

Saša Mitrev  
Institut za poljoprivredu, Strumica

UDK: 632.4: 679.64: 634.13 (497.17)  
AGRIS: H20 0718 0722 G832  
Originalni naučni rad

## PATOGENE I BAKTERIOLOŠKE KARAKTERISTIKE ERWINIA AMYLOVORA, PARAZITA KRUSKE I DUNJE U MAKEDONIJI\*)

Proučene su patogene, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike osam izolata i dva reizolata bakterija, izolovanih sa obolelih voćaka kruške i dunje, poreklom iz Makedonije.

Na osnovu postignutih rezultata proizlazi da svi proučavani sojevi pripadaju bakteriji *Erwinia amylovora*, prouzrokovaču bakterijske plamenjače voćaka. To potvrđuje i kontrolni soj (1430) ove bakterije izolovan u Francuskoj.

**Ključne reči:** *Erwinia amylovora*, sojevi bakterije, patogenost, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike, bakterijska plamenjača, kruška, dunja.

### Uvod

Bakterijska plamenjača jabučastih voćaka, čiji je prouzrokovalac *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al 1920, registrovana je na području Makedonije krajem osamdesetih godina. Bolest je prouzročila velike materijalne gubitke u područjima gde je bila konstatovana i ispoljila je tendenciju daljeg širenja u drugim rejonima. Parazit je utvrđen na krušci i dunji, a u manjem stepenu i na jabuci. Ovako naglo širenje i razvoj bolesti u Makedoniji nametnulo je potrebu što hitnijeg proučavanja patogena u cilju sprečavanja daljeg širenja i preduzimanja odgovarajućih mera zaštite.

Istraživanja su obavljena u fitobakteriološkoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu tokom 1991. i 1992. godine.

### Rasprostranjenost i ekonomski značaj patogena u Makedoniji

Prisustvo bakterije *E. amylovora* u Makedoniji prvi put je konstatovano u toku 1980. godine, a zvanično je objavljeno 1991. (Arsenijević, i sar. 1991). Poslednjih godina bolest uzima sve jače razmere, a štete su katastrofalne, pogotovo na krušci i dunji. Ovako iznenađna pojava patogena, i to jakog intenziteta, ukazuje

\*) Ovaj rad predstavlja deo magistarske teze pripremljene i odbranjene na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, 15.07.1993. godine, pod rukovodstvom prof. Dr Momčila Arsenijevića.

This paper is a part of M.A. thesis prepared and defended on July 15 1993, at the Faculty of Agriculture in Novi Sad, supervised by prof. dr. Momčilo Arsenijević as mentor.

na pretpostavku da je bolest možda bila prisutna u vidu manjih žarišta na području Makedonije i pre 1989. godine, pošto je poznato da su potrebne bar 2-3 godine za intenzivni razvoj bolesti od početka infekcije.

Bolest je do sada utvrđena u sledećim rejonima: Devčelija, Strumica, Štip, Radovište, Vinica, Veles, Kavadarci, Bitolj, Skoplje, Gostivar, Ohrid i Kičevo.

Ukupna površina na kojoj je bolest registrovana procenjuje se na oko 500 ha pod kruškom i oko 60 ha pod dunjom. Veći deo zasada na ovim površinama je već iskrčen, a preostali deo trebalo je da se iskrči do kraja 1991. godine. Ukupni troškovi za krčenje oko 700.000 obolelih stabala i sadnju novih voćaka iznosi oko 14 DEM po stablu, pa se šteta u Makedoniji procenjuje na oko 10.000.000 DEM.

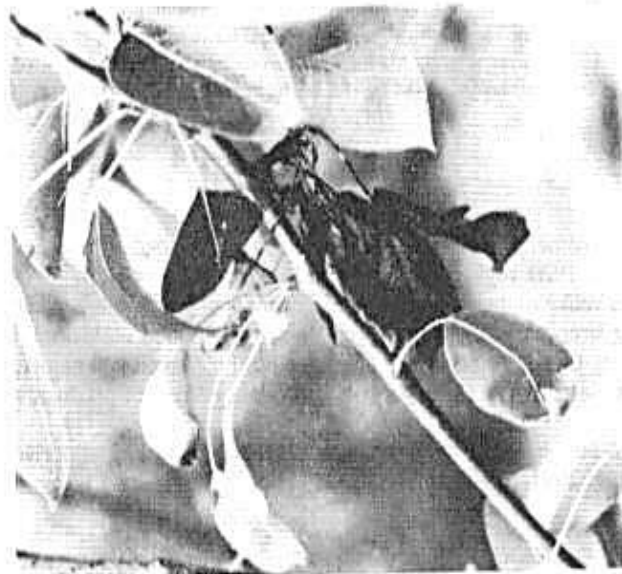
#### Simptomi bolesti

Bakterija *E. amylovora* parazitira sve delove jabučastih voćaka, počevši od cveta, cvetnih drški, plodova, lišća, mladara, grana i debela (s. 1-3).

Obično se prvi simptomi bolesti pojavljuju rano u proleće na razvijenim cvetovima. Bakterija dospeva u cvet preko nektarskih žlezda, odakle se intenzivno širi preko tučka, te promene na cvetovima postaju sve očitije. U početku, na cvetovima se uočavaju vlažne pege, koje potom, za desetak dana, postaju tamne boje, a cvetovi se suše, potpuno pocrne i izumiru. U daljem razvoju bolesti, bakterija se preko cvetnih drški širi na susedno lišće, koje postepeno dobija crnu boju, suši se i izumire, ali ne otpada već ostaje na granama (sl. 1).

Inficirani mladi plodovi pocrne, a po njihovoj površini se formiraju sitne kapi bakterijskog eksudata, posle čega plodovi potpuno izumiru.

Pri optimalnoj vlažnosti i temperaturi, bolest se brzo širi na mladarcima, to najjačim intenzitetom krajem maja i tokom juna meseca. U toku leta bolest se jasno primećuje a ispoljeni simptomi ukazuju na prisutnost bakterije *E. amylovora* (sl. 1 i 3).



Sl. 1. - *E. amylovora*. Izgled obolelog lišća kruške. Prirodna zaraza.  
*E. amylovora*. The look of the diseased leaves of pear. Natural infection.

Prisustvo bolesti jasno je izraženo i u vidu rak-rana na starijim granama i debelu. Na obolelim mestima pokorično tkivo je jako ispucano i udubljeno (sl. 3), a njegovim ljuštenjem i skidanjem jasno se uočava prelaz između zdravog i bolesnog dela. Obolelo tkivo postaje tamnije od zdravog i postepeno izumire. Kod nekih grana, gde se ove promene prstenasto razvijaju i spajaju, gornji deo iste grane izumire, sušeći se (sl. 2).



S1. 2. - *E. amylovora*. Sušenje pojedinih grana obolele kruške. Prirodna zaraza.  
*E. amylovora*, Drying of some branch of a diseased pear. Natural infection.



S1. 3. - *E. amylovora*. Nekroza i pucanje kore deblijih grana obolele kruške. Prirodna zaraza.  
*E. amylovora*, Necrosis and bark cracking of the thick branch of a diseased pear. Natural infection.

Krajem maja i tokom juna 1989. i 1990. godine, usled obilnih padavina, zapaža se jaka produkcija bakterijskog eksudata. Naročito intenzivno stvaranje eksudata prisutno je kod rak-rana na deblu i starijim granama, gde se eksudat obilnije sliva po biljci, prema zemljištu.

U toku vegetacije, jače obolele vočke lako se uočavaju i sa daljine, te zbog njihovog tipičnog izgleda, odaju utisak kao da su vatrom spaljene.

#### Materijal i metode

*Opšta tehnika korišćena u radu.* - Pripremljene hranljive podloge sterilisane su u autoklavu na 115°C tokom 20 min. Čiste kulture bakterija presejane su samo na hranjivu podlogu NAG, sa 2% glicerina (Psallidas i Dimova, 1986) i inkubirane u termostatu na 25°C u vremenu od 24h.

Biljni materijal sa koga su izolovane bakterije spaljen je posle upotrebe, a isti postupak primenjen je i za mladare na kojima je proveravana patogenost bakterije.

*Izolovanje bakterije.* - Izolacija iz obolelih uzoraka vršena je na uobičajeni način, korišćenjem maceriranog tkiva i zasejavanjem macerata na mesopeptonsku podlogu obogaćenu 5% saharozom (NAS) (Schaad, 1980, Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1988, 1992) i na selektivnu Crosseovu i Goodmanovu (CG) podlogu, (Crosse i Goodman, 1973).

Bakterije su izolovane uglavnom iz rak-rana debljih grana, uzimanjem sitnijih fragmenata na prelazu bolesnog i zdravog tkiva.

Zasejane Petri kutije održavane su 2-3 dana u termostatu na 25°C, a čiste kulture, presejane su na kosu hranjivu podlogu NAG sa 2% glicerina (NAG), pomoću bakteriološke petlje i inkubirane 24h na 25°C u termostatu, nakon čega su čuvane u frižideru na 4°C.

Svi dobijeni izolati, kao čiste kulture, ispitivani su pomoću 5 diferencijalnih testova: hipersenzibilna reakcija na duvanu, aglutinacija na mikroskopskoj pločici, bojenje po Gram-u, fluorescentnost na Kingovoj podlozi B i inokulacija mladih plodova kruške. Ovi testovi su preliminarni i služe za odabiranje samo patogenih sojeva za dalja ispitivanja (Arsenijević i sar. 1991).

*Patogene odlike Erwinia amylovora.* - Za proučavanje patogenih odlika dobijenih izolata, upotrebljena je suspenzija bakterija koncentracije  $5 \times 10^8$  ćelija/ml, a sve inokulacije vršene su ubodom pomoću igle. Korišćeno je po tri ponavljanja kod sledećih testova:

- provera patogenosti na listovima duvana i muškatele
- provera patogenosti na cvetovima kruške
- provera patogenosti na zelenim plodovima kruške, kajsije, višnje i šljive
- provera patogenosti na mladarama: kruške, jabuke, dunje i vatrenog trna (*Pyrocantia* sp.).

*Odgajivačke odlike patogena.* - Odgajivačke odlike dobijenih izolata ispitivane su na sledećim hranljivim podlogama:

- 1) standardna mesopeptonska (MPP) podloga
- 2) mesopeptonska podloga obogaćena sa 5% saharoze (NAS)
- 3) Kingova podloga B (King B-podloga)
- 4) Selektivna Crosseova i Goodmanova (CG) podloga (Arsenijević, 1988, 1992).

Od odgajivačkih karakteristika na ovim podlogama posmatrane su: oblik kolonija, boja, konzistencija, providnost, izgled ivica, veličina, prisustvo ili odsustvo tamnog centra, sluzavost i slično (Arsenijević, 1988, Crosse i Goodman, 1973).

Osim toga, proučavane su i sledeće odgajivačke odlike: bojenje po Gram-u, stvaranje levana, fluorescentnog i ružičastog pigmenta prema metodama opisanim od strane Arsenijevića (1988, 1992), razvoj na 34°C i 36°C (Schaad, 1980), tolerantnost prema 5% i 7% NaCl (Lelliott i Stead 1987), hidroliza skroba, razlaganje želatina (Šutić i Panić, 1969), stvaranje amonijaka (Goodman, 1975), stvaranje H<sub>2</sub>S iz peptona (Schaad, 1980), stvaranje indola (Klement et al, 1990), redukcija nitrata (Šutić i Panić, 1969), hidroliza eskulina (Lelliott i Stead, 1987) i tvina 80 prema (Klement et al, 1990).

*Biohemijasko-fiziološke odlike sojeva.* - a. - Kod ovih proučavanja korišćeni su sledeći testovi: pektolitička aktivnost na kriškama krompira (Arsenijević, 1988, 1992), aktivnost oksidaze, katalaze, fosfataze, lecitinaze i ureaze, oksidativno-fermentativni (O/F) test na podlozi sa glukozom, metabolizam arginina, metil-crveni test, redukujće supstance iz saharoze i stvaranje fenilalanindezaminaze prema metodama opisanim od strane Lelliotta i Steada (1987), Arsenijevića (1988, 1992) i Klementa et al (1990).

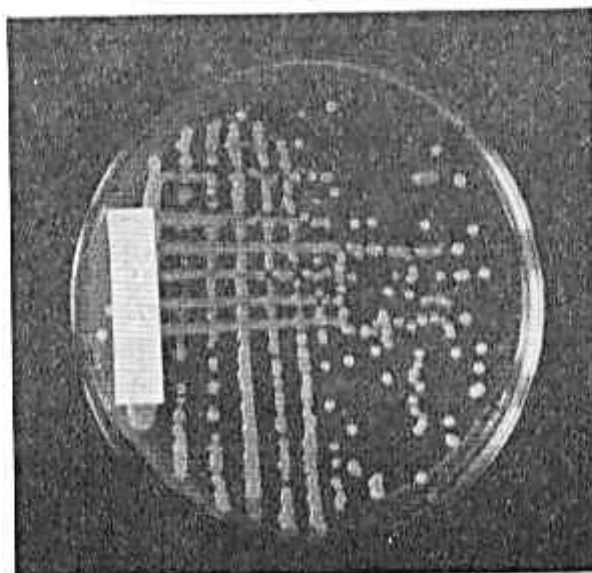
b. - Korišćenje ugljenih hidrata iz: D glukoze, D fruktoze, rafinoze, metil-a-D-glukozida, D galaktoze, D ksitoze, L ramnoze, salicina, L arabinoze, D manitola, D trehaloze, eskulina, dekstrina, dulcitol, glicerola i skroba, obavljeno je metodama koje navode (Arsenijević (1988, 1992) i Klement et al (1990).

c. - Za proučavanje stvaranja baza iz organskih kiselina, korišćene su: mravlja, malcinska, oksalna, limunska, benzolna, sirćetna i L. vinska kiselina (Arsenijević, 1988).

## Rezultati

### Izolovanje bakterije i opšte karakteristike dobijenih sojeva

Veći broj izolacija bakterije sa obolelih voćaka, obavljen je na podlozi sa 5% saharoze (NAS), sa koje su i dobijene čiste kulture bakterije (sl. 4). Kolonije na ovoj podlozi imaju karakteristične odlike bakterije *E. amylovora* i to: specifično uvećanje-levan tipa, prijavobelu do krem boju, ravne ivice i providnu periferiju, kao i tamniju tačku u središtu kolonije. Ovakve kolonije su presejane na hranljivu podlogu sa 2% glicerina (NAG), u epruvetu i uključene u dalja ispitivanja



Sl. 4. - *E. amylovora*. Izolovanje bakterije na podlozi obogaćenoj saharozom (NAS).  
*E. amylovora*. Bacteria isolation on a medium enriched with sacchrose (NAS).

Izolacije su obavljene i na selektivnoj podlozi, koju su dali Crosse i Goodman, 1973 (CG-podloga). Na ovoj podlozi najbrže se razvijaju kolonije *E. amylovora*. One su sa karakterističnim udubljenjima na površini kolonije, svetlijom periferijom i tamnijim centrom kolonije, što je karakteristično za ovu bakteriju.

Prisustvo atipičnih sojeva pri ovoj izolaciji na selektivnoj podlozi, slabije je izraženo u odnosu na hranljivu podlogu sa 5% saharoze (NAG), na kojoj se i atipične bakterije dobro razvijaju.

Na hranljivoj podlozi sa 5% saharoze (NAS), često i atipični sojevi imaju veoma slične kolonije sa bakterijom *E. amylovora* (Mitrev, 1993, Arsenijević i Mitrev, 1995).

Izolacije obavljene u toku mirovanja voćaka manje su uspešne u odnosu na one izvršene tokom vegetacije, kada su simptomi bolesti jasno izraženi. Sojevi čuvani u frižideru pri 4°C, kao čiste kulture, na kosoj podlozi sa glicerinom (NAG), zadržavaju svoju vitalnost oko 6 meseci.

Izolacijama je dobijeno ukupno 157 sojeva bakterija. Sojevi koji pokazuju pozitivne rezultate u pogledu hipersenzibilne reakcije duvana, aglutinacije na mikroskopskoj pločici i prisustva kapi bakterijskog eksudata na mladim plodovima kruške, a negativne na Kingovoj podlozi B i prilikom bojenja po Gram-u, ukazuju na karakteristike bakterije *E. amylovora*.

Od ukupno 157 izolovanih sojeva, 47 poreklom sa kruške i 36 sojeva sa dunje ispoljavaju pozitivnu reakciju kod gore spomenutih testova.

Dobijeno je i 34 netipična soja, među kojima 17 ukazuju na karakteristike apatogene forme *E. amylovora*, a 11 sojeva ispoljavaju karakteristike bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Mitrev, 1993).

Tokom ovog rada, za dalja biohemijska i fiziološka istraživanja odabrano je 8 sojeva i 2 reisolata, kao predstavnika pojedinih lokaliteta Makedonije i jedan autentičan soj bakterije *E. amylovora* dobijen posredstvom prof. M. Arsenijevića iz Francuske (tab. 1).

Tab. 1. - Sojevi *E. amylovora* dobijeni za istraživanja odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika

*E. amylovora* strains used for cultural and biochemical-physiological investigations

Br. No	Soj Strain	Lokalitet Locality	Godina izolacije Year of isolation
1*)	Du-39	Devdelija	1990
2	RDu-550/1	Vinica	1991
3	Du-554	Štip	1991
4	Du-568	Rosoman	1991
5	K8-89	Bitolj	1990
6	K8-550	Kavadarci	1991
7	K8-559	Veles	1991
8	RK8-560/1	Radovište	1991
9	K8-570	Skoplje	1991
10*	J-60	Bitolj	1990
11	1430	France	/

\*) Sojevi iz kolekcije bakterija prof. dr M. Arsenijevića, koja se odražava u bakteriološkoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Strains from the collection of bacteria of Prof. dr. Arsenijević, kept at bacteriological laboratory of the Faculty of Agriculture in Novi Sad

### Patogene odlike ispitvanih sojeva

*Provera patogenosti na listovima duvana i muškatile.* - Svi patogeni sojevi *E. amylovora* prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju listova duvana i muškatile u toku 24h. Nije bilo razlike kod ove dve biljke u pogledu hipersenzibilnosti prema ovoj bakteriji. I drugi autori (Arsenijević i sar. 1991) navode da je lišće muškatile pogodno za proveru patogenosti bakterija i pojavu hipersenzibilne reakcije.

*Provera patogenosti na cvetovima kruške.* - Veštačka inokulacija cvetova kruške pokazala je da su cvetovi veoma osetljivi na prisustvo bakterije *E. amylovora*. Promene na inokulisanim cvetovima su uočljive nakon 2-3 dana stajanja u vlažnoj komori. Cvetovi na mestu uboda postaju tamnije boje i vlažnog izgleda i ta promena se širi po celoj cvetnoj čašci, kruničnim listićima, dršci i zelenom delu pri osnovi cveta. Boja cvetova je tamnomrka do crna. Cvetovi ne otpadaju nego ostaju povijeni na grančici i vise.

Posle 5-10 dana od inokulacije cvetova, bakterija prodire kroz tkivo dalje od lišća, koje se postepeno menja, dobijajući tamnomrku do crnu boju. Takvo lišće ne otpada nego ostaje osušeno da visi na grančicama.

Nakon 10 dana od inokulacije, pa nadalje, bakterija se širi kroz tkivo grančica tako da se sva nekrotična mesta oko inokulacije spajaju među sobom i cela grančica izumire, najkasnije 20 dana od inokulacije. Boja pokoričnog tkiva se menja, postaje tamnija, masnog izgleda, naborana i suva. Pri zaseku skalpelom, uočava se mrka boja tkiva, kako u kori, tako i u drvenastom delu, odnosno posle dvadesetak dana nastaje potpuna destrukcija tkiva inokulisane kruške.

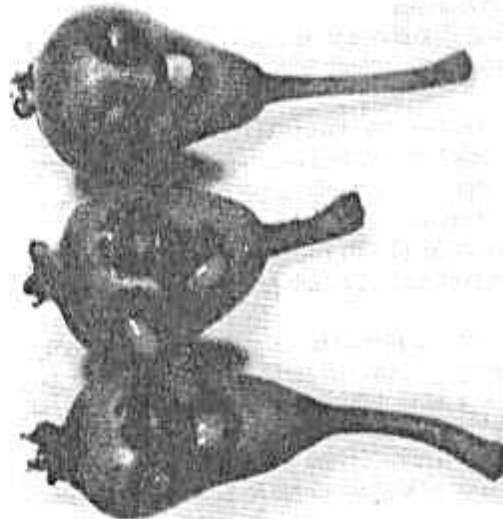
Sojevi *E. amylovora* dobijeni sa dunje i jabuke, podjednako prouzrokuju promene na cvetovima kruške kao i sojevi sa kruške.

*Provera patogenosti na mladim, nezrelim plodovima kruške i drugih voćaka.* - Veštačka inokulacija mladih plodova kruške, višnje, kajsije i šljive, pokazuje da ih ova bakterija podjednako parazitira, nezavisno od toga sa kog domaćina je izolovana.

Tako na plodovima kruške, sorte viljamovka, nakon 3-4 dana od inokulacije, uočavaju se nekrotično-prstenaste pege oko uboda i pojava sitnih kapi bakterijskog eksudata (sl. 5). Narednih dana stvaranje bakterijskog eksudata je obilnije, njegova boja je bela do krem, a kasnije postaje tamnija. Za nedelju dana ceo plod potpuno nekrotira i izumire.

Svi sojevi *E. amylovora*, nezavisno sa kog domaćina potiču, ujednačeno se ponašaju na mladim plodovima kruške.

Na plodovima kajsije, sorte mađarska najbolja, nakon inokulacije stvara se nekroza oko uboda u tkivo ploda. Svi izolati nisu se ujednačeno ponašali. Neki su sojevi prouzrokovali nekrozu, a drugi ne. Pojava bakterijskog eksudata ovde je izostala.



Sl. 5. - *E. amylovora*. Nekroza tkiva i pojava krupnih kapi bakterijskog eksudata na plodovima kruške. Veštačka inokulacija ubodom pomoću igle uz korišćenje supsenzije bakterija koncentracije  $10^8$  ćelija/ml.

*E. amylovora*. Tissue necrosis and appearance of large drops of bacterial exudate on the pear fruits. Artificial inoculation by needle using bacterial suspension  $10^8$  cells/ml.

Plodovi višnje, sorte hajmanova konzervna, sporije reaguju pošte inokulacije od plodova šljive i kruške. Nakon 4-5 dana od inokulacije nastaju nekrotične promene oko uboda, bez kapljica bakterijskog eksudata. Narednih nekoliko dana plodovi su potpuno obuhvaćeni nekrozom bez bakterijskog eksudata.

Već nakon 48h plod šljive, sorte stenlej, ispoljava prisustvo vlažnih pega oko uboda sa sitnim kapljicama bakterijskog eksudata. nakon tri dana gornja inokulisana površina je tamnija i vlažna, sa prisustvom mnogobrojnih većih kapljica bakterijskog eksudata. Izrazitu pogodnost plodova šljive sorte stenlej kao testa patogenosti bakterije *E. amylovora* i pojavu bakterijskog eksudata ističe i Arsenijević i sar. (1991).

*Provera patogenosti na mladima voćaka i vatrenog trna.* - Promene kod vatrene trna su mnogo sporije nego kod ostalih biljaka domaćina. Za potpunu nekrozu inokulisanih mladara potrebno je više od 10-15 dana.

Kod svih ispitivanih mladara domaćina, reakcija je pozitivna. Nezavisno od toga a koje biljke izolovani soj potiče, podjednako se ponaša na ispitivanim mladarima kruške, dunje, jabuke i vatrenog trna.

Kod mladara kruške, dunje i jabuke, prve promene se pojavljuju oko mesta uboda u vidu nekroze, posle 3-4 dana. Narednih 2-3 dana nekrotira vrh mladara sa tendencijom daljeg širenja prema osnovi. Za 10-12 dana nekrotira ceo mladar.

### Odgajivačke odlike ispitivanih sojeva

Na mesopeptonskoj podlozi (MPP) kolonije su ujednačene kod svih ispitivanih sojeva *E. amylovora*. Posle tri dana razvoja odlikuju se malim dimenzijama, veličine oko 1 mm; okrugle su, svetlučave i beličaste; nisu ispupčene i ravnih su ivica.

Na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (NAS), posle 3 dana razvoja u termostatu kolonije su okrugle 3-4 mm u prečniku, ravnih ivica, ispupčene i sjajne, prljavobele do krem boje. Prisutna je tamnija tačka u središtu kolonije i svetlija periferija. Narednih dana razvoja, kolonije gube konzistenciju i postaju sluzaste i spajaju se preko cele površine hranljive podloge. Nije registrovan drugi tip kolonija.

Na Kingovoj podlozi B, kolonije su sitne, okrugle, prečnika oko 1-2 mm, ravnih ivica i malo ispupčene, bele boje, nisu fluorescentne; gledano prema svetlu nisu mutne nego svetlučave i sa radijalnim su prugama.

Kod selektivne Crosse-Goodmanove (CG) podloge, kolonije su posle 4 dana razvoja krupne, ispupčene, 2-3 mm u prečniku, ravnih ivica kod manjih i talasastih, kod većih kolonija čiji je prečnik 3-4 mm. Prisutna su manja i veća udubljena po površini kolonija, nalik kraterima. Periferija je svetlija, a centar kolonija tamniji.

Kontrolni soj iz Francuske (1430), isto se ponaša u pogledu odgajivačkih odlika kao i domaći sojevi, samo na Kingovoj podlozi B, gledano prema svetlu, kolonije su mutne i nemaju radijalne pruge.

Sojevi koji su uključeni u ispitivanje odgajivačkih odlika pokazuju veliku homogenost u njihovim raznim reakcijama. Negativne reakcije su potvrđene kod: bojenja po Gram-u, razvoja u vodenom kupatilu na 34° i 36°C, tolerantnosti prema 7% NaCl, stvaranja ružičastog i žutog pigmenta, kao i kod redukcije nitrata, hidrolize skroba, eskulina i tvina 80. Stvaranje amonijaka, indola i sumpor-vodonika, eskulina i tvina 80. Stvaranje amonijaka, indola i sumpor-vodonika odsustuje. Pozitivne reakcije su kod: stvaranja levana, tolerantnosti prema 5% NaCl i razlaganja želatina.

Nije zabeležena razlika u nijednom testu, osim kod hidrolize eskulina, gde je reakcija neujednačena. Od deset sojeva, tri su pozitivna u ovom testu, a preostalih sedam i kontrolni soj iz Francuske (1430), su negativne do slabo pozitivne reakcije. Kontrolni soj iz Francuske kod preostalih testova ima potpuno iste odlike kao i ispitivani sojevi iz Makedonije (tab. 2).

### Biohemijsko-fiziološke odlike sojevad

Ustanovljena je velika homogenost među ispitivanim sojevima u pogledu biohemijsko-fizioloških odlika, korišćenja ugljenih hidrata i organskih kiselina. Pozitivni rezultati zabeleženi su kod sledećih testova: stvaranje levana, aktivnosti katalaze, redukujućih supstanci iz saharoze, O/F testa na podlozi sa glukozom (kako pri aerobnim tako i u anaerobnim uslovima gajenja) i razlaganje želatina (tab. 2).

Proučavani sojevi su pokazali negativne rezultate kod sledećih testova: aktivnost lecitinaze, oksidaze, fosfataze, fenilalanindezaminaze, ureaze, metil-erVENOG testa i metabolizma arginina (tab. 2).

Ovi rezultati se u potpunosti podudaraju sa istraživanjima koja su obavljena u drugim zemljama (Paulin et al 1973, Dye, 1969, Vantomme et al 1982, Schaad, 1980, Psallidas i Dimova, 1986, Van der Zwet i Keil, 1979), kao i sa rezultatima koje je ispoljio kontrolni soj *E. amylovora* (1430) poreklom iz Francuske (tab. 2 i 3).



Tab. 2. - Odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike sojeva *E. amylovora*  
 Cultural and biochemical-physiological properties of *E. amylovora* strains

Test	Sojevi iz Makedonije Strains from Macedonia	Soj 1430 Strain 1430	Podaci iz literature Literature <sup>1</sup>
Bojenje po Gramu - Gram reaction	-	-	-
Stvaranje - Production of:			
fluorescentnog pig. - fluorescent pig.	-	-	-
ružičastog pig. - pink diffusible pig.	-	-	-
žutog pig. - yellow pig.	-	-	-
levana - levan	+	+	+ ili ±
H <sub>2</sub> S iz peptana - H <sub>2</sub> S from peptone	-	-	-
NH <sub>3</sub> - NH <sub>3</sub>	-	-	-
indola - indole	-	-	-
Hidroliza - Hydrolysis of:			
želatina - gelatin	+	+	+
eskulina - aesculin	±	-	ili ±
škroba - starch	-	-	-
twina 80 - tween 80	-	-	-
Redukcija nitrata - Nitrate reduction	-	-	-
Razvoj na - Growth at:			
34°C	-	-	±
36°C	-	-	-
Tolerantnost prema - Tolerance of:			
5% NaCl	+	+	+
7% NaCl	-	-	-
Metil-crveni test - Methyl-red test	-	-	-
Redukujuće supstance iz saharoze - Reducing substance from sucrose	+	+	+ ili ±
O/F test na glukozu - O/F on glucose			
- aerovni uslovi - aerobic	+	+	+
- anaerobni uslovi - anaerobic	+	+	+
Metabolizam arginina - Arginine dihydrolase test	-	-	-
Aktivnosti - Activity of:			
- oksidaze - oxidase	-	-	-
- katalaze - catalase	+	+	+
- fosfataze - phosphatase	-	-	nt
- lecitinaze - lecithinase	-	-	-
- ureaze - urease	-	-	-
- fenilalanindeziminaze - phenylalanin deaminase	-	-	-
Trulež kriški krompira - P otatoes slices rot	-	-	-

+ = pozitivna reakcija - positive reaction

- = negativna reakcija - negative reaction

± = varijabilna reakcija - variable reaction

nt = nije testirano - not tested

<sup>1</sup> Paulin et al 1973, Dye, 1969, Vantomme et al 1982, Schaad, 1980, Psallidas i Dimova, 1986, Van der Zwet i Keil, 1979.

T a b . 3 . - Korišćenje ugljenih hidrata i organskih kiselina od strane  
proučavanih sojeva *E. amylovora*  
Carbon compounds and organic acids utilization by *E. amylovora* strains

Test	Sojevi iz Makedonije Strains from Macedonia	Soj 1430 Strain 1430	Podaci iz literature Literature <sup>1)</sup>
D glukoza - D glucose	+	+	+
rafinoza - raffinose	-	-	±
fruktoza - fructose	+	+	+
L ramnoza - L. ramnose	±	±	- ili ±
saharoza - sucrose	+	+	+
L arabinoza - L. arabinose	+	+	+
D ksiloza - D xylose	+	+	-
metil- $\alpha$ -D-glukozid methyl- $\alpha$ -D-glucoside	-	-	-
maltoza - maltose	-	-	+
D manitol - D manitol	+	+	+
D galaktoza - D galactose	+	+	-
dulcitol - dulcitol	-	-	+
D trehaloza - D trehalose	+	+	+
glicerol - glycerol	+	+	+
laktoza - lactose	-	-	-
dekstrin - dextrin	-	-	-
eskulin - aesculin	-	-	-
skrob - starch	-	-	- ili ±
salicin - salicin	-	-	+
mравlja kiselina - formic acid	+	+	+
maleinska kiselina - maleic acid	+	+	+
oksalna kiselina - oxalic acid	+	+	+
limunska kiselina - citric acid	+	+	+
acetatna kiselina - acetic acid	+	+	+
L tartaratna kiselina - L tartaric acid	-	-	-
benzolna kiselina - benzoic acid	-	-	-

+ = pozitivna reakcija - positive reaction

- = negativna reakcija - negative reaction

± = varijabilna reakcija - variable reaction

nt = nije testirano - not tested

<sup>1)</sup> Paulin et al 1973, Dye, 1969, Vantomme et al 1982, Schaad, 1980, Psallidas i Dimova, 1986, Van der Zwet i Keil, 1979.

### Diskusija

Bakterija *E. amylovora*, kao prouzrokovatelj bakterijske plamenjače jabučastih voćaka, sa sigurnošću je prvi put utvrđena u Makedoniji 1989. godine, što je i zvanično objavljeno (Arsenijević i sar. 1991, Arsenijević i Panić, 1992a). Pretpostavlja se da je bakterija u područjima Makedonije bila prisutna i pre 1989. godine.

Tokom naših proučavanja, za izolaciju parazita korišćeni su uzorci skoro iz svih područja Makedonije, a dobijeni rezultati ukazuju da je parazit prisutan u mnogim lokalitetima. Uočljivo je da ovaj patogen napada pretežno zasade pod kruškom i dunjom, a slabo one pod jabukom. Ovo se podudara sa zapažanjima i drugih autora u drugim mediteranskim zemljama, kao što je Grčka (Psallidas, 1990) i Turska (Oktem, 1990), a što se slaže i sa podacima Arsenijevića i

sar. (1991), Arsenijevića i Panića, (1992b), Panića i Arsenijevića (1991, 1992). Ovo navodi na moguću specifičnost ponašanja parazita u području Mediterana, zbog klimatskih faktora ili usled nejednake agresivnosti bakterije u odnosu na svoje domaćine ispoljene u ovom regionu.

Ukupna registrovana površina na kojoj je prisutna ova bolest u Makedoniji procenjuje se na oko 500 ha kruške i 60 ha dunje. Nije zabeleženo krčenje zasada pod jabukom. Materijalna šteta se procenjuje na oko 10.000.000 DEM. Veliki ekonomski značaj ove bakterije ističu i Arsenijević i Panić (1992a, b) i Panić i Arsenijević (1992).

Nije registrovana razlika u otpornosti pojedinih sorti na terenu, kako kruške tako i dunje, što se takođe slaže s podacima Arsenijevića i Panića (1992) i Panića i Arsenijevića (1992).

Simptomi ispoljeni na obolelim voćkama identični su već opisanim u literaturi, u drugim zemljama. Ispoljavaju se u karakterističnom obliku na svim delovima obolele vočke: stablu, granama, lišću, mladarcima, cvetovima i plodovima.

Iz obolelih biljnih delova, poreklom iz različitih područja Makedonije, izolovano je 157 čistih kultura bakterije, od kojih je 84 pokazalo odlike bakterije *E. amylovora*. Izolacije su pretežno vršene na hranljivoj podlozi sa 5% saharoze (NAS), a manje na selektivnoj Crosseovoj i Goodmanovoj (CG) podlozi. Na prvoj podlozi, kolonije su krupne, levan tipa, prljavo bele do krem boje, ravnih ivica, providne periferije i sa tamnijom tačkom u središtu kolonije. Od ukupno 157 sojeva izolovanih sa obolele kruške i dunje, odabrano je osam reprezentativnih sojeva i dva reizolata za detaljnija ispitivanja, što je i predmet ovog rada (tab. 1, 2, 3).

Kod proučavanja odgajivačkih odlika ove bakterije, pokazalo se da je selektivna (CG) podloga pogodnija za izolacije od hranljive podloge obogaćene sa 5% saharoze (NAS). Ova pogodnost proizlazi iz toga, što spomenuta podloga onemogućava razvoj atipičnih i saprofitičkih bakterija, kao i drugih mikroorganizama, a favorizuje razvoj *E. amylovora*.

Patogene odlike ispitivanih sojeva ukazuju na izrazitu homogenost kao i ujednačenost u pogledu bakterioloških karakteristika (tab. 2 i 3). Tako svi proučavani sojevi *E. amylovora* prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju lišća duvana i muškatle, izazivajući nekrotične pege i pojavu bakterijskog eksudata na mladim plodovima kruške. Nezavisno sa kog domaćina potiču, sojevi ove bakterije ispoljavaju isti stepen patogenosti na veštački inokulisanim mladarcima kruške, dunje i vatrenog trna.

Ispitivani sojevi pokazuju izrazitu homogenost i u pogledu odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika (tab. 2 i 3), što se podudara sa ranije obavljenim proučavanjima ove bakterije od strane mnogih istraživača (Dye, 1969, Van der Zwet i Keil, 1979, Schaad, 1988, Arsenijević i sar. 1991, Psallidas i Dimova, 1986, Paulin et al 1973) i sa odlikama kontrolnog soja (1430) iz Francuske.

## Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih tokom ovih istraživanja može se zaključiti sledeće:

- Bakterija *E. amylovora* je prouzrokovatelj patogenih promena na krušci, dunji i jabuci u Makedoniji. Pretpostavlja se da je ona u ovom području bila prisutna i pre 1989. godine.
- Usled destruktivnog dejstva patogena iskrčeno je oko 500 ha kruške i 60 ha dunje, uglavnom u društvenom vlasništvu. Površine su sigurno i veće ako se uzmu u obzir i voćnjaci privatnog vlasništva, za koje nema tačne evidencije.
- Materijalne štete usled dejstva ove bakterije, dostigle su u 1990. godini vrednost od oko 10.000.000 DEM.
- Patogenost proučavanih sojeva dokazano je različitim testovima i to: veštačkom inokulacijom cvetova kruške, plodova kruške, šljive, kajsije i višnje, mladara kruške, jabuke, dunje i vatrenog trna, kao i pojavom hipersenzibilne reakcije lišća duvana i muškatle. Postignuti rezultati pokazuju da se sojevi među sobom ujednačeno ponašaju i da razlike nisu značajne. Nezavisno sa kog domaćina je soj dobijen, podjednako se ponaša na inokulisanoj krušci, dunji i jabuci.

- Odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike ispitivanih sojeva se u potpunosti podudaraju sa podacima iz literature i kontrolnim izolatom *E. amylovora*, poreklom iz Francuske. Proučavani sojevi pokazuju veliku homogenost i u svim ostalim odlikama (tab. 1, 2, 3).

#### LITERATURA

- Arsenijević, M. (1988): Bakterioze biljaka. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M. i Panić, M. (1992a): First Appearance of Fire Blight, Caused by *Erwinia amylovora*, on Quince and Pear in Yugoslavia. *plant Disease*, 76: 1283 (Abstr).
- Arsenijević, M. i Panić, M. (1992b): Present Status of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia, VIII Inter. Conf. on Plant Path. Bac. June, 9-12, 1992, Versailles, France.
- Arsenijević, M., Panić, M. i Antonijević, D. (1991): Fire Blight of Pomaceous Fruit Trees in Yugoslavia. *Plant Protection*, Vol. 42, (No 196): 87-97, Belgrade.
- Arsenijević, M. i Mitrev, S. (1995): Karakteristike nekih atipičnih sojeva bakterija dobijenih prilikom izolacija *Erwinia amylovora*. *Zaštita bilja* (u štampi).
- Crosse, J.E. i Goodman, R.N. (1973): A Selective Medium for a Definitive Colony Characteristics of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 63: 1425-1426.
- Dye, D.N. (1968): A Taxonomic Study of the Genus *Erwinia* I. The "*Amylovora*" group. *New Zcal. Jour. Sci.* 11: 590-607.
- Goodman, N.R. (1975): *Phytobacteriology* (Third Edition), University of Missouri, Columbia, Mo.
- International Working Group on Fire Blight Research (1990): NEWSLETTER. U.S. Department of Agriculture, Appalachian Fruit Research Station, Kearneysville, West Virginia, USA.
- Klement, Z., Rudolph, K. i Sands, D.C. (1990): *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Lelliott, R.A. i Stead, D.E. (1987): *Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants*, William Clowes Limited, Baccles and London.
- Mitrev, S. (1993): Proučavanje bakterije *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920 kao parazita voćaka u Makedoniji. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Institut za zaštitu bilja, Novi Sad.
- Panić, M. i Arsenijević, M. (1991): *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. - Pojava rasprostranjenosti i štetnosti u svetu i Jugoslaviji. *Glasnik zaštite bilja*, God. XIV, br. 6: 191-197, Zagreb.
- Panić, M. i Arsenijević, M. (1992): Outbreak, Spread and Economic Importance of Fire Blight Pathogen (*Erwinia amylovora*) in Yugoslavia. Sixth Inter. Workshop on Fire Blight, October, 10-12, 1992, Athens, Greece. *Acta horticulture* (1993) 338: 89-96.
- Paulin, J.P. i Samson, R. (1973): Le feu bactérien en France. II. Caractères des souches D'*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. 1920, isolées du foyer Franco-Belge. *Ann. Phytopathol.* 5(4): 389-397.
- Psallidas, P.G. i Dimova, M. (1986): Occurrence of the Disease Fireblight of Pomaceus Trees in Cyprus. Characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. *Annls. Inst. Phytopath. Benaki*, 15: 61-70.
- Schaad, N.W. (1980): *Laboratory Guide for identification of plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopath Society, St. Paul, Minnesota.
- Vantomme, R., Swings, J., Goer, M., Kersters, K. i de Ley, J. (1982): Phytopathological Serological, Biochemical and Protein Electroforated Characterization of *Erwinia amylovora*. Strains Isolated in Belgium. *Phytopath. Z.* 103: 349-360.
- Van der Zwet, T. i Keil, H.L. (1979): *Fire Blight. A Bacterial Disease of Rosaceous Plants*, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1-200.

(Primljeno 22.08.1994.)

PATHOGENIC AND BACTERIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF  
*ERWINIA AMYLOVORA*, THE PATHOGEN OF PEAR AND QUINCE-TREES  
IN MACEDONIA

by

S. Mitrev

Institute of Agriculture, Strumica

S u m m a r y

Fire blight, caused by *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920, is very destructive disease for pear, quince and less to apple tree in Macedonia. The pathogen recently a quarantine bacterium for our country, has already been caused considerable damages with tendency of further spreading.

The purpose of the present study was: (1) to show economic importans and distribution of *E. amylovora* in Macedonia, (2) to test their patogenicity, (3) to verify their properties by morphological, biochemical and physiological tests and (4) to compare the strains isolated in Macedonia with autentic strain from France.

The disease was registered in 15 communities or the total surface of Macedonia was estimated of about 500 ha under pear and about 60 ha under quince trees. Great part of these surfaces was already cleared. The expenses for celaning and planting new seedlings could be estimated on about 10.000.000 DEM.

From eighty three isolates of *E. amylovora*, 47 from Pear and 36 from quince trees, isolated during 1991. and 1992., eight isolates and two reisolates were studied in detail (tab. 1, 2 and 3). The strains were examined by morfological, biochemical, physiological and pathological features (tab. 2 and 3). These properties indicate that all *E. amylovora* investigated strains constitute a homogeneous populations, regardless of their host plant, place (locality) or date of isolation.

Our investigation showed that strains from Macedonia are identical to *E. amylovora*, bacterium the causal agent of "fire blight" disease of the pomaceous trees and that it did not constitute a special strains of the pathogen.