

Erwinia amylovora – prouzrokovatelj nekroze korenovog vrata stabla jabuke

Veljko Gavrilović¹, Svetlana Milijašević², Biljana Todorović*,
Svetlana Živković¹ i Nenad Trkulja¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

²Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, Srbija (vgavriilo@yahoo.com)

REZIME

Tokom 2007. godine zabeležena je masovna pojava bakterijske plamenjače jabučastih voćaka prouzrokovana bakterijom *Erwinia amylovora*. Pored nekroze plodova i plamenjače mladara, tipičnih simptoma bolesti, našu pažnju je privukla pojava nekroze mrkoljubičaste boje u zoni korenovog vrata, koja prstenasto zahvata prizemni deo i prouzrokuje izumiranje stabala jabuke. S obzirom na to da uzrok ovakvih patoloških promena može da bude *E. amylovora*, ali i fitopatogene gljive iz rodova *Phomopsis* i *Phytophthora*, preduzeta su istraživanja sa ciljem da se utvrdi etiologija ovog oboljenja jabuke. Iz obolelih uzoraka izolovane su bakterije koje stvaraju levan, ali ne i fluorescentni pigment. Proučavani sojevi prouzrokovali su HR na listovima duvana i nekrozu inokulisanih, nesazrelih plodova kruške, uz obilno stvaranje bakterijskog eksudata, što je karakterističan znak *E. amylovora*. Na osnovu rezultata dobijenih pri testovima provere patogenosti, ali i rezultata biohemijskih odlika, ELISA testa i molekularnih metoda (PCR), potvrđeno je da proučavani izolati pripadaju bakteriji *E. amylovora*, koja je uzročnik simptoma nekroze korenovog vrata stabala jabuke, prvi put zabeleženih u Srbiji. Moguće objašnjenje ove pojave je da su vegetativne podloge za kalemljenje bile inficirane ovom bakterijom. Zbog toga je veoma bitno razvijati dijagnostičke protokole za utvrđivanje prisustva *E. amylovora* u podlogama za kalemljenje jabuke, tokom procesa kontrole zdravstvene ispravnosti sadnog materijala.

Ključne reči: *Erwinia amylovora*; jabuka; nekroza; korenov vrat

UVOD

Masovna pojava bakterijske plamenjače jabučastih voćaka koju prouzrokuje fitopatogena bakterija *E. amylovora* zabeležena je u svim voćarskim rejonima u Srbiji tokom 2007. godine. Jak intenzitet bolesti je primećen naročito na jabuci i dunji, a znatno slabiji na

krušci, što je predstavljalo izvesno iznenađenje, imajući u vidu njenu izrazitu osetljivost na ovaj patogen, utvrđenu ranije (Gavrilović i sar., 2001).

Prvi simptomi bolesti – nekroza tek zameđenih plodova i obilna produkcija bleožutih kapi bakterijskog eksudata na nekrotičnim površinama, uočavaju se odmah po precvetavanju voćaka. Dalje tokom vegetaci-

je, bakterija prouzrokuje nekrozu mladara, ali i višegodišnjih grana, što su uobičajeni simptomi bakterijske plamenjače.

Međutim, našu pažnju su privukli simptomi iznenadnog sušenja i izumiranja stabala jabuke. Na ovim stablima su zapažene nekroze u zoni korenovog vrata, koje ga prstenasto zahvataju u celosti prouzrokujući sušenje voćke. Nekrotične pege su mrkoljubičaste boje i na njima se primećuju vlažne pruge tamnije boje koje potiču od bakterijskog eksudata.

S obzirom da *E. amylovora* može da prouzrokuje nekrozu korenovog vrata jabučastih voćaka, preduzeta su istraživanja sa ciljem da se utvrdi da li iznenadno izumiranje stabala jabuke prouzrokuje ova bakterija ili pak neki drugi patogeni agensi (npr. gljive iz roda *Phytophthora*, *Phomopsis* i dr.).

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena

Uzorci stabala jabuke sa simptomima nekroze na prizemnom delu stabla i korenovom vratu prikupljeni su tokom juna 2007. godine iz plantažnog zasada u okolini Arandelovca. Bakterija je izolovana na dve standardne hranljive podloge koje se najčešće koriste u laboratorijskom radu za izolaciju *E. amylovora*: mesopeptonskoj obogaćenoj sa 5% sharoze (NAS) i Kingovoj B (KB). Pojedinačne, jasno uočljive kolonije bakterija nanošene su na kosu mesopeptonsku podlogu sa 2% glicerola (NAG) radi održavanja u kolekciji (Arsenijević 1997; Gavrilović, 1998).

S obzirom da pomenute promene u zoni korenovog vrata mogu prouzrokovati i neke fitopatogene gljive, istovremeno su uzeti i uzorci obolelog biljnog materijala radi provere prisustva gljiva. Za izolaciju gljiva su korišćene krompir-glukozna i podloga od kukruznog brašna (Dhingra i Sinclair, 1987).

Provera patogenosti

U cilju provere patogenosti izolovanih sojeva bakterije, inokulisani su nezreli plodovi kruške (sorte santa marija) bakteriološkom iglom, korišćenjem suspenzije bakterija koncentracije 10^7 ćel/ml. Takođe su inokulisani i listovi duvana u cilju ispitivanja hipersenzitivne reakcije (HR), važnog svojstva mnogih fitopatogenih bakterija (Gavrilović, 1998).

Biohemijsko-fiziološke odlike

Proučene su sledeće bakteriološke karakteristike: stvaranje levana, aktivnost oksidaze, O/F test, hidroliza želatina, eskulina i skroba, metabolizam ugljenih hidrata i polihidroksilnih alkohola, kao i stvaranje baza iz organskih kiselina (Jones i Geider, 2001). U testovima provere patogenosti i proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika, kao kontrolni izolat je korišćen referentni soj CFBP 1430 iz Kolekcije fitopatogenih bakterija iz Francuske.

DAS-ELISA test

Za identifikaciju izolovanih sojeva bakterije korišćena je DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) metoda (Hampton i sar., 1990), primenom komercijalnog antiseruma specifičnog za detekciju *E. amylovora* (Loewe Biochemica GmbH, Germany). Od čistih kultura bakterije, starosti 24 časa, u sterilnoj vodi je pripremljena bakterijska suspenzija čija je koncentracije podešena na 10^6 ćel/ml. Uzorci za ELISA test pripremljeni su zagrevanjem po 100 µl bakterijske suspenzije na 100°C u trajanju od 10 minuta i potom razređeni u odnosu 1:20 u odgovarajućem puferu. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa enzimom korišćena su u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu. Intenzitet reakcije očitavan je spektrofotometrijski dva časa nakon dodavanja supstrata p-nitrofenilfosfata, merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom su smatrane vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

U cilju potvrde identiteta izolovanih sojeva urađen je Bio-PCR iz kultura izolovanih sojeva prema PCR protokolu Bereswill i sar. (1992). Za pripremu uzorka DNK, kulture bakterije su gajene na KB podlozi tokom 24 časa. Za svaki soj, pripremljena je suspenzija bakterija koncentracije 10^6 ćel/ml. Suspenzija bakterija je napravljena u sterilnoj destilovanoj vodi. Zatvorene mikrotube zagrevane su na temperaturu 95°C u trajanju od 10 minuta, a potom odmah prebačene na led i nakon hlađenja kratko centrifugirane. PCR reakcije izvedene su u Eppendorf Master Cycleru. Prajmere je sintetisao Fermentas (Lithuania). Korišćeni su sledeći oligonukleotidni prajmeri:

A: 5'CGGTTTTTAACGCTGGG 3'

B: 5'GGGCAAATACTCGGATT 3'

Uslovi PCR reakcije bili su:

1 ciklus

- denaturacija DNK (93°C - 2 minuta)
37 ciklusa
- denaturacija DNK (93°C - 1 minut)
- vezivanje prajmera (52°C - 2 minuta)
- intezna fragmenta DNK- elongacija (72°C - 2 minuta)
1 ciklus
- elongacija (72°C - 10 minuta)

Reakciona smeša (25 µl) se sastojala iz: 1 X PCR Master mix (Fermentas, Lithuania) (0,625 U Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM svakog dNTP-a), 1 µl svakog prajmera (20 µM) i 2,5 µl uzorka DNK iz prethodno pripremljenih kultura bakterije. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša bez dodatog uzorka DNK, a kontrolni soj *E. amylovora* (CFBP 1430), korišćen je kao pozitivna kontrola.

Prema ovom protokolu pozitivnim se ocenjuje PCR test u kome je detektovan specifični produkt amplifikacije veličine 900 bp, mada se mogu javiti varijacije u dužini ampikona 900-1100 bp (Lecomte i sar., 1997) zbog ponavljajuće sekvence od 8 baznih parova (Jones i Geider, 2001).

Analiza PCR produkata

Elektroforetsko razdvajanje produkata amplifikacije (fragmenti nukleinske kiseline dobijeni lančanom reakcijom polimeraze) urađeno je u 1,5% agaroznom gelu, pri naponu 100 V u TBE puferu. Korišćen je DNK marker od 1 kb. Gel je obojen potapanjem u 0,1% rastvor etidijum-bromida u trajanju od 10 minuta i zatim posmatran u UV transiluminatoru.

REZULTATI

Simptomi

Na obolelim stablima jabuke su zapažene nekroze u zoni korenovog vrata, koje ga prstenasto zahvataju u celosti (Slika 1), prouzrokujući sušenje voćke. Nekrotične pege su mrkoljubičaste boje i na njima se primećuju vlažne pruge tamnije boje koje potiču od bakterijskog eksudata (Slika 2).



Slika 1. Nekroza korenovog vrata stabala jabuke
Figure 1. Root collar necrosis of apple trees



Slika 2. Nekrotične, mrkoljubičaste pege sa vlažnim prugama tamnije boje
Figure 2. Dark-purple necrosis with dark, wet stripes

Izolacija patogena

Bledosive, izrazito ispupčene, mukoidne kolonije (levan tip), prečnika 2-3 mm, uočavaju se posle 2-3 dana razvoja na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS). Na Kingovoj podlozi B se razvijaju kolonije bele boje, koje ne stvaraju fluorescentni pigment.

Izolovanje gljiva na podlozi od kukuruznog brašna i krompir-glukoznoj podlozi pokazalo se neuspešnim.

Patogenost

Na plodovima kruške se 24 časa od inokulacije najpre pojavljuju vlažne tamnozelene pege. Daljim razvojem patološkog procesa one se šire, postaju mrke, a na njihovoj površini se uočavaju brojne kapljice bakterijskog eksudata bleđožute boje, što je tipično za *E. amylovora*. Na plodo-

vima kruške inokulisanim sojem Ks-108 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) 2-3 dana posle inokulacije pojavljuju se mrko-crne nekrotične pege bez prisustva eksudata, što je karakterističan znak ove bakterije.

Biohemijsko-fiziološke odlike

Proučavani sojevi stvaraju levan, hidrolizuju želatin, ali ne i skrob i eskulin; ne stvaraju oksidazu, a glukozu razlažu i u oksidativnim i fermentativnim uslovima; u svojim metaboličnim procesima koriste glukozu, saharozu, fruktozu, ribozu, manitol, sorbitol, inozitol; negativni rezultati su zabeleženi pri testovima korišćenja laktoze, maltoze, rafinoze, melezitose i dulcitola; razla-

žu sirćetnu, mravlju, oksalnu, limunsku, ali ne i mlečnu i askorbinsku kiselinu (Tabela 1).

ELISA test

Primenom imunoenziemske metode na ploči utvrđeno je da proučavani sojevi poseduju iste antigene karakteristike sa kontrolnim sojem *E. amylovora* (CFBP 1430).

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

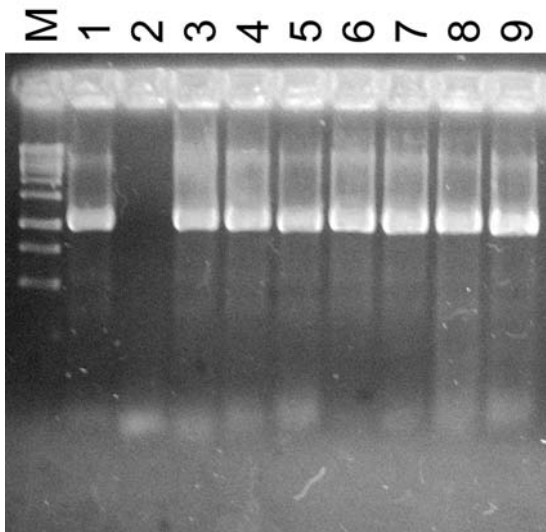
Kao rezultat lančane reakcije polimeraze, korišćenjem prajmera A i B koje su dizajnirali Bereswill i sar.

Tabela 1. Biohemijsko-fiziološke odlike proučavanih sojeva
Table 1. Biochemical and physiological properties of investigated strains

Odlike Properties	Proučavani sojevi Investigated strains	Kontrolni soj Reference strain CFBP1430
Stvaranje levana Levan production	+	+
Aktivnost oksidaze Oxidase activity	-	-
O/F ¹ metabolizam glukoze Glucose (O/F) metabolism	O-F	O-F
Hidroliza želatina Gelatin hydrolysis	+	+
Hidroliza eskulina Aesculin hydrolysis	-	-
Hidroliza skroba Starch hydrolysis	-	-
Korišćenje: Utilisation of:		
- glukoze/glucose	+	+
- fruktoze/fructose	+	+
- saharoze/sucrose	+	+
- riboze/ribose	+	+
- laktoze/lactose	-	-
- maltoze/maltose	-	-
- rafinoze/raffinose	-	-
- melezitose/melesitose	-	-
- manitola/mannitol	+	+
- sorbitola/sorbitole	+	+
- inozitola/inositol	+	+
- dulcitola/dulcitol	-	-
- mravlje kiseline/formic acid	+	+
- sirćetne kiseline/acetic acid	+	+
- limunske kiseline/citric acid	+	+
- oksalne kiseline/oxalic acid	+	+
- mlečne kiseline/lactic acid	-	-
- askorbinske kiseline/ascorbic acid	-	-

+ pozitivna reakcija; - negativna reakcija; 1 – oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze

+ positive reaction; - negative reaction; 1 – oxidative-fermentative metabolism of glucose



Slika 3. Amplifikacija PCR produkata veličine 900 bp sledećih sojeva *E. amylovora*: M – Molekularni marker (1kb); 1 – pozitivna kontrola; 2 – negativna kontrola; 3-9 – sojevi *E. amylovora* izolovani iz korenovog vrata stabala jabuke

Figure 3. Amplification of 900 bp PCR products with DNA of following *E. amylovora* strains: M – Molecular weight marker (1kb); 1 – positive control; 2 – negative control; 3-9 – *E. amylovora* strains isolated from apple trees root collar

(1992), amplifikovani su fragmenti nukleinske kiseline odgovarajuće veličine – 900 baznih parova (bp) (Slika 3).

DISKUSIJA

E. amylovora je eksperimentalno potvrđena u Srbiji 1989. godine kao patogen kruške i dunje. Domaćini ove bakterije u Srbiji danas su pored ovih voćaka i jabuka, mušmula, glog, vatreni trn, poglela dunjarica (*Cotoneaster horisontalis*), *Chaenomeles japonica* i *Sorbus* sp. (Gavrilović i sar., 2001; Balaž i sar., 2004; Gavrilović i sar., 2007). Njena pojava na voćkama i biljkama spontane flore (glog) i u regionima na velikim nadmorskim visinama, gde nije zastupljena intenzivna voćarska proizvodnja, ukazuje na njeno intenzivno širenje obuhvatajući sve širi spektar domaćina. Tim pre što je u regionu Požege eksperimentalno potvrđena kao parazit nama nepoznate ukrasne biljke, čija je identifikacija u toku (Gavrilović, neobjavljeno). Osim toga, svedoci smo sve češćih masovnih pojava bakterijske palmenjače na jabučastim voćkama, kao što je bilo 2007. godine, koje po pravilu rezultiraju velikim ekonomskim štetama. Ova pojava bi se možda mogla objasniti i heteroge-

nošću populacije ove bakterije koja je nedavno potvrđena. Proučavajući veliki broj sojeva iz različitih evropskih zemalja Llop i sar. (2007) utvrdili su postojanje novog plazmida (P170) u nekim sojevima *E. amylovora*. Takođe, u Španiji je otkrivena nova vrsta bakterije koja parazitira samo cvetove kruške, prouzrokujući njihovu nekrozu, za koju je predložen naziv *Erwinia piriflorinigrans* (Rosello i sar., 2007).

Našu pažnju je privukla pojava simptoma iznenadnog sušenja stabala jabuke, na kojima je uočena nekroza korenovog vrata. Ovo je atipičan simptom bakterijske plamenjače u našoj zemlji. Međutim, u literaturi ima podataka o tome da *E. amylovora* može da prouzrokuje slične simptome na korenovom vratu jabuke, usled čega u konačnom ishodu dolazi do sušenja stabala (van der Zwet i Beer, 1995).

Izolacija patogena je s lakoćom izvršena na standardnim bakteriološkim podlogama (NAS i KB), koje se u laboratorijskom radu najčešće koriste za izolaciju fitopatogenih bakterija iz obolelog tkiva voćaka. Izgled kolonija bakterije na njima ima i veliki dijagnostički značaj. Levan, koji *E. amylovora* formira na prvoj pomenutoj podlozi je veoma važno svojstvo ove bakterije. Odsustvo fluorescencije na KB je svojstvo na osnovu koga se *E. amylovora* razlikuje od bakterije *Pseudomonas syringae*, ali i raznih saprofitnih bakterija roda *Pseudomonas* koje se često pojavljuju prilikom izolacije (Gavrilović, 1998, 2004).

Proučavani sojevi su ispoljili uniformnost u pogledu patogenih i biohemijskih odlika i oni se ne razlikuju od kontrolnog soja CFBP 1430. Primenom molekularnih (PCR) i seroloških metoda, koje su najpouzdanije pri detekciji *E. amylovora*, potvrđeno je da proučavani sojevi pripadaju ovoj bakteriji.

Nekroza korenovog vrata jabuke koja prouzrokuje sušenje čitave voćke, mogla bi se objasniti na dva načina.

Pojava simptoma plamenjače na plodovima i mladima bila je praćena izrazitom produkcijom bakterijskog eksudata. Obilne padavine (kiša, grad) u tom periodu su omogućile intenzivno raznošenje inokuluma u zasadu i moguće je da je bakterija upravo na taj način dospela do korenovog vrata, gde je kroz povrede biotske ili abiotske prirode ostvarila infekciju.

Drugo moguće objašnjenje je da su vegetativne podloge na koje su voćke kalemljene bile zaražene bakterijom. Sve podloge jabuke koje se kod nas koriste za kalemljenje jabuke (M-9, M-26, MM106) su osetljive na *E. amylovora* (van der Zwet i Beer, 1995), ali i ukoliko su obolele ne mora uvek doći do pojave simpto-

ma bolesti na njima, tako da one tokom vegetacije izgledaju potpuno zdrave. Stoga je veoma važno razviti dijagnostičke protokole, radi pouzdanog utvrđivanja prisustva *E. amylovora* u vegetativnim podlogama, tokom procesa kontrole sadnog materijala.

U SAD su selekcionisane podloge otporne na *E. amylovora* (Geneva 65, 11, 30), i u ovoj zemlji su proučavanja otpornosti vegetativnih podloga na ovu bakteriju veoma intenzivna (Norelli i sar., 2001; Fazio i sar., 2007).

Iako prilikom ovih istraživanja iz obolelih uzoraka nisu izolovane patogene gljive, treba istaći da su kao prouzrokovani oboljenja podloga za jabuku opisani *Phomopsis mali* (Arsenijević i Gavrilović, 2005) i *Phytophthora* spp. (Brown i Mirchetich, 1993), koje takođe mogu naneti velike štete.

LITERATURA

- Arsenijević, M.:** Bakterioze biljaka. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje. S Print, Novi Sad, 1997, str. 1-576.
- Arsenijević, M. i Gavrilović, V.:** *Phomopsis perniciososa* Grove – uzročnik truleži uskladištenih plodova jabuke. Pesticidi i fitomedicina, 20: 189-195, 2005.
- Balaž, J., Knežević, T., Smiljanić, A. i Stojšin, V.:** *Chaenomeles japonica* and *Cotoneaster horizontalis*, new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. Book of Abstracts 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, 2004, pp. 22.
- Bereswill, S., Pabl, A., Belleman, P. Zeller, W. and Geider, K.:** Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3522-3526, 1992.
- Brown, G.T. and Mirchetich, S.M.:** Relative resistance of thirteen apple rootstocks to three species of *Phytophthora*. Phytopathology, 83: 744-749, 1993.
- Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B.:** Basic Plant Pathology methods. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, 1987, p. 432.
- Fazio, G., Wan, Y., Russo, N.L. and Aldwinckle, H.S.:** Investigation on the inheritance of strain specific resistance to *Erwinia amylovora* in an apple rootstocks segregating population. Book of Abstracts 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, USA, 2007, p. 66.
- Gavrilović, V.:** Bakteriološke odlike izolata *Erwinia amylovora* (Barrill) Winslow et al. različitog porekla. Magistarska teza. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 1998, str. 1-68.
- Gavrilović, V.:** Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2004, str. 1-104.
- Gavrilović, V., Arsenijević, M., Panić, M. i Jovanović, G.:** Rasprostranjenost *Erwinia amylovora* u SR Jugoslaviji (1989-2000) i mere suzbijanja. Zaštita bilja, 237: 141-158, 2001.
- Gavrilović, V., Obradović, A., Milijašević, M., Arsenijević, M. and Vojinović, M.:** Sorbus spp. – a new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. Book of Abstracts 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, USA, 2007, p. 69.
- Hampton, R., Ball, E. and De Boer, S.:** Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Pathogens, a Laboratory Manual. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1990.
- Jones, A.L. and Geider, K.:** II Gram negative bacteria B. *Erwinia* and *Pantoea*. In: Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (N.W. Shaad, J.B. Jones and W. Chun, eds.), 2nd edn., APS Press, St Paul, USA, 2001, pp. 40-56.
- Lecomte, P., Manceau, C., Paulin, J.P. and Keck, M.:** Identification by PCR analyses on plasmid pE29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. European Journal of Plant Pathology, 103: 91-98, 1997.
- Llop, P., Gonzales, R., Pulawska, J., Bultreys, A., Cabrefiga, J. and Lopez, M.M.:** The new plasmid pE170 is present in *E. amylovora* European strains. Book of Abstracts 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, USA, 2007, p. 23.
- Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S., Holleran, H.T., Robinson T.L. and Johnson, W.C.:** Resistance of Cornell-Geneva apple rootstocks to *Erwinia amylovora* when grown as vegetative shoots and orchard trees. Book of Abstracts 9th International Workshop on Fire Blight, Napier, New Zealand, 2001, O 28.
- Rosello, M., Christen, R., Llop, P., Gardan, L. and Lopez, M.M.:** Description of *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov. that causes necrosis of pear blossoms. Book of Abstracts 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, USA, 2007, p. 24.
- van der Zwet, T. and Beer, S.V.:** Fire Blight – Its Nature, Prevention and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Management U.S. Department of Agriculture. Agricultural Bulletin, N° 631: 97, 1995.

Erwinia amylovora – the Causal Agent of Root Collar Necrosis of Apple Trees

SUMMARY

A large-scale outbreak of fire blight symptoms caused by *Erwinia amylovora* was recorded in pome fruit trees during 2007. In addition to fruit necrosis and shoot blight as the typical disease symptoms, dark purple necrosis was observed in the root collar area girdling the trunk just above the ground and thus withering the whole apple tree. Since similar symptoms on apple trees could be caused by *E. amylovora* or one of several phytopathogenic fungi of the genera *Phomopsis* and *Phytophthora*, an investigation was conducted to identify the causal agent of this disease. Levan-producing, nonfluorescent bacteria were isolated from diseased samples. The isolated strains produced HR in tobacco leaves and necrosis of artificially inoculated, immature pear fruits, followed by oozing of bacterial exudate, a characteristic of *E. amylovora*. Based on the results of pathogenicity tests, biochemical characteristics, ELISA test and PCR analysis, it was confirmed that the investigated strains belonged to *E. amylovora*, causing the root collar necrosis of apple trees as an atypical symptom of this bacterium in Serbia.

The explanation of this symptom may be that the vegetative rootstocks were infected with *E. amylovora*. Therefore, the development of diagnostic protocols for detection of *E. amylovora* in apple rootstock is very important for health inspections of planting materials.

Keywords: *Erwinia amylovora*; Apple; Necrosis; Root collar