

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

Рябого Миколи Ігоровича на тему:

«Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення садивного матеріалу винограду», подану на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 203 «Садівництво та виноградарство» галузь знань 20 - «Аграрні науки та продовольство»

Актуальність теми. Сьогодні існує серйозна проблема поширення вірусних хвороб на виноградних насадженнях. Особливо шкідливим є 3-й серотип вірусу скручування листя виноградної лози, який завдає значних економічних збитків виноградарству у різних країнах. Найчастіше ці хвороби поширюються через ввезення зараженого садивного матеріалу, використання для щеплення ураженої прищепної або підщепної лози, а також через недотримання санітарних вимог під час вирощування садивного матеріалу. Їх поширення може бути ефективно обмежене шляхом використання сертифікованого садивного матеріалу, дотримання комплексу профілактичних заходів та оздоровлення. Найчастіше оздоровлення садивного матеріалу винограду проводять із застосуванням біотехнологічних методів, зокрема методів культури тканин і органів *in vitro*. серед яких найбільш поширеними є: термотерапія, хіміотерапія, культура меристем і верхівок пагонів. В Україні дослідження з використанням зазначених біотехнологічних підходів для винограду в культурі тканин і органів *in vitro* практично не проводилися, що зумовлює актуальність обраної теми дисертаційного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на базі лабораторії вірусології і мікробіології та відділу розсадництва, розмноження і біотехнології винограду Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН України в межах науково-дослідних робіт Національної

академії аграрних наук України: «Дослідження масштабів ураженості виноградних насаджень Півдня України вірусними, фітоплазмовими і бактеріальними хворобами винограду, діагностика та створення системи оздоровлення від них при виробництві сертифікованого посадкового матеріалу» (номер державної реєстрації 0121U107838).

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

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

- провести фітосанітарне обстеження виноградників Одеської області, виявити збудників вірусних хвороб і бактеріального раку винограду;
- оцінити шкідливість 3-го серотипу вірусу скручування листя виноградної лози та обґрунтувати необхідність оздоровлення садивного матеріалу;
- удосконалити методи діагностики вірусів (полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу);
- провести ПЛР діагностику зразків виноградної лози різних сортів на наявність вірусів хвороби скручування листя винограду і бактеріального раку;
- провести ідентифікацію сортів «Каберне Совіньйон» і «Одеський чорний», які використовують для виробництва сертифікованого садивного матеріалу;
- розробити протокол культивування апікальних меристем винограду та оздоровлення рослин за їх використання *in vitro*;
- розробити ефективні способи проведення термотерапії та хіміотерапії винограду *in vitro*, які забезпечать і високий рівень елімінації вірусу хвороби скручування листя, і оптимальний рівень регенерації, розвитку ініціальних експлантів, мікроклонів винограду після оздоровлення;
- визначити коефіцієнт елімінації *GLRaV-3* після різних способів оздоровлення винограду в культурі *in vitro*;
- оцінити економічну ефективність оздоровлення винограду в культурі *in*

vitro.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень дисертації. Представлена робота спрямована на вирішення важливого наукового завдання, яке полягає в проведенні фітосанітарного обстеження виноградних насаджень півдня Одеської області, встановленні поширеності та ступеня ураження винограду вірусом скручування листя винограду 3-го серотипу (*GLRaV-3*) і збудником бактеріального раку *Rhizobium radiobacter*, а також у розробленні та науковому обґрунтуванні ефективних біотехнологічних підходів до їх ідентифікації, оздоровлення рослин *in vitro* з метою елімінації патогенів та отримання безвірусного садивного матеріалу.

Здобувачем вперше ідентифіковано вірус скручування листя виноградної лози 3-го серотипу (*GLRaV-3*) методом ПЛР зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу та проведено секвенування геному ізолятів агробактерій, виділених із виноградної лози на насадженнях Одеської області. Встановлено, що переважна більшість досліджених ізолятів є вірулентними, генетично неоднорідними та переважно містять октопінову Ті-плазмиду, яка визначає їхню патогенність. Розроблено протокол культивування апікальних меристем винограду для оздоровлення мікроклонів від *GLRaV-3* та ефективний спосіб хіміотерапії *in vitro* для елімінації цього патогена. Доведено доцільність і високу ефективність комбінованого застосування різних методів оздоровлення винограду *in vitro*.

Удосконалено методичні підходи до ідентифікації вірусу скручування листя виноградної лози-3 (*GLRaV-3*) та збудника бактеріального раку винограду *Rhizobium radiobacter*, оптимізовано склад поживного середовища для культивування апікальних меристем винограду, а також параметри проведення термотерапії *in vitro*, що сприяє підвищенню ефективності оздоровлення рослин від вірусної інфекції.

Набули подальшого розвитку підходи до ідентифікації патогенних і непатогенних штамів агробактерій на основі визначення типу Ті-плазмід та виявлення генів *virD2* і *virF*, пов'язаних із вірулентністю збудника.

Поглиблено уявлення про шкідливість вірусу скручування листа виноградної лози-3 (*GLRaV-3*) та оцінювання ефективності оздоровлення рослин шляхом визначення коефіцієнта елімінації вірусу в культурі тканин і органів *in vitro*. Подальшого розвитку набули також етапи культивування винограду *in vitro*, спрямовані на підвищення ефективності отримання оздоровленого рослинного матеріалу.

Практичне значення одержаних результатів полягає у проведенні фітосанітарного обстеження виноградних насаджень Одеської області, виявленні та ідентифікації вірусу скручування листа виноградної лози-3 (*GLRaV-3*) на сортах винограду «Одеський чорний» і «Каберне Совіньйон», а також удосконаленні молекулярно-генетичних підходів до одночасної ідентифікації *GLRaV-3* та збудника бактеріального раку винограду *Rhizobium radiobacter*. Розроблені та удосконалені способи оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro* мають практичне значення для виробництва здорового садивного матеріалу цінних сортів і клонів винограду різних категорій якості. Запропоновані технологічні рішення пройшли виробничу перевірку та впроваджені у ДП «ДГ «Таїровське» ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України. Крім того, результати досліджень використовуються в освітньому процесі під час підготовки здобувачів за освітньо-науковою програмою «Виноградарство» в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно виконаним науковим дослідженням. Здобувачем проведено аналіз наукової літератури за тематикою досліджень, сформульовано мету і завдання роботи, розроблено схеми експериментів, виконано основний обсяг лабораторних досліджень, здійснено обробку, аналіз та узагальнення отриманих результатів. Автором особисто підготовлено наукові публікації, сформульовано висновки та практичні рекомендації, написано текст дисертації. Секвенування та філогенетичний аналіз ізолятів агробактерій виконувалися у співпраці з фахівцями кафедри ботаніки та патології рослин

Університету штату Орегон (США). Результати досліджень, опубліковані у співавторстві, відображають особистий внесок здобувача, який становить 60–70 %.

Апробація результатів дисертації. Результати виконаних досліджень апробовано на наукових конференціях у формі доповідей, за підсумками яких опубліковано матеріали конференцій:

✓ The 20th Congress of the International Council for the Study of Virus & Virus-like Diseases of the Grapevine (Thessaloniki, Greece, 25-29 September 2023).

✓ The VI International Scientific and Practical Conference «Perspectives of contemporary science: theory and practice» (Lviv, Ukraine, 22-24 July 2024).

✓ The International Conference on Science, Innovations and Global Solutions (Poland, July 31, 2024).

✓ The 12th International scientific and practical conference “Perspectives of contemporary science: theory and practice” (Lviv, Ukraine, January 13-15, 2025).

✓ The XXVI International scientific and practical conference «Latest research in the development of science and education» (Prague, Czech Republic, June 30 – July 02, 2025).

✓ XVI з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (м. Київ, Україна, 2–6 червня 2025 року).

✓ The II International Scientific and Practical Conference «Innovation and modern technologies for the development of science» (Prague, Czech Republic, January 12-14, 2026).

✓ I науково-практичній конференції «Новітні технології сучасного суспільства» (м. Харків – м. Люблін, Україна – Польща, 21–23 січня 2026 року).

Також, щорічно, протягом 2022-2026 років обговорювалися на засіданнях Вченої ради ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України.

Дотримання принципів академічної доброчесності. У ході рецензування дисертаційної роботи фактів порушення принципів академічної

добросовісності, зокрема плагіату, фабрикації чи фальсифікації, не виявлено. Усі наукові положення та ідеї є авторськими, що підтверджує відповідність дослідження нормам наукової етики.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертаційну роботу викладено на 194 сторінках комп'ютерного тексту, у тому числі 155 – основного тексту, що складається з анотації, списку скорочень, вступу, п'яти розділів, висновків і практичних рекомендацій. Містить 14 таблиць, 24 рисунки і 3 додатки. У списку використаних джерел 229 найменувань.

Дисертаційна робота складається з наступних частин:

«Вступ» дисертаційної роботи загалом відповідає вимогам до наукових праць такого рівня. Актуальність теми обґрунтована переконливо та базується на сучасних тенденціях розвитку виноградарства в Україні та світі. Чітко сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, які є логічно узгодженими. Методи дослідження охарактеризовано достатньо повно.

Розділ I «Хронічні хвороби виноградної лози та методи їх оздоровлення (огляд літератури)» включає ґрунтовний аналіз вітчизняних і зарубіжних наукових джерел, присвячених поширенню, біологічним особливостям, діагностиці та шкідливості вірусу скручування листя виноградної лози-3 (*GLRaV-3*) і збудника бактеріального раку винограду *Rhizobium radiobacter*. Автором узагальнено сучасні дані щодо економічного значення цих патогенів, механізмів їх поширення, існуючих методів діагностики та підходів до оздоровлення винограду від вірусних і бактеріальних інфекцій. Показано, що, незважаючи на значний обсяг досліджень, проведених за кордоном, питання поширення зазначених патогенів у виноградних насадженнях України, особливостей їх ідентифікації та застосування сучасних біотехнологічних методів оздоровлення залишаються недостатньо вивченими. Встановлено, що комплексні дослідження, спрямовані на одночасне вивчення вірусних і бактеріальних хвороб винограду, їх діагностику та розроблення ефективних способів оздоровлення рослин, в

Україні практично не проводилися, що й зумовило актуальність, мету та завдання дисертаційної роботи.

Розділ 2 «Матеріали, методи та умови проведення дослідження» присвячено програмі, схемі та методичному забезпеченню досліджень. Охарактеризовано об'єкти досліджень, методи фітосанітарного обстеження виноградних насаджень, ідентифікації вірусних і бактеріальних патогенів, а також біотехнологічні підходи до оздоровлення винограду *in vitro*. Обґрунтовано використання сучасних молекулярно-генетичних методів діагностики, зокрема ПЛР у режимі реального часу та секвенування геному. Застосовані методики відповідають меті та завданням роботи й забезпечують достовірність отриманих результатів.

Розділ 3 «Ідентифікація вірусу хвороби скручування листя та бактеріального раку виноградної лози» представлено результати фітосанітарного обстеження виноградних насаджень Одеської області, під час якого виявлено рослини із симптомами хвороби скручування листя та бактеріального раку. За допомогою сучасних серологічних і молекулярно-генетичних методів підтверджено наявність вірусу скручування листя виноградної лози-3 (*GLRaV-3*) та збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter*. На особливу увагу заслуговує удосконалення та застосування мультиплексної ЗТ-ПЛР у режимі реального часу для одночасної ідентифікації зазначених патогенів. Автором також встановлено негативний вплив *GLRaV-3* на ріст, урожайність та якісні показники винограду. Важливе наукове значення мають результати виділення, ідентифікації та секвенування ізолятів агробактерій, які засвідчили їх генетичну різноманітність, належність до різних геномовидів та наявність онкогенних Ті-плазмід, що визначають вірулентність збудника. Крім того, за допомогою мікросателітного аналізу підтверджено сортову належність досліджуваних рослин винограду, що забезпечує достовірність отриманих результатів.

Розділ 4 «Оздоровлення винограду від вірусу скручування листя виноградної лози-3 (*GLRaV-3*) в культурі тканин і органів *in vitro*»

присвячено розробленню та вдосконаленню біотехнологічних підходів до елімінації вірусу *GLRaV-3*. Автором досліджено ефективність термотерапії, культури апікальних меристем та хіміотерапії із застосуванням різних віруцидних препаратів, комбінацій. Встановлено вплив досліджуваних факторів на життєздатність експлантів, регенераційну здатність, морфогенез та ефективність елімінації вірусу. Показано, що найбільш ефективним виявилось поєднання хіміотерапії з культивуванням апікальних меристем, яке забезпечувало майже повну елімінацію *GLRaV-3* та отримання оздоровленого рослинного матеріалу. Отримані результати мають важливе практичне значення для виробництва безвірусного садивного матеріалу винограду.

Розділ 5 «Економічна ефективність ідентифікації та оздоровлення винограду від вірусу скручування листя виноградної лози-3 (*GLRaV-3*)»

присвячено економічному обґрунтуванню розроблених методів діагностики та оздоровлення винограду *in vitro*. Здобувачем проведено розрахунок виробничих витрат, собівартості оздоровлених мікроклонів, прибутку та рівня рентабельності залежно від способу оздоровлення. Встановлено, що найвищу економічну ефективність забезпечує поєднання хіміотерапії з культивуванням апікальних меристем, яке дозволяє отримати найбільший вихід оздоровлених рослин, найнижчу собівартість продукції та найвищий рівень рентабельності. Отримані результати підтверджують практичну доцільність впровадження розроблених біотехнологічних підходів у виробництво оздоровленого садивного матеріалу винограду.

Висновки дисертаційної роботи є логічним узагальненням результатів проведених досліджень і повною мірою відображають зміст та основні положення роботи, які впливають із поставленої мети та завдань дослідження. Висновки охоплюють основні аспекти дослідження та містять конкретні науково обґрунтовані положення щодо фітосанітарного моніторингу, молекулярно-генетичної діагностики та біотехнологічне оздоровлення винограду від вірусу скручування листя виноградної лози-3

(*GLRaV-3*) і збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter*. Сформульовані положення є достатньо аргументованими, базуються на експериментальних даних і узгоджуються з матеріалами відповідних розділів дисертації.

Дискусійні положення дисертаційної роботи.

1. У літературному огляді детально розглянуто світовий досвід елімінації вірусу скручування листя-3 (*GLRaV-3*) та бактеріального раку (*Rhizobium radiobacter*). Проте автор недостатньо висвітлив питання можливої взаємодії між вірусними та бактеріальними патогенами за їхнього сумісного ураження лози в полі. Оскільки саме така ситуація найчастіше спостерігається. Чи існують такі дані?
2. В Україні, в нашому інституті, були започатковані роботи (Мілкус Б. Н., Щербіна А. В.) щодо оздоровлення винограду у культурі тканин і органів *in vitro* і здобувач на цьому наголошує у підрозділі 1.4. З огляду на це, хотілося б почути Вашу думку щодо новизни та практичних переваг запропонованих Вами протоколів термотерапії.
3. У четвертому розділі показано, що найменший розмір апікальної меристеми (0,2–0,4 мм) забезпечує максимальну елімінацію вірусу, але призводить до зниження приживлюваності та регенерації експлантів. Здобувач пропонує комбінувати більші меристеми (0,5–0,7 мм) із термо- або хіміотерапією. Але в літературі зустрічається інформація про можливий ризик виникнення соматональної варіабельності (генетичних або морфологічних відхилень у регенерантів) внаслідок сумісної дії двох стресових факторів – екстремальної температури (37 °С протягом 8 тижнів) та хімічних мутагенів, яким частково є рибавірин.
4. Не зовсім зрозумілі терміни, коли проводилася ідентифікація збудника хвороби скручування листя винограду до- та після оздоровлення.

У цілому робота справляє позитивне враження. Представлені зауваження та недоліки мають переважно дискусійний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку результативності поданої

дисертаційної роботи. Зазначене не знижує її наукової та практичної цінності.

Повнота викладення в опублікованих працях наукових положень, висновків, рекомендацій сформульованих у дисертації. Наукові положення, висновки та результати дисертаційного дослідження Рябого Миколи Ігоровича характеризуються належним рівнем теоретичного обґрунтування та достатньою повнотою відображення у наукових публікаціях автора. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць: 5 статей у виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, 1 стаття – у зарубіжному виданні, 1 стаття у іншому науковому виданні, 8 публікацій – матеріали і тези конференцій. Ознайомлення з науковим доробком здобувача свідчить, що публікації повною мірою презентують основні результати дослідження, відображають його наукову новизну та практичну значущість. Дисертація відповідає встановленим вимогам чинного законодавства України.

Відповідність дисертації спеціальності і галузі знань, за якими вона представлена до захисту. Дисертаційне дослідження повністю відповідає спеціальності 203 – Садівництво та виноградарство в межах галузі знань 20 - «Аграрні науки та продовольство», за якою передбачено присудження ступеня доктора філософії.

Загальний висновок. Здобувачем здійснено комплексне дослідження, що полягає у фітосанітарному моніторингу виноградних насаджень, молекулярно-генетичній ідентифікації вірусного та бактеріального патогенів винограду, а також розробленні й удосконаленні біотехнологічних підходів до оздоровлення рослин *in vitro*. Отримані результати мають практичне значення (виробництво сертифікованого садивного матеріалу винограду) та можуть бути впроваджені у виробництво.

Рівень виконання роботи засвідчує належну підготовку здобувача, він володіє теоретичними знаннями, практичними вміннями, дослідницькими навичками та професійними компетентностями, що відповідає вимогам

третього рівня вищої освіти за спеціальністю 203 – «Садівництво та виноградарство».

Дисертаційна робота Рябого Миколи Ігоровича «Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення садивного матеріалу винограду» відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. № 261 «Про затвердження Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових закладах)», наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 «Про затвердження Порядку присудження ступеню доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її автор заслуговує на присудження освітньо-наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 203 – «Садівництво та виноградарство», галузі знань 20 – «Аграрні науки та продовольство».

Рецензент:

Доктор сільськогосподарських наук,
Член-кореспондент НААН,
старший науковий співробітник,
заступник директора з наукової роботи
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України

Ніна МУЛЮКІНА