

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Конуп Людмили Олександрівни «Бактеріальний рак винограду і обґрунтування заходів щодо обмеження його розвитку в південному регіоні України» - поданої на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальності 06.01.11 – фітопатологія

Детальний аналіз дисертації Конуп Людмили Олександрівни «Бактеріальний рак винограду і обґрунтування заходів щодо обмеження його розвитку в південному регіоні України» дозволяє офіційному опоненту сформулювати наступні узагальнені висновки щодо актуальності, ступеня обґрунтованості основних наукових положень, висновків, рекомендацій, наукової новизни, практичного значення, а також загальної оцінки роботи.

Актуальність теми дисертаційного дослідження

Виноград як і пшениця тисячоліття супроводжують людську цивілізацію. Свіжі ягоди, вино та сік є джерелом багатьох корисних речовин і завжди були у великому попиті. Але «споживачами» цієї культури є не тільки люди а й патогенні мікроорганізми. Віруси, фітоплазми, гриби та бактерії уражують виноград і наносять значний збиток врожаю. Ці хвороби знижують тривалості життя рослин, родючості виноградних насаджень. Серед таких хвороб найбільш небезпечним є бактеріальний рак винограду, який спричинюється бактерією *Rhizobium (Agrobacterium) vitis*. Хвороба ця системна, хронічна, тому й збитки від неї у світі дуже вагомі. Росповсюдження її співпадає з розповсюдженням виноградників. Навіть у таких виноградарських країнах як Італія, Франція, Німеччина, Австрія хвороба розвивається і разом з саджанцями, які імпортуються для вирощування в Україні, тим більш що бактеріальний рак не внесений до європейську систему сертифікації.

Природно-кліматичні умови півдня України сприятливі для адаптації збудника хвороби, тому ймовірність розповсюдження її дуже висока. Засобів захисту від бактеріального раку майже не існує здебільшого це методи профілактики, запобігання ураженості. Воно й не дивно, бо з бактеріозами взагалі дуже важко боротися. І на інших культурах ми спостерігаємо таку саму картину. А зараз взагалі бактеріальні хвороби дуже поширились.

Розробка ефективної системи захисту винограду від бактеріального раку має включати такі позиції, як оптимальне розміщення виноградників, використання стійких прищеп та підщеп, а також і сортименту в цілому,

агротехнічні прийоми, що сприяють зменшенню механічних пошкоджень, використання сівозміни для оздоровлення ґрунту від патогенних агробактерій. Особливо важливою та необхідною є діагностика та контроль зараженості садивного матеріалу, ґрунту, як карантинний захід. Усім цим питанням, метою яких є обмеження розповсюдження хвороби присвячена дисертаційна робота. Як фітопатологи ми розуміємо, яку складну наукову й практичну проблему поставила перед собою авторка. Актуальність теми дійсної дисертації є беззаперечною.

Основні наукові положення, висновки і рекомендації, що сформульовані у дисертації, ступінь їх обґрунтованості і достовірності

Наукова новизна дисертаційної роботи

Теоретичне значення досліджень полягає у тому, що дисертанткою вперше узагальнено сучасні відомості щодо контролю бактеріального раку винограду, удосконалено методи діагностики і практично обґрунтовано захисні заходи.

Вперше:

- проведено моніторинг ураженості бактеріальним раком виноградних насаджень в південному регіоні України і досліджено їх стан у зв'язку зі змінами клімату;
- досліджено стійкість проти хвороби сортів винограду, що вирощуються в районах проведення досліджень;
- розроблено експрес-метод ідентифікації пухлин, які були спричинені бактеріальною інфекцією;
- встановлено антимікробну і протипухлинну активність класу органічних сполук – краун-ефірів (циклополіефіри) і можливість використання їх як високоефективних антимікробних і протипухлинних засобів захисту. Проведено скринінг антимікробної активності понад 200 краун-ефірів різних функціональних груп цього класу, досліджено механізм антимікробної дії найбільш активних представників.
- розроблено і впроваджено мультиплексний метод ПЛР-ідентифікації патогенів різних типів Ті-плазмід;
- досліджено вплив водної температурної обробки різних режимів на збудника бактеріального раку винограду;

удосконалено метод ПЛР-діагностики у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією для ідентифікації патогену.

дослідження набули подальшого розвитку, а саме виявлено ізоляти непатогенних агробактерій, що мають антагоністичні властивості щодо патогену.

Практичне значення отриманих результатів

Дисертанткою на основі проведених досліджень розроблено систему захисту виноградних рослин від бактеріального раку винограду. Ця система була запроваджена для виробництва сертифікованих саджанців винограду у виноградному розсаднику Херсонської області (акт впровадження).

Крім того була проведена оцінка стійкості сортів винограду проти бактеріального раку. Виділили ізоляти агробактерій з антагоністичними властивостями щодо збудника бактеріального раку, які були рекомендовані для використання у виноградарських господарствах Півдня України (акти впровадження). Підібрано оптимальні режими водної температурної обробки виноградного матеріалу для оздоровлення його від бактеріального раку і були впроваджені в виноградному розсаднику Херсонської області (акт впровадження).

Лабораторіям фітосанітарних і карантинних служб України було рекомендовано модифікований молекулярно-біологічний метод ідентифікації збудника бактеріального раку винограду з використанням полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (РЧ-ПЛР) для діагностики латентної форми бактеріального раку у імпортованих саджанцях (методичні рекомендації, 2012 р.).

Виявлено високу антимікробну активність у класу сполук - краун-ефірів та виявлено представників цієї групи, що мають антимікробну дію до збудника хвороби та проявляють протипухлинну активність (акт впровадження).

Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях

Публікації. Основні результати досліджень за темою дисертації опубліковано в 67 наукових працях, з яких 3 монографії, 2 розділи в колективних монографіях, 20 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, 6 статей у наукових виданнях інших держав, 7 статей в інших наукових виданнях, науково-практичні рекомендації, патент України на корисну модель, 2 авторських свідоцтва, 25 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотацій, вступу, огляду літератури, описання матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини, висновків і пропозицій виробництву, додатків. Вона викладена на 324 сторінках та містить 42 таблиці і 45 рисунків. Список проаналізованих джерел літератури включає 422 позиції.

Обсяг друкованих робіт та їх кількість відповідають вимогам МОН України щодо публікацій основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Зміст автореферату є ідентичним до змісту дисертації і достатньо повно відображає основні положення дослідження.

Аналіз змісту дисертації

У вступі Конуп Л. О. обґрунтувала актуальність теми дисертації, сформулювала мету та завдання досліджень, показано наукову новизну та практичну значимість отриманих результатів, наведено дані щодо особистого внеску, публікації та апробацію наукових розробок.

Розділ 1. Стан вивчення бактеріального раку винограду (огляд літератури)

У розділі представлено аналіз використаної наукової літератури, що свідчить про доцільність дисертаційної роботи. На підставі аналізу літературних джерел показано широке розповсюдження бактеріального раку винограду, збудником якого є бактерія *Rhizobium (Agrobacterium) tumefaciens (vitis)* в усьому світі, та пов'язане це зі змінами клімату, що відбулись за останні 10 років. Обговорено ефективність різних прийомів захисту проти бактеріального раку. Надається огляд сучасних методів діагностики використання яких дозволяє за короткий термін провести скринінг великої кількості зразків рослин на наявність збудників вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб винограду, вивчити, спрогнозувати і запобігти їх розповсюдженню. Доведено, що тільки комплексне застосування різних методів (санітарна селекція, термотерапія, обробка хімічними і бактеріологічними препаратами), а також високий рівень агротехніки дозволить знизити рівень ураження винограду бактеріальним раком.

На основі критичного аналізу, систематизації та узагальнення першоджерел визначено напрями досліджень, їх актуальність, шляхи вирішення наукової проблеми – обґрунтування заходів щодо обмеження розвитку бактеріального раку винограду в південному регіоні України

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень. У розділі надано місце, умови, методи і методики проведення досліджень. Польові

дослідження і фітосанітарне обстеження проводили протягом 2012-2020 рр. на території Одеської, Миколаївської і Херсонської областей південного регіону, який відноситься до південного степового агрокліматичного району. Лабораторні дослідження проводили в лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова» НААН України, акредитованої відповідно до міжнародного стандарту ISO/IEC 17025:2005 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій», атестат акредитації №201008 від 11.12.2011 р., а також в лабораторії вірусології, мікробіології і агрохімії прищеплювального комплексу ЗАТ «Одеський коньячний завод» (атестат акредитації №РО-1005/2004 від 01.11.2004р.) Дослідження впливу термообробки на збудника бактеріального раку в уражених виноградних рослинах проводили у лабораторних умовах та на промисловому обладнанні у прищеплювальному комплексі ЗАО «Одеський коньячний завод». Метеорологічні умови за період проведення досліджень відслідковувалися в відділі агроєкології ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» НААН України. Оздоровлення рослин, уражених збудником бактеріального раку методом апікальних меристем *in vitro* проводили сумісно з відділом розсадництва та розмноження ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» НААН України.

Об'єктами досліджень у дисертації були – сорти винограду та збудник бактеріального раку винограду, його розповсюдження, патогенез спричиненої хвороби. Використовували фітопатологічні, мікробіологічні, серологічні, молекулярно-біологічні, біохімічні методами. Для оцінки достовірності отриманих експериментальних результатів використовували математично-статистичні методи. Дослідження проводились відповідно до атестованої методики: МВВ 002-85/3-2006. Виявлення збудника бактеріального раку (*Agrobacterium tumefaciens (vitis)*) винограду методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та нормативних документів: ДСТУ 3355-06. «Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб при карантинному огляді та експертизи», ДСТУ 4390:2005 «Технічні умови. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози», ДСТУ 8562:2015. «Маточники та садивний матеріал. Методи виявлення збудників вірусних хвороб та бактеріального раку».

Розділ 3. Симптоми та візуальне виявлення бактеріального раку винограду

За результатами фітосанітарного обстеження виноградників Одеської, Миколаївської і Херсонської областей встановлено, що в Одеської області

поширення бактеріального раку на виноградниках становило 0,3-35 %, у Миколаївській області - 0,6-2,5 %, у Херсонській області - 0,3-1,4 %. Найбільш високий відсоток ураження спостерігався на сортах: Каберне Совіньйон, Шардоне і Мерло, імпортованих із Франції, Німеччини, Сербії і Італії. В роботі досліджувались 46 клонів технічних сортів і 47 технічних сортів рядового садивного матеріалу, 13 клонів столових сортів і 7 столових сортів рядового садивного матеріалу; 10 клонів підщепних сортів винограду на ураженість збудником бактеріального раку винограду. Найбільшу кількість кущів із симптомами бактеріального раку було виявлено на сортах Каберне Совіньйон, Мерло, Шардоне імпортного походження.

Встановлено, що метеорологічні зміни, які відбулися за останні десять років, а саме низькі температури (до -20°C) взимку, весняні приморозки в травні сприяли поширенню цієї хвороби. Показано, що в уражених патогеном рослинах значно знижувався урожай (на 16,2 % - 28,7 % з гектару), відбувалось зменшення: середньої маси грони (приблизно на 20 %), кількості пагонів виноградної лози (майже на 10 %), маси приросту (на 10 %), масової концентрації цукру в ягодах (до 15-19 %) і збільшення масової концентрації титрованих кислот (11,2 г/дм³) порівняно з контрольною групою здорових рослин.

За матеріалами досліджень, виконаних у даному розділі, опубліковано 14 наукових праць.

. Розділ 4. Діагностика бактеріального раку винограду.

У роботі досліджували 64 клони прищепних і підщепних сортів і 51 сорту рядового матеріалу як вітчизняного, так і інтродукованого імпортного виробництва. У Одеській, Миколаївській і Херсонській областях південного регіону були виявлені кущі винограду з симптомами бактеріального раку як на молодих, так і на плодоносних виноградниках. Встановлено, що найбільший відсоток кущів з симптомами бактеріального раку був на сортах Каберне Совіньйон, Мерло, Шардоне імпортного виробництва. В результаті ідентифікації виділених ізолятів із матеріалу виноградних рослин і ґрунту міжряддя методами ІФА і ПЛР було підтверджено наявність збудника бактеріального раку за симптомами і встановлена латентна форма ураження рослин. Методом ІФА встановлено, що максимальна концентрація клітин збудника бактеріального раку зосереджується в пухлинах рослин і здерев'янілих чубуках. За основи штучного зараження тест-рослин *Solanum lycopersicum*, *Helianthus annuus* і *Vitis vinifera* референтними штамами бактеріального раку дисертанткою доказано, що всі досліджені сорти мають

схильність до ураження птогеном. Встановлено, що усі зразки, які були відібрані на виноградниках і виділені з них агробактерії переважно мали октопінову Ті-плазмиду (80 %), а також деякі – вітопінову (20 %). Доказано, що на виноградниках південного регіону превалює зараження збудником бактеріального раку *R. vitis* октопінового типу.

За матеріалами досліджень, виконаних у даному розділі, опубліковано 20 наукових праць

Розділ 5. Заходи захисту виноградних рослин

Виділено і досліджено антагоністичні властивості ізолятів бактерій, які б могли бути використані в якості біологічних препаратів для захисту винограду від бактеріального раку винограду для попередження вторинного зараження рослин із ґрунту, який може бути джерелом цієї інфекції і сприяти поширенню хвороби. Встановлено, що ці ізоляти за морфологічними і біохімічними показниками відповідають характеристикам виду *R. vitis*. Методом триплексної РЧ-ПЛР, а також за допомогою тест-рослин було встановлено, що два ізоляти агробактерій ІЛВМ1, ІЛВМ2 мали антагоністичні властивості.

Для оздоровлення виноградної лози і саджанців хворих на бактеріальний рак різних сортів винограду було підбрано температурний режим для оздоровлення рослин за допомогою водної терапії. Встановлено, що температурний режим 40 °С - 5 годин є оптимальним для зменшення кількості ізолятів патогенних агробактерій і негативно не впливає на фізіологічні показники дослідних сортів винограду. Доказано, що поєднання вакуум інфільтрації з різними температурними режимами негативно впливає на фізіологічні показники виноградних рослин, а саме: не утворюється калюс і не на усіх чубуках розпускаються вічка. Досліджена інтенсивність розмноження *in vitro* клонів підщепних і прищепних сортів винограду, як метод оздоровлення рослин від бактеріального раку. Розроблені прийоми підвищення коефіцієнту розмноження клонів винограду *in vitro* за рахунок оптимізації складу поживного середовища, іонітного субстрату, умов освітлення культуральних боксів. Розроблено прийоми оптимізації процесу адаптації мікроклонів винограду *in vivo*, які підвищують життєздатність оздоровлених від бактеріального раку рослин і забезпечують їх приживлюваність на рівні 95-97 %, яким було закладено базові маточники в теплиці.

За матеріалами досліджень, виконаних у даному розділі, опубліковано 13 наукових і науково-методичних праць.

Розділ 6. Антимікробна і протипухлинна активність краун-ефірів. Перспектива хімічного захисту винограду від збудника бактеріального раку.

Вперше проведено систематичне вивчення антимікробної активності для широкого ряду аліфатичних, циклоаліфатичних, ароматичних краун-ефірів, що містять в якості заступників алкільні, аралкільні, нітро-, аміно-, ацильні групи, атоми галогенів і інші сполуки, загалом понад 200 краун-ефірів. З чималого числа краун-ефірів, які проявляють значну антимікробну активність, нами встановлені 2 сполуки, які мали досить високу антимікробну активність, що перевищує таку для найбільш ефективних природних антибіотиків. Діапазон МПК цих краун-ефірів для *R. vitis* становить 83-200 мкг/мл.

Вивчено протимікробну дію модельних сполук. В якості моделей обрані бензодіоксан, вератрол і їх трет.бутілпохідні. Отриманий експериментальний матеріал дозволяє зробити висновки про структурно-функціональні закономірності антимікробної активності краун-ефірів. Показано визначальну роль «комплексонних» фрагментів в молекулах заміщених бензо (дібензо-) краун-ефірів і їх циклоаліфатичних аналогів, в першу чергу трет.бутільного і інших замісників для появи високої антимікробної активності. Мала токсичність порівняно з природними антибіотиками-комплексонами досліджених високоактивних краун-ефірів дозволяє розраховувати на створення ефективних препаратів на основі цих сполук.

За матеріалами досліджень, виконаних у даному розділі, опубліковано 16 наукових праць.

Розділ 7. Технологія виробництва здорових саджанців винограду вільних від збудника бактеріального раку. У розділі представлена схема методів та етапи контролю бактеріального раку винограду, яка включає щорічний одноразовий візуальний санітарний відбір (контроль) клонів підщепних сортів винограду (покущово, на всіх етапах, від клонодослідної ділянки до базових маточників) на наявність уражених зразків та їх відбракування. Також щорічний одноразовий візуальний санітарний відбір (контроль) клонів прищепних сортів винограду (покущово, на всіх етапах, від клонодослідної ділянки до базових маточників), яку доцільно проводити разом із другим санітарним контролем (оцінкою) на ураження вірусними хворобами наприкінці липня – початку серпня. При цьому контроль латентного ураження бактеріальним раком винограду доцільно проводити вибірково, охоплюючи таку кількість рослин: на банку клонів – по 20 % щорічно (усі рослини банку клонів повинні 1 раз на п'ять років пройти перевірку на збудника бактеріального раку); на базових

маточниках – вибірково 1 раз протягом 5 років (обсяг вибірки – 1 % від загальної кількості кущів). Додаткові заходи контролю бактеріального раку винограду на маточниках зводяться до використання агротехнічних заходів обмеження поширення хвороби та оздоровлення цінних сортів і клонів методом культури апікальної меристеми, термотерапії рослинного матеріалу і використання бактерій-антагоністів для попередження вторинного ураження ґрунтовою інфекцією.

За матеріалами досліджень, виконаних у даному розділі, опубліковано 16 наукових праць.

Загальні висновки дисертаційної роботи повністю відповідають її змісту, конкретно і стисло висвітлюють основні наукові результати.

У дисертації теоретично обґрунтовано, експериментально доведено та представлено системний підхід до вивчення поширення бактеріального раку на виноградниках півдня України. Також розроблено системи хімічних, біологічних та профілактичних захисних заходів.

Загалом можна зазначити, що дисертація Конуп Л. О. є закінченою високоякісною науковою роботою, в якій отримані принципово нові наукові результати, є теоретична та практична цінність, та є вельми важливою для майбутнього виробництва, про що свідчать рекомендації дисертанта.

**Дискусійні положення та зауваження офіційного опонента
Бабаянц О.В. щодо дисертаційної роботи Конуп Людмили
Олександрівни «Бактеріальний рак винограду і обґрунтування заходів
щодо обмеження його розвитку в південному регіоні України»**

У опонента є незначна кількість питань та зауважень щодо дисертаційної роботи, які жодним чином не зменшують її якості та важливості.

1 - стор. 33

-Одне з завдань «дослідити стійкість різних сортів винограду проти хвороби». Чи можливо ми говорити про стійкість до бактерій? Можливо це якась часткова стійкість, толерантність, талремність, .?

2 – стр. 33.

-Об'єктом дослідження є не лише збудник бактеріального раку винограду але й сорти та клони цієї культури, а також ефірні сполуки.

3. – стор. 92 – 93.

- Дещо сумбурно подається інформація щодо температурних умов у роки досліджень. Чи не краще, обговорюючи температурний режим та кількість опадів у весняно-літній період разом обговорити також і умови зимнього періоду. А не окремо у кінці.

4 – стор.103

-У розділі 2.3.1. «Фітосанітарне обстеження виноградних насаджень» не зайвими були б мати фото ураження, яке візуально оцінювали, як ураження бактеріальним раком винограду.

6 - стр.104.

-У розділі 2.3.3. з назвою «Мікробіологічний метод дослідження збудника бактеріального раку винограду» є підрозділи, що присвячені дослідженню агробактерій та ефірних сполук. Може краще узагальнити назву просто: «Мікробіологічний метод дослідження»?

7 - стор 147.

-Тбл. 3.3. Приводиться тільки наявність та відсутність ознак хвороби. Цікаво побачити оцінку інтенсивності її розвитку. Це є важлива характеристика взаємодії рослини і патогена.

8 - стор 157.

-Надається висновок, що сорти Каберне Совіньйон клон 15, Мерло і Шардоне клон 96 більш сприятливі порівняно з іншими. Наскільки це може бути не випадковість? Адже фон природний. Виділяти сорти за сприятливістю краще на штучному фоні, у тому числі й у польових умовах.

9 - стор 179.

-Доказано, що «всі досліджені сорти мають схильність до ураження патогеном», але розвиток хвороби на них може проходити по різному. Саме це й є сортові особливості, чи ні?

10 - стр.191.

-Не одна з таблиць не має показнику «НСР». Чому? Щодо таблиці 5.2 5.3 , то це є, вважаю за необхідність.

11 – стор.188.

-На скільки економічно виправдано використання ізолятів антагоністичних агробактерій? І чи не дуже це складно в умовах виробництва?

12 - стор. 232.

-Скринінг антимікробної активності краун-сполук проводили *in vitro*. А чи не зменшиться ефективність сполук, виділених як найкращі, в польових умовах?

13 - стр.234.

- На скільки економічно доцільно використовувати краун-ефіри для створення ефективних препаратів на основі цих сполук. Бо їх ефективність доказана безумовно, але чи не будуть вони занадто дорогими та рентабельними?

Загальна оцінка дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Конуп Людмили Олександрівни є структурованою, цілісною, повністю завершеною науково-дослідною роботою. Так, теоретично, експериментально та практично обґрунтовано і проведено сучасний моніторинг бактеріального раку на виноградниках півдня України, розроблено хімічні, біологічні та профілактичні захисні заходи проти хвороби. Дисертантка обґрунтувала актуальність теми дисертації, сформулювала мету та завдання досліджень, чітко визначила наукову новизну та практичну значимість отриманих результатів, навела дані щодо особистого внеску, публікації та апробацію наукових розробок.

У дисертації теоретично обґрунтовано, експериментально доведено та представлено системний підхід до вивчення поширення бактеріального раку на виноградниках півдня України і розроблено ефективну систему захисту від цієї хвороби.

Оформлення дисертації і автореферату в цілому відповідає діючим нормативним документам, що абсолютно показує якість чудової та дуже важливої наукової роботи. .

Представлена дисертаційна робота відповідає усім вимогам, що висуваються до докторських дисертацій згідно п. 10 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 зі змінами, а її автор, Конуп Людмила Олександрівна

цілком заслуговує присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.11 – фітопатологія.

Офіційний опонент

докторка біологічних наук,
старший науковий співробітник,
В.о.директора Одеської державної
Сільськогосподарської дослідної станції
Інституту водних проблем і меліорації
НААН України



О.В. Бабаянц

Підпис О.В. Бабаянц засвідчую,
вчений секретар

В.І.Зорунько

17.12.2021р.