

CZU 632.3 : 634.11

IDENTIFICAREA IZOLATULUI BACTERIAN P5 OBȚINUT DIN PLANTE DE MĂR

Maria MAGHER*Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei*

Abstract. The phytopathogen *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. is a bacterium having a major impact on pome fruit species causing identification problems at some development phenophases of trees. The aim of this paper was to identify the bacterial isolate P5 obtained from apple tree samples using classical and modern methods recommended for the bacterium *E. amylovora* (API 20E test, gas chromatography, PCR, DAS-ELISA and indirect immunofluorescence). As a result of our investigations, the bacterium *Erwinia amylovora* was clearly identified. Taking into consideration the quarantine status of the phytopathogen *E. amylovora*, it is necessary to carry out the phytosanitary tests in order to monitor the presence of fire blight on pome fruit species as well as to implement timely the required preventive and curative control measures.

Key words: *Malus pumila*; Apple; *Erwinia amylovora*; Fire blight; Identification; Techniques.

Rezumat. Fitopatogenul *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. este o bacterie cu un impact deosebit asupra speciilor pomicele sămânțoase, care prezintă probleme de identificare la anumite fenofaze de dezvoltare a pomilor. Scopul acestei lucrări a fost de a identifica izolatul bacterian P5, obținut din probe de măr, prin metode clasice și contemporane recomandate pentru bacteria *E. amylovora* (testul API 20E, gaz-cromatografie, PCR, DAS-ELISA, imunofluorescență indirectă). În rezultatul cercetărilor a fost identificată bacteria *Erwinia amylovora*. Având în vedere statutul de carantină al fitopatogenului *E. amylovora*, se impune necesitatea efectuării obligatorii a sondajelor fitosanitare pentru monitorizarea prezenței focului bacterian la culturile pomicele sămânțoase și efectuarea la timp a măsurilor preventive și curative de combatere.

Cuvinte-cheie: *Malus pumila*; Măr; *Erwinia amylovora*; Foc bacterian; Identificare; Tehnici.

INTRODUCERE

Identificarea unui microorganism este rezultatul unui complex întreg de analize, constituite din mai multe etape: examinarea directă a simptomelor, izolarea bacteriei în stare pură, examenul microscopic al celulelor, determinarea caracterelor morfologice, fiziologice, biochimice etc. Pentru studierea acestor proprietăți, culturile sunt însămânțate pe medii nutritive care conține ingrediente din grupul carbohidraților, proteine, săruri minerale, indicatori și alte substanțe (Magher, M. et al. 2013).

Erwinia amylovora Burrill atacă mai multe specii de plante din familia *Rosaceae* (Ordax, M. et al. 2012; Gusberti, M. et al. 2015). Cele mai importante gazde sunt genurile *Pyrus* spp., *Malus* spp., *Cydonia* spp., *Eriobotrya japonica*, *Cotoneaster* spp., *Crataegus* spp., *Pyracantha*, spp. și *Sorbus* spp. (Vanneste, I. 2000; van der Zwet, T. et al. 2012). Bacteria, având o viteză rapidă de răspândire, poate distruge tot pomul în numai trei luni de la infecție (Ngugi, H. 2011). Pagubele produse de acest fitopatogen sunt estimate atât prin micșorarea recoltei, cât și prin cheltuielile suportate pentru defrișarea pomilor afectați (van der Zwet, T. 1979).

Simptomele manifestate în cazul focului bacterian pot fi similare cu cele cauzate de alți factori, atât biotici cât și abiotici. Fitopatogenii *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. și *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall sunt două bacterii cu un impact deosebit asupra speciilor pomicele semințoase, care prezintă probleme de identificare în anumite fenofaze de dezvoltare ale pomilor (Magher, M. 2015). Aceasta are consecințe semnificative, având în vedere și statutul de carantină al fitopatogenului *E. amylovora* (Bădărău, S. 2012), ceea ce determină necesitatea identificării agentului patogen după caracterele microscopice, culturale, biochimice, antigenice etc.

Conform (EFSA) Autorității Europene pentru Siguranța Alimentelor (2014), *E. amylovora* este reglementată de Directiva 2000/29/EC și poate fi identificată în baza rezultatelor înregistrate la aplicarea metodelor moderne disponibile atât pentru materialul vegetal simptomatic, cât și cel asimptomatic.

În procesul examinării fitosanitare a plantațiilor de măr, păr și gutui, precum și a pomilor răzleți din gospodării particulare de pe teritoriul Republicii Moldova, au fost colectate probe cu simptome de bacterioză.

Scopul acestei lucrări a fost de a identifica izolatul bacterian P5, obținut din probe de măr, prin metode clasice și contemporane recomandate pentru bacteria *Erwinia amylovora*.

MATERIAL ȘI METODĂ

În calitate de obiect de cercetare a servit izolatul bacterian P5, obținut din probe de măr cu simptome specifice de bacterioză. Investigațiile s-au realizat în Laboratorul de Fitopatologie și Biotehnologie al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM, în Laboratorul de Bacteriologie al Centrului de Carantină, Identificare, Expertize de Arbitraj și Dezinfectare a Producției de pe lângă Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare al Republicii Moldova și în Secția Bacteriologie a Inspectoratului Central pentru Protecția Plantelor și Semințelor din or. Torun, Polonia.

În perioada examinării, izolatul P5 a fost menținut pe mediul nutritiv King B (King, E. 1954), la temperatura de +5 °C (±1). Reînsămânțările au fost efectuate la fiecare 3 luni.

Pentru determinarea fitopatogenității izolatelor, prin îndeplinirea testului de hipersensibilitate, este utilizată planta de *Pelargonium* sp. Suspensia bacteriană de $2,5 \times 10^8$ ufc/ml, după standardul turbidității a lui McFarland, a fost injectată cu seringă sterilă în spațiul intercelular al frunzelor. După inoculare, planta este menținută în condiții de cameră, fiind vizualizată după 24 ore. Apa sterilă a fost utilizată pentru controlul negativ. Rezultatul pozitiv se manifestă prin necrozarea țesutului în zona inoculată (Govorik, I., 2012).

Testul de patogenitate a fost efectuat pe 3 fructe verzi de păr, de cca 3,5–4 cm în diametru, spălate și dezinfectate cu alcool de 70%, uscate și inoculate cu suspensie bacteriană (titrul 10^8 cfu/ml) obținută din cultura izolatului P5, după 24 ore de cultivare pe mediul King B. Fructele tratate astfel, așezate în vase căptușite cu hârtie de filtru umectată, au fost incubate la $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fiind examinate la două, la patru și la șapte zile. Variantele martor au fost 3 fructe inoculate cu apă sterilă (Severin, V. 2009). Rezultatul este considerat pozitiv dacă în jurul punctului inoculat, după 2-5 zile, apar necroze cu picături de exudat bacterian (Sklâr, S. 1967).

Prin colorarea bacteriilor după Gram peste frotiul fixat prin căldură s-a aplicat violetul de gențiană, urmat de mordansarea cu soluție Lugol, apoi decolorarea cu alcool și adăugarea fuxinei. Colorarea frotiului în violet-albastru este specifică bacteriilor Gram-pozitive, iar în roz-roșu – celor Gram-negative.

Mobilitatea celulelor bacteriene a fost determinată prin examinarea lor pe preparate native între lamă și lamelă, iar dispunerea bacteriilor – prin vizualizare la microscopul optic al frotiurilor colorate, obținute din cultura P5. Pentru colorarea celulelor bacteriene a fost utilizată soluția alcoolică de 1% albastru de metilen (Magher, M. 2013).

Forma și dimensiunile celulelor bacteriene au fost determinate la microscopul electronic BS-500 Tesla.

Morfologia coloniilor bacteriene a fost studiată pe cinci medii nutritive, utilizate și recomandate în practica microbiologică pentru *Erwinia amylovora*: Mediul King B, CCT, Levan (Bereswill, S. 1997), MM2Cu și MM1 (Bereswill, S. 1998).

Proprietatea izolatului de a produce pigment a fost studiată pe mediul nutritiv King B.

Pentru determinarea punctului inactivării termice, cultura a fost tratată la temperatura 33–40°C, prin distribuirea suspensiei cu titrul de 10^7 ufc/ml, a câte 0,5 ml în eprubete introduse în baia cu apă pentru 10 minute. După răcire, din fiecare eprubetă s-a colectat câte o încărcătură de ansă și distribuită pe agar înclinat, apoi vizualizată creșterea după 2 zile de incubare la temperatura 27°C. Pentru stabilirea toleranței bacteriei la clorura de sodiu este utilizat mediul nutritiv cu următoarea compoziție: 5g extract de drojdie, 0,5g K_2HPO_4 , 0,2g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl în diferite cantități – de la unu până la 10 g; 1 l apă. După însămânțare, eprubetele au fost incubate la 27°C și urmărite până la 14 zile pentru vizualizarea turbidității (Severin, V. 2009).

Aplicarea sistemului standardizat de identificare a *Enterobacteriaceaelor* și a altor bacterii Gram-negative API 20 E, care constă în 20 teste biochimice miniaturizate, s-a efectuat în concordanță cu instrucțiunile de utilizare ale producătorului (Sigma-Aldrich, SUA). Galeria API 20 este alcătuită din 20 microtuburi care conțin diverse substraturi sub formă deshidratată. Testele sunt inoculate cu suspensie bacteriană, realizată din coloniile studiate, pentru reconstituirea mediului. Reacțiile produse în timpul perioadei de incubare (24 de ore la 30°C) se traduc prin viraje de culoare spontane sau obținute prin adăugarea de reactivi suplimentare. Compilarea rezultatelor utilizării substratului permite determinarea unui cod de 7 cifre, după care se face identificarea bacteriei. Testul oxidazei (al 21-lea test de identificare biochimică) a fost efectuat conform instrucțiunii de utilizare a producătorului (Sigma-Aldrich®, SUA), considerându-se pozitiv prin colorarea discului utilizat în albastru-violet.

Testul molecular PCR (Reacția polimerazei în lanț) s-a efectuat conform standardului PM 7/20 *Erwinia amylovora* (EPPO Bulletin 2013). Extracția ADN-ului bacterian s-a făcut conform recomandărilor lui Llop, P. et al. (1999). Pentru analiză este utilizat kitul RED-Extract N-Amp T Plant de la compania (Sigma-Aldrich, SUA). Amplificarea primerilor oligonucleotide (G1-F: 52 -CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-32 și G2-R: 52 -GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA

ATC GGC-32) a fost efectuată cu termocycler-ul T100 (Bio-Red) în condițiile descrise în tabelul 1.

În scopul diluării compușilor inhibitori, probele au fost diluate în soluție tampon 1:10. Pentru amplificare au fost utilizate atât diluțiile, cât și soluția stoc. În calitate de control pozitiv a fost utilizată tulpina de *Erwinia amylovora* NCPPB 683 din Colecția Națională a

Tabelul 1. Condiții pentru reacția de amplificare

Temperatura, °C	Timpul	Numărul de cicluri
95	3 min	1
94	30 sec	40
60	30 sec	
72	1 min	
72	5 min	1

Bacteriilor Fitopatogene, FERA, York, UK. Soluția tampon a servit drept control negativ. Produsul specific amplificării, cu dimensiunea de 187 bp, a fost detectat electroforetic pe gel de agaroză de 1,5% în tampon TBE (1 h la 100 V) colorat cu bromură de etidiu și fotografiat în lumină UV.

Profilul de acizi grași al izolatului P5 a fost analizat cu ajutorul sistemului automat de identificare Sherlock (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 SUA), utilizându-se cromatograful de gaze Agilent 7683A sampler automat. Analiza s-a realizat după următorii pași: cultivarea izolatului pe agar cu tripticază de soia timp de 24 ore; recoltarea a circa 40 mg masă celulară, care este supusă unui protocol chimic de saponificare, metilare, extracție și spălare bazică după Kuykendall, L. et al. (1988); măsurarea prin cromatografie de înaltă rezoluție în fază gazoasă a acizilor grași omologați; compararea sub formă de cromatogramă a compoziției obținute cu baza de date (biblioteca cromatografică). Rezultatul analizei a fost reprezentat de specia din bibliotecă a cărei valoare numerică a indicelui de similaritate (IS) este asemănător cu cel al microorganismului cercetat.

Analiza serologică prin metoda DAS-ELISA a fost îndeplinită conform standardului PM 7/101(1) ELISA (EPPO Bulletin 2010), cu utilizarea kitului complet de la compania LOEWE® Biochemical GmbH, Germania. Reacția de culoare a fost detectată prin intermediul unui fotometru de 405 nm, utilizându-se cititorul de microplăci Tecan Sunrise. Rezultatul se consideră pozitiv dacă valoarea extincției depășește media controalelor negative de două ori sau dacă colorarea este cea specifică reacției pozitive.

La testul de imunofluorescență indirectă (IF), efectuat conform Standardului EPPO PM 7/97 (EPPO Bulletin 2009), au fost analizate trei diluții: 1:1, 1:10 și 1:100, utilizându-se conjugatul (IgG-FITC), cu diluția de lucru 1/160, și anticorpul (Pab), cu diluția de lucru 1/100, de la compania Neogen Corporation®. Probele fixate și prelucrate pe lame cu godeuri de 6mm au fost studiate la microscopul cu epifluorescență ZEISS Axio Lab.A1, model 40FL, fiind iluminate în UV, cu emisie de lumină în domeniul vizibil. Rezultatul este considerat pozitiv dacă în câmpul microscopului apar celulele verzi cu caracter specific bacteriei.

Datele obținute în experiențe au fost prelucrate statistic cu ajutorul softului computerizat „STATISTICA – 6”

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prima etapă în identificarea unei specii bacteriene de interes este evidențierea morfologiei celulelor bacteriene și a caracterului Gram. Forma și dispunerea celulelor bacteriene, prezența și aranjarea flagelilor sunt caracteristici de specie, utile taxonomiei bacteriene.

Frotiurile obținute din coloniile izolatului au fost colorate și examinate la microscopul optic. Colorația simplă, cu albastru de metilen, a permis depistarea celulelor în formă de bastonașe, cu capetele rotunjite, dispuse izolat, gram-negative. La examinarea preparatelor între lamă și lamelă, am depistat mișcarea haotică a celulelor, specifică bacteriilor ciliate. Prezența flagelilor cu așezare peritrihă, este confirmată prin vizualizarea la microscopul electronic, la care au fost determinate și dimensiunile celulelor izolatului P5. Conform datelor obținute (Tab. 2), lungimea și lățimea medie a celulelor bacteriene constituie 1,15-1,63 x 0,56-0,62 μm.

Tabelul 2. Dimensiunile celulelor bacteriene ale izolatului P5

Indicatori	Dimensiuni, μm										Σ	\bar{X}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Lungimea	1,24	1,55	1,20	1,12	1,64	1,22	1,52	1,69	1,68	1,08	13,94	$1,39 \pm 0,24$
Lățimea	0,66	0,61	0,62	0,59	0,58	0,58	0,62	0,58	0,59	0,52	5,95	$0,59 \pm 0,03$

Cele mai multe bacterii fitopatogene posedă grupul de gene *hrp*, care induce reacția de hipersensibilitate la plantele nongază și de patogenitate la cele gazdă (Ancona, V. 2015). Izolatul P5 a produs reacția de hipersensibilitate, manifestându-se după 24 de ore, prin necrozarea țesutului frunzei de *Pelargonium* sp. în zona inoculată.

Stabilirea patogenității unui microorganism, în scopul diagnosticării, se face prin inocularea plantei și reproducerea simptomelor patogenului. Pentru *E. amylovora* este caracteristic, în condiții optime, să producă pe organele plantei exudat bacterian. Astfel, simptome de necrozare a țesutului din zona inoculată a fructelor verzi de păr sunt depistate după 24 de ore. După 3 zile, în zona brunificată apar picături de exudat, la început albicioase, apoi alb-murdar – simptom specific pentru agentul fitopatogen al focului bacterian al rozaceelor.

Mediile de cultură diagnostice utilizate reprezintă diferite substraturi nutritive care asigură bacteria cu elemente necesare pentru creștere, reproducere și întreținere a funcționalității. Izolatul P5 pe mediul MM2 cu cupru, peste 48 de ore formează colonii tipice de culoare galbenă, care devin mucoide după 72 de ore, iar pe mediul MM1 fără cupru nu se înregistrează formarea coloniilor. Pe mediul CCT, peste 48 de ore coloniile sunt violet-pal, rotunde, convexe, netede, cu centrul mai dens, devenind mucoide după 72 de ore. Pe mediul King B, după 48 de ore se formează colonii mici, alb-murdare, rotunjite, puțin bombate, iar prin expunere la raze UV, după 72 de ore de incubare, nu prezintă pigment fluorescent. Pe mediul Levan, peste 48 de ore se formează colonii mucoide.

Temperatura are o mare influență asupra proceselor fiziologice ale celulei bacteriene deoarece stimulează sau inhibă activitatea complexului ei enzimatic. După 2 zile de incubare la temperatura de 33°C, 34°C și 35°C, cultura cercetată s-a dezvoltat bine, la 36°C și 37°C – mai slab, înregistrându-se reducerea activității la 38°C, iar la 39°C creșterea se stopează, ceea ce permite atribuirea izolatului P5 la grupa microorganismelor psihotrofe.

Stabilirea toleranței bacteriei la clorura de sodiu constă în o analiză importantă în diagnosticarea unei specii bacteriene. După evaluarea toleranței izolatului P5 față de NaCl și după 2 zile de incubare la 25°C, sunt depistate turbidități în eprubetele cu concentrație de 1-5%, iar în cele cu 6-10% nu au fost observate modificări ale mediului nutritiv nici după 14 zile. Aceasta demonstrează că concentrația de NaCl din componența mediului nutritiv mai mare de 5% inhibă creșterea culturii P5.

Particularitățile biochimice ce pun în evidență echipamentul enzimatic al microorganismelor diferă de la o specie bacteriană la alta. Astfel, după 24 de ore de incubare a godeurilor cu microteste și adăugarea reactivelor, conform producătorului, am obținut 6 rezultate pozitive (Tab. 3).

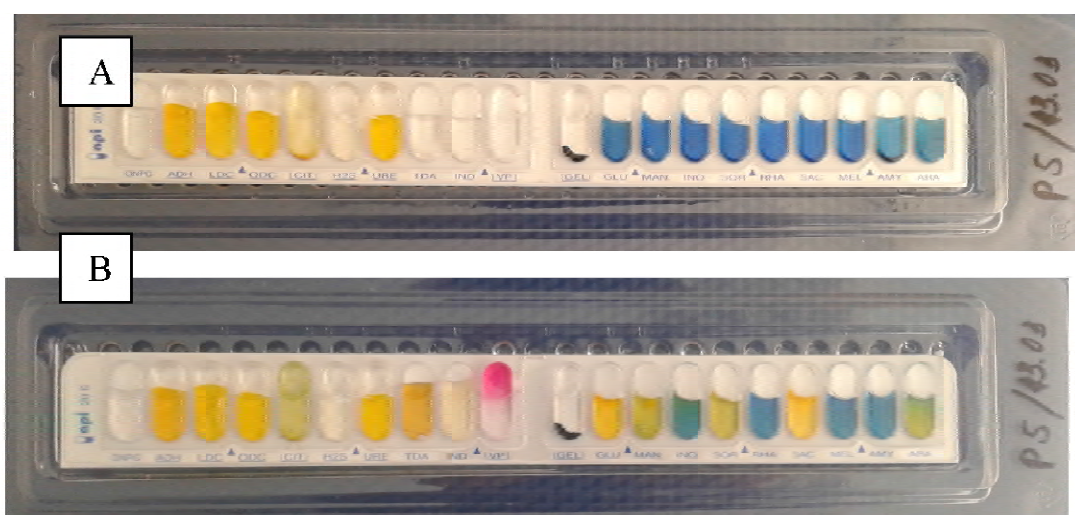
Prin aplicarea testului API 20E, pentru determinarea caracterelor biochimice ale izolatului P5 a fost obținut profilul numeric 0005522, care identică tulpina de referință PD 4072 *Erwinia amylovora*. Tulpina P5 a manifestat reacție pozitivă de producere a acetonei și fermentație fără formare de gaze în proba cu glucoză, manitol, sorbitol, zaharoză și arabinoză (Fig. 1). Testul de oxidază a lui Kovacs, bazat pe producția enzimei indofenol oxidaza, a fost negativ.

Cultura P5 a fost supusă amplificării prin intermediul PCR folosindu-se primerii AJ245 și AJ246, prin care a fost demonstrată prezența regiunii cromozomiale *ams* de 187 kb specifică bacteriei *E. amylovora*. Izolatul P5, analizat prin PCR, a prezentat reacție pozitivă, la fel ca și tulpina de referință (Fig. 2).

Până în prezent au fost identificați peste 300 de acizi grași, care în condiții determinate sunt stabili, bine conservați și demonstrează un mare grad de omogenitate în cadrul diferitelor unități taxonomice, ceea ce permite realizarea unor biblioteci utile. Esterii metilici sunt măsurați prin cromatografia de înaltă rezoluție în fază gazoasă. Compoziția obținută sub formă de cromatogramă este comparată cu exponatele din biblioteca cromatografică, iar rezultatul obținut reprezintă probabila consistență de identificare. Asemănarea este cuantificată prin indicii de similaritate (IS), care reprezintă valoare

Tabelul 3. Particularitățile biochimice ale izolatului P5 (conform sistemului API 20E (BioMerieux®))

Teste	Substratul	Reacții/enzime	Rezultate
1	2	3	4
ONPG	orto-nitro-feni- β -D-galactopiranozid	β -galactozidază	-
ADH	arginină	arginin-dihidrolază	-
LDC	lizină	lizin-decarboxilază	-
ODC	ornitină	ornitin-decarboxilază	-
CIT	citrat de sodiu	utilizarea citratului	-
H ₂ S	tiosulfat de sodiu	producerea de H ₂ S	-
URE	uree	urează	-
TDA	triptofan	triptofan-dezaminază	-
IND	triptofan	producerea de indol	-
VP	piruvat de sodiu	producerea de acetoină	+
GEL	gelatină	gelatinază	-
GLU	glucoză	fermentație/ oxidare	+
MAN	manitol	fermentație/ oxidare	+
INO	inozitol	fermentație/ oxidare	-
SOR	sorbitol	fermentație/ oxidare	+
RHA	ramnoză	fermentație/ oxidare	-
SAC	zaharoză	fermentație/ oxidare	+
MEL	melibioză	fermentație/ oxidare	-
AMY	amigdalină	fermentație/ oxidare	-
ARA	L-arabinoză	fermentație/ oxidare	+
Oxidază Kovacs	tetrametil-p-fenilendi amină dehidroclorid pe hârtie de filtru	indofenol oxidază	-

**Figura 1. Galeria API 20E inoculată cu suspensia izolatului P5: A) înainte de incubare; B) după 24 ore de incubare**

numerică obținută în urma unui calcul automat efectuat de softul Sherlock, ce exprimă distanța dintre spațiul multidimensional al profilului cromatogramei microorganismului cercetat și cel mai asemănător profil al cromatogramei unei specii din bibliotecă.

La analiza profilului acizilor grași obținuți din izolatul P5, valoarea numerică a indicelui de similaritate după prima identificare a constituit 0,908, iar după a doua – 0,927, asemănător cu profilul numeric al bacteriilor din specia *Erwinia amylovora*.



Figura 2. Rezultatul analizei PCR: M - matriță; 2 - 7 probe de plante; 8 - 10 control negativ; 11- control pozitiv 1:1; 12 - control pozitiv 1:10; 13 – izolatul P5; 14 - izolatul P5 diluat 1:10; 15 și 16 control negativ

Cultura P5 a fost testată prin metoda DAS-ELISA, când din componența sandwichiului anticorp – antigen – anticorp conjugat – parte de enzimă specifică se hidrolizează substratul ce determină intensitatea culorii, ca dependență de titrul patogenului. Intensitatea culorii a fost detectată cu ajutorul unui fotometru și este direct proporțională cu densitatea bacteriei. Valoarea eșanționului după prima repetare a fost de 2,9 ori mai mare decât cea a controlului negativ, iar în cazul matorului de referință de 0,056, fiind de 2,3 ori mai mare decât în varianta mator (Fig. 3).

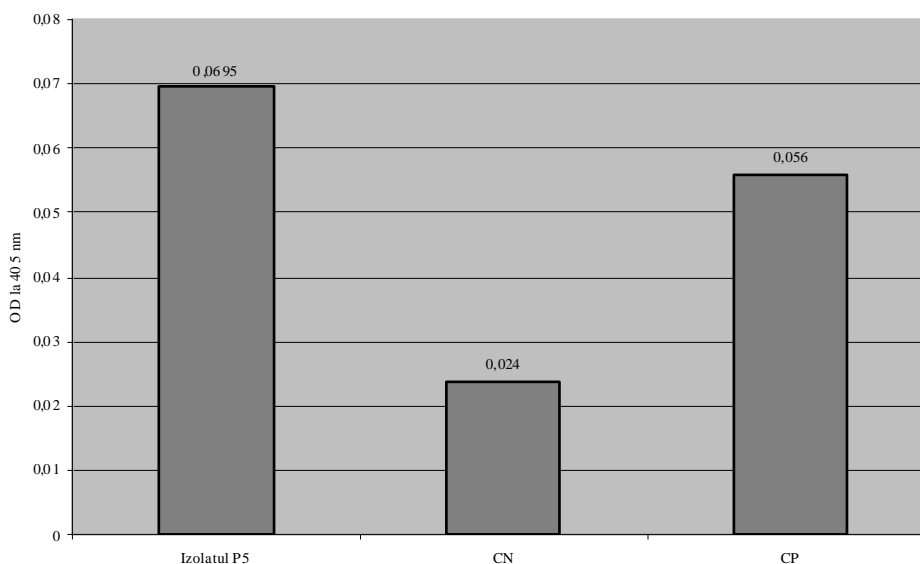


Figura 3. Valoarea eșanționului obținut prin analiza DAS-ELISA la prima repetiție: izolatul P5-eșanționul analizat; CN-control negativ; CP-control pozitiv

Rezultate similare au fost înregistrate și în repetiția a doua. Conform figurii 4, valoarea medie de absorbție a eșanționului a fost de 0,11, depășind controlul negativ de 9,2 ori, iar controlul pozitiv a fost

de 8,5 ori mai mare față de controlul negativ. Astfel, eșantionul examinat prin metoda DAS-ELISA a fost identificat ca *Erwinia amylovora*.

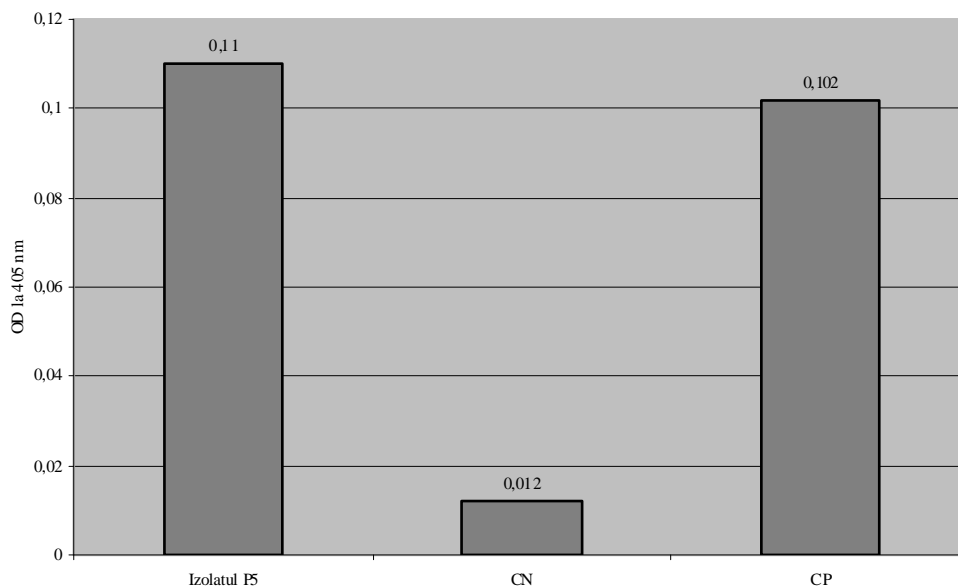


Figura 4. Valoarea eșantionului obținut prin analiza DAS-ELISA la repetiția a doua: izolatul P5- eșantionul analizat; CN-control negativ; CP-control pozitiv

Rezultatul pozitiv a fost confirmat și prin colorația galbenă, apărută în godeurile infectate de cultura experimentată (Fig. 5).

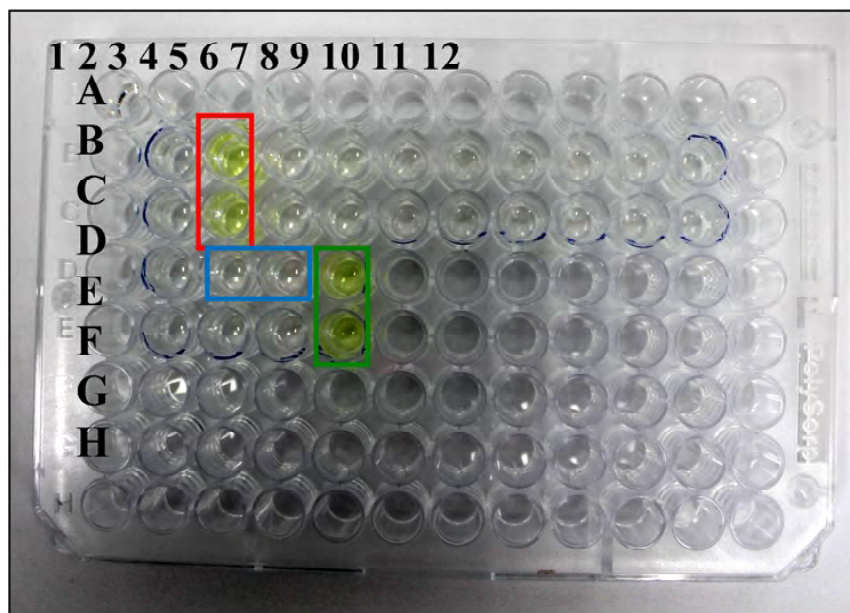


Figura 5. Placa pentru microtitrare după analiza prin metoda DAS-ELISA: godeul B3 și C3 – izolatul P5; godeul D3 și D4 - control negativ; godeul D5 și E5 - control pozitiv

Testul de imunofluorescență indirectă a inclus etape de fixare și prelucrare a lamelor cu godeuri cu diametrul de 6 mm, pe care au fost distribuite trei diluții ale suspensiei bacteriene. Examinarea la microscopul luminiscent a permis depistarea celulelor bacteriene (Fig. 6) cu fluorescență verde în toate diluțiile, confirmând rezultatul pozitiv al analizei.

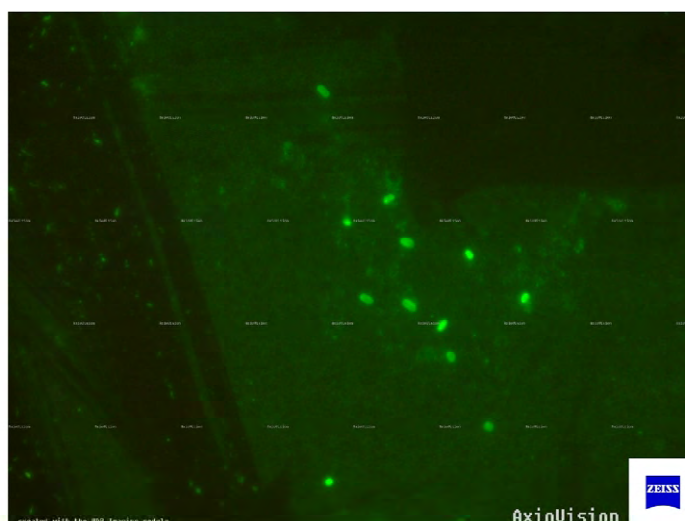


Figura 6. Celule bacteriene în câmpul microscopului cu epifluorescență (x100)

CONCLUZII

1. Identificarea bacteriilor fitopatogene, îndeosebi a agenților de carantină fitosanitară, reprezintă o etapă obligatorie în elaborarea metodelor și sistemelor de protecție a plantelor.
2. Analiza complexă a rezultatelor obținute după îndeplinirea testelor clasice și moderne (testul API 20E, Gaz-cromatografie, PCR, DAS-ELISA, Imunofluorescență indirectă), precum și a testului de patogenitate, a permis identificarea culturii P5 ca specia *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al.
3. Identificarea bacteriei *E. amylovora* impune necesitatea efectuării obligatorii a sondajelor fitosanitare în scopul monitorizării prezenței focului bacterian la culturile pomicele sămânțoase și aplicării la timp a măsurilor preventive și curative de combatere.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. ANCONA, V. et al. (2015). The Bacterial Alarmone (p) ppGpp activates the type III secretion system in *Erwinia amylovora*. In: Journal of Bacteriology, vol. 197, nr. 8, pp. 1433-1443. ISSN 1098-5530.
2. BERESWILL, S. et al. (1997). Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. In: Physiological and Molecular Plant Pathology, vol. 51(4), pp. 215-225. ISSN 0885-5765.
3. BERESWILL, S. et al. (1998). Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. In: Plant Disease, vol. 82 (Febr.), pp. 158-164. ISSN 0191-2917.
4. BĂDĂRĂU, Sergiu. (2012). Fitopatologie: (generală și agricolă). Chișinău: Print-Caro. 592 p. ISBN 978-9975-56-046-7.
5. GOROVİK, U.N. i dr. (2012). *Bacillus pumilis* - Novyj fitopatogen sosny obyknovenoj. In: Tr. Beloruss. Gos. Univ. Ser. Fiziol. Biohim. Mol. Osn. Fun, t. 7, č. 1, s. 194-198. ISSN 2220-5896.
6. GUSBERTI, M. et al. (2015). Fire blight control: The struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. In: Int. J. Environ. Res. Public Health, vol. 12(9), pp. 11422-11447. ISSN 1660-4601.
7. KING, E.O., WARD, M., RANEY, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. In: Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol. 44, pp. 301-307. ISSN 0022-2143.
8. KUYKENDALL, L.D. et al. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradiorhizobium japonicum*. In: International Journal of Systematic Bacteriology. 1988, vol. 38, pp. 358-361. ISSN 0020-7713.
9. LLOP, P. et al. (1999). A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. In: Journal of Microbiological Methods, vol. 37, pp.23-31. ISSN 0167-7012.
10. MAGHER, M. (2013). Unele caractere fenotipice ale izolatelor bacteriene obținute din plante de măr, păr și gutui. In: Lucrări științifice, Univ. Agrară de Stat din Moldova, vol. 36(2), pp. 239-242. ISBN 978-9975-64-125-8.
11. MAGHER, Maria (2015). Arsura și focul bacterian la culturile pomicele sămânțoase – simptome, diagnoză și combatere. In: Lucrări științifice, Univ. Agrară de Stat din Moldova, vol. 42(1), pp. 319-325. ISBN 978-9975-64-272-9.

12. NGUGI, H.K., LEHMAN, B.L. MADDEN, L.V. (2011). Multiple treatment meta-analysis of products evaluated for control of fire blight in the eastern United States. In: *Phytopathology*, vol. 101, pp. 512-522. ISSN 0031-949X.
13. ORDAX, M. et al. (2012). Improved recovery of *Erwinia amylovora* – stressed cells from pome fruit on RESC, a simple, rapid and differential medium. In: *Trees*, vol. 26, pp. 83-93. ISSN 1432-2285.
14. PM 7/101(1) (2010). ELISA. In: *EPP0 Bulletin*, vol. 40(3), pp. 369-372. ISSN 0250-8052.
15. PM 7/20 (2) (2013). *Erwinia amylovora*. In: *EPP0 Bulletin*, vol. 43(1), pp. 21-45. ISSN 0250-8052.
16. PM 7/97 (1) (2009). Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria. In: *EPP0 Bulletin*, vol. 39(3), pp. 413–416. ISSN 0250-8052.
17. SEVERIN, V., CORNEA, C.P. (2009). Ghid pentru diagnoza bolilor plantelor. București: Ceres, 2009. 278 p. ISBN 978-973-40-0821-6.
18. EFSA Panel on Plant Health (PLH) (2014). Scientific Opinion on the pest categorisation of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al. In: *EFSA Journal*, vol. 12(12), 3922. ISSN 1831-4732.
19. SCLÂR, S.N. (1967). Bakterial'nyi ojob plodovyh derev'ev. Moskva: Eîlos, 1967. 17 s.
20. MIDI (2012). Sherlock Microbial Identification System. MIS Operating Manual. Version 6.2 [accesat: 03.06.2016]. Disponibil: http://www.midi-inc.com/pdf/Sherlock_MIS_Operating_Manual.pdf
21. MIDI (2006?). Sherlock® 6.0 Microbial Identification System [accesat: 03.06.2016]. Disponibil: <http://www.learneasy.ch/MIDI-GC-Full-Brochure.pdf>
22. TAYLOR, R.K., GUILFORD, P., CLARK, R.G., HAL, C.N., FORSTER, R.L. (2001). Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. In: *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, vol. 29 (1), pp. 35-43. ISSN 0114-0671.
23. ZWET, T. van der, KEIL, H.L. (1979). Fire blight; a bacterial disease of rosaceous plants [accesat: 03.06.2016]. Washington, DC, USA. 211 p. Disponibil: <http://naldc.nal.usda.gov/download/CAT79714375/PDF>
24. ZWET, T. van der, OROLAZA-HALBRENDT, N., ZELLER, W. (2012). Losses due to fire blight and economic importance of the disease. In: *Fire blight. History, biology and management*. St. Paul, MN, USA: APS Press, pp. 37-41.
25. VANNESTE, I.L. (2000). What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it? In: *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. Wallingford UK: CABI Publishing, pp. 1-8.

Data prezentării articolului: 20.04.2016

Data acceptării articolului: 21.05.2016