

**WSTĘPNA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII Z RODZAJU
PSEUDOMONAS WYWOŁUJĄCYCH MOKRĄ ZGNILIZNĘ
CEBULI (*ALLIUM CEPA* L.) W POLSCE**

**PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF BACTERIA
FROM GENUS *PSEUDOMONAS* CAUSING SOFT ROT
OF ONION (*ALLIUM CEPA* L.) IN POLAND**

Beata Kowalska, Urszula Smolińska

Instytut Ogrodnictwa

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

beata.kowalska@inhort.pl

Abstract

From bulbs of onion (*Allium cepa* L.) with soft rot symptoms growing in different parts of Poland 75 bacterial isolates were obtained. The pathogenicity of these isolates was confirmed by biotests. The results presented in this paper involved forty isolates which were identified as *Pseudomonas* genera. These isolates were characterized biochemically. On the obtained results 20 isolates were classified to IVa *Pseudomonas marginalis* (50%), 6 isolates to group II *P. viridiflava* (15%), 7 isolates to *P. fluorescens* group Va (17.5%), 1 isolate to group Vb (2.5%), 1 isolate – *P. aeruginosa* (2.5%). Five isolates were not classified to any of the group *Pseudomonas*.

Key words: bacteria, *Pseudomonas*, onion, soft rot

WSTĘP

Bakteriozy są powszechnymi chorobami cebuli (*Allium cepa* L.) pojawiającymi się najczęściej podczas przechowywania oraz transportu. Choroby te mogą także rozwinąć się podczas wegetacji roślin na polu, szczególnie po silnym deszczu, w momencie zasychania szczypioru. Głównym źródłem infekcji jest zakażona gleba lub resztki roślinne zalegające na polu. Bakterie przenoszone są przez wodę podczas opadów lub nawadniania oraz przez owady. Rozwojowi choroby sprzyja wysoka wilgotność powietrza oraz temperatura 20-30 °C. Czynnikiem etiologicznym bakterioz mogą być następujące gatunki: *Burkholderia cepacia*, *B. gladioli*, *Pectobacterium carotovorum*, *Enterobacter cloacae* oraz bakterie z rodzaju *Pseudomonas* (Schwartz i Mohan 2008; Kowalska 2010; Kowalska i in. 2015).

Rodzaj *Pseudomonas* oprócz gatunków saprotroficznych obejmuje także gatunki patogeniczne, w obrębie których wyróżnia się patowary. Bakterie te wywołują różnego rodzaju choroby roślin, w tym mokrą zgniliznę (Godfrey i Marshall 2002; Tekoriene i in. 2003; Zwolińska i in. 2009; Mikiciński i in. 2010). Cebula porażana jest przez następujące bakterie z rodzaju *Pseudomonas*: *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. aeruginosa*, *P. marginalis* pv. *marginalis* (Mohan i Bijman 1998; Schwarz i Mohan 2008; Achbani i in. 2014). Charakterystyczne objawy mokrej zgnilizny to mace racja i rozpad tkanki roślinnej pod wpływem enzymów pektynolitycznych wydzielanych przez patogena do środowiska.

W Polsce od kilku lat notuje się znaczny wzrost liczby chorób bakteryjnych na roślinach warzywnych. Przyczyną tego zjawiska są między innymi warunki atmosferyczne – wysoka temperatura w okresie wegetacji warzyw, duże ilości opadów, gradobicia, silne wiatry i okresowe podtopienia pól. Ponadto brak jest wystarczająco skutecznych środków ochrony przed tymi chorobami. W wykazie zarejestrowanych odmian cebuli nie ma informacji na temat ich odporności na choroby bakteryjne. Kowalska i Smolińska (2014) w warunkach laboratoryjnych stwierdziły różnicowaną podatności 33 odmian na porażenie przez *B. cepacia*, *B. gladioli* i *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Autorki niniejszej pracy w latach 2004-2010 prowadziły badania, których celem była charakterystyka bakterii patogenicznych wywołujących zgniliznę cebuli na terenie Polski. W ramach tych prac z porażonych cebul uzyskano 75 izolatów bakterii patogenicznych. Przedmiotem prezentowanego opracowania jest charakterystyka oraz ocena patogeniczności i wirulencji izolatów bakteryjnych należących tylko do rodzaju *Pseudomonas*.

MATERIAŁY I METODY

Porażone cebule (*Allium cepa* L.) uzyskano z różnych rejonów Polski, zarówno z pól, jak i z przechowalni. Oceniano charakter objawów chorobowych po dokonaniu przekroju podłużnego lub poprzecznego cebul.

Z porażonych cebul usuwano zewnętrzne suche łuski, po czym cebule myto pod bieżącą wodą i płukano w wodzie destylowanej. Następnie sterylizowano je powierzchniowo przez 30 s w 70% etanolu i ponownie płukano w wodzie destylowanej. Cebule krojono podłużnie i z pogranicza łuski chorej i zdrowej wycinano za pomocą skalpela fragmenty tkanki (ok. 6 × 6 mm), które wykładano na pożywkę odżywczą NA (Dhingra i Sinclair 1995). Po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 28 °C wyrosłe bakterie

kilkakrotnie pasażowano na pożywkę w celu uzyskania pojedynczych kolonii bakterii.

Dla sprawdzenia patogeniczności uzyskanych izolatów bakterii przeprowadzono inokulację rośliny żywicielskiej – cebuli. Dojrzałe cebule odm. ‘Grabowska’, które po zbiorze były przechowywane w 4 °C, obrano i opłukano pod bieżącą wodą. Poddano je powierzchniowej sterylizacji w 70% etanolu przez 30 s i w 0,5% NaOCl przez 5 min, a następnie przepłukano dwukrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Tak przygotowaną cebulę krojono podłużnie na dwie części. Cebule umieszczano w jałowej szalce (ø 19 cm) wyłożonej bibułą filtracyjną, a następnie uszkodzono w jednym miejscu igłą preparacyjną o średnicy 1,0-1,5 mm. W miejsce uszkodzenia наносzono po 20 µl 24-godzinnej hodowli bakteryjnej o stężeniu $1,0-2,5 \times 10^8$ jtk·ml⁻¹. Każdym izolatem zakażano 3 fragmenty cebul. Kombinację kontrolną stanowiły cebule nieinokulowane bakteriami. Test przeprowadzono trzykrotnie. Szalki umieszczano w komorze inkubacyjnej w temperaturze 28 °C, w ciemności. Ocenę zdrowotności łusek prowadzono po 4-6 dniach inkubacji według stopnia ich porażenia wyrażonego w skali 0-3, gdzie 0 – brak objawów chorobowych; 1 – zmiany poniżej 50% porażonej powierzchni, 2 – ponad 50% powierzchni łuski z objawami zgnilizny, 3 – cała łuska porażona. Do dalszych testów przeznaczono tylko te izolaty, które wykazały stopień wirulencji powyżej 1 według zastosowanej skali.

Izolaty te poddano dalszym testom. Sprawdzone je pod względem gram ujemności, stosując barwienie metodą Grama. Do oceny zdolności wzrostu bakterii w warunkach beztlenowych wykorzystano podłoże Hugh-Leifsona (Hugh i Leifson 1953). Dla każdego izolatu inokulowano po dwie próbówki z podłożem. Do jednej próbówki dodano 2 ml sterylnej parafiny w celu zapewnienia warunków beztlenowych. Inkubację prowadzono w temperaturze 28 °C przez 48 h. Zmiana zabarwienia pożywki z niebieskiego na żółty świadczyła o reakcji pozytywnej, czyli zdolności bakterii do wzrostu w warunkach beztlenowych.

Ocenę zdolności bakterii do wytwarzania barwnika, wykazującego zdolność do fluorescencji, badano na pożywce King B selektywnej dla rodzaju *Pseudomonas* (King i in. 1954). Bakterie inkubowano przez 48 h w temperaturze 28 °C, a następnie obserwowano świecenie barwnika przy użyciu transiluminatora w świetle UV. Na tej podstawie do dalszych badań wybrano 40 izolatów bakterii posiadających barwnik fluoresceinę. Izolaty te zostały oznaczone w następujący sposób: P17, P19, P25, P34, P38, P42, P43, P44, P47, P52, P54, P83, P93, P97, P111, P112, P114, P120, P125,

P128, P135, P138, P159, P161, P172, P176, P178, P179, P185, P439, P443, P483, P486, P487, P503, P504, P505, P508, P509 i P513.

W kolejnym etapie przeprowadzono zestaw testów identyfikacyjnych LOPAT (Schaad i in. 2001). Zdolność do wytwarzania lewanu była badana na pożywce NAS. Wytwarzanie mukoidalnych, czyli wypukłych, błyszczących kolonii, świadczyło o obecności lewanu.

Obecność oksydazy badano przy użyciu krążków nasączonych 1% chlorowodorkiem dimetylo-p-fenyldiaminy (Fluka). Na krążek za pomocą wykałaczki nanoszono bakterie pobrane z 24 h hodowli. Powstanie niebieskiego zabarwienia w ciągu ok. 45 s świadczyło o dodatnim wyniku.

Test sprawdzający aktywność pektynolityczną izolatów przeprowadzono na bulwach ziemniaka. Bulwy obrano, powierzchniowo wysterylizowano i pocięto na plastry, które umieszczano w szalkach Petriego. Nacinano je w centralnej części i w to miejsce za pomocą ezy wprowadzono hodowlę bakterii. Plastry ziemniaka inkubowano w temperaturze 28 °C przez 48 h. Ocenę rozkładu tkanki ziemniaka prowadzono według następującej skali: 1 – brak rozkładu tkanki, 2 – tkanka z ograniczonymi zmianami, 3 – rozległa zgnilizna.

Zdolność do rozkładu argininy, czyli obecność dihydrolazy argininy, badano na pożywce zawierającej chlorowodorek argininy oraz czerwień fenolową jako indykator. Pożywka była umieszczona w probówkach i za pomocą ezy zaszczipiona bakteriami. Po 4-dniowej inkubacji w temperaturze 28 °C zmiana zabarwienia pożywki na kolor jasnoróżowy świadczyła o reakcji pozytywnej, czyli obecności enzymu degradującego argininę do ornityny z wydzielaniem CO₂ i NH₃ (Thornley 1960).

Przeprowadzono test nadwrażliwości na liściach tytoniu (*Nicotiana tabacum* odm. 'Samsun') (Schaad i in. 2001). Tytoń wysiano około dwa miesiące przed wykonaniem doświadczenia. 24-godzinną hodowlę bakteryjną o stężeniu $1,0-2,5 \times 10^8$ jtk·ml⁻¹ wprowadzano za pomocą strzykawki do przestrzeni międzykomórkowych przy nerwie głównym, na spodniej stronie liścia tytoniu. Obserwacje prowadzono po 24 h inkubacji w temperaturze pokojowej. Badane bakterie zaliczono do patogenicznych, gdy wywoływały nekrozę liści i obumieranie blaszki liściowej między nerwami. Reakcja ta jest dowodem wystąpienia reakcji nadwrażliwości tytoniu na bakterie patogeniczne.

Badano zdolność do wzrostu bakterii w temperaturze 37 i 41 °C na pożywce NB przez 48 h. Zmętnienie pożywki świadczyło o wzroście bakterii (Schaad i in. 2001).

Testy biochemiczno-fizjologiczne przedstawione powyżej przeprowadzono dwukrotnie, w dwóch lub trzech powtórzeniach dla każdego izolatu.

Testy biochemiczne dla wybranych izolatów bakterii przeprowadzono także z zastosowaniem testów API 20E (BioMerieux SA). W 5 ml 0,85% NaCl przygotowano zawiesinę bakterii z 24-godzinnej hodowli. Zawiesinę (po ok. 100/200 μ l) napełniano miniprobówki zawierające różne podłoża mikrobiologiczne. Dla testów wymagających zapewnienia warunków beztlenowych (zdolność do wykorzystania cytrynianu i acetoniny oraz obecność żelatynazy) do studzienek nanoszono dodatkowo olej mineralny. Inkubację prowadzono w temperaturze 36 °C przez 24 godziny. Korzystając z Tabeli Odczytu zawartej w instrukcji, odczytywano reakcje w miniprobówkach oraz określano 7-cyfrowy profil numeryczny. Odczyt wyników uzyskiwano przy wykorzystaniu oprogramowania komputerowego apiwebTM.

WYNIKI I DISKUSJA

Z porażonego materiału roślinnego wyodrębniono 75 izolatów wykazujących patogeniczność w stosunku do cebuli. Wszystkie izolaty wywoływały mokrą zgniliznę cebuli, co często było widoczne dopiero na przekroju podłużnym badanej cebuli. Izolaty zostały sprawdzone pod względem patogeniczności i wirulencji w stosunku do cebuli odm. 'Grabowska'. Stwierdzono, że różniły się one między sobą stopniem wirulencji, który według zastosowanej skali mieścił się w granicach 1,5-3,0 (tab. 1). Czterdzieści izolatów na podstawie przeprowadzonych testów biochemicznych zaklasyfikowano do rodzaju *Pseudomonas*, których wstępną charakterystykę przedstawiono w niniejszej pracy (tab. 1). Pozostałe izolaty patogeniczne, należące do następujących gatunków: *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia plymuthica*, *Pantoea ananatis*, były przedmiotem wcześniej opublikowanych prac naukowych (Kowalska 2010, Kowalska i in. 2011; 2015).

Obserwacje mikroskopowe preparatów barwionych metodą Grama potwierdziły gram ujemność wszystkich 40 charakteryzowanych izolatów. Żaden z badanych izolatów nie wykazywał wzrostu w warunkach beztlenowych, wszystkie wytwarzały fluoryzujący barwnik na pożywce King B. Żaden z izolatów nie wykazywał zdolności do wzrostu w 41 °C. Cecha ta potwierdziła przynależność do grupy bakterii patogenicznych, gdyż według Schaada i in. (2001) patogeniczne gatunki *Pseudomonas* nie rosną w tej temperaturze.

Tabela 1. Charakterystyka izolatów bakterii *Pseudomonas*
 Table 1. Characteristic of *Pseudomonas* bacterial isolates

Nr izolatu Lp. Isolate No. num- ber	Miejsce Place	Źródło Source	Rok Year	Stopień wirulencji (skala 0-3)* Virulence index (scale 0-3)*	Lewan Levan	Wytwa- rzenie oksydazy Oxidase reaction	Aktywność pektynolityczna (skala 1-3)** Pectolytic activity (scale 1-3)**	Dihydrola- za arginyne Arginine dihydrolyase	Reakcja nad- wrażliwości na liściach tytoniu Hypersensitivity reaction on tobacco leaves	Gatunek/rodzaj Species/genera
1. P17	Kutno I	pole; field	2004	2,0	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
2. P19	Kutno I	pole; field	2004	1,5	+/-	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
3. P25	Kutno II	pole; field	2004	2,0	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
4. P34	Kutno II	pole; field	2004	3,0	+/-	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
5. P38	Kutno II	pole; field	2004	3,0	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
6. P42	Kutno III	pole; field	2004	3,0	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
7. P43	Kutno III	pole; field	2004	3,0	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
8. P44	Kutno IV	pole; field	2004	2,7	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
9. P47	Kutno IV	pole; field	2004	3,0	+/-	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
10. P52	Kutno IV	pole; field	2004	2,0	-	-	2	-	+	<i>P. viridiflava</i>
11. P54	Kutno V	pole; field	2004	2,0	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
12. P83	Łęczycza I	pole; field	2004	1,5	+/-	+	1	-	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
13. P93	Łęczycza I	pole; field	2004	1,5	+	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Vb
14. P97	Łęczycza I	pole; field	2004	1,5	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
15. P111	Łęczycza II	pole; field	2004	2,0	+	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
16. P112	Łęczycza II	pole; field	2004	3,0	+	+	2	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
17. P114	Łęczycza III	pole; field	2004	1,5	+/-	-	1	-	+	<i>P. viridiflava</i>
18. P120	Żyrardów I	przech.; storage	2004	3,0	+	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
19. P125	Żyrardów I	przech.; storage	2004	3,0	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
20. P128	Żyrardów II	przech.; storage	2004	2,0	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
21. P135	Żyrardów III	przech.; storage	2004	3,0	+/-	+	1	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.
22. P138	Tarnów I	przech.; storage	2004	1,5	+/-	+	2	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
23. P159	Inowrocław I	przech.; storage	2004	2,0	+/-	+	3	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp.

24.	P161	Inowrocław II	przech.; storage	2004	1,5	-	-	3	-	+	<i>P. viridiflava</i>
25.	P172	Inowrocław III	przech.; storage	2004	3,0	-	-	3	-	+	<i>P. viridiflava</i>
26.	P176	Inowrocław IV	przech.; storage	2004	3,0	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
27.	P178	Inowrocław IV	przech.; storage	2004	2,0	-	+	1	+	-	<i>P. fluorescens</i> Va
28.	P179	Inowrocław IV	przech.; storage	2004	1,5	+	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
29.	P185	Inowrocław V	przech.; storage	2004	2,0	+/-	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
30.	P439	Kutno	przech.; storage	2007	1,5	+	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
31.	P443	okolice Poznania	polc; field	2007	3,0	-	+	2	-	+	<i>P. aeruginosa</i>
32.	P483	Łęczyca I	polc; field	2008	2,0	+	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
33.	P486	Łęczyca II	polc; field	2008	3,0	-	-	2	-	+	<i>P. viridiflava</i>
34.	P487	Łęczyca III	polc; field	2008	3,0	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
35.	P503	Hopkie I	przech.; storage	2009	3,0	+/-	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
36.	P504	Hopkie II	przech.; storage	2009	2,5	+/-	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
37.	P505	Hopkie II	przech.; storage	2009	2,5	+/-	+	2	+	-	<i>P. marginalis</i>
38.	P508	Hopkie III	przech.; storage	2009	2,5	+	-	3	-	+	<i>P. viridiflava</i>
39.	P509	Hopkie III	przech.; storage	2009	2,5	+	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>
40.	P513	Hopkie IV	przech.; storage	2009	2,0	+/-	+	3	+	-	<i>P. marginalis</i>

* stopień wirulencji wyrażono w skali 0-3, gdzie 0 – brak zmian świadczących o rozwoju bakterii; 1 – zmiany poniżej 50% porażonej powierzchni,

2 – ponad 50% powierzchni łuski z objawami zgnilizny, 3 – cała łuska porażona

* virulence index was presented in a scale of 0-3, where 0 – no symptoms of bacteria development; 1 – below 50% of infected scale; 2 – over 50% of infected scale; 3 – all scale infected

(+) – reakcja pozytywna; positive reaction

(-) – reakcja negatywna; negative reaction

(+/-) wynik reakcji pośredni, trudny do interpretacji; the result of the reaction intermediate, difficult to interpretation

** skala zmian wywoływanych przez bakterie na ziemniaku: 1 – brak rozkładu tkanki, 2 – tkanka z ograniczonymi zmianami, 3 – rozległa zgnilizna

** the scale of the changes caused by bacteria on potatoes: 1 – lack of tissue destruction, 2 – tissue with limited destruction, 3 – extensive soft rot

Przeprowadzono zestaw testów LOPAT, określających następujące właściwości biochemiczne: zdolność do wytwarzania lewanu, obecność oksydazy, aktywność pektynolityczną, wytwarzanie dihydrolazy argininy oraz reakcję nadwrażliwości na liściach tytoniu. Wyniki tych testów przedstawiono w tabeli 1. Uzyskane wyniki umożliwiły podział izolatów na grupy LOPAT (Lelliott i in. 1966).

Izolaty P17, P19, P34, P38, P42, P43, P44, P47, P111, P120, P179, P185, P439, P483, P487, P503, P504, P505, P509 i P513 zaklasyfikowano do grupy IVa: *Pseudomonas marginalis*. Bakterie te w teście na zdolność do wytwarzania lewanu dały wynik pozytywny lub pozytywno-negatywny, wytwarzały enzym oksydazę i dihydrolazę argininy. W teście na ziemniaku większość izolatów wykazała silną aktywność pektynolityczną, nie wywoływały reakcji nadwrażliwości na liściach tytoniu (tab. 1).

Bakterie te izolowano z cebul pochodzących z różnych rejonów Kutna, Łęczycy, Żyrardowa, Inowrocławia i Hopkie koło Tomaszowa Lubelskiego. Na uwagę zasługuje fakt, że cebule pochodziły zarówno z pola, jak również z przechowalni, zatem bakterie rozwijały się i wywoływały objawy chorobowe cebuli w zróżnicowanych warunkach termicznych podczas uprawy oraz w przechowalni, czyli w 0 °C. Podobne obserwacje przeprowadzili także Wright i Hale (1992), Kim i in. (2002) oraz El-Hendawy (2004), którzy stwierdzili, że *P. marginalis* może wywoływać bakteriozę na cebuli podczas jej przechowywania, powodując znaczne straty. Należy przypuszczać, że wystąpienie objawów chorobowych wywoływanych przez *P. marginalis* w przechowalniach było spowodowane zakażeniem cebul tym patogenem np. podczas zbioru. Bakterie mogą wnikać do wnętrza cebul pomiędzy łuski przez szyjkę – miejsce po odcięciu szczypioru, a następnie rozwijać się w przechowalni i wywoływać chorobę.

Bakteria *P. marginalis* wywołuje choroby także innych gatunków warzyw, np. z rodziny kapustowatych (Rimmer i in. 2007). Zwolińska i in. (2009) badając populację bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wywołujących mokrą zgniliznę różnych roślin, wykazali, że najbardziej patogenicznym gatunkiem z tej grupy był *P. marginalis*. Dodatkowo badacze ci zaobserwowali, że izolaty uzyskane z warzyw – marchwi, pietruszki, selera, pora, sałaty – były bardziej wirulentne niż pochodzące z roślin uprawnych – buraka cukrowego i rzepaku. W niniejszej pracy wykazano także wysoką wirulencję izolatów *P. marginalis*. Stopień porażenia cebul w teście patogeniczności według wprowadzonej skali wynosił 2 lub 3, czyli zmiany chorobowe obejmowały odpowiednio około $\frac{3}{4}$ łuski i całą łuskę cebuli.

Izolaty P52, P114, P161, P172, P486 i P508 zaklasyfikowano do grupy II: *P. viridiflava*. Testy oceniające zdolność tych izolatów do wytwarzania lewanu, oksydazy i dihydrolazy argininy dały wynik negatywny. Izolaty wykazały aktywność pektynolityczną w teście na ziemniaku oraz wywołały reakcję nadwrażliwości na liściach tytoniu (tab. 1). Izolaty P161, P172, P508 zostały wyizolowane z cebul, które pochodziły z przechowalni. W teście patogeniczności stopień ich wirulencji był dosyć wysoki i wyniósł odpowiednio 1,5; 3,0 i 2,5. Potwierdza to zdolność *P. viridiflava* do rozwoju i wywoływania choroby w 0 °C. Godfrey i Marshall (2002) także stwierdzili, że gatunek ten może powodować chorobę warzyw przechowywanych w niskich temperaturach.

Izolaty P25, P54, P97, P125, P128, P176, P178 nie wykazywały właściwości pektynolitycznych, ani nie powodowały reakcji nadwrażliwości na liściach tytoniu, wytwarzały oksydazę i dihydrolazę argininy. Na tej podstawie zaklasyfikowano je do grupy *P. fluorescens* Va. Izolat P93 nieznacznie różnił się od pozostałych, ponieważ wynik w teście na wytwarzanie lewanu był zdecydowanie pozytywny. Izolat ten zaliczono do grupy Vb (tab. 1). Bakterie *Pseudomonas fluorescens* należą głównie do saprotrofów (Schaad i in. 2001), jednakże w pracy wykazano ich patogeniczne właściwości w stosunku do cebuli. Stopień wirulencji poszczególnych izolatów był zróżnicowany. Uzyskane wyniki są zbieżne z badaniami Aboaba (2007) oraz Tekoriene i in. (2003), którzy także zaobserwowali zgniliznę wewnętrznych łusek cebuli wywoływaną przez tę grupę bakterii. W Stanach Zjednoczonych Liao i Wells (1987) z przechowywanej papryki z objawami miękkiej zgnilizny wyizolowali bakterie *Pseudomonas*, które zaklasyfikowano do grupy V *P. fluorescens*.

Izolaty P83, P112, P135, P138, P159, P443 wykazywały zróżnicowane cechy w testach LOPAT, które uniemożliwiły zaklasyfikowanie ich do którejkolwiek z grup (tab. 1). Opracowano ich charakterystykę fenotypową z zastosowaniem testu API 20E. Dla izolatu P443 uzyskano profil numeryczny 2206004, który odpowiadał taksonowi *Pseudomonas aeruginosa* (tab. 2). Dla pozostałych izolatów P83, P112, P135, P138 i P159 uzyskano profile wątpliwe i na tej podstawie nie udało się ich zidentyfikować do gatunku.

Izolat P443 wyodrębniony z cebuli pochodzącej z rejonów Poznania charakteryzował się wysokim stopniem wirulencji. *P. aeruginosa* dosyć rzadko wymieniany jest jako patogen roślin. W literaturze są nieliczne doniesienia na ten temat. Abd-Alla i in. (2011), Schwartz i Mohan (2008), Hao i Xie (2006), a także Tekoriene i in. (2003) wymieniają tę bakterię

jako sprawcę mokrej zgnilizny cebuli. Znacznie więcej jest doniesień na temat *P. aeruginosa* jako sprawcy groźnych zakażeń u ludzi (de Bentzmann i Plesiat 2011). Pomimo patogenicznych właściwości bakteria ta posiada także potencjał do wykorzystania w biologicznej ochronie roślin (Couillerot i in. 2009; Yasmin i in. 2014).

Tabela 2. Profil biochemiczny izolatu P443 odpowiadający taksonowi *P. aeruginosa* wg testu API 20E

Table 2. Biochemical profile of P443 isolate corresponding to *P. aeruginosa* according to API 20E test

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

WNIOSKI

1. Spośród 75 izolatów patogenicznych uzyskanych z porażonych cebul (*Allium cepa* L.) 53% stanowiły izolaty należące do rodzaju *Pseudomonas* (40 izolatów).
2. Wśród 40 patogenicznych izolatów *Pseudomonas* uzyskanych z cebul z objawami mokrej zgnilizny najczęściej występującymi gatunkami były *P. marginalis* (20 izolatów – 50%), *P. fluorescens* Va (7 izolatów – 17,5%) i *P. viridiflava* (6 izolatów – 15%).
3. Jeden izolat pochodzący z cebuli uzyskanej z przechowalni z okolic Poznania zidentyfikowano jako *P. aeruginosa*. Izolat ten wykazywał wysoki stopień wirulencji, silne właściwości pektynolityczne oraz powodował nadwrażliwość na liściach tytoniu.
4. Izolaty bakteryjne z rodzaju *Pseudomonas* wykazywały zróżnicowany stopień wirulencji w teście patogeniczności, przy czym 15 badanych izolatów (37,5%) powodowało 100% porażenie łuski cebuli w tym teście.

Literatura

- Abd-Alla M.H., Bashandy S.R., Ratering S., Schnell S. 2011. First report of soft rot of onion bulbs in storage caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Egyptian Journal of Plant Interactions 6(4): 229-238. DOI: 10.1080/17429145.2010.535618.
- Aboaba O.O. 2007. Growth studies of *Pseudomonas fluorescens* implicated in soft rot of purple variety of onions in Southern Nigeria. Nature and Science 5(4): 75-80. DOI: 10.1146/annurev.mi.13100159.001235.

- Achbani E.H., Sadik S., Kahkahi R.El. Benbouazza A., Mazouz H. 2014. First report on *Pseudomonas marginalis* bacterium causing soft rot of onion in Morocco. *Atlas Journal of Biology* 3(2): 218-223. DOI: 10.5147/ajb.2014.0136.
- de Bentzmann S., Plesiat P. 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental Microbiology* 13(7): 1655-1665.
- Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moenne-Loccoz Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 4(5): 505-511.
- Dhingra O.D., Sinclair J.B. 1995. *Basic plant pathology methods*. Lewis Publishers, Boca Raton London Tokyo
- El-Hendawy H.H. 2004. Association of pectolytic fluorescent pseudomonads with postharvest rots of onion. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 369-376.
- Godfrey S.A.C., Marshall J.W. 2002. Identification of cold-tolerant *Pseudomonas viridiflava* and *P. marginalis* causing severe carrot postharvest bacterial soft rot during refrigerated export from New Zealand. *Plant Pathology* 51: 155-162. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00679.x.
- Hao X.J., Xie G.L. 2006. Internal brown rot of onion caused by an opportunistic bacterial pathogen (*Pseudomonas aeruginosa*) in China. *Journal of Plant Pathology* 88 (3): 342.
- Hugh R., Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66: 24-26.
- Kim Y.K., Lee S.D., Choi C.S., Lee S.B., Lee S.Y. 2002. Soft rot of onion bulbs caused by *Pseudomonas marginalis* under low temperature storage. *The Plant Pathology Journal* 18(4): 199-203.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Kowalska B. 2010. Charakterystyka bakterii patogenicznych występujących na cebuli (*Allium cepa* L.) i metody ich zwalczania – praca doktorska. Instytut Warzywnictwa, Skierniewice, 129 ss.
- Kowalska B., Smolińska U., Oskiera M. 2011. First report of *Serratia plymuthica* causing onion bulb rot in Poland. *Polish Journal of Microbiology* 60(1): 85-87.
- Kowalska B., Smolińska U. 2014. Podatność odmian cebuli na porażenie przez patogeny bakteryjne. *Progress in Plant Protection* 54(2): 185-190. DOI: <http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2014-030>.
- Kowalska B., Smolińska U., Oskiera M. 2015. *Burkholderia gladioli* associated with soft rot of onion bulbs in Poland. *Journal of Plant Pathology* 97(1): 37-43. DOI: 10.4454/JPP.V97I1.007.

- Krejzar V., Mertelik J., Pankova I., Kloudova K., Kudela V. 2008. *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. Plant Protection Science 44(3): 85-90.
- Lelliot R.A., Billing E., Hayward A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. The Journal of Applied Bacteriology 29: 470-489.
- Liao C.H., Wells J.M. 1987. Diversity of pectolytic, fluorescent *Pseudomonas* causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. Phytopathology 77(5): 673-677.
- Mikiciński A., Sobiczewski P., Sulikowska M., Puławska J., Treder J. 2010. Pectolytic bacteria associated with soft rot of calla lily (*Zantedeschia* spp.) tubers. Journal of Phytopathology 158: 201-209. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01597.x.
- Mohan S.K., Bijman V.P. 1998. A soft rot of leaves, scapes and bulbs of onion seed crops caused by *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. Phytopathology 88: S64.
- Rimmer S.R., Shattuck V.I., Buchwaldt L. 2007. Compendium of *Brassica* Diseases. APS Press, St. Paul, MN, 117 s.
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, MN, 373 s.
- Schwartz H.F., Mohan S.K. 2008. Compendium of onion and garlic diseases and pests. APS Press, St. Paul, MN, 127 s.
- Tekoriene R., Lugauskas A., Vasinauskiene M. 2003. Bacteria of the *Pseudomonas* migula genus on stored vegetables. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus 2 (2): 153-160.
- Thornley M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology 1: 37-52. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00178.x.
- Wright P.J., Hale C.N. 1992. A field and storage rot of onion caused by *Pseudomonas marginalis*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 20: 435-438. DOI: 10.1080/01140671.1992.10418061.
- Yasmin S., Hafeez F.Y., Rasul G. 2014. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* Z5 for biocontrol of cotton seedling disease caused by *Fusarium oxysporum*. Biocontrol Science Technology 24(11): 1227-1242. DOI: 10.1080/09583157.2014.932754.
- Zwolińska A., Maćkowiak-Sochacka A., Krawczyk K. 2009. Charakterystyka populacji bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wywołujących mokrą zgniliznę roślin. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 49(3): 1353-1357.