

Opinion on the doctoral dissertation
"Development of a method for the use of microorganisms against the causative agent of
fire blight in apple orchards in Kazakhstan"
by Molzhigitova Assel Yermekovna

The presented doctoral thesis concerns a very important issue in the protection of apple trees against fire blight, one of the most harmful diseases in the cultivation of this species in almost all apple growing regions in the world. The disease occurs in at least 65 countries, causing economic losses. Plant protection against fire blight is aimed at both preventing their infection and controlling the disease.

I believe that undertaking the presented research is very purposeful because the range of products to control the disease is extremely poor and mainly includes those based on copper compounds and antibiotics. However, the use of the latter in practice is allowed only in a few countries. It is worth emphasizing that European Union legislation prohibits their use in plant protection. There are great prospects for biological method, mainly based on bacteria and yeast. The first research on biological control of fire blight was conducted in the USA about 100 years ago. Currently, it is also carried out in other countries, including Kazakhstan. Commercial products whose active ingredients are mainly bacteria have already been developed. However, the search for effective strains is still important. Kazakhstan is very interesting and valuable in this respect, e.g. due to the apple forests growing here, which can be naturally inhabited by populations of microorganisms with a high degree of various forms of antagonism towards the causal agent of fire blight, which is the *Erwinia amylovora* bacterium.

The structure of the doctoral thesis is typical for this type of work and includes an introduction with a broad justification of the research undertaken, current data on the occurrence and harmfulness of fire blight in Kazakhstan, and a presentation of six research tasks carried out as part of the doctoral thesis. It is worth emphasizing the indication of new elements of study and the list of activities related to the dissemination of research results at numerous international conferences and in publications. In addition, a broad review of world literature on the epidemiology of fire blight and strategies for combating it in various countries is presented, with particular emphasis on the biological method. Recall that the disease was first detected in the United States in the late 18th century and probably spread to various countries from there. This entire chapter was prepared very carefully by Assel Molzhigitova and is a valuable source of up-to-date information, especially from a practical point of view. Particularly interesting and worth further consideration is the use of artificial mutagenesis of selected strains with an emphasis on increasing their effectiveness. The thesis has 107 pages with a list of cited world literature, numbering approximately 250 items. The obtained results are presented in 18 tables and 35 figures, and two annexes contain evidence of the implementation and dissemination of the research in practice and the assessment of the effectiveness of the developed biopreparation. In addition, copies of two implementation



acts from Assel Molzhigitova scientific achievements and two patents for bioproducts based on the MB40 *Bacillus amyloliquefaciens* strain and the K20/1 *Streptomyces canofumeus* strain are attached..

The part devoted to own research includes a detailed description of the materials and methods used and the results obtained, and - what is very important - their discussion is combined research results published by other authors. In the summary, Assel Molzhigitova included six well-formulated conclusions, paying particular attention to the possibilities of applying the obtained results in practice. From a practical point of view, what is worth emphasizing is the test on the effectiveness of limiting the growth of *E. amylovora* on pear fruitlets, documented with very well-taken illustrative photographs. Moreover, the author described a similar test on cut off flowering apple tree shoots, also attaching a very good photo and included a formula for the degree of flower infection. The obtained results were statistically processed using modern analysis methods.

In the chapter devoted to the results and their discussion, Author presented a description of disease symptoms occurring on apple and pear trees in the examined orchards, from which she obtained a total of 216 isolates, including 142 bacterial isolates, 37 fungal isolates and 37 yeast isolates. Among the bacteria, the following species were identified: *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Bacillus polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum* and *Paenibacillus polymyxa*. The results of the phenotypic identification of bacteria, fungi and yeasts presented in a table were supplemented with photographs of colonies of these microorganisms on agar media. In the next stage of the research, she determined the zones of inhibition of the growth of *E. amylovora* by extracts obtained from the culture of 19 strains of *Streptomyces* spp., showing the activity of 8 of them.

Among the tested isolates of the *Bacillus* genus, noteworthy is the MB40 isolate, which inhibited the growth of *E. amylovora* to the highest extent, and among the *Lactobacillus* genus - isolate 17M. Identification of these isolates using molecular biology methods showed that the first one belongs to the species *B. amyloliquefaciens*, and the second one to *L. plantarum*.

Assel Molzhigitova devoted a separate part of the study to the MB40 isolate mutated by UV radiation, thanks to which its inhibitory activity increased 2.8-fold. However, irradiation of the 17M strain with UV rays gave similar results in terms of the number of surviving bacterial cells, but with increasing exposure time to the mutagenic factor, a decrease in their number was observed. There was no effect of UV on their antagonistic activity. The growth inhibition zone of *E. amylovora* was similar to the no-irradiation option.

The *B. amyloliquefaciens* MB40 strain obtained by mutagenesis was tested in laboratory conditions on unripe pear fruits and on model branches in natural conditions. On pear fruits infected with the pathogen and treated with the antagonist no fire blight symptoms were observed, and the samples practically did not differ from those treated with distilled water (control), which clearly proves the effectiveness of the tested strain.

In order to determine the metabolite responsible for the inhibitory effect of selected bacteria - antagonistic toward *E. amylovora*, a number of biochemical tests were carried out using gas-liquid chromatography. It has been shown that the main substance found in the culture fluid of MB40 is acetoin. The presence of, among others, 2,3-butanedione, 2-hydroxy-3-pentanone was also detected. However, various concentrations of acetoin

did not show any toxic effect against *E. amylovora*, while 2,3-butanedione dissolved in ethanol at various concentrations inhibited the growth of this pathogen. Experiments on flowering apple tree branches showed that spraying the post-culture fluid of the MB40 strain resulted in a reduction in the severity of fire blight symptoms by approximately 90% compared to the control combination.

In the case of strain 17M, it was found that the main component of the culture fluid was acetic acid, with less lactic acid and 2,3-butanedione. These ingredients reduced the growth of *E. amylovora*. However, the experiment with the culture fluid of strain 17M showed its phytotoxicity depending on the concentration. When used in concentrations of 10% and 20%, it showed very high effectiveness in protecting apple flowers against fire blight. In the further part of the study, the composition of the culture medium was determined in order to obtain the strongest antagonistic activity of selected strains against *E. amylovora*. Also, the biological effectiveness of the ethanol extract from the actinomycete *Streptomyces canofumeus* K20/1 was assessed.

It should be mentioned that in various concentrations of culture fluids of the MB40 and 17M strains, their bactericidal effect against *E. amylovora* was demonstrated. The research was carried out on tissue cultures of apple and pear trees and on model branches.

The results of tests on pear branches showed that spraying the culture fluid of the *B. amyloliquefaciens* MB40 strain was very effective. Production experiments aimed at assessing the effectiveness of the biological product based on the *L. plantarum* 17M strain conducted on apple trees showed its effectiveness of 77.7% compared to 86.7% in the standard version. Thus, it was found that the double use of biological products based on the bacterial strains *B. amyloliquefaciens* MB40 and *L. plantarum* 17M effectively protects fruit trees against the fire blight.

Conclusion

Summarizing the obtained results and their discussion, it should be stated that the undertaken research provided a lot of valuable information very useful in developing and implementing a biological method of protecting apple and pear trees against fire blight into practice.

Undoubtedly, Assel Molzhigitova knows the methods of classical microbiology and molecular biology. I state that in the presented doctoral thesis important research was undertaken for both science and practice. She achieved the intended research goal.

It should be emphasized that the presented research on the biological protection of apple trees against fire blight was carried out for the first time in Kazakhstan.

I believe that the presented doctoral thesis of Assel Y. Molzhigitova meets all the formal requirements for obtaining the academic degree of Doctor of Philosophy.

P. Sobiczewski

Dec. 10th, 2023

Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

хаб. д-р., проф. Петр Собичевский

Молжигитова Асель Ермаковнаның «6D070100 - Биотехнология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алу үшін орындалған «Қазақстанның алма бактарындағы бактериялық күйік қоздырғышына қарсы микроорганизмдерді қолдану тәсілін өңдеу» тақырыбындағы диссертациялық жұмысына

ПІКІР

Ұсынылған докторлық диссертация дүние жүзіндегі алма өсіретін аймақтардың барлығында дерлік кездесетін, ең зиянды аурулардың бірі болып табылатын алма ағаштарын күйік ауруынан қорғаудағы өте маңызды мәселеге қатысты. Ауру кем дегенде 65 елде орын алып, экономикалық шығынға ұшыратады. Өсімдіктерді бактериялық күйіктен қорғау, олардың инфекциясының алдын алуға және аурумен күресуге бағытталған.

Ұсынылған зерттеуді жүргізу өте мақсатты деп есептеймін, өйткені ауруды бақылауға арналған өнімдердің ассортименті өте аз және негізінен мыс пен антибиотик қосылыстарына негізделген препараттарды қамтиды. Алайда, соңғысын тәжірибеде қолдануға тек санаулы елдерде ғана рұқсат етілген. Еуропалық Одақ заңнамасы оларды өсімдіктерді қорғауда пайдалануға тыйым салатынын атап өткен жөн. Негізінен бактериялар мен ашытқыларға негізделген биологиялық әдістің болашағы зор. Бактериялық күйік ауруын биологиялық бақылау бойынша алғашқы зерттеулер шамамен 100 жыл бұрын АҚШ-та жүргізілген. Қазіргі уақытта ол басқа елдерде де, соның ішінде Қазақстанда да жүзеге асырылуда. Белсенді ингредиенттері негізінен бактериялар болып табылатын коммерциялық өнімдер қазірдің өзінде әзірленген. Дегенмен, тиімді штамдарды іздеу әлі де өзекті мәселе. Мысалы, Қазақстанда бұндай зерттеу жұмыстарын жүргізу өте қызықты және құнды, себебі осы жерде өсетін алма ағашы ормандарында, бактериялық күйік қоздырғышы - *Erwinia amylovora* бактериясына қарсы табиғи түрде әр түрлі формадағы микроорганизмдердің популяциялары тіршілік ете алады.

Докторлық диссертацияның құрылымы жұмыстың осы түріне тән және жүргізілген зерттеулердің кең негіздемесі бар кіріспеден, Қазақстандағы бактериялық күйіктің пайда болуы мен зияндылығы туралы ағымдағы деректерден және оның шеңберінде орындалған алты ғылыми жұмысты баяндаудан тұрады. Зерттеудің жаңа элементтерін және көптеген халықаралық конференциялар мен басылымдарда зерттеу нәтижелерін таратуға байланысты іс-шаралар тізбесін ерекше атап өткен жөн. Сонымен қатар, биологиялық әдіске ерекше назар аудара отырып, әртүрлі елдердегі бактериялық күйіктің эпидемиологиясы және онымен күресу стратегиялары бойынша әлемдік әдебиеттерге кең шолу берілген. Естеріңізге сала кетейік, ауру алғаш рет АҚШ-та 18 ғасырдың аяғында анықталған және сол жерден

әртүрлі елдерге тараған болуы мүмкін. Бұл тарауды Асель Молжигитова өте мұқият дайындаған және өзекті акпараттың құнды көзі болып табылады, әсіресе практикалық тұрғыдан. Тандалған штаммдардың жасанды мутагенезін қолдану, олардың тиімділігін арттыру ерекше қызықты және әрі қарай қарастыруға тұрарлық. Диссертациялық жұмыс 107 беттен тұрады, 250-ге жуық тақырыпты қамтитын әлемдік әдебиеттер тізімі келтірілген. Алынған нәтижелер 18 кестеде және 35 суретте берілген, ал екі қосымшада зерттеулердің тәжірибеде жүзеге асырылуы мен таралуы және әзірленген биопрепараттың тиімділігін бағалау туралы деректер келтірілген. Сонымен қатар, Асель Молжигитованың ғылыми жетістіктерінен екі енгізу актісі мен *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 штаммы мен *Streptomyces canofumeus* K20/1 штаммы негізіндегі биоөнімдерге екі патенттің көшірмелері қоса берілген.

Өзіндік зерттеулерге арналған бөлімде пайдаланылған материалдар мен әдістердің және алынған нәтижелердің егжей-тегжейлі сипаттамасы бар, ал ең маңыздысы - олардың талқылауы басқа авторлар жариялаған зерттеу нәтижелерінің жиынтығы болып табылады. Түйіндемеде Молжигитова Асель алынған нәтижелерді тәжірибеде қолдану мүмкіндіктеріне ерекше назар аудара отырып, нақты тұжырымдалған алты қорытындыны енгізді. Практикалық тұрғыдан алғанда, өте жақсы түсірілген иллюстрациялық фотосуреттермен құжатталған алмұрт жемістеріндегі *E. amylovora* өсуін шектеудің тиімділігіне арналған сынақты атап өткен жөн. Сонымен қатар, автор алма ағашының гүлденген бұтақшаларына ұқсас сынақты сипаттады, сонымен қатар өте жақсы фотосуретті тіркеп, гүлдерде ауру жұқтыру дәрежесінің формуласын берген. Алынған нәтижелер заманауи талдау әдістерімен статистикалық өңдеуден өткен.

Нәтижелерге және оларды талқылауға арналған тарауда автор зерттелген бақтарда алма және алмұрт ағаштарында пайда болатын ауру белгілерінің сипаттамасын келтірді, олардан барлығы 216 изолат, оның ішінде 142 бактериялық изолат, 37 саңырауқұлақ изолаттары және 37 ашытқы бөлініп алынды. Бактериялардың арасында келесі түрлер анықталды: *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Bacillus polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum* және *Paenibacillus polymyxa*. Кестеде келтірілген бактерияларды, саңырауқұлақтарды және ашытқыларды фенотиптік сәйкестендіру нәтижелері ағарлы коректік орталарындағы микроорганизмдердің колонияларының фотосуреттерімен толықтырылған. Зерттеудің келесі кезеңінде ол *Streptomyces sp.* туысына жататын 19 штамдардан алынған сығындылар арқылы *E. amylovora* өсуінің тежеу аймақтарын анықтап, олардың ішінен 8 дақыл белсенділік көрсеткен.

Тексерілген *Bacillus* туысының ішінде *E. amylovora* өсуін барынша тежеген MB40 изолаты болса, ал *Lactobacillus* туысына жататын 17M изолаты болғанын ерекше атап өтуге болады. Бұл изолаттарды молекулярлық биология әдістерімен анықтау барысында біріншісі *B. amyloliquefaciens* түріне, екіншісі *L. plantarum* түріне жататынын көрсетті.

Асель Молжигитова зерттеудің жеке бөлігін ультракүлгін сәулеленумен мутацияланған MB40 изолатына арнады, соның арқасында оның тежеу

белсенділігі 2,8 есе артты. Алайда, 17М штаммының ультракүлгін сәулелерімен сәулеленуі тірі қалған бактерия жасушаларының саны бойынша ұқсас нәтижелер бергенімен, бірақ мутагендік фактордың әсер ету уақыты ұлғайған сайын олардың санының азаюы байқалды. Ультракүлгін сәулесімен мутагенез жүргізу оның антагонистік белсенділігіне әсері болған жоқ. *E. amylovora* өсу тежеу аймағы сәулелендірусіз нұсқасына ұқсас болды.

Мутагенез әдісімен алынған *B. amyloliquefaciens* MB40 штаммы зертханалық жағдайда піспеген алмұрт жемістерінде және табиғи жағдайда үлгілі бұтақтарда сыналған. Қоздырғышпен зақымданған және антагонистпен өңделген алмұрт жемістерінде бактериялық күйіктің белгілері байқалмады, ал сынамалар тазартылған сумен өңделгеннен іс жүзінде ерекшеленбеді (бақылау), бұл тексерілген штаммның тиімділігін анық дәлелдейді.

Таңдалған бактериялардың *E. amylovora* антагонистік тежегіш әсеріне жауапты метаболитті анықтау үшін газ-сұйықтық хроматографиясын қолдану арқылы бірқатар биохимиялық сынақтар жүргізілді. MB40 дақылдық сұйықтығында кездесетін негізгі зат ацетоин екені көрсетілген. Сонымен қатар 2,3-бутандион, 2-гидрокси-3-пентанонның болуы да анықталды. Алайда, ацетоиннің әртүрлі концентрациясы *E. amylovora* қарсы ешқандай уытты әсер көрсетпеді, ал этанолда әртүрлі концентрацияда ерітілген 2,3-бутандион бұл қоздырғыштың өсуін тежеген. Гүлденген алма ағашының бұтақтарына жүргізілген тәжірибелер MB40 штаммының дақылдық сұйықтықпен бүрку бақылау комбинациясымен салыстырғанда бактериялық күйік белгілерінің ауырлығының шамамен 90%-ға төмендеуіне әкелгенін көрсеткен.

17М штамм жағдайында дақылдық сұйықтықтың негізгі компоненті сірке қышқылы, аз мөлшерде сүт қышқылы және 2,3-бутандион екені анықталды. Бұл метаболитер *E. amylovora* өсуін азайтты. Бірақ, 17М штаммының культуралық сұйықтығымен жүргізілген тәжірибе концентрацияға байланысты оның фитоуыттылығын көрсетті. 10% және 20% концентрацияда қолданғанда, ол алма ағашының гүлдерін бактериялық күйіктен қорғауда өте жоғары тиімділік көрсеткен. Зерттеудің келесі бөлігінде *E. amylovora* қарсы іріктеліп алынған штаммдардың ең күшті антагонистік белсенділігін алу үшін қоректік ортаның құрамы анықталды. Сондай-ақ, *Streptomyces canofumeus* K20/1 актиномицетінен алынған этанолды сығындысының биологиялық тиімділігі де бағаланған.

MB40 және 17М штаммдарының дақылдық сұйықтықтарының әртүрлі концентрацияларында олардың *E. amylovora* қарсы бактерицидтік әсері көрсетілгенін атап өткен жөн. Зерттеулер алма және алмұрт ағаштарының жемісі мен модельдік бұтақтарында жүргізілген.

Алмұрт бұтақтарына жүргізілген сынақтардың нәтижелері *B. amyloliquefaciens* MB40 штаммының дақылдық сұйықтығын бүрку өте тиімді екенін көрсетті. Алма ағаштарында жүргізілген *L. plantarum* 17М штаммына негізделген биологиялық өнімнің тиімділігін бағалауға бағытталған өндірістік тәжірибелерде стандартты нұсқадағы 86,7% салыстырғанда оның тиімділігін 77,7% көрсетті. Осылайша, *B. amyloliquefaciens* MB40 және *L.*

plantarum 17М бактериялық штаммдары негізіндегі биологиялық өнімдерді қосарлы қолдану жеміс ағаштарын бактериялық күйік ауруынан тиімді қорғайтыны анықталды.

Қорытынды

Алынған нәтижелерді және оларды талқылауды қорытындылай келе, жүргізілген зерттеулер алма және алмұрт ағаштарын бактериялық күйіктен қорғаудың биологиялық әдісін әзірлеу және тәжірибеге енгізу үшін өте пайдалы көптеген құнды мәліметтерді бергенін айту керек.

Асель Молжигитованың классикалық микробиология мен молекулалық биологияның әдістерін меңгергені сөзсіз. Ұсынылған докторлық диссертацияда ғылым үшін де, тәжірибе үшін де маңызды зерттеулер жүргізілгенін айтамын. Ол алға қойған зерттеу максатына жетті.

Алма ағаштарын бактериялық күйікке қарсы биологиялық қорғау бойынша ұсынылған зерттеу Қазақстанда алғаш рет жүргізілгенін атап өткен жөн.

Молжигитова Асель Ермаковнаның ұсынған докторлық диссертациясы философия докторы ғылыми дәрежесін алу үшін барлық ресми талаптарға сәйкес келеді деп есептеймін.

10 желтоқсан 2023ж.

хаб. д-р., проф. Петр Собичевский
қолы бар/

