

Received: 03.11.2017 / Accepted: 20.03.2018

Perspectives on the use of bacteria in the protection of apple and pear against fire blight (*Erwinia amylovora*)

Perspektywy zastosowania bakterii w ochronie jabłoni i gruszy przed zarazą ogniową (*Erwinia amylovora*)

Artur Mikiciński, Piotr Sobiczewski*

Summary

Protection of plants against fire blight (FB) caused by *Erwinia amylovora* includes the integration of various methods aimed at preventing their infection and elimination of FB disease. Copper containing plant protection products are the only compounds registered in Poland. However, various limitations associated with use of these pesticides increased interest in application of alternative methods, including antagonistic bacteria, which occur in natural conditions and have ability to protect plants from FB. The studies in various countries have demonstrated that the species *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens*, as well as *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* are the most effective. The commercial available bioproducts are based on the first three species. They are mainly used in apple and pear production at blooming period and in programs integrated with chemical pesticides. The results of the research conducted in Poland provide the basis for the development of a biopreparat containing one of the two prospective strains: 48M (*Pantoea agglomerans*) and 59M (*Pseudomonas protegens*).

Key words: apple; pear; fire blight; biocontrol; efficacy

Streszczenie

Ochrona roślin przed zarazą ogniową obejmuje integrację różnych metod ukierunkowanych na zapobieganie ich porażeniu oraz wyniszczanie choroby. Spośród chemicznych środków ochrony roślin do walki z zarazą zarejestrowane są w Polsce prawie wyłącznie preparaty miedziowe. Jednak różne ograniczenia związane z ich stosowaniem spowodowały wzrost zainteresowania metodami alternatywnymi, w tym metodą biologiczną z wykorzystaniem bakterii. Stwierdzono, że w warunkach naturalnych występują bakterie działające antagonistycznie wobec sprawcy zarazy ogniowej oraz mające zdolności ochrony roślin przed chorobą. Badania prowadzone w różnych krajach wykazały, że najbardziej skuteczne są bakterie gatunków *Pantoea agglomerans* i *Pseudomonas fluorescens*, a także *Bacillus subtilis* i *Lactobacillus plantarum*. Na bazie wyselekcjonowanych szczepów trzech pierwszych z wymienionych gatunków produkuje się biopreparaty. Są one stosowane głównie w okresie kwitnienia jabłoni i gruszy, a także w programach integrowanych ze środkami chemicznymi. Wyniki badań przeprowadzonych w Polsce dają podstawę do opracowania biopreparatu, którego składnikiem czynnym może być jeden z dwóch perspektywicznych szczepów: 48M (*Pantoea agglomerans*) i 59M (*Pseudomonas protegens*).

Słowa kluczowe: jabłoń; grusza; zaraza ogniowa; biologiczna ochrona; skuteczność

Institut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
*corresponding author: piotr.sobiczewski@inhort.pl

Wstęp / Introduction

Zaraza ogniowa należy do najbardziej szkodliwych chorób jabłoni i gruszy. W Polsce występuje od ponad 50 lat i corocznie wyrządza szkody o znaczeniu gospodarczym, zwłaszcza w sadach. Dotychczas została wykryta w prawie wszystkich rejonach uprawy roślin sadowniczych. Wieloletnie obserwacje wskazują jednak na znacząco nieregularność występowania choroby, i to zarówno w aspekcie jej nasilenia w rejonach, w których jest notowana od lat, jak i niespodziewanego pojawu w rejonach, w których nigdy nie była wykrywana. Zmienność występowania zarazy ogniowej wiąże się głównie z przebiegiem warunków atmosferycznych decydujących o przeżywalności jej sprawcy – bakterii *Erwinia amylovora*, w porażonych organach roślin-gospodarzy, których zakres jest szeroki i obejmuje ponad 130 gatunków, głównie z rodziny różowatych. W Polsce, obok jabłoni (*Malus*) i gruszy (*Pyrus*), porażane są: głóg (*Crataegus*), pigwa (*Cydonia*), pigwowiec (*Chaenomeles*), ognik (*Pyracantha*), irga (*Cotoneaster*), jarząb (*Sorbus*) i świdośliwa (*Amelanchier*).

Ochrona roślin przed zarazą ogniową, ukierunkowana zarówno na zapobieganie ich porażeniu, jak i zwalczanie choroby, obejmuje wykorzystanie metod: chemicznej, agrotechnicznej, mechanicznej, biologicznej, hodowlanej i kwarantannowej. Ze względu na to, że żadna z tych metod nie jest w pełni skuteczna dużą uwagę zwraca się na ich odpowiednią integrację. Ponadto, według przepisów obowiązujących w Unii Europejskiej, bakteria *E. amylovora* ma status organizmu kwarantannowego, gdy wystąpi na materiale rozmnożeniowym określonych gatunków roślin (Dyrektywa 2000/29/EC). Wskazuje to na ustawy obowiązujące zwalczania zarazy ogniowej w szkółkach, matecznikach, zraźnikach, a także na roślinach-gospodarzach rosnących w bezpośrednim sąsiedztwie tych upraw oraz w tzw. strefach buforowych i chronionych.

Podstawowym elementem programu integrowanej ochrony roślin przed zarazą ogniową są lustracje. Porażone części lub nawet całe drzewa czy krzewy powinny być jak najszybciej usuwane. W rejonach zagrożonych zaleca się opryskiwania preparatami miedziowymi, które są jedynymi chemicznymi środkami ochrony roślin zarejestrowanymi w naszym kraju przeciwko chorobie. Mają one dość dobre działanie zapobiegawcze, ale nie leczą roślin już porażonych. Mogą także powodować działanie uboczne w postaci ordzawień liści i owoców, zwłaszcza jabłoni. Ochronę jabłoni i gruszy przed zarazą ogniową mogą wspomóc środki indukujące odporność.

Niewielki asortyment chemicznych środków ochrony roślin przeciwko chorobie oraz różne ograniczenia związane z ich stosowaniem spowodowały wzrost zainteresowania metodami alternatywnymi, w tym metodą biologiczną z wykorzystaniem bakterii. Pierwsze prace poświęcone bakteriom antagonistycznym wobec *E. amylovora* zosta-

ły podjęte w Stanach Zjednoczonych, niejako przy okazji, w ramach badań nad etiologią nekroz i zgorzeli występujących na jabłoniach i gruszach. W wyniku izolacji na pożywki mikrobiologiczne stwierdzono wówczas, że obok bakterii patogenicznych powodujących nekrozy i zgorzele występują również inne bakterie, a niektóre z nich miały zdolność silnego ograniczania wzrostu *E. amylovora*. Obecność tych bakterii wykazano nawet wówczas, gdy patogen zamarł w chorej tkance. Pionierskie badania ukierunkowane na zastosowanie bakterii do ochrony jabłoni przed zarazą ogniową w sadach przeprowadzono w latach 1928–1931, również w Stanach Zjednoczonych (Parker 1936). Bakterie wyosobniano ze środowiska roślin, a ich selekcję oparto na wynikach oceny zdolności do ograniczania wzrostu *E. amylovora* na pożywce agarowej. Wybrane izolaty testowano następnie na drzewach jabłoni w okresie kwitnienia opryskując je wodną zawiesiną potencjalnych antagonistów, a następnie zakażając w ten sam sposób patogenem. Stwierdzono znaczne ograniczenie porażenia kwiatów w porównaniu z kombinacją kontrolną, w której drzewa przed zakażaniem opryskiwano tylko wodą. W późniejszych latach Stessel i wsp. (1953) przeprowadzili szerokie badania przesiewowe testując około 70 000 izolatów bakterii pozyskanych z gleby. Ich celem była ocena inhibicyjnej aktywności nie tylko wobec *E. amylovora*, ale także innych bakterii patogenicznych dla roślin. Trzy spośród nich wyróżniły się skutecznością przeciwko sprawcy zarazy ogniowej.

Bakterie gatunku *Pantoea agglomerans* / Bacteria of the species *Pantoea agglomerans*

Prace nad poszukiwaniem skutecznych bakterii przeciwko zarazie ogniowej, kontynuowane w Stanach Zjednoczonych wykazały, że w zgorzelach powodowanych przez chorobę na jabłoniach i gruszach często występowały niepatogeniczne bakterie, tworzące żółto zabarwione kolonie (Farabee i Lockwood 1958). Z utworzonej kolekcji wyselekcjonowano 35 izolatów, które hamowały wzrost *E. amylovora* na agarze z ekstraktem drożdżowym powodując zakwaszenie tej pożywki. Było to pierwsze doniesienie o możliwym mechanizmie działania „żółtych bakterii” przeciwko *E. amylovora*. Uzyskane wyniki zainicjowały dyskusję skutkującą podjęciem szerszych badań nad ich rolą w patogenezie zarazy ogniowej. Pomimo, że wiele cech fenotypowych tych bakterii było podobnych do tych jak u *E. amylovora*, to jednak bardziej szczegółowe badania wykluczyły m.in. ich zdolności chorobotwórcze dla drzew owocowych. Wykazano także, że „żółte bakterie” miały więcej cech wspólnych z ówczesną jednostką systematyczną – *Bacterium herbicola*, której nazwę zmieniono później na *Erwinia herbicola* (Dye 1964). Szczepy należące do tego gatunku obejmowały szeroką grupę bakterii występujących w różnych środowiskach, podobnych do siebie pod wzglę-

dem cech fenotypowych i genetycznych. W grupie bakterii podobnych do *E. herbicola* znalazły się również patogeny ludzi i zwierząt z gatunku *Enterobacter agglomerans* (Starr 1981). W oparciu o wyniki analiz obejmujących podobieństwo DNA bakterii oraz ich elektroforetycznych wzorów białkowych, zaproponowano włączenie szczepów *E. herbicola* i *E. agglomerans* do nowego gatunku *Pantoea agglomerans* (Gavini i wsp. 1989). W dalszej części przeglądu będą jednak stosowane takie nazwy bakterii, jakie występowały w oryginalnych pracach.

Wśród prekursorskich badań nad biologiczną ochroną jabłoni i grusz przed zarazą ogniową na podkreślenie zasługują prace prowadzone pod kierunkiem profesora E.J. Klosa na Uniwersytecie stanu Michigan w East Lansing. Obok potwierdzenia, że *E. herbicola* zasiedlają te same nisze co *E. amylovora* oraz, że nie są patogenami, zajęto się zagadnieniem ich występowania w drewnie jednorocznych i starszych pędów gruszy udowadniając, że częściej były obecne w tkankach młodszych. *E. herbicola* występowała także w dużych ilościach na powierzchni liści jabłoni, czereśni i moreli, natomiast zdecydowanie w mniejszej liczności na liściach gruszy. Odkrywczym było stwierdzenie obecności tych bakterii w okresie zimy w pąkach różnych odmian jabłoni, ale jednocześnie ich braku w pąkach moreli, czereśni, brzoskwini i gruszy (Riggle i Klos 1972). W badaniach przeprowadzonych w warunkach szklarniowych i w sadzie wykazano, że opryskiwanie grusz w okresie kwitnienia wodną zawiesiną *E. herbicola* na 24 godziny przed zakażeniem patogenem, spowodowało istotne ograniczenie nasilenia choroby na kwiatach. Wysłunęto wniosek, że efekt ochronny mógł być związany z wytwarzaniem przez antagonistę toksycznej substancji, albo też może zachodzić współzawodnictwo z patogenem o pokarm.

Rozległe badania nad zastosowaniem *E. herbicola* do walki z zarazą ogniową przeprowadzono w latach 80. ubiegłego wieku pod kierunkiem prof. S.V. Beera na Uniwersytecie Cornella, w stanie Nowy Jork (Beer i wsp. 1980; Rundle i Beer 1987). Do wstępnej oceny skuteczności izolatów opracowano test z wykorzystaniem zawiązków owoców gruszy, dzięki czemu wyselekcjonowano bardzo skuteczny szczep Eh252. Wprowadzenie zawiesiny tego szczepu na kwiaty jabłoni na dzień przed lub trzy dni po inokulacji *E. amylovora* wykazało, że odpowiednio 52 i 25% kwiatów było zewnętrznie zdrowych. Podobną skuteczność (52% kwiatów bez objawów) odnotowano po zabiegu streptomycyną. Jednocześnie udowodniono, że opryskiwania zawiesiną antagonisty o wyższej koncentracji zwiększały skuteczność zabiegu. Przeprowadzono także badania nad mechanizmem działania Eh252, jego przeżywalnością na kwiatach jabłoni w warunkach naturalnych oraz innymi cechami związanymi z antagonizmem wobec *E. amylovora*. W podsumowaniu sformułowano wniosek, że ochronę jabłoni przed zarazą ogniową z zastosowaniem *E. herbicola* w okresie kwitnienia, można uznać za nową metodę

zwalczania tej choroby, mającą perspektywę zastosowania w praktyce (Beer i wsp. 1980). Jednak dalsze badania prowadzone w warunkach polowych na skalę produkcyjną, zarówno w Stanach Zjednoczonych, jak i Nowej Zelandii wykazały, że Eh252 nie zawsze dawał zadowalające wyniki.

Na szczególną uwagę zasługuje szczep C9-1 wyizolowany ze zgorzeli na pniu jabłoni w stanie Michigan, początkowo zidentyfikowany jako *E. herbicola*, a następnie jako *P. agglomerans*. Jednak badania przeprowadzone w ostatnich latach, obejmujące m.in. sekwencjonowanie genu *gyrB* tego szczepu oraz zastosowanie metody spektrofotometrii masowej MALDI-TOF MS, wskazały na konieczność przeklasyfikowania C9-1 i zaliczenia go do gatunku *Pantoea vagans* (Rezzonico i wsp. 2010). Szczep ten wykazał wysoką skuteczność przeciwko zarazie ogniowej w różnych doświadczeniach prowadzonych w warunkach polowych na zachodnim wybrzeżu Stanów Zjednoczonych. Jedną z głównych jego zalet jest wysoka zdolność kolonizacji kwiatów jabłoni i grusz, a zwłaszcza znamienia słupka. Traktowanie jabłoni i grusz zawiesiną C9-1 w okresie kwitnienia ograniczało występowanie zarazy ogniowej o 50–80% i było podobnie skuteczne, jak zabieg siarczanem streptomycyny. Z tego względu Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska zainicjowała działania nad jego komercjalizacją. Na bazie szczepu wyprodukowano biopreparat przeciwko zarazie ogniowej o nazwie BlightBan C9-1 (Johnson i Stockwell 2000). Ze szczegółowych badań wynika, że skuteczność preparatu zależała głównie od wielkości potencjału inokulacyjnego *E. amylovora* oraz warunków pogodowych.

Dalsze badania nad poszukiwaniem skutecznych bakterii zaowocowały wyselekcjonowaniem innych perspektywicznych szczepów *E. herbicola*, np. Eh318, Eh325, Eh112Y (USA), Eh1087 (NZ). Ich skuteczność była prawie taka sama, jak C9-1. Na wyróżnienie zasługuje także szczep P10c *P. agglomerans* wyizolowany w Nowej Zelandii, wykazujący skuteczność zbliżoną do streptomycyny i bardzo dobrze kolonizujący kwiaty jabłoni. W doświadczeniach polowych jako wektory bakterii wykorzystywano pszczoły. Na bazie zliofilizowanych bakterii szczepu P10c, odporne na streptomycynę, rifampicynę i kilka bakteriofagów, opracowano preparat BlossomBless, który sadownicy nowozelandzcy stosują w okresie kwitnienia jabłoni i grusz, również w sytuacjach, kiedy istnieje potrzeba wykonania dodatkowych zabiegów preparatami zawierającymi wymienione antybiotyki (Vanneste i wsp. 2002).

W Europie pierwsze prace nad wykorzystaniem bakterii przeciwko zarazie ogniowej przeprowadzono w Niemczech. Testy ze szczepami C1 i C81 gatunku *E. herbicola* wykonano na wysoce podatnych odmianach irgi (*Cotoneaster bullatus*). Bakterie aplikowano w warunkach laboratoryjnych na kwiaty irgi 24 godziny przed inokulacją *E. amylovora* uzyskując skuteczność taką samą, jak w kombinacji z zastosowaniem streptomycyny. Jednak w warunkach polowych skuteczność tych szczepów w ochronie kwiatów irgi wynio-

sła zaledwie 20%. Szczep C81 słabo sprawdził się również w ochronie pędów gruszy w warunkach polowych wykazując skuteczność zaledwie na poziomie 37%. Natomiast zastosowany dla porównania szczep Eh112Y *E. herbicola* pochodzący z USA ochronił ponad 86% pędów (Zeller i wsp. 1984). Również Zeller i Wolf (1996) izolowali bakterie z różnych roślin-gospodarzy *E. amylovora*, selekcjonując je testem na zawiązkach owoców gruszy. Na uwagę zasługuje szczep Eh89, którego skuteczność w ochronie kwiatów irgi oceniono na 70%. Była ona podobna do zastosowanej dla porównania streptomycyny. W dalszych badaniach pozyskano szczep Pa21889, zaliczony już wówczas do gatunku *P. agglomerans*, powodujący istotne zmniejszenie nasilenia zarazy ogniowej na kwiatach różnych odmian jabłoni (Laux i wsp. 2003). Podobnie, jak w innych, wspomnianych wyżej doświadczeniach obserwowano jednak zmienną skuteczność badanych bakterii, spowodowaną m.in. różnymi warunkami pogodowymi.

Prawie w tym samym czasie co w Niemczech, Wilson i wsp. (1990) w Wielkiej Brytanii wyizolowali z kwiatów i liści głogu kilka szczepów *E. herbicola* nieposiadających zdolności biosyntezy żółtego pigmentu. Ocena przeprowadzona w warunkach szklarniowych wykazała, że jeden z tych szczepów, oznaczony symbolem EhWHL9, ograniczał nasilenie choroby na kwiatach głogu w 80% i to w takim samym stopniu, jak użyty dla porównania siarczan streptomycyny. Prace nad poszukiwaniem skutecznych szczepów *E. herbicola* prowadzono również w innych krajach Europy. W Republice Czeskiej, z różnych roślin będących gospodarzami sprawcy zarazy ogniowej, m.in. jabłoni, gruszy, irgi i głogu, wyosobniono kilkaset izolatów *P. agglomerans*, spośród których wyselekcjonowano cztery charakteryzujące się wysoką aktywnością w hamowaniu wzrostu *E. amylovora in vitro* oraz wysokimi zdolnościami ochronnymi na zawiązkach owoców gruszy (Kokoškova 1995). Jednak w badaniach na różnych gatunkach roślin nie potwierdzono ich zadawalającej skuteczności.

Na Węgrzech pierwsze prace związane z zastosowaniem pożytecznych bakterii wyselekcjonowanych z liści i owoców jabłoni, przeprowadzono stosując testy *in vitro*, dzięki czemu pozyskano szczep HIP32, który zidentyfikowano jako *P. agglomerans*. Aplikowany w formie wodnej zawiesiny na kwiaty jabłoni znacznie ograniczał nasilenie zarazy ogniowej (Hevesi i wsp. 2006).

W Turcji pierwsze badania nad ochroną jabłoni i grusz przed zarazą ogniową z wykorzystaniem bakterii antagonicznych przeprowadzili Ülke i Çinar (1999). Spośród 250 izolatów pozyskanych z liści, pędów i kwiatów jabłoni i gruszy, 9 wykazało aktywność przeciwko *E. amylovora* w teście *in vitro*. W kolejnym etapie, polegającym na selekcji izolatów testem na zawiązkach owoców gruszy, wytypowano sześć najbardziej skutecznych szczepów z gatunku *E. herbicola*, które w ochronie pędów gruszy wykazały skuteczność wynoszącą 80% – porównywalną ze strepto-

myciną. Efektem badań prowadzonych w regionie Aegan było wyselekcjonowanie, spośród 160 izolatów bakterii epifitycznych, 13 z gatunku *E. herbicola*, o wysokich zdolnościach ochronnych, zarówno na zawiązkach owoców, jak i kwiatach gruszy. Ich skuteczność wynosiła od 82 do 98% (Benlioğlu i Erdoğan 1999). Badania nad opracowaniem biopreparatu na bazie szczepu *E. herbicola* wykazały, że formuła z zastosowaniem talku jako nośnika była bardziej skuteczna w porównaniu z użyciem bakterii zliofilizowanych czy zawieszonych w serwatce. Również w talku bakterie przeżywały lepiej niż na innych nośnikach (Özaktan i wsp. 1999).

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* / Bacteria of the genus *Pseudomonas*

Wielu badaczy analizując skład gatunkowy bakterii zasiedlających fylosferę różnych roślin wykazało powszechność występowania fluoryzujących bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. We Francji stwierdzono, że bakterie te były dominującym składnikiem populacji zasiedlających zarówno zdrowe, jak i chore jabłonie, grusze i głogi oraz, że wiele z nich wykazywało zdolność ograniczania wzrostu *E. amylovora in vitro* (Paulin 1978). W Kalifornii Thomson i wsp. (1976) wyselekcjonowali 3 izolaty fluoryzujących *Pseudomonas*, które w ochronie kwiatów grusz były tak samo skuteczne, jak streptomycyna. Podobne wyniki uzyskano w Anglii z dwoma izolatami *Pseudomonas fluorescens* w ochronie kwiatów i pędów głogu (Wilson i wsp. 1992). Badania przeprowadzone w Niemczech i Turcji, obejmujące skryning na pożywkach mikrobiologicznych i zawiązkach owoców gruszy oraz testy na roślinach irgi i jabłoni wykazały skuteczność izolatu R1 w ochronie kwiatów gruszy, wynoszącą odpowiednio 62 i 50% w warunkach sztucznej inokulacji patogenem, a w sadzie w warunkach infekcji naturalnej – 64%.

W połowie lat 80. ubiegłego wieku wyizolowano z liści gruszy w Kalifornii szczep A506 *P. fluorescens* wyróżniający się aktywnością w ograniczaniu wzrostu *E. amylovora* na pożywce mikrobiologicznej oraz zdolnościami ochronnymi jabłoni i grusz przed zarazą ogniową (Lindow i wsp. 1996). Na bazie tego szczepu opracowano biopreparat BlightBan A506, dostępny na rynku od 1996 roku. W wielu doświadczeniach prowadzonych w stanach Kalifornia, Oregon i Waszyngton wykazano przydatność tego preparatu w różnych programach ochrony jabłoni i grusz (Johnson i Stockwell 2000). Stwierdzono również, że dodanie do biopreparatu BlightBan A506 chelatowych związków żelaza stanowi źródło tego pierwiastka tylko dla bakterii antagonistycznych, co podwyższyło skuteczność jego działania.

We Włoszech oraz w Nowej Zelandii przeprowadzono badania nad przydatnością innych szczepów z rodzaju *Pseudomonas*, oznaczonych symbolami BO 3371 i BO G19

(Galasso i wsp. 2002). W warunkach szklarniowych wykazały one wysoką skuteczność zarówno w ochronie kwiatów, jak i pędów jabłoni i grusz, którą oszacowano nawet na 87%. Jednak uzyskiwane wyniki nie zawsze były jednolite, co mogło być związane z podatnością kwiatów związaną z długością okresu od ich otwarcia do zakończenia kwitnienia. W Nowej Zelandii szczep BO G19 ochronił 79% kwiatów jabłoni w warunkach polowych. W dalszych badaniach odnotowano także wysoką zdolność obu szczepów do kolonizacji kwiatów jabłoni i pędów grusz, co pozytywnie korelowało z poziomem skuteczności ochrony kwiatów jabłoni (Biondi i wsp. 2006).

W Hiszpanii szczep EPS62e *P. fluorescens* istotnie ograniczał zarazę ogniową w testach na oderwanych kwiatach, zawiązkach owoców oraz na drzewkach gruszy w warunkach szklarniowych. Jego skuteczność osiągała nawet 87%, jednak różniła się ona w zależności od testu. Przeżywalność bakterii tego szczepu monitorowano na kwiatach jabłoni stosując m.in. technikę real-time PCR oraz metodę posiewów na pożywkę. Nie stwierdzono różnic w liczebności populacji tych bakterii co sugeruje, że nie występowały one jako „żywe, ale nie dające się hodować” (Pujol i wsp. 2006).

Inne gatunki bakterii / Other species of bacteria

W trakcie prowadzonych badań nad poszukiwaniem bakterii antagonistycznych wobec *E. amylovora* i jednocześnie skutecznych przeciwko zarazie ogniowej, obok bakterii z rodzajów *Pantoea* i *Pseudomonas*, pozyskiwano również izolaty należące do innych taksonów. W Niemczech wyisobniono szczep Ra39 *Rahnella aquatilis* (Laux i wsp. 2003), szeroko badany w latach 1998–2000 pod kątem możliwości ochrony kwiatów jabłoni. W warunkach szklarniowych jego skuteczność wynosiła od 58 do 63% i była prawie taka sama, jak streptomycyny. Podobne efekty uzyskano w warunkach polowych. Zabieg wykonany w okresie kwitnienia w warunkach polowych ograniczał nasilenie zarazy ogniowej na kwiatach jabłoni o 68–77%, co odpowiadało skuteczności streptomycyny (Zeller i Laux 2006).

Również bakterie *Bacillus subtilis* wykazały zdolność ograniczania wzrostu *E. amylovora*. Pierwsze doniesienie na ten temat pochodzi z Egiptu (Abo-El-Dahab i El-Goarani 1964). Późniejsze prace prowadzone ze szczepem BS-F3 w warunkach polowych we Włoszech wykazały jego skuteczność w ochronie kwiatów gruszy na poziomie 60% po traktowaniu jednokrotnym i 75% po dwukrotnej aplikacji (Alexandrova i wsp. 2002). Także wśród szczepów z rodzaju *Bacillus* wyizolowanych w Republice Południowej Afryki znaleziono antagonistów wobec *E. amylovora* (Jock i wsp. 2002). Większość z nich zaklasyfikowano do gatunku *B. megaterium*.

W Turcji pozyskano szczepy BB-2 i AB-27 *B. subtilis*, które ograniczały nasilenie zarazy ogniowej w 82% na pędach grusz (Basim i wsp. 2002). Natomiast wyizolowany

w Niemczech szczep BS BD-170 wykazał skuteczność w ochronie kwiatów jabłoni w szklarni na poziomie 52–55%, a w warunkach naturalnych nawet 71%. Badania prowadzone w sadach jabłoniowych w Szwajcarii wykazały dobre zdolności kolonizacji kwiatów przez bakterie tego szczepu, a także ich rozprzestrzenianie się na sąsiednie kwiaty. Skuteczność zabiegu zależała od terminu jego wykonania (Broggini i wsp. 2005). Ze względu na zadawalającą skuteczność szczep ten skomercjalizowano rejestrując biopreparat o nazwie Biopro jako stymulator wzrostu. Był on dostępny na rynku od 2001 roku. Jednak testy w sadach położonych w południowo-zachodnich Niemczech nie dały jednoznacznych wyników, co do jego skuteczności.

Prawie w tym samym czasie opracowano w Stanach Zjednoczonych technologię produkcji biopreparatu o nazwie Serenade na bazie szczepu QST-713 *B. subtilis*. Pierwsze badania z tym szczepem w ochronie kwiatów jabłoni wykazały jego skuteczność na poziomie 64,3%, która była porównywalna do streptomycyny, jednak w następnym roku badań była ona znacznie niższa (Aldwinckle i wsp. 2002).

Spośród innych gatunków bakterii na uwagę zasługują również szczepy gatunków *Erwinia billingiae* i *E. tasmaniensis*, pozyskane odpowiednio w Republice Południowej Afryki i Australii, które wykazały istotne zdolności ochrony kwiatów jabłoni przed zarazą ogniową (Geider 2006).

Ostatnio opisano skuteczność bakterii z gatunku *Lactobacillus plantarum*, wyizolowanych z powierzchni owoców jabłoni i niektórych warzyw (np. sałaty), silnie ograniczających rozwój zarazy ogniowej zarówno na kwiatach, owocach, jak i liściach (Roselló i wsp. 2013). Wszelkstronnie przebadano 4 szczepy, które m.in. dobrze kolonizowały kwiaty jabłoni i gruszy. Stabilna liczebność populacji tych bakterii utrzymywała się przez przynajmniej tydzień w warunkach wysokiej, a także niskiej wilgotności powietrza.

Właściwości antagonistyczne wobec *E. amylovora* wykazały również bakterie z gatunku *Serratia marcescens*, pochodzące ze śliwy. Jednak zastosowane w okresie kwitnienia gruszy ochroniły tylko 23% kwiatów (Gerami i wsp. 2013).

Badania w Polsce / Research in Poland

W Polsce, badania nad wykorzystaniem bakterii antagonistycznych do zwalczania zarazy ogniowej podjęto około 20 lat temu w ówczesnym Instytucie Sadownictwa i Kwaciarstwa w Skierniewicach. Początkowo obejmowały one izolacje bakterii epifitycznych z kwiatów i liści jabłoni, grusz oraz głógów w rejonie Krakowa, określenie ich wpływu na wzrost *E. amylovora* na sztucznych pożywkach oraz ocenę zdolności ochronnych na zawiązkach

kach owoców gruszy. Spośród kilkuset wyosobnionych wówczas izolatów, większość wykazała antagonizm wobec patogena na pożywkach, a około 25% z nich wyróżniło się zdolnością do całkowitej lub prawie całkowitej ochrony zawiązków owoców gruszy przed chorobą. Niektóre izolaty wykazały zarówno tę zdolność, jak i antagonizm na pożywkach, a inne tylko jedną z tych cech. Na podstawie charakterystyki fenotypowej, najbardziej skuteczne izolaty zaklasyfikowano do gatunków *P. fluorescens* i *P. agglomerans* oraz rodzaju *Xanthomonas* (Krupiński 2001). Bardziej szczegółowe badania obejmujące większą liczbę izolatów pochodzących także z Polski centralnej pozwoliły na stwierdzenie, że antagonizm nie jest jedynym, a przynajmniej nie zawsze najważniejszym mechanizmem decydującym o zdolnościach ochronnych takich bakterii (Mikiciński i wsp. 2008). W badaniach na kwitnących drzewkach jabłoni udowodniono także, że niektóre bardzo skuteczne izolaty lepiej chroniły kwiaty przed zarazą niż zastosowane dla porównania Miedzian 50 WP (tlenochlorek miedzi) czy Aliette 80 WG (fosetyl glinu) (Sobiczewski i wsp. 2008).

W ostatnich latach podjęto szerokie badania nad biologiczną ochroną jabłoni przed zarazą ogniową obejmujące m.in. pozyskanie 396 izolatów bakterii pochodzących z fitylofery jabłoni i środowiska glebowego sadu jabłoniowego, selekcję 13 izolatów reprezentujących różne taksony i wyróżniających się zdolnościami ochronnymi kwiatów i pędów jabłoni przed chorobą, określenie przydatności różnych nośników dla bakterii oraz określenie potencjalnych mechanizmów działania tych bakterii. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do opracowania biopreparatu na bazie najbardziej perspektywicznych szczepów: szczepów 48M (*P. agglomerans*) i 59M (*P. protegens*) (Mikiciński i wsp. 2016a, b; Mikiciński 2017).

Podsumowanie / Summary

W rozważaniach na temat biologicznej ochrony jabłoni i gruszy przed zarazą ogniową należy rozgraniczyć sukces naukowy od sukcesu komercyjnego. Jeśli uwzględni się

liczbę prac opublikowanych w różnych krajach w ciągu ostatniego półwiecza, to można stwierdzić, że jest to duże osiągnięcie. Jednak, jak to zwykle bywa w przypadku metody biologicznej, sukces naukowy nie przekłada się na zastosowanie w praktyce. Lista wyizolowanych bakterii, wykazujących zdolności ochronne przed zarazą ogniową nawet w warunkach polowych, jest długa. Natomiast liczba opracowanych i zarejestrowanych preparatów na bazie tych bakterii jest niezwykle uboga (tab. 1).

Jednym z ważnych powodów utrudniających komercjalizację biopreparatów jest zmienność ich skuteczności. Niekiedy odzwierciedla ona warunki, w których prowadzone są badania, związane np. z terminem wykonania zabiegu lub czynnikami klimatycznymi wpływającymi na kolonizację chronionego organu rośliny przez bakterie. Duże znaczenie ma także formułacja, w tym stężenie czynnika biologicznego w produkcie i sposób jego wytwarzania. Istotna jest także wielkość potencjału inokulacyjnego patogena w środowisku. Wymienione ograniczenia mają również podłoże ekologiczne przekładające się wprost na odporność czynnika biologicznej ochrony na stresy zarówno biotyczne, jak i abiotyczne występujące w danym biotopie. Większość wyselekcjonowanych bakterii należy do grupy gramujemnych, w związku z czym nietworzących przetrwalników, a przez to wrażliwych na zmieniające się warunki środowiska. Perspektywiczny czynnik biologicznej ochrony musi z jednej strony skutecznie konkurować z *E. amylovora*, a z drugiej musi być zdolny do kolonizowania tych samych nisz na różnych organach rośliny zagrożonych przez patogena. W przypadku zarazy ogniowej są to praktycznie wszystkie organy nadziemnej części roślin, na których patogen może bytować, m.in. dzięki dostępowi do wody i składników pokarmowych oraz ochronie przed promieniowaniem słonecznym. Bakterie ochronne wytwarzając metabolity wtórne toksyczne dla patogena oraz konkurując o pokarm i miejsce, mają za zadanie nie dopuścić do nawiązania przez *E. amylovora* patogenicznego stosunku z rośliną.

W tej kwestii pomocne wydają się być metody biotechnologii, przy użyciu których możliwe jest nadanie bakteriom

Tabela 1. Wykaz komercyjnych biopreparatów na bazie bakterii przeciwko zarazie ogniowej (Vanneste 2011)
Table 1. List of commercial bioproducts containing various bacterium strains against fire blight (Vanneste 2011)

Nazwa Name	Gatunek bakterii i szczep Species of bacteria and strain	Rok Year	Kraj Country
BlightBan® A506	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	1995	USA
Blossom Bless™	<i>Pantoea agglomerans</i> P10c	2000	Nowa Zelandia – New Zealand
BlightBan® C9-1	<i>Pantoea vagans</i> C9-1	2007	USA
Bloomtime	<i>Pantoea agglomerans</i> E325	2007	USA
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	2002	USA, UE
Biopro	<i>Bacillus subtilis</i> BD170	bd	Szwajcaria – Switzerland
PomaVita™	<i>Pantoea agglomerans</i> P10c	bd	UE

bd – brak danych – no data, UE – Unia Europejska – European Union

pożądanych cech. Podjęto również próby ograniczenia niekorzystnego oddziaływania otoczenia na pożyteczne bakterie przez dodawanie do ich wodnej zawiesiny substancji pokarmowych, poprawiających ich przeżywalność na chrońonej powierzchni roślin, a jednocześnie niemających stymulującego wpływu na *E. amylovora* (van der Zwet 1993). Generalną zasadą jest, aby sposób wprowadzenia czynnika biologicznego sprzyjał utrzymaniu jego zadowalającej żywotności i aktywności. Udowodniono, że środowisko takie jak kwiaty czy pędy jabłoni jest generalnie bardzo ubogie w składniki pokarmowe. Wszystko to uzasadnia prowadzenie dalszych poszukiwań skutecznie działających szczepów bakterii. Bardzo ważne jest także określenie warunków zapewniających zadowalającą żywotność i aktywność bakterii po hodowli i w opracowanym biopreparacie. Konieczna jest stabilizacja metabolizmu bakterii, którą można osiągnąć przez przechowywanie w niskiej temperaturze, zamrażanie z użyciem krioprotektantów lub liofilizację.

W opracowaniu biopreparatu na bazie bakterii, podobnie zresztą, jak każdego innego biopreparatu, bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego nośnika. Firmy komercyjne często nie podają szczegółów, ale wśród najczęściej stosowanych należy wymienić: karboksymetylocelulozę, al-

ginian sodu, skrobię, żelatynę, gumę ksantanową czy talk. Preparaty Blossom-Blight C9-1 oraz BlossomBlight A506 produkowane w Stanach Zjednoczonych zawierają liofilizaty bakterii.

Innym bardzo ważnym czynnikiem ograniczającym komercjalizację wyselekcjonowanych szczepów jest kosztowny proces rejestracji, trwający zwykle długo i wiążący się z koniecznością przeprowadzenia badań m.in. w kontekście ewentualnej szkodliwości danego organizmu dla środowiska. Odrębną sprawą jest też społeczna akceptacja stosowania tych środków w praktyce. Brak jest szczegółowych danych na ten temat (Sobiczewski 2010). Wydaje się, że przyszłość metody biologicznej leży także w opracowaniu strategii jej integracji z innymi dostępnymi aktualnie metodami. Przykładem może tu być nowozelandzki BlossomProtect, wykorzystywany w programie z preparatami na bazie streptomycyny, podobnie zresztą jak w Stanach Zjednoczonych. Warto podkreślić, że przydatność biopreparatów do walki z zarazą ogniową upatruje się przede wszystkim przy niskim lub co najwyżej średnim zagrożeniu chorobowym oraz w uprawach prowadzonych systemem ekologicznym.

Literatura / References

- Abo-El-Dahab M.K., El-Goorani M.A. 1964. Antagonistic effect of a *Bacillus subtilis* strain upon *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 54 (10): 1285–1286.
- Aldwinckle H.S., Bhaskara Reddy M.V., Norelli J.L. 2002. Evaluation of control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Horticulturae* 590: 325–331. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.48.
- Alexandrova M., Bazzi C., Lameri P. 2002. *Bacillus subtilis* strain BS-F3: Colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. *Acta Horticulturae* 590: 291–297. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.43.
- Basim E., Yegen O., Ünlü A., Laux P., Zeller W. 2002. Biocontrol of *Erwinia amylovora* with antagonistic bacteria. *Bulletin International Organisation for Biological and Integrated Control* 25: 147–150.
- Beer S.V., Norelli J.L., Rundle J.R., Hodges S.S., Palmer J.R., Stein J.I., Aldwinckle H.S. 1980. Control of fire blight by non-pathogenic bacteria. *Phytopathology* 70: 459.
- Benlioglu K., Erdoğan O. 1999. Detection of bacterial microflora antagonistic to *Erwinia amylovora* on apple, pear, and quince trees. *Acta Horticulturae* 489: 631–634. DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.489.112.
- Biondi E., Bazzi C., Vanneste J.L. 2006. Reduction of fire blight incidence on apple flowers and colonisation of pear shoots in experimental orchard using *Pseudomonas* spp. IPV-BO G19 and IPV-BO 3371. *Acta Horticulturae* 704: 323–327. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.704.47.
- Broggini G.A.L., Duffy B., Holliger E., Schärer H.-J., Gessler C., Patocchi A. 2005. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro®) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology* 111 (2): 93–100. DOI: 10.1007/s10658-004-1423-x.
- Dye D.W. 1964. *Erwinia herbicola* (Löhnis 1911). *International Journal of Systematic Bacteriology* 30: 294.
- Dyrektywa Rady 2000/29/EC z dnia 8 maja 2000 r. w sprawie środków wprowadzanych celem zapobiegania wprowadzaniu organizmów szkodliwych dla roślin i produktów roślinnych oraz ich rozprzestrzenianiu na terenie Wspólnoty. *Dziennik Urzędowy UE* Nr L169: 1–112.
- Farabee G.J., Lockwood J.L. 1958. Inhibition of *Erwinia amylovora* by *Bacterium* sp. isolated from fire blight cankers. *Phytopathology* 48: 209–211.
- Galasso O., Sponza G., Bazzi C., Vanneste J.L. 2002. Characterisation of two fluorescent strains of *Pseudomonas* as biocontrol agents against fire blight. *Acta Horticulturae* 590: 299–307. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.44.
- Gavini F., Mergaert J., Beji A., Mielcarek C., Izard D., Kersters K., de Ley J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (3): 337–345. DOI: 0020-7713/89/030337-09\$02.00/0.
- Geider K. 2006. Twenty years of molecular genetics with *Erwinia amylovora*: Answers and new questions about EPS-synthesis and other virulence factors. *Acta Horticulturae* 704: 397–402. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.704.62.
- Gerami E., Hassanzadeh N., Abdollahi H., Ghasemi A., Heydari A. 2013. Evaluation of some bacterial antagonists for biological control of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology* 95 (1): 127–134. DOI: 10.4454/JPP.V95I1.026.

- Hevesi M., Hudak I., Dorgai L., Szentkirályi A., Bubán T. 2006. *Pantoea agglomerans* HIP32: A new bacterial antagonist to *Erwinia amylovora*. *Phytopathologia Polonica* 39: 79–85.
- Jock S., Völksch B., Mansvelt L., Geider K. 2002. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Letters* 211 (2): 247–252. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11232.x.
- Johnson K.B., Stockwell V.O. 2000. Biological control of fire blight. Chapter 16. p. 319–338. In: “Fire Blight: the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*” (J.L. Vanneste, ed.). CABI Publishing, Wallingford, UK. ISBN 0851992943. DOI: 10.1079/9780851992945.0000.
- Kokoškova B. 1995. Biologická ochrana proti původci spály růžovitych rostlin (*Erwinia amylovora*). Biological control of fire blight (*Erwinia amylovora*). Dissertation. Czech University of Agriculture Prague, 184 pp.
- Krupiński G. 2001. Prognozowanie zagrożenia jabłoni przez zarazę ogniową *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., w rejonie Krakowa oraz niekonwencjonalne możliwości ochrony roślin przed tą chorobą. Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Krakowie, 129 ss.
- Laux P., Wesche J., Zeller W. 2003. Field experiments on biological control of fire blight by bacterial antagonists. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110 (4): 401–407. DOI: <http://www.jstor.org/stable/43216071>.
- Lindow S.E., McGourty G., Elkins R. 1996. Interactions of antibiotics with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in the control of fire blight and frost injury to pear. *Phytopathology* 86 (8): 841–848.
- Mikiciński A. 2017. Bakterie i induktory odporności w ochronie jabłoni przed zarazą ogniową (*Erwinia amylovora*). Praca doktorska. Instytut Ogródnictwa, Skierniewice, 201 ss.
- Mikiciński A., Sobiczewski P., Berczyński S. 2008. Selection of bacteria from epiphytic populations on apple trees and soil environment for ability to control fire blight (*Erwinia amylovora*). *Phytopathologia Polonica* 47: 43–55.
- Mikiciński A., Sobiczewski P., Puławska J., Maciorowski R. 2016a. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.). *European Journal of Plant Pathology* 145 (2): 265–276. DOI: 10.1007/s10658-015-0837-y.
- Mikiciński A., Sobiczewski P., Puławska J., Malusa E. 2016b. Antagonistic potential of *Pseudomonas graminis* 49M against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Archives of Microbiology* 198: 531–539. DOI: 10.1007/s00203-016-1207-7.
- Özaktan H., Bora T., Sukan F.V., Sukan S., Sargin S. 1999. Studies on determination of antagonistic potential and biopreparation of some bacteria against the fireblight pathogen. *Acta Horticulturae* 489: 663–668. DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.489.118.
- Parker K.G. 1936. Fire blight: overwintering, dissemination, and control of the pathogen. New York (Ithaca) Agricultural Experiment Station Memory, 193 pp.
- Paulin J.P. 1978. Biological control of fire blight: Preliminary experiments. *Proceedings of the 2 International Conference Plant Pathogenic Bacteria* 4: 525.
- Pujol M., Badosa E., Manceau C., Montesinos E. 2006. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of fire blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and real-time PCR methods. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4): 2421–2427. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2421-2427.2006.
- Rezzonico F., Vogel G., Duffy B., Tonolla M. 2010. Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13): 4497–4509. DOI: 10.1128/AEM.03112-09.
- Riggle J.H., Klos E.J. 1972. Relationship of *Erwinia herbicola* to *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Botany* 50 (5): 1077–1083. DOI: 10.1139/b72-133.
- Roselló G., Bonaterra A., Francés J., Montesinos L., Badosa E., Montesinos E. 2013. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology* 137 (3): 621–633. DOI: 10.1007/s10658-013-0275-7.
- Rundle J.R., Beer S.V. 1987. Populations dynamics of *Erwinia amylovora* and a biological control agent, *Erwinia herbicola*, on apple blossom parts. *Acta Horticulturae* 217: 221–222. DOI: 10.17660/ActaHortic.1987.217.37.
- Sobiczewski P. 2010. Bakterie w ochronie roślin przed agrofagami – znaczenie gospodarcze i biotechnologia. [Bacteria in plant protection against agrophages – economic importance and biotechnology]. *Postępy w Ochronie Roślin/Progress in Plant Protection* 50 (3): 1064–1073.
- Sobiczewski P., Mikiciński A., Berczyński S., Puławska J. 2008. Biological control of fire blight on apple blossoms and shoots with epiphytic and soil bacteria. *Acta Horticulturae* 793: 409–414. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.793.61.
- Starr M.P. 1981. The genus *Erwinia*. p. 1260–1271. In: “The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria” Vol. II (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Ballows, H.G. Schlegel, eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Toronto.
- Stessel G.J., Leben C., Keitt G.W. 1953. Screening tests designed to discover antibiotics suitable for plant disease control. *Mycologia* 45: 325–334.
- Thomson S.V., Schroth M.N., Moller W.J., Reil W.O. 1976. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 66: 1457–1459.
- Ulke G., Çinar O. 1999. Biological control studies of fire blight caused by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al. *Acta Horticulturae* 489: 611–614. DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.489.106.
- van der Zwet T. 1993. Manipulation on epiphytic microbial community to promote biological control of *Erwinia amylovora* on pear and apple. *Acta Horticulturae* 338: 351–352. DOI: 10.17660/ActaHortic.1993.338.56.
- Vanneste J.L. 2011. Biological control agents of fire blight: successes and challenges. *Acta Horticulturae* 896: 409–416. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.58.
- Vanneste J.L., Cornish D.A., Yu J., Voyle M.D. 2002. P10C: A new biological control agent for control of the fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees. *Acta Horticulturae* 590: 231–235. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.33.
- Wilson M., Epton H.A.S., Sigee D.C. 1990. Biological control of fire blight of hawthorn (*Crataegus monogyna*) with *Erwinia herbicola* under protected conditions. *Plant Pathology* 39 (2): 301–308. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1990.tb02507.x.
- Wilson M., Epton H.A.S., Sigee D.C. 1992. Biological control of fire blight of hawthorn (*Crataegus monogyna*) with fluorescent *Pseudomonas* spp. under protected conditions. *Journal of Phytopathology* 136 (1): 16–26. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1992.tb01277.x.
- Zeller W., Laux P. 2006. Biocontrol of fire blight with the bacterial antagonist *Rhanella aquatilis* Ra39 in combination with aromatic compounds. *Acta Horticulturae* 704: 341–344. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.704.50.
- Zeller W., Massfeller D., Krebs E. 1984. Further experiments to control fire blight in the Federal Republic of Germany. *Acta Horticulturae* 151: 165–172. DOI: 10.17660/ActaHortic.1984.151.20.
- Zeller W., Wolf B. 1996. Studies on biological control of fire blight. *Acta Horticulturae* 411: 341–346. DOI: 10.17660/ActaHortic.1996.411.69.