

ОЗДОРОВЛЕННЯ ВИНОГРАДУ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН І ОРГАНІВ *IN VITRO*

Зеленянська Н. М. – доктор сільськогосподарських наук,

старший науковий співробітник

orcid.org/0000-0002-9303-8686

Національний науковий центр

«Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова»

Національної академії аграрних наук України

Рябий М. І. – аспірант

orcid.org/0009-0003-6608-135X

Національний науковий центр

«Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова»

Національної академії аграрних наук України

Постановка проблеми. Виноградна лоза (*Vitis spp.*) є важливою сільськогосподарською культурою з важливим соціально-економічним значенням [1, 2]. Вона сприйнятлива до патогенів, що передаються через садивний матеріал та спричиняють різні хвороби, етіологія яких не завжди чи повністю встановлена [3, 4]. Багаторічний життєвий цикл виноградної рослини, вегетативне розмноження та активний обмін садивним матеріалом сприяють глобальному поширенню цих агентів, формуючи складні інфекційні комплекси [5, 6, 7]. Вірусні інфекції 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 [8, 9, 10].

Відомо близько 65 вірусів, 8 віроїдів і 4 сателітні РНК, що інфікують виноград. До основних захворювань, що мають економічне значення відносять – вірус коротковузля виноградної лози, віруси хвороби скручування листя винограду, вірус мармуровості листя винограду та віруси комплексу борознистості деревини виноградної лози. Більшість вірусів мають РНК-геном [4]. Прояв хвороби залежить від сорту, підщепи, штаму вірусу, агротехнічних умов, факторів навколишнього середовища та асоціацій з іншими патогенами [11]. Поширення на великі відстані відбувається через вегетативне розмноження, локальна передача – комахами, кліщами або нематодами [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 найбільше 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) [4, 12].

За даними багатьох дослідників, поширення хвороб вірусної етіології 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 [7]. Створення виноградників у зонах, вільних від переносників (зокрема нематод), також сприяє зменшенню як локального, так і віддаленого поширення вірусів [4].

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* [13, 14], хіміотерапія [15], культура меристем і верхівок пагонів [11], соматичний ембріогенез [16], а також електротерапія та кріотерапія [17]. 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 меристем чи верхівок пагонів, що забезпечує стабільне оздоровлення рослинного матеріалу.

Отже, сьогодні проблема поширення вірусних захворювань на виноградних насадженнях, зокрема хвороби скручування листя (*GLRaV*), які спричиняють значні економічні втрати та погіршують якість виноробної

продукції залишається актуальною. Вирішення цієї проблеми можливе шляхом використання оздоровленого садивного матеріалу, отриманого за допомогою біотехнологічних методів, зокрема термотерапії *in vitro* у поєднанні з культурою меристем.

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

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 35–42 °C 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.

У дослідженні AlMaarri K., Massa R. та AlBiski F. (Дамаський університет, Сирія) встановлено, що застосування термотерапії у поєднанні з подальшим культивуванням верхівок пагонів картоплі сприяло ефективній елімінації вірусу *Y* (*PVY*), який уражує картоплю та інших представників родини *Solanaceae*. Найвищу ефективність забезпечував режим термообробки за температури 37 °C протягом 40 днів із використанням апікальних меристем розміром 0,1–0,3 мм. Культивування апікальних меристем розміром 0,1 мм дозволяло отримати 75,0–81,0 % рослин, вільних від вірусів. Із збільшенням розміру експлантів частота елімінації вірусу знижувалася [18].

Позитивні результати щодо отримання рослин, вільних від вірусної інфекції, було одержано після застосування термотерапії у поєднанні з подальшим культивуванням верхівок меристем у представників багатьох трав'янистих і деревних видів [19]. Зокрема, успішне оздоровлення отримано у гібридів *Lilium* × *Elegans* (генотипи 409 і 599), азійських гібридів лілії та гібридів *LA Fangio* і *Lacorno* від вірусу строкатості (*LSV*), вірусу плямистості лілії (*LMoV*) та вірусу мозаїки огірка (*CMV*) за умов проведення термотерапії при температурі 38 °C упродовж 5–40 днів (розмір апікальної меристеми не зазначено) [20]. Методика також виявилася ефективною для оздоровлення хрону від вірусу мозаїки ріпи (*TuMV*) ($t = 37$ °C, 23 дні, розмір меристеми 0,5 мм) та артишоку від італійського латентного вірусу артишоку (*AILV*) ($t = 38$ °C, 15 днів, розмір меристеми 0,3–0,8 мм). У цих дослідженнях автори повідомляють про повне (100 %) оздоровлення досліджуваних трав'янистих рослин [19]. Водночас комбінація термотерапії та культивування апікальних меристем не завжди забезпечувала очікувану ефективність. Так, для хризантеми (вірус хризантеми В – *CVB*), бегонії (вірус некротичної кільцевої плямистості *Prunus* – *PNRSV*), часнику (загальний латентний вірус часнику – *GarCLV*; вірус жовтої карликовості цибулі – *OYDV*, сорт «Хамедан») та картоплі сорту «Діамант» (вірус картоплі *Y* – *PVY*) кількість рослин, вільних від вірусної інфекції, становила тільки 0–33 % [20]. Подібні результати отримали Lozoaya-Saldana H. та Dawson W. O. (Каліфорнійський університет, США), які

не досягли успішного оздоровлення рослин сої, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки, за умов термотерапії ($t = 40/36$ °C день/ніч, 15 днів) та подальшого культивування апікальних меристем [21].

Аналіз наукових публікацій, присвячених оздоровленню деревних порід із використанням методів термотерапії та культивування апікальних меристем, свідчить, що ефективність цих підходів значною мірою залежить від виду та сорту рослин, режиму термообробки, а також розміру ізолюваних меристем. Так, повне оздоровлення рослин було досягнуто у яблуні сорту «Oregon Spur-II» від вірусів мозаїки (*ApMV*), борознистості (*ASGV*) і ямчатості деревини (*ASPV*) після проведення термотерапії ($t = 37$ – 40 °C, 4 тижні, розмір меристеми 0,3–0,6 мм), а також у сливи сорту «Earliblue» від вірусу кільцевого некрозу (*PNRSV*) за температури 35–38 °C упродовж 10–12 днів при розмірі меристеми 5,0 мм [22]. Подібні результати отримано і для малини, оздоровленої від вірусу чорного некрозу (*BRNV*) та вірусу куцистої карликовості (*RBDV*) за комбінованого температурного режиму 29 °C і 38 °C з інтервалом 4 години протягом 5 тижнів [23, 24]. Водночас для інших сортів яблуні, груші, сливи та малини ефективність оздоровлення залишалася низькою і становила тільки 0–43 %.

Виявлені закономірності підтверджуються і результатами, отриманими під час досліджень, спрямованих на оздоровлення винограду. Зокрема, Vanja Miljani, Denis Rusjan, Andreja Škvar та ін. (Люблянський університет, Словенія; Університет Монпельє, Франція) застосовували *in vivo* термотерапію ($t = 36$ – 38 °C, 6 тижнів) у поєднанні з *in vitro* мікрощепленням апікальних меристем (0,1–0,2 мм) на сіянці підщепи *Viella* (*Vitis labrusca* × *V. riparia*) для елімінації восьми вірусів та двох віроїдів винограду. Хоча загальна регенераційна здатність мікрощеплень була низькою, для всіх вірусів досягнуто 100 % елімінації, тоді як для віроїдів показники були нижчими – 39,2 % для *HSVd* та 42,6 % для *GYSVd-1* [25].

В. Křižan, E. Ondrušiková та співавтори (Університет сільського господарства та лісівництва ім. Менделя, Брно, Чеська Республіка) досліджували ефективність термотерапії *in vitro* та *in vivo* для елімінації вірусу коротковузля винограду (*GFLV*) у трьох підщепних генотипів. В обох випадках термотерапію проводили протягом 45 днів за $t = 37$ °C. Автори встановили, що ефективність обох способів була подібною, проте перевагу надають методу *in vivo*, оскільки він дозволяє отримати більшу кількість апікальних сегментів з оброблених рослин, скорочує період культивування *in vitro* та зменшує ризик соматичної (сомаклональної) мінливості [13].

У дослідженні Panattoni A. та Triolo E. створено *in vitro* колекцію рослин *Vitis berlandieri* × *V. riparia* «Kober 5BB», які експериментально інфікували вірусами *GVA*, *GFLV*, *GfKv*, *GLRaV-1* і *GLRaV-3*, після чого проводили *in vitro* термотерапію у вегетаційній камері ($t = 37 \pm 0,5$ °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* [14].

Отже, аналіз літературних джерел свідчить, що термотерапія є ефективним методом елімінації вірусів у винограду та інших багаторічних культур. Її застосування, особливо у поєднанні з культивуванням апікальних меристем або мікрощепленням, забезпечує високі показники оздоровлення рослин. Водночас ефективність методу істотно залежить від комплексу факторів, серед яких – вид і сорт рослини, тип і концентрація вірусів, температура та тривалість термообробки, а також розмір і фізіологічний стан ізолюваних меристем. Оптимізація цих параметрів є необхідною умовою для підвищення результативності оздоровлення винограду та впровадження термотерапії в біотехнологічну практику. Незважаючи на те, що деякі дослідники надають перевагу проведенню термотерапії *in vivo*, наше дослідження зосереджено на термотерапії *in vitro*, оскільки цей підхід дозволяє максимально контролювати всі фактори середовища та стандартизувати умови експерименту. В умовах *in vivo* на виноградну лозу впливає багато зовнішніх чинників, які можуть впливати на достовірність прояву теплового стресу щодо вірусної інфекції, що ускладнює порівняння ефективності оздоровлення для різних типів вірусів. Використання стабільного середовища, єдиного генетичного фону та усунення коливань вологості, температури й властивостей ґрунтового субстрату створює можливість об'єктивно оцінити ефективність термотерапії та виявити біологічну чутливість вірусів до теплового стресу. Крім того, в кожному конкретному випадку необхідно знати реакцію різних сортів винограду на проведення термотерапії, режим термообробки, а також тривалість проведення термообробки для різних патогенів і відсоток оздоровлення рослин.

З огляду на вищенаведене, **метою** нашого дослідження було – визначити ефективність поєднання термотерапії і культивування апікальних меристем *in vitro* для оздоровлення винограду від вірусу скручування листя та оцінити життєздатність і регенераційний потенціал отриманих мікроклонів.

Матеріали та методика досліджень. Робота виконувалась у лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження та біотехнології винограду ННЦ «ІБіВ ім. В. Є. Таїрова» протягом 2022–2024 рр. Матеріалом для роботи були мікроклональні рослини та апікальні меристеми технічного сорту винограду «Одеський чорний».

У польових умовах шляхом проведення візуальної селекції винограду були виявлені кущі з візуальними симптомами 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*). Підготовку розчинів імуноглобулінів, кон'юганту і субстрату проводили згідно до інструкцій комерційних тест-наборів

ІФА (*AgriTest*, Італія). Використовували мікропланшети фірми «*Falcon*». Буферні розчини для проведення ІФА готували згідно інструкції виробника до комерційних наборів ІФА (*AgriTest*, Італія). В якості субстрату використовували п-нітрофенілфосфат (п-НФФ) (*Serva*, Німеччина). Інкубацію зразків з реакційною сумішшю проводили в термостаті-шейкері «*Dynatec*» (США) по дві години при $t = +37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Введення ініціальних експлантів винограду в культуру *in vitro* проводили згідно прийнятої в установі технології [26]. Культивування ініціальних експлантів винограду здійснювали в культуральних боксах за наступних параметрів: температура 24–25 °С, 16-годинний фотоперіод, освітлення 2500–3000 лк., вологість повітря 60–70 %.

Для введення в культуру *in vitro* ініціальних експлантів винограду використовували поживне середовище Мурасіге і Скуга (МС), що містило 0,5 мг/л 6-БАП і 0,1 мг/л ІОК; для мікророзмноження, укорінення та проведення термотерапії – МС, що містило 0,2 мг/л 6-БАП і 0,3 мг/л ІОК та половинну кількість макросолей; для культивування апікальних меристем – МС 2, що містило збільшену кількість вітамінів, фітогормонів та гібереллової кислоти [27].

Ініціальні експланти, які використовували у роботі: одновічкові чубуки із бічною брунькою, верхівки пагонів (верхівкові сегменти) (для введення в культуру *in vitro*) та апікальні меристеми розміром 0,5–0,7 мм для етапу оздоровлення рослин, а також сформовані мікроклони.

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.

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.

Кількість ініціалей для кожного варіанту досліджень та контрольних дорівнювала 30 шт., по 10 шт. у повторності. Ініціальні експланти та сформовані рослини культивували у скляних ємкостях діаметром 40 мм, висотою 150 мм. Об'єм поживного середовища дорівнював 20–25 мл. У цих ємкостях рослини знаходились і під час термотерапії.

Роботу проводили за наступною схемою дослідів:

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

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

Варіант 3 – Культивування АМ + подальша термотерапія мікропагонів;

Варіант 4 (Контроль 2) – Культивування АМ без термотерапії.

У роботі використовували: мікробіологічні, молекулярно-біологічні та біотехнологічні методи досліджень. Визначали: кількість життєздатних мікроклонів

та мікропагонів (%), рівень регенерації ініціальних експлантів (%), кількість утворених пагонів (шт.), їх висоту (см), кількість оздоровлених рослин (%).

Результати досліджень. Упродовж 2023–2024 рр. було проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень південних районів Одеської області з метою виявлення вірусних інфекцій. У результаті обстежень, проведених у липні 2023 та у червні 2024 року, на насадженнях сорту «Одеський чорний» були виділені кущі з характерними симптомами хвороби скручування листя винограду. Із цих рослин відібрано зразки для лабораторного тестування, за результатами якого підтверджено наявність вірусу скручування листя винограду 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3*).

Оздоровлення винограду *in vitro* шляхом застосування термотерапії та культивування апікальних меристем ми 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 однорічкові чубуки та верхівкові сегменти, довжиною 0,8–1,0 см.

Перед проведенням термотерапії рослини було протестовано на наявність вірусу скручування листя винограду 3 (*GLRaV-3*), результати тестування були позитивними. Для отримання необхідної кількості матеріалу 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. Після зняття температурного стресу у рослин виділяли апікальні меристеми і переносили їх на поживне середовище МС 2.

Другий спосіб проведення термотерапії. Із апікальних верхівок уражених пагонів, які використовували у 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 15–20 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 однорічкові 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. 1). Згідно з отриманими результатами, у варіанті 1 (термотерапія мікроклональних рослин + подальше культивування АМ) та у контрольному варіанті 2 (культивування мікроклональних рослин без термотерапії + подальше культивування АМ) 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 АМ + подальша термотерапія мікропагонів) життєздатність рослин знижувалася до 48 %, а у контрольному варіанті 4 (культивування АМ без термотерапії) – до 70 %.

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 АМ і характеризувалися нижчою стійкістю до температурного стресу.

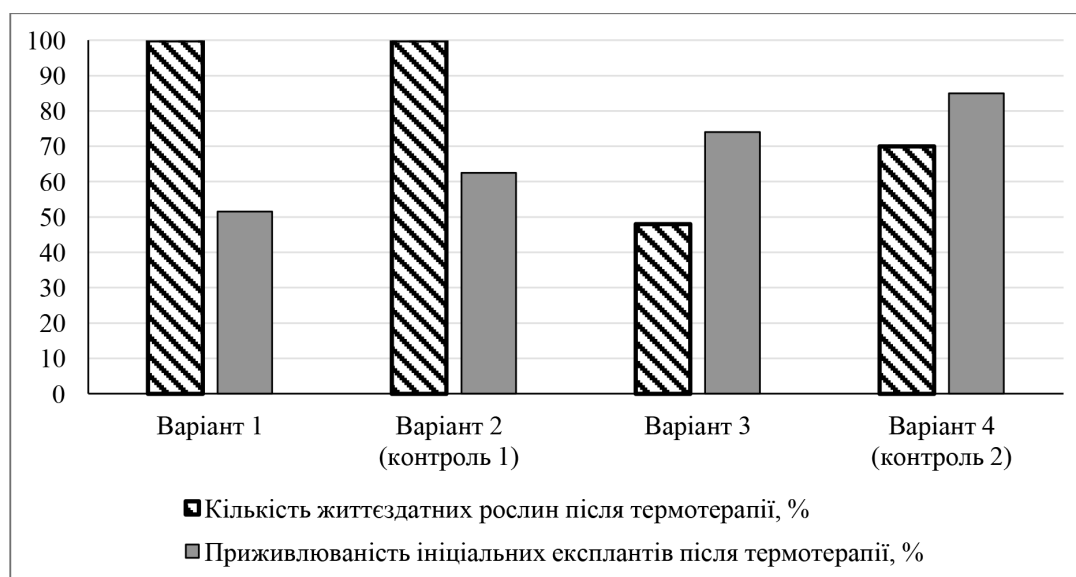


Рис. 1. Життєздатність та регенераційний потенціал ініціальних експлантів винограду після термотерапії

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 АМ, 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) (Рис. 1). Встановлено, що приживлюваність ініціальних експлантів винограду після проведення термотерапії істотно залежала від послідовності поєднання термічної обробки з етапом культивування АМ. Так, у варіанті 1 (термотерапія + культивування АМ) 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 першого варіанту. У варіанті 3 (культивування АМ перед термотерапією) спостерігалось суттєве підвищення приживлюваності до 74 %, що пояснюється позитивним ефектом висаджування на свіжі поживні середовища ініціальних експлантів великих розмірів. Максимальна приживлюваність ініціальних експлантів (85 %) була у варіанті 4 (контроль 2), де термотерапія не застосовувалася.

Протягом 60 діб культивування АМ та сегментів пагонів великих розмірів, після проведення термотерапії, встановлювали особливості розвитку пагонів (рис. 2).

Як результат, було встановлено наступне. У варіантах 1 і 2, де пагони формувались з АМ 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 з АМ [28]. У варіантах 3 і 4, де пагони формувались із ініціальних експлантів великих розмірів 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 одновіркових чубуків [26].

Через шість місяців після культивування мікроклональних рослин в умовах культурального боксу було проведено повторне лабораторне тестування на наявність вірусу скручування листя винограду. Отримані результати свідчать про високу ефективність комбінування методів термотерапії та культивування АМ 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 лише метод культивування АМ без термічної обробки, кількість оздоровлених рослин була нижчою і знаходилась на рівні 60,0 і 62,0 % відповідно. Це підтверджує доцільність поєднання термотерапії з культивуванням АМ для підвищення ефективності оздоровлення виноградних рослин від вірусних інфекцій. 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 доквілля необхідно проводити повторне тестування для підтвердження стабільності оздоровленого стану рослин [29].

Висновки. Проведене дослідження підтверджує важливість і ефективність застосування комбінації методів термотерапії *in vitro* та культивування апікальних меристем для оздоровлення винограду від вірусу скручування листя (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

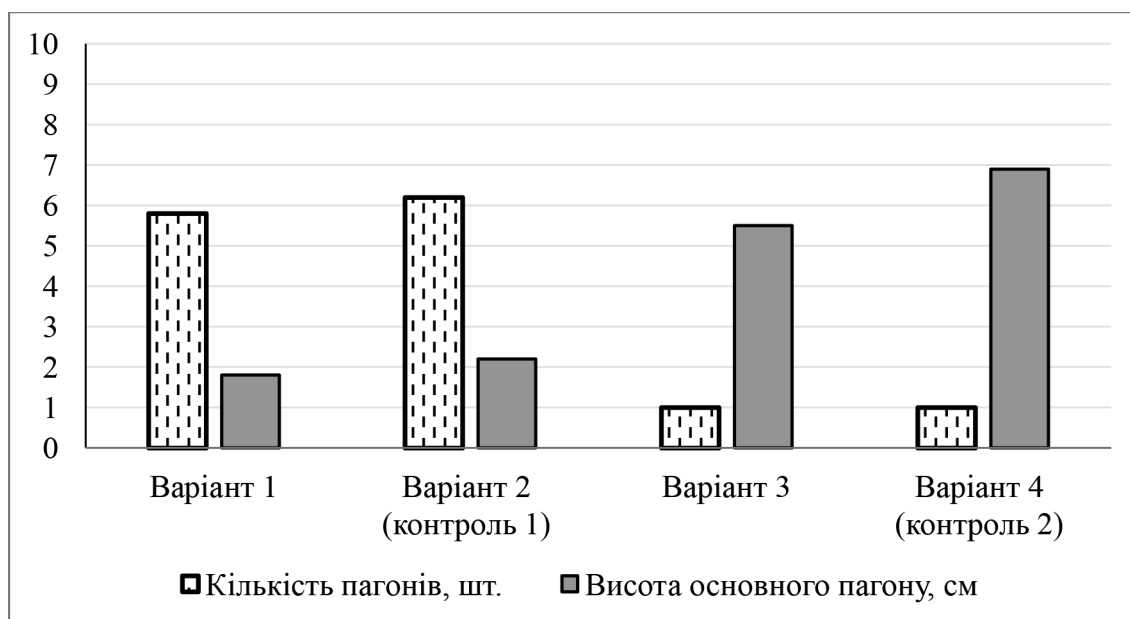


Рис. 2. Розвиток ініціальних експлантів винограду сорту «Одеський чорний» після проведення термотерапії

застосовували одночасно термотерапію і культивування апікальних меристем (незалежно від послідовності проведення процесів), відсоток оздоровлених рослин становив 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.

У подальших дослідженнях щодо оздоровлення садивного матеріалу винограду в культурі *in vitro* необхідно дослідити застосування комплексу методів термотерапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

- Camargo U. A., Toniello J., Hoffmann A. Progressos na viticultura brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2011. Vol. 33. No. 1. P. 144–149. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500017>
- Ruiz V. S. Advances in grape culture worldwide. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2011. Vol. 33. No. 1. P. 131–143. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500016>
- 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>
- Marcos Fernando Basso, Thor Vinicius Martins Fajardo, Pasquale Saldarelli 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>
- Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D., Rowhani A. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*. 2009. Vol. 387. No. 2. P. 395–401. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.028
- Al Rwahnih M., Golino D., Rowhani A. First report of Grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in the United States. *Plant Disease, Saint Paul*. 2016. Vol. 100. No. 5. P. 1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1235-PDN>
- 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.
- 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>
- 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
- 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>
- 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, Amsterdam*. Vol. 123. 2009. No. 2. P. 280–282. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.08.016
- Hans J. Maree, Rodrigo P. P. Almeida, Rachelle Bester, Kar Mun Chooi, Daniel Cohen, Valerian V. Dolja, Marc F. Fuchs, Deborah A. Golino, Anna E. C. Jooste, Giovanni P. Martelli, Rayapati A. Naidu, Adib Rowhani, Pasquale Saldarelli, Johan T. Burger Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*. 2013. Vol. 4. No. 82. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082
- Křížan B., Ondrušková E., Holleínová 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
- 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>
- 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>
- 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
- Bayati S., Shams-Bakhsh M., Moien 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
- 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. 237–43. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0215a
- MinRui Wang, ZhenHua Cui, JingWei Li, XinYi Hao, Lei Zhao and QiaoChun Wang *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*. 2018. P. 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Chinestra S. C., Curvetto N. R., Marinangeli P. A. (2015) Production of virus-free plants of *Lilium* spp. from bulbs obtained *in vitro* and *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*. Vol. 194. P. 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.015>

21. 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.
22. Dziedzic 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.
23. 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. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x
24. 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
25. 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. 2004. *J. Plant. Pathol.* Vol. 86. P. 183–195.
26. Зеленьанська 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.
27. Зеленьанська 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>
28. Guojun Hu, Yafeng Dong, Zunping Zhang, Xudong Fan, Fang Ren Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 271. P. 109462
29. Vanja Miljanić, Denis Rusjan, Andreja Škvarč, Philip pe Chatelet, and Nataša Štajner 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>
30. in Viral Prospection and Management. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39 (1), 2–22. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017411>
31. Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, A. (2009) Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus, *Virology*, 387 (2), 395–401. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.028
32. Al Rwahnih, M., Golino, D., & Rowhani, A. (2016) First report of Grapevine Pinot gris virus infecting grapevine in the United States. *Plant Disease, Saint Pau*, 100 (5), 1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1235-PDN>
33. Martelli, G. P. (2014) Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 1–136.
34. Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., & Fuchs, M. (2004) Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant. Pathol.*, 86, 183–195. <https://www.researchgate.net/publication/242759853>
35. Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte P., Terlizzi, F., Credi, R., & Saldarelli, P. (2012) A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in *Cv Pinot gris*. *Virus Res.*, 163, 262–268. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.10.010
36. Sudarshana, M. R., Perry, K. L., & Fuchs, M. F. (2015) Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology*, 105, 1026–1032. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0369-FI>
37. Maliogka, V. I., Skiada, F. G., Eleftheriou, E. P., & Katis, N. I. (2009) 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*, 123 (2), 280–282. DOI:10.1016/j.scienta.2009.08.016
38. Hans J. Maree, Rodrigo P. P. Almeida, Rachelle Bester, Kar Mun Chooi, Daniel Cohen, Valerian V. Dolja, Marc F. Fuchs, Deborah A. Golino, Anna E. C. Jooste, Giovanni P. Martelli, Rayapati A. Naidu, Adib Rowhani, Pasquale Saldarelli, & Johan T. Burger (2013) Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, 4 (82). DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082
39. Křižan, B., Ondrušiková, E., Holleínová, V., Moravcová, K., & Bláhová, L. (2009) Elimination of Grapevine fanleaf virus in grapevine by *in vivo* and *in vitro* thermotherapy. *Hort. Sci.* (PRAGUE), 36 (3), 105–108. DOI: 10.17221/37/2008-HORTSCI
40. Panattoni, A., & Triolo, E. (2010) Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on *in vitro* collection of Kober 5BB. *Scientia Horticulturae*, 125 (1), 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.001>
41. Luvisi, A., Panattoni, A., & Triolo, E. (2011) Thiopurine prodrugs for plant chemotherapy purposes. *Journal of Phytopathology*, 159 (5), 390–392. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01779.x>
42. Borroto-Fernandez, E. G., Sommerbauer, T., Popowich, E., Scharti, A., & Laimer, M. (2009) Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis vinifera* cv. Domina leads to Arabis mosaic virus-free

REFERENCES:

1. Camargo, U. A., Tonietto, J., & Hoffmann, A. (2011) Progressos na viticultura brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33 (1), 144–149. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500017>
2. Ruiz, V. S. (2011) Advances in grape culture worldwide. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33 (1), 131–143. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500016>
3. Maliogka, V. I., Olmos, A., Pappi, P. G., Lotos, L., Efthimiou, K., Grammatikaki, G., Candresse, T., Katis, N. I., & Avgelis, A. D. (2015b) A novel grapevine badnavirus is associated with the *Roditis* leaf discoloration disease. *Virus Research, Amsterdam*, 203, 47–55. <https://DOI: 10.1016/j.virusres.2015.03.003>
4. Marcos Fernando Basso, Thor Vinicius Martins Fajardo, & Pasquale Saldarelli (2017) Grapevine Virus Diseases : Economic Impact and Current Advances

- plants. *European Journal of Plant Pathology*, 124 (1), 171–174. DOI: 10.1007/s10658-008-9404-0
17. Bayati, S., Shams-Bakhsh, M., & Moiens, A. (2011) Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryotherapy and electrotherapy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13 (3), 442–450.
 18. AlMaarri, K., Massa, R., & AlBiski, F. (2012) Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate *Potato Y potyvirus* from infected potato plants. *Plant Biotechnol*, 29, 237–43. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.12.0215a
 19. MinRui Wang, ZhenHua Cui, JingWei Li, XinYi Hao, Lei Zhao & QiaoChun Wang (2018) *In vitro* thermotherapybased methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
 20. Chinestraa, S. C., Curvettoa, N. R., & Marinangeli, P. A. (2015) Production of virus-free plants of *Lilium* spp. from bulbs obtained *in vitro* and *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 194, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.015>
 21. Lozoya-Saldana, H., & Dawson, W. O. (1982) Effect of alternating temperature regimes on reduction or elimination of viruses in plant tissues. *Phytopathology*, 72 (8), 1059–1064.
 22. Dziedzic, E. (2008) Elimination of *Prunus* necrotic ring spot virus (PNRSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 6 (16), 101–109.
 23. Wang, Q., Cuellar, W. J., Rajamaki, M. L., Hirata, Y., & Valkonen, J. P. T. (2008) 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*, 9 (2), 237–250. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x
 24. Cheong, E. J., Jeon, A. R., Kang, J. W., Mock, R., & Kinard, G. Li R. (2014) *In vitro* elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (*Rubus occidentalis*). *Hort. Sci.*, 2, P. 95–99. DOI: 10.17221/266/2013-HORTSCI
 25. Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., & Fuchs, M. (2004) Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant. Pathol.*, 86, 183–195.
 26. Zelenianska, N. M. (2016) Naukove obgruntuvannya ta rozrobka suchasnoi tekhnolohii vyroshchuvannya sadyvnoho materialu vynohradu [Scientific substantiation and development of modern technology in culture of grapevine planting]: dys.... d-ra. s.-h.. nauk : 06.01.08. Odesa. [in Ukrainian].
 27. Zelenianska, N. M., & Riabyi, M. I. (2024) Zastosuvannya metodu apikalnykh merystem dlia rozmnozhenia vynohradu *in vitro* [Application of the method of apical meristems for grape propagation *in vitro*]. *Visnyk Umanskoho natsionalnoho universytetu sadivnytstva* 2, 55–61. DOI <https://doi.org/10.32782/2310-0478-2024-2-55-61> [in Ukrainian].
 28. Guojun Hu, Yafeng Dong, Zunping Zhang, Xudong Fan, & Fang Ren (2020) Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Scientia Horticulturae*, 271, 109462.
 29. Miljanić, V., Rusjan, D., Škvarč, A., Chatelet, P., & Štajner, N. (2022) 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*, 11, 1064. <https://doi.org/10.3390/plants11081064>.

Зеленянська Н. М., Рябий М. І. Оздоровлення винограду у культурі тканин і органів *in vitro*

У статті представлено результати досліджень, спрямованих на оздоровлення винограду від вірусу скручування листя (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3) за допомогою поєднання методів термотерапії *in vitro* та культивування апікальних меристем. Враховуючи актуальність проблеми вірусних інфекцій винограду, які знижують врожайність, погіршують якість ягід та технологічні властивості виноматеріалів, забезпечення санітарної чистоти садивного матеріалу є одним із ключових напрямів підвищення продуктивності та стабільності виноградарства. **Мета** – визначити ефективність поєднання термотерапії і культивування апікальних меристем *in vitro* для оздоровлення винограду від вірусу скручування листя та оцінити життєздатність і регенераційний потенціал отриманих мікроклонів. У роботі використовували: мікробіологічні, молекулярно-біологічні та біотехнологічні методи досліджень. Матеріалом для дослідження були мікроклональні рослини та апікальні меристеми технічного сорту винограду «Одеський чорний», отримані з кущів із характерними симптомами скручування листя. Вірусну інфекцію підтверджували методом імуноферментного аналізу (ІФА). Культивування ініціальних експлантів проводили на модифікованих поживних середовищах Мурасіге і Скуга, які характеризувалися підвищенням вмісту фітогормонів і вітамінів. **Результати.** Для оздоровлення рослин винограду було застосовано дві комбінації методів термотерапії і культивування апікальних меристем. Перша – термотерапія сформованих мікроклональних рослин із подальшим виділенням та культивуванням апікальних меристем; друга – культивування апікальних меристем із наступною термотерапією мікроклонів. Термотерапію проводили в термокамері протягом 8 тижнів при температурі 37 °C з поступовим підвищенням від 25 °C і 16-годинним фотоперіодом. Отримані результати свідчать про високу ефективність поєднання обох методів для оздоровлення винограду від вірусу GLRaV-3. Показано, що приживлюваність ініціальних експлантів після проведення термотерапії та культивування апікальних меристем (незалежно від послідовності проведення процесів) становила 51,5–74,0 %, із кожного експланта формувалось від 1,0 до 5,8 пагонів, довжина яких коливалася від 1,8 до 5,5 см. Кількість рослин, оздоровлених від вірусу, досягла 85,0–88,0 %, що підтверджує високу ефективність комбінації методів у порівнянні з використанням лише культури апікальних меристем. При цьому спостерігалася висока життєздатність і стабільність морфологічних характеристик регеноерованих мікроклонів. **Висновки.** Поєднання термотерапії *in vitro* та культивування апікальних меристем є ефективним методом оздоровлення винограду від вірусу скручування листя (GLRaV-3), що забезпечує високий рівень елімінації вірусу, мікроклональні рослини рослини характеризуються високою приживлюваністю, регенераційним потенціалом і стабільними морфологічними ознаками.

Ключові слова: виноград, культура *in vitro*, мікроклони, GLRaV-3, оздоровлення винограду, термотерапія, апікальні меристеми.

Zelenianska N. M., Riabyi M. I. Sanitation of grapevines in tissue and organ culture *in vitro*

The article presents the results of a study aimed at sanitizing grapevine from Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) using a combination of *in vitro* thermotherapy and apical meristem culture. Considering the relevance of viral infections in grapevine, which reduce yield, deteriorate berry quality, and impair the technological properties of wine materials, ensuring the sanitary health of planting material is one of the key strategies to enhance productivity and stability in viticulture. **Purpose.** The study aimed to evaluate the effectiveness of combining *in vitro* thermotherapy and apical meristem culture for the sanitation of grapevine from leafroll virus and to assess the viability and regenerative potential of the resulting microclones. Microbiological, molecular-biological, and biotechnological methods were employed. The material comprised microclonal plants and apical meristems of the technical grapevine cultivar *Odeskyi chornyi*, obtained from vines exhibiting typical leafroll symptoms. Viral infection was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The initial explants were cultured on modified Murashige and Skoog media enriched with phytohormones and vitamins.

Results. Two combinations of thermotherapy and apical meristem culture were applied for grapevine sanitation. The first involved thermotherapy of established microclonal plants followed by isolation and culture of apical meristems; the second involved culturing apical meristems followed by thermotherapy of microshoots. Thermotherapy was conducted in a growth chamber for 8 weeks at 37 °C, gradually increased from 25 °C, with a 16-hour photoperiod. The results demonstrated high efficiency of combining both methods for grapevine sanitation from GLRaV-3. The survival rate of initial explants after thermotherapy and apical meristem culture (regardless of process sequence) ranged from 51.5 to 74.0 %, with each explant producing 1.0 to 5.8 shoots, 1.8 to 5.5 cm in length. The proportion of virus-free plants reached 85.0–88.0 %, confirming the high efficacy of the combined approach compared to apical meristem culture alone. High viability and stable morphological characteristics of the regenerated microclones were also observed. **Conclusions.** The combination of *in vitro* thermotherapy and apical meristem culture is an effective method for sanitizing grapevine from Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), ensuring a high level of virus elimination. The resulting microclonal plants exhibit high survivability, strong regenerative potential, and stable morphological traits.

Key words: grapevine, *in vitro* culture, microclones, GLRaV-3, grapevine sanitation, thermotherapy, apical meristems.

Дата першого надходження рукопису до видання: 27.10.2025

Дата прийнятого до друку рукопису після рецензування: 28.11.2025

Дата публікації: 14.12.2025