

УДК 634.8:578.832.1:581.143.6:57.085.2
DOI <https://doi.org/10.32782/2226-0099.2025.146.1.13>

ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ ОЗДОРОВЛЕННЯ ВИНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Зеленянська Н.М. – д.с.-г.н.,

старший науковий співробітник, заступник директора з науково-інноваційної діяльності,

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України
orcid.org/0000-0002-9303-8686

Рябий М.І. – аспірант,

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України
orcid.org/0009-0003-6608-135X

У статті досліджено ефективність поєднання методів хіміотерапії та культивування апікальних меристем для оздоровлення винограду технічного сорту «Одеський чорний» від вірусу скручування листя *GLRaV-3* у культурі *in vitro*. У результаті проведення візуальної селекції виноградних насаджень були виявлені куці з візуальними ознаками хвороби скручування листя. Методом імуноферментного аналізу (ІФА) підтверджено наявність *GLRaV-3*. Інфікований матеріал було введено в культуру *in vitro* на модифіковане поживне середовище MS. Для проведення хіміотерапії застосовували віруцидні препарати Рибавірин та Озельтамівір у різних концентраціях, їх вносили до поживного середовища протягом трьох пасажів (по 30 днів кожен). Після завершення хіміотерапії частину рослин переносили на свіжі поживні середовища для мікророзмноження та укорінення, а з частини – виділяли апікальні меристеми (0,5-0,7 мм) і переносили на поживне середовище MS 2 для подальшого культивування. Отримані результати показали, що життєздатність експлантів залежала від типу та концентрації віруцидних препаратів. Рибавірин у високих концентраціях проявляв фітотоксичність, уповільнював ріст пагонів та розвиток кореневої системи, Озельтамівір у концентраціях 30–40 мг/л мав мінімальний фітотоксичний вплив. Комбіноване застосування обох препаратів забезпечувало високу життєздатність ініціальних експлантів, стимулювало проліферацію бруньок та формування мікроклонів із оптимальними біометричними показниками. Використання апікальних меристем у поєднанні з хіміотерапією підвищувало ефективність елімінації вірусу: Рибавірин забезпечував 42,0–45,0 % санації, Озельтамівір – 88,0–95,0 %, а комбіноване застосування обох препаратів дозволяло досягнути практично повної елімінації вірусу – 98,0–100 %. Отже, поєднання хіміотерапії з культивуванням апікальних меристем є перспективним біотехнологічним прийомом отримання вільного від вірусу *GLRaV-3* садивного матеріалу винограду та запобігання поширенню вірусних інфекцій на виноградних насадженнях.

Ключові слова: садивний матеріал винограду, оздоровлення, ініціальні експланти, мікроклони, *GLRaV-3*, життєздатність, регенераційний потенціал, хіміотерапія, Рибавірин, Озельтамівір, апікальні меристеми.

Zelenianska N.M., Riabyi M.I. Practical Aspects of Grapevine Sanitation in In Vitro Culture

The article investigates the effectiveness of combining chemotherapy and apical meristem culture for the sanitation of grapevine plants of the technical cultivar Odeskyi Chornyi from Grapevine leafroll-associated virus 3 (*GLRaV-3*) under *in vitro* conditions. As a result of visual

selection of vineyard plantings, grapevine bushes exhibiting visible symptoms of leafroll disease were identified. The presence of GLRaV-3 was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Infected plant material was introduced into *in vitro* culture on a modified MS nutrient medium. For chemotherapy, the virucidal agents ribavirin and oseltamivir were applied at different concentrations and incorporated into the nutrient medium over three successive passages (30 days each). After completion of chemotherapy, part of the plants was transferred to fresh nutrient media for micropropagation and rooting, while from another part apical meristems (0.5–0.7 mm) were excised and transferred to MS 2 medium for further cultivation. The results obtained demonstrated that the viability of explants depended on the type and concentration of the virucidal agents used. Ribavirin at high concentrations exhibited phytotoxic effects, slowed shoot growth, and inhibited root system development, whereas oseltamivir at concentrations of 30–40 mg/L had minimal phytotoxic impact. The combined application of both agents ensured high viability of initial explants, stimulated bud proliferation, and promoted the formation of microclones with optimal biometric parameters. The use of apical meristem culture in combination with chemotherapy significantly increased the efficiency of virus elimination: ribavirin provided 42.0–45.0% sanitation, oseltamivir 88.0–95.0%, while the combined use of both agents allowed for almost complete virus elimination, reaching 98.0–100%. Thus, the integration of chemotherapy with apical meristem culture represents a promising biotechnological approach for obtaining GLRaV-3-free grapevine planting material and for preventing the spread of viral infections in vineyards.

Key words: grapevine planting material, sanitation, initial explants, microclones, GLRaV-3, viability, regenerative potential, chemotherapy, ribavirin, oseltamivir, apical meristems.

Постановка проблеми. Виноград є сільськогосподарською культурою, яка має важливе економічне значення у світовому масштабі. Сфера виноградарства належить до найбільш динамічних і швидкозростаючих сегментів аграрного ринку впродовж останніх років. У зв'язку з цим своєчасний моніторинг чинників, здатних негативно впливати на ріст і розвиток рослин та якість продукції, зокрема контроль збудників вірусних хвороб винограду, є необхідною умовою стабільного і ефективного виробництва [1, с. 1-2]. Вірусні хвороби знижують врожайність, пригнічують ріст та скорочують тривалість життя виноградних кущів. Вони також погіршують технологічні властивості ягід – уповільнюють дозрівання, зменшують вміст цукру та барвних речовин, підвищують кислотність вина [2, с. 184-185; 3, с. 262-263; 4, с. 1026-1028; 1, с. 6-7].

Відомо близько 70 вірусів, 8 віроїдів і 4 сателітні РНК, що інфікують виноград. До основних захворювань, що мають економічне значення відносять – коротковузля виноградної лози, хворобу скручування листя винограду, мармуровість листя винограду та борознистість деревини виноградної лози. Більшість вірусів мають РНК-геном [5, с. 2-4; 6, с. 806-807]. Прояв хвороби залежить від сорту, підщепи, штаму вірусу, агротехнічних умов, факторів навколишнього середовища та асоціацій з іншими патогенами [7, с. 280-282]. Поширення на великі відстані відбувається через вегетативне розмноження, локальна передача – комахами, кліщами або нематодами [8, с. 3-7].

Хвороба скручування листя виноградної лози (GLRaV) є однією з найбільш економічно шкідливих і поширених вірусних інфекцій винограду у світі, здатною спричинити втрату врожаю до 40 %. До скручування листя винограду асоційовані кілька вірусів родини *Closteroviridae* (роди *Ampelovirus*, *Closterovirus* та *Velarivirus*), які можуть інфікувати рослину окремо або формувати вірусні комплекси. Серед них GLRaV-3 є найпоширенішим та найбільш розповсюдженим агентом. Перші симптоми у дорослих рослин зазвичай проявляються на зрілих листках, починаючи від основи пагонів і поступово поширюючись на молоді листки. Це особливо помітно наприкінці періоду вегетації. У *Vitis vinifera* проявляються чіткі симптоми, у *Vitis labrusca*, гібридів та підщеп ці симптоми найчастіше не

проявляються. Типові симптоми включають почервоніння листя у сортів з червоними ягодами та пожовтіння – у сортів з білими ягодами, шкірясту структуру листової пластинки, збереження зеленого кольору жилок та закручування країв листків донизу (*GLRaV-1,3*) [5, с. 5-7; 9, с. 3-4; 10].

Оскільки поширення цієї хвороби по всьому світу є результатом транспортування інфікованого вірусом рослинного матеріалу на регіональному, національному, континентальному та міжконтинентальному рівнях [11, с. 105-108; 12, с. 330-333; 13, с. 20-23], то за даними багатьох дослідників, її поширення на виноградниках можна ефективно контролювати шляхом виробництва та використання під час закладання насаджень сертифікованого садивного матеріалу, протестованого на наявність вірусів. Це суттєво знижує потенціал зараження, особливо в регіонах, де поширені переносники патогенів [8]. Створення виноградників у зонах, вільних від переносників (зокрема нематод), також сприяє зменшенню як локального, так і віддаленого поширення вірусів [5, с. 10-20].

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* [11, с. 105-108; 14, с. 63-65], хіміотерапія [15, с. 390-391; 16, с. 115-118; 17, с. 3; 18, с. 437], культура меристем і верхівок пагонів [19, с. 281-283], соматичний ембріогенез, електротерапія [16, с. 115] та кріотерапія. 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.

Отже, сьогодні проблема поширення вірусних захворювань на виноградних насадженнях, зокрема хвороба скручування листя (*GLRaV*), яка спричиняє значні економічні втрати та погіршує якість виноробної продукції залишається актуальною. Вирішення цієї проблеми можливе шляхом використання оздоровленого садивного матеріалу, отриманого за допомогою біотехнологічних методів, зокрема хіміотерапії *in vitro* у поєднанні з культурою меристем.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Хіміотерапія рослин у культурі *in vitro* є біотехнологічним методом оздоровлення, що передбачає введення до поживного середовища хімічних сполук, переважно антивірусних або антимікробних препаратів, з метою пригнічення або елімінації фітопатогенів, насамперед вірусів, із рослинних експлантів за умови збереження їх життєздатності та регенераційної здатності.

Guojun Hu та ін. для елімінації *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)* у рослин *Vitis champini* застосовували хіміотерапію *in vitro* з використанням Рибавірину (R) 15 і 25 мкг/мл, термотерапію (37 °C) та їх комбінацію (R15 + T і R25 + T). Встановлено, що Рибавірин незалежно від концентрації характеризувався

високою фітотоксичністю. Поєднання Рибавіріну з термічним впливом знижувало прояви фітотоксичності та сприяло активізації ростових процесів ініціальних експлантів. Застосування тільки термотерапії також негативно впливало на рослини – рівень життєздатності у регенерованих Т-рослин дорівнював – 23,3 %. Водночас показники життєздатності після хіміотерапії (R15 і R25) та комбінованих обробок (R15 + T і R25 + T) дорівнювали відповідно 47,0 % (31/66) і 41,0 % (50/122). Ефективність елімінації *GLRaV-3* оцінювали за допомогою *RT-PCR* та *qPCR*. Показано, що комбінована обробка була найбільш результативною: за 20-денних комбінованих обробок (R15 + T і R25 + T) рівень елімінації перевищував 80 % [20].

Ionela Catalina Guta досліджувала ефективність термо- та хіміотерапії *in vitro* для оздоровлення експлантів *Vitis vinifera* сорту «Sangiovese», інфікованих *GLRaV-1* та *GLRaV-3*. Для хіміотерапії застосовували інгібітори інозинмонофосфатдегідрогенази (рибавірин, тіазофурін), інгібітори біосинтезу пуринів (6-тіогуанін) та інгібітори нейрамінідази (озельтамівір). Показано, що реакція експлантів на обробки залежала від типу вірусу: інгібітори IMPDH були більш ефективними проти *GLRaV-1*, тоді як інгібітори нейрамінідази та синтезу пуринів забезпечували вищий рівень санації проти *GLRaV-3*. Терапевтичний ефект Рибавіріну щодо *GLRaV-3* був низьким (40,0 %), застосування Озельтамівіру забезпечувало значно вищий рівень елімінації (78,0 %). Подібні результати отримано й іншими авторами [21, 22]. Термічна обробка забезпечувала елімінацію *GLRaV-1* та *GLRaV-3* на рівні близько 55,0 % [16].

У подальших дослідженнях Ionela Catalina Guta оцінювала ефективність хіміо- та електротерапії для оздоровлення *Vitis vinifera* L. сорту «Ranâi Magaraci», інфікованого *GLRaV-1* та *GLRaV-3*. Рибавірин та Озельтамівір вводили до поживного середовища протягом трьох послідовних субкультур. Встановлено неефективність Рибавіріну, який також індукував вітрифікацію та некроз рослин. Озельтамівір забезпечував високий рівень елімінації вірусу (66,6–71,4 %) у першій і другій субкультурах, однак у третій проявлявся фітотоксичний ефект. Електротерапія з подальшим культивуванням верхівок пагонів дозволяла отримати 33,3–66,6 % рослин без вірусів [23, с. 74-76; 1].

Окрім цього, Рибавірин і Озельтамівір ефективно застосовували для елімінації вірусу плямистості винограду (*GfklV*). Зокрема, Озельтамівір індукував інтенсивну проліферацію адвентивних бруньок без загибелі інокулятив за будь-якої концентрації. Комбіноване використання Рибавіріну та Озельтамівіру для елімінації *GfklV* у генотипі «Tâmâioasă românească» 322 забезпечувало активацію каулогенезу без втрат експлантів протягом трьох субкультур. Максимального ефекту елімінації досягали за концентрацій 20 мг/л Рибавіріну та 40 мг/л Озельтамівіру після однієї субкультури [23; 16, с. 115-118].

Таким чином, аналіз літературних джерел свідчить, що для оздоровлення винограду від *GLRaV-3* шляхом хіміотерапії *in vitro* може застосовуватися широкий спектр віруцидних препаратів. Водночас ефективність багатьох із них обмежується високою фітотоксичністю, недоступністю в Україні або відсутністю стабільного елімінаційного ефекту. Ефективність і токсичність віруцидів значною мірою залежать від генотипу рослини-господаря, типу вірусу та фізіологічного стану експланту, що зумовлює необхідність індивідуального підбору препаратів і робочих концентрацій для кожного сорту винограду.

Альтернативним ефективним методом отримання рослин винограду, вільних від вірусних, мікоплазмових захворювань і бактеріального раку, є культура

апикальних меристем [24, с. 1748-1750]. Апикальна меристема, яка являє собою конус клітин заввишки 0,1–1,0 мм, що активно діляться, зазвичай вільна від патогенів. Проте наукових праць із цього напрямку у виноградарстві небагато.

Mostafa F. M. A., Shaaban M. M., Doaa S. Elazab and Kamel M. T. використовували апикальні меристеми та вузлові живці як ініціальні експланти для введення у культуру *in vitro* різних сортів винограду. Найвищу приживлюваність експлантів (87,5–100 %) отримано на поживному середовищі MS із додаванням 6-БАП, кінетину та α -НОК протягом трьох пасажів, однак розміри апикальних меристем авторами не зазначені [25, с. 66-70].

Sabbadini S., Anca Butiuc-Keul та Ana Coste та ін. розробляли протоколи регенерації *in vitro* для низки сортів виноградної лози з використанням апикальних меристем, проте основною метою було отримання калюсних культур [26; 27, с. 62]. Отже, наукові дослідження щодо культивування апикальних меристем винограду *in vitro* залишаються обмеженими, а низка експериментальних аспектів і висновків – дискусійними. Переважна кількість робіт зосереджена на отриманні калюсних культур із широкою генетичною варіабельністю, що використовується переважно у селекційних програмах.

У зв'язку з цим у даному дослідженні оцінювали ефективність оздоровлення винограду технічного сорту «Одеський чорний» під впливом противірусних препаратів – Рибавіріну та Озельтамівіру – з подальшим культивуванням апикальних меристем. Подібні дослідження в Україні не проводили, що зумовлює їх актуальність і своєчасність. Крім того, сорт «Одеський чорний» є цінним за господарсько-біологічними ознаками, а його клони потребують оздоровлення з метою подальшого збереження та використання у виробництві.

Мета дослідження – визначити ефективність поєднання методів хіміотерапії та апикальних меристем для елімінації вірусу скручування листя винограду (*GLRaV-3*) в культурі *in vitro*; оцінити життєздатність і регенераційний потенціал оздоровленого матеріалу.

Виклад основного матеріалу дослідження. Методика дослідження. Робота виконувалась у лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження та біотехнології винограду Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України протягом 2021–2025 рр. на технічному сорті винограду «Одеський чорний».

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. Ідентифікацію вірусу скручування листя винограду проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА). Для цього використовували комерційні набори фірми *Agritest* (Італія) до вірусів скручування листя *GLRaV3* (*Grapevine Leaf Roll-Associated Virus 3*).

Ініціальні експланти, які використовували у роботі: одновічкові чубуки із бічною брунькою, верхівки пагонів (для введення в культуру *in vitro*), апикальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм та сформовані мікроклони. Їх культивували на модифікованому поживному середовищі Мурасіге і Скуга (MS), що містило: для введення в культуру *in vitro* – 0,5 мг/л 6-БАП і 0,1 мг/л ІОК, для мікророзмноження, укорінення та адаптації – 0,2 мг/л 6-БАП і 0,3 мг/л ІОК, половинну кількість макросолей та хелату заліза для культивування апикальних меристем – MS 2, що містило збільшену кількість вітамінів, фітогормонів та гіберелової кислоти

[28, с. 57-58]. Фізичні параметри культивування: температура 24–25°C, 16-годинний фотоперіод, освітлення 2500–3000 лк., вологість повітря 60–70 %.

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.

Для проведення хіміотерапії у поживне середовище, перед автоклавуванням додавали віруцидні препарати – Рибавірин та Озельтамівір. Концентрації препаратів встановлювали на основі оцінки фітотоксичності [29, с. 239]. Хіміотерапію проводили протягом трьох пасажувань по 30 днів кожне (загалом 90 днів). Після чого частину рослин переносили на свіжі MS для мікророзмноження, укорінення та адаптації, а частину використовували для виділення апікальних меристем з подальшим їх культивуванням.

Визначення коефіцієнту елімінації вірусу *GLRaV-3* проводили через 90 днів хіміотерапії та через 6 місяців після її завершення та через 90 днів культивування апікальних меристем.

Роботу проводили за наступною схемою:

Дослід 1. Елімінація *GLRaV3* 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).

Дослід 2. Елімінація *GLRaV3* на основі 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.

Кількість ініціальних експлантів для кожного варіанту досліджень дорівнювала 15 шт. Кожен експлант представляв одне повторення і оцінювався індивідуально.

У роботі використовували: мікробіологічні, молекулярно-біологічні та біотехнологічні методи досліджень. Визначали: кількість життєздатних мікропагонів (%), біометричні показники росту та розвитку вегетативної маси мікроклонів (кількість утворених пагонів, коренів (шт.), їх висоту та довжину (см), коефіцієнт елімінації (КЕ (%)) = $(N_2/N_1) * 100$, де N_1 – загальна кількість рослин, що проходили оздоровлення, шт.; N_2 – кількість оздоровлених рослин, шт.).

Результати дослідження та їх обговорення. Елімінація *GLRaV3* на основі проведення хіміотерапії. Упродовж 2021–2025 рр. було проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень південних районів Одеської області з метою виявлення вірусних інфекцій. У результаті обстежень на насадженнях

сорту «Одеський чорний» були виявлені кущі з характерними симптомами хвороби скручування листа винограду. Із цих рослин було відібрано зразки для лабораторного тестування, за результатами якого підтверджено наявність *GLRaV-3*. Вегетуючі пагони інфікованих кущів були використані для введення ініціальних експлантів у культуру *in vitro* з подальшим мікророзмноженням 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. 1).

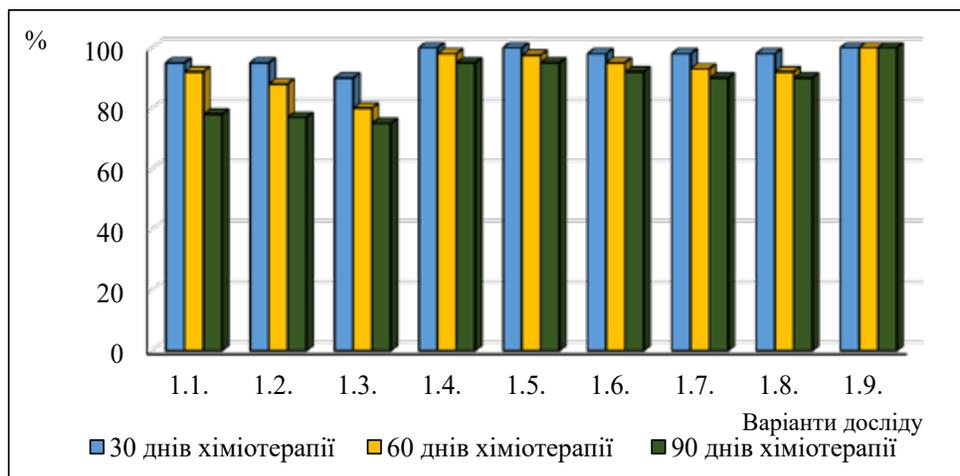


Рис. 1. Життєздатність ініціальних експлантів винограду у різні строки проведення хіміотерапії

Життєздатними вважали експланти, які характеризувалися зеленою листковою пластинкою і тканинами чубуків, наявністю живої пазушної бруньки, її проліферацією, ризогенезом. 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 ініціальей було після застосування Озельтамівіру 30 і 40 мг/л та у контролі (без впливу препаратів). У варіантах з Рибавірином (перший-третій) рівень життєздатності ініціальей 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 дослідження була більш вираженою. Найбільше життєздатних ініціальей (98,0–100%) було так само у варіантах з Озельтамівіром та контролі. У варіантах з Рибавірином рівень життєдіяльності ініціальей знижується до 80,0–92,0%. 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 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.* Одночасне використання Рибавірину та Озельтамівіру для елімінації *GFkV* дозволяло запустити 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 [18].

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 мікроживців 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. 2).

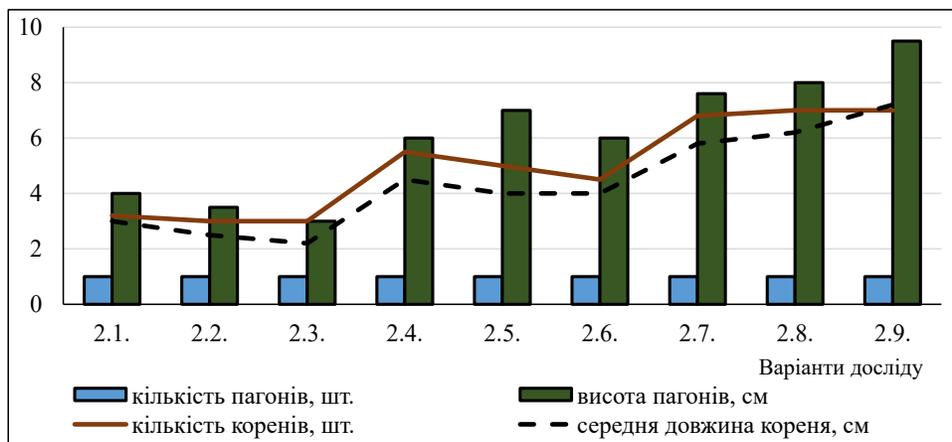


Рис. 2. Біометричні показники росту та розвитку мікроклонів винограду після проведення хіміотерапії (90 днів)

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 Рибавіріну 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. Про позитивний вплив сумісного застосування препаратів Рибавірин (невисокі концентрації) та Озельтамівір на інтенсивність проліферації адвентивних бруньок і подальший їх розвиток вказують дослідження і інших авторів [29].

Аналіз показників ризогенезу показав тісний зв'язок між кількістю сформованих коренів та їх довжиною, що узгоджується із 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 методу апікальних меристем. Після хіміотерапії у рослин (за всіма варіантами досліді) виділяли апікальні меристеми і перенесли їх на поживне середовище MS 2. Через 90 діб культивування визначали ступінь їх регенерації та проводили обліки розвитку (табл. 1).

Таблиця 1

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

Варіанти досліді	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 Рибавіріну 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 Рибавіріну 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*.

Отже, отримані результати показують, що Рибавірин пригнічував регенерацію та розвиток апікальних меристем, Озельтамівір і його комбінації з Рибавірином забезпечували кращу регенераційною здатністю експлантів і менш виражений фітотоксичний вплив, хоча й 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 їх 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. 3).

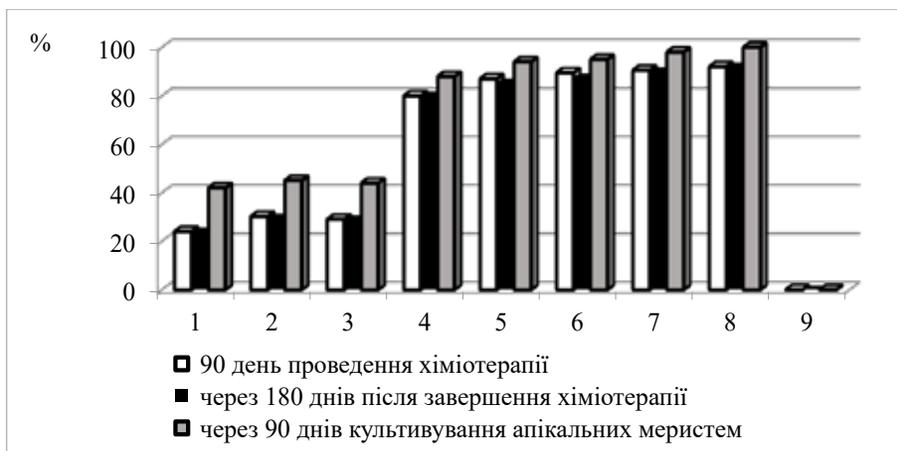


Рис. 3. Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листа винограду (*GLRaV-3*)

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 Рибавіріну. Після культивування апікальних меристем коефіцієнт елімінації збільшився до 42–45%. 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 протівірусний 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 вірусу.

Висновки даного дослідження та перспективи подальшого розвитку в цьому напрямі.

1. 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.

2. Життєздатність ініціальних експлантів безпосередньо залежала від типу та концентрації віруцидного препарату, а також від 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 Рибавіріну 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 мікрোকлонів, особливо після застосування Озельтамівіру.

3. Щодо елімінації вірусу *GLRaV-3*, встановлено, що Рибавірин самостійно забезпечував низький рівень елімінації рослин від вірусу, який не перевищував 30,0 % на 90-й день і тільки частково підвищувався після 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 Рибавіріну та Озельтамівіру з подальшим культивуванням апікальних меристем дозволяло досягнути практично повної елімінації вірусу (98,0–100 %).

У подальших дослідженнях щодо оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro* доцільно дослідити сумісний вплив на елімінацію *GLRaV-3* термо- та хемотерапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. 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.
2. 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. *Journal of Plant Pathology*. 2004. Vol. 86. P. 183–195.

3. 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 Research*. 2012. Vol. 163. P. 262–268. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.10.010.
4. 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. DOI: 10.1094/PHYTO-12-14-0369-FI.
5. 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. DOI: 10.1590/0100-29452017411.
6. Guță I. C., Buciumeanu E. C. Effect of virus infection on grape quality and quantity (*Vitis vinifera* L., cv. Fetească neagră). *African Journal of Agricultural Science and Technology*. 2016. Vol. 4, No. 7. P. 806–811.
7. 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.
8. Martelli G. P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*. 2014. Vol. 96, No. 1. P. 1–136.
9. Maree H. J., Almeida R. P. P., Bester R., Chooi K. M., Cohen D., Dolja V. V., Fuchs M. F., Golino D. A., Jooste A. E. C., Martelli G. P., Naidu R. A., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J. T. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*. 2013. Vol. 4, No. 82. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082.
10. Кириченко А. М. Сага про віруси та виноград. *Агроном*. 2022. URL: <https://www.agronom.com.ua/saga-pro-virusy-ta-vynograd/> (дата звернення: 10.12.2025).
11. Křižan B., Ondrušiková E., Holleinová V., Moravcová K., Bláhová L. Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by *in vivo* and *in vitro* thermotherapy. *Horticultural Science (Prague)*. 2009. Vol. 36, No. 3. P. 105–108. DOI: 10.17221/37/2008-HORTSCI.
12. Charles J. G., Cohen D., Walker J. T. S., Forgie S. A., Bell V. A., Breen K. C. A review of the ecology of grapevine leafroll-associated virus type 3 (*GLRaV-3*). *New Zealand Plant Protection*. 2006. Vol. 59. P. 330–337. DOI: 10.30843/nzpp.2006.59.4590.
13. Martínez L., Miranda C., Royo J. B., Urrestarazu J., Martínez de Toda F., Balda P., Santesteban L. G. Direct and indirect effects of three virus infections on yield and berry composition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. ‘Tempranillo’. *Scientia Horticulturae*. 2016. Vol. 212. P. 20–28. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.09.0234.
14. Panattoni A., Triolo E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. *Scientia Horticulturae*. 2010. Vol. 125, No. 1. P. 63–67. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.03.001.
15. Luvisi A., Panattoni A., Triolo E. Thiopurine prodrugs for plant chemotherapy purposes. *Journal of Phytopathology*. 2011. Vol. 159, No. 5. P. 390–392. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01779.x.
16. 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, No. 1. P. 115–118. DOI: 10.15835/nbha4219227.
17. 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: 10.1016/j.scienta.2020.109462.
18. 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. DOI: 10.1016/S2095-3119(18)61913-6.
19. 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.

20. 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: 10.1016/j.scienta.2020.109462.

21. Panattoni A., D'Anna F., Triolo E. Improvement in grapevine chemotherapy. *Proceedings of the 15th International Congress on Grapevine Virology (ICVG)*. 2006. P. 139–141.

22. Panattoni A., D'Anna F., Triolo E. Improvement in grapevine chemotherapy. *Proceedings of the 15th International Congress on Grapevine Virology (ICVG)*. 2006. P. 139–141.

23. 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 Suppl. P. 72–78.

24. 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. Vol. 12. P. 1748–1758. DOI: 10.1111/mpp.12875.

25. 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: 110.12.2025).

26. 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. DOI: 10.1051/bioconf/20191201019.

27. Butiuc-Keul A., Coste A. Biotechnologies and Strategies for Grapevine Improvement. *Horticulturae*. 2023. Vol. 9, № 1. P. 62. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010062>

28. 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. DOI <https://doi.org/10.32782/2310-0478-2024-2-55-61>

29. 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

Дата першого надходження рукопису до видання: 17.11.2025

Дата прийнятого до друку рукопису після рецензування: 22.12.2025

Дата публікації: 31.12.2025