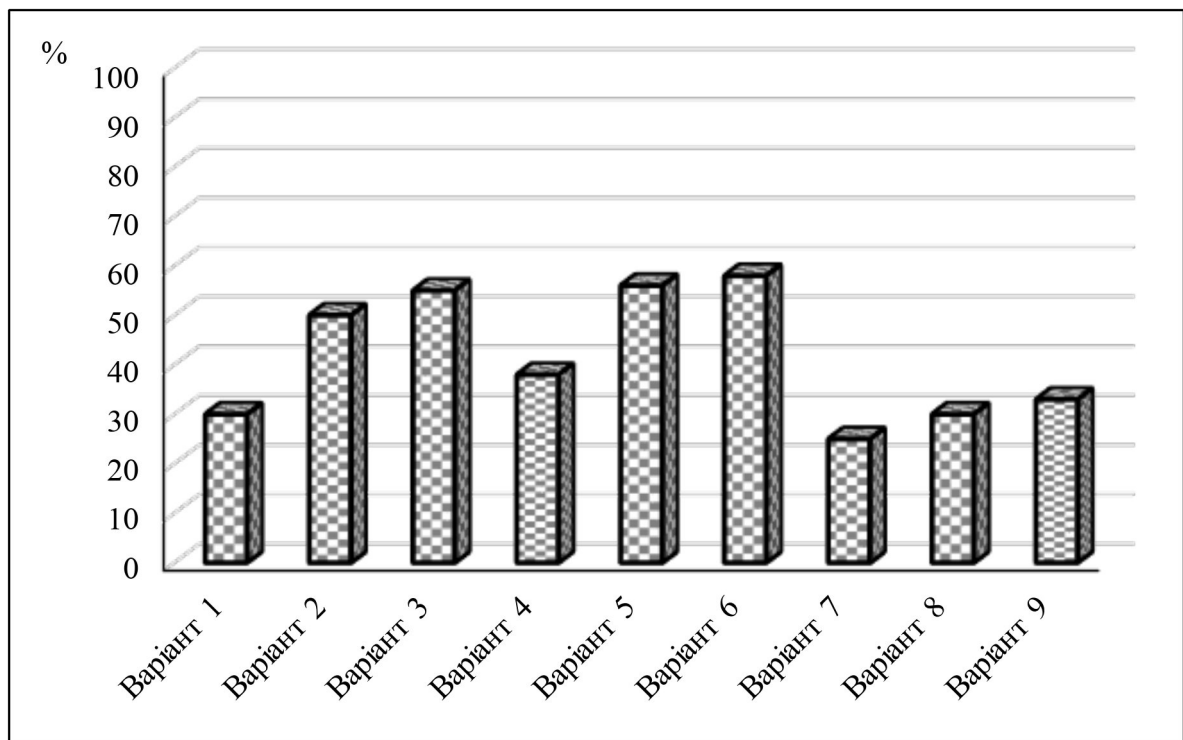


Рис. 4.1 Приживлюваність апікальних меристем винограду сорту «Каберне Совіньйон» на модифікованих поживних середовищах

На приживлюваність апікальних меристем впливав і фітогормональний склад поживного середовища (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Склад поживних середовищ, які використовували у роботі

Компоненти середовища	МС (стандарт)	МС 1	МС 2
	мг/дм ³		
1	2	3	4
Макроелементи			
NH ₄ NO ₃	1650,0	1650,0	1650,0
KNO ₃	1900,0	1900,0	1900,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,0	370,0	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0	170,0	170,0
CaCl ₂	331,0	440,0	440,0

Продовження табл.4.1

1	2	3	4
Хелат заліза			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ ЕДТА	37,3	37,3	37,3
Мікроелементи			
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Вітаміни			
Тіамін-НСІ	1,0	5,0	5,0
Піридоксин-НСІ	1,0	5,0	5,0
Нікотинова кислота	1,0	5,0	5,0
Мезоінозит	75,0	100,0	100,0
Фітогормони			
6-БАП	0,1	1,0	1,0
ІОК	0,2	0,2	0,2
ГК ₃	-	1,0	0,5
Інші складові			
Сахароза	20000,0	20000,0	20000,0
Агар	7000,0	7000,0	7000,0

На модифікованих поживних середовищах із підвищеним вмістом вітамінів

(тіамін, піридоксин, нікотинова кислота, мезоінозит) і фітогормонів (6-БАП, ГК₃) приживалося на 20,0–22,0 % (МС 1, крім апікальних меристем розміром 0,2–0,4 мм) та на 25,0–26,0 % (МС 2) більше ініціальних експлантів, ніж на поживному середовищі МС (стандарт).

Через 70 – 80 діб культивування визначали ступінь регенерації апікальних меристем та проводили обліки їх розвитку. На основі отриманих результатів було встановлено наступне. Рівень прояву регенераційних процесів залежав від обох факторів – розміру ініціального експланту та гормонального складу поживного середовища. Найвищим він був після культивування апікальних меристем на поживному середовищі МС 2. Апікальні меристеми розміром 0,2–0,4 мм характеризувалися рівнем регенерації 36,0 %, що на 7,0 % більше за аналогічний варіант на МС (стандарт); апікальні меристеми розміром 0,5–0,7 та 0,8–1,0 мм характеризувалися рівнем регенерації 56,0 та 62,0 %, що на 21,0–22,0 % більше за стандарт (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Регенераційна здатність та розвиток апікальних меристем сорту
«Каберне Совіньйон» на модифікованих поживних середовищах**

Розмір ініціальних експлантів, мм	Рівень регенерації ініціальних експлантів, %	Кількість пагонів, шт.	Висота основного пагону, мм
1	2	3	4
МС 1			
0,2–0,4	32,0	1,0±0,05	3,8±0,2
0,5–0,7	51,0	1,6±0,08	5,0±0,3
0,8–1,0	56,0	1,8±0,08	5,6±0,3
МС 2			
0,2–0,4	36,0	1,4±0,06	4,1±0,6

0,5–0,7	56,0	1,8±0,09	5,8±0,6
---------	------	----------	---------

Продовження табл. 4.2

1	2	3	4
0,8–1,0	62,0	2,0±0,09	6,2±0,7
МС (стандарт)			
0,2–0,4	29,0	0,8±0,05	3,0±0,4
0,5–0,7	35,0	1,0±0,06	3,5±0,5
0,8–1,0	42,0	1,3±0,07	4,0±0,5

На поживному середовищі МС 1 рівень регенерації апікальних меристем збільшувався порівняно з варіантами МС (стандарт) на 3,0 (0,2–0,4 мм), 16,0 (0,5–0,7 мм) та 14,0 (0,8–1,0 мм) %.

Протягом періоду культивування апікальних меристем відбувалося формування основних пагонів. Відмічено, що на середовищі МС (контроль) апікальні меристеми формували в середньому 1,0 пагона висотою 3,5 мм. На МС 1 та МС 2 експланти найменших розмірів давали початок 1,2 пагона висотою 3,9 мм. Апікальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм на середовищі МС 1 формували по 1,6 пагона висотою 5,0 мм, а на МС 2 – відповідно по 1,8 пагона висотою 5,8 мм. Меристеми розміром 0,8–1,0 мм на МС 1 формували по 1,8 пагона висотою 5,6 мм, на МС 2 – по 2,0 пагони висотою 6,2 мм.

Порівняно зі стандартним МС на середовищі МС 2 ці показники збільшувалися на 75,0 (кількість пагонів) і 36,6 (висота пагонів) %, для ініціальних експлантів розміром 0,2–0,4 мм, на 80,0 і 65,7 % для ініціальних експлантів розміром 0,5–0,7 мм та на 53,8 і 55,0 % для ініціальних експлантів розміром 0,8–1,0 мм. На МС 1 так само відмічали збільшення цих показників. Відповідно на 28,5 і 7,3 % (для ініціальних експлантів розміром 0,2–0,4 мм), на 11,1–13,7 % (для ініціальних експлантів розміром 0,5–0,7 мм) та на 9,6–10,0 % (для ініціальних експлантів розміром 0,8–1,0 мм) [7, 9, 226].

Оскільки такі дослідження нами проводились уперше, було проведено математичний аналіз їх результатів, зокрема двохфакторний дисперсійний

аналіз (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Результати дисперсійного аналізу за даними рисунка 4.1 та таблиці 4.2

Джерело варіації	Сума квадратів	Ступені свободи	Дисперсія	F _{факт.}	p-знач.	Вплив факторів, %
<i>Приживлюваність апікальних меристем, %</i>						
Фактор 1	2220,93	2	1110,467	5821,86	0,000	54,4
Фактор 2	1572,34	2	786,174	4121,68	0,000	38,5
Фактор 1*Фактор 2	287,30	4	71,826	376,56	0,000	7,0
Похибка	3,43	18	0,191			0,1
<i>Рівень регенерації апікальних меристем, %</i>						
Фактор 1	1365,20	2	682,601	420,78	0,000	39,6
Фактор 2	1823,93	2	911,967	562,17	0,000	52,9
Фактор 1*Фактор 2	229,24	4	57,310	35,32	0,000	6,6
Похибка	29,20	18	1,622			0,9
<i>Кількість регенованих пагонів, шт.</i>						
Фактор 1	2,12	2	1,063	166,47	0,000	51,0
Фактор 2	1,85	2	0,928	145,34	0,000	44,5
Фактор 1*Фактор 2	0,07	4	0,018	2,82	0,055	1,7
Похибка	0,11	18	0,006			2,8
<i>Висота регенованих пагонів, мм</i>						
Фактор 1	15,64	2	7,821	430,95	0,000	52,6
Фактор 2	12,18	2	6,093	335,75	0,000	41,0
Фактор 1*Фактор 2	1,61	4	0,402	22,19	0,000	5,4
Похибка	0,32	18	0,018			1,0

Основними факторами впливу на результативні показники (приживлюваність апікальних меристем, рівень регенерації апікальних меристем, кількість регенерованих пагонів, висота регенерованих пагонів) були: фактор 1 – тип поживного середовища, фактор 2 – розмір апікальних меристем.

У результаті такого аналізу було отримано фактичні значення критерію Фішера, які порівнювали з табличними величинами. Для факторів 1 і 2 отримані величини критерію Фішера дорівнювали 5821,86 (фактор 1), 4121,68 (фактор 2) – за показником приживлюваності апікальних меристем, 420,78 (фактор 1) і 562,17 (фактор 2) – за показником рівня регенерації апікальних меристем, 166,47 (фактор 1) і 145,34 (фактор 2) – за показником кількості регенерованих пагонів та 430,95 (фактор 1) і 335,75 (фактор 2) – за показником висоти регенерованих пагонів, за табличного їх значення 3,55. Тобто $F_{\text{факт.}}$ за всіма показниками було більшим за $F_{\text{теор.}}$. Звідси робимо висновок, що обидва фактори достовірно впливали на результативні показники, як окремо, так і при їх взаємодії (за виключенням показника кількість регенерованих пагонів).

Даний метод статистичного аналізу дозволив встановити частку впливу кожного фактору з загальної сукупності факторів на прояв результативних показників. Показано, що вплив обох факторів був достатньо високим і знаходився на рівні 39,6–54,4 % (фактор 1) та на рівні 38,5–52,9 % (фактор 2) від загальної 100 % сукупності. Для всіх показників, крім рівня регенерації, найбільший вплив мав фактор тип поживного середовища. Прояв регенераційних властивостей апікальних меристем більшою мірою залежав від їх розмірів [11].

На другому етапі роботи визначали вплив розмірів апікальних меристем на ступінь елімінації вірусу скручування листя винограду сорту «Каберне Совіньйон». Із апікальних сегментів мікроклонів винограду, ураження яких *GLRaV-3* було підтверджено лабораторно, виділяли апікальні меристеми довжиною 0,2–0,4 мм, 0,5–0,7 мм, 0,8–1,0 мм. Їх висаджували на

поживне середовище МС 2 і культивували в культуральному боксі за відповідних умов, протягом шести місяців. Надалі визначали коефіцієнт елімінації вірусу скручування листа 3 (рис. 4.2).

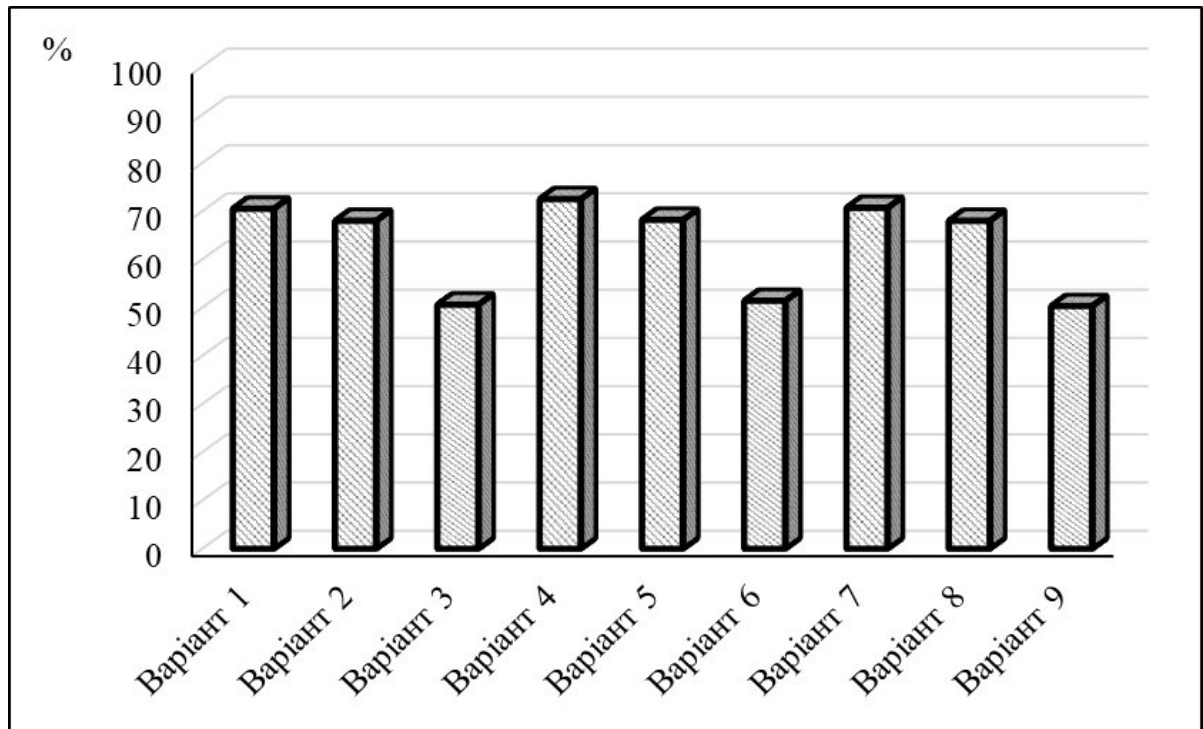


Рис. 4.2 Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листа винограду (*GLRaV-3*) сорту «Каберне Совіньйон» після оздоровлення методом апікальних меристем

Отримані результати показали, що найвищий показник елімінації вірусу скручування листа винограду був характерний для варіантів, де рослини регенерували з найменших меристем (0,2–0,4 мм) на всіх типах поживних середовищ (70,5–72,5 %), але найбільші його значення були у варіанті МС 2 + АМ 0,2–0,4 мм (72,5 %). Зі збільшенням розміру меристем до 0,5–0,7 мм коефіцієнт елімінації знижувався до 68,0 %, а при використанні меристем 0,8–1,0 мм відмічали різке зменшення показника (50,3–51,4 %), незалежно від типу середовища. Модифіковане поживне середовище МС 2 забезпечувало вищу ефективність елімінації вірусу скручування листа 3 порівняно з МС 1 та стандартним МС, особливо при культивуванні апікальних меристем

найменшого розміру.

Експериментальні результати, отримані під час проведення дослідження були опрацьовані статистично (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Результати дисперсійного аналізу за даними рисунка 4.2

Джерело варіації	Сума квадратів	Ступені свободи	Дисперсія	$F_{\text{факт.}}$ $F_{\text{теор.}}$	p-знач.	Вплив факторів, %
Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листя винограду (<i>GLRaV-3</i>)						
Тип поживного середовища	7,482	2	3,741	<u>35,2</u> 3,55	0,00000	0,33
Розмір апікальних меристем	2223,547	2	1111,773	<u>10459,2</u> 3,55	0,00000	99,42
Тип поживного середовища*Розмір апікальних меристем	3,664	4	0,916	<u>8,6</u> 2,92	0,00045	0,16
Похибка	1,913	18	0,106		0,00000	0,09

Основними факторами впливу на результативну ознаку (коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листя винограду (*GLRaV-3*)) були: тип поживного середовища, розмір апікальних меристем. Результати дисперсійного аналізу показали, що всі досліджувані фактори статистично достовірно впливали на коефіцієнт елімінації вірусу *GLRaV-3* у мікроклонів винограду. Тип поживного середовища мав достовірний вплив ($F_{\text{факт.}} = 35,2 > F_{\text{теор.}} = 3,55$; $\alpha = 0,05$), проте його внесок у загальну варіацію становив тільки 0,33%. Найбільший ефект впливу було встановлено для розміру апікальних

меристем, який дорівнював 99,42% від загальної варіації ($F_{\text{факт.}} = 10459,2 > F_{\text{теор.}} = 3,55$). Взаємодія між типом поживного середовища та розмірами апікальних меристем також була статистично достовірною ($F_{\text{факт.}} = 8,6 > F_{\text{теор.}} = 2,92$), проте її внесок у загальну варіацію був невеликим (0,16%). Похибка мала мінімальний вплив (0,09%), що свідчить про високу точність експерименту. Таким чином, розмір апікальних меристем є визначальним фактором для ефективної елімінації вірусу *GLRaV-3*, тип поживного середовища і взаємодія факторів мають додатковий і менш значний вплив.

4.2. Метод термотерапії

На першому етапі досліджень даного напрямку розробляли протокол проведення термотерапії винограду *in vitro*. Із стерильних верхівок пагонів інфікованих кущів винограду формували ініціальні експланти довжиною 0,8-1,0 см і вводили в культуру тканин і органів *in vitro*. На етапі введення використовували модифіковане поживне середовище МС, яке містило 0,2 мг/л 6-БАП та 0,05 мг/л ІОК. Після проліферації пазушних бруньок ініціальні експланти пересаджували на поживне середовище другого етапу культивування для власне мікророзмноження і укорінення. Для цього використовували поживне середовище МС із вмістом 0,1 мг/л 6-БАП та 0,3 мг/л ІОК. Після досягнення мікроклонами висоти 6-8 см їх переміщали до термокамери для проведення термотерапії.

Перед проведенням термотерапії мікроклональні рослини було протестовано на наявність вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*), результати тестування були позитивними.

Тривалість термотерапії була різною від 6 до 12 тижнів. Після проведення термотерапії з мікроклонів відбирали меристеми, розміром 0,5-0,7 мм і переносили на поживне середовище МС 2 для подальшого культивування і пасажування. Через 6 місяців культивування рослини

перевіряли (ІФА) на приховане ураження *GLRaV-3*. Отримані результати показали наступне (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

**Результати оздоровлення винограду від *GLRaV-3* за допомогою
термотерапії**

Сорт	Тривалість термотерапії	Результат тестування (ІФА) + позитивна реакція - негативна реакція
«Одеський чорний»	6	+
	8	-
	10	-
	12	-
«Каберне Совіньон»	6	+
	8	-
	10	-
	12	-

Результати, представлені в таблиці, свідчать, що оздоровлення від вірусу скручування листя у досліджуваних сортів винограду відбувалося після 8 тижнів термотерапії. Незважаючи на те, що ряд авторів вказує на доцільність застосування більш тривалих термінів термотерапії винограду *in vitro* [29], у даному дослідженні було обрано саме цей режим, оскільки подальше подовження температурного впливу призводило до загибелі більшості ініціальних експлантів винограду. Тому, надалі оздоровлення винограду (сорт «Одеський чорний») *in vitro* шляхом застосування термотерапії та культивування апікальних меристем проводили за двома способами.

Перший спосіб проведення термотерапії. Вегетуючі пагони інфікованих кущів були використані для введення ініціальних експлантів у

культуру *in vitro* з подальшим отриманням мікроклональних рослин, що за біометричними показниками відповідали повноцінним рослинам. У якості ініціальних експлантів використовували одновічкові чубуки та верхівкові сегменти довжиною 0,8–1,0 см.

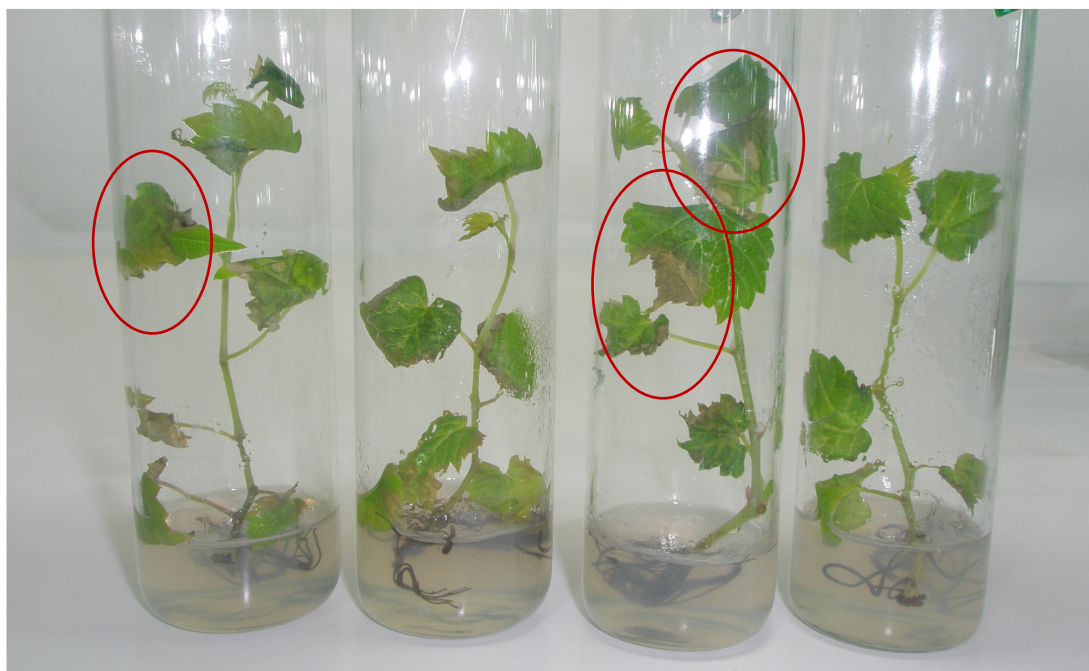
Перед проведенням термотерапії мікроклональні рослини було протестовано на наявність вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*), результати тестування були позитивними.

Для отримання необхідної кількості матеріалу було здійснено кілька пасажувань на свіжі поживні середовища. Після досягнення рослинами висоти 6–8 см їх переміщували до термокамери для проведення термотерапії. Слід зазначити, що після проведення термотерапії частина мікроклонів, порівняно з контролями, мала більш світле забарвлення приросту, частина листків некротизувала (рис. 4.3).

Після зняття температурного стресу у рослин виділяли апікальні меристеми і переносили їх на поживне середовище МС 2.

Другий спосіб проведення термотерапії. З апікальних верхівок уражених пагонів, які використовували в якості ініціальних експлантів на етапі введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro* виділяли апікальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм і культивували на поживному середовищі МС 2. Після регенерації меристем та утворення мікропагонів висотою 20–30 мм їх використовували для термотерапії *in vitro*. Після зняття температурного стресу у рослин, які піддавалися термотерапії, відокремлювали та культивували верхівки пагонів висотою 4–5 мм і одновічкові мікрочубуки з однією пазушною брунькою. Культивування пагонів здійснювали на поживному середовищі МС.

Після проведення термотерапії ініціальних експлантів та мікроклонів винограду, за обома способами, визначали кількість життєздатних рослин (рис. 4.4). Згідно з отриманими результатами, у варіанті 1 (термотерапія мікроклональних рослин + подальше культивування апікальних меристем) та



1



2

Рис. 4.3 Стан мікроклонів винограду після термотерапії (1) та контролі (2)

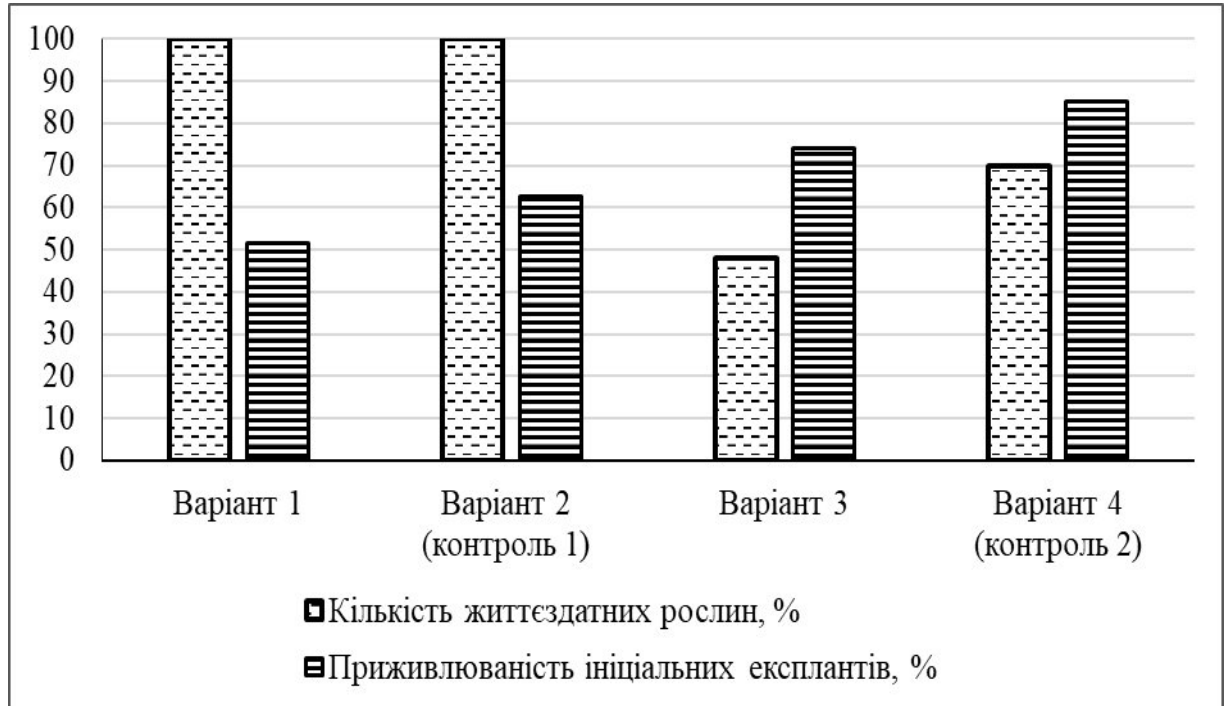


Рис. 4.4 Життєздатність та регенераційний потенціал ініціальних експлантів винограду після термотерапії

у контрольному варіанті 2 (культивування мікроклональних рослин без термотерапії + подальше культивування апікальних меристем) кількість життєздатних рослин становила 100 %, що свідчить про відсутність летального впливу температурного стресу на сформовані мікроклональні рослини. Хоча після термообробки спостерігалися ознаки впливу високої температури. Водночас у варіанті 3 (культивування апікальних меристем + подальша термотерапія мікропагонів) життєздатність рослин знижувалася до 48,0 %, а у контрольному варіанті 4 (культивування апікальних меристем без термотерапії) – до 70,0 %. Така відмінність може бути зумовлена різним фізіологічним станом рослин на момент проведення термотерапії: у варіанті 1 обробці піддавали добре сформовані мікроклони з пагонами висотою 6–8 см, які мали вищий адаптаційний потенціал до дії високої температури, тоді як у варіанті 3 термообробці піддавали молоді мікропагони, що регенерували з апікальних меристем і характеризувалися нижчою стійкістю

до температурного стресу.

Після проведення термотерапії визначали не тільки кількість рослин, які залишились життєздатними, але й їх регенераційний потенціал. При першому способі термотерапії на нові поживні середовища МС 2 висаджували апікальні меристеми, які були виділені з мікроклонів після проведення термотерапії. При другому способі термотерапії – на поживне середовище МС висаджували ініціальні експланти великих розмірів (0,5–1,0 см). Встановлено, що приживлюваність ініціальних експлантів винограду після проведення термотерапії істотно залежала від послідовності поєднання термічної обробки з етапом культивування апікальних меристем. Так, у варіанті 1 (термотерапія + культивування апікальних меристем) приживлюваність ініціальних експлантів становила 51,5 %, що свідчить про пригнічення регенераційних процесів під впливом температурного стресу. У контрольному варіанті 2 цей показник був вищим – 62,5 %, що підтверджує негативний вплив термотерапії на фізіологічний стан експлантів у першому варіанті. У варіанті 3 (культивування апікальних меристем перед термотерапією) спостерігалось суттєве підвищення приживлюваності до 74,0 %, що пояснюється позитивним ефектом висаджування на свіжі поживні середовища ініціальних експлантів великих розмірів. Максимальна приживлюваність ініціальних експлантів (85,0 %) була у варіанті 4 (контроль 2), де термотерапія не застосовувалася.

Протягом 60 діб культивування апікальних меристем та сегментів пагонів великих розмірів, після проведення термотерапії, встановлювали особливості розвитку пагонів (рис. 4.5). Як результат, було встановлено наступне. У варіантах 1 і 2, де пагони формувались із апікальних меристем утворювалася більша кількість пагонів (5,8 і 6,2 шт. відповідно), проте їх висота залишалася незначною (1,8–2,2 см), що узгоджується з літературними даними щодо розвитку рослин із апікальних меристем [113]. У варіантах 3 і 4, де пагони формувались із ініціальних експлантів великих розмірів

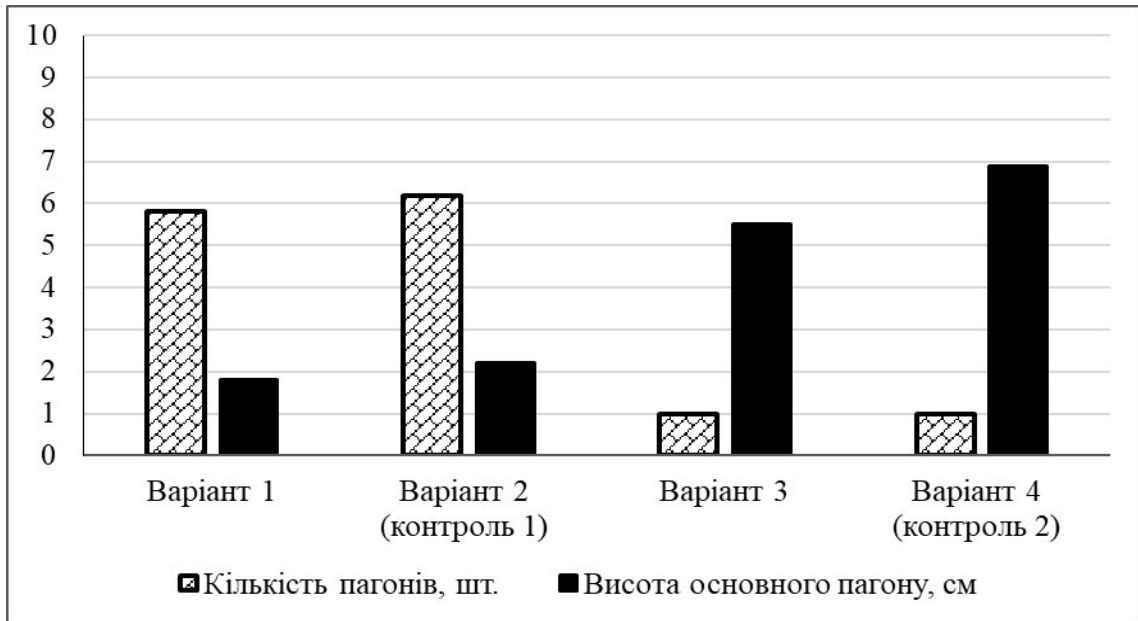


Рис. 4.5 Розвиток ініціальних експлантів винограду після проведення термотерапії

відзначено іншу тенденцію: кількість пагонів зменшувалася до одного, а висота основного пагону суттєво збільшувалася – до 5,5 см у варіанті 3 і 6,9 см у контрольному варіанті 4. Це логічно пояснюється, оскільки всі умови культивування відповідають протоколу загальноприйнятого мікроклонального розмноження винограду з застосуванням одновічкових чубуків [6].

Через шість місяців після культивування мікроклональних рослин в умовах культурального боксу було проведено повторне лабораторне тестування на наявність вірусу скручування листя винограду 3 (рис. 4.6).

Отримані результати свідчать про високу ефективність комбінування методів термотерапії та культивування апікальних меристем для елімінації вірусу. Зокрема, у варіантах 1 і 3, де застосовували обидва методи (незалежно від послідовності їх проведення), відсоток оздоровлених рослин становив відповідно 85,0 та 88,0 %. У контрольних варіантах 2 і 4, де використовували тільки метод культивування апікальних меристем без термічної обробки, кількість оздоровлених рослин була нижчою і

знаходилась на рівні 60,0 і 62,0 % відповідно.

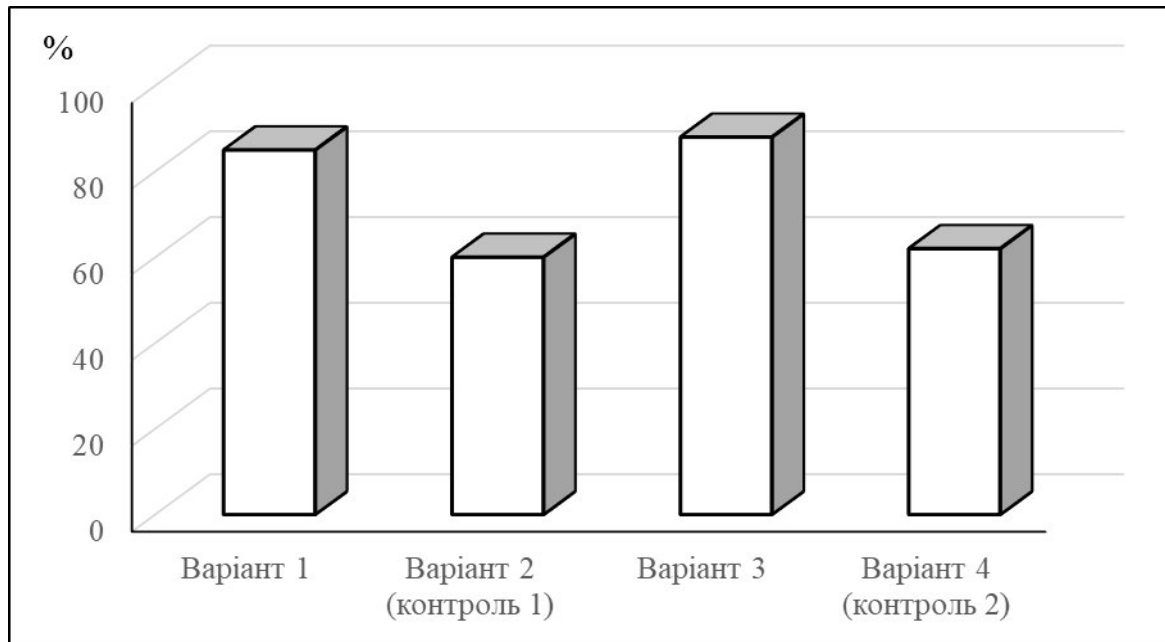


Рис. 4.6 Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листа винограду (*GLRaV-3*) після термотерапії у різні способи

Це підтверджує доцільність поєднання термотерапії з культивуванням апікальних меристем для підвищення ефективності оздоровлення виноградних рослин від вірусних інфекцій [8, 26].

Разом із тим, як зазначають інші дослідники, навіть за успішної елімінації вірусу в умовах *in vitro*, через 1–3 роки культивування мікроклональних рослин у неконтрольованих умовах довкілля необхідно проводити повторне тестування для підтвердження стабільності оздоровленого стану рослин [155].

Всі експериментальні дані, отримані у цьому розділі, були оброблені статистично (табл. 4.6). За результатами дисперсійного аналізу з застосуванням критерію Фішера, встановлено статистично обґрунтований вплив досліджуваних факторів на показники елімінації вірусу скручування листа винограду (*GLRaV-3*) та морфо-біологічні характеристики регенерантів. Оцінку впливу здійснювали за співвідношенням $F_{\text{факт.}}$ і $F_{\text{теор.}}$,

Таблиця 4.6

Результати дисперсійного аналізу за даними рисунків 4.4, 4.5, 4.6

Джерело варіації	Сума квадратів	Ступені свободи	Дисперсія	$F_{\text{факт.}} / F_{\text{теор.}}$	p-знач.	Вплив факторів, %
1	2	3	4	5	6	7
Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листя винограду (<i>GLRaV-3</i>)						
Апікальні меристеми	2,535	1	2,535	16,714/4,493	0,0008	0,07
Апікальні меристеми +Термотерапія	3863,855	3	1287,952	8491,989/3,238	0,0000	99,87
Апікальні меристеми * Апікальні меристеми +Термотерапія	0,188	3	0,063	0,414/3,248	0,7453	0
Похибка	2,427	16	0,152			0,06
Кількість оздоровлених рослин, шт.						
Апікальні меристеми	0,8817	1	0,8817	5,642/4,493	0,0303	0,23
Апікальні меристеми +Термотерапія	383,2700	3	127,7567	817,642/3,248	0,0000	99,07

Продовження табл. 4.6

1	2	3	4	5	6	7
Апікальні меристеми *	0,2017	3	0,0672	0,430/3,248	0,7341	0,05
Апікальні меристеми +Термотерапія						
Похибка	2,5000	16	0,1562			0,65
Кількість життєздатних рослин, шт.						
Апікальні меристеми	3,4504	1	3,4504	23,003/4,493	0,0002	0,36
Апікальні меристеми +Термотерапія	964,2479	3	321,4160	2142,773/3,248	0,0000	99,34
Апікальні меристеми *	0,5979	3	0,1993	1,329/3,248	0,2999	0,06
Апікальні меристеми +Термотерапія						
Похибка	2,4000	16	0,1500			0,24
Приживлюваність ініціальних експлантів, шт.						
Апікальні меристеми	0,00844	1	0,00844	0,131/4,493	0,7212	0,02
Апікальні меристеми +Термотерапія	37,00261	3	12,33420	192,809/3,248	0,0000	97,28

Продовження табл. 4.6

1	2	3	4	5	6	7
Апікальні меристеми *	0,00311	3	0,00104	0,016/3,248	0,9970	0,01
Апікальні меристеми +Термотерапія						
Похибка	1,02353	16	0,06397			2,69
Кількість пагонів, шт.						
Апікальні меристеми	0,6017	1	0,60167	26,255/4,493	0,0001	0,47
Апікальні меристеми +Термотерапія	126,1250	3	42,04167	1834,545/3,248	0,0000	98,71
Апікальні меристеми *	0,6850	3	0,22833	9,964/3,248	0,0006	0,54
Апікальні меристеми +Термотерапія						
Похибка	0,3667	16	0,02292			0,28
Висота основного пагону, мм						
Апікальні меристеми	1,12667	1	1,12667	56,333/4,493	0,0000	1,12
Апікальні меристеми +Термотерапія	98,30000	3	32,76667	1638,333/3,248	0,0000	98,09

Продовження табл. 4.6

1	2	3	4	5	6	7
Апікальні меристеми *	0,46667	3	0,15556	7,778/3,248	0,0019	0,47
Апікальні меристеми +Термотерапія						
Похибка	0,32000	16	0,02000			0,32

рівнем значущості p та часткою внеску кожного фактора у загальну дисперсію результативної ознаки.

Для коефіцієнта елімінації *GLRaV-3* встановлено, що фактор «апикальні меристеми» має статистично достовірний вплив ($F_{\text{факт.}} = 16,714 > F_{\text{теор.}} = 4,493$; $p = 0,0008$), проте його частка у загальній варіації ознаки є мінімальною (0,07 %). Комбінація факторів апикальні меристеми + термотерапія характеризується високим і достовірним впливом ($F_{\text{факт.}} = 8491,989 > F_{\text{теор.}} = 3,238$; $p < 0,001$), обумовлюючи 99,87 % варіації коефіцієнта елімінації. Взаємодія факторів є недостовірною ($F_{\text{факт.}} = 0,414 < F_{\text{теор.}} = 3,248$; $p = 0,7453$) і відповідно не впливає на результативну ознаку.

Аналогічну закономірність встановлено для показників кількості оздоровлених і життєздатних рослин. Самостійний вплив апікальних меристем у обох випадках є статистично достовірним (для кількості оздоровлених рослин $F_{\text{факт.}} = 5,642 > F_{\text{теор.}} = 4,493$; $p = 0,0303$; для кількості життєздатних рослин $F_{\text{факт.}} = 23,003 > F_{\text{теор.}} = 4,493$; $p = 0,0002$), проте його внесок у загальну варіацію результативних ознак залишається незначним і становить відповідно 0,23 та 0,36 %. Основним чинником, який впливав на формування обох показників є комбінований спосіб оздоровлення апікальні меристеми + термотерапія. Він характеризувався надзвичайно високими значеннями критерію Фішера ($F_{\text{факт.}} = 817,642$ і $2142,773$ відповідно) та достовірністю на рівні $p < 0,05$, забезпечуючи 99,07–99,34 % загальної дисперсії. Взаємодія факторів для кількості оздоровлених і життєздатних рослин статистично незначуща ($F_{\text{факт.}} < F_{\text{теор.}}$; $p > 0,05$) і не має істотного впливу на досліджувані показники.

Для приживлюваності ініціальних експлантів самостійний вплив апікальних меристем статистично не підтверджено ($F_{\text{факт.}} = 0,131 < F_{\text{теор.}} = 4,493$; $p = 0,7212$), а його внесок у загальну дисперсію є мінімальним (0,02 %). Фактор апікальні меристеми + термотерапія має істотний і достовірний вплив ($F_{\text{факт.}} = 192,809 > F_{\text{теор.}} = 3,248$; $p < 0,05$), забезпечуючи

97,28 % варіації показника. Взаємодія факторів є повністю недостовірною ($F_{\text{факт.}} = 0,016 < F_{\text{теор.}}; p = 0,9970$). Подібну закономірність виявлено і для морфологічних показників – кількості пагонів та висоти основного пагону.

Самостійний вплив апікальних меристем для обох ознак є статистично достовірним (для кількості пагонів $F_{\text{факт.}} = 26,255 > F_{\text{теор.}} = 4,493; p = 0,0001$; для висоти основного пагону $F_{\text{факт.}} = 56,333 > F_{\text{теор.}} = 4,493; p < 0,001$), проте їх внесок у загальну варіацію показників залишається незначним і становить відповідно 0,47 та 1,12 %. Визначальним фактором формування кількості пагонів і висоти основного пагону є комбінований фактор апікальні меристеми + термотерапія, який характеризується високим рівнем впливу 98,71–98,09 % ($F_{\text{факт.}} = 1834,545$ і $1638,333$ відповідно; $p < 0,05$). Взаємодія факторів для обох морфологічних показників є статистично значущою, але її частка у загальній варіації не перевищує 0,47–0,54 %.

4.3. Метод хіміотерапії

Елімінація GLRaV-3 на основі проведення хіміотерапії. Вегетуючі пагони інфікованих кущів винограду сорту «Одеський чорний» із візуальними ознаками хвороби скручування листя були використані для введення ініціальних експлантів у культуру *in vitro* з подальшим пасажуванням для отримання необхідної кількості мікроклонів для роботи.

Після отримання мікроклональних рослин, що за біометричними показниками відповідали повноцінним рослинам, їх живцювали на одновічкові чубуки (верхівкові сегменти) і висаджували на поживні середовища з віруцидними препаратами – рибавірином та озельтамівіром різних концентрацій (рис. 4.7).

Життєздатними вважали експланти, які характеризувалися зеленою листковою пластинкою і тканинами чубуків, наявністю живої пазушної бруньки, її проліферацією, ризогенезом.

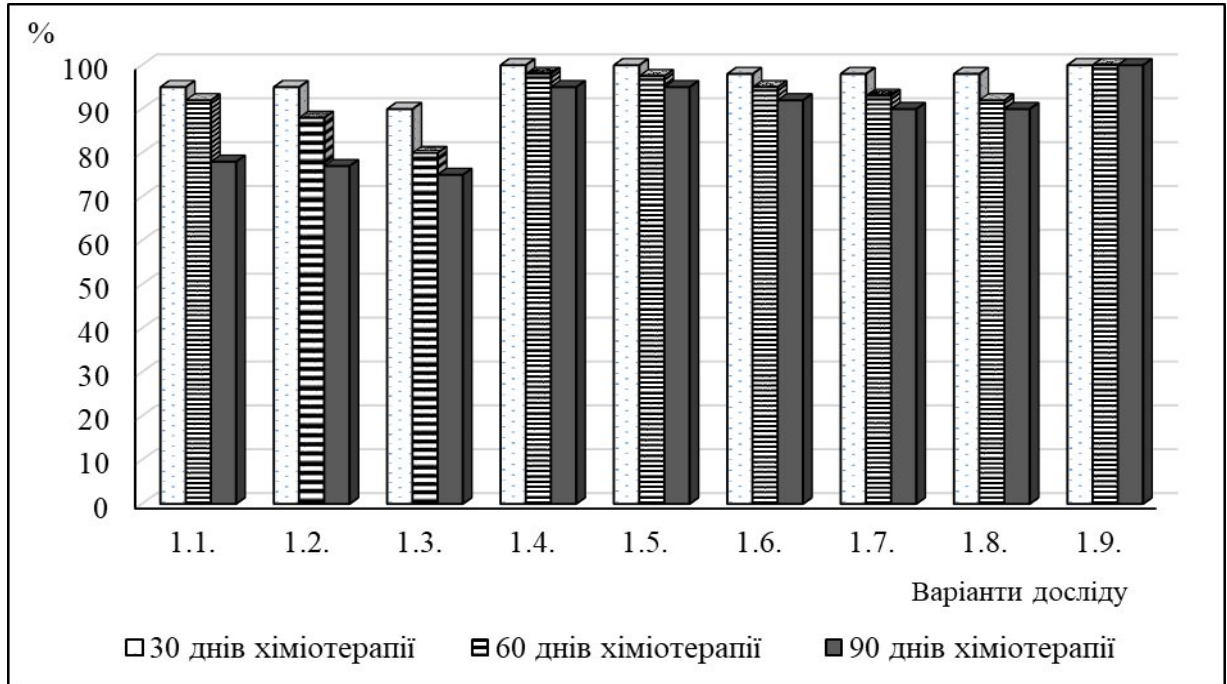
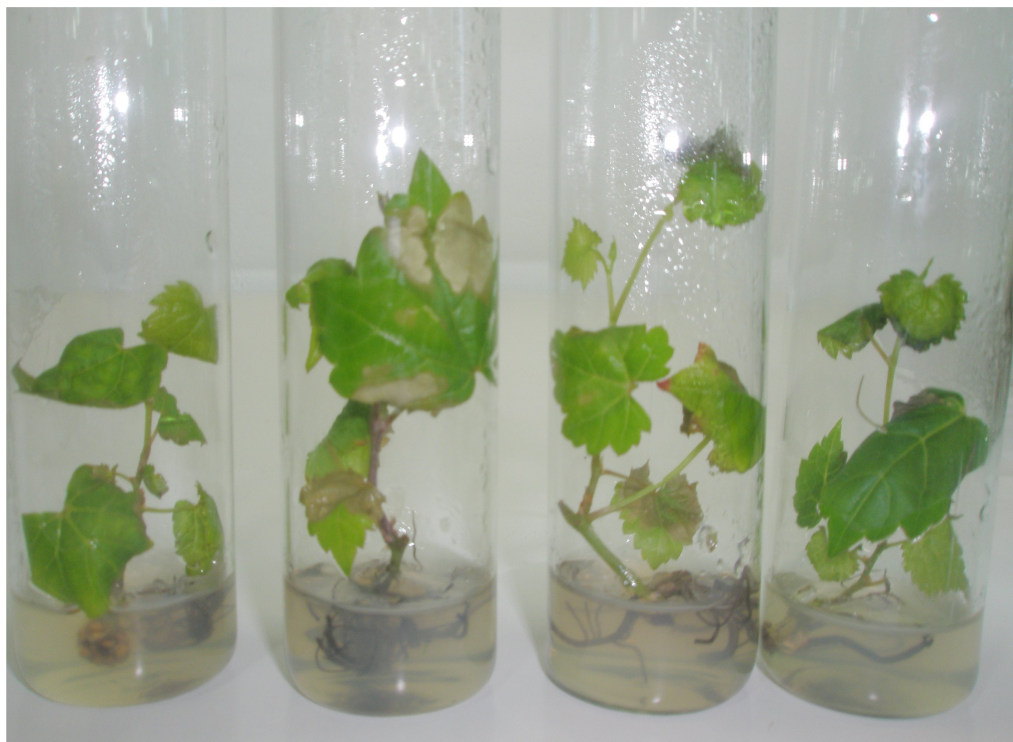


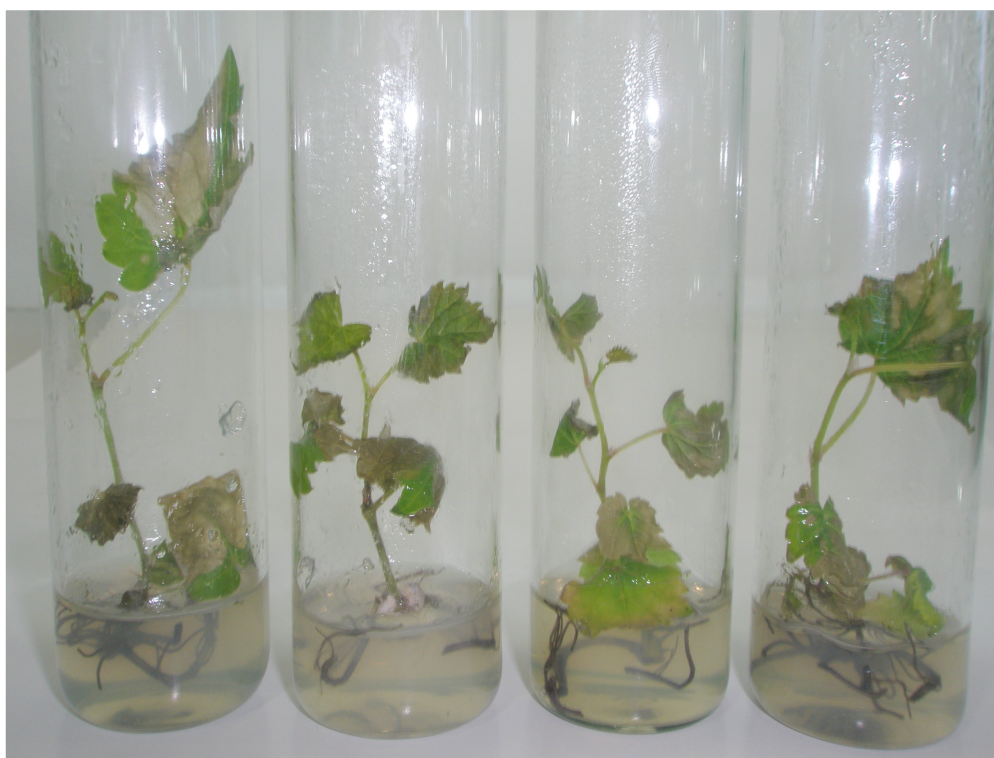
Рис. 4.7 Життєздатність ініціальних експлантів винограду у різні строки проведення хіміотерапії

Отримані дані показують, що ефективність віруцидних препаратів залежала як від типу та концентрації препаратів, так і від тривалості проведення процесу. Після 30 днів хіміотерапії життєздатність мікроклонів у всіх варіантах залишалася високою (90,0–100 %). 100 % життєздатних ініціалей було після застосування озельтамівіру 30 і 40 мг/л та у контролі (без впливу препаратів). У варіантах з рибавірином (перший-третій) рівень життєздатності ініціалей дорівнював 90,0–95,0 %. Це свідчить про те, що навіть короткотривалий вплив рибавірину проявляє легкий стресовий ефект.

На 60-й день хіміотерапії різниця між варіантами дослідю була більш вираженою. Найбільше життєздатних ініціалей (98,0–100 %) було так само у варіантах із озельтамівіром та контролі. У варіантах із рибавірином рівень життєдіяльності ініціалей знижувався до 80,0–92,0 % (рис. 4.8). У варіантах, де хіміотерапію проводили комплексно (рибавірин+озельтамівір) показники життєздатності були меншими (92,0–93,0 %) проте стабільними. Це свідчить, що озельтамівір у концентрації 30–40 мг/л проявляє незначну фітотоксичність



Рибавірин, 20 мг/л



Рибавірин, 25 мг/л



Контроль

Рис. 4.8 Мікроклони винограду на поживному середовищі МС із рибавірином та контролі

навіть на 60 день хіміотерапії, порівняно з рибавірином. Про істотне зниження швидкості розмноження та високу фітотоксичність рибавірину високих концентрацій вказано і в дослідженні Panattoni A. та ін. [175]. Одночасне використання рибавірину та озельтамівіру для елімінації *GFkV* дозволяло запуснути процеси каулогенезу, і не було зареєстровано жодного відмирання експлантів після трьох послідовних субкультур. Це можна пояснити різним фітотоксичним ефектом віруцидів та різною стійкістю до них, регенеративним потенціалом досліджуваних генотипів винограду [114].

Через 90 днів хіміотерапії життєздатність ініціальних експлантів помітно знижувалася у всіх варіантах після застосування віруцидних препаратів. Проте, найбільше життєздатних ініціальних експлантів було у контрольних варіантах та варіантах із озельтамівіром – 95,0 % (30, 40 мг/л) та 92,0 % (80 мг/л). У варіантах із рибавірином життєздатність ініціалей зменшувалась до 75,0–78,0 %, на відміну від варіантів, де хіміотерапію

проводили з застосуванням двох препаратів: рибавірин, 20 мг/л + озельтамівір, 30 мг/л; рибавірин, 20 мг/л + озельтамівір, 40 мг/л. Життєздатність ініціальних експлантів була на рівні 90,0 %. У контрольному варіанті кількість життєздатних експлантів дорівнювала 100 %, що абсолютно логічно, оскільки ініціале не піддавали впливу віруцидних препаратів.

Отже, за критерієм життєздатності ініціальних експлантів винограду найбільш оптимальним для проведення хіміотерапії є препарат озельтамівір у концентрації 30–40 мг/л, оскільки він проявляв меншу фітотоксичність. Проте, слід зазначити, що після комбінованого застосування обох препаратів у концентрації 20 та 40 мг/л показники життєздатності мікрочубуків винограду також були на високому рівні.

Незважаючи на тривале культивування мікроклонів винограду на поживних середовищах із віруцидними препаратами, які у різній мірі проявляли фітотоксичний ефект, рослин розвивалися і після завершення хіміотерапії характеризувалися достатніми біометричними показниками розвитку як вегетативної надземної маси, так і кореневої системи (рис. 4.9).

У всіх варіантах дослідження мікроклони формували по одному пагону це дозволяє вважати, що препарати не пригнічували формування пагонів, а впливали здебільшого на їх ріст і розвиток. Висота пагонів змінювалась залежно від типу та концентрації препарату. Найменшу висоту мали рослини після застосування рибавірину у концентраціях 20–25 мг/л (другий, третій варіанти), особливо після тривалої хіміотерапії. Озельтамівір, навпаки, стимулював ріст пагонів у порівнянні з рибавірином. Після застосування озельтамівіру у концентраціях 30, 40 мг/л, у т.ч. у комбінації з рибавірином висота пагонів рослин дорівнювала 6,0–8,0 см [12]. Про позитивний вплив сумісного застосування препаратів рибавірин (невисокі концентрації) та озельтамівір на інтенсивність проліферації адвентивних бруньок і подальший їх розвиток вказують дослідження й інших авторів [36].

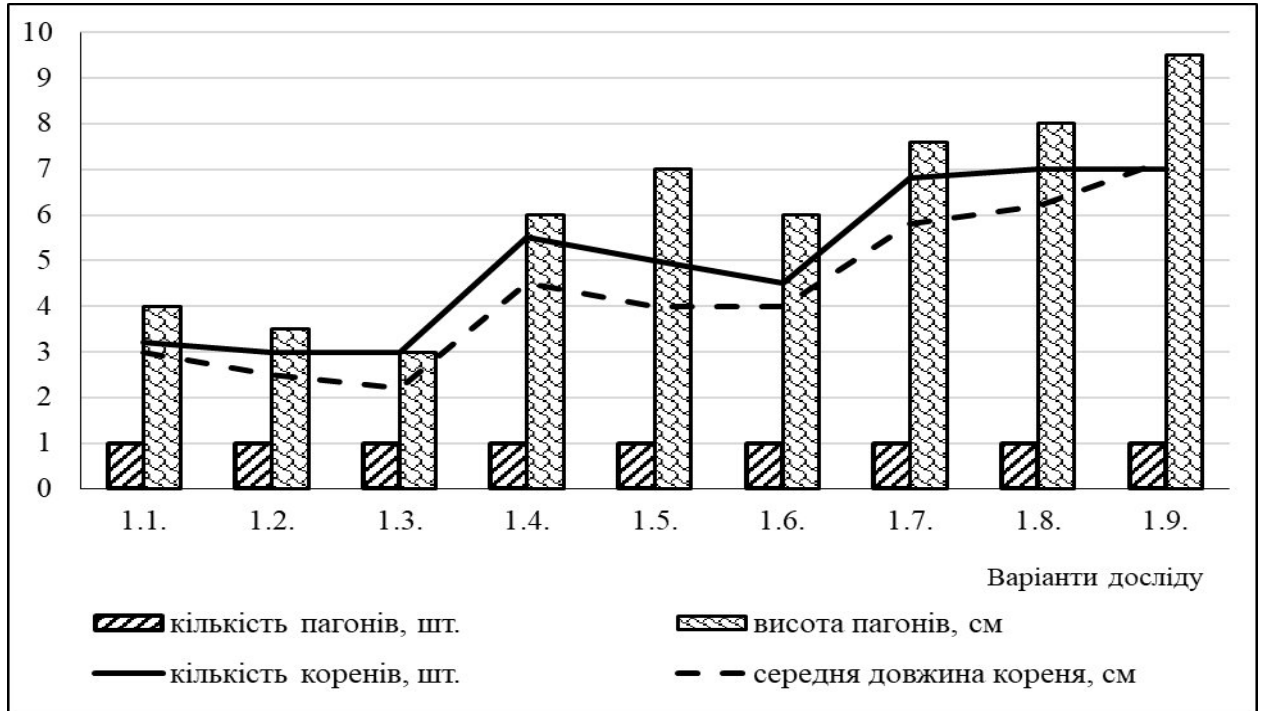


Рис. 4.9 Біометричні показники росту та розвитку мікроклонів винограду після проведення хіміотерапії (90 днів)

Аналіз показників ризогенезу показав тісний зв'язок між кількістю сформованих коренів та їх довжиною, що узгоджується з загальним рівнем життєздатності мікроклонів після хіміотерапії. Найменші значення обох показників встановлено у варіантах із рибавірином: кількість коренів дорівнювала 3,0–3,2 шт., їх середня довжина – 2,2–2,5 см, що свідчить про ефект пригнічення препарату на розвиток кореневої системи. У рослин, які проходили хіміотерапію під впливом озельтамівіру та його комбінації з рибавірином кількість коренів збільшувалась до 4,5–6,0 шт., а середня довжина коренів – до 4,0–6,2 см. Ці значення є наближеними до контрольних показників.

Елімінація GLRaV3 на основі методів хіміотерапії та апікальних меристем. Після хіміотерапії у рослин (за всіма варіантами дослідю) виділяли апікальні меристеми і переносили їх на поживне середовище МС 2. Через 90 діб культивування визначали ступінь їх регенерації та проводили обліки

розвитку (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Регенераційна здатність та розвиток апікальних меристем винограду сорту «Одеський чорний» після проведення хіміотерапії

Варіанти дослідів	Рівень регенерації ініціальних експлантів, %	Кількість пагонів, шт.	Висота основного пагону, мм
2.1	32,0	1,0±0,04	5,0±0,20
2.2	31,0	1,0±0,05	4,5±0,21
2.3	30,0	1,0±0,07	4,0±0,28
2.4	56,0	1,4±0,05	5,8±0,30
2.5	58,0	1,8±0,07	6,1±0,40
2.6	52,0	2,0±0,07	5,5±0,31
2.7	55,0	1,1±0,04	6,0±0,35
2.8	61,0	1,0±0,04	6,5±0,29
2.9	72,0	1,3±0,06	5,0±0,31

Наведені в таблиці дані свідчать про суттєвий вплив віруцидних препаратів, їх концентрацій у поєднанні з методом апікальних меристем на регенераційну здатність і морфогенез ініціальних експлантів. У варіантах 2.1–2.3 (рибавірин 15–25 мг/л + апікальні меристеми) рівень регенерації ініціальних експлантів залишався відносно низьким і знаходився на рівні 30,0–32,0 %, кількість пагонів не перевищувала одного, а їх висота зменшувалася зі збільшенням концентрації препарату з 5,0 до 4,0 мм. Це вказує на фітотоксичний вплив рибавірину на ростові процеси апікальних меристем.

Застосування озельтамівіру (варіанти 2.4–2.6) супроводжувалося збільшенням показників регенерації апікальних меристем до 52,0–58,0%

(порівняно з рибавірином), кількості пагонів до 1,4–2,0 шт., висоти основного пагону до 5,5–6,1 мм.

Комбіноване застосування рибавірину та озельтамівіру (варіанти 2.7–2.8) забезпечувало відносно високий рівень регенерації (55,0–61,0 %), кількість пагонів зменшувалась до 1,0–1,1 шт., висота основного пагону, навпаки, була максимальною у досліді (6,0–6,5 мм). Це вказує на переважання ростових процесів над проліферацією.

У контрольному варіанті без застосування віруцидних препаратів всі показники переважали над дослідними значеннями, що підтверджує негативний вплив антивірусних препаратів на життєздатність експлантів у культурі *in vitro* [10, 26].

Отже, отримані результати показують, що рибавірин пригнічував регенерацію та розвиток апікальних меристем, озельтамівір і його комбінації з рибавірином забезпечували кращу регенераційну здатність експлантів і менш виражений фітотоксичний вплив, хоча і поступалися контролю за абсолютними показниками регенерації.

Визначення показника елімінації вірусів є ключовим етапом оцінки ефективності методів оздоровлення рослинного матеріалу, оскільки саме він дозволяє об'єктивно встановити результативність застосованих технологічних прийомів та обґрунтувати їхню доцільність для отримання вільних від вірусів рослин. Отримані результати досліджень свідчать про чітку залежність коефіцієнта елімінації *GLRaV-3* від типу віруцидного препарату, його концентрації та поєднання з методом апікальних меристем (рис. 4.10). Так, у варіантах 2.1–2.3 (рибавірин 15–25 мг/л + апікальні меристеми) коефіцієнт елімінації вірусу був найнижчим і на 90-й день хіміотерапії становив 24,0–30,2 %. Через 180 днів після завершення хіміотерапії ці показники практично не змінювалися (24,0–29,5 %), що свідчить про нестійкий та обмежений протівірусний ефект рибавірину.

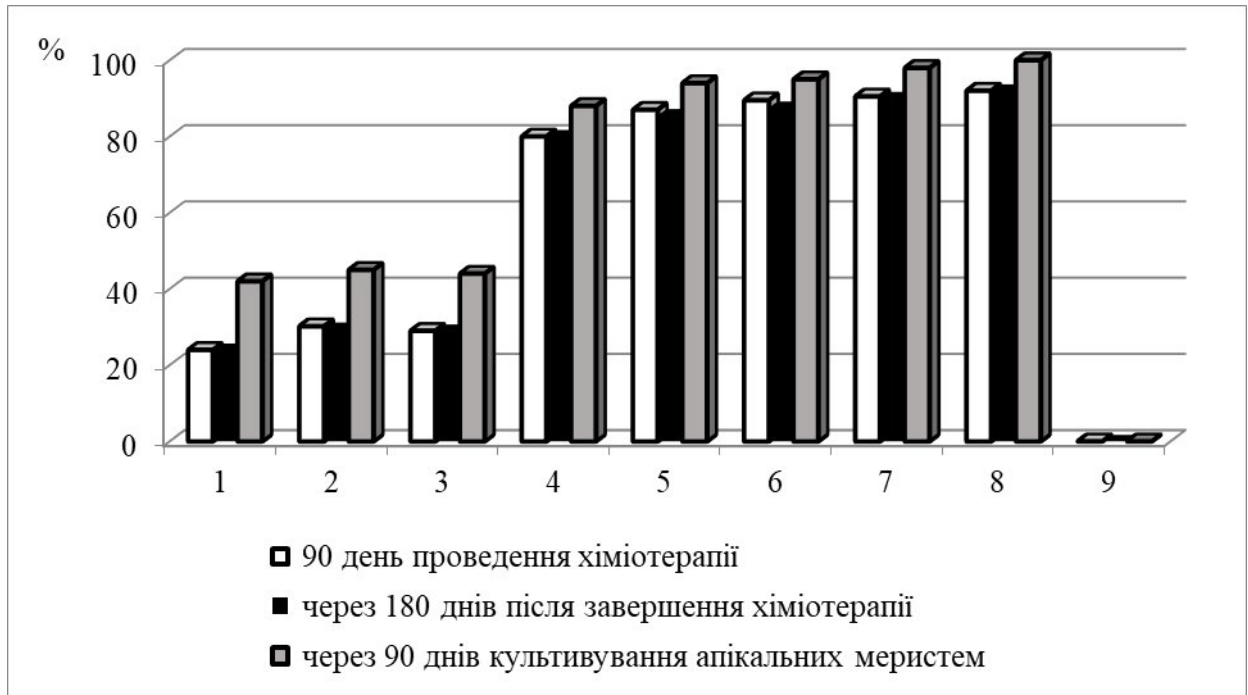


Рис. 4.10 Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листя винограду (*GLRaV-3*)

Після культивування апікальних меристем коефіцієнт елімінації збільшився до 42,0–45,0 %. Проте залишався нижчим порівняно з іншими варіантами.

Значно вищий рівень елімінації *GLRaV-3* забезпечувало застосування озельтамівіру (варіанти 2.4–2.6). Уже на 90-й день хіміотерапії коефіцієнт елімінації дорівнював 80,0–89,5 %, через 180 днів після її завершення залишався стабільно високим (80,0–87,5 %), що вказує на пролонгований противірусний ефект препарату. Застосування апікальних меристем у цих варіантах додатково підвищувало ефективність елімінації до 88,0–95,0 %.

Комбіноване застосування рибавіріну та озельтамівіру (варіанти 2.7–2.8) забезпечувало найвищі показники. Коефіцієнт елімінації на 90-й день хіміотерапії дорівнював 90,5–92,0 %, через 180 днів після завершення хіміотерапії залишався без істотного зниження (90,0–92,0 %), а після культивування апікальних меристем збільшувався до 98,0–100 %, що свідчить про практично повну елімінацію

За результатами дисперсійного аналізу, проведеного з використанням

критерію Фішера при рівні значущості $p < 0,05$, встановлено статистично достовірний вплив досліджуваних факторів (спосіб оздоровлення, віруцидний препарат) на життєздатність експлантів, морфогенетичні показники та ефективність елімінації вірусу *GLRaV-3* (табл. 4.8).

Життєздатність ініціальних експлантів у різні строки культивування характеризувалася зміною ступеня впливу досліджуваних факторів. За результатами дисперсійного аналізу при рівні значущості $p < 0,05$ встановлено, що через 30 діб культивування статистично достовірний вплив мав тільки спосіб оздоровлення ($F_{\text{факт.}} = 44,867$), який зумовлював 50,08 % загальної дисперсії показника, тоді як вплив віруцидного препарату та взаємодії факторів був недостовірним і не перевищував 1,28–1,76 %. Через 60 діб достовірний вплив способу оздоровлення зберігався ($F_{\text{факт.}} = 24,862$; 29,79 %), при цьому суттєво збільшувався вплив віруцидного препарату ($F_{\text{факт.}} = 7,354$; 17,62 %). Взаємодія факторів була недостовірною. На 90-ту добу культивування обидва основні фактори – спосіб оздоровлення та віруцидний препарат – мали високий вплив ($F_{\text{факт.}} \gg F_{\text{теор.}}$; $p < 0,05$) на життєздатність ініціальних експлантів, формуючи відповідно 61,13 та 37,98 % загальної дисперсії показника, внесок їх взаємодії та експериментальної похибки був незначним.

Отримані результати свідчать про поступове посилення ролі віруцидного препарату зі збільшенням строків культивування та основне значення способу оздоровлення на всіх етапах формування життєздатності експлантів. Для морфологічних показників росту пагонів встановлено взаємозалежний та статистично значущий вплив досліджуваних факторів на рівні значущості $p < 0,05$. Кількість пагонів істотно залежить від способу оздоровлення, віруцидного препарату та їх взаємодії, оскільки значення $F_{\text{факт.}}$ для всіх факторів перевищувало $F_{\text{теор.}}$; при цьому їх внесок у загальну дисперсію дорівнював відповідно 18,63; 33,90 та 33,90 %, що свідчить про

Таблиця 4.8

Результати дисперсійного аналізу за даними рисунка 4.7, 4.9, 4.10

Джерело варіації	Сума квадра-тів	Ступені свободи	Дисперсія	$F_{\text{факт.}} / F_{\text{теор.}}$	p-знач.	Вплив факторів, %	
1	2	3	4	5	6	7	
Життєздатність ініціальних експлантів через 30 діб, %							Життє здатні сть ініціал ьних експл антів через 30 діб
Спосіб оздоровлення	6073,081	1	6073,081	44,867/4,078	0,000000	50,08	
Віруцидний препарат	154,985	2	77,492	0,572/3,225	0,568449	1,28	
Спосіб оздоровлення*Віруцидни й препарат	213,333	2	106,667	0,788/3,225	0,461339	1,76	

Похибка	5684,935	42	135,356			46,88
Життєздатність ініціальних експлантів через 60 діб, %						
Спосіб оздоровлення	3352,162	1	3352,162	24,862/4,078	0,000011	29,79
Віруцидний препарат	1983,131	2	991,566	7,354/3,225	0,001826	17,62

Продовження табл. 4.8

1	2	3	4	5	6	7
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	254,940	2	127,470	0,945/3,225	0,396619	2,27
Похибка	5662,682	42	134,826			50,32
Життєздатність ініціальних експлантів через 90 діб, %						
Спосіб оздоровлення	4629,429	1	4629,429	2885,782/4,078	0,000000	61,13
Віруцидний препарат	2875,986	2	1437,993	896,382/3,225	0,000000	37,98
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	0,095	2	0,047	0,029/3,225	0,970992	0,00
Похибка	67,377	42	1,604			0,89
Кількість пагонів, шт.						Кількість пагонів, шт.

Спосіб оздоровлення	0,788	1	0,788	57,626/4,078	0,000000	18,63
Віруцидний препарат	1,435	2	0,717	52,431/3,225	0,000000	33,9

Продовження табл. 4.8

1	2	3	4	5	6	7
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	1,435	2	0,717	52,431/3,225	0,000000	33,9
Похибка	0,575	42	0,013			13,58
Висота пагонів, см						
Спосіб оздоровлення	1,508	1	1,508	10,296/4,078	0,002553	1,61
Віруцидний препарат	74,140	2	37,070	252,957/3,225	0,000000	78,66
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	12,445	2	6,222	42,4627/3,225	0,000000	13,2
Похибка	6,155	42	0,146			6,53
Кількість коренів, шт.						
Спосіб оздоровлення	157,462	1	157,462	1777,806/4,078	0,000000	69,43
Віруцидний препарат	57,078	2	28,539	322,215/3,225	0,000000	25,17

Продовження табл. 4.8

1	2	3	4	5	6	7
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	8,528	2	4,264	48,143/3,225	0,000000	3,76
Похибка	3,720	42	0,088			1,64
Середня довжина кореня, см						
Спосіб оздоровлення	139,062	1	139,062	1570,065/4,078	0,000000	73,97
Віруцидний препарат	31,362	2	15,681	177,046/3,225	0,000000	16,68
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	13,862	2	6,931	78,256/3,225	0,000000	7,37
Похибка	3,720	42	0,088			1,98
КЕ через 90 днів культивування апікальних меристем, %						
Спосіб оздоровлення	6951,000	1	6951,000	735,314/4,078	0,000000	19,41
Віруцидний препарат	27136,640	2	13568,320	1435,329/3,225	0,000000	75,76

Продовження табл. 4.8

1	2	3	4	5	6	7
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	1335,680	2	667,840	70,648/3,225	0,000000	3,73
Похибка	397,030	42	9,450			1,10
КЕ через 180 днів після завершення хіміотерапії, %						
Спосіб оздоровлення	6636,370	1	6636,370	969,416/4,078	0,000000	18,87
Віруцидний препарат	27050,290	2	13525,150	1975,702/3,225	0,000000	76,92
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	1193,880	2	596,940	87,199/3,225	0,000000	3,39
Похибка	287,520	42	6,850			0,82
КЕ через 90 днів культивування апікальних меристем, %						
Спосіб оздоровлення	14397,870	1	14397,870	2583,669/4,078	0,000000	38,07
Віруцидний препарат	22733,920	2	11366,960	2039,778/3,225	0,000000	60,12

Продовження табл. 4.8

1	2	3	4	5	6	7
Спосіб оздоровлення*Віруцидний препарат	451,130	2	225,570	40,477/3,225	0,000000	1,19
Похибка	234,050	42	5,570			0,62

виражений синергічний ефект спільної дії способу оздоровлення і віруцидного препарату. Висота пагонів також достовірно залежала від усіх досліджуваних факторів, однак визначальним фактором був віруцидний препарат, який становив 78,66 % загальної дисперсії показника ($F_{\text{факт.}} = 252,957$). Взаємодія факторів характеризувалася суттєвим, але другорядним впливом (13,20 %), вплив способу оздоровлення, незважаючи на статистичну достовірність ($F_{\text{факт.}} = 10,296$; $p < 0,05$), характеризувався мінімальним внеском у варіацію висоти пагонів (1,61 %).

Для показників коренеутворення (кількість коренів та середня довжина кореня) встановлено достовірний вплив усіх факторів. Основним фактором впливу був спосіб оздоровлення, який забезпечував 69,43–73,97 % загальної дисперсії, віруцидний препарат забезпечував 16,68–25,17 %, взаємодія факторів – 3,76–7,37 %.

Аналіз коефіцієнта елімінації вірусу через 90 днів культивування апікальних меристем і через 180 днів після завершення хіміотерапії показав, що за умов $p < 0,05$ статистично достовірним був вплив усіх факторів. При цьому найбільший вплив мав віруцидний препарат (60,12–76,92 % загальної дисперсії), спосіб оздоровлення забезпечував 18,87–38,07 %, а взаємодія факторів всього 1,19–3,73 %.

Висновки до розділу 4

1. Ефективність культивування апікальних меристем винограду визначається сумісним впливом розміру ініціального експланту та складу поживного середовища. Використання модифікованих поживних середовищ зі збільшеним вмістом вітамінів і фітогормонів, забезпечувало підвищення приживлюваності ініціальних експлантів (апикальних меристем), інтенсифікацію регенераційних процесів і покращення морфометричних показників пагонів порівняно зі стандартним поживним середовищем МС.

2. На основі експериментальних досліджень встановлено, що найвищим регенераційним потенціалом *in vitro* характеризувалися апікальні меристеми розміром 0,5–1,0 мм після культивування їх на штучному поживному середовищі МС із підвищеним вмістом фітогормонів – 1 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л ГК та вітамінів. Їх приживлюваність знаходилась 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 %.

3. Результати статистичного аналізу довели достовірність отриманих результатів та дали змогу встановити вплив кожного фактора на отримання результативних показників. На показники приживлюваності апікальних меристем, кількість регенованих пагонів, їх висоту найбільший вплив мав фактор 1 (склад поживного середовища) – 39,6–54,4 %, на прояв рівня регенерації апікальних меристем та коефіцієнт елімінації вірусу скручування листя-3 – фактор 2 (розмір апікальних меристем) – це 38,5–52,9 % і 99,4% від загальної варіації.

4. Проведення дослідження щодо різних способів термотерапії підтверджує важливість і ефективність застосування комбінації методів термотерапії *in vitro* та культивування апікальних меристем для оздоровлення винограду від вірусу скручування листя-3 (*GLRaV-3*). Саме поєднання цих двох підходів дозволяє ефективно знижувати вірусне навантаження у рослинах та отримувати оздоровлений садивний матеріал винограду.

Використання комбінованої методики забезпечує високий рівень оздоровлення рослин: у варіантах, де застосовували одночасно термотерапію і культивування апікальних меристем (незалежно від послідовності проведення процесів), кількість оздоровлених рослин становила 85,0–88,0 %, тоді як культивування тільки апікальних меристем забезпечувало значно

нижчі показники (60,0–62,0 %).

Після застосування комплексу методів термотерапії та культивування апікальних меристем *in vitro* отримано життєздатні мікроклональні рослини винограду з високим регенераційним потенціалом. Приживлюваність ініціальних експлантів після проведення вказаних заходів становила 51,5–74,0 %, із кожного ініціального експланта утворювалось від 1,0 до 5,8 шт. пагонів, які мали довжину 1,8–5,5 см. Ці показники свідчать, що поєднання термотерапії та культивування апікальних меристем дозволяє отримувати рослини, які зберігають життєздатність, успішно регенерують і демонструють стабільні морфологічні характеристики після оздоровлення.

5. Результати статистичного аналізу, проведеного за критерієм Фішера, показали, що для всіх досліджуваних результативних ознак – коефіцієнта елімінації вірусу хвороби скручування листя винограду, кількості оздоровлених і життєздатних рослин, приживлюваності ініціальних експлантів, кількості пагонів та висоти основного пагону – основним статистично значущим фактором впливу була комбінація апікальних меристем і термотерапії. Саме цей фактор зумовлював від 97,0 до майже 100 % загальної варіації показників. Самостійний вплив апікальних меристем був статистично значущим тільки для окремих показників і мав другорядний характер. Взаємодія факторів переважно впливала на формування морфологічних ознак і не відігравала ключової ролі в елімінації вірусу.

6. Поєднання хіміотерапії та культивуванням апікальних меристем є ефективним біотехнологічним методом оздоровлення винограду від вірусу скручування листя *GLRaV-3*. Такий підхід дозволяє одночасно знизити фітотоксичний ефект препаратів, зберегти життєздатність і регенераційний потенціал ініціальних експлантів та досягнути високого коефіцієнту елімінації вірусу. Вибір конкретного препарату та його концентрації необхідно здійснювати з урахуванням типу вірусу, генотипу винограду та стану експлантів для забезпечення максимально ефективного оздоровлення.

7. Життєздатність ініціальних експлантів безпосередньо залежала від типу та концентрації віруцидного препарату та тривалості хіміотерапії. Озельтамівір у концентраціях 30–40 мг/л проявляв низьку фітотоксичність та забезпечував високий рівень життєздатності експлантів навіть після 90 днів лікування. Рибавірин у вищих концентраціях знижував життєздатність і гальмував розвиток пагонів та кореневої системи. При поєднанні озельтамівіру та рибавірину ефект пригнічення був значно меншим і життєздатність ініціальних експлантів була на високому рівні. Культивування апікальних меристем після хіміотерапії стимулювало розвиток основного пагону та зберігало регенераційний потенціал мікроклонів, особливо після застосування озельтамівіру.

8. Щодо елімінації вірусу *GLRaV-3* встановлено, що застосування рибавірину як самостійного чинника забезпечувало низький рівень звільнення рослин від патогену (не більше 30,0 % на 90-й день) і незначно посилювало ефект після подальшого культивування апікальних меристем. Озельтамівір, навпаки, забезпечував високий рівень елімінації – до 89,5 % на 90-й день і залишався стабільним протягом 180 днів. Поєднання у процесі хіміотерапії рибавірину та озельтамівіру з подальшим культивуванням апікальних меристем дозволяло досягнути практично повної елімінації вірусу (98,0–100 %).

9. За результатами дисперсійного аналізу при рівні значущості $p < 0,05$ встановлено, що життєздатність ініціальних експлантів, кількість і висота пагонів, коренеутворення та коефіцієнт елімінації вірусу після проведення хіміотерапії ініціальних експлантів винограду достовірно залежали від способу оздоровлення та віруцидного препарату. Основний вплив на формування більшості показників мав тип віруцидного препарату, частка його впливу змінювалась від 16,68 % (середня довжина кореня) до 78,66 % (висота пагонів), а вплив способу оздоровлення змінювався від 1,61 % (висота пагонів) до 73,97 % (середня довжина кореня) залежно від показника

та етапу оцінки. Взаємодія факторів була статистично достовірною для морфологічних ознак, висоти пагонів, кількості коренів і коефіцієнта елімінації вірусу, проте її частка у загальній дисперсії залишалася відносно невеликою (1,19–33,9 %), що свідчить про переважно адитивний характер дії факторів із проявами синергії для окремих показників. Таким чином, ефективність оздоровлення і подальший ріст та розвиток експлантів визначаються спільною дією способу оздоровлення та віруцидного препарату, причому найбільший внесок у варіацію належала препарату.

Основні положення цього розділу викладені в таких наукових працях автора зі списку використаних джерел [7, 8, 9, 10, 11, 12, 25, 26, 226].

РОЗДІЛ 5

ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОЗДОРОВЛЕННЯ ВИНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН І ОРГАНІВ *IN VITRO*

Розроблена або удосконалена технологія чи окремий технологічний прийом мають бути економічно доцільними, забезпечувати підвищення виходу продукції, зниження її собівартості за умови збереження високих показників якості та сприяти підвищенню рівня рентабельності виробництва.

Економічний ефект визначався кількістю оздоровлених рослин, отриманих у результаті застосування різних методів санації. До розрахунків включали тільки ті варіанти дослідження, які характеризувалися наявністю технологічного ефекту: АМ+МС 2, АМ+МС 1, ТТ+АМ, АМ+ТТ, ХТ (озельтамівір 40 мг/л), ХТ (озельтамівір 40 мг/л) +АМ, ХТ (озельтамівір 80 мг/л), ХТ (озельтамівір 80 мг/л) +АМ, ХТ (рибавірин 20 мг/л+озельтамівір 30 мг/л), ХТ (рибавірин 20 мг/л+озельтамівір 40 мг/л), ХТ (рибавірин 20 мг/л+озельтамівір 40 мг/л)+АМ (табл. 5.1.)

Витрати на електроенергію визначали з урахуванням установленної потужності електроприладів, задіяних у технологічному процесі, а також площі культуральних боксів і термокамери, що забезпечували розміщення необхідної кількості мікроклонів. Трудові витрати обчислювали на основі рівня оплати праці персоналу, залученого до виконання відповідних технологічних операцій. Витрати на ідентифікацію збудника хвороби скручування листя винограду-3 визначали з урахуванням вартості тест-систем та додаткових хімічних реактивів. Отже, загальні витрати на проведення процесу в усіх варіантах досліду були подібними і знаходилися у межах 15,1–15,4 тис. грн на 100 експлантів. Основну частку витрат (понад 75 %) становили витрати на ідентифікацію вірусу (ІФА+ПЛР).

Таблиця 5.1

Економічна оцінка процесу ідентифікації та оздоровлення винограду від вірусу скручування листя-3 *in vitro*
(у розрахунку на 100 ініціальних експлантів, мікроклонів)

Показники	Варіанти дослідження					
	AM+MC 2	AM+MC 1	TT+AM	AM+TT	XГ (озельтамівір 40 мг/л)	XГ (озельтамівір 40 мг/л) +AM
1	2	3	4	5	6	7
Кількість ініціальних експлантів, мікроклонів, взятих для оздоровлення, шт.	100	100	100	100	100	100
Кількість оздоровлених мікроклонів, шт.	73,0	70,5	85,0	88,0	85,5	94,0
Рівень елімінації вірусу <i>GLRaV-3</i> , %	73,0	70,5	85,0	88,0	85,5	94,0
Витрати на одержання оздоровлених мікроклонів, у т.ч.	15422,0	15290,0	15126,0	15126,0	15174,5	15174,5

Прожовження табл. 5.1

1	2	3	4	5	6	7
- на введення ініціальних експлантів в культуру <i>in vitro</i> та їх мікророзмноження, грн.	126,0	126,0	126,0	126,0	126,0	126,0
- на ідентифікацію вірусу <i>GLRaV-3</i> (ІФА+ПЛР)	12000,0	12000,0	12000,0	12000,0	12000,0	12000,0
- на додаткові компоненти, грн.	396,0	264,0	0	0	148,5	148,5
- на енергоресурси, грн.	900,0	900,0	1000,0	1000,0	900,0	900,0
- трудові витрати, грн.	2000,0	2000,0	2000,0	2000,0	2000,0	2000,0
Собівартість оздоровленого мікроклону, грн.	211,2	216,8	177,9	171,8	177,4	161,4
Ціна реалізації оздоровленого мікроклону, грн.	360,0	360,0	360,0	360,0	360,0	360,0
Прибуток, грн.	10858,0	10090,0	15474,0	16554,0	15605,5	18665,5
Рівень рентабельності, %	70,40	65,99	102,30	109,44	102,84	123,01

Прожовження табл. 5.1

1	2	3	4	5	6	7
Показники	ХТ (озельтамівір 80 мг/л)	ХТ (озельтамівір 80 мг/л) +АМ	ХТ (рибавірін 20 мг/л+озельтамівір 30 мг/л)	ХТ (рибавірін 20 мг/л+озельтамівір 30 мг/л)+АМ	ХТ (рибавірін 20 мг/л+озельтамівір 40 мг/л)	ХТ (рибавірін 20 мг/л+озельтамівір 40 мг/л)+АМ
Кількість ініціальних експлантів, мікроклонів, взятих для оздоровлення, шт.	100	100	100	100	100	100
Кількість оздоровлених мікроклонів, шт.	87,5	95,0	90,0	98,0	92,0	100,0
Рівень елімінації вірусу <i>GLRaV-3</i> , %	87,5	95,0	90,0	98,0	92,0	100,0
Витрати на одержання оздоровлених мікроклонів, у т.ч.	15323,0	15323,0	15356,0	15356,0	15405,5	15405,5
- на введення ініціальних експлантів в культуру <i>in vitro</i> та їх мікророзмноження, грн.	126,0	126,0	126,0	126,0	126,0	126,0

Прожовження табл. 5.1

1	2	3	4	5	6	7
- на ідентифікацію вірусу <i>GLRaV-3</i> (ІФА+ПЛР)	12000,0	12000,0	12000,0	12000,0	12000,0	12000,0
- на додаткові компоненти, грн.	297,0	297,0	330,0	330,0	379,5	379,5
- на енергоресурси, грн.	900,0	900,0	900,0	900,0	900,0	900,0
- трудові витрати, грн.	2000,0	2000,0	2000,0	2000,0	2000,0	2000,0
Собівартість оздоровленого мікроклону, грн.	175,12	161,295	170,622	156,694	167,451	154,055
Ціна реалізації оздоровленого мікроклону, грн.	360,0	360,0	360,0	360,0	360,0	360,0
Прибуток, грн.	16177,0	18877,0	17044,0	19924,0	17714,5	20594,5
Рівень рентабельності, %	105,5	123,2	110,2	129,7	114,9	133,6

Додаткові витрати були пов'язані з використанням компонентів поживних середовищ або противірусних препаратів та енергоресурсів. Застосування віруцидних препаратів при проведенні хіміотерапії збільшувало витрати за рахунок їх вартості, але суттєво не впливало на загальну суму витрат.

Аналіз собівартості одного оздоровленого мікроклону свідчить, що вирішальним фактором її формування була кількість життєздатних рослин, отриманих після оздоровлення. За умови практично однакових загальних витрат на процес оздоровлення, зменшення виходу оздоровлених мікроклонів зумовлювало збільшення витрат у перерахунку на одиницю продукції.

Найбільшу собівартість однієї рослини відмічено у варіантах, де оздоровлення проводили тільки з застосуванням апікальних меристем на поживних середовищах МС 1 і МС 2 (211,2–216,8 грн./шт.), що пов'язано з низьким рівнем елімінації вірусу. У цих варіантах витрати на ідентифікацію вірусу, оплату праці та енергоресурси розподілялися на меншу кількість оздоровлених рослин, і це суттєво збільшувало собівартість продукції.

Застосування термотерапії та хіміотерапії сприяло збільшенню кількості оздоровлених мікроклонів, унаслідок чого собівартість зменшувалася до 171,8–177,9 грн./шт. Незважаючи на збільшення витрат на енергоресурси або додаткові компоненти поживного середовища, підвищена ефективність санації компенсувала ці витрати та забезпечувала економічну доцільність відповідних технологічних прийомів.

Найменша собівартість одного оздоровленого мікроклону була у варіантах, де оздоровлення ініціальних експлантів проводили комбіновано: (хіміотерапія чи термотерапія) + культивування апікальних меристем. Зокрема це варіанти, у яких хіміотерапію проводили і шляхом комплексного застосування препаратів рибавіріну та озельтамівіру. Собівартість оздоровленого мікроклону, у цих варіантах, знижувалася до 154,1–156,7

грн./шт., що пояснюється найбільшою ефективністю елімінації вірусу та, відповідно, найбільшим виходом здорових рослин.

Формування прибутку безпосередньо залежало від кількості отриманих оздоровлених рослин та їх реалізаційної вартості. У варіантах із використанням для оздоровлення тільки апікальних меристем прибуток був мінімальним і дорівнював 10,1–10,9 тис. грн. у розрахунку на 100 ініціальних експлантів. Застосування для оздоровлення термотерапії та хіміотерапії підвищувало економічний ефект способів санації, що проявлялося у збільшенні цього показника до 15,5–17,7 тис. грн. Найбільші показники прибутковості були у варіантах із комбінованими методами оздоровлення (ХТ (рибавірин 20 мг/л+озельтамівір 30 мг/л) + АМ, ХТ (рибавірин 20 мг/л+озельтамівір 40 мг/л) + АМ), де прибуток був 19,9 та 20,6 тис. грн. Це свідчить про високу економічну ефективність зазначених способів санації.

Рівень рентабельності інтегрально відображає співвідношення між витратами та економічним результатом розроблених, удосконалених та застосованих методів. За результатами досліджень цей показник змінювався у межах від 65,9 % до 133,6 %, що свідчить про різницю в економічній доцільності окремих технологічних підходів до оздоровлення.

Найнижчий рівень рентабельності був у варіантах АМ + МС 1 та АМ + МС 2, де низький вихід оздоровлених рослин не дозволяв ефективно компенсувати витрати. Використання термотерапії та хіміотерапії забезпечувало рентабельність на рівні понад 100 %, що вказує на доцільність їх практичного впровадження. Максимальні показники рівня рентабельності (129,7–133,6 %) було отримано у варіантах за комбінованого застосування хіміотерапії (рибавірин + озельтамівір) та апікальних меристем. Це свідчить, що поєднання високої технологічної ефективності та оптимальних витрат забезпечує найбільш економічно вигідні умови виробництва оздоровленого садивного матеріалу винограду.

Висновки до розділу 5

1. Розрахунок показників економічної ефективності є необхідною складовою оцінки доцільності впровадження методів ідентифікації та оздоровлення винограду *in vitro*. У цьому розділі проаналізовано тільки ті варіанти досліджень, які забезпечували технологічний ефект, тобто формування оздоровлених мікроклонів і можливість їх подальшої реалізації або виробничого впровадження.
2. Загальні витрати на одержання оздоровлених мікроклонів винограду у розрахунку на 100 ініціальних експлантів були подібними у всіх варіантах і дорівнювали 15126,0–15422,0 грн. Основну частку витрат формували витрати на ідентифікацію вірусу *GLRaV-3* (12000,0 грн.) та трудові витрати (2000,0 грн.). Додаткові витрати на компоненти поживних середовищ, протівірусні препарати та енергоресурси змінювалися залежно від методу, який застосовували, проте суттєво не впливали на загальний рівень витрат.
3. Собівартість оздоровленого мікроклону залежала від виходу здорових рослин. Найбільші показники собівартості встановлено у варіантах оздоровлення з використанням апікальних меристем на середовищах МС 1 та МС 2 – 211,2–216,8 грн./шт. Застосування термотерапії та хіміотерапії сприяли зниженню собівартості до 171,8–177,9 грн./шт., найменші її значення (154,1–156,7 грн./шт.) було отримано у варіантах із комбінацією методів: хіміотерапія + апікальні меристеми.
4. Рівень прибутку прямо залежав від кількості оздоровлених мікроклонів та ціни реалізації (360,0 грн./шт.). Найменший прибуток був у варіантах із використанням методу апікальних меристем – 10090,0–10858,0 грн. При застосуванні термотерапії та хіміотерапії прибуток збільшувався до 15474,0–17714,5 грн, а найбільші його значення (19924,0–20594,5 грн) було отримано у варіантах із комбінацією методів хіміотерапії та апікальних меристем.

5. Рівень рентабельності досліджуваних варіантів коливався від 65,9 % до 133,6 %. Найнижчі показники були характерні для варіантів АМ + МС 1 та АМ + МС 2. Застосування термотерапії та хіміотерапії забезпечувало рентабельність понад 100 %, а найвищий її рівень (129,7–133,6 %) відмічено у варіантах із комбінованою хіміотерапією (рибавірин + озельтамівір) у поєднанні з апікальними меристемами.

ВИСНОВКИ

1. Проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний» в Одеській області. Виявлено кущі з симптомами скручування листя та бактеріального раку. Встановлено, що кількість рослин із симптомами бактеріального раку збільшувалась; частка кущів із симптомами скручування листя залишалась незмінною.
2. Проведено ПЛР-діагностику 60 зразків виноградної лози сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний» (по 30 зразків кожного) на наявність вірусів хвороби скручування листя винограду і бактеріального раку.
3. Встановлено негативний вплив вірусу скручування листя (*GLRaV-3*) на виноградні рослини. Це проявляється у порушенні синтезу хлорофілу, зниженні якості та кількості врожаю, затримці розвитку кущів, а в окремих випадках – у загибелі уражених рослин.
4. Удосконалено метод ЗТ-ПЛР для ідентифікації вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*), що дало змогу отримувати достовірніші результати. Встановлено, що оптимальна концентрація іонів магнію (Mg^{2+}) для детекції РНК-вірусу становить 2,5 мМ.
5. Уперше в Україні застосовано метод мультиплексної ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією для одночасної ідентифікації вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*) та збудника бактеріального раку (*Rhizobium radiobacter*).
6. За допомогою методу мікросателітного аналізу підтверджено сортову належність досліджуваних рослин («Каберне Совіньйон» та «Одеський чорний»), у яких методами молекулярної діагностики ідентифіковано ураження патогенами *GLRaV-3* та *Rhizobium radiobacter*.
7. Секвенування ізолятів агробактерій показало, що серед виділених та ідентифікованих штамів агробактерій є як непатогенні, так і патогенні

штами. Встановлено, що всі зразки агробактерій, які виділені з виноградної лози, були генетично відмінними та переважно містили октопінову Ті-плазмиду, яка відповідає за патогенність.

8. Ефективність культивування апікальних меристем винограду *in vitro* визначається комплексним впливом розміру ініціального експланта та складу поживного середовища. Найвищий регенераційний потенціал проявляли апікальні меристеми розміром 0,5–1,0 мм, які культивували на модифікованому поживному середовищі МС із підвищеним вмістом фітогормонів (1 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л ГК) та вітамінів; це забезпечило їхню приживлюваність на рівні 56,0–62,0 % та покращення морфометричних показників. Але, найвищий коефіцієнт елімінації вірусу *GLRaV-3* був характерний для найменших за розміром меристем (0,2–0,4 мм) і дорівнював 70,5–72,5 %.

Статистичний аналіз підтвердив достовірність отриманих результатів. Встановлено, що на морфометричні та регенераційні показники апікальних меристем найбільше впливав склад поживного середовища (частка впливу фактора становила 39,6–54,4 %). Коефіцієнт елімінації вірусу та рівень регенерації переважно визначалися розміром експлантів (38,5–52,9 % та 99,4 % від загальної варіації відповідно).

9. Дослідження підтвердило високу ефективність комбінованого застосування термотерапії *in vitro* та культивування апікальних меристем для оздоровлення винограду від вірусу скручування листя 3 (*GLRaV-3*). Саме поєднання цих методів забезпечує максимальний вихід оздоровлених рослин (85,0–88,0 %) та формування життєздатних мікроклонів із високим регенераційним потенціалом і приживлюваністю на рівні 51,5–74,0 %. При цьому типові морфологічні характеристики пагонів після оздоровлення повністю зберігаються.

Статистичний аналіз показав, що поєднання термотерапії з культурою апікальних меристем є домінантним фактором, який визначає майже 100 %

загальної варіації результативних показників оздоровлення та морфогенезу.

10. Доведено, що поєднання хіміотерапії та культивування апікальних меристем є високоефективним методом оздоровлення винограду від вірусу *GLRaV-3*. Такий інтегрований підхід дозволяє одночасно знизити фітотоксичність препаратів, зберегти життєздатність, регенераційний потенціал ініціальних експлантів та досягнути практично повної елімінації вірусу (98,0–100 %). Ефективність хіміотерапії залежала від типу та концентрації віруцидного препарату: озельтамівір забезпечував високу життєздатність і рівень елімінації вірусу (до 89,5 %), рибавірин у високих концентраціях пригнічував ріст, їх комбіноване застосування з подальшим культивуванням апікальних меристем зменшувало негативний ефект і підвищувало рівень санації.

Статистичний аналіз підтвердив, що основний внесок у варіацію морфологічних показників та коефіцієнту елімінації мав тип препарату, а спосіб оздоровлення і взаємодія факторів проявляли переважно адитивний характер із елементами синергії.

11. Розрахунок показників економічної ефективності є важливим для оцінки доцільності впровадження прийомів оздоровлення винограду *in vitro* у практику, оскільки дозволяє визначити оптимальні методи з точки зору витрат, прибутковості та можливості подальшого виробничого використання оздоровлених мікроклонів. Загальні витрати на оздоровлення 100 ініціальних експлантів були майже однаковими у всіх варіантах (15126–15422 грн.) і переважно склалися з витрат на ідентифікацію вірусу *GLRaV-3* та трудові ресурси, оскільки витрати на поживні середовища, противірусні препарати та енергоресурси суттєво не впливали на загальний рівень витрат.

Собівартість одного оздоровленого мікроклону залежала від виходу здорових рослин: найбільшою вона була у варіантах, де оздоровлення проводили з застосуванням апікальних меристем на середовищах МС 1 та МС 2 (211,2–216,8 грн./шт.), у варіантах, де використовували термотерапію

та хіміотерапію собівартість зменшувалась до 171,8–177,9 грн./шт., у варіантах, де комбінували хіміотерапію та культивування апікальних меристеми (ХТ (рибавірин 20 мг/л+озельтамівір 30 мг/л) + АМ, ХТ (рибавірин 20 мг/л + озельтамівір 40 мг/л) + АМ) собівартість була найменшою – 154,1–156,7 грн./шт.

Найбільший прибуток і рентабельність були встановлені для варіантів, де застосовували комбінацію хіміотерапії та культивування апікальних меристем (прибуток 19924–20594,5 грн., рентабельність 129,7–133,6 %), що свідчить про економічну доцільність саме цього підходу для виробництва оздоровлених мікроклонів винограду *in vitro*.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ПО ЗАСТОСУВАННЮ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

I. При виробництві якісних саджанців винограду необхідно проводити комплексні заходи, а саме фітосанітарне обстеження виноградних насаджень для виявлення перших симптомів ураження рослин збудниками хвороб у весняно-літній період, коли найбільше проявляються симптоми вірусних хвороб і бактеріального раку.

Щоб не допустити поширення вірусної і бактеріальної інфекції необхідно своєчасно проводити діагностику хвороб і ідентифікацію збудників у спеціалізованих лабораторіях, які мають відповідне лабораторне обладнання та використовуються сучасні лабораторні методи.

Для прискорення діагностики рекомендовано використовувати розроблену мультиплексну систему, за допомогою якої можна визначати декілька різних фітопатогенів.

II. Оздоровлення винограду від хвороби скручування листя в культурі тканини і органів *in vitro* рекомендовано проводити наступним чином. Перед застосуванням будь якого методу оздоровлення обов'язково проводять лабораторне тестування вихідного матеріалу на наявність вірусної інфекції (ІФА, ЗТ-ПЛР).

Метод апікальних меристем.

1. Фізичні параметри культивування у культуральних боксах: температура 24–25 °С, 16-годинний фотоперіод, освітлення 2500–3000 лк, відносна вологість повітря 60–70 %.
2. Ініціальні експланти винограду довжиною 0,8–1,0 см стерилізують та вводять у культуру тканин і органів *in vitro* на поживне середовище МС. Для забезпечення необхідної кількості мікроклональних рослин експланти субкультивують декілька циклів.
3. На етапі введення використовують модифіковане поживне середовище

МС, яке містить 0,2 мг/л 6-БАП та 0,05 мг/л ІОК.

4. Після проліферації пазушних бруньок ініціальні експланти пересаджують на поживне середовище другого етапу культивування для власне мікророзмноження і укорінення. Для цього використовують поживне середовище МС із вмістом 0,1 мг/л 6-БАП та 0,3 мг/л ІОК.

5. Після досягнення рослинами висоти 6-8 см виділяють апікальні меристеми, розміром 0,5–0,7 мм і висаджують на поживне середовище МС 2 для подальшої регенерації, культивування та отримання мікроклонів винограду заданих параметрів.

Метод термотерапії.

Стандартні роботи по культивуванню винограду *in vitro* проводять як зазначено вище (метод апікальних меристем).

I. Спосіб проведення термотерапії.

1. Після досягнення мікроклонами висоти 6-8 см їх переміщують до термокамери для проведення термотерапії.

2. Термотерапію ініціальних експлантів, мікроклонів винограду проводять у термокамері протягом 8 тижнів за температури 37 °С.

3. Фізичні параметри проведення термотерапії: 16-годинний фотоперіод, холодне біле флуоресцентне світло (2-3 тис. лк.). Температуру збільшують поступово, починаючи з 25 °С.

4. Після зняття температурного стресу у рослин виділяють апікальні меристеми, розміром 0,5-0,7 мм і переносять їх на поживне середовище МС 2 для подальшого культивування.

II. Спосіб проведення термотерапії.

1. Із апікальних верхівок уражених пагонів, виділяють апікальні меристеми, розміром 0,5–0,7 мм і культивують на поживному середовищі МС 2.

2. Після регенерації меристем та утворення мікропагонів висотою 20–30 мм їх переміщують до термокамери для проведення термотерапії.

3. Після зняття температурного стресу у рослин, які піддавали термотерапії, відокремлюють та культивують верхівки пагонів висотою 4–5 мм та проводять живцювання рослин на одновічкові мікрочубуки з однією пазушною брунькою.

4. Культивування ініціальних експлантів здійснюють на поживному середовищі МС.

Метод хіміотерапії.

1. Стандартні роботи по культивуванню винограду *in vitro* проводять як зазначено вище (метод апікальних меристем).

2. Мікроклони винограду, які досягли висоти 8-10 см живцюють на одновічкові мікрочубуки і висаджують на стандартне поживне середовище МС із віруцидними препаратами.

3. Віруцидні препарати додають у поживне середовище МС перед автоклавуванням.

4. Рекомендовано використовувати наступні препарати: комплекс рибавірин + озельтамівір у кількості (20 мг/л + 30 мг/л) або (20 мг/л + 40 мг/л), озельтамівір 30 або 40 мг/л.

5. Хіміотерапію можна поєднувати з культивуванням апікальних меристем.

6. Після хіміотерапії у рослин виділяють апікальні меристеми, розмірами 0,5-0,7 мм і переносять їх на поживне середовище МС 2 для подальшої регенерації, культивування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андрієвський В. В., Врублевський А. Т., Мацкевич В. В., Мацкевич О. В. Проблеми мікроклонального розмноження фундука. *Агробіологія*. 2019. № 1. С. 74–84. [https://doi: 10.33245/2310-9270-2019-146-1-74-84](https://doi.org/10.33245/2310-9270-2019-146-1-74-84).
2. Балашова Г. С. Наукові основи насінництва картоплі на півдні України : дис. ... д-ра с.-г.н. : 06.01.05. Херсон, 2016. 330 с.
3. Бочарова В. Р., Ковальова І. А., Мазуренко Л. С. Ідентифікація генотипів клонів винограду за допомогою мікросателітних маркерів. *Цитологія і генетика*. 2009. № 1. С. 8–17.
4. Бочарова В. Р., Тулєєва М. І., Мулюкіна Н. А., Ковальова І. А. Ідентифікація та паспортизація генотипів винограду за допомогою ДНК-маркерів. *Вісник ОГУ*. 2008. С. 127–134.
5. Демчук І. В., Зарицький М. М. Проблеми оздоровлення картоплі методами біотехнології. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2012. Випуск 2 (23). С. 179–194.
6. Зеленянська Н. М. Наукове обґрунтування та розробка сучасної технології вирощування садивного матеріалу винограду : дис. ... д-ра. с.-г.. наук : 06.01.08. Одеса, 2016. 502 с.
7. Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Застосування методу апікальних меристем для розмноження винограду *in vitro*. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2024. № 2. С. 55–61. <https://doi.org/10.32782/2310-0478-2024-2-55-61>
8. Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Оздоровлення винограду у культурі тканин і органів *in vitro*. *Аграрні інновації*. 2025. No. 33. С. 121-129. DOI <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2025.33.20>
9. Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Особливості культивування апікальних меристем винограду у культурі тканин і органів *in vitro*. *Perspectives of*

contemporary science: theory and practice : Proceedings of VI International Scientific and Practical Conference (Lviv, July 22–24, 2024). Львів, 2024. С. 13–18.

10. Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Практичні аспекти оздоровлення винограду в культурі *in vitro*. *Таврійський науковий вісник*. 2025.

11. Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Статистичне обґрунтування окремих показників культивування апікальних меристем винограду. *Latest research in the development of science and education* : матеріали XXVI International scientific and practical conference (June 30 – July 02, 2025). Prague, Czech Republic, 2025. P. 7–11.

12. Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Хіміотерапія винограду *in vitro*. *The scientific heritage* (Budapest, Hungary). 2025. No. 175. P. 3–9. DOI: 10.5281/zenodo.18077199

13. Києнко З. Б., Кімейчук І. В., Мацкевич В. В. Мікроклональне розмноження рослин роду *Actinidia* Lindl. *Сортовивчення та сортознавство*. 2022. 18 (3). С. 220–229. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.18.3.2022.269022>

14. Ключаденко А. А., Мельничук М. Д. Особливості клонального мікророзмноження хмелю (*Humulus Lupulus* L.) на безвірусній основі. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія*. 2007. Вип. 21. С. 218–224.

15. Конуп Л. О., Рябий М. І. Методи діагностики вірусу скручування листя винограду – “*GRAPEVINE LEAF ROLL-ASSOCIATED*” і оздоровлення виноградної лози від цього збудника. Тези доповідей XVI з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (м. Київ, 2–6 червня 2025 р.). Київ, 2025. С. 282.

16. Конуп Л. О., Рябий М. І., Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., Чистякова В. Л., Вуек А. О., Кирик М. М., Власов В. В. Коротковузля виноградної лози на виноградниках Одеської області: діагностика та перспективи оздоровлення методом термічної обробки. *Карантин і захист рослин*. 2025. № 1. С. 14–19.

DOI: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2025.1.14-19>

17. Конуп Л. О., Чистякова В. Л., Конуп А. І., Ніколаєва Н. І. Оздоровлення виноградної лози і саджанців, заражених збудником фітоплазмової інфекції. *Виноградарство і виноробство*. 2015. Вип. 52. С. 89–91.
18. Конуп Л. О., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., Рябий М. І. Фітоплазмозна інфекція на виноградних рослинах сорту Шардоне і оздоровлення їх методом термотерапії. *Вісник виноградарства і виноробства*. 2023. Вип. 2. С. 58–63.
19. Люта Ірина Вплив складу живильних середовищ на ріст і розвиток експлантів винограду, отриманих в умовах *in vitro*. *International Science Journal of Engineering & Agriculture*. 2024. Vol. 3, No. 6. P. 107–116. [https://doi: 10.46299/j.isjea.20240306.11](https://doi.org/10.46299/j.isjea.20240306.11).
20. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Мацкевич Ю. В. Розробка окремих елементів протоколу сталого росту та розмноження суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) в асептичних умовах. *Агробіологія*. 2023. № 2. С. 172–186. <https://agrobiologiya.btsau.edu.ua/uk/content/rozrobka-okremykh-elementiv-protokolu-stalogo-rostu-ta-rozmnozheniya-sunyci-sadovoyi-fragaria> (дата звернення 25.12.2025)
21. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Олешко О. Г. Фізіологія та біотехнологія рослин : підручник. Біла Церква : БНАУ, 2022. 427 с.
22. Мілкус Б. Н., Конуп Л. О., Жунько І. Д., Ліманська Н. В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя. *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т. 67, № 1. С. 41–48.
23. Олійник О. О., Клюваденко А. А., Мельничук М. Д. Покращення складу живильних середовищ для пришвидшення росту і розвитку троянди ефіроолійної в культурі *in vitro*. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2016. Вип. 26.7. С. 134–139.

https://www.researchgate.net/publication/319628082_OPTIMIZATION_OF_CUL

[TURE_MEDIA_CONTENT_FOR_ACCELERATION_OF_GROWTH_AND_CULTIVATION_OF_ROSA_DAMASCENA_MILL_IN_IN_VITRO_CULTURE](#)

(дата звернення 25.12.2025).

24. Подгаєцький А. А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.
25. Рябий М. І. Ідентифікація збудників вірусних і бактеріальних хвороб винограду. *Perspectives of contemporary science: theory and practice* : матеріали 12-ї міжнар. наук.-практ. конф. (м. Львів, 13–15 січ. 2025 р.). Львів, 2025. С. 36–41.
26. Рябий М. І., Зеленянська Н. М. Метод термотерапії для оздоровлення винограду від збудника хвороби скручування листя-3. *Innovation and modern technologies for the development of science* : Abstracts of II International Scientific and Practical Conference (Prague, January 12-14, 2026). Prague, Czech Republic, 2026. P. 11–16.
27. Система сертифікованого виноградного розсадництва України : монографія / В. В. Власов та ін. Київ : Аграрна наука, 2015. 288 с.
28. Теслюк Н. І. Утворення множинних пагонів винограду в культурі *in vitro* на різних живильних середовищах. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2018. № 1. С. 66–75I. URL:[http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).119109](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).119109)
29. Щербіна А. В. Діагностика вірусних хвороб в процесі одержання здорового садивного матеріалу винограду : канд. біол. наук : 06.01.11. Одеса, 2004. 131 с.
30. Abdellatif E., Valentini F., Janse J.D., Bouri M., Rhouma A., Chebil S., D'Onghia A.M. Occurrence of crown gall of the grapevine in Tunisia and characterization of Tunisian *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* strains. *Journal of Plant Pathology*. 2013. Vol. 95, No. 1. P. 115–126.
31. Abolmaaty A VU C Oliver J Levin R E Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Microbios* 2000. Vol. 101. P. 181–189.

32. Adams I. P., Glover R. H., Monger W. A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M. *et al.* Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant Pathol.* 2009. Vol. 10. P. 537–545.
33. Agrios N. *Plant Pathology*. 3rd ed. New York : Academic Press, Inc., 1988.
34. Afonso A. M., Guerra R., Cavaco A. M., Pinto P., Andrade A., Duarte A., Power D. M., Marques N. T. Identification of asymptomatic plants infected with Citrus tristeza virus from a time series of leaf spectral characteristics. *Comput. Electron. Agric.* 2017. Vol. 141. P. 340–350. DOI: 10.1016/j.compag.2017.08.001
35. Alkowni R., Zhang Y.P., Rowhani A., Uyemoto J.K., Minafra A. Biological, molecular, and serological studies of a novel strain of grapevine leafroll associated virus 2. *Virus Genes*. 2011. Vol. 43, No. 1. P. 102–110. DOI: 10.1007/s11262-011-0607-7
36. AlMaarri K., Massa R., AlBiski F. Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. *Plant Biotechnol.* 2012. Vol. 29. P. 237–243. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0215a
37. Altmayer B. Investigations on the elimination of nepovirus and grapevine leafroll by shoot tip meristem culture of grapevirus. *Phytoparasitica*. 1989. Vol. 17. P. 72–73.
38. Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* 2004. Vol. 86. P. 183–195. <https://www.researchgate.net/publication/242759853>
39. Azizi M., Lau H., Abu-Bakar N. Integration of advanced technologies for plant variety and cultivar identification. *Journal of Biosciences* 2021. Vol. 46(4). P. 91. DOI: 10.1007/s12038-021-00214-x
40. Basso M. F., Fajardo T. V. M., Saldarelli P. Grapevine Virus Diseases: Economic Impact and Current Advances in Viral Prospection and Management. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2017. Vol. 39, No. 1. P. 2–22.

<https://doi.org/10.1590/0100-29452017411>

41. Barba M., Blanco C., Navarro L. Grapevine virus elimination using meristem tip culture. *Vitis*. 2004. Vol. 43. P. 91–96.
42. Barlass M., Skene K. G. M., Woodham R. C., Krake L. R. Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture. *Annals of Applied Biology*. 1982. Vol. 101. P. 291–295.
43. Bayati S., Shams-Bakhsh M., Moiens A. Elimination of Grapevine *virus A* (*GVA*) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, Tehran. 2011. Vol. 13. No. 3. P. 442–450.
44. Bendel N., Kicherer A., Backhaus A., Köckerling J., Maixner M., Bleser E., Klück H.-C., Seiffert U., Voegelé R.T., Töpfer R. Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 and 3 in White and Red Grapevine Cultivars Using Hyperspectral Imaging. *Remote Sensing*. 2020. Vol. 12. P. 1693. DOI: 10.3390/rs12101693.
45. Bhat A. I., Rao G. P. Virus elimination by meristem-tip culture. *Characterization of Plant Viruses*. 2020. P. 465–477. DOI: 10.1007/978-1-0716-0334-5_47
46. Bini F., Kuczmog A., Putnoky P., Otten L., Bazzi C., Burr T.J., Szegedi E. Novel pathogen specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis*. 2008. Vol. 47. P. 181–189. DOI: 10.5073/vitis.2008.47.181-189
47. Blackburn G.A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. *J. Exp. Bot.* 2007. Vol. 58, No. 4. P. 855–867. DOI: 10.1093/jxb/erl123
48. Blouin A., Chooi K., Cohen D., MacDiarmid R. Serological methods for the detection of major grapevine viruses. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Cham, Switzerland: Springer, 2017. P. 409–429. DOI: 10.1007/978-3-319-57706-7_21
49. Borroto-Fernandez E. G., Sommerbauer T., Popowich E., Scharti A., Laimer M. Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis*

- vinifera* cv. Domina leads to Arabis mosaic virus-free plants. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht. 2009. Vol. 124, No. 1. P. 171–174. DOI: [10.1007/s10658-008-9404-0](https://doi.org/10.1007/s10658-008-9404-0)
50. Bouamama-Gzara B., Selmi I., Chebil S., Melki I., Mliki A., Ghorbel A., Carra A., Carimi F., Mahfoudhi N. Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian cultivar by somatic embryogenesis and characterization of the somaclones using ampelographic descriptors. *The Plant Pathology Journal*. 2017. Vol. 33, No. 5. P. 401–411.
51. Boscia D., Greif C., Gugerli P., Martelli G.P., Walter B., Gonsalves D. Nomenclature of grapevine leafroll associated putative closteroviruses. *Vitis*. 1995. Vol. 34. P. 171–175.
52. Bowers J. E., Dangl G. S., Meredith C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* 1999. Vol. 50, No. 3. P. 243–246. DOI: 10.5344/ajev.1999.50.3.243
53. Bowers J. E., Dangl G. S., Vignani R., Meredith C. P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*. 1996. Vol. 39, No. 4. P. 628–633. DOI: 10.1139/g96080
54. Buciumeanu E.-C., Guta I.-C. Harmful viruses of grapevine: impact, spread and biotechnologies for healthy plants regeneration. *Acta Agricola Romanica*. 2023. Vol. 5, No. 5.2. P. 6–20.
55. Buciumeanu E., Vişoiu E. Elimination of grapevine leafroll associated virus type III by heat treatment and *in vitro* culture. In: Crăciun C., Ardelean A. (Eds.), *Current Problems and Techniques in Cellular and Molecular Biology*. Timișoara, Romania: Ed. Mirton, 1996. P. 626–631.
56. Buciumeanu E., Vişoiu E. Elimination of grapevine viruses in *Vitis vinifera* L. cultivars. *Proceedings of the 13th ICVG Meeting*, 12–17 March 2000, Adelaide, Australia. Adelaide. 2000. P. 165–166.
57. Burr T. J. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of

- dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Disease*. 1984. Vol. 68. P. 976–978. DOI: 10.1094/PD68976
58. Burr T. J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1999. Vol. 37. P. 53–80. DOI: 10.1146/annurev.phyto.37.1.53
59. Burr T. J., Reid C. L., Adams C. E., Momol E.A. Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia*. *Plant Disease*. 1999. Vol. 83. P. 102–107. DOI: 10.1094/PDIS.1999.83.2.102
60. ButiucKeul A., Coste A. Biotechnologies and strategies for grapevine improvement. *Horticulturae*. 2023. Vol. 9, No. 1. P. 1–27. DOI: 10.3390/horticulturae9010062
61. Castellano M. A., Martelli G. P., Savino V. Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected vines. *Vitis*. 1983. Vol. 22. P. 23–39.
62. Castillo A., Pina J. A., Navarro L. Virus free grapevine propagation via meristem culture. *Vitis*. 2008. Vol. 47. P. 123–129.
63. Celestino M., Di Franco A., Polizzotto R. Meristem culture for grapevine virus elimination. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2010. Vol. 101. P. 211–218.
64. Chávez P., Zorogastúa P., Chuquillanqui C., Salazar L., Mares V., Quiroz R. Assessing Potato yellow vein virus (PYVV) infection using remotely sensed data. *Int. J. Pest Manag.* 2009. Vol. 55. P. 251–256.
65. Chen J., Li W., Xu Q. Grapevine virus free plant production by meristem tip culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2011. Vol. 106. P. 189–196.
66. Cheong E. J., Jeon A. R., Kang J. W., Mock R., Kinard G., Li R. In vitro elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (*Rubus occidentalis*). *Hort. Sci. (Prague)*. 2014. Vol. 2. P. 95–99. DOI: 10.17221/266/2013-HORTSCI
67. Chinestra S. C., Curvetto N. R., Marinangeli P. A. Production of virus-free plants of *Lilium* spp. from bulbs obtained *in vitro* and *ex vitro*. *Scientia*

Horticulturae. 2015. Vol. 194. P. 304–312.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.015>

68. Cipriani G., Marrazzo M. T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M., Testolin R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biology*. 2008. Vol. 8. P. 1–13. doi:10.1186/1471-2229-8-127.

69. Clever M., Stehr R. (1996). Ergebnisse einer Leistungsprüfung zwischen virusfreien und nicht virusfreien Kernobstsorten. *Mitt. Obstbauversuchringes des Alten Landes*. Vol. 51, No 6. P. 236–247.

70. Coetzee B. Freeborough M. Maree H. J. Celton J. Rees D. J. Burger J. T. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: virome of a vineyard. *Virology* 2010. Vol. 400. P. 157–163.

71. Constable F. E. Nicholas P. Rodoni B. C. *Development and Validation of Diagnostic Protocols for the Detection of Endemic and Exotic Pathogens of Grapevines*. Final report to Grape and Wine Research & Development Corporation. Department of Primary Industries, DPI05/04. 2010. 283 p.

72. Davis Edward W II, Weisberg Alexandra J, Tabima Javier F, Grunwald Niklaus J, Chang Jeff H. Gall-ID: tools for genotyping gall-causing phytopathogenic bacteria. *PeerJ*. 2016. Vol. 4. e2222. DOI: 10.7717/peerj.2222.

73. Diab A. A., Khalil S. M., Ismail R. M. Regeneration and micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through shoot tips and axillary buds. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2011. Vol. 2, Issue 4. P. 484–491.

74. Díaz-Barrita A. J., Norton M., Martínez-Peniche R. A., Uchanski M., Mulwa R., Skirvin R. M. The use of thermotherapy and in vitro meristem culture to produce virus-free ‘Chancellor’ grapevines. *International Journal of Fruit Science*. 2008. Vol. 7, No. 3. P. 215–227. https://doi.org/10.1300/J492v07n03_03

75. Dokupilová I. Šturdík E. Mihálik D. Characterization of vine varieties by SSR markers. *Acta Chimica Slovaca* 2013. Vol. 6(2). P. 227–234. DOI:

10.2478/acs-2013-0035

76. Doile J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987. Vol. 19. P. 11–15.
77. Dolja V. V. Kreuze J. F. Valkonen J. P. T. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res*. 2006. Vol. 117. P. 38–51.
78. Dolja V. V., Martelli G. P., Meng B. Evolutionary aspects of grapevine virology. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Cham, Switzerland: Springer, 2017. P. 659–688. DOI: 10.1007/978-3-319-57706-7_34.
79. Dong Y. Duan S. Xia Q. Liang Z. Dong X. Margaryan K. Musayev M. *et al.* Chen Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution. *Science* 2023. Vol. 379(6635). P. 892–901. DOI: 10.1126/science.add8655.
80. Dziejczak E. Elimination of Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV) from plum ‘Earliblue’ shoots through thermotherapy in vitro. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 2008. Vol. 6, No. 16. P. 101–109.
81. Elansary D. W. A., Gürcan K., Roumi V., Şimşek Ö. Efficacy of plant tissue culture techniques for eliminating Black Mulberry Idaeovirus (BMIV) from infected black mulberry (*Morus nigra*). *Plants*. 2024. Vol. 13. Art. 2959. <https://doi.org/10.3390/plants13212959>
82. Engelbrecht D. J. Kasdorf G. G. F. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* 1990. Vol. 22. P. 341–346.
83. Faccioli G. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. In: Loebenstein G., Berger P. H., Brunt A. A., Lawson R. H., editors. *Virus and virus-like diseases of potato and production of seed-potatoes*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. P. 365–390. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0842-6_28
84. Faccioli V. C., Marani F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A., Khetarpal R. K., Koganezawa H., editors. *Plant virus*

disease control. St. Paul: APS Press, 1998. P. 346–380.

85. Faist H., Keller A., Hentschel U., Deeken R. Grapevine (*Vitis vinifera*) crown galls host distinct microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 82, No. 18. P. [online]. <https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>
86. Faoro F., Tornaghi R., Belli G. Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy. *J. Plant Pathol.* 1981. Vol. 17. P. 183–189.
87. Farhadi-Toolli S., Ghanbari A., Kermani M.J., Zeinalabedini M., Bettoni J.C., Naji A.M., Kazemi N. Droplet-vitrification cryotherapy and thermotherapy as efficient tools for the eradication of apple chlorotic leaf spot virus and apple stem grooving virus from virus-infected quince in vitro cultures. *European Journal of Plant Pathology.* 2022. Vol. 162. P. 31–43. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02326-2>
88. Farkas M. E. Czotter N. Lózsa R. Dula T. Ember I. Várallyay É. Szegedi E. Conventional PCR primers for the detection of grapevine pathogens disseminated by propagating material. *International Journal of Horticultural Science* 2014. Vol. 20. P. 69–80. <https://doi.org/10.31421/IJHS/20/3-4/1139>
89. Fayek M. A., Jomaa A. H., Shalaby A.-B. A., Al-Dhaher M.-M. Meristem tip culture for in vitro eradication of grapevine leaf roll-associated virus-1 (*GLRaV-1*) and grapevine fan leaf virus (*GFLV*) from infected Flame Seedless grapevine plantlets. *Ini. Inv.* 2009. Vol. 4. ISSN-e 1988-415X
90. Gale G. Saving the vine from phylloxera: a never ending battle. In: *Wine: A Scientific Exploration* / eds. J. Sandler, R. Pidler. London : Taylor and Francis, 2002. P. 70–91.
91. Gambino G., Gribaudo I. Applications of in vitro techniques for grapevine virus elimination. *Vitis.* 2006. Vol. 45. P. 97–101.
92. Genov N., Llop P., Lopez M. M., Bobev S. G., Álvarez B. Molecular and phenotypic characterization of *Agrobacterium* species from vineyards allows identification of typical *Agrobacterium vitis* and atypical biovar 1 strains. *Journal of Applied Microbiology.* 2015. Vol. 118. P. 1465–1477.

93. Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Res.* 2012. Vol. 163. P. 262–268. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.10.010
94. Gohlke J. Deeken R. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers of Plant Science.* 2014. Vol. 5. P. 155. DOI: 10.3389/fpls.2014.00155. PMID: 24795740; PMCID: PMC4006022.
95. Golino D. A., Sim S. T., Rowhani A. Techniques for virus detection and elimination in grapevine. *Acta Hort.* 2000. Vol. 528. P. 147–155.
96. Gordon J. E., Christie P. The *Agrobacterium* Ti plasmids. *Microbiol. Spectrum.* 2014. Vol. 2, No. 6. P. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0010-2013>
97. Goussard P. G., Wiid J., Kasdorf G. G. F. The effect of in vitro somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture.* 1991. Vol. 12. P. 77–81.
98. Gouveia P. Santos M. T. Eiras-Dias J. E. Nolasco G. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties. *Arch. Virol.* 2011. Vol. 156. P. 413–420.
99. Gribaudo I., Manini F., Lenzi R. Virus elimination in grapevine cultivars of North-Western Italy through meristem culture and *in vitro* thermotherapy. Proceedings of the 12th Meet. ICVG. Lisbon, Portugal, 1997. P. 165–166.
100. Griffel L., Delparte D., Edwards J. Using Support Vector Machines classification to differentiate spectral signatures of potato plants infected with Potato virus Y. *Comput. Electron. Agric.* 2018. Vol. 153. P. 318–324.
101. Gugerli P., Brugger J. J., Bovey R. L'enroulement de la vigne: mise en evidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hort.*

1984. Vol. 16. P. 299–304.
102. Gugerli P., Brugger J. J., Bovey R. L'enroulement de la vigne: mise en evidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 1984. Vol. 16. P. 299–304.
103. Guță I. C., Buciumeanu E. C., Gheorghe R. N., Teodorescu Al. Solutions to eliminate grapevine leafroll associated virus serotype 1+3 from *Vitis vinifera* L. cv. Ranâi Magaraci. *Romanian Biotechnological Letters.* 2010. Vol. 15, No. 1. P. 72–78.
104. Guță I. C., Buciumeanu E. C., Gheorghe R.-N., Teodorescu Al. Examination of phytotoxic effect of viricides on grapevine in controlled medium. *Scientifical Papers U.S.A.M.V.B., Serie B, Horticulture.* 2009. Vol. LIII. P. 559–563.
105. Guță I. C., Buciumeanu E. C., Gheorghe R. N., Teodorescu Al. The Assessment of Viricides Phytotoxicity used in Grapevine *in Vitro* Chemotherapy. *Bulletin UASVM Horticulture.* 2009. Vol. 66, No. 1. P. 661.
106. Guta I. C., Buciumeanu E.-C., Visoiu E. Elimination of Grapevine fleck virus by *in vitro* chemotherapy. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.* 2014. Vol. 42, Issue 1. P. 115–118. DOI: <https://doi.org/10.15835/nbha4219227>
107. Haas J. H. Moore L. W. Ream W. Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 1995. Vol. 61. P. 2879–2884.
108. Habbadi K. Duplay Q. Chapulliot D. Kerzaon I. Benkirane R. Benbouazza A. Wisniewski-Dyé F. Lavire C. Achbani E. H. Vial L. Characterization and phylogenetic diversity of *Allorhizobium vitis* isolated from grapevine in Morocco. *Journal of Applied Microbiology* 2020. Vol. 128. P. 828–839. DOI: 10.1111/jam.14523.
109. Hassan M. *In Vitro* Regeneration of Virus-Free Grapevine (*Vitis vinifera* L.) in Some Commercial Cultivars. *International Journal of Agricultural and Natural*

Sciences. 2018. Vol. 1, No 1. P. 69–74. <https://www.ijans.org/index.php/ijans/article/view/421/409> (дата звернення: 23.12.2025).

110. Hatzinikolakis H. K., Roubelakis-Angelakis K. A. A modified method for *in vitro* thermotherapy and meristem culture for production of virus-free grapevine plant material. *11th International Conference on Vine and Wine* (Montreux, Switzerland, September 6–9, 1993). Montreux, Switzerland, 1993. P. 172.

111. Hauptmanová A., Polák J. The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of *in vitro* cultures. *Hort. Sci. (Prague)*. 2011. Vol. 38, No. 2. P. 49–53. <https://DOI: 10.17221/10/2010-HORTSCI>

112. Hou J. Li L. He J. Detection of grapevine leafroll disease based on 11-index imagery and ant colony clustering algorithm. *Precis. Agric.* 2016. Vol. 17. P. 488–505.

113. Hu G., Dong Y., Zhang Z., Fan X., Ren F. Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (*GLRaV-3*). *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 271. Art. 109462. P. 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109462>

114. Hu G., Dong Y., Zhang Z., Fan X., Ren F., Zhou J. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2015. Vol. 121. P. 435–443. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61913-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61913-6)

115. Hu G. J., Hong N., Wang L. P., Hu H. J., Wang G. P. Efficacy of virus elimination from *in vitro*-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Protection*. 2012. Vol. 37. P. 20–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.017>

116. Hu Guo-jun, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Ren Fang, Li Zheng-nan. Effect of pre-culture on virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy coupled with shoot tip culture. *Journal of Integrative Agriculture*.

2018. Vol. 17, No. 9. P. 2015–2023

117. Hu J. S., Gonsalves D., Teliz D. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *J. Phytopathol.* 1990. Vol. 128. P. 1–14.

118. Humplik J. F., Lazár D., Fürst T., Husičková A., Hýbl M., Spichal L. Automated integrative high-throughput phenotyping of plant shoots: A case study of the cold-tolerance of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Methods.* 2015. Vol. 11. P. 20.

119. Ioannou N. Occurrence and natural spread of grapevine leafroll-associated closteroviruses in Cyprus. In: *Proceedings 11th Congress of ICVG*, 5–10 September, Montreux: Federal Agricultural Research Station of Changins, 1993. P. 111–112.

120. Ito T., Sumi S., Ohki S., Suzuki N., Ieki H. Production of virus-free grapevine plants by meristem tip culture. *Vitis.* 2009. Vol. 48. P. 1–6.

121. Jooste A. E. C. Maree H. J. Bellstedt D. U. Goszczynski D. E. Pietersen G. Burger J. T. Three Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR. *Arch. Virol.* 2010. Vol. 155. P. 1997–2006.

122. Kawaguchi A. Genetic diversity of *Rhizobium vitis* strains in Japan based on multilocus sequence analysis of *pyrG*, *recA* and *rpoD*. *Journal of General Plant Pathology.* 2011. Vol. 77. P. 299–303. DOI: 10.1007/s10327-011-0333-y.

123. Kawaguchi A. Nemoto M. Ochi S. Matsushita Y. Sato T. Sone T. Insight into the population dynamics of pathogenic bacteria causing grapevine crown gall in snowfall areas: snow cover protects the proliferation of pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science.* 2023. Vol. 14. P. 1198710. DOI: 10.3389/fpls.2023.1198710.

124. Kawaguchi A. Noutoshi Y. Insight into inducing disease resistance with *Allorhizobium vitis* strain ARK-1, a biological control agent against grapevine crown gall disease. *European Journal of Plant Pathology.* 2022. Vol. 162. P.

981–987. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02440-3>

125. Kawaguchi A. Sone T. Ochi S. Matsushita Y. Noutoshi Y. Nita M. Origin of pathogens of grapevine crown gall disease in Hokkaido in Japan as characterized by molecular epidemiology of *Allorhizobium vitis* strains. *Life*. 2021. Vol. 11. P. 1265. <https://doi.org/10.3390/life11111265>

126. Kaya E. Comparison of three different techniques for eradication of Apple mosaic virus (ApMV) from hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Plant Protection Research*. 2021. Vol. 61. P. 11–19. <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.136275>

127. Khan N., Ahmed M., Hafiz I., Abbasi N., Ejas S., Anjum M. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for in vitro shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 2015. Vol. 49. P. 37–45. URL: <https://DOI:10.20870/oenone.2015.49.1.95>

128. Kerr A. Panagopoulos C. G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *J. Phytopathol.* 1977. Vol. 90, No. 2. P. 172–179.

129. Konup L., Vlasov V., Konup A., Chistyakova V., Nikolaeva N., Riabyi M., Kyryk M., Pikovskyi M. Detection and identification of grapevine leafroll associated virus 1, 3, 4 (strain 9) isolates in south of Ukraine. *Proceedings of the 20th Congress of the International Council for the Study of Virus & Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)* : materials of the international conference (Thessaloniki, September 25–29, 2023). Thessaloniki, 2023. P. 159–160.

130. Konup L., Pikovskyi M., Riabyi M., Kyryk M., Konup A. Bacterial tumor of grapevine and prospects for its biological control. *Plant and Soil Science*. 2024. Vol. 15, No. 4. P. 54–67. <https://doi.org/10.31548/plant3.2024.54>

131. Koruza B., Jelaska S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refošk). *Vitis*. 1993.

Vol. 22. P. 59–60.

132. Kovaleva I. A, Janse L. A., Konup L, A., Zelenyanskaya N. N., Vlasov V. V, Konup A. I, Muljukina N. A, Kyryk N. N, Pikovskyi M. Y. Detection of the infection of the Cabernet Sauvignon variety of clone origin by grape viruses. *Cytology and Genetics*. 2022. Vol. 56, P. 504–512.

<https://doi.org/10.3103/S0095452722060044>

133. Křížan B., Ondrušiková E., Holleinová V., Moravcová K., Bláhová L. Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by *in vivo* and *in vitro* thermotherapy. *Hort. Sci. (PRAGUE)*. 2009. Vol. 36, No. 3. P. 105–108. DOI: 10.17221/37/2008-HORTSCI

134. Kumar S. Baranwal V. K. Singh P. Jain R. K. Sawant S. Singh S. K. Characterization of a Grapevine leafroll-associated virus 3 from India showing incongruence in its phylogeny. *Virus Genes*. 2012. Vol. 45. P. 195–200

135. Kuzmanović N. Biondi E. Overmann J. Puławska J. Verbarq S. Smalla K. Lassalle F. Genomic analysis provides novel insights into diversification and taxonomy of *Allorhizobium vitis* (i.e., *Agrobacterium vitis*). *BMC Genomics* 2022. Vol. 23. P. 462. DOI: 10.1186/s12864-022-08662-x.

136. Kuzmanović N. Puławska J. Hao L. Burr T. J. The ecology of *Agrobacterium vitis* and management of crown gall disease in vineyards. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2018. Vol. 418. P. 15–53. DOI: 10.1007/82_2018_85. PMID: 29556824.

137. Lee H., Kim M. S., Lim H.-S., Park E., Lee W.-H., Cho B.-K. Detection of cucumber green mottle mosaic virus-infected watermelon seeds using a near-infrared (NIR) hyperspectral imaging system: Application to seeds of the “Sambok Honey” cultivar. *Biosyst. Eng.* 2016. Vol. 148. P. 138–147.

138. Lozoya-Saldana H., Dawson W. O. Effect of alternating temperature regimes on reduction or elimination of viruses in plant tissues. *Phytopathology*. 1982. Vol. 72, No. 8. P. 1059–1064.

139. Luvisi A., Panattoni A., Triolo E. Thiopurine prodrugs for plant

- chemotherapy purposes. *Journal of Phytopathology*, Berlin. 2011. Vol. 159, No. 5. P. 390–392. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01779.x>
140. Lu Y., Hu X., Chen J. Grapevine virus elimination by meristem culture and antiviral agents. *Vitis*. 2013. Vol. 52. P. 67–73.
141. MacDonald S. L. Staid M. Staid M. Cooper M. L. Remote hyperspectral imaging of Grapevine leafroll-associated virus 3 in Cabernet Sauvignon vineyards. *Comput. Electron. Agric.* 2016. Vol. 130. P. 109–117.
142. Maliogka V. I., Skiada F. G., Eleftheriou E. P., Katis N. I. Elimination of a new ampelovirus (*GLRaV-Pr*) and Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (*GRSPaV*) from two *Vitis vinifera* cultivars combining *in vitro* thermotherapy with shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*. 2009. Vol. 123, No. 2. P. 280–282. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.08.016.
143. Maliogka V. I., Olmos A., Pappi P. G., Lotos L., Efthimiou K., Grammatikaki G., Candresse T., Katis N. I., Avgelis A. D. A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Research, Amsterdam*. 2015b. Vol. 203. P. 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.003>
144. Maree H. J., Almeida R. P., Bester R., Chooi K. M., Cohen D., Dolja V. V., Fuchs M. F., Golino D. A., Jooste A. E., Martelli G. P., et al. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Front. Microbiol.* 2013. Vol. 4. P. 82.
145. Martelli G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, Bari. 2014. Vol. 96, No.1. P. 1–136.
146. Martelli G. P. Grapevine virology: An overview. *J. Plant Pathol.* 2014. Vol. 96. P. 7–19.
147. Martelli G. P., Agranovsky A. A., Al Rwahnih M., Dolja V. V., Dovas C. I., Fuchs M., et al. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *J. Plant Pathol.* 2012. Vol. 94. P. 7–19.

148. Martelli G. P., Boscia D., Choueiri E., Digiario M., Castellano M. A., Savino V. Occurrence of filamentous viruses and rugose wood of grapevine in Yemen. *Phytopathol. Mediterr.* 1994. Vol. 33. P. 146–151.
149. Martelli G. P., Quacquarelli A. Virus-free grapevine certification programs. *Vitis*. 2007. Vol. 46. P. 125–131.
150. Matsuura Y., Koganezawa H., Kubota K. Grapevine virus-free plant production using *in vitro* culture techniques. *Plant Biotechnol.* 2011. Vol. 28. P. 501–508.
151. Maul E. Töpfer R. *Vitis. International variety catalogue (VIVC)*. 2023. www.vivc.de (дата звернення 12.01.2026)
152. Medzihradzky A., Gyula P., Sós-Hegedűs A., Szittyá G., Burgyán J. Transcriptome reprogramming in the shoot apical meristem of CymRSV-infected *Nicotiana benthamiana* plants associates with viral exclusion and the lack of recovery. *Molecular Plant Pathology*. 2019 (12). P. 1748–1758. <https://doi.org/10.1111/mpp.12875>
153. Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.F., Decroocq S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. *Molecular Breeding*. 2005. Vol. 15(4). P. 349–366. doi:10.1007/s11032-004-7651-0.
154. Migliaro D., Saldarelli P., Bosco D. Thermotherapy and meristem culture for grapevine virus elimination. *Vitis*. 2012. Vol. 51. P. 125–132.
155. Miljanić V., Rusjan D., Škvarč A., Chatelet P., Štajner N. Elimination of eight viruses and two viroids from preclonal candidates of six grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) through *in vivo* thermotherapy and *in vitro* meristem tip micrografting. *Plants*. 2022. Vol. 11. P. 1064. <https://doi.org/10.3390/plants11081064>
156. Milkus B. N. Konup L. O. Zhunko I. D. Limanska N. V. Testing of some grape varieties for the presence of the causative agent of crown gall and viruses of short knot and leaf curl. *Journal of Microbiology* 2005. Vol. 67. P. 41–48.

157. Milkus B. N. Limanska N. V. Zhunko I. D. Konup L. O. Viral, bacterial and phytoplasma diseases of grapes. Odesa, 2012. 296 P.
158. Mishchenko L. T., Konup L. O., Dunich A. A., Gorobets V. F., Konup A. I., Zaimenko N. V., Kozub N. O., Dashchenko A. V., Chistyakova V. L., Shcherbakova T. O., Sovinska R. S. First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2022. P. 189–198. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00665-w>
159. Mishchenko L. T., Konup L. O., Dunich A. A., Gorobets V. F., Konup A. I., Zaimenko N. V., Kozub N. O., Dashchenko A. V., Chistyakova V. L., Shcherbakova T. O., Sovinska R. S. First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2023. Vol. 130. P. 189–198.
160. Mishra P., Asaari M. S. M., Herrero-Langreo A., Lohumi S., Diezma B., Scheunders P. Close range hyperspectral imaging of plants: A review. *Biosyst. Eng.* 2017. Vol. 164. P. 49–67.
161. Mori K., Hosokawa D. Localization of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture. *Acta Hortic.* 1977. Vol. 78. P. 389–396.
162. Mostafa F. M. A., Shaaban M. M., Elazab D. S., Kamel M. T. *In vitro* propagation of four grape cultivars. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*. 2015. Vol. 46, No. 4. P. 65–76. URL: http://www.aun.edu.eg/faculty_agriculture/arabic (дата звернення: 21.12.2025).
163. Mousavi S. A. Österman J. Wahlberg N. Nesme X. Lavire C. Vial L. Paulin L. de Lajudie P. Lindström K. Phylogeny of the *Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 2014. Vol. 37. P. 208–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>
164. Mousavi S. A. Willems A. Nesme X. de Lajudie P. Lindström K. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen.

- nov., and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiology* 2015. Vol. 8. P. 84–90. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.12.003
165. Muljukina N., Kovalova I., Konup L., Lyashenko G., Zelenianska N., Tarasco E., Nenartovych A. Control of grapevine virus diseases in collections and at the stages of propagation in Ukraine. *IVES Conference Series, 46th World Congress of Vine and Wine*. 2025. P. 1–4. DOI: 10.58233/Xq3H1QyO.
166. Naidu R. A., Maree H. J., Burger J. T. Grapevine leafroll disease and associated viruses: A unique pathosystem. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2015. Vol. 53. P. 613–634.
167. Naidu R. A., O’Neil S., Walsh D. Grapevine Leafroll Disease. *WSU Extension Bulletin* EB2027E. 2008. 20 p. Available at: <http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf> (дата звернення 12.01.2026)
168. Naidu R. A. Perry E. M. Pierce F. J. Mekuria T. The potential of spectral reflectance technique for the detection of Grapevine leafroll-associated virus-3 in two red-berried wine grape cultivars. *Comput. Electron. Agric.* 2009. Vol. 66. P. 38–45.
169. Naidu R. A., Rowhani A., Fuchs M. F., Golino D. A., Martelli G. P. Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*. 2014. Vol. 98. P. 1172–1195. DOI: 10.1094/PDIS-02-14-0207-FE.
170. Nguyen L.-T., Schmidt H. A., von Haeseler A., Minh B. Q. *IQ-TREE*: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 2015. Vol. 32, No. 1. P. 268–274. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
171. Osman F. Rowhani A. Application of a spot sampling sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan®). *J. Virol. Methods*. 2006. Vol. 133. P. 130–136.
172. OEPP/EPPO. Certification scheme No. PM 4/8 (2): Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. *EPPO Bulletin*. 2008. Vol. 38. P. 422–429.

173. Ophel K. Kerr A. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1990. Vol. 40. P. 236–241. DOI: 10.1099/00207713-40-3-236.
174. Panattoni A., D'Anna F., Cristani C., Triolo E. Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *Journal of Virological Methods*. 2007. Vol. 146, Issues 1–2. P. 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.008>
175. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. Selective chemotherapy on Grapevine leafroll-associated virus-1 and -3. *Phytoparasitica*. 2011. Vol. 39. P. 503–508.
176. Panattoni A., Triolo E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. *Scientia Horticulturae*. 2010. Vol. 125, Issue 1. P. 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.001>
177. Paprštein F., Sedlák J., Svobodová L., Polák J., Gadiou S. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance – short communication. *Hort. Sci. (Prague)*. 2013. Vol. 40, No. 4. P. 186–190. <https://DOI: 10.17221/37/2013-HORTSCI>
178. Pathirana R. McKenzie M. J. A modified green grafting technique for large-scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Hort.* 2005. Vol. 107. P. 97–102.
179. Pereira L. Gomes S. Barrias S. Fernandes J. R. Martins-Lopes P. Applying high-resolution melting (HRM) technology to olive oil and wine authenticity. *Food Research International*. 2018. Vol. 103. P. 170–181. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.026
180. Pietersen G. Walsh H. Development of a LAMP technique for control of Grapevine leafroll-associated virus type 3 (GLRaV-3) in infected white cultivar vines by rouging, in *Proceedings of the 17th Congress of ICVG, 7–14 October*. (Davis: Foundation Plant Services), 2012. P. 50–51.
181. Pio Ribeiro G., Saldarelli P., Hong N., Xiang B.C.H., Zhang X.L., Wang G.P., et al. First record of three grapevine viruses in the Chinese province of Sinkiang. *J. Plant Pathol.* 2004. Vol. 86. P. 264.

182. Polder G., Van der Heijden G. W. A. M., Van Doorn J., Baltissen T. A. H. M. C. Automatic detection of tulip breaking virus (TBV) in tulip fields using machine vision. *Biosyst. Eng.* 2014. Vol. 117. P. 35–42.
183. Polder G., Blok P. M., De Villiers H., Van der Wolf J. M., Kamp J. Potato virus Y detection in seed potatoes using deep learning on hyperspectral images. *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10. P. 209.
184. Polder G., Van der Heijden G. W. A. M., Van Doorn J., Baltissen T. A. H. M. C. Automatic detection of tulip breaking virus (TBV) in tulip fields using machine vision. *Biosyst. Eng.* 2014. Vol. 117. P. 35–42.
185. Rosciglione B. Gugerli P. Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevines by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret, in *Proceedings of the 9th Congress of ICVG, 6–11 September* (Kyri at Anavim: Volcani Institute of Agricultural Research), 1987. P. 67–69.
186. Rosciglione B., Gugerli P. Maladies de l'enroulement et du bois strié de la vigne: analyse microscopique et sérologique. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 1986. Vol. 18. P. 207–211.
187. Rowhani A. Golino D. A. ELISA test reveals new information about leafroll disease. *Cal. Agri.* 1995. Vol. 49. P. 26–29.
188. Rowhani A., Osman F., Daubert S., Al Rwahnih M., Saldarelli P. Polymerase chain reaction methods for the detection of grapevine viruses and viroids. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham, Switzerland. 2017. P. 431–450.
189. Rowhani A. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. *Proceedings of the XIII International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine*. Adelaide, 2000. P. 82.
190. Rowhani A. Uyemoto J. K. Golino D. Martelli G. P. Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. Vol. 43. P. 261–278.
191. Sabbadini S., Capriotti L., Limera C., Navacchi O., Tempesta G., Mezzetti

- B. A plant regeneration platform to apply new breeding techniques for improving disease resistance in grapevine rootstocks and cultivars. *BIO Web of Conferences*. 2019. Vol. 12. Art. 01019. 41st World Congress of Vine and Wine. URL: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191201019>
192. Savino V., Boscia D., D'Onghia A. M., Martelli G. P. Effect of heat therapy and meristem tip culture on the elimination of grapevine leafroll-associated closterovirus type III. In: Proceedings of the 10th Meeting of ICVG. Volos: ORES Publishing; 1991. P. 433–436.
193. Sawada H. Ieki H. Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmid from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61(2). P. 828–831.
194. Sayers E. W., Bolton E. E., Brister J. R., Canese K., Chan J. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. 2022. Vol. 50 (D1). P. D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
195. Schaad N. W. Frederick R. D. Shaw J. Schneider W. L. Hickson R. Petrillo M. D. *et al.* Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. Vol. 41. P. 305–324.
196. Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M. A., Beyvers S., Blom J., Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*. 2021. Vol. 7. Article 000685. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
197. Sedlák J., Paprštein F., Suchá J. Influence of chemotherapy on development and production of virus free *in vitro* strawberry plants. *Horticultural Science (Prague)*. 2019. Vol. 46, No. 2. P. 53–56. <https://doi.org/10.17221/249/2017-HORTSCI>
198. Sefc K., Regner F., Turetschek E., Glössl J., Steinkellner H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species. *Genome*. 1999. Vol. 42(3). P. 367–373. doi:10.1139/gen-42-3-367.

199. Skiada F. G., Grigoriadou K., Maliogka V. I., Katis N. I., Eleftheriou E. Elimination of Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 and Grapevine Rupestris Stem Pitting-Associated Virus from Grapevine cv. Agiorgitiko, and a Micropropagation Protocol for Mass Production of Virus-Free Plantlets. *Journal of Plant Pathology*. 2009. Vol. 91, No. 1. P. 177–184.
200. Smith E. F. Townsend C. O. A plant tumour of bacterial origin. *Science*. 1907. Vol. 25. P. 671–673.
201. Staudt G., Kassemeyer H. H. Elimination of grapevine leafroll associated virus type I in *Vitis vinifera* cv. Lemberger. *Vitis*. 1994. Vol. 33. P. 179–180.
202. Spitzer T., Maiss E. Elimination of grapevine viruses by meristem culture. *Vitis*. 2005. Vol. 44. P. 157–162.
203. Subramoni S., Nathoo N., Klimov E., Yuan Z.-C. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front. Plant Sci*. 2014. Vol. 5. P. 322.
204. Sudarshana M. R., Perry K. L., Fuchs M. F. Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology*. 2015. Vol. 105. P. 1026–1032. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0369-FI>
205. Szegedi E Bottka S Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis* 2002. Vol. 41. P. 37–42.
206. Tereshchenko A., Fedorenko V., Smyntyna V., Konup I., Erikssone M., Konup A., Yakimova R., Ramanavicius A., Balmeb S., Bechelany M. ZnO films formed by atomic layer deposition as an optical biosensor platform for the detection of Grapevine virus A-type proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017. Vol. 92. P. 763–769.
207. This P., Jung A., Borrego J., Botta R., Constantini L., Crespan M., Dangl G. S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith C. P., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification

- of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004. Vol. 109. P. 1448–1458.
208. Thomas M. R., Scott N. S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*. 1993. Vol. 86(8). P. 985–990. doi:10.1007/BF00211051.
209. Tsai C. W., Rowhani A., Golino D. A., Daane K. M., Almeida R. P. P. Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology*. 2010. Vol. 100. P. 830–834.
210. Verma N., Ram R., Zaidi A. A. *In vitro* production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*. 2005. Vol. 103, Iss. 2. P. 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.05.005>
211. Villano C. Aiese Cigliano R. Esposito S. D'Amelia V. Iovene M. Carputo D. Aversano R. DNA-based technologies for grapevine biodiversity exploitation: state of the art and future perspectives. *Agronomy* 2022. Vol. 12(2). P. 1–16. DOI: 10.3390/agronomy12020491
212. Voegel T. M. Nelson L. M. Quantification of *Agrobacterium vitis* from grapevine nursery stock and vineyard soil using droplet digital PCR. *Plant Disease*. 2018. Vol. 102. P. 2136–2141. DOI: 10.1094/PDIS-02-18-0342-RE.
213. Walter B. Bass P. Legin R. Martin C. Vernoy R. Collas A. *et al.* The use of a green-grafting technique for the detection of virus-like diseases of the grapevine. *J. Phytopathol.* 2008. Vol. 128. P. 137–145.
214. Wang A., Li Z., Li Y. Virus free grapevine production by *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2011. Vol. 104. P. 317–324.
215. Wang M. R., Cui Z. H., Li J. W., Hao X. Y., Zhao L., Wang Q. C. *In vitro* thermotherapy based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*. 2018. Vol. 14. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
216. Wang Q., Cuellar W. J., Rajamaki M. L., Hirata Y., Valkonen J. P. T. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation

- of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology, Malden*. 2008. Vol. 9, No. 2. P. 237–250. <https://doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>
217. Ward E. Foster S. J. Fraaije B. A. McCartney H. A. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol.* 2004. Vol. 145. P. 1–16.
218. Weber E., Golino D.A., Rowhani A. Laboratory testing for grapevine virus diseases. *Pract. Wine. Vineyard*. 2002. Vol. 22. P. 13–26.
219. Weber E., Golino D.A., Rowhani A. Leafroll disease of grapevines. *Pract. Wine Vineyard*. 1993. Vol. 14. P. 21–24.
220. Weisberg A. J. Davis E. W. II. Tabima J. Belcher M. S. Miller M. Kuo C.-H. Loper J. Grünwald N. J. Putnam M. L. Chang J. H. Unexpected conservation and global transmission of agrobacterial virulence plasmids. *Science*. 2020. Vol. 368(6495). P. eaba5256. <https://doi.org/10.1126/science.aba5256>. PMID: 32499412.
221. Wick R. R., Schultz M. B., Zobel J., Holt K. E. Bandage: interactive visualization of *de novo* genome assemblies. *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31(20). P. 3350–3352. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>
222. Yağci A. Gozener C. E. Effects of crown gall (*Agrobacterium vitis*) on development, yield, quality and ripening of grapevines (*Vitis vinifera*). *Fresenius Environmental Bulletin* 2018. Vol. 27. P. 5933–5939. <https://www.researchgate.net/publication/328529513>
223. Youssef A., Soliman A., ElSherif A. Meristem culture for virus elimination in grapevine. *Vitis*. 2008. Vol. 47. P. 125–132.
224. Youssef S. A., Al-Dhaher M. M. A., Shalaby A. A. Elimination of Grapevine fanleaf virus (GFLV) and Grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. *International Journal of Virology*. 2009. Vol. 5, No 2. P. 89–99.
225. Yu G., Smith D. K., Zhu H., Guan Y., Lam T. T.-Y. GGTREE: an R

package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 8, No. 1. P. 28–36. DOI: 10.1111/2041-210X.12628.

226. Zelenianska N., Riabiy M. Determination of the regeneration potential of grape apical meristems *in vitro*. *International Conference on Science, Innovations and Global Solutions* (Poland, July 31, 2024). Poland, 2024. P. 310–313.

227. Zhang Y. M., Chang F. T., Sui X. H., Chen W. F., Chen W. X. Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, No 9. P. e44936. DOI: 10.1371/journal.pone.0044936.

228. Zhang Y., Xu L., Chen Z. Grapevine virus elimination using shoot tip culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2012. Vol. 110. P. 271–278.

229. Zimmermann D., Bass P., Legin R., Walter B. Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease of grapevines. *J. Phytopathol.* 1990. Vol. 130. P. 205–218.

ДОДАТКИ

Додаток А. 1

Затверджую

Директор ДП «ДГ «Таїровське»
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»
НААН України Ощипок О. С.

«30» «жовтня» 2025 року



АКТ

впровадження результатів науково-дослідної роботи у виробництво

1. Назва розробки. Застосування біотехнологічних методів для оздоровлення садивного матеріалу винограду категорії «вихідні» для закладки мікрматочника прищепних лоз в ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України (за результатами дисертаційної роботи аспіранта лабораторії вірусології і мікробіології ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» – Рябого Миколи Ігоровича «Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення та розмноження садивного матеріалу винограду»).
2. Назва наукової установи, яка виконувала розробку. Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України.
3. Шифр роботи та назва програми, згідно яких виконано впровадження. «Дослідження масштабів ураженості виноградних насаджень Півдня України вірусними, фітоплазмовими і бактеріальними хворобами винограду, діагностика та створення системи оздоровлення від них при виробництві сертифікованого посадкового матеріалу» (номер державної реєстрації 0121U107838).
3. Назва підприємства та об'єкту, на якому виконано впровадження. Державне підприємство «Дослідне господарство «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», НААН України, Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України (лабораторія вірусології і мікробіології та культури винограду *in vitro*).
4. Дата впровадження. Вересень 2023 року – жовтень 2025 року.
5. Короткий опис та умови впровадження, його новизна. Згідно з ДСТУ 4390:2005 «Саджанці винограду та чубуки виноградної лози. Технічні умови», садивний матеріал винограду поділяють на три категорії: «вихідний», «базовий» і «сертифікований», які визначаються технологічною послідовністю етапів розмноження. У санітарному відношенні матеріал повинен мати клонове походження, бути вільним від латентного ураження вірусами коротковозля, мозаїки резухи, першим та третім серотипами вірусу скручування листя винограду, вірусом мармуровості, а також вірусами А і В винограду.

Контролюватися на латентне ураження збудником бактеріального раку винограду (*Agrobacterium tumefaciens*). Підтримання належного санітарного статусу виноградної лози забезпечується застосуванням біотехнологічних методів оздоровлення, таких як термотерапія, хіміотерапія та культура апікальних меристем.

У ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України наразі закладено базовий маточник площею 3,4 га, який включає клони підщепних і прищепних сортів винограду. Згідно з програмою розвитку виноградного розсадництва, у господарстві передбачено закладання мікроматочника підщепних і прищепних лоз із використанням клонів цінних і перспективних сортів категорії «вихідний». Для цього перевага надається садивному матеріалу, отриманому за допомогою культури тканин і органів *in vitro*.

У рамках виконання дисертаційної роботи Рябого М. І. було розроблено методи оздоровлення винограду *in vitro*. На їх основі нашим завданням було оздоровити і виростити стандартні саджанці технічного сорту винограду «Одеський чорний», передати їх у дослідне господарство для закладання мікроматочника.

У 2023 році в культуру тканин і органів *in vitro* були введені ініціальні експланти винограду сорту «Одеський чорний», уражені хворобою скручування листя винограду третього серотипу. Наявність збудника була підтверджена лабораторно за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).

Оздоровлення ініціальних експлантів та мікроклонів винограду здійснювали трьома методами: через культуру апікальних меристем, термотерапію та хіміотерапію.

Процес введення експлантів у культуру *in vitro*, їх послідовне пасажування, укорінення та оздоровлення тривав протягом 2023–2025 років.

Метод апікальних меристем. Ініціальні експланти винограду довжиною 0,8–1,0 см стерилізували та вводили в культуру тканин і органів *in vitro* на стандартне поживне середовище МС. Для отримання необхідної кількості мікроклональних рослин експланти субкультивували декілька циклів. Після цього їх пересаджували на поживне середовище другого етапу культивування, призначене для власне мікророзмноження та укорінення, яке містило 0,1 мг/л 6-БАП та 0,3 мг/л ІОК. Після досягнення мікроклонами висоти 6–8 см з верхівкових сегментів виділяли апікальні меристеми 0,5–0,7 мм та висаджували їх на поживне середовище МС 2 для подальшої регенерації. Через 6 місяців культивування мікроклонів в умовах культурального боксу проводили повторне тестування ІФА на наявність вірусу скручування листя винограду-3. Оцінку ступеня оздоровлення проводили за коефіцієнтом елімінації вірусу (Табл. 1). Таким способом було оздоровлено і вирощено 45 шт. стандартних саджанців винограду, які були передані в дослідне господарство для закладання мікроматочника.

Продовження додатку А.1

Таблиця 1

Коефіцієнт елімінації вірусу скручування листя-3 після оздоровлення мікроклонів винограду методом апікальних меристем

Поживне середовище/розмір апікальних меристем, мм	КЕ, %
МС 2+АМ 0,2-0,4 мм	72,5
МС 2+АМ 0,5-0,7 мм	68,2
МС 2+АМ 0,8-1,0 мм	51,4
МС (стандарт)+АМ 0,2-0,4 мм	70,7
МС (стандарт)+АМ 0,5-0,7 мм	68,0
МС (стандарт)+АМ 0,8-1,0 мм	50,3

Метод термотерапії. Після досягнення мікроклонами висоти 6-8 см їх піддавали впливу високої температури. Термотерапію ініціальних експлантів, мікроклонів винограду проводили у термокамері протягом 8 тижнів за температури 37 °С. Фізичні параметри проведення термотерапії: 16-годинний фотоперіод, холодне біле флуоресцентне світло (2-3 тис. лк.). Після зняття температурного стресу у рослин виділяли апікальні меристеми, розміром 0,5-0,7 мм і переносили на поживне середовище МС 2 для подальшого культивування. Через 6 місяців культивування мікроклонів в умовах культурального боксу проводили повторне тестування ІФА на наявність вірусу скручування листя винограду-3. Оцінку ступеня оздоровлення винограду проводили за коефіцієнтом елімінації вірусу (Табл. 2). Таким способом було оздоровлено і вирощено 51 шт. стандартних саджанців винограду, які були передані в дослідне господарство для закладання мікроматочника.

Таблиця 2

Коефіцієнт елімінації вірусу скручування листя-3 після оздоровлення мікроклонів винограду методом термотерапії

Варіанти досліджу	Коефіцієнт елімінації, %
Термотерапія мікроклональних рослин + подальше виділення і культивування апікальних меристем	86,0
Культивування мікроклональних рослин без термотерапії + подальше виділення і культивування апікальних меристем	62,0

Метод хіміотерапії. Мікроклони винограду, які досягали висоти 8-10 см живцювали на одновічкові мікрочубуки і висаджували на стандартне поживне середовище МС з віруцидними препаратами. Використовували наступні препарати: комплекс рибавірин + озельтамівір у кількості (20 мг/л + 30 мг/л). Хіміотерапію поєднували з культивуванням апікальних меристем. Після

Продовження додатку А.1

хіміотерапії у рослин виділяли апікальні меристеми, розмірами 0,5-0,7 мм і переносили їх на поживне середовище МС 2 для подальшої регенерації, культивування. Через 6 місяців культивування мікроклонів в умовах культурального боксу проводили повторне тестування ІФА на наявність вірусу скручування листя винограду-3. Оцінку ступеня оздоровлення винограду проводили за коефіцієнтом елімінації вірусу (Табл. 3). Таким способом було оздоровлено і вирощено 25 шт. стандартних мікроклональних саджанців винограду, які були передані в дослідне господарство для закладання мікроточника.

Таблиця 3

Коефіцієнт елімінації вірусу скручування листя-3 після оздоровлення мікроклонів винограду методом термотерапії

Варіанти	90 день проведення хіміотерапії	через 180 днів після завершення хіміотерапії
Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 30 мг/л	90,5	90
Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 40 мг/л	92	92

6. Основні техніко-економічні показники (результати) впровадженної розробки. При розрахунку техніко-економічних показників враховували кількість оздоровлених рослин, отриманих у результаті застосування певного способу оздоровлення, а також прямі витрати на процес лабораторної ідентифікації збудника хвороби скручування листя винограду (дворазове визначення) та оздоровлення мікроклонів *in vitro* (Табл. 4).

Таблиця 4

Основні показники економічної ефективності оздоровлення винограду *in vitro*

Економічні показники	АМ	ТТ+АМ	ХТ (Рибавірин 20 мг/л+Озельтамівір 30 мг/л)	ХТ (Рибавірин 20 мг/л+Озельтамівір 30 мг/л)+АМ	ХТ (Рибавірин 20 мг/л+Озельтамівір 40 мг/л)	ХТ (Рибавірин 20 мг/л+Озельтамівір 40 мг/л)+АМ
Кількість ініціальних експлантів для оздоровлення, шт.	30	30	30	30	30	30

Продовження додатку А.1

Кількість оздоровлених мікроклонів, шт.	21,9	25,5	27,0	29,4	27,6	30,0
Рівень елімінації, %	73,0	85,0	90,0	98,0	92,0	100,0
Собівартість оздоровленого мікроклону, грн.	265,2	226,9	214,3	196,8	210,2	193,4
Ціна реалізації адаптованого мікроклону, грн.	360,0	360,0	360,0	360,0	360,0	360,0
Прибуток, грн.	2076,0	3392,0	3932,0	4796,0	4133,0	4997,0
Рівень рентабельності, %	35,7	58,6	67,9	82,8	71,2	86,1

Отримані результати свідчать, що оздоровлення ініціальних експлантів із використанням термотерапії, хіміотерапії та їх поєднання з культивуванням апікальних меристем забезпечувало рівень рентабельності 58,6–86,1 %, що характеризує процес як стабільний та інвестиційно привабливий. Застосування виключно культивування апікальних меристем давало рентабельність 35,7 %, що вказує на підвищені економічні ризики.

Комісія у складі: головного агронома ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН - Лобаня Б. В., співробітників ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН: зав. відділом розсадництва, розмноження і біотехнології винограду, д.с.-г.н. – Зеленянської Н. М., зав. лабораторії вірусології і мікробіології, д.с.-г.н. – Конуп Л.О., зав. лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження і біотехнології винограду, к.с.-г.н. – Гоголінської О. І., зав. лабораторії фізіології винограду відділу розсадництва, розмноження і біотехнології винограду, к.с.-г.н. – Боруна В. В., лаборанта лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження і біотехнології винограду – Бойко О. М., аспіранта лабораторії вірусології і мікробіології – Рябого М. І. підтверджує, що ініціальні експланти, мікроклони винограду технічного сорту «Одеський чорний» були оздоровлені *in vitro* від вірусу скручування листя винограду-3, вирощені у шкільці відкритого ґрунту і в кількості 121 шт. передані в дослідне господарство для закладки мікроматочника.

Головний агроном ДП «ДГ «Таїровське»
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України

 Лобань Б. В.

Зав. відділом розсадництва, розмноження і біотехнології винограду
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України

 Зеленянська Н. М.

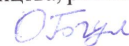
Продовження додатку А.1

Зав. лабораторії вірусології і мікробіології
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України



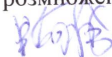
Конуп Л. О.

Зав. лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження і біотехнології
винограду ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України



Гогулінська О. І.

Зав. лабораторії фізіології винограду відділу розсадництва, розмноження і біотехнології
винограду ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України



Борун В. В.

Лаборант лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження і
біотехнології винограду ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України



Бойко О. М.

Аспірант лабораторії вірусології і мікробіології
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України



Рябий М. І.

Додаток А. 2

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
“ІНСТИТУТ ВІНОГРАДАРСТВА І
ВИНОРОБСТВА ІМЕНІ В.Є. ТАЇРОВА”



NATIONAL ACADEMY
OF AGRARIAN SCIENCES OF UKRAINE
NATIONAL SCIENTIFIC CENTRE
“V. YE. TAIROV INSTITUTE
OF VITICULTURE AND WINEMAKING”

Вул. Перемоги, 27
с-ще Таїрове, Одеський р-н, Одеська обл.,
65496, Україна
Тел./факс: +380 (48) 740 36 76
Електронна пошта: iviv_nnc@ukr.net
iviv@te.net.ua



Peremohy str., 27,
Tairove settlement, Odesa district,
Odesa region, 65496, Ukraine
Tel./fax: +380 (48) 740 36 76
E-mail: iviv_nnc@ukr.net
iviv@te.net.ua

14.01 2026 р. № 1

ДОВІДКА

про впровадження результатів наукових досліджень
Рябого Миколи Ігоровича

Даним підтверджуємо, що результати наукових досліджень здобувача III освітньо-наукового ступеня доктора філософії Миколи Рябого, отримані під час підготовки дисертаційної роботи доктора філософії з питань ідентифікації збудників вірусних і бактеріальних хвороб винограду та розробки сучасної системи оздоровлення винограду *in vitro* в процесі виробництва садивного матеріалу біологічних категорій якості – пройшли апробацію та використовуються в освітньому процесі при підготовці аспірантів, що навчаються за ОНП «Виноградарство» в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова».

Теоретичні положення дисертаційної роботи «Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення садивного матеріалу винограду» увійшли до змісту вибіркового навчального дисциплін: «Біотехнологія», «Фітоентомологічний комплекс винограду» та використовуються впродовж 2025 – 2026 навчального року.

Довідка видана для представлення у спеціалізовану вчену раду за місцем захисту дисертаційної роботи доктора філософії.

Директор

Заступник директора
з наукової роботи

Ірина ІЩЕНКО, 0676016671



Ірина КОВАЛЬОВА

Ніна МУЛЮКІНА

Додаток Б

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Конуп Л., Pikovskiy M., **Riabyi M.**, Kyryk M., Konup A. Bacterial tumor of grapevine and prospects for its biological control. *Plant and Soil Science*. 2024. Vol. 15., No. 4. P. 54–67. <https://doi.org/10.31548/plant3.2024.54>
2. Зеленьянська Н. М., **Рябий М. І.** Застосування методу апікальних меристем для розмноження винограду *in vitro*. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. 2024. № 2. С. 55–61. <https://doi.org/10.32782/2310-0478-2024-2-55-61>
3. Конуп Л. О., **Рябий М. І.**, Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., Чистякова В. Л., Буек А. О., Кирик М. М., Власов В. В. Коротковузля виноградної лози на виноградниках Одеської області: діагностика та перспективи оздоровлення методом термічної обробки. *Карантин і захист рослин*. 2025. № 1. С. 14–19. DOI: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2025.1.14-19>
4. Зеленьянська Н. М., **Рябий М. І.** Оздоровлення винограду у культурі тканин і органів *in vitro*. *Аграрні інновації*. 2025. №. 33. С. 121–129. DOI <https://doi.org/10.32848/agrar.innov.2025.33.20>
5. Зеленьянська Н. М., **Рябий М. І.** Практичні аспекти оздоровлення винограду в культурі *in vitro*. *Таврійський науковий вісник*. 2025. Вип. 146. Частина 1. С. 114–126. DOI <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2025.146.1.13>

Статті у зарубіжних періодичних наукових виданнях:

1. Зеленьянська Н. М., **Рябий М. І.** Хіміотерапія винограду *in vitro*. *The scientific heritage* (Budapest, Hungary). 2025. No. 175. P. 3–9. DOI: 10.5281/zenodo.18077199

Публікації, у яких засвідчено апробацію матеріалів дисертації:

1. Konup L., Vlasov V., Konup A., Chistyakova V., Nikolaeva N., **Riabyi M.**, Kyryk M., Pikovskyi M. Detection and identification of grapevine leafroll associated virus 1, 3, 4 (strain 9) isolates in south of Ukraine. *Proceedings of the 20th Congress of the International Council for the Study of Virus & Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG) : materials of the international conference (Thessaloniki, September 25–29, 2023)*. Thessaloniki, 2023. P. 159–160.
2. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Особливості культивування апікальних меристем винограду у культурі тканин і органів *in vitro*. *Perspectives of contemporary science: theory and practice : Proceedings of VI International Scientific and Practical Conference (Lviv, July 22–24, 2024)*. Львів, 2024. С. 13–18.
3. Zelenianska N., **Riabyi M.** Determination of the regeneration potential of grape apical meristems *in vitro*. *International Conference on Science, Innovations and Global Solutions (Poland, July 31, 2024)*. Poland, 2024. P. 310–313.
4. **Рябий М. І.** Ідентифікація збудників вірусних і бактеріальних хвороб винограду. *Perspectives of contemporary science: theory and practice : матеріали 12-ї міжнар. наук.-практ. конф. (м. Львів, 13–15 січня 2025 р.)*. Львів, 2025. С. 36–41.
5. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Статистичне обґрунтування окремих показників культивування апікальних меристем винограду. *Latest research in the development of science and education : матеріали XXVI International scientific and practical conference (June 30–July 02, 2025)*. Prague, Czech Republic, 2025. P. 7–11.
6. Конуп Л. О., **Рябий М. І.** Методи діагностики вірусу скручування листя винограду – “*GRAPEVINE LEAF ROLL-ASSOCIATED*” і оздоровлення виноградної лози від цього збудника. Тези доповідей *XVI з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (м. Київ, 2–6 червня 2025 р.)*. Київ, 2025. С. 282.
7. **Рябий М. І.**, Зеленянська Н. М. Метод термотерапії для оздоровлення

винограду від збудника хвороби скручування листя-3. *Innovation and modern technologies for the development of science* : Abstracts of II International Scientific and Practical Conference (Prague, January 12–14, 2026). Prague, Czech Republic, 2026. P. 11–16.

8. Зеленянська Н. М., **Рябий М. І.** Застосування методів культури тканин і органів *in vitro* для оздоровлення сільськогосподарських культур. *Новітні технології сучасного суспільства* : матеріали I науково-практичної конференції (м. Харків – м. Люблін, 21–23 січня 2026 року). Україна – Польща, 2026. С.43–45.

Статті, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Конуп Л. О., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., **Рябий М. І.** Фітоплазмова інфекція на виноградних рослинах сорту Шардоне і оздоровлення їх методом термотерапії. *Вісник виноградарства і виноробства*. 2023. Вип. 2. С. 58–63.