

CZU 634.11/.14 : 579.842.24

## SIMPTOME CARACTERISTICE PENTRU ERWINIA AMYLOVORA ȘI UNELE ASPECTE MORFOLOGICE ALE IZOLATELOR BACTERIEI

MARIA MAGHER

*Institutul de Protecție a Plantelor și Agricultură Ecologică*

**Abstract.** At the macroscopic examination, the symptoms of *Erwinia Amylovora* or fireblight can be confused with other diseases, with damages caused by insects or damages caused by certain environmental conditions. Taking into consideration the above mentioned and in order to determine the fireblight it is required to isolate and identify the pathogenetic agent. It was collected biological material from plant species – apple, pear and quince in order to isolate the fireblight pathogen.

**Key words:** Apple, *Erwinia Amylovora*, Isolation, Morphology, Pear, Quince.

### INTRODUCERE

În Republica Moldova focul bacterian al rozaceelor a fost semnalat pentru prima dată în 1991. Această bacterioză este considerată cea mai dăunătoare pentru culturile pomicele semințoase.

Focul bacterian al rozaceelor poate ataca toate organele aeriene ale plantelor. Arsura inflorescențelor este de obicei primul simptom și apare primăvara devreme. Poate fi afectată o singură floare sau toată inflorescența. Florile apar hidrozate, apoi se ofilesc, se brunifică și se înnegresc. Boala progresaază înspre peduncul care, în final, se înnegrește. Pe timp călduros și umed, uneori din peduncul exsudează picături de lichid. Boala se extinde repede și bacteriile invadează frunzele vecine. Pe lăstar, apar și ulcerații. Frunzele se vestejesc și întreg lăstarul se brunifică la măr sau se înnegrește la păr, încovoiindu-se în formă de cârjă (S. Sklâr, 1967; V. Severin, 1996).

După simptomele macroscopice de manifestare, focul bacterian al rozaceelor poate fi confundat cu alte boli, precum și cu unele vătămări cauzate de insecte și condiții nefavorabile de mediu, cum ar fi: arsura bacteriană comună a mărilor și părului produs de bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall, 1904; ulcerația ramurilor produsă de ciuperca *Nectria galligena* Bres. și de *Botryosphaeria obtusa* (f.c. *Sphaeropsis malorum*) (Schwein.) Shoemaker (1964); *Phomopsis mali* (Schulzer & Sacc.) Died., (1912) atacă ramurile de păr, pe care produce leziuni cu scoarța ridicată; gândacul sfredelitor al lăstarilor de păr, *Polycaon confertus* LeConte, 1866, produce o încovoiere a lăstarilor asemănătoare cârjelor focului bacterian.

Focul bacterian al rozaceelor poate fi confundat de asemenea cu vătămările produse de ger, carență de potasiu, care determină înnegrirea frunzelor; carența de bor, care produce vestejirea lăstarilor (V. Severin, 1996; T. Van der Zwet and Beer, 1999).

Reeșind din cele expuse, pentru determinarea focului bacterian al rozaceelor, apare necesitatea izolării și identificării agentului patogen.

## MATERIAL ȘI METODĂ

Ca material pentru studiu a servit biomaterialul colectat în timpul sondajelor fitosanitare la speciile măr, păr și gutui, cu simptome specifice pentru focul bacterian al rozaceelor (tab.1).

Tabelul 1

*Materialul biologic colectat pentru izolarea E. amylovora*

Cultura	Soiul	Material biologic
Măr	<i>Mantuaner</i>	Inflorescențe brunificate; fructe imature cu picături de exudat.
Păr	<i>Sokrovișce</i>	Inflorescențe cu flori brunificate; lăstari tineri ofiliți; lăstari tineri încovoiați în formă de cârjă, cu exudat bacterian
	<i>Noiabriskaia</i>	Scoarța din zona ulcerasă de pe lăstari
Gutui	<i>Iujanka</i>	Lăstari tineri încovoiați în formă de cârjă
	<i>Cometa</i>	Lăstari încovoiați în formă de cârjă cu picături de exudat

În scopul izolării bacteriei *E. amylovora* au fost examinate 141 probe.

După recomandările lui Bel'tiukova i dr. (1968) porțiunile de țesut cu simptome de bacterioză au fost spălate preventiv cu apă nesterilă, apoi cu sterilă și plasate într-un mojar de porțelan bine sterilizat. În mojar, după ce adăugam puțină apă sterilă, triturăm bine țesutul cu ajutorul pistilului și le lăsam pentru câteva minute. După expirarea timpului menționat, cu o pipetă sterilă s-a depus o picătură din suspensia obținută pe suprafața mediului nutritiv cu cartof agarizat (CA) în vase Petri și striată cu o baghetă Drigalsky. După 48 ore de incubare la 28°C, vasele Petri erau examinate macroscopic. Din plăcile incubate am ales câte o colonie, morfologic asemănătoare celor produse de *E. amylovora* și le-am supus purificării prin epuizarea de ansă în trei eprubete, cu mediul de cultură înclinat (CA) (fig. 1 și 2).

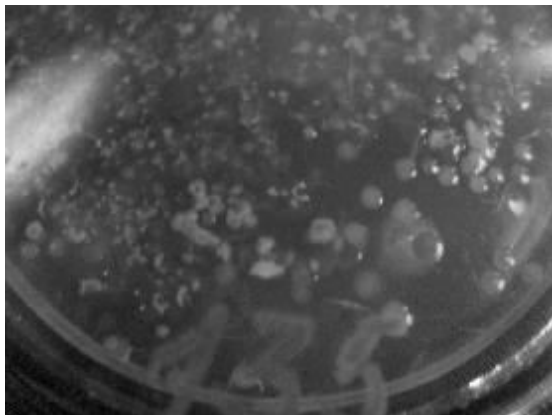


Fig. 1. Mediul CA cu colonii bacteriene

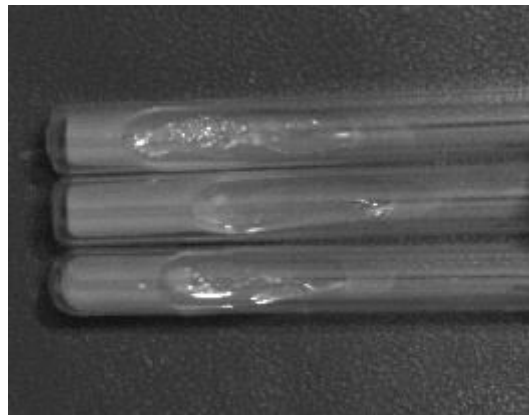


Fig. 2. Colonii izolate după purificare

Eprubetele însămnțate cu mediul de cultură înclinat au fost puse la incubare la 28°C pentru 48 de ore. După expirarea timpului toate eprubetele au fost studiate și alese acelea unde coloniile erau mici și izolate. De aici s-au ales coloniile, care au fost ulterior repicate pe mediul cu cartof agarizat (CA) pentru cercetările ulterioare.

### *Mediile de nutriție utilizate la izolarea patogenului*

Mediul cu cartof agarizat (CA). Pentru obținerea substratului de cartof agarizat s-au îndeplinit următoarele: 300 g cartofi curățați de coajă și tăiați bucăți, peste care s-a turnat 1 l apă de robinet, s-au fiert timp de 20 min la foc slab. Soluția obținută s-a filtrat prin două straturi de tifon, apoi prin vată, după care s-a adăugat 20 g de agar. S-a controlat aciditatea soluției (pH=7,2) cu hârtie indicatoare universală și din nou s-a fiert până la dizolvarea agarului. Soluția din nou a fost filtrată, s-a turnat în eprubete, după care s-a sterilizat în autoclavă la 1 atm timp de 20 min (Metodičeskie ukazaniâ ..., 1974).

Mediul extract de carne cu peptonă și agar (E.Tepper et al., 1972): la 500 g carne bine mărunțită, fără oase, grăsimi și tendoane s-a adăugat un litru de apă încălzită și a fost lăsată la infuzare pentru 12 ore la temperatura camerei. După aceea, s-a scos carnea, iar extractul rămas s-a filtrat prin tifon cu un strat de vată, apoi s-a fiert timp de 30 de minute pentru coagularea proteinelor, după care iar a fost

filtrat. După suplimentarea cu apă până la 1 litru, s-a adăugat 10 g peptonă și 5 g sare de bucătărie. Soluția a fost încălzită până la dizolvarea peptonei prin amestec continuu. Mediul astfel pregătit s-a mai fiert 10 minute, după care a fost filtrat prin filtru de hârtie. La 1 litru bulion de carne a fost adăugat 20 g agar. Amestecul s-a încălzit până la topirea agarului, apoi s-a reglat aciditatea cu soluție de 20% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Compusul a fost autoclavat la 1 atm timp de 20 minute.

Mediul King B (E. King et al., 1954): 20 g peptonă, 15 ml glicerină, 1,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 g  $\text{Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH – 7,2; 15 g agar; 1 l apă distilată. Mediul a fost autoclavat la 1 atm timp de 15 minute.

Pentru determinarea formei și mărimii bacteriilor s-a recurs la colorarea acestora. Pe lamele, preventiv spălate cu apă sterilă și șterse cu hârtie de filtru, cu pipeta, s-a adăugat câte o picătură de apă sterilă, în care s-au distribuit uniform cantități mici de bacterii, luate cu ansa bacteriologică din coloniile tipice pentru *E. amylovora*, crescute în vasele Petri. Frotiurile au fost lăsate să se usuce la temperatura camerei. După uscare preparatele au fost fixate prin trecerea rapidă deasupra flăcării de câteva ori (Bol'șoj praktikum po mikrobiologii, 1962).

Pentru determinarea caracterului bacteriei după Gram s-au folosit următoarele substanțe (E. Tepper et al., 1972): violet de geșiană, soluția Lugol, alcool etilic de 96°, fucsine dizolvate.

Colorarea bacteriilor după Gram a decurs după cum urmează:

După fixare, frotiurile au fost acoperite cu soluție violet de geșiană și ținute timp de 1 minut. După îndepărtarea colorantului, s-au spălat cu apă și s-a adăugat soluția Lugol, care s-a menținut timp de 1,5 minute. După îndepărtarea soluției Lugol, s-a prelucrat cu alcool, prin mișcări ale lamei, timp de 15-20 secunde, până când soluția devenea incoloră. După aceasta, preparatele iarăși s-au spălat cu apă, apoi s-a adăugat fucsine. După un minut, preparatele s-au spălat și s-au uscat pe hârtie filtru.

Studierea mobilității bacteriilor s-a efectuat după metoda picăturii strivite (N. Utevskij, 1975): într-o picătură de apă sterilă s-a suspendat o încărcătură de ansă cu bacterii, care ulterior s-a pus pe o lamă de microscop. Picătura a fost acoperită cu o lamelă și cercetată la microscopul electronic.

Patogenitatea izolatelor bacteriene au fost determinate prin infectarea artificială a fructelor verzi de păr (S. Sklâr, 1967). Inocularea s-a efectuat cu seringă sub piele, prin înțepătură de ac, cu cultură bacteriană de 48 ore (suspensie bacteriană de  $10^6$  -  $10^7$  cfu/ml după standardul turbidității). Fructele inoculate au fost incubate la temperatura de 26°C și umiditatea de 80%, fiind mai apoi examinate peste două, patru și respectiv șapte zile (fig. 3).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

După analiza macroscopică a cutiilor Petri cu mediul CA, însămânțate cu suspensii bacteriene din macerate și incubate pentru 48 ore la 28°C, am depistat că nu în toate vasele s-au izolat în colonii specifice pentru *E. amylovora*. După purificare prin epuizarea de ansă, s-au obținut 138 de izolate bacteriene, care au fost supuse testelor ulterioare.

După purificarea pe mediul CA s-au obținut colonii circulare cu diametrul de 3-4 mm, netede, alb-murdare, de consistență uleioasă, semitransparente, cu centrul puțin mai concentrat, plate în secțiune verticală și cu mici caneluri radiale.

Pe bulionul de carne cu peptonă și agar bacteriile au format colonii mici, rotunde, cu diametrul de 2-4 mm, albe, opalescente, strălucitoare, uleioase, cu marginile întregi.

Pe mediul King B creșterea *E. amylovora* a fost rapidă și peste 48 ore a format colonii de culoare albă, rotunde, mucoide cu diametru de 2-5 mm.

După testarea izolatelor după Gram, s-au obținut rezultate negative, frotiurile colorându-se în roz, iar unele până la roșu.

Prin studierea la microscop, s-au depistat bacterii în formă de bastonașe cu diametrul cuprins între 0,7 – 0,9 x 0,9 -1,7, cu flageli dispuși peritrih pe suprafața corpului.

După îndeplinirea testului de patogenitate, în cazul a 86 de probe, s-au obținut simptome caracteristice pentru focul bacterian al rozaceelor – exudatul bacterian. Pe suprafața fructelor, după una-două zile de incubație, s-au depistat picături de exudat alb-murdar.



Fig. 3. Aspectul fructelor verzi de pâr inoculate după două, patru și respectiv 7 zile.

### CONCLUZII

1. Culturile bacteriene crescute pe medii nutritive agarizate au prezentat caractere morfologice asemănătoare cu cele descrise în literatura de specialitate pentru *E. amylovora*: colonii mici, albe sau alb-murdare, rotunde, cu o lucire caracteristică, consistență uleioasă (Metodiceskie ukazaniâ ..., 1974; V. Severin, 1996; S. Sklâr, 1967; A Practical Guide to Integrated Disease Management, 1999).

2. Apariția exudatului bacterian pe suprafața fructelor verzi de pâr ne vorbește despre reacția specifică la infectarea cu *Erwinia amylovora*.

### BIBLIOGRAFIE

1. Bel'tiukova, K.I. i dr. Metody issledovaniâ vozbuditelâ bakterial'nyh boleznej rastenij. Kiev: Naukova dumka, 1968, 316 s.
2. Bol'soj praktikum po mikrobiologii. Moskva: Gosudarstvennoe izdatel'stvo Vysšaâ škola, 1962, 44 s.
3. King, E.O. Ward, M.K., Raney, D.E. Two simple media for the demonstrasion of pyocyanin and fluorescein. J.Lab. Clinic. Med., 1954, Vol. 44, 301-304 p.
4. Metodiceskie ukazaniâ po issledovaniû i opredeleniû vozbuditelej bakteriozov plodovyh kul'tur. Leningrad, 1974, 28 s.
5. Severin, Valerian. Focul bacterian al rozaceelor (*Erwinia amylovora*), București: Editura Ceres, 1996, p. 9-11.
6. Sklâr, S.N. Bakterial'nyj ožog plodovyh derev'ev. Moskva: Izdatel'stvo Kolos, 1967, 8-9 s.
7. T.van der Zwet and Beer. Fire blight – Its Nature, Prevention, and Control / A Practical Guide to Integrated Disease Management, 1999, 5-17 p.
8. Tepper, E.Z., Silnikov, V.K., Pereverzeva, G.I. Praktikum po mikrobiologii. Moskva: Izdatel'stvo Kolos, 1972, 45 s.
9. Utevskij N.L. Mikrobiologiâ s tehnikoj mikrobiologičeskikh issledovanij. Moskva: Medicina, 1975, 53 s.

Data prezentării articolului – **10.12.2010**