

*Н. А. Мулюкіна,  
Н. М. Зеленьянська,  
Д. Ю. Лосєва,  
Н. І. Ніколасва,  
О. М. Карастан,  
Г. В. Плачинда*

Национальный научный центр  
«Институт виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова»,  
Украина

## МЕТОДИ ОЗДОРОВЛЕННЯ ВІД ВІРУСІВ ВІНОГРАДУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КУЛЬТУРИ IN VITRO

*В огляді проаналізовано основні методи оздоровлення винограду від вірусів, які охоплені системою сертифікації садивного матеріалу винограду. Методи, оптимальні з точки зору ефективності оздоровлення та мінімального негативного впливу на стан рослин, застосовані для вилучення з тканин винограду вірусу третього серотипу скручування листя винограду з подальшою санітарною та генетичною оцінкою стану рослин.*

**Ключові слова:** виноград, вірусні хвороби, скручування листя, борознистість деревини, культура in vitro, термотерапія, хемотерапія.

Культура тканин винограду in vitro є багатоцільовим біотехнологічним інструментом, який використовується для прискореного розмноження та скринінгу генотипів, їх оздоровлення за допомогою термотерапії та хемотерапії.

Цілком природно, що система виробництва садивного матеріалу категорії «сертифікований», яка базується на виділенні та розмноженні безвірусних клонів сортів винограду, широко використовує культуру in vitro на усіх зазначених вище напрямках. Беручи до уваги той факт, що виноград уражається великою кількістю вірусів – близько 60 [1], які негативно впливають на агробіологічні показники винограду та економіку виноградарства в цілому через зниження якості та кількості врожаю, оптимізація методів отримання безвірусного вихідного матеріалу залишається актуальною проблемою сертифікованого виноградного розсадництва.

**Метою** нашого огляду було визначення найбільш ефективних сучасних прийомів отримання безвірусного садивного матеріалу винограду за допомогою культури in vitro для подальшого застосування у вилученні третього серотипу вірусу скручування листя та вірусу А винограду.

**Матеріал та методи.** В якості матеріалу було застосовано сорт Каберне Совінйон, уражений третім серотипом вірусу скручування листя та сорт Ранній Магарача, уражений вірусом А винограду.

Для підтвердження ураження та ідентифікації вірусу на вихідних рослинах було використано імуноферментний аналіз за допомогою діагностичних наборів фірми «AgriTest» (Італія).

Для оздоровлення було використано культуру апексів із подальшим додаванням до середовища проліферації рибавіріну в концентрації 40 мг/мл.

Попередню оцінку ефективності оздоровлення від третього серотипу ВСЛВ проводили за допомогою методу прискореного скринінгу на провокаційних середовищах із сорбітолом.

Виділення ДНК для оцінки генетичної стабільності проводили за методом, розробленим співробітниками Південного біотехнологічного центру (м.Одеса).

### **Культура меристем та термотерапія in vitro.**

Класичними методами оздоровлення в культурі in vitro залишаються культура апексів та культура меристем, як окремо, так і у сполученні із термо- та хемотерапією, які мають різний рівень успіху.

Перші роботи в плані застосування методів культури тканин до оздоровлення винограду від вірусів були проведені в університеті Девіс, Каліфорнія.

Це дозволило значно покращити методику з огляду на відсоток оздоровлених рослин та на виживання рослин після обробки [2].

У роботі Сім із співавторами [3] серед 197 сортів винограду, які були піддано культурі меристем, було отримано 87 % оздоровлених. Серед 12,7 % сортів, які були позитивно тестовані на віруси після обробки, більшість (10,2% ) були позитивно тестовані на вірус, асоційований із

ямчатістю деревини винограду. Менше, ніж 2% рослин були позитивно тестовані на віруси скручування листя, коротковузля, мармуровість, віруси А, В та Д винограду, асоційовані з борознистістю деревини. Наявність вірусу у вихідних експлантів та їх відсутність у матеріалі після культури меристем було підтверджено глибоким секвенуванням 10 експлантів з вибірки.

### ***Хемотерапія.***

В останнє десятиріччя пошукові роботи в галузі отримання безвірусного вихідного матеріалу винограду спрямовані на пошук методів, які доповнюють класичні методи культури *in vitro* (культура апексів, культура меристем, термотерапія) або є альтернативними до них, та водночас – більш ефективними. З цієї точки зору оптимізація методичних засад отримання безвірусного вихідного матеріалу винограду в культурі *in vitro* є актуальною, особливо з точки зору визначення чинників, які підвищують ефективність видалення вірусів із тканин винограду та їх оптимального поєднання. Одним з малодосліджених напрямків є хемотерапія.

Серед антивірусних сполук найчастіше для видалення вірусів найчастіше використовується рибавірин. Рибавірин в комплексі з термотерапією був успішно використаний для видалення вірусу А винограду на сортах Вітіс вініфера [4], вірусу, асоційованого із ямчатістю деревини сорта Рупестріс та вірусу мармуровості винограду на сорті Сіра.

В роботі Малк із співавторами [1] (CSIRO, Австралія), дії рибавірину були піддані сорти Рондинелла и Корвина Веронезе, які були використані в якості експлантів *in vitro* для видалення вірусів мармуровості та ямчатості деревини винограду.

Обробка включала кілька варіантів, в тому числі використання температури 25 градусів та концентрації рибавірину на рівні 25 мкг/мл, а також термотерапію без хемотерапії. В усіх застосованих варіантах було отримано частину здорових від вірусу ямчатості деревини експлантів.

Дане дослідження демонструє, що рибавірин є більш ефективним, ніж термотерапія, крім того, не було показано загибелі рослин та ненормальностей розвитку у оброблених рослин. Проте експланти із середовищ з рибавірином показали уповільнення росту без зміни забарвлення (порівняно із термотерапією).

Автори вважають, що потрібні подальші дослідження для встановлення того факту, чи оздоровлення пов'язане із повним видаленням вірусу або із супресією його реплікації.

Skiada et al [5] застосували хемотерапію в культурі *in vitro* та паралельно – термотерапію із культурою меристем для вилучення із тканин грецького сорту Аргіоргітіко вірусу ямчатості деревини винограду. В якості терапевтичних агентів використовували тіазофурін, рибавірин та мікофенольну кислоту в концентраціях від 10 до 80 мг/мл, доданих до проліфераційного середовища. Максимальна тривалість обробки складала 80 діб.

Було показано, що противірусна активність зазначених препаратів може бути порівняна із рівнем отримання здорових рослин за допомогою комбінації традиційних методів – термотерапії та культури меристем та культури верхівок та термотерапії.

В роботі Guta та Buciumeanu [6] проводилось порівняльне дослідження хемотерапії на видалення вірусів коротковузля, першого та третього серотипів ВСЛВ та вірусу мармуровості винограду із сортів Фетяска біла, Ранній Магарача, Канер та Каберне Совіньйон з колекції Національного дослідного інституту Біотехнології у плідівництві (Штефанешті-Агрес, Румунія). В основі методики було піддання апексів винограду (0,2 – 0,3 см) впливу хімічних речовин, доданих у середовище Мурасіге та Скуга. Було випробувано рибавірин у концентраціях 10, 20 та 40 мг/мл та оселтамвір (як джерело оселтамвіру фосфату використовувався препарат Таміфлю) у концентраціях від 37,5, до 112,5 мг/л, які додавалися на трьох послідовних субкультиваціях на етапі проліферації. Загальний термін обробки складав від 30 до 90 днів.

На відміну від ряду попередніх робіт було показано, що обробка рибавірином у зазначених концентраціях викликала токсичний ефект, вітрифікацію та некротичні ушкодження на листі. Найбільш ефективною обробка рибавірином була для вилучення вірусу коротковузля винограду у концентрації 40 мг/л протягом 30 днів (33,3% оздоровлених рослин). Рибавірин був неефективним у видаленні вірусів, асоційованих із першим та третім серотипами вірусу скручування листя.

Проте ефективність рибавірину для видалення вірусів комплексу скручування листя підвищується при зменшенні розміру верхівок пагонів, які використовувалися для обробки, до 1 мм, при цьому рибавірин у концентрації 10мг/л повністю видаляє третій серотип ВСЛВ та комплекс першого і третього серотипів ВСЛВ[7].

### ***Основні групи антивірусних речовин та біохімічні механізми їх дії.***

Черговим початком підвищеної уваги до методу хемотерапії стали 2000-ні роки, коли

головним методом вилучення вірусів із тканин винограду була термотерапія та культура меристеми. Для ряду робіт, які проводилися на зазначеному напрямку, важливим було оцінити ефективність сполук із різним механізмом впливу на вірусну інфекцію.

В роботі Panattoni [8] для оздоровлення матеріалу сорту Сагрантіно від ВСЛВ 1,3 та вірусу А винограду було використано 4 антивірусні сполуки, які спроможні інгібувати вірусну реплікацію – амантадін, ДГТ (2,4 діоксо-гексагідро-1,3,5 триазин), аденін, рибавірін, які використовувались у нефітотоксичних концентраціях [9]. Серед використаних антивірусних речовин ефективним проти усіх вірусів виявився лише рибавірін, доданий у середовище для проліферації у концентрації 20 мг/мл.

Обробка хімічними речовинами розглядається як потенційна можливість отримання рослин, вільних від вірусної інфекції, незважаючи на те, що кілька речовин вже виявили свій потенціал відносно видалення вірусу із тканин або істотного зниження його концентрації у тканинах [10]. Кількість цих речовин є значно меншою порівняно із антивірусними препаратами, які використовуються у медицині. Вірусологія рослин бере корисну інформацію саме з медичних досліджень, наприклад, стосовно рибавіріну. Цей підхід дозволив використати проти багатьох вірусів рибавірін [11] тіазофурін [12], мікофенольну кислоту [13]. Відповідно до результатів медичних досліджень, ці сполуки інгібують активність інозин монофосфат дегідрогенази, ключову точку біосинтезу пуринів.

Інший механізм дії антивірусних речовин, який розглядається в роботі Luvisi et al. [14], стосується часткового впливу на біосинтез пуринів. Цей механізм стосується сполуки 2-аміно-6-меркаптопуріну, яка перетворюється на тіоінозинову кислоту, що інгібує ряд реакцій, які відносяться до інозинмонофосфату та його перетворення у ксантозинмонофосфат, який є альтернативним субстратом інозин монофосфат дегідрогенази [15].

Застосування даної сполуки до хіміотерапії винограду сорту Сагрантіно, ураженого першим та третім серотипом ВСЛВ, в культурі *in vitro* із додаванням її до середовища проліферації протягом 30 днів показала, що як в контролі, так і в досліді не було загиблих рослин (до досягнення концентрації 0.30 мМ.) Вплив препарату на вірусну інфекцію позначався, насамперед, у прогресуючому зниженні концентрації вірусу в ІФА в залежності від кратності обробок, проте навіть трикратна обробка не приводила до повного вилучення вірусу. Автори вважають, що очевидний вплив препарату на вірус скручування листя винограду демонструє перспективність цього класу сполук проти вірусів рослин.

Дослідження Panattoni et al [16] були спрямовані на відпрацювання раціональної стратегії застосування антивірусних речовин для отримання вихідного безвірусного матеріалу. Автори зазначають, що попередні дослідження в цій галузі були сфокусовані на обмеженій кількості антивірусних речовин: рибавірін, ДХТ (2,4-діоссоседро-1,3,5 – триазин) та ДХПА ((С) – 9-(2,3-діоссопропиладенін [8]. Таким чином, лише невелика кількість сполук, які отримані для лікування людини від вірусної інфекції, може ефективно використовуватися проти вірусів рослин та видаляти їх повністю або істотно знижувати концентрацію вірусних часток у тканинах винограду [10].

De Clercq [17] підкреслює, що наявні терапевтичні антивірусні сполуки класифікуються за механізмом їх антивірусної дії. Автори вирішили застосувати ряд сполук із різним механізмом антивірусної дії для видалення з тканин винограду третього серотипу вірусу скручування листя на сорті Санджовезе. До першої групи належали обрані сполуки тіазофурін, мікофенольна кислота, бензамід рибозид та сінленазол, які інгібують активність інозин монофосфат дегідрогенази та оселтамвір, який належить до групи сполук, що інгібують активність нейрамінідази. Результат показав, що обидві групи речовин спроможні видаляти третій серотип ВСЛВ із тканин винограду на високому рівні ( від 40 - 50 % ).

Ще одною групою сполук з антивірусною активністю, яка останнім часом активно досліджується в Україні (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України), є група екологічно безпечних комплексних біопрепаратів широкого спектру дії на основі грибних та бактеріальних гліканів та гліколіпідів різної хімічної будови, що мають антивірусну та антимікробну активність.

Попередні дані, отримані авторами, свідчать про те, що цій групі препаратів притаманна профілактична та терапевтична дія щодо вірусних і бактеріальних хвороб ряду культур (табак, картопля). Більше того, показано, що глікани стимулюють схожість та енергію проростання насіння та ріст і розвиток рослин [18]. Ця група препаратів є перспективною, оскільки їх застосування не впливає негативно на рослину. Як відомо, у практиці боротьби з вірусними хворобами на сьогодні ще не існує жодного препарату, який би пригнічував збудника, не впливаючи на нормальні метаболічні процеси хазяїна. Проте до оздоровлення винограду від вірусів препарати, які містять вірусні інгібітори біологічного походження [19] та поверхнево активні речовини мікробного

походження [20] та мають високу інгібувальну активність щодо вірусів та бактерій, ще не застосовувалися.

Отже, мала кількість антивірусних речовин, яка використовується у фітовірусології на культурі винограду (порівняно із медициною) та вузький спектр механізмів їх антивірусної активності робить актуальним пошук та застосування нових ефективних антивірусних речовин для отримання вихідного безвірусного матеріалу, на якому базується система сертифікації садивного матеріалу винограду.

#### ***Малопоширені методи контролю та вилучення вірусів винограду в культурі in vitro.***

До малопоширених методів контролю та вилучення вірусів винограду в культурі in vitro відносяться електротерапія, соматичний ембріогенез, кріозберігання рослин та метод провокаційних середовищ.

Електротерапія була застосована Burger [21], але за допомогою методу не вдалося видалити вірусу коротковузля з тканин винограду, а лише зменшити значення оптичної щільності в імуноферментному аналізі.

Пізніше метод електротерапії був успішно застосований Guta та Buciumeanu [6] на дорослих рослинах довжиною 15-20 см, отриманих з одновічкових чубуків в режимі використання постійного електричного поля інтенсивністю 10, 20 та 40 В/см (експозиція складала 5, 10 та 20 хвилин для кожної інтенсивності поля), для видалення комплексу першого та третього серотипів ВСЛВ.

Вплив методу соматичного ембріогенезу на наявність вірусних часток базується на тому, що переміщення вірусів із материнської рослини до рослини, отриманої методом соматичного ембріогенезу блокується за рахунок відсутності судин, по яким він переміщається [22].

Метод соматичного ембріогенезу був успішно застосований для вилучення вірусу скручування листя із тканин винограду [22, 23].

Цікавим є той факт, що завдяки механізму оздоровлення практично усі отримані рослини як через культуру пиляків, так і через культуру сім'япочок.

Метод успішно був застосований для вилучення вірусу мармуровості із сорту Ранній Магарача [24] та третього серотипу вірусу скручування листя із сорту Мюллер Тургау [25]. Ще одним прийомом отримання безвірусного матеріалу є кріозберігання [26], яке було використане Wang et al. [27] для вилучення вірусу А. Рівень оздоровлення, як і при використанні соматичного ембріогенезу, був високим – 97 %. Проте із цієї роботи не зовсім зрозуміло, чи є ефект оздоровлення власне наслідком кріозберігання, чи воно відбувається за рахунок того, що для кріозберігання в культуру вводиться різноплановий матеріал від верхівок пагонів та меристеми до каллусу та ембріонів.

Огляд особливостей малопоширених методів отримання та контролю безвірусного матеріалу дає можливість зробити висновок щодо доцільності продовження досліджень в цих напрямках, оскільки їх високий потенціал у оздоровленні від вірусів (наприклад, соматичного ембріогенезу) та попереднього контролю деяких із них на етапах розмноження, утворення колекцій, оцінки матеріалу після оздоровчих процедур дозволяє підвищити ефективність отримання вихідного безвірусного матеріалу.

Ще одним напрямком застосування методів культури in vitro до контролю вірусної інфекції є методи прискореного скринінгу на ураження вірусами як варіант, альтернативний до індексації щепленням. Класичний метод індексації щепленням в європейській системі сертифікації садивного матеріалу винограду є обов'язковим до застосування, проте його тривалість в середньому складає рік – півтора від щеплення до прояву симптомів.

Спробу прискорити процес біологічної індексації було зроблено в 90-ті роки Tanne et al. [28]. Автори використали мікросщеплення в культурі in vitro для проведення індексації на ураження окорковінням кори винограду і отримали симптоми хвороби через 8 – 12 тижнів.

Другою спробою тих самих авторів у 1996 році було застосування провокаційних середовищ, які індукують водний стрес, що в свою чергу викликає прояв симптомів скручування листя (почервоніння та скручування листя) [29]. Авторами було встановлено, що оптимальним середовищем для виявлення третього серотипу вірусу скручування листя було середовище МС з 0,8 % агаром та 4% сорбітолом.

Як видно, запропоновані методи дають значну перевагу щодо економії часу та витрат праці. Водночас наявність сортової специфіки у прояві симптомів робить необхідним попередні дослідження характеру прояву симптомів на інших сортах, які будуть тестуватися. Не менш важливо дослідити сортову реакцію рослин, уражених першим серотипом ВСЛВ, тестування на ураження яким є обов'язковим у системі сертифікації садивного матеріалу винограду.

### ***Генетичний та санітарний контроль після обробки.***

Проведення генетичного та санітарного контролю після застосування оздоровчих процедур є необхідним для контролю виникнення мутацій та рівня оздоровлення, відповідно. Вивчення можливості індукування генетичних варіацій при використанні культури меристем та при проведенні *in vitro* термотерапії, хемотерапії та електротерапії проводиться сьогодні в багатьох країнах. Наприклад, в інституті біотехнології в Румунії було проведено вивчення RAPD профілів рослин винограду після мікророзмноження і показано мономорфність рослин та їх відповідність контрольним рослинам [30].

Отже, генетичний контроль має на меті контроль можливого появлення генетичних варіацій при застосуванні методів культури *in vitro*, термотерапії та хемотерапії.

Слід зазначити, що виявлення генетичних варіацій буде залежати як від обраного методу контролю, так і від застосованих процедур та їх режимів.

Повторне тестування на вірусну інфекцію є необхідним етапом санітарного контролю при застосуванні методів культури *in vitro*, оскільки вільними від вірусів виявляються лише частка отриманих експлантів. Крім того, лабораторне виявлення патогенів доцільно проводити з огляду на те, що методи оздоровлення можуть викликати лише зниження реплікації замість повного вилучення вірусу. Саме тому важливо, коли буде проведено повторне тестування - одразу після обробки, або через пів-року – рік, тобто вже після адаптації.

В якості методів використовують як ІФА, так і ПЛР, при цьому є відомості щодо того, що чутливість ІФА в ряді випадків відповідає чутливості ПЛР.

Роботи з оздоровлення винограду від вірусів із застосуванням методів культури *in vitro* в ННЦ «Інститут виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова» розпочалися у 80-ті роки минулого сторіччя. Було використано класичну термотерапію вегетуючих рослин із подальшим відбором верхівок пагонів та їх культивуванням *in vitro* та застосовано прийоми хемотерапії із використанням препаратів із мембрано-транспортною активністю синтезовані у фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського та рослинні глікозиди для оздоровлення в культурі апексів рослин винограду сорту Липовина, ураженого борознистістю деревини винограду та сорту Мускат жемчужний, ураженого мозаїкою жилок та першим серотипом ВСЛВ [31]. Отримані результати продемонстрували вплив обох груп препаратів на прояв симптомів скручування листя та мозаїки жилок (відсутність симптомів після обробки).

Мілкусом Б. Н. [32] була успішно застосована термотерапія в культурі *in vitro* для оздоровлення сортів східноєвропейського походження від вірусів коротковузля, мармуровості та скручування листя винограду.

В 2010 – 2013 рр. в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» культуру *in vitro* було застосовано для прискореного скринінгу на ураження скручуванням листя на провокаційних середовищах із сорбітолом та для проведення хемотерапії за допомогою рибавірину в культурі апексів з метою вилучення третього серотипу ВСЛВ та вірусу А винограду. Отримані результати показали відсутність симптомів скручування листя після обробки в культурі *in vitro* за допомогою використання провокаційних середовищ із сорбітолом. Остаточний висновок щодо санітарного стану рослин після хемотерапії в культурі *in vitro* буде отримано після діагностики методом ІФА через рік після адаптації та росту в теплиці. (Мулюкіна Н. А., Зеленянська Н.М., Лосева Д. Ю., Ніколаєва Н. І, неопубліковані дані).

Із трьох зразків сорту Каберне Совіньйон, ураженого третім серотипом вірусу скручування листя винограду (контроль до обробки, культура апексів, хемотерапія в культурі апексів за допомогою рибавірину) було виділено ДНК для проведення подальшого генотипування за 7 мікросателітними локусами для підтвердження генетичної стабільності матеріалу після процедур оздоровлення.

### ***Висновки.***

1. Аналіз даних із застосування культури *in vitro* для цілей оздоровлення винограду від вірусів демонструє високий потенціал термо- та хемотерапії.

2. Показано можливість використання скринінгу в культурі *in vitro* на провокаційних середовищах із сорбітолом на наявність/відсутність симптомів скручування листя винограду на сорті Каберне Совіньйон.

3. Показано вплив обробки рибавірином в культурі апексів на прояв симптомів ураження третім серотипом вірусу скручування листя винограду. Остаточні дані щодо рівня оздоровлення від вірусу та відсутності мутацій будуть отримані за допомогою ІФА та мікросателітних маркерів.

## *Література*

1. Malk H. Elimination of viruses from different varieties of grapevine (*Vitis vinifera* L.) using thermotherapy and chemotherapy / H. Malk, R. Davies, N. Habili, T. Hervel, J. Randles // 17<sup>th</sup> Meet. ICVG, Davis, California, 7 – 14 October, 2012.; extended abstracts. – Davis, 2012. – P. 266 – 267.
2. Golino D. A. The use of shoot tip culture in foundation plant materials service programs / D. A. Golino, S. T. Sim, J. Berezky, A. Rowhani // Proc. Int. Plant Propagation Soc. – 2000. – 50. – P. 568-573.
3. Sim S. Virus elimination from grape selections using tissue culture at foundation plant services, University of California, Davis / S. Sim, M. Al Rwahnih, A. Rowhani, D. Golino // 17<sup>th</sup> Meet. ICVG, Davis, California, 7 – 14 October, 2012.; extended abstracts. – Davis, 2012. – P. 262 – 263
4. Panattoni A. Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy // A. Panattoni, F. D'Anna, C. Cristani, E. Triolo // Journal of Virological Methods. – 2007. - 146. – P. 129–135.
5. Skiada F. Advances on the eradication of Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV) from *Vitis vinifera* explants / F. Skiada, V. Maliogka, E. Eleftheriou, N. Katis //16<sup>th</sup> Meet. ICVG, Dijon, France, 31August - 4 September, 2009.; extended abstracts. – Dijon, 2009. – P. 262 – 263.
6. Guta I. C. Results of chemotherapy and electrotherapy on virus elimination in grapevine / I. Guta, E. Buciumeanu // 16<sup>th</sup> Meet. ICVG, Dijon, France, 31August - 4 September, 2009.; extended abstracts. – Dijon, 2009. – P. 264 – 265.
7. Barba M. Il risanamento della vite: tre tecniche a confronto / M. Barba, L. Martino, A. Cupidi // Vignevini. - 1992. - 3. – P. 33-36.
8. Panattoni A. Effects of antiviral drugs in *Vitis vinifera* infected explants / A. Panattoni, E. Triolo // 14<sup>th</sup> Meet. ICVG, Locorotondo (Bary), Italy, 12 – 17 September, 2003.; extended abstracts. – Locorotondo, 2003. – P. 244.
9. Bertoni P. Micropropagazione ed effetti di alcune molecole ad attività antivirale: indagini su «Sangiovese» / P. Bertoni, S. Biricolti, A. Panattoni and E. Triolo // Proc. Int. Symp. «Il Sangiovese». ARSIA, Firenze. – 2000. – 111. – P. 15-17.
10. Griffiths H. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in vitro potato plantlets / H. Griffiths, S. Slack, H. Dodds // Canadian Journal of Botany. – 1990. - 68. – P. 1515–1521.
11. Panattoni A. Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy/ A. Panattoni, F. D'Anna, C. Cristiani, E. Triolo // Journal of Virological Methods. – 2007. – 146. – P. 129-135.
12. Panattoni A. Antiviral activity of tiazofurin and mycophenolic acid against Grapevine Leafroll-associated Virus 3 in *Vitis vinifera* explants / A. Panattoni, F. D'Anna, E. Triolo //Antiviral research. - 2007. – 73. – P. 206-211.
13. D'Anna F. Termo- e chemioterapia antivirale in vitro / F. D'Anna // Ed. ARACNE, Roma. – 2007. - 94 pp.
14. Luvisi A. 2-amino-6-mercaptopurine: a preliminary study of a novel chemical group for grapevine antiviral therapy / A. Luvisi, A. Panattoni, E. Triolo // 16<sup>th</sup> Meet. ICVG, Dijon, France, 31August - 4 September, 2009.; extended abstracts. – Dijon, 2009. – p. 260 - 261
15. Geary R. Azothiopurine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease / R. Geary, M. Barclay // Journal of Gastroenterology and Hepatology. - 2005. – 20. – P. 1149-1157.
16. Panattoni A. Improvement in grapevine chemotherapy / A. Panattoni, F. D'Anna, E. Triolo // 15<sup>th</sup> Meet. ICVG, Stellenbosh, South Africa, 3 – 7 April, 2006.; extended abstracts. – Stellenbosh, 2006. – p. 139 – 141.
17. De Clercq E. Highlight in the development of new antiviral agents / E.De Clercq // Highlight in the development of new antiviral agents. - Mini Review in Medical Chemistry. – 2002. – 2. – P. 163-175.
18. Використання кормових та пекарських дріжджів для розробки технології отримання біологічно активних гліканів / В. С. Підгорський, О. Г. Коваленко, В. М. Васильєв, О. В. Ісакова // Біотехнологія. – 2010. – 3. № 6. – С. 49-58.
19. Коваленко О. Г. Глікани *Ganoderna adspersum* (Schulzer) Donk: : отримання та антифїтовірусна активність / О. Г. Коваленко, О. М. Поліщук, С. П. Вассер // Біотехнологія. – 2010. – 3, № 5. – С. 82-91.
20. Вільданова-Марцишин Р. І. Перспективи застосування біоПАР у виноградарстві / Р. І. Вільданова-Марцишин, О. В. Карпенко, Н. С. Щеглова, Р. І. Гвоздяк // Виноград. – 2009. –

- № 12(23). – С. 60-61.
21. Burger J. G. Electrotherapy: a possible method to eliminate grapevine fanleaf virus from grapevine / J.G. Burger // 9<sup>th</sup> Meet. ICVG, Kiryat Anavim, Israel, 6-11 September 1987.: proceedings. - Kiryat Anavim, 1989. – P. 153
  22. Goussard P. G. The effectiveness of in vitro somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines / P. G. Goussard, J. Wiid J., G. G. F.Kasdorf // S. Afr. J. Enol. Vitic. – 1991. - 12(2). – P. 77-81.
  23. Schaefer R. Somatic embryogenesis from nucellar tissue for the elimination of viruses from grapevines / R. Schaefer, R. M. Pool, D. Gonsalves // Am. J. Enol. Vitic. – 1994. – 45(4). – P. 472- 473.
  24. Popescu C. F. Somatic embryogenesis, a reliable method for grapevine fleck virus free grapevine regeneration. / C. F. Popescu, E. C. Buciumeanu, E. Visoiu // 14<sup>th</sup> Meet. ICVG, Locorotondo (Bary), Italy, 12 – 17 September, 2003.; extended abstracts. – Locorotondo, 2003. – P. 243.
  25. Gribaudo I. Elimination of grapevine leafroll-associated virus 3 from the wine grapevine Müller-Thurgau (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis / I. Gribaudo, J. Bondaz, D. Cuzzo, G. Gambino // 14<sup>th</sup> Meet. ICVG, Locorotondo (Bary), Italy, 12 – 17 September, 2003.; extended abstracts. – Locorotondo, 2003. – P. 240 – 241.
  26. Melliot B. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) / Melliot B., Panis B., Paumay Y., Swenen R., Lepovre P., Frison E. // Plant Cell Rep. – 2002. – 20. – P.1117-1122. ,
  27. Wang Q. Elimination of grapevine virus A by cryopreservation / Q. Wang, R. Gafny, P. Li, M. Mawassi, I. Sela, E. Tanne // 14<sup>th</sup> Meet. ICVG, Locorotondo (Bary), Italy, 12 – 17 September, 2003.; extended abstracts. – Locorotondo, 2003. – P. 242.
  28. Tanne E. Rapidly diagnosing grapevine corky bark by in vitro micrografting / E.Tanne, N. Shlamovitz, P. Spiegel-Roy // Hort Science. – 1993. – 28 (6) - P. 667 – 668.
  29. Tanne E. Rapid in vitro indexing of grapevine viral diseases; the effect of stress-inducing agent on the diagnosis of leafroll / E. Tanne, P. Spiegel-Roy, N. Shlamovitz // Plant Disease. – 1996. – Vol. 80, N 9 . – P. 972 – 974.
  30. Guta I. Solutions to eliminate grapevine leafroll associated virus serotype 1+3 from *V. vinifera* L. cv. Ranai Magaraci / I. Guta, E. Buciumeanu, R. Gheorghe, Al. Teodorescu // Rom. Biotechnol. Lett. – 2010. – 15. – P. 72–78.
  31. Мулюкіна Н. А. Прижилкова мозаїка та борознистість деревини винограду (етіологія, діагностика, заходи боротьби): дис. канд. біол. наук. / Ніна Анатоліївна Мулюкіна. – К., 1993. – 155 с.
  32. Отримання садивного матеріалу винограду, вільного від вірусів, за допомогою термотерапії і культури тканин / Б. Н. Мілкус, Дж. Ейворі, В. Н. Пинська, С. А. Стицько, А. В. Щербина // Захист рослин. – 2002. – № 7. – С. 19.

**Мулюкіна Н. А., Зеленянська Н. Н., Лосева Д. Ю., Николаєва Н. И., Карастан О. М., Плачинда Г. В.**

### **Методи оздоровлення от вірусів винограда с применением культури in vitro**

*В обзоре проанализированы основные методы оздоровления винограда от вирусов, охваченных системой сертификации посадочного материала винограда. Методы, оптимальные с точки зрения эффективности оздоровления и минимального отрицательного влияния на состояние растений, применены для устранения из тканей третьего серотипа вируса скручивания листьев винограда с дальнейшей санитарной и генетической оценкой состояния растений.*

**Ключевые слова:** виноград, вирушніе болєзни, скручивание листьев, борозчатость древесины, культура in vitro, термотерапия, хемотерапия.

**N. A. Muljukina, N. A. Zelenjanskay, D. J. Losjeva., N. I. Nikolaeva., O.M. Karastan., G. V. Plachinda**

### **Methods of grapevine recovering using in vitro culture**

*The main methods of grapevine virus elimination in the system of planting material certification have been analysed. Methods with the best effectiveness of virus elimination and minimal negative influence on the plant have been used for GLRaV 3 elimination from grapevine with the next sanitary and genetic evaluation of plant state.*

**Keywords:** grapes, viruchnye disease, curling leaves, grooved wood culture in vitro, heat therapy, chemo.