

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен "доктор" по: област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.2 „Растителна защита“, научната специалност „Растителна защита“ (фитопатология).

**Автор на дисертационния труд:** Дияна Василева Александрова, докторант на самостоятелна подготовка към Института по Овощарство, гр. Пловдив.

**Тема на дисертационния труд:** „Реакция на крушови сортове, към причинителя на болестта огнен пригор *Erwinia amylovora* (Burril). Методи и средства за контрол.“

**Рецензент:** доц. д-р Катя Георгиева Трепчава, Лесотехнически Университет, област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.2 „Растителна защита“, научна специалност „Растителна защита“ (ентомология) определена за член на научното жури със заповед № РД-05-277/17.09.2020 год. от Председателя на ССА.

### 1. Кратко представяне на кандидата.

Докторант Дияна Василева Александрова завършва ОКС „Бакалавър“, специалност „Агрономство и растителни биотехнологии“ в Аграрен Университет, гр. Пловдив през 2012 г. През 2014 г. получава магистърска степен по „Растителна защита“ в Аграрен Университет, гр. Пловдив. От 07.04.2014 г. до момента работи в Институт по Овощарство, гр. Пловдив, като асистент по Фитопатология, където е и докторант на самостоятелна подготовка. Научноизследователската дейност на докторантката е свързана с болести по овощните растения, диагностика, изолиране и идентифициране на фитопатогени.

В периода 2014 - 2019 г. последователно има следните специализации и участия в чужбина:

- 2014 г. - 1 месец - Research Institute of Horticulturae, Skierniewice, Poland - Основни болести по костилкови овощни видове;
- 2015 г. - 1 седмица - Agroscope, Wädenswil, Switzerland Молекулярна диагностика на болести;
- 2018 г. - 1 седмица - Research Institute of Horticulturae, Skierniewice, Poland;

- 2019 г. - 1 седмица - „The 3rd Symposium on Exchange and Cooperation to Enhance Innovation for Agricultural Science and Technology in South & Southeast Asia. Zhaotong City of Yunnan Province.

Дияна Василева Александрова е зачислена в докторантура на самостоятелна подготовка по докторска програма „Растителна защита“ (фитопатология), ПН 6.2 „Растителна защита“ (Заповед №РД 05-115/13.06.2019 г.) към Института по Овощарство, гр. Пловдив и срок на обучение три години. След изпълнение на индивидуалния учебен план докторант Дияна Александрова е отчислена с право на защита със заповед №РД 05-156/25.06.2020 г.

## **2. Актуалност на проблема.**

Огненият пригор е една от най-опасните болести, регистрирани у нас и в света. Причинява се от бактерията *Erwinia amylovora* (Burrill., 1880) и при силно размножаване води до частично или пълно изсъхване на дърветата, намаляване на добивите и понижаване качеството на продукцията.

Актуалността на проблема на настоящата разработка е следствие от фактори обособени от редица доказани и безспорни факти: широк кръг от гостоприемници, бързо разпространение, както и трудна борба с патогена.

Анализът на литературните източници показва значимостта на разработвания проблем. Успешният контрол на болестта е свързан с необходимостта от комплексен подход на дейности и мероприятия, включващи подбор на устойчиви или толерантни сортове и подложки, съобразени със здравния статус и навременна агротехника, прогноза и правилно диагностициране на болестта, употребата на химични или техни алтернативни средства.

Свободната търговия на европейския пазар е предпоставка за навлизането на вредители, тъй като България търгува с широк кръг производители и вносители, както от Европа, така и от други континенти, а освен чрез дъжд, вятър и насекоми, бактерията *Erwinia amylovora* (Burrill., 1880) може да се разпространява чрез селскостопанска техника, превозни средства и заразени плодове. Тя прониква в растението чрез естествени отвори или наранявания, причинени от насекоми, или такива, причинени от неблагоприятни метеорологични условия. Големи рискове за пренос на вида е и използването на заразен посадъчен материал или размножаване на такъв. Болестта може да бъде пренесена и с режещи инструменти при извършване на различни манипулации без дезинфекция.

Крушовите сортове са доказано чувствителни към причинителя на болестта огнен пригор *Erwinia amylovora* (Burril). Различната сортова чувствителност към огнен пригор

доказва необходимостта от разширяване на проучванията свързани с устойчивост на сортове, подложки и селекционни материали, устойчивост на хибриди и усъвършенстване на методите за борба с болестта.

Актуалността на проблема на настоящата разработка е представена подробно в главите „Увод“ и „Литературен обзор“, в които ясно е обоснована необходимостта от разработването на настоящия дисертационен труд.

### **3. Цел, задачи, хипотези и методи на изследване.**

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи реакцията на крушови сортове, присадени на две подложки към бактериалното заболяване огнен пригор - чрез установяване степента на чувствителност спрямо два щама на бактерията и комбинация от тях и подбор на препарати за контрол срещу *Erwinia amylovora*.

Задачите на дисертацията са формулирани ясно и са насочени към:

1. Установяване чувствителност на крушови сортове, присадени на дялева подложка ВА29 или крушева подложка ОНФ333, при полски условия;
  2. Установяване чувствителност на крушови сортове, присадени на дялева подложка ВА29 или крушева подложка ОНФ333, при контролирани условия:
    - Определяне степен на нападение по листа, при сортоподложкови комбинации присадени на дялева подложка ВА29 и крушова подложка ОНФ333;
    - Установяване степен на нападение по летораста при сортоподложкови комбинации присадени на дялева подложка ВА29 и крушова подложка ОНФ333;
    - Определяне място на локализиране на повредата от бактерията *Erwinia amylovora*;
    - Проучване реакцията на крушови сортове спрямо два различни щама на бактерията и комбинация от тях;
    - Проследяване влиянието на подложката върху степента на чувствителност при сортоподложкови комбинации;
  3. Определяне на ефективността на системни и контактни фунгициди, в условия *in vitro* за превенция и контрол срещу *Erwinia amylovora*;
  4. Проучване ефективността на биостимулатора Регоплант.
- Изследванията са проведени през периода 2015-2019 г. в лабораторията по фитопатология и в експерименталните бази на Института по Овощарство, гр. Пловдив като са отчетени следните показатели:

- Чувствителност на крушови сортоподложкови комбинации при полски условия. За целта е създадена крушова градина. В опита са включени 25 крушови

сорта, присадени върху две подложки, както и 5 от сортовете отгледани на собствен корен. Засадени са по 5 дървета в повторение от всяка сортоподложкова комбинация. Възникването и развитието на огнен пригор при полски условия през периода 2015 - 2019 година са оценени по Van der Zwet и колектив (1970) USDA (United States Department of Agriculture).

- **Чувствителност на крушови сортоподложкови комбинации при контролирани условия.**

Отчетени са степен на нападение по листа (%) и степен на нападение по леторастите (%). За създаване на изкуствена инфекция са използвани шамовете Щам Ea3325 – изолиран от ябълка на 16.05.2013г. в гр.Петрич и Щам Ea3345 – изолиран от круша на 27.06.2013г. в гр. Ботевград. За установяване нападението по листа са направени две отчитания в динамика за възникналата инфекция, съответно на десети и петнадесети ден след изкуственото заразяване на растенията. Чувствителността е отчетена по 5 степенната скала на Zeller et al. (1990). За проследяване динамиката на развитие на болестта след преминаването на бактериите в леторастите е направено отчитане на двадесет и петия ден след изкуственото заразяване. Опожаряването на едногодишния прираст за всяка сортоподложкова комбинация и отчитането на преките, видими загуби след инокулацията са изчислени по формулата:  $X = a \cdot 100/A$ . Степента на опожаряване на леторастите е определена в зависимост от процента заразна част от летораста и въз основа на този показател сортовете са разпределени в групи според пет степенната скала Le Lezec et al. (1997).

- **Влияние на подложката върху степента на чувствителност на сортовете, след изкуствено заразяване.**

Заразяването и отчитането на резултати са направени както в описаните за сортоподложковите комбинации с контролирани условия.

- **Изпитване на химични и биологични средства за контрол на *Erwinia amylovora*.**

Изпитани са следните химични средства за контрол на *Erwinia amylovora* в ин витро условия - Бордо микс 20 ВП ( 200 г/кг меднокалциев сулфат) в концентрация 0,6% разтвор; Фунгуран 50 ВП (87,7% меден хидрооксид) в концентрация 0,15% разтвор; Алиет Флаш (800 гр/кг фозетил – алуминий), в концентрация 0,3% разтвор; Алфил Дупло (350гр/кг манкоцеб, 350гр/кг фозетил – алуминий), в концентрация 0,35% разтвор от препарата; Дитан М 45 (800гр/кг манкоцеб) в концентрация 0,3% разтвор. Проучването на възможностите за биологичен контрол е проведено чрез прилагане

на биостимулатора Регоплант. Данните от проведените наблюдения и анализи са обработени чрез статистически софтуер IBM SPSS Statistics 19 и Analysis ToolPak в MS Excel. Извършени са еднофакторен дисперсионен анализ, като е използван теста на Дънкан (Duncan's Multiple Range Test (MRT)). Използваните методи са описани подробно и напълно съответстват на поставените цел и задачи на разработката.

#### **4. Онагледеност и представяне на получените резултати.**

Дисертационният труд е написан върху 129 страници, обособен е в 8 раздела, които са точно и ясно конкретизирани. Информацията в настоящата разработка е обобщена в 20 таблици, 22 оригинални снимки и 13 фигури. Наличието на богат снимков материал в глава «Резултати и обсъждане» доказва достоверността на получените научни резултати. В разработката са включени двадесет и пет от най-широко застъпените в производството крушови сортове присадени на две подложки, които се използват в нашата страна. Проследени са темповете на развитие на болестта при различните сортове. Установено е влиянието на подложката върху степента на чувствителност след изкуствено заразяване с огнен пригор при пет сорта. В *in vitro* условия са изпитани химични препарати срещу огнен пригор. В разработката е включен биорегулар Регоплант, като биологичен препарат срещу патогена.

Използвани са подходящи статистически методи и софтуер за анализ на получените резултати.

#### **5. Обсъждане на резултатите и използвана литература.**

В резултат на настоящата разработка са оценени двадесет и пет сорта круши след изкуствено заразяване с местни шамове на бактерията *Erwinia amylovora*. За всеки изследван сорт е установена степен на нападение по листата, степен на нападение по летораста и развитие на бактерията до подложка. Извършен е отбор на сортове, притежаващи толерантност към бактериалното заболяване. Установена е разликата във вирулетността на различни изолати от *Erwinia amylovora* след изкуствено заразяване, както и вирулетността на смесен инокулум от бактерията. Проследено е действието на биостимулатор Регоплант в две концентрации, като индуктор на имунитета.

Интерпретацията на получените резултати потвърждава, че сортовете Д-р Жул Гюйо и Жифардова масловка присадени на ВА29 са толерантни на заболяването, а сортът Боскова масловка е силно чувствителен. От вида *Erwinia amylovora* се срещат шамове, които варират по отношение на вирулентност. Анализът на получените резултати потвърждава също така, че при смесване на два шاما от бактерията се увеличава вирулентността на шамовете.

потвърдено е влиянието на подложката върху степента на чувствителност от бактериалното заболяване. Получените резултати в следствие разработката на дисертационния труд имат и практическо значение, тъй като дават информация за толерантни сортове към болестта, подходящи за отглеждане в страната, изпитано е действието на медни препарати, които могат да се използват като превантивна мярка срещу бактериалното заболяване в овощните градини.

Използвани са 166 литературни източника, от които само три на български език, което доказва значимостта на разработвания проблем в световен мащаб. Добрата информираност на докторанта дава възможност за прецизна интерпретация на използваните литературни източници. Използваната литература е в унисон с поставените цели и задачи в дисертационния труд. Научната интерпретация и научния стил на излагане на материала е доказателство за високата степен на изученост на проблема и допълването му с нови знания и изследвания от докторанта.

#### **6. Приноси на дисертационния труд.**

Резултатите от проведените изследвания са обобщени в 15 извода и дават основание да се формулират както приноси с оригинален и потвърдителен характер, так и приноси с приложен характер.

#### **Научни приноси**

##### **Приноси с оригинален характер:**

- За първи път в страната са оценени двадесет и пет сорта крупни след изкуствено заразяване с местни щамове на бактерията *Erwinia amylovora*;
- За всеки сорт е установена степен на нападение по листата, степен на нападение по леторасти и развитие на бактерията до подложка;
- Извършен е отбор на сортове, притежаващи толерантност към бактериалното заболяване;
- Установена е разликата във вирулетността на различни изолати от *Erwinia amylovora* след изкуствено заразяване, както и вирулетността на смесен инокулум от бактерията;
- Проследено е действието на биостимулатор Регоплант в две концентрации, като индуктор на имунитета.

### **Приноси с потвърдителен характер:**

- Потвърдено е, че сортовете Д-р Жул Гюйо и Жифардова масловка присадени на ВА29 са толерантни на заболяването, а сортът Боскова масловка е силно чувствителен;
- Потвърдено е, че от вида *Erwinia amylovora* се срещат щамове, които варират по отношение на вирулентност;
- Потвърдено е, че при смесване на два щамове от бактерията се увеличава вирулентността на щамовете;
- Потвърдено е влиянието на подложката върху степента на чувствителност от бактериалното заболяване.

### **Научно-приложни приноси**

- Установени са толерантни сортове, подходящи за отглеждане в страната;
- Установено е, че сортовете присадени на дюлева подложка са по-чувствителни към бактериалното заболяване, в сравнение с тези присадени на крушова подложка ОНФ333;
- Оценено е действието на медни препарати, които могат да се използват като превантивна мярка срещу бактериалното заболяване в овощните градини.

Посочените от докторанта изводи и приноси ясно демонстрират научната и научно-приложна значимост на проведените изследвания и получените резултати, които представляват солидна основа за следващи приложения.

### **7. Критични бележки и въпроси.**

Допуснати са технически грешки напр. (стр. 100 снимка: Tsiantos, Psallidas., (2004) неправилно цитиране на някои автори) от незначителен характер, които не намаляват научната значимост на дисертационния труд и постигнатите научни резултати и приноси.

#### **Въпроси:**

1. Анализът на литературните източници показва, че разпространението на болестта и преноса на *Erwinia amylovora*, посредством насекоми се приема като вероятно най-важният начин за естествено разпространение на патогена в полски условия. Имате ли информация за видовия състав на представителите от клас Insecta през отделните години на проучването?
2. От къде е взет посадъчния материал за създаване на опитната градина?

3. Кои фактори според Вас обуславяват голямо вариране в степенята на нападение по листата след изкуствено заразяване с *E. amylovora* на сортове, присадени върху подложка ВА29, през отчетените периоди на десети и петнадесети ден при сортовете Ранна Болярка (46,6%-100%) и Пас Красан (53,3%-100%) ? (табл. 1)
4. Кои според Вас са структурните и биохимични особености в листата, които обясняват различната възприемчивост към патогенната? ( стр. 67)
5. На какво според Вас се дължи различната степен на чувствителност по листата при Сорта Абат Фетел, петнадесет дни след изкуственото заразяване с *Erwinia amylovora*? (Снимка 6).

#### 8. Публикувани статии и цитирания.

Във връзка с дисертационния труд са представени 3 публикации, на които докторантката е първи автор, както следва.

1. Alexandrova, D., & Dzhuvinov, V. (2017). First results of five pear cultivars after artificial inoculation with *Erwinia amylovora* (Burrill). *Journal of BioScience & Biotechnology*.

2. Александрова, Д., & Чавдаров, П. (2019). Химична средства за контрол с *Erwinia amylovora* (Burrill) в in vitro условия.

3. Aleksandrova, D., Chavdarov P. & Nesheva M. (2020). Fire blight susceptibility of pear cultivars grafted on OHF 333 rootstock. (in print)

Цитирания от докторантката не са посочени.

Представеният автореферат отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

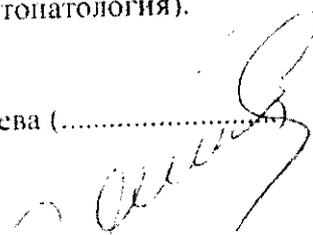
#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Въз основа на научените и приложените, от докторантката, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на Института по Овощарство към ССА за неговото приложение, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на Дияна Василева Александрова образователната и научна степен "**доктор**" по научната специалност „Растителна защита“ (фитопатология).

Дата: 03.11.2020 г.

РЕЦЕНЗЕНТ: доц. д-р Катя Тренчева (.....)



## REVIEW

on a dissertation for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" in: field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine, professional field 6.2 "Plant protection", the scientific specialty "Plant protection" (phytopathology).

**Author of the dissertation:** Diana Vasileva Alexandrova, PhD student in independent training at the Institute of Fruit Growing, Plovdiv.

**Topic of the dissertation:** "Reaction of pear varieties to the causative agent of *Erwinia amylovora* (Burril). Methods and means of control. "

**Reviewer:** Assoc. Prof. Dr. Katya Georgieva Trencheva, University of Forestry, field of higher education 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional field 6.2 "Plant Protection", scientific specialty "Plant Protection" (entomology) appointed as member of the scientific board of examiners with Order № RD-05-277/17.09.2020 by the Chairman of the AA.

### 1. Brief introduction of the candidate.

PhD student Diana Vasileva Alexandrova graduated from the Bachelor's Degree in Agronomy and Plant Biotechnology at the Agricultural University, Plovdiv in 2012. In 2014 she received a Master's degree in Plant Protection from the Agricultural University, Plovdiv. From 07.04.2014 until now she works at the Institute of Fruit Growing, Plovdiv, as an assistant in Phytopathology, where she is a doctoral student in independent training. The research activity of the doctoral student is related to fruit plant diseases, diagnostics, isolation and identification of phytopathogens.

In the period 2014 - 2019 there are successively the following specializations and participations abroad:

- 2014 - 1 month - Research Institute of Horticulturae, Skierniewice, Poland - Major diseases of stone fruit species;
- 2015 - 1 week - Agroscope, Wädenswil, Switzerland Molecular diagnostics of diseases;
- 2018 - 1 week - Research Institute of Horticulturae, Skierniewice, Poland;

• 2019 - 1 week - "The 3rd Symposium on Exchange and Cooperation to Enhance Innovation for Agricultural Science and Technology in South & Southeast Asia. Zhaotong City of Yunnan Province.

Diana Vasileva Alexandrova is enrolled in a doctoral program of independent preparation under the doctoral program "Plant Protection" (phytopathology) in 6.2 "Plant Protection" (№RD- 05115/13.06.2019) at the Institute of Fruit Growing, Plovdiv and the term of training three years. After the implementation of the individual curriculum, doctoral student Diana Alexandrova was expelled with the right to defense by order RD - 05156 / 25.06.2020.

## **2. Relevance of the problem.**

Fire blight is one of the most dangerous diseases registered in Bulgaria and in the world. It is caused by the bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill., 1880) and in case of strong multiplication leads to partial or complete drying of the trees, reduction of yields and lower quality of production. The relevance of the problem of the present development is a consequence of factors conditioned by a number of proven and indisputable facts: a wide range of hosts, rapid spread, and difficult control of the pathogen. The analysis of the literature sources shows the importance of the developed problem. Successful disease control is related to the need for a comprehensive approach to activities and activities, including selection of resistant or tolerant varieties and rootstocks in accordance with health status and timely agricultural techniques, prognosis and proper diagnosis of the disease, the use of chemicals or alternatives. Free trade on the European market is a prerequisite for the entry of pests, as Bulgaria trades with a wide range of producers and importers, both from Europe and from other continents, and in addition to rain, wind and insects, the bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill., 1880 ) can be spread through agricultural machinery, vehicles and contaminated fruit. It penetrates the plant through natural openings or injuries caused by insects or those caused by adverse weather conditions. The use of infected propagating material or propagation of such species is also a great risk for transmission. The disease can also be transmitted with cutting tools when performing various manipulations without disinfection. Pear varieties have been shown to be susceptible to *Erwinia amylovora* (Burril). The different varietal susceptibility to fire blight proves the need to expand studies related to the resistance of varieties, rootstocks and breeding materials, resistance to hybrids and improvement of disease control methods. The topicality of the problem of the present work is

presented in detail in the chapters "Introduction" and "Literary review", in which the necessity of the development of the present dissertation is clearly substantiated.

### **3. Purpose, tasks, hypotheses and research methods.**

The aim of this dissertation is to study the reaction of pear varieties grafted on two rootstocks to the bacterial disease fire blight - by establishing the degree of susceptibility to two strains of the bacterium and a combination of them and selection of control drugs against *Erwinia amylovora*. The tasks of the dissertation are clearly formulated and are aimed at:

1. Determination of susceptibility of pear varieties grafted on quince rootstock BA29 or pear rootstock OHF333, under field conditions:

2. Determination of susceptibility of pear varieties grafted on quince rootstock BA29 or pear rootstock OHF333 under controlled conditions;

- Determining the degree of attack on the leaves, in case of varietal rootstock combinations grafted on quince rootstock BA29 and pear rootstock OHF333;

- Determining the degree of attack on shoots in varietal rootstock combinations grafted on quince rootstock BA29 and pear rootstock OHF333;

- Determining the location of the damage from the bacterium *Erwinia amylovora*;

- Study of the reaction of pear varieties to two different strains of the bacterium and a combination of them;

- Monitoring the influence of the rootstock on the degree of sensitivity in varietal rootstock combinations;

3. Determination of the effectiveness of systemic and contact fungicides, in vitro for prevention and control against *Erwinia amylovora*;

4. Study the effectiveness of the biostimulator Regoplant.

The research was conducted in the period 2015-2019 in the laboratory of phytopathology and in the experimental bases of the Institute of Fruit Growing, Plovdiv, taking into account the following indicators:

**Sensitivity of pear rootstock combinations in field conditions.**

A pear garden has been created for this purpose. The experiment included 25 pear varieties grafted on two rootstocks, as well as 5 of the varieties grown on their own roots. Five trees are planted in repetition of each rootstock combination. The occurrence and development of fire in Polish conditions in the period 2015 - 2019 were assessed by Van der Zwet and team (1970) USDA (United States Department of Agriculture).

• **Sensitivity of pear rootstock combinations under controlled conditions.**

Leaf infestation rate (%) and shoot attack rate (‰) were reported. The strains Ea3325 - isolated from an apple on 16.05.2013 were used to create an artificial infection, in the town of Petrich and Strain Ea3345 - isolated from pear on 27.06.2013, in the town of Botevgrad. To establish the attack on the leaves, two reports were made in the dynamics of the infection, on the tenth and fifteenth day after the artificial infestation of the plants. Sensitivity was reported on a 5-point scale by Zeller et al. (1990). To monitor the dynamics of the development of the disease after the passage of bacteria in the shoots, a report was made on the twenty-fifth day after the artificial infection. The burning of the one-year growth for each rootstock combination and the reporting of the direct, visible losses after inoculation are calculated by the formula:  $X = a \cdot 100 / A$ . The degree of burning of the shoots is determined depending on the percentage of infected part of the shoots and based on this indicator the varieties are divided into groups according to the five-point scale Le Lezee et al. (1997).

• **Influence of the rootstock on the degree of susceptibility of the varieties after artificial infection.**

Infection and reporting of results were done as described for the rootstock combinations with controlled conditions.

• **Testing of chemical and biological agents for the control of *Erwinia amylovora*.** The following chemical control agents for *Erwinia amylovora* were tested in vitro: Bordeaux mix 20 VP (200 g / kg copper-calcium sulphate) in a concentration of 0.6‰ solution; Funguran 50 VP (87.7% copper hydroxide) in a concentration of 0.15% solution; Aliet Flash (800 g / kg fosetyl - aluminum), in a concentration of 0.3% solution; Alfil Duplo (350 g / kg mancozeb, 350 g / kg fosetyl - aluminum), in a concentration of 0.35% solution of the preparation; Ditan M 45 (800 g / kg mancozeb) in a concentration of 0.3% solution. The study of the possibilities for biological control was conducted by applying the biostimulator Regoplant. The data from

the conducted observations and analyzes were processed using statistical software IBM SPSS Statistics 19 and Analysis ToolPak in MS Excel. One-way analysis of variance was performed using the Duncan's Multiple Range Test (MRT) and the methods used are described in detail and fully in line with the objectives and objectives of the development.

#### **4. Visualization and presentation of the obtained results.**

The dissertation is written on 129 pages and is divided into 8 sections, which are precisely and clearly specified. The information in this paper is summarized in 20 tables, 22 original photos and 13 figures. The presence of rich photographic material in the chapter "Results and discussion" proves the reliability of the obtained scientific results. Twenty-five of the most widely used pear varieties grafted on two rootstocks, which are used in our country, are included in the development. The rates of disease development in different varieties were monitored. The influence of the substrate on the degree of susceptibility after artificial infection with fire in five varieties was established. Chemicals against fireburn have been tested in vitro. The bioregulator Regoplant is included in the development as a biological preparation against the pathogen. Appropriate statistical methods and software were used to analyze the results obtained.

#### **5. Discussion of the results and used literature.**

As a result of the present study, twenty-five varieties of pears were evaluated after artificial infection with local strains of the bacterium *Erwinia amylovora*. For each studied variety, the degree of attack on the leaves, the degree of attack on the shoots and the development of the bacterium to the rootstock were established. A selection of varieties with tolerance to bacterial disease was performed. The difference in the virulence of different isolates of *Erwinia amylovora* after artificial infection was found, as well as the virulence of a mixed inoculum from the bacterium. The effect of the biostimulator Regoplant in two concentrations as an inducer of immunity was monitored. The interpretation of the obtained results confirms that the varieties Dr. Jules Guyot and Gifard's olive grafted on BA29 are tolerant to the disease, and the variety Boskova maslovka is very sensitive. *Erwinia amylovora* strains are found to vary in virulence. The analysis of the obtained results also confirms that when mixing two strains of the bacterium the virulence of the strains increases, the influence of the substrate on the degree of susceptibility to the bacterial disease is confirmed. The results obtained as a result of the development of the dissertation have a practical significance, as they provide information about tolerant varieties to the disease, suitable for cultivation in the country,

tested the action of copper preparations that can be used as a preventive measure against bacterial disease in orchards. 166 literature sources were used, of which only three in Bulgarian, which proves the importance of the developed problem worldwide. The good information of the doctoral student allows for a precise interpretation of the used literature sources. The used literature is in unison with the set goals and objectives in the dissertation. The scientific interpretation and the scientific style of presentation of the material is a proof of the high degree of study of the problem and its supplementation with new knowledge and research by the doctoral student.

## **6. Contributions to the dissertation.**

The results of the conducted research are summarized in 15 conclusions and give grounds to formulate both contributions of original and confirmatory nature, and contributions of applied nature.

### **Scientific contributions**

#### **Contributions of original character:**

- For the first time in the country, twenty-five varieties of pears were evaluated after artificial infection with local strains of the bacterium *Erwinia amylovora*;
- For each variety, the degree of attack on the leaves, the degree of attack on the shoots and the development of the bacterium to the rootstock have been established;
- A selection of varieties with tolerance to bacterial disease has been made;
- There was a difference in the virulence of different isolates of *Erwinia amylovora* after artificial infection, as well as the virulence of a mixed inoculum of the bacterium;
- The effect of the biostimulator Regoplant in two concentrations as an inducer of immunity was monitored.

#### **Confirmatory contributions:**

- It has been confirmed that the varieties Dr. Jules Guillot and Gifard's olive grafted on BA29 are tolerant to the disease, and the variety Boskova maslovka is very sensitive;

- It has been confirmed that strains of the species *Erwinia amylovora* occur that vary in terms of virulence;
- It has been confirmed that mixing two strains of the bacterium increases the virulence of the strains;
- The influence of the substrate on the susceptibility to bacterial disease has been confirmed.

#### **Scientific and applied contributions:**

- Tolerant varieties suitable for growing in the country have been established;
- Varieties grafted on quince rootstock were found to be more susceptible to bacterial disease than those grafted on pear rootstock OHF333;
- The effect of copper preparations that can be used as a preventive measure against bacterial disease in orchards has been evaluated.

The conclusions and contributions indicated by the doctoral student clearly demonstrate the scientific and scientific-applied significance of the conducted research and the obtained results, which represent a solid basis for further applications.

#### **7. Critical remarks and questions.**

Technical errors have been made, e.g. (p. 100 photo; Tsiantos, Psallidas., (2004) incorrect citation of some authors) of insignificant nature, which do not reduce the scientific significance of the dissertation and the achieved scientific results and contributions.

#### **Questions:**

1. Analysis of the literature shows that the spread of the disease and the transmission of *Erwinia amylovora* by insects is considered to be probably the most important way for the natural spread of the pathogen in the field. Do you have information on the species composition of the Insecta representatives during the different years of the study?

2. Where is the planting material taken to create the experimental garden?
3. Which factors do you think cause a large variation in the degree of infestation on the leaves after artificial infection with *E. amylovora* of varieties grafted on rootstock BA29, during the reported periods of tenth and fifteenth day in the varieties Early Bolyarka (46.6% -100% ) and Pas Krasan (53.3% -100%)? (Table 1)
4. What do you think are the structural and biochemical features in the leaves that explain the different susceptibility to pathogens? (page 67)
5. What do you think is the reason for the different degree of sensitivity of the leaves in the Abbot Vettel variety, fifteen days after the artificial infection with *Erwinia amylovora*? (Picture 6).

## **8. Published articles and citations.**

In connection with the dissertation, 3 publications are presented, of which the doctoral student is the first author, as follows:

1. Alexandrova, D., & Dzhuvinov, V. (2017). First results of five pear cultivars after artificial inoculation with *Erwinia amylovora* (Burrill). Journal of BioScience & Biotechnology.
2. Alexandrova, D., & Chavdarov, P. (2019). Chemical controls with *Erwinia amylovora* (Burill) in vitro.
3. Alexandrova, D., Chavdarov P. & Nesheva M. (2020). Fire blight susceptibility of pear cultivars grafted on OHF 333 rootstock. (in print)

Citation by the doctoral student is not specified.

The presented abstract objectively reflects the structure and content of the dissertation.

## **CONCLUSION:**

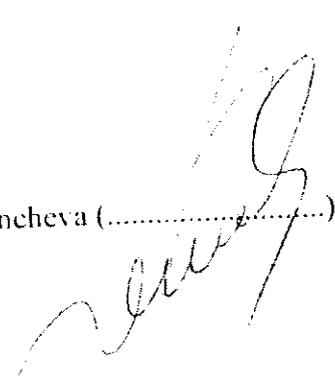
Based on the different research methods learned and applied by the doctoral student, the correctly performed experiments, the summaries and conclusions made, I believe that the presented dissertation meets the requirements of ZRASRB and the Rules of the Institute of Fruit Growing at AA for its application, which gives me reason to rate it POSITIVE.

I allow myself to suggest to the esteemed Scientific board of examiners also to vote positively and to award Diana Vasileva Alexandrova the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Plant Protection" (phytopathology).

Date: 03.11.2020

REVIEWER:

Assoc. Prof. Dr. Katya Trencheva (.....)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Katya Trencheva', is written over the dotted line of the reviewer's name.