

ВІДГУК
офіційного опонента
доцента кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології
Одеського національного університету імені І. І. Мечникова,
кандидата сільськогосподарських наук
Теслюк Наталії Іванівни
на дисертаційну роботу Рябого Миколи Ігоровича
«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 дисертаційної роботи та зв'язок із науковими програмами. Актуальність теми дисертаційної роботи є беззаперечною та визначається сучасними потребами галузі виноградарства у виробництві високоякісного оздоровленого садивного матеріалу. Відомо, що вірусні та бактеріальні хвороби винограду широко поширені на виноградних насадженнях і призводять до зниження продуктивності рослин, погіршення якості врожаю, скорочення терміну експлуатації насаджень та значних економічних втрат. За таких умов особливого значення набуває впровадження сучасних біотехнологічних методів, які забезпечують отримання генетично цінного та вільного від вірусної і бактеріальної інфекції садивного матеріалу.

Серед існуючих підходів до оздоровлення рослин найбільш перспективними є методи культури тканин і органів *in vitro*, які базуються на використанні апікальних меристем, термо- та хіміотерапії. Саме ці методи дозволяють ефективно елімінувати патогени, зберігати цінні генотипи та забезпечувати прискорене розмноження оздоровлених рослин. Ефективність таких методів залежить від особливостей культивування експлантів, складу поживних середовищ, схем санації та біологічних особливостей конкретних

сортів винограду, що потребує подальших досліджень і наукового обґрунтування.

У зв'язку з цим особливо актуальними є дослідження, спрямовані на вдосконалення протоколів культивування апікальних меристем винограду, оптимізацію умов термо- та хіміотерапії *in vitro*, визначення їх впливу на морфогенез і регенераційну здатність рослинного матеріалу, а також на ефективність елімінації вірусних патогенів. Важливим аспектом роботи є комплексний підхід, який поєднує сучасні методи молекулярної діагностики з біотехнологічними способами оздоровлення рослин, що відповідає світовим тенденціям розвитку біотехнології рослин та сертифікованого розсадництва.

Отже, дисертаційна робота присвячена вирішенню актуального науково-практичного завдання щодо удосконалення біотехнологічних методів оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro* та підвищення ефективності виробництва оздоровленого садивного матеріалу, що має важливе значення для розвитку сучасного виноградарства та біотехнології рослин.

Дисертаційна робота виконувалась у межах науково-дослідних робіт НААН 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).

Наукова новизна положень, результатів і висновків дисертаційної роботи. Наукова новизна дисертаційного дослідження полягає у комплексному вирішенні актуального наукового завдання, пов'язаного з удосконаленням діагностики та розробленням ефективних біотехнологічних способів оздоровлення винограду від вірусних і бактеріальних патогенів.

Здобувачем **уперше** ідентифіковано 3-й вірус хвороби скручування листя виноградної лози методом ПЛР зі зворотною транскрипцією у режимі реального часу, що сприяло підвищенню надійності виявлення збудника та

вдосконаленню системи фітосанітарного контролю садивного матеріалу винограду.

Важливим науковим результатом є проведення секвенування геному ізолятів агробактерій, виділених із виноградних насаджень Одеської області, що дозволило встановити їх генетичну різноманітність, підтвердити вірулентність більшості досліджених ізолятів та виявити переважне поширення штамів з октопіновими Tі-плазмідами, асоційованими з патогенністю збудника бактеріального раку винограду. Такі дослідження проведені на експериментальній базі Університету штату Орегон (США) у межах договору про творче співробітництво.

Суттєвою складовою наукової новизни є розроблення протоколу культивування апікальних меристем винограду та їх використання для оздоровлення рослин у культурі тканин і органів *in vitro*.

Уперше обґрунтовано ефективність застосування хіміотерапії в культурі *in vitro* для елімінації вірусу скручування листя виноградної лози *GLRaV-3* та доведено високу ефективність його елімінації за комбінованого застосування різних способів оздоровлення винограду.

Здобувачем **удосконалено** режими термотерапії та доведено доцільність комбінування різних способів оздоровлення для підвищення коефіцієнта елімінації вірусу. Визначено основні фактори, що впливають на успішність оздоровлення, регенерацію та подальший розвиток мікроклонів винограду.

Подальшого розвитку набули наукові положення щодо ідентифікації патогенних штамів агробактерій, оцінки шкідливості *GLRaV-3*, вдосконалення етапів культивування винограду в культурі тканин і органів *in vitro*.

Практичне значення результатів дисертаційної роботи полягає у створенні науково обґрунтованих підходів до отримання оздоровленого садивного матеріалу винограду та у підвищенні ефективності його виробництва. Запропоновані технологічні рішення можуть бути використані у виноградному розсадництві для отримання безвірусного матеріалу цінних сортів і клонів винограду. Результати досліджень пройшли виробничу

перевірку та впроваджені у практику мікроклонального розмноження винограду в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України та ДП «ДГ «Таїровське», а також використовуються в освітньому процесі підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю «Виноградарство».

Апробація результатів дисертаційної роботи. Основні результати дослідження щорічно обговорювались на засіданнях вченої ради ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» НААН України та були представлені на шести міжнародних науково-практичних конференціях («Перспективи сучасної науки: теорія та практика» (Львів, Україна, 22-24 липня 2024 р. та 13-15 січня 2025 р.); конференція з питань науки, інновацій та глобальних рішень (Польща, 31 липня 2024 р.); «Новітні дослідження в розвитку науки та освіти» (Прага, Чеська Республіка, 30 червня – 2 липня 2025 р.); «Інновації та сучасні технології для розвитку науки» (Прага, Чеська Республіка, 12-14 січня 2026 р.); «Новітні технології сучасного суспільства» (м. Харків – м. Люблін, Україна – Польща, 21–23 січня 2026 року), на XVI з'їзді Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (м. Київ, Україна, 2–6 червня 2025 року) та на 20-му конгресі Міжнародної ради з вивчення вірусних та вірусоподібних хвороб виноградної лози (Салоніки, Греція, 25-29 вересня 2023 р.).

Повнота викладу основних результатів дисертаційної роботи у наукових фахових виданнях. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових праць, у тому числі: 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.

Ступінь наукової обґрунтованості результатів, сформульованих у дисертаційній роботі. Наукові положення дисертаційної роботи одержано в результаті виконання польових і лабораторних досліджень, виконаних у повній відповідності сучасним стандартам дослідної справи в виноградарстві і виноградному розсадництві. Представлені на захист матеріали повною мірою

обґрунтовані, достовірність одержаних результатів і сформульовані на їх основі висновки не викликають сумнівів.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно виконаним і завершеним науковим дослідженням. Здобувачем проведено аналіз наукових джерел, виконано експериментальні дослідження, здійснено обробку та узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки і практичні рекомендації, підготовлено наукові публікації за темою дисертації. Наукові положення та результати, винесені на захист, належать автору і відображають його особистий внесок у розв'язання поставлених завдань.

Відомості про дотримання академічної доброчесності. Дисертаційна робота виконана з урахуванням сучасних вимог академічної доброчесності. У результаті перевірки дисертаційної роботи на наявність плагіату у системі StrikePlagiarism академічного плагіату не виявлено.

Структура, обсяг та зміст 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, із яких 220 – латиницею.

Дисертаційна робота виконана згідно чинних вимог. На початку наведені анотації (українською та англійською мовами) та список публікацій здобувача. Далі наведений зміст роботи.

У **вступі** наведено відомості щодо актуальності теми, зв'язку роботи з науковими програмами, планами, темами, сформульовано мету та завдання досліджень, наведено характеристику методів досліджень, відомості щодо наукової новизни та практичного значення результатів роботи, особистого внеску здобувача, апробації результатів роботи та публікацій.

У **першому розділі** «Хронічні хвороби виноградної лози та методи їх оздоровлення (огляд літератури)» дисертантом проаналізовано наукові роботи зарубіжних та вітчизняних вчених відносно ступеня вивченості поставлених

наукових завдань в Україні та світі, окреслено сучасні тенденції та проблеми щодо ідентифікації та елімінації збудників хвороби скручування листя винограду, бактеріального раку винограду в Україні та світі, обґрунтовано напрямки проведення досліджень.

У **другому розділі** «Матеріали, методи та умови проведення дослідження» дисертаційної роботи детально наведено характеристики об'єктів, умов та методик проведення досліджень. Описано фітосанітарне обстеження виноградних насаджень Одеської області, методи відбору зразків і лабораторної діагностики 3-го вірусу хвороби скручування листя виноградної лози та збудника бактеріального раку із застосуванням ІФА, ЗТ-ПЛР у реальному часі, секвенування геному і філогенетичного аналізу ізолятів агробактерій. Детально представлено біотехнологічні підходи до оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro*, зокрема використання апікальних меристем, термотерапії та хіміотерапії, наведено схеми дослідів, умови культивування, критерії оцінки ефективності оздоровлення рослин і методи статистичної обробки отриманих результатів.

У **третьому розділі** «Ідентифікація вірусу хвороби скручування листя та бактеріального раку виноградної лози» представлено результати фітосанітарного моніторингу виноградних насаджень, лабораторної ідентифікації *GLRaV-3* та *Rhizobium radiobacter*, оцінки шкідливості вірусу скручування листя винограду, а також молекулярно-генетичної характеристики ізолятів агробактерій і сортової ідентифікації виноградних рослин.

У **четвертому розділі** «Оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro*» наведені результати досліджень щодо ефективності біотехнологічних методів оздоровлення винограду, зокрема з застосуванням апікальних меристем, термотерапії та хіміотерапії для елімінації вірусу скручування листя винограду-3. Встановлено, що ефективність регенерації та подальшого розвитку експлантів визначається комплексною дією розміру апікальних меристем і складу поживного середовища. Обґрунтовано

оптимальні розміри експлантів (0,5–1,0 мм), що забезпечують найвищий регенераційний потенціал та суттєво впливають на рівень елімінації вірусу.

Доведено високу ефективність поєднання термотерапії з культурою апікальних меристем. Встановлено оптимальну тривалість термічного впливу (близько 8 тижнів), перевищення якої призводить до зниження життєздатності експлантів. Показано, що комбінований підхід забезпечує до 85–88 % оздоровлених рослин, істотно перевищуючи ефективність застосування тільки апікальних меристем.

Встановлено також ефективність використання віруцидних препаратів у поєднанні з культурою апікальних меристем. Показано, що препарат озельтамівір у концентраціях 30–40 мг/л характеризується низькою фітотоксичністю та високою противірусною активністю, препарат рибавірин проявляє більш виражений пригнічувальний вплив на регенераційні процеси. Найвищий рівень елімінації вірусу *GLRaV-3* (до 98–100 %) досягнуто при комбінованому застосуванні препаратів із подальшим культивуванням апікальних меристем.

Слід відзначити, що для доведення достовірності отриманих результатів здобувач застосовував статистичні методи аналізу, зокрема двофакторний дисперсійний аналіз із використанням критерію Фішера. Це дозволило об'єктивно оцінити достовірність впливу досліджуваних факторів та їх взаємодії на результативні показники. Розрахунок F-критерію у поєднанні з визначенням частки внеску кожного фактору в загальну дисперсію забезпечив кількісну інтерпретацію експериментальних даних. Це дало змогу не тільки підтвердити статистичну значущість отриманих результатів ($p < 0,05$), але і диференціювати фактори за ступенем їх впливу, що істотно підвищує надійність та обґрунтованість зроблених висновків.

У п'ятому розділі «Економічна ефективність оздоровлення винограду в культурі тканин і органів *in vitro*» проведено економічну оцінку ефективності біотехнологічних методів оздоровлення винограду *in vitro*. Показано, що основним фактором, який визначає економічну доцільність, є вихід

оздоровлених мікроклональних рослин. Використання тільки апікальних меристем характеризується найнижчою економічною ефективністю через обмежений рівень елімінації вірусу та, відповідно, низький вихід безвірусного матеріалу. Застосування термотерапії та хіміотерапії дозволяє підвищити ефективність оздоровлення, що призводить до зниження собівартості одиниці продукції та збільшення прибутку. Найвищі показники економічної ефективності (прибуток і рівень рентабельності) отримано у варіантах комбінованого застосування біотехнологічних методів, що забезпечує максимальний вихід оздоровлених рослин, найнижчу собівартість та підтверджує доцільність їх практичного впровадження у виробництво безвірусного садивного матеріалу винограду.

Підсумок дисертаційної роботи представлено у **розділах** «Висновки» та «Практичні рекомендації по застосуванню результатів наукового дослідження», які здобувач наводить у повній відповідності до результатів науково-дослідної роботи. Висновки впливають із поставлених перед дисертантом завдань, є всебічно обґрунтованими експериментальними даними та повною мірою відображають підсумкові результати досліджень. Практичні рекомендації мають чітке прикладне значення та формують комплексну технологію отримання безвірусного садивного матеріалу винограду в культурі *in vitro*. Їх впровадження дозволяє підвищити вихід оздоровлених рослин і сприяє виробництву якісного сертифікованого садивного матеріалу винограду.

Дискусійні положення та зауваження щодо дисертаційної роботи.

Позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Рябого Миколи Ігоровича, необхідно відмітити окремі недоліки, які потребують пояснення автора у порядку дискусії та побажань:

1. Недостатньо розмежовано ефект складу середовища та ефекту окремих компонентів. У МС 1 та МС 2 одночасно змінено кілька параметрів: концентрації вітамінів, мезоінозиту, 6-БАП, ГК₃ та CaCl₂. Тому висновок про перевагу МС 2 є практично корисним, але не дозволяє встановити, який саме

компонент або їх комбінація визначили підвищення приживлюваності та регенерації.

2. Порівняння двох способів термотерапії ускладнене різними типами експлантів після обробки. У варіанті 1 після термотерапії висаджували апікальні меристеми на МС 2, а у варіанті 3 - верхівки пагонів 4–5 мм та одновічкові мікрочубуки на МС. Тобто одночасно змінюються тип експланта, його розмір і середовище культивування. Через це різницю в приживлюваності та морфогенезі не можна пояснити тільки послідовністю «термотерапія ↔ меристема».

3. У дослідженнях оздоровлення винограду від *GLRaV-3* використано тільки два сорти - «Одеський чорний» та «Каберне Совін'йон». Враховуючи відомі сортові відмінності у морфогенетичному потенціалі, чутливості до термотерапії та ефективності елімінації вірусів, зроблені висновки щодо оптимальних параметрів оздоровлення доцільно розглядати насамперед для досліджених генотипів. Виникає питання універсальності запропонованих підходів.

4. Потребує уточнення обґрунтування вибору окремих концентрацій віруцидних препаратів та тривалості хіміотерапії.

5. Бажано більш чітко підкреслити інноваційність поєднання методів (апікальні меристеми, термотерапія, хіміотерапія).

6. Зважаючи на те, що основну частку витрат (понад 75 %) формує двоетапна діагностика (ІФА+ПЛР) у розрахунку на малу партію (100 експлантів), у межах дискусії хотілося б почути думку здобувача: як зміниться собівартість одного оздоровленого мікроклону у разі виробництва великих об'ємів оздоровлених мікроклонів?

7. У тексті дисертаційної роботи присутні нечисленні орфографічні та стилістичні помилки.

Однак, наведені зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи Рябого М. І., не зменшують її наукової цінності та практичного значення результатів. Дисертаційна робота виконана на високому

методологічному рівні та є завершеною науковою працею, містить науково обґрунтовані результати проведених здобувачем досліджень, які вирішують конкретне наукове завдання: розроблення та наукового обґрунтування ефективних біотехнологічних підходів до ідентифікації вірусних і бактеріальних патогенів винограду (вірус скручування листя-3, *Rhizobium radiobacter*), оздоровлення *in vitro* з метою їх елімінації та отримання безвірусного садивного матеріалу, що має суттєве значення для галузі знань 20 - Аграрні науки та продовольство.

Рівень виконання поставленого наукового завдання та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності. Здобувачем повністю виконано поставлену наукову мету за темою «Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення садивного матеріалу винограду» вирішено всі поставлені завдання дослідження. Він здобув теоретичні знання, уміння, навички та компетентності, достатні для розв'язання комплексних завдань у галузі дослідницько-інноваційної діяльності, оволодів методологією наукової діяльності, а також провів власне наукове дослідження, результати якого мають наукову новизну, теоретичне та практичне значення, вирішують конкретне наукове завдання, яке оформлене у вигляді дисертації, та опублікував основні його наукові результати.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Рябого Миколи Ігоровича на тему: «Удосконалення біотехнологічних прийомів оздоровлення садивного матеріалу винограду» є завершеною науковою працею, що відзначається науковою новизною, важливим теоретичним і практичним значенням, виконана на належному науково-методичному рівні. Здобувач має високий рівень фахової підготовки, що дозволяє йому правильно трактувати результати отриманих досліджень і трансформувати їх в технології для практичного використання. З огляду на актуальність, новизну, важливість отриманих автором наукових результатів, їх обґрунтованість і достовірність, а також практичну цінність сформульованих положень і висновків, вважаю, що дисертаційна робота Рябого Миколи Ігоровича на тему: «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 Рябий Микола Ігорович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 203 – Садівництво та виноградарство, з галузі знань 20 - Аграрні науки та продовольство.

Офіційний опонент –

кандидат сільськогосподарських наук,

доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

Одеського національного університету імені І. І. Мечникова,

МОН України

Наталія ТЕСЛЮК