AGRICULTURAL SCIENCES

ХІМІОТЕРАПІЯ ВИНОГРАДУ *IN VITRO*

Зеленянська Н.М.,
доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, заступник директора з науково-інноваційної діяльності
Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» НААН України
Рябий М.І.
Аспірант,
Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» НААН України

CHEMOTHERAPY OF GRAPEVINE *IN VITRO*

Zelenianska N.
Doctor of Agricultural Sciences, Senior Research Scientist,
Deputy Director for Research and Innovation,
National Scientific Centre «V.Ye. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking» NAAS of Ukraine
Riabyi M.
Graduate Student,
National Scientific Centre «V.Ye. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking» NAAS of Ukraine

Анотація

Метою даного дослідження було оцінити ефективність хіміотерапії з використанням препаратів Рибавірин, Озельтамівір для елімінації вірусу хвороби скручування листя (*Grapevine leafroll associated virus-3*, GLRaV-3) у рослин *Vitis vinifera* L. сорту «Одеський чорний» та визначити вплив віруцидних препаратів на розвиток ініціальних експлантів, мікроклонів винограду в умовах культури *in vitro*. З кущів винограду з візуальними проявами хвороби скручування листя було відібрано зразки, які використали для проведення лабораторної діагностики методом ІФА і підтверджено зараження вихідного матеріалу *GLRaV-3*. Інфіковані ініціальні експланти було введено в культуру *in vitro* та піддано хіміотерапії протягом 90 днів із використанням різних концентрацій препаратів. Після завершення процесу хіміотерапії оцінювали життєздатність рослин, морфогенетичні показники та коефіцієнт елімінації вірусу. Додатковий контроль дієвості процесу оздоровлення проводили через 180 днів.

Отримані результати показали суттєві відмінності між препаратами за рівнем фітотоксичності та віруцидної активності. Рибавірин у концентраціях 15–25 мг/л виявив підвищену токсичність для рослин, що проявилося в зниженні ростових показників і низькому рівні елімінації *GLRaV-3* (24,7–30,5%). На відміну від нього, Озельтамівір характеризувався значно кращою толерантністю рослин і високим коефіцієнтом елімінації – від 80,0 до 89,5 % залежно від концентрації. Найвищу ефективність отримано у варіантах із комбінованим застосуванням препаратів, де рівень елімінації був у межах 90,5–92,0% і залишався стабільним через 180 днів після завершення хіміотерапії. Отримані результати можуть бути використані у програмах оздоровлення виноградних генотипів та створення безвірусного садивного матеріалу.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of chemotherapy using Ribavirin and Oseltamivir for the elimination of Grapevine leafroll-associated virus-3 (GLRaV-3) in *Vitis vinifera* L. plants of the 'Odeskyi Chornyi' cultivar, as well as to determine the impact of these virucidal agents on the development of initial explants and microclones under in vitro culture conditions. Samples were collected from grapevine plants exhibiting visual symptoms of leafroll disease and subjected to ELISA-based laboratory diagnostics, which confirmed GLRaV-3 infection in the initial plant material. The infected initial explants were introduced into in vitro culture and exposed to chemotherapy for 90 days using various concentrations of the tested agents. Upon completion of chemotherapy, plant viability, morphogenetic parameters, and virus elimination rates were assessed. Additional verification of the recovery process was conducted 180 days later.

The results revealed substantial differences between the tested agents in terms of phytotoxicity and virucidal activity. Ribavirin at concentrations of 15–25 mg/L exhibited increased phytotoxicity, manifested by reduced growth parameters and low GLRaV-3 elimination rates (24.7–30.5%). In contrast, Oseltamivir demonstrated markedly higher plant tolerance and a significantly greater elimination rate—ranging from 80.0% to 89.5%, depending on concentration. The highest efficacy was observed in treatments combining both agents, where virus elimination reached 90.5–92.0% and remained stable 180 days after chemotherapy. These findings can be applied in programs aimed at the sanitation of grapevine genotypes and the production of virus-free planting material.

Ключові слова: садивний матеріал, ініціальні експланти, мікроклони, *GLRaV-3*, хіміотерапія, Рибавірин, Озельтамівір.

Keywords: planting material, initial explants, microclones, GLRaV-3, chemotherapy, Ribavirin, Oseltamivir.

Актуальність дослідження. Вірусні хвороби винограду можуть викликатися широким спектром патогенних агентів. Для культурних сортів *Vitis vinifera* L. встановлено наявність понад 80 різних вірусів [8, 6]. Частина з них особливо небезпечна через високу поширеність, виражену вірулентність та глобальне розповсюдження, що зумовлює необхідність застосування регламентованих заходів контролю. Зокрема, на рівні ЄС нормативні документи передбачають обов'язкову діагностику садивного матеріалу винограду на вірус коротковузля винограду (*GFLV*) та вірус мозаїки арабіса (*ArMV*) роду *Nepovirus*, а також на вірус скручування листя винограду 1 і 3 (*GLRaV-1* та *GLRaV-3*) роду *Ampelovirus* [*5,* 17].

Хворобу винограду, спричинену вірусом скручування листя (*GLRaV*) вважають однією з найнебезпечніших. Види вірусів, що її викликають, послідовно називають вірусом скручування листя винограду 1, вірусом скручування листя винограду 2 тощо (*GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-n*). Усі віруси належать до роду *Ampelovirus*, за винятком *GLRaV-2 та GLRaV-7*, які відносяться до родів *Closterovirus* та *Velarivirus*. Поширення цієї хвороби по всьому світу є результатом транспортування інфікованого вірусом рослинного матеріалу на регіональному, національному, континентальному та міжконтинентальному рівнях, оскільки хвороба передається через щеплення [*13*, *4, 14*].

Перші ознаки хвороби, зокрема загинання країв листкових пластинок донизу, зазвичай проявляються на початку серпня та посилюються до кінця вегетації. У сортів із темним забарвленням ягід інфекція спричиняє передчасне почервоніння листків, при цьому зона вздовж головних жилок залишається зеленою. У сортів із світлими ягодами частіше спостерігають слабкий хлороз. Інтенсивність прояву симптомів залежить від генотипу сорту, кліматичних умов і типу збудника. Деякі серотипи *GLRaV* можуть викликати прихований, безсимптомний перебіг інфекції. Такі рослини часто залишаються зовні здоровими, але здатні передавати вірус при використанні їх у щепленні [*13*].

Інфікування вірусом скручування листя призводить до різкого зниження продуктивності виноградних насаджень. У хворих рослин формується дрібне гроно, ягоди повільніше забарвлюються, мають підвищену кислотність і нижчий вміст цукрів [*20, 14]*. За різними оцінками, втрати врожаю становлять від 20 до 40 % або навіть більше. Зменшення цукристості також негативно впливає на якість виноматеріалів: вина з таких ягід містять менше спирту, танінів, мають менш інтенсивне забарвлення та гірші смакові характеристики [*13, 16, 20, 6]*. Крім кількісних і якісних показників урожаю ягід ураження *GLRaV-3* суттєво зменшує площу листкової поверхні кущів винограду, метаболічну активність листків, інтенсивність росту пагонів, довжину міжвузлів, вихід стандартних чубуків та визрівання лози. У лозі накопичувалося на 40-43 % менше сухих речовин, порівняно із здоровими рослинами [19, 16, 20, 6]. А це агробіологічні показники росту та розвитку кущів винограду, які забезпечують розмноження виноградної лози у різні способи.

Для контролю хвороб винограду, спричинених вірусами вирішальне значення має використання здорового садивного матеріалу. Але, в окремих випадках, коли мова йде про збереження цінного генетичного матеріалу винограду, який уражений вірусом скручування листків винограду, необхідно проводити його оздоровлення. Для елімінації *GLRaV-3* рекомендують використовувати термотерапію, хіміотерапію, культивування апікальних меристем та соматичний ембріогенез. Проте, ефективність елімінації змінюється залежно від методу [7, 18, 2, 1].

Аналіз літературних джерел показує, що для оздоровлення винограду від хвороби *GLRaV-3* шляхом проведення хіміотерапії в культурі тканин і органів *in vitro* можна застосовувати низку віруцидних препаратів, зокрема Рибавірин (Ribavirin), 5-Азацитидин (AZA), Ациклогуанозин, Азидотимідин (AZT), 3-Деазауридин (DZD), DHPA (дигідроксіпропіладенін), Озельтамівір (Oseltamivir), Мікофенолову кислоту (MPA), Селеназол (SE), DHT (2,4-діоксо-гексагідро-1,2,5-тріазин), Ціаногуанідин та ін. [9, 10, 11, 12]. Але, одні препарати є недоступними в Україні, інші проявляють високу токсичність щодо розвитку ініціальних експлантів винограду *in vitro* або загалом не впливають на елімінацію *GLRaV-3*. Крім того, для кожного генотипу винограду слід поступово підбирати як віруцидні препарати, так і робочі концентрації для хіміотерапії, оскільки ефективність і фітотоксичність залежать від генотипу рослини господаря, типу вірусу та стану експланту.

Тому у даному дослідженні оцінювали оздоровлення винограду технічного сорту «Одеський чорний» під впливом противірусних реагентів – Рибавірину та Озельтамівіру. Подібних досліджень в Україні не проводили, тому їх актуальність залишається на високому рівні, а робота є своєчасною. Крім того, сорт «Одеський чорний» є цінним за своїми господарсько-біологічними ознаками, тому його клони потребують оздоровлення для подальшого збереження та використання у виробництві.

Мета дослідження – визначити вплив препаратів Рибавірин та Озельтамівір на елімінацію вірусу скручування листя винограду (*GLRaV-3*) та розвиток ініціальних експлантів, мікроклонів винограду в культурі *in vitro.*

Матеріали та 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 2022–2025 рр. У роботу було взято мікроклональні рослини технічного сорту винограду «Одеський чорний».

«Одеський чорний» («Алікант Буше» х «Каберне Совіньйон») – технічний сорт винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» середньопізнього строку дозрівання, відомий високою врожайністю, стійкістю до хвороб та морозостійкістю. З урожаю ягід отримують насичені рубінові вина з тонами пасльону, вишні, шоколаду та ягід. Використовують для виготовлення сухих, десертних та ігристих вин.

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*) та сформовані мікроклони.

Ініціальні експланти (верхівки пагонів, розміром 0,8–1,0 см) сорту «Одеський чорний» *in vitro* 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 – 0,2 мг/л 6-БАП і 0,3 мг/л ІОК, половинну кількість макросолей та хелату заліза. Фізичні параметри культивування: температура 24–25ºС, 16-годинний фотоперіод, освітлення 2500–3000 лк., вологість повітря 60–70 %.

Для проведення хіміотерапії у поживне середовище, перед автоклавуванням додавали віруцидні препарати – Рибавірин та Озельтамівір. Концентрації препаратів встановлювали на основі оцінки фітотоксичності та за умови не перевищення порогового рівня [18]. Хіміотерапію проводили протягом трьох пасажувань по 30 днів кожне (загалом 90 днів). Після чого рослини послідовно переносили на свіжі MS для мікророзмноження, укорінення та адаптації. Визначення коефіцієнту елімінації вірусу *GLRaV-3* проводили через 90 днів хіміотерапії та через 6 місяців після її завершення.

Роботу проводили за наступною *схемою досліду*:

Варіант 1 – Рибавірин, 15 мг/л;

Варіант 2 – Рибавірин, 20 мг/л;

Варіант 3 – Рибавірин, 25 мг/л;

Варіант 4 – Озельтамівір, 30 мг/л;

Варіант 5 – Озельтамівір, 40 мг/л;

Варіант 6 – Озельтамівір, 80 мг/л;

Варіант 7 – Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 30 мг/;

Варіант 8 – Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 40 мг/;

Варіант 9 – Контроль (культивування мікроклонів винограду без хіміотерапії).

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

Ініціальні експланти та сформовані рослини культивували у склянних ємкостях діаметром 40 мм, висотою 150 мм, об'єм поживного середовища дорівнював 20–25 мл. У цих ємкостях рослини знаходились і під час хіміотерапії.

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. Упродовж 2023–2025 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 вичвлены кущі з характерними симптомами хвороби скручування листя 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. Кожне нове пасажування здійснювали тричі через кожні 30 днів та визначали рівень приживлюваності ініціальних експлантів (Рис. 1).

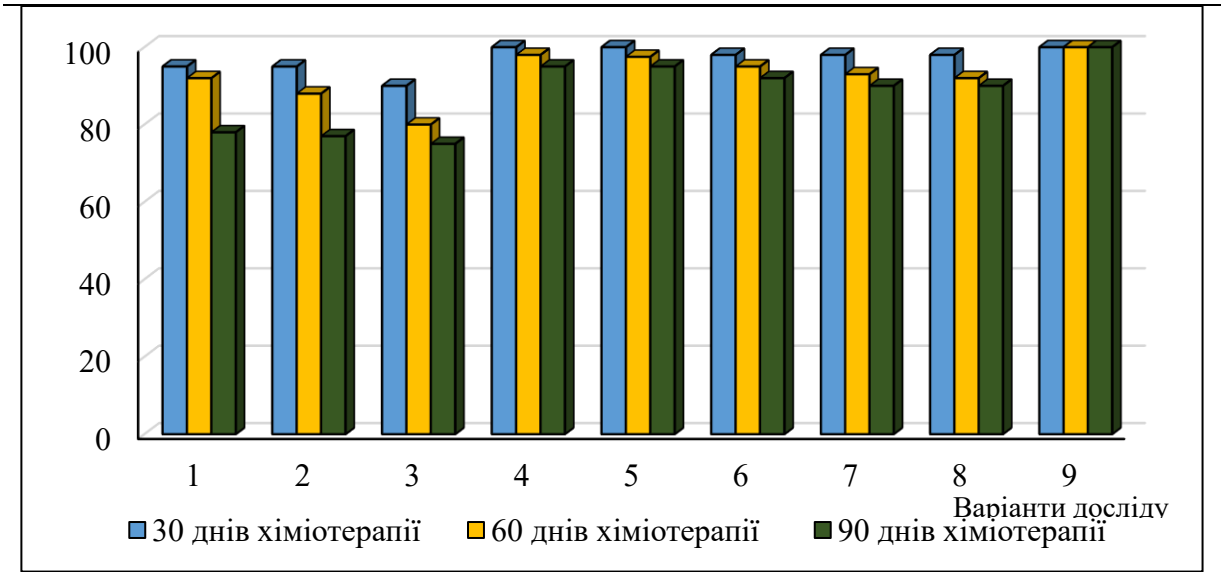

Рисунок 1. Життєздатність ініціальних експлантів винограду у різні строки проведення хіміотерапії, %

Життєздатними вважали експланти, які характеризувалися зеленою листковою пластинкою і тканинами чубуків, наявністю живої пазушної бруньки, її проліферацією, ризогенезом. Отримані дані показують, що ефективність хіміотерапевтичних 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 (90–100 %). 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 90–95%. Це свідчить про те, що навіть короткотривалий вплив Рибавірину проявляє легкий стресовий ефект.

На 60-й день хіміотерапії різниця між варіантами досліду була більш вираженою. Найбільше життєздатних ініціалей (98–100%) було так само у варіантах з Озельтамівіром та контролі. У варіантах з Рибавірином рівень життєдіяльності ініціалей знижувася до 80–92%. У варіантах, де хіміотерапію проводили комплексно (Рибавірин+Озельтамівір) показники життєздатності були меншими (92–93%) 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.* (2014) [18]. Одночасне використання Рибавірину та Озельтамівіру для елімінації *GFkV* дозволило 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.

Через 90 днів хіміотерапії життєздатність ініціальних експлантів помітно знижувалася у всіх варіантах після застосування хіміотерапевтичних препаратів. Проте, найбільше життєздатних ініціальних експлантів було у контрольних варіантах та варіантах із Озельтамівіром 95% (30, 40 мг/л) та 92% (80 мг/л). У варіантах із Рибавірином життєздатність ініціалей зменшувалась до 75-78%, на відміну від варіантів, де хіміотерапію проводили з застосуванням двох препаратів: Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 30 мг/; Рибавірин, 20 мг/л + Озельтамівір, 40 мг/л. Життєздатність ініціальних експлантів була на рівні 90%. У контрольному варіанті кількість життєздатних експлантів дорівнювала 100%, що абсолютно логічно, оскільки ініціале не піддавали впливу віруцидних препартів.

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).

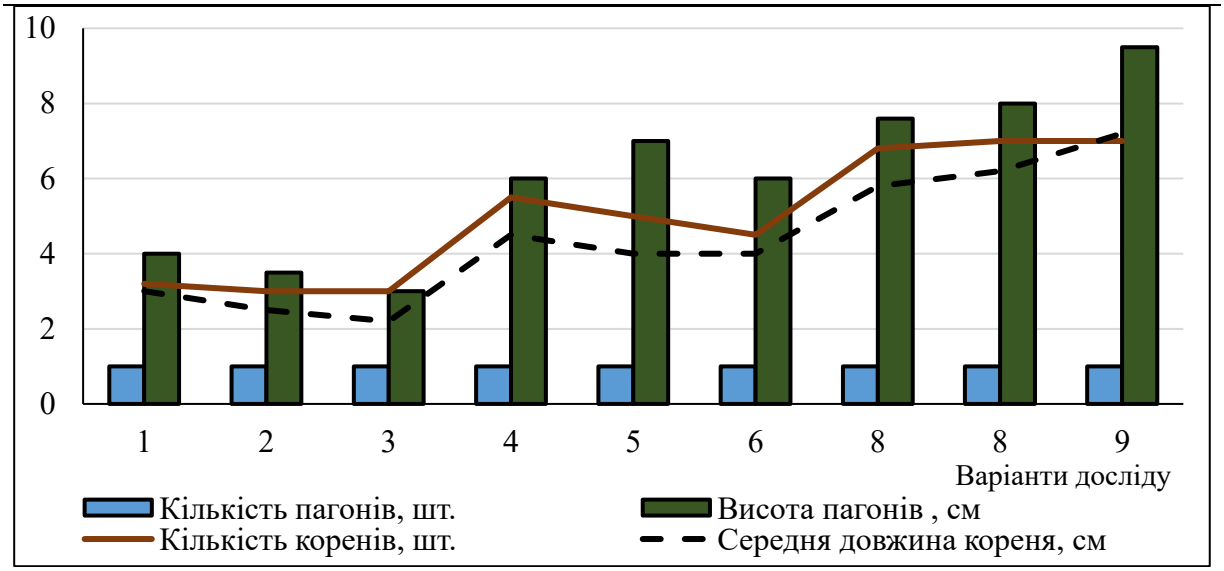

Рисунок 2. Біометричні показники росту та розвитку мікроклонів винограду після проведення хіміотерапії (90 днів)

У всіх варіантах досліду мікроклони формували по одному пагону, що свідчить про стабільність утворення пагонів незалежно від типу або концентрації хіміотерапевтичного препарату. 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. 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 [18, 9].

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.

Після завершення хіміотерапії з кожного варіанту було відібрано по 10 рослин для визначення ефективності елімінації *GLRaV-3* (рослини були окремо проаналізовані за допомогою *ELISA*). Результати визначення показали, що після проведення хіміотерапії рослини, вільні від *GLRaV-3*, бути у всіх варіантах, за виключенням контролю. Проте кількість таких рослин була різною (Рис. 3).

Рисунок 3. Коефіцієнт елімінації вірусу хвороби скручування листя винограду (GLRaV-3) після проведення хіміотерапії

Згідно з даними рис. 3 можна стверджувати, що ефективність хіміотерапії мікроклонів винограду істотно залежала від препарату, що застосовували для хіміотерапії. У варіантах з Рибавірином (перший–третій) коефіцієнт елімінації вірусу на 90-й день становив тільки 24,7–30,5%, що свідчить про слабкий противірусний ефект і збереження інфекції у більшості рослин. Подібні результати було отримано [3, 18] Через 180 днів після проведення хіміотерапії показники практично не змінилися, що підтверджує низьку ефективність препарату.

У варіантах з Озельтамівіром та його комбінаціях з Рибавірином (четвертий–восьмий) коефіцієнт елімінації вірусу був високим – 80–92%, через 180 днів культивування рослин у культуральному боксі він знижувався (у окремих варіантах) на 1,5 %. Це свідчить про стабільний і тривалий противірусний ефект препарату. 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 [15]. Оскільки результат елімінації вірусу *GLRaV-3* встановлений на етапі культивування *in vitro*, не завжди підтверджується у подальших дослідженнях вже акліматизованих рослин.

Висновки. У результаті фітосанітарного обстеження та лабораторної діагностики (ІФА) встановлено інфікування рослин сорту «Одеський чорний» вірусом скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*). Виділені інфіковані пагони були введені в культуру *in vitro*, регенеровані мікроклони були використані як вихідний матеріал для хіміотерапії. Останню проводили з застосуванням препаратів Рибавірин та Озельтамівір протягом 90 днів.

Оцінка життєздатності ініціальних експлантів винограду залежала від препарату, його концентрації та тривалості експозиції. Після 30 днів хіміотерапії життєздатність залишалась високою у всіх варіантах досліду (90–100 %), проте вже на 60-й та 90-й день цей показник знижувався до 92 та 80%.

Препарат **Озельтамівір у концентраціях 30–40 мг/л проявляв низьку фітотоксичність протягом усього періоду хіміотерапії**, забезпечуючи 95–100% життєздатних експлантів навіть після 90 днів культивування. Це свідчить про його придатність для подальших досліджень з елімінації вірусу (*GLRaV-3*). Препарат **Рибавірин у концентраціях 15–25 мг/л проявляв високу фітотоксичність**. Після його застосування життєздатність експлантів зменшувалась до 75–78% після 90 днів хіміотерапії.

Комбіноване застосування Рибавірину (20 мг/л) та Озельтамівіру (30–40 мг/л) забезпечувало високі показники життєздатності (≈90 %) після 90 днів хіміотерапії, що може свідчити про синергічний або компенсаторний ефект препаратів і розширює можливості комбінованих схем оздоровлення.

Незважаючи на фітотоксичний вплив препаратів, мікроклональні рослини після завершення хіміотерапії зберігали здатність до активного росту, утворення пагонів та коренів. Це підтверджує, що віруцидні речовини у застосованих концентраціях не блокують відновлення регенераційних процесів рослин після оздоровлення.

Найвищий коефіцієнт елімінації *GLRaV-3* був отриманий у варіантах із комбінованим застосуванням Рибавірину та Озельтамівіру (КЕ = 90,5–92,0%) і залишався стабільним через 180 днів після завершення хіміотерапії. Тому, таку комбінацію можна застосовувати для елімінації *GLRaV-3* та формування оздоровленого вихідного матеріалу винограду.

Список літератури

1. Bi W.-L., Hao X.-Y., Cui Z.-H., Pathirana R., Volk G. M., Wang Q.-C. Shoot tip cryotherapy for efficient eradication of grapevine leafroll-associated virus-3 from diseased grapevine in vitro plants. Annals of Applied Biology. 2018. Vol. 173, Issue 3. P. 261-270 DOI: https://doi.org/10.1111/aab.12459

2. 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, Issue 6. P. 561–571. DOI: https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0122

3. 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.

4. Charles J. G., Cohen D., Walker J. T. S, Forgie S. A., Bell V. A., Breen K. C. A reviev of the ecology of grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). New Zealand Plant Protection. 2006. Vol. 59. P. 330-337. DOI: https://doi.org/10.30843/nzpp.2006.59.4590

5. Council Directive 68/193/EEC of 9 April 1968 on the marketing of material for the vegetative propagation of the vine. Official Journal of the European Communities. 1968. L 93. P. 15–23.

6. Crespo-Martínez S., Ramírez-Lacunza A., Miranda C., Urrestarazu J., Santesteban L. G. Dynamics of GFLV, GFkV, GLRaV-1, and GLRaV-3 grapevine viruses transport toward developing tissues. European Journal of Plant Pathology. 2023. Vol. 167. P. 197–205. DOI: https://doi.org/10.1007/s10658-023-02703-1

7. Dĩaz-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, Issue 3. P. 215–227. DOI: https://doi.org/10.1300/J492v07n03_03

8. Fuchs M. Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. Journal of. Plant Pathology. 2020. Vol. 102, 643–653. DOI:

https://doi.org/10.1007/s42161-020-00579-2

9. 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

10. 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

11. 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.

12. 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

13. 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).

14. 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: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.0234

15. 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. Art. 1064. DOI: https://doi.org/10.3390/plants11081064

16. Montero R., El Aou Ouad H., Pacifico D., Marzachì C., Castillo N., García E., Del Saz N. F., Florez-Sarasa I., Flexas J., Bota J. Effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology in asymptomatic plants of Vitis vinifera. Annals of Applied Biology. 2017. Vol. 171, Issue 2. P. 155-171. DOI: https://doi.org/10.1111/aab.12356

17. 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.

18. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. Selective chemotherapy on Grapevine leafroll-associated virus-1 and -3. Phytoparasitica. 2011. Vol. 39. P. 503–508 DOI 10.1007/s12600-011-0185-1

19. Solomon T. Endeshaw, Paolo Sabbatin, Gianfranco Romanazzi, Annemiek C. Schilderc, Davide Neri Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of Vitis vinifera L. cv. Cabernet Franc. Scientia Horticulturae. 2014. Vol. 170. P. 228-236. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.021

20. Wallis C. M. Potential effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 (genus Ampelovirus; family Closteroviridae) or Grapevine red blotch virus (genus Grablovirus; family Geminiviridae) infection on foliar phenolic and amino acid levels. BMC Res Notes. 2022. Vol. Art. 15:213. DOI:https://doi.org/10.1186/s13104-022-06104-1