

Momčilo Arsenijević  
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Saša Mitrev  
Institut za poljoprivredu, Strumica

UDK: 579.64:634.1  
AGRIS: H20 0718 0722  
Originalni naučni rad

## KARAKTERISTIKE NEKIH ATIPIČNIH SOJEVA BAKTERIJA DOBIJENIH PRILIKOM IZOLOVANJA ERWINIA AMYLOVORA

Proučene su patogene, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike pet sojeva bakterija izolovanih iz tkiva obolele kruške i dunje, inficirane sa *Erwinia amylovora*.

Na osnovu postignutih rezultata proizilazi da se proučavani sojevi razlikuju, kako međusobno tako i u odnosu na bakteriju *E. amylovora*. Njihove odlike ukazuju na to da se prilikom laboratorijske obrade uzoraka, poreklom s obolelih voćaka, mogu pojaviti, osim sojeva tipičnih za *E. amylovora*, i kolonije saprofitskih bakterija, kao i sojevi *Erwinia herbicola* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

**Ključne reči:** *Erwinia amylovora*; *E. herbicola*; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; saprofitske bakterije; sojevi bakterija; patogene, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike; bakteriozna plamenjača; dunja; kruška.

### Uvod

Bakteriozna plamenjača kruške i dunje predstavlja jednu od najdestruktivnijih i ekonomski najznačajnijih bolesti jabučastih voćaka na teritoriji Makedonije i SR Jugoslavije (Arsenijević i sar., 1991; Arsenijević i Panić, 1992; Mitrev, 1993). Prilikom izolovanja njenog prouzrokovača, bakterije *Erwinia amylovora* (Burritt) Winslow et al. na standardnim podlogama kao što su mesopeptonska (MPP) i mesopeptonska obogaćena sa 5% saharoze (NAS), osim kolonija tipičnih za *E. amylovora*, razvijaju se i kolonije drugačijeg izgleda koje se, sudeći prema svome izgledu, češće uočavaju na podlozi.

U želji da utvrdimo njihovu srodnost ili različitost u odnosu na karantinsku bakteriju *E. amylovora* pristupili smo proučavanju patogenih i bakterioloških odlika nekoliko sojeva, predstavnika različitih grupa i tipova kolonija, kolekcionisanih pri izolovanju *E. amylovora*. Ovo utoliko pre s obzirom na aktuelnost i značaj *E. amylovora* u nas i potrebu što bržeg i jednostavnijeg testiranja i identifikacije njenih sojeva dobijenih pri izolaciji, a i zbog mogućnosti da jedna vrsta bakterija može formirati kolonije različitog izgleda na podlozi i obrnuto (van der Zwet i Keil, 1979; Arsenijević, 1988).

Istraživanja su obavljena u Fitobakteriološkoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu tokom 1991. i 1992. godine (Mitrev, 1993).

### Materijal i metode

1. *Izolovanje raznih sojeva bakterija.* - Izolovanje bakterija vršeno je na uobičajeni način zasejavanjem macerata, razmazom, na podlogu (NAS) sa 5% saharoze (Schaad, 1988, Lelliott i Stead, 1987, Arsenijević, 1988, 1992). Korišćene su obolele, starije ili mlade, grane kruške i dunje sa ispoljenim simptomima bolesti, tipičnim za bakterioznu plamenjaču voćaka. Prethodno pripremljena podloga sterilisana je u autoklavu pri 115°C tokom 20 minuta. Zasejane Petri kutije održavane su u termostatu 2-3 dana pri 25°C, posle čega su pojedinačne kolonije, bakteriofotkom petljom, presejane na kosu podlogu (NAG) sa 2% glicerina i inkubirane u termostatu 24 časa pri 25°C. Čiste kulture održavane su na ovoj podlozi (NAG) u frižideru pri 4°C jednomesečnim presejavanjem ili liofilizacijom.

Od većeg broja sojeva za dalja proučavanja odabrano je pet, po jedan od predstavnika svake grupe izolata i to: sa dunje Du-501 i Du-573 a sa kruške Kš-513, Kš-514 i Kš-523. Svi su iz Makedonije, izolovani tokom 1991. godine: prvi soj (Du-501) potiče s materijala iz Krupišta, drugi i treći (Du-573 i Kš-513) su iz Strumice a četvrti i peti (Kš-514 i Kš-523) iz Radoviša.

Kao kontrole, korišćena su dva identifikovana soja *E. amylovora*: Me-1 i Fr-1430. Prvi potiče iz Makedonije (Mitrev, 1993) a drugi je iz Francuske (1430) dobijen iz Angersa (Station de Pathologie Végétale, Beaucaud) posredstvom prof. dr M. Arsenijevića (tab. 4).

2. *Diferencijalni testovi za razlikovanje atipičnih sojeva od sojeva E. amylovora.* - Svi sojevi dobijeni prilikom izolovanja iz obolelog tkiva voćaka proučavani su korišćenjem sledećih diferencijalnih testova: hipersenzibilna reakcija (HIR) duvana, aglutinacija na mikroskopskim pločicama sa antiserumom *E. amylovora* (1430), bojenje po Gramu, fluorescentnost na Kingovoj podlozi B i inokulacija mladih plodova kruške (tab. 4). Ovi testovi su poslužili kao preliminarni za razlikovanje patogenih sojeva *E. amylovora* od drugih bakterija atipičnih kolonija (Arsenijević, 1988, Arsenijević i sar., 1991).

3. *Testovi patogenosti netipičnih sojeva.* - Za ova proučavanja korišćeno je lišće duvana i muškatle, cvetovi i letorasti kruške i neraszreli plodovi kruške, višnje i šljive. Upotrebljene su sorte: viljamova, hajmanov rubin i stenli. Inokulacija duvana i muškatle vršena je ubrizgavanjem suspenzije bakterija koncentracije  $10^7$  cfu/ml, u lišće, dok su ostale inokulacije izvedene ubodom pomoću igle gušćom koncentracijom bakterija ( $10^8$  cfu/ml).

Izuzev duvana i muškatle, grančice sa cvetovima kruške, letorasti kruške i plodovi voćaka su, posle obavljene inokulacije, postavljeni u vlažne komore tokom 48 časova, kod grančica kruške, ili, nekoliko dana pri inokulaciji plodova voćaka (Arsenijević i sar., 1991, Arsenijević i Smiljana Sremac, 1993).

4. *Odgajivačke odlike proučavanih sojeva.* - Odgajivačke odlike proučavanih sojeva praćene su na sledećim podlogama: standardna mesopeptonska (MPP), mesopeptonska sa 5% saharoze (NAS), Kingova podloga B i selektivna (CG) podloga (Crosse i Goodman, 1973, Arsenijević, 1988, 1992, Mitrev, 1993) (tab. 1).

Zasejavanje podloga vršeno je razmazom ređe suspenzije bakterija. Za svaku podlogu, i izolat, korišćeno je po tri Petri kutije. Posmatran je: oblik i boja kolonija, konzistencija, providnost, izgled ivica, veličina kolonija prisustvo ili odsustvo tamnog centra na koloniji i sl. (Arsenijević, 1988, Crosse i Goodman, 1973, Mitrev, 1993). Proučeno je još i ponašanje bakterija prema Gramu, stvaranje levana, fluorescentnog i ružičastog pigmenta, prema metodama navedenim od strane Arsenijevića (1988, 1992), razvoj pri 34°C i 36°C (Schaad, 1988), tolerancija prema 5% i 7% NaCl (Lelliott i Stead, 1987), hidroliza skroba i razlaganje želatina (Šutić i Panić, 1969), stvaranje amonijaka (Goodman, 1975), stvaranje H<sub>2</sub>S iz peptona (Schaad, 1988), indola (Klement et al, 1990), redukcija nitrata (Šutić i Panić, 1969), hidroliza eskulina (Lelliott i Stead, 1987) i hidroliza tvina 80 (Klement et al, 1990) (tab. 2 i 4).

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

*Proučavanje korišćenja ugljenih hidrata iz:* D glukoze, D fruktoze, rafinoze, alfa-metil D glukozida, D galaktoze, D ksiloze, L ramnoze, salicina, L arabinoze, D trehaloze, D manita, eskulina, dekstrina, dulcitol, glicerola i skroba, obavljeno je prema metodama koje navode Fahy i Persley (1983), Klement et al. (1990) i Arsenijević (1988, 1992) (tab. 2-4).



## Rezultati

## I. Opšte karakteristike izolovanih sojeva

Većina izolacija sa obolelih voćaka obavljena je na podlozi sa 5% saharoze (NAS), sa koje i potiču gotovo svi proučavani sojevi. Na ovoj podlozi (NAS) još prilikom odabiranja pojedinačnih kolonija, i presejavanja na kosu podlogu radi dobijanja čistih kultura, uočava se prisustvo kolonija različitog izgleda i neujednačenih karakteristika (tab. 1). Tako pojava krupnih, ispupčenih (levan tipa), prljavobelih do krem boje kolonija, ravnih ivica i providne periferije a s tamnom tačkom u središtu kolonije, ukazuje na prisustvo *E. amylovora* na podlozi. Ali, razvoj ovako krupnih i ispupčenih kolonija, prilikom izolovanja na podlozi, karakterističan je i za *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (Lelliott i Stead, 1987, Arsenijević, 1970, Arsenijević i sar. 1991, Arsenijević i Smiljana Sremae, 1993).

Atipične kolonije, međutim, su sitnije, nisu ispupčene, takode su bele boje ili su krupnije i žučkaste. S druge strane, na podlozi sa 5% saharoze (NAS) razvijaju se i kolonije *E. amylovora* nalik, a ne pripadaju ovoj bakteriji (tab. 1). Sve to predstavljalo je i osnovni razlog da se pristupi proučavanju bakterioloških i patogenih karakteristika predstavnika spomenutih tipova i grupa kolonija, što je i predmet daljih izlaganja u ovome radu (tab. 1-4).

Tab. 1. - Razvoj proučavanih sojeva na raznim podlogama  
Development of the strains investigated on different media

Podloga Medium	Soj Strain	Karakteristike Characteristics
	Du-501	Kolonije sitne, prečnika 1-2 mm, bele, okrugle, ravne, ravnih ivica Colonies small, 1-2 mm in diameter, white, circular, flat, with entire edges
	Du-573	Kolonije sitne, prečnika 2-3 mm, krem, okrugle, blago ispupčene, talasastih ivica Colonies small, 2-3 mm in diameter, cream, circular, slightly domed, undulate
	Kš-513	Kolonije sitne, prečnika oko 1 mm, okrugle, ravne, ravnih ivica i zrnaste strukture Colonies small, about 1 mm in diameter, circular, flat, granulated, with entire edges
MPP (NA)	Kš-514	Kolonije prečnika 3-5 mm, krem, okrugle, ravne, talasastih ivica Colonies 3-5 mm in diameter, cream, circular, flat, undulate
	Kš-523	Kolonije sitne, prečnika 1-2 mm, okrugle, ravne, ravnih ivica, beličastokrem boje Colonies small, 1-2 mm in diameter, whitecream, circular, flat, with entire edges
	<i>E. amylovora</i>	Kolonije sitne, oko 1 mm u prečniku, ujednačene, beličaste, okrugle, sjajne, slabo ispupčene, ravnih ivica Colonies small, about 1 mm in diameter, uniform, whitish, circular, shiny, slightly convex, entire edges
	Du-501	Kolonije sitne, prečnika oko 1 mm, bele, okrugle, ravne, ravnih ivica Colonies small, about 1 mm in diameter, white, circular, flat, with entire edges
	Du-573	Kolonije prečnika 2-4 mm, krem, slabo ispupčene, talasastih ivica, s tamnim centrom i svetlijom periferijom, nisu tipično levan tipa Colonies 2-4 mm in diameter, cream, slightly domed, undulate, with darker centre and shiny margins, not typical levan type

NAS	Kš-513	Kolonije prečnika 2-3 mm, sluzaste, žutog centra i beličasto-providne periferije Colonies 2-3 mm in diameter, slimy, with yellow centre and whitish translucent edges
	Kš-514	Kolonije prečnika 2-3 mm, krem, okrugle, ispupčene, ravnih ivica, levan tipa, svetlije u centru Colonies 2-3 mm in diameter, cream, circular, convex, levan type, shiny in centre
	Kš-523	Kolonije krupne, prečnika 3-4 mm, prljavobele, okrugle, ispupčene, levan tipa, ravnih do slabo talasastih ivica Colonies large, 3-4 mm in diameter, dirty white, circular, domed, levan type, undulate to entire edges
	<i>E.amylovora</i>	Kolonije krupne, prečnika 3-4 mm, beličastokrem, ispupčene, levan tipa, sjajne, ravnih ivica, tamnije u središtu i sa svetlom periferijom, sluzaste i tečne Colonies large, 3-4 mm in diameter, whitecream, convex, levan type, shiny, entire edges, darker in centre and with shiny margins, slimy, fluidal
KING B	Du-501	Kolonije beličastokrem, s tamnijim centrom, sluzaste, tečne Colonies whitecream, darker in centre, slimy, fluidal
	Du-573	Kolonije zelenkasto-fluorescentne, 3-4 mm, okrugle, ravne, talasastih ivica Colonies green-fluorescent, 3-4 mm in diameter, circular, flat, undulate
	Kš-513	Kolonije intenzivno žute, 2-3 mm, okrugle, ravne, beličastog centra, nefluorescentne Colonies intensive yellow, 2-3 mm in diameter, circular, flat, with white centre, nonfluorescent
	Kš-514	Kolonije zelenofluorescentne, 3-4 mm, okrugle, tamnije u centru Colonies green-fluorescent, 3-4 mm, circular, with darker centre
	Kš-523	Kolonije bele, okrugle, 2-3 mm, ravne, ravnih ivica Colonies white, circular, 2-3 mm in diameter, flat, with entire edges
	<i>E.amylovora</i>	Kolonije sitne, 1-2 mm, beličastosjajne, okrugle, slabo ispupčene, ravnih ivica, s radijalnim prugama, nisu fluorescentne Colonies small, 1-2 mm, shinywhite, slightly convex, circular, radially striped, with entire edges, nonfluorescent
CG (Crosse and Goodman)	Du-501	Kolonije sitne, 1 mm veličine, oštne, s udubljenjem pri vrhu, ravnih ivica, prugaste Colonies small, 1 mm in diameter, sharp, with craters at the top, entire edges, striped
	Du-573	Veoma usporen razvoj - Very slow growing
	Kš-513	Nema razvoja - No growth
	Kš-514	Veoma usporen razvoj - Very slow growing
	Kš-523	Nema razvoja - No growth
	<i>E.amylovora</i>	Kolonije krupne, 3-4 mm, beličaste, okrugle, ispupčene, s udubljenjima na površini, slabo talasastih ivica i ravnih (kod manjih kolonija, 2-3 mm u prečniku), periferija svetla a centar taman Colonies large, 3-4 mm in diameter, white, circular, domed with craters on the surface, slightly undulate, or with entire edges at small (2-3 mm) colonies, shiny margins and darker centre

T a b . 2 . - Odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike netipičnih bakterija upoređene sa karakteristikama sojeva *Erwinia amylovora*  
 Cultural and physiological properties of the atypical bacteria in comparison with characteristics of *Erwinia amylovora* strains

Karakteristike Characteristics	<i>E. amylovora</i>		Du-501	Du-573	K3-513	K3-514	K3-523
	Mc-1	Pr-1430					
Stvaranje pigmenta Pigment production							
ružičastog pink	-	-	-	-	-	-	-
žutog yellow	-	-	-	-	+	-	-
Razvoj pri: Growth at:							
34°C	-	-	-	+	+	+	+
36°C	-	-	-	-	+	-	+
Tolerantnost prema NaCl NaCl tolerance							
5%	+	+	+	-	+	-	+
7%	-	-	+	-	+	-	-
Redukujuće supstance iz saharoze Reducing substances from sucrose	+	+	-	+	-	+	+
Metil crveni test Methyl red test	-	-	-	+	-	+	+
Stvaranje: Producing:							
katalaze catalase	+	+	+	+	+	+	+
fosfataze phosphatase	-	-	+	+	-	+	+
lecitinaze lecithinase	-	-	-	-	-	-	-
Ureaze Urease	-	-	-	+	-	+	+
fenilalanindezaminaze phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-
Hidrolaza: Hydrolysis:							
twina 80	-	-	-	-	-	-	±
twina 80	-	-	-	-	-	-	-
želatina gelatine	+	+	+	+	+	+	-
škroba starch	-	-	-	-	-	-	-
Stvaranje: Producing:							
H <sub>2</sub> S (from peptone)	-	-	-	-	±	-	+
NH <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-
Indola Indole	-	-	-	-	-	-	-
Red. nitrata Nitrate reduct.	-	-	+	-	+	-	+

Legenda: + pozitivna reakcija; - negativna; ± varijabilna reakcija  
 + positive reaction; - negative; ± variable reaction



T a b . 3. - Korišćenje ugljenih hidrata od strane atipičnih sojeva i sojeva *Erwinia amylovora*  
Carbohydrate utilization by atypical strains in comparison with *Erwinia amylovora* bacterium

Ugljeni hidrat Carbohydrate	<i>E. amylovora</i>		Du-501	Du-573	KS-513	KS-514	KS-523
	Mc-1	Fr-1430					
L. Arabinosa L. Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Dekstrin Dextrine	-	-	+	-	±	-	-
Dulcitol Dulcitol	-	-	-	-	-	-	+
Esculin Esculine	-	-	-	-	-	-	-
Fruktoza Fructose	+	+	+	+	+	+	+
D Galaktoza D Galactose	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol Glycerol	+	+	+	+	+	+	+
D Glukoza D Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Ksiloza Xylose	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Maltoza Maltoze	-	-	+	-	+	-	+
D Manitol D Manitol	+	+	+	+	+	+	+
α-metil-D-glukozid α-methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-	+
Rafinoza Raffinose	-	-	-	-	-	+	+
L. Ramnoza L. Rhamnose	±	±	+	-	+	-	+
Saharoza Sucrose	+	+	-	+	+	+	+
Salicin Salicin	-	-	-	-	-	-	-
Škrob Starch	-	-	-	-	-	-	-
D Trehaloza D Trehalose	+	+	+	-	+	-	+

Tab. 4. - Pregled osnovnih karakteristika proučavanih sojeva izolovanih sa obolele kruške i dunje

Review of the main characteristics of investigated strains isolated from diseased pear and quince tree

Soj Strain	Patogenost - Pathogenicity					Bakteriološke karakteristike - Bacteriological characteristics						
	HR mušk- atle Pelarg- onium HR	Letor- asti kruške Pear shoots	Nesazreli plodovi Unripe fruits of			Boje- nje po Gramu Gram stain	Fluor- escen- tnost Fluore- scence on King B	Meta- bolizam glukoze Glucose metabo- lism		LOPAT tests	AgEa	Identifi- kovana bakterija The bacterium identified
			Kruška Pear	Višnja Sour cherry	Šljiva Plum			O	F			
Du-501	-	-	-	-	-	-	+	+	----	±	Saprofitna bakterija Saprophytic bacterium	
Du-573	+	-	-	-	-	+	+	-	±---+	±	<i>P.s.syrin- gae</i> (avirulent)	
Kš-513	-	-	-	-	-	-	+	+	----	±	<i>E. herbi- cola</i>	
Kš-514	+	+	-	+	-	+	+	-	+---+	-	<i>P.s.syrin- gae</i> (virulent)	
Kš-523	-	-	-	-	-	-	+	+	+----	±	Saprofitna bakterija Saprophytic bacterium	
Me-1 (Mace- donia)	+	+	+ <sup>e</sup>	-	+ <sup>e</sup>	-	-	+	+	+---+	+	<i>E.amylo- vora</i>
Fr- 1430 (Fra- nce)	+	+	+ <sup>e</sup>	-	+ <sup>e</sup>	-	-	+	+	+---+	+	<i>E.amylo- vora</i>

Legenda: + pozitivna reakcija; +<sup>e</sup> nekroza plodova sa pojavom kapi bakterijskog eksudata; ± nejasna ili slabo pozitivna reakcija; - negativna reakcija; AgEa aglutinacija na mikroskopskoj pločici sa nezagrevanim antigenima sojeva *E. amylovora*; Me-1 i Fr-1430

+ positive reaction; +<sup>e</sup> fruits necrosis with droplets of bacterial exudate; ± unclear or weak positive reaction; - negative reaction; AgEa agglutination on slide with non heated antigens of *E. amylovora* Me-1 and Fr-1430 strains

## 2. Patogenost

- *Duvan i muškatala*. - Sojevi Kš-514, Du-573 i kontrolni (*E. amylovora*) prouzrokuju HR lišća ovih biljaka tokom 24 časa od inokulacije (tab. 4). U pogledu hipersenzibilitnosti ujednačeno se ponašaju, bez bitnijih znakova razlike. Ostali sojevi (Kš-513, Kš-523 i Du-501) negativno reaguju.

- *Cvetovi i letorasti kruške*. - Od pet proučavanih sojeva samo su Kš-514 i Du-573 prouzrokovali uobičajene promene na inokulisanim cvetovima kruške, ispoljene u vidu nekroze, a potom uvelosti i sušenja cvetova. Pri tome, prvi soj (Kš-514) je agresivniji u odnosu na Du-573.

Kontrolni sojevi (*E. amylovora*) pozitivno reaguju. Na letorastima kruške samo soj Kš-514 i sojevi *E. amylovora*, posle 2-3 dana, prouzrokuju jaku nekrozu tkiva, oko mesta uboda, koja se postepeno širi izazivajući izumiranje inokulisanih letorasta (tab. 4).

- *Nesazreli plodovi voćaka*. - Na inokulisanim plodovima kruške, sorte viljamova, i šljive stenli, nijedan od pet proučavanih sojeva ne prouzrokuje očekivanu reakciju. Suprotno tome, kontrolni sojevi *E. amylovora*: Mc-1 (iz Makedonije) i Fr-1430 (iz Francuske), izazivaju jaku nekrozu s obilatim pojavom beličastih kapi bakterijskog eksudata (Arsenijević i saradnici, 1991, Mitrev, 1993) (tab. 4). Inokulisani plodovi višnje, sorte hajmanova konzervna, ispoljavaju nekrotične promene karakteristične za bakteriju *P. s. pv. syringae*, samo nakon inokulacije izvršene sojem Kš-514 (Arsenijević i Smiljana Sremac, 1993).

### 3. Odgajivačke i fiziološke odlike

Proučavani sojevi, i kontrolni *E. amylovora*, nejednako se razvijaju na pojedinim podlogama (tab. 1). Na MPP ta razlika i nije toliko izražena koliko na ostalim supstratima. Jer, izuzev žute boje kolonija, karakteristične za izolat Kš-513 (*E. herbicola*), ostali sojevi formiraju beličastokrem, sitnije kolonije, okruglaste i ravnih ivica. Na podlozi obogaćenju 5% saharozom (NAS) kolonije izolata Du-573 i Kš-514 imaju sličan razvoj: okrugle su, krem boje i ispupčene; one na Kingovoj podlozi B i fluoresciraju, stvarajući zeleni pigment, koga ostali sojevi i *E. amylovora* ne proizvode (tab. 1 i 4).

Samo sojevi *E. amylovora*, na podlozi sa 5% saharoze (NAS) i na selektivnoj, Crosseovoj i Goodmanovoj (CG) podlozi, imaju karakterističan razvoj toliko izražen za ovu bakteriju i donekle sojevi Du-573 i Kš-514, za koje smatramo da imaju sličnosti sa *P. s. pv. syringae* (tab. 1 i 4).

Na Crosseovoj i Goodmanovoj (CG) podlozi pojavljuju se i najveće razlike u izgledu i razvoju kolonija (tab. 1). Jer, na njoj se, kao pogodnoj podlozi za razvoj *E. amylovora*, sojevi ove bakterije razvijaju ispoljavajući sve odlike vrste. Ostali sojevi imaju vrlo usporen razvoj kolonija ili se kolonije na ovoj, selektivnoj, podlozi uopšte i ne pojavljuju (tab. 1).

Što se tiče ostalih karakteristika, svi sojevi, proučavani i kontrolni (*E. amylovora*), negativno se boje po Gramu; izuzev sojeva Du-573 i Kš-514, koji su fluorescentni (*P. s. pv. syringae*) ne stvaraju fluorescentni ni ružičasti pigment, a žuti proizvodi samo soj Kš-513 (*E. herbicola*). Tipično stvaranje levana ispoljavaju sojevi Kš-514, Kš-523 i kontrolni (*E. amylovora*); sojevi Du-501 i Kš-513 su negativni a soj Kš-573 nejasan ili slabo pozitivan. Indol i amonijak ne stvara ni jedan soj, H<sub>2</sub>S proizvodi samo soj Kš-523 dok je ponašanje soja Kš-573 varijabilno (tab. 2). Nitrate redukuju Du-501, Kš-513 i Kš-523; ostali sojevi (Du-573, Kš-514 i kontrolni) su negativni. Njeđnak je i razvoj na 34°C i 36°C, kao i tolerantnost prema NaCl, zatim i kod reakcija pri metil crvenom testu i testu stvaranja redukujućih supstanci iz saharoze, proizvodnji ureaze i fosfataze (tab. 2).

Svi sojevi, kao i kontrolni, međutim, su oksidazno negativni, aerobno razlažu glukozu, ne stvaraju arginin dehidrolazu, lecitinazu, ni fenil alanindezaminazu, ne hidrolizuju škrob, niti prouzrokuju trulež kriški krompira (tab. 2 i 4); stvaraju katalazu i izuzev soja Kš-523 razlažu želatin (tab. 2-4).

### 4. Razgradnja ugljenikovih jedinjenja

Kao i u prethodnim, biohemijsko-fiziološkim i drugim proučavanjima (tab. 2), testirani i kontrolni (*E. amylovora*) sojevi ispoljavaju sličnosti, ali i razlike i pri korišćenju ugljenih hidrata (tab. 2 i 3). Tako D glukozu, fruktozu, L arabinozu, D ksilozu, D manitol, D galaktozu i glicerol, koriste svi sojevi (tab. 3). U pogledu razgradnje laktoze, škroba i salicina reakcija je negativna. Ostale šećere jedni sojevi razgrađuju, a drugi ne (tab. 3).



### Diskusija

Prilikom izolovanja *E. amylovora* iz tkiva obolelih voćaka, na podlozi se, osim ovog patogena, pojavljuju i kolonije drugih bakterija, neujednačenog izgleda i različitih bakterioloških karakteristika. S obzirom na to da se pri izolovanju ovog patogena, s manjim ili većim uspehom, mogu koristiti razne podloge (MPP, NAS, Kingova B, CG i dr.) bilo je od interesa proučiti kako će se ovi različiti supstrati ponašati u našem slučaju. Ovo tim pre, jer povećano širenje i sve veći ekonomski značaj *E. amylovora* postaju sve aktuelnija pitanja u nas, a time i potreba za češćim izolacijama bakterije i laboratorijskoj analizi obolelih uzoraka, prispelih s terena. Otuda što brža i pouzdanija identifikacija patogena ima svoje puno opravdanje.

Ispostavilo se, naime, da se sve navedene podloge uspešno mogu koristiti za izolovanje *E. amylovora* u laboratorijskom radu. Ali, podloga sa 5% saharoze (NAS) i Kingova B ponajviše odgovaraju. Jer, na prvoj (NAS) se već posle dva do tri dana od izolacije, razvijaju krupne, beličastosive kolonije karakteristične za ovu bakteriju, ali i za *P.s. pv. syringae*, takode sve učestalijeg patogena voćaka (Arsenijević, 1970, Arsenijević i saradnici, 1991, Arsenijević i Smiljana Sremać, 1993).

Prema tome, samo uvežbana i dovoljno stručna lica mogu, u ovoj fazi identifikacije ove dve bakterije, uočiti nijanse njihovog razlikovanja (Lelliott i Stead, 1987). Tako, već trećeg dana, ako se dva dana nakon izolacije sa ravne podloge, iz Petri kutije, razvijene kolonije preseju na kosu Kingovu podlogu B, nastaje fluorescencija, odnosno pojava zelenog pigmenta, u slučajevima razvoja kolonija bakterije *P.s. pv. syringae* ili njegovog odsustva, kada je *E. amylovora* prisutna na ovoj podlozi (Arsenijević i saradnici, 1991, Arsenijević i Smiljana Sremać, 1993).

Međutim, prilikom izolovanja *E. amylovora*, osim kolonija tipičnih za ove dve spomenute bakterije, pojavljuju se i atipične kolonije, nalik ovim bakterijama (*P.s. pv. syringae* i *E. amylovora*), ili sasvim drugačijih karakteristika. S obzirom da ovako nastala situacija može otežati i usporiti identifikacione postupke u laboratorijskom radu, a kod nedovoljno iskusnih osoba izazvati pogreške i zabune izazvati, to poznavanje karakteristika i ovih atipičnih bakterija, od posebnog je značaja. U našem dosadašnjem radu pokazalo se da je bakteriju *P.s. pv. syringae*, čije je prisustvo u uzorcima obolelih voćaka sve češće, moguće relativno lako i brzo dokazati (Arsenijević i Smiljana Sremać, 1993). Ali, prisustvo atipičnih bakterija, takode čestih pratioca izolovanja *E. amylovora*, može prouzrokovati i neočekivane poteškoće (Mitre v, 1993). Jer, u očekivanju *E. amylovora* na podlozi se razvijaju druge, slične ili različite bakterije. Ovo pogotovu kad su u pitanju starije voćke, naročito dunje i kruške, osobito u slučajevima kada su izostale uobičajene mere agrotehnike i zaštite voćaka.

Poznato je da populaciju patogenih bakterija, u zasadima voćaka, prate razne saprofitske bakterije, izraženog antagonističkog dejstva, na šta se ukazuje i kao na potencijalne agense biološkog suzbijanja patogena. Na primer, prisustvo epifitne populacije saprofitskih formi bakterije *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula u zasadima obolele trešnje u Engleskoj, antagonista ekonomski veoma značajne bakterije *P.s. pv. morsprunorum* (Wormald) Young, Dye et Wilkie (Crosse, 1965, 1971). Ili, antagonističko dejstvo *E. herbicola* (Lähnis) Dye u voćnjacima SAD, ispoljeno prema *E. amylovora*, patogenu jabuke i sl. (G o o d m a n, 1965, 1967).

Navedene primere, koji ukazuju na prateću saprofitsku floru bakterije *E. amylovora*, potvrđuju i naši rezultati dobijeni prilikom proučavanja sojeva, predstavnika raznih grupa bakterija, izolovanih iz tkiva obolele kruške i dunje, inficiranih ovom bakterijom (tab. 1-4). Tako izolat Kš-514, poreklom sa kruške, ispoljava sve karakteristike patogene bakterije *P.s. pv. syringae*. Njemu se, po mnogim svojstvima, izuzev odsustva patogenosti i nejednake reakcije u pogledu korišćenja saharoze, približava soj Du-573, izolovan iz obolele dunje. Ali, on ne ispoljava patogene odlike (tab. 4). Soj Kš-513 (poreklom s kruške), s obzirom na žutu boju kolonija i druge bakteriološke odlike, tipičan je predstavnik bakterije *E. herbicola* (Dye, 1969, Gibbins, 1978, Arsenijević, 1992), što ukazuje i na značajnost nalaza ove vrste u nas (tab. 1-4). Preostala dva soja, Du-501 (izolovan s dunje) i Kš-523 (poreklom s kruške), apatogenih karakteristika i različitih

bakterioloških odlika, mogli bi se, za sada, svrstati u grupu neidentifikovanih bakterija, predstavnika saprofitske populacije, prisutne u zasadima obolelih voćaka na ispitivanom području. A sve to zajedno, ukazuje i na potencijalnu mogućnost biološke borbe, korišćenjem saprofitskih bakterija protiv patogene *E. amylovora* u nas, što bi daljim eksperimentima trebalo i potvrditi.

### Zaključak

Prilikom izolovanja *E. amylovora*, na podlozi se češće mogu pojaviti i kolonije sojeva drugačijih karakteristika od onih tipičnih za ovu bakteriju.

Proučavanjem njihovih patogenih, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika, proizilazi sledeće:

- Dva soja, K3-514, poreklom s obolele kruške, i Du-573 (izolovan s dunje), sudeći na osnovu ispoljenih karakteristika, pripadaju bakteriji *P.s. pv. syringae*, jer s njom ispoljavaju najveću sličnost (tab. 1-4).

- Soj K3-514 ispoljava jasne znake patogenosti, osobito na nesazrelim plodovima višnje. Drugi soj (Du-573), iako sličnih bakterioloških karakteristika, ne poseduje ovu odliku.

- Soj K3-513 tipičan je predstavnik bakterije *E. herbicola*, s kojom se skoro u potpunosti podudara, što se tiče odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških karakteristika (tab. 1-4).

- Preostala dva soja (Du-501 i K3-523) nisu za sada mogla biti sa sigurnošću identifikovana, te je verovatno da pripadaju saprofitskoj populaciji bakterija, pratioca *E. amylovora* u zasadima voćaka.

- Prema tome, patogenu bakteriju *E. amylovora* prate kako fitopatogena (*P.s. pv. syringae*) tako i saprofitska mikroflora, što može ukazati i na mogućnost antagonističkog dejstva i eventualnu perspektivu biološke borbe, korišćenjem saprofitskih bakterija protiv patogene vrste *E. amylovora*.

### LITERATURA

- Arsenijević, M. (1970): Prilog proučavanju *Pseudomonas syringae* van Hall parazita kruške u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, br. 110-111: 301-307.
- Arsenijević, M. (1988): Bakterioze biljaka. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M., Panić, M. (1992): First appearance of fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, on quince and pear, in Yugoslavia. *Plant Dis.* 76 (Abstr.).
- Arsenijević, M., Panić, M., Antonijević, D. (1991): Fire blight of Pomaceous fruit trees in Yugoslavia. *Plant Protection*, Vol. 2, No 196: 87-97, Belgrade.
- Arsenijević, M., Smiljana Srećac (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, parazit jabuke. *Zaštita bilja*, br. 4, 206: 283-293.
- Crosse, E.J., Goodman, R.N. (1973): A Selective Medium for a Definitive Colony Characteristics of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 63: 1425-1426.
- Crosse, E.J. (1965): Bacterial canker of stone-fruits. VI. Inhibitions of leaf-scar infection of sherry by a saprophytic bacterium from the leaf surfaces. *Ann. appl. Biol.* 56: 149-160.
- Crosse, E.J. (1971): Prospects for the use of bactericides for the control of bacterial diseases. *Proc. 6th Br. Insectic. Fungic. Conf.*
- Dye, D.W. (1969): A Taxonomy Study of the Genus *Erwinia*. III. The "herbicola" group. *New Zeal. Jour. Sci.* Vol. 12, No 2: 223-236.
- Fahy, P.C., Persley, G.J. (1983): *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, Sidney, Australia.



- Gibbins, R.N. (1978): *Erwinia herbicola*: a review and perspective. Proc. IVth Inter. Conf. Pl. Path. Bacteria: 403-431, Angers, France (INRA).
- Goodman, R.N. (1965): In vitro and in vivo interactions between of mixed bacterial cultures isolated from apple buds. Phytopath. Vol. 55: 217-221.
- Goodman, R.N. (1967): Protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* infection by avirulent strains and three others bacterial species. Phytopath., Vol. 57, No 1.
- Goodman, R.N. (1975): Phytobacteriology. Proceedings of the First Workshop on Phytobacteriology (Third Edition). University of Missouri, Columbia, Mo.: 1-73.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (1990): Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987): Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh.
- 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.
- Schaad, N.W. (1988): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopath. Society, St. Paul, Minnesota.
- Šutić, D., Panić, M. (1969): Metode proučavanja fitopatogenih bakterija. Zavod za zaštitu bilja Poljoprivrednog fakulteta i Sekretarijat za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu SR Srbije, Beograd.
- Van der Zwet, T., Keil, H.L. (1979): Fire Blight. A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1-200.

(Priljeno 20.10.1994.)

## CHARACTERISTICS OF SOME ATYPICAL STRAINS OF THE BACTERIA OBTAINED IN THE COURSE OF *ERWINIA AMYLOVORA* ISOLATIONS

by

M. Arsenjević  
Faculty of Agriculture, Novi Sad  
S. Mitrev  
Institute for Agriculture, Strumica

### Summary

In this paper the strains as representative separate groups of bacterial colonies, which follow isolations of bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al, were investigated. The purpose of the present study was to test the atypical strains pathogenicity and to verify properties by morphological, biochemical and physiological tests (tables 1-4).

Our investigation showed that atypical strains differed among themselves and in relation to *E. amylovora*, the causal agent of fire blight disease.

From five isolates examined, two strains (K3-514 and Du-573) showed properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall bacterium and one isolate (K3-513) had the same characteristics as *Erwinia herbicola* (Löhnis) Dye (table 4).

The other two strains (Du-501 and K3-523) probably belong to the population of saprophytic bacteria which exist in fruit tree orchards.