

タマネギ軟腐病のペクチン質含有培地を用いた簡易診断

田中民夫* 坪木和男**

供試培地は2つの基礎培地からなる。すなわち、A培地：純水1,000ml (約100°C), 0.2%プロムチモールブルー溶液40ml, 10% CaCl₂·2H₂O 6 ml, ポリガラクトン酸ナトリウム塩22g (pH6.9-7.1), およびB培地：ペプトン20g, K₂HPO₄1.5g, MgSO₄0.7g, グリセリン10g, 0.1%クリスタル紫溶液5 ml, 寒天4 g および純水100ml (pH7.2)である。両培地は別々に殺菌(121°C, 15分)した後、ただちに混合し、平板とした。本培地(PFD)上に生育した *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* のコロニーは中心部が橙黄色でその周縁は黄色を呈し、またコロニー周縁の培地表面は深く陥没した。立毛中の腐敗症状タマネギなどから、PFD培地上に中心部が橙黄色で周縁が黄色のコロニーを形成し、培地表面を陥没させる細菌を分離し、細菌学的諸性質を検討した。また、PFD培地を用いたタマネギ軟腐病の診断の実用性について論議した。

緒 言

北海道において、細菌によるタマネギ球腐敗はおもに *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* および *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* によるものとされている²³⁾。舟山ら⁹⁾は北海道において腐敗タマネギ球から *E. carotovora* subsp. *carotovora* の一系統とみなされる細菌を分離した。田部井ら²⁰⁾は岐阜県産タマネギの細菌性腐敗病菌として *E. carotovora* subsp. *carotovora* を報告した。一方、土屋ら²⁶⁾はレタスから分離した *P. marginalis* をタマネギに刺針噴霧接種、またはタマネギ切葉に刺針接種した結果、本菌のタマネギに対する病原性を認めた。しかし、これら鱗茎からの病原細菌とタマネギ地上部病徴との関係は明らかではなく、立毛中のタマネギ腐敗症状を病徴のみからタマネギ軟腐病(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)と診断することは困難な場合が多い。

筆者らはタマネギ軟腐病の診断法の1つとしてペクチン質含有培地を用いた簡易診断法を検討し

たのでその結果を報告する。

材料および方法

1. 供試培地

病原細菌の分離に用いた培地は次の2つの基礎培地からなる。すなわち、A培地：純水1,000ml, 0.2%プロムチモールブルー溶液40ml, 10% CaCl₂·2H₂O6ml, ポリガラクトン酸ナトリウム塩(シグマ社)22g およびB培地：ペプトン20g, K₂HPO₄1.5g, MgSO₄0.7g, グリセリン10g, 0.1%クリスタル紫溶液5ml, 寒天4g, 純水100mlである。A培地のpHは6.9-7.1およびB培地のpHは7.2とした。AおよびB培地は別々に121°C, 15分間殺菌した後、ただちに混合し、ペトリ皿に流し込み、平板培地として供試した。本培地を陥没形成検出培地 (pit formation detection medium, 以下PFD培地と略記)と称した。なお、本培地の使用にあたり、細菌コロニーの流動を防ぐため、培地平板作製後、5日ほど放置し、培地表面の水滴が消失した後、供試した。

2. PFD地上でのコロニー形成

腐敗タマネギから分離した菌株E1およびE4の2分離菌株を供試した。両菌株の普通寒天培地培養菌体(25°C, 24時間)を殺菌水中に浮遊させ、それぞれ10⁸/ml未満の濃度となるように希釈し

1982年7月1日受理

* 北海道立北見農業試験場, 099-14 常呂郡訓子府町

** 同上(現北海道立十勝農業試験場, 082 河西郡芽室町)

表1 腐敗タマネギから分離した細菌の諸性質

供 試 菌 株	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E. carotovora	
						D ¹⁾	L ²⁾
形 態	短桿	短桿	短桿	短桿	短桿	桿 状	短 桿
運 動 性	+	+	+	+	+	+	+
ベ ン 毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周毛	周 毛	周 毛
胞 子	-	-	-	-	-	-	-
グラム染色	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰 性	陰 性
抗 酸 性	-	-	-	-	-	-	-
O F 試験	F	F	F	F	F	F	F
肉汁培地上の生育	良好	良好	良好	良好	良好		良 好
カタラーゼ	+	+	+	+	+	+	+
オキシダーゼ	-	-	-	-	-	-	-
硝酸塩の還元	+	+	+	+	+	+	+
デンプンの加水分解	-	-	-	-	-	-	-
アミノ酸脱炭酸酵素							
アルギニン	-	-	-	-	-	-	-
オルニチン	-	-	-	-	-	-	-
リ ジ ン	-	-	-	-	-	-	-
グルタミン酸	-	-	-	-	-	-	-
ウレアーゼ	-	-	-	-	-	-	-
ツウィーン80の分解	+	+	+	+	+	d	
有機化合物からの酸生産							
フルクトース	+	+	+	+	+	+	+
グルコース	+	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	+	+	+	+	+	+	+
β-メチルグルコシド	+	+	+	+	+	+	+
サッカロース	+	+	+	+	+	+	+
マンノース	+	+	+	+	+	+	+
D-リボース	+	+	+	+	+	+	+
アドニット	-	-	-	-	-	-	-
ズルシット	-	-	-	-	-	-	-
メレズイトース	-	-	-	-	-	-	-
アラビノース	+	+	+	+	+	+	+
マンニット	+	+	+	+	+	+	+
サリシン	+	+	+	+	+	+	+
α-メチルグルコシド	-	+	-	+	+	-	-
キシロース	+	+	+	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+
イノシット	+	+	+	+	+	d	d
ラクトース	+	+	+	+	+	+	+
メリビオース	+	+	+	+	+	+	+
マルトース	-	+	-	+	+	d	d
セロビオース	+	+	+	+	+	+	+
デキストリン	-	-	-	-	-	-	-
エスクリン	+	+	+	+	+	+	+
グリセリン	+	+	+	+	+	-	-
ラムノース	+	+	+	+	+	+	+
ソルビット	-	-	-	-	-	+	+
トレハロース	-	+	+	+	+	+	

表 1 つづき

供 試 菌 株	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E. carotovora	
						D ¹⁾	D ²⁾
有機酸の利用							
酢 酸	+	+	+	+	+	+	+
フマル酸	+	+	+	+	+	+	+
グルコン酸	+	+	+	+	+	+	+
DL-リンゴ酸	+	+	+	+	+	+	+
コハク酸	+	+	+	+	+	+	+
安息香酸	-	-	-	-	-	-	-
シュウ酸	-	-	-	-	-	-	-
プロピオン酸	-	-	-	-	-	-	-
ギ 酸	-	-	-	-	-	+	+
マロン酸	-	-	-	-	-	-	-
D-(-)-酒石酸	-	-	-	-	-	-	-
乳 酸	+	-	-	-	+	+	+
クエン酸	+	+	+	+	+	+	+
D- α -ガラクトロン酸	+	+	+	+	+	d	d
嫌気条件下での生育	+	+	+	+	+	+	+
生育因子の要求	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S 生産	+	+	+	+	+	+	+
36°Cでの生育	+	+	+	+	+	+	+
グルコン酸塩の酸化	-	-	-	-	-	-	-
サッカロースからの還元物質	-	+	-	+	+	-	-
ペクチン酸塩の分解	+	+	+	+	+	+	+
淡紅色色素の生産	-	-	-	-	-	-	-
アセトインの生産	+	+	+	+	+	+	+
MR 試験	-	-	-	-	-	d	
ムコイド生育	-	-	-	-	-	d	d
DNase	+	-	+	-	-		-
ゲラチン溶解	+	+	+	+	+	+	+
フェニルアラニンデアミナーゼ	-	-	-	-	-	-	-
インドール生産	-	-	-	-	-	-	-
グルコースからのガス生産	-	-	-	-	-	d	d
カゼインの加水分解	+	+	+	+	+	+	+
青色色素生産	-	-	-	-	-	-	-
黄色色素生産	-	-	-	-	-	-	-
KCNによる生育阻害	-	-	-	-	-	d	d
5%塩化ナトリウム溶液中での生育	+	+	+	+	+	+	+
レシチナーゼ	-	-	-	-	-	-	-
ホスファターゼ	-	-	-	-	-	-	-
エリスロマイシン(50 μ g)感受性	-	-	-	-	-	-	-
バレイショ黒脚症状の発現	-	-	-	-	-	-	-
ジャガイモ塊茎腐敗	+	+	+	+	+	+	
アンモニア生産	-	-	-	-	-		
リトマスミルク	R ³⁾ C ⁴⁾ D ⁵⁾	R, C, D	R, C, D	R, C, D	R, C, D		

1) Dye (1969) 2) Lelliott (1974) 3) 還元 4) 凝固 5) 消化

た。これら細菌浮遊液0.2mlをそれぞれPFD培地およびKingらのB培地¹⁰⁾平板上に殺菌したガラス棒で塗布した。これらのペトリ皿を25°C, 32時間培養し、培地上に出現したコロニーの数を計数した。

3. 病原細菌の分離

立毛中および収穫時に腐敗症状を示すタマネギ個体および腐敗症状を示すタマネギ花基を採集し、その腐敗部の組織塊を殺菌水中に投入、十分振とうして細菌を浮遊させた。この浮遊液を1白金耳とり、PFD培地平板上に画線した。平板上に出現したコロニーは再画線した後、普通寒天培地上に移植し、室温で保存した。

4. 接種方法

本畑に移植したタマネギ個体および鉢植えした母球から萌芽、伸長した葉の内部に約0.5mlの細菌浮遊液 ($10^{8-9}/ml$) を注射接種した。また、細菌浮遊液 ($5.6 \times 10^3/ml$) にツウィーン20を5,000倍の希釈倍数になるよう添加した後、本畑に生育中のタマネギ個体に噴霧接種した。

5. 細菌学的性質

富永²⁴⁾, Dye⁴⁾, 細菌学実習提要²⁷⁾および坂崎の新細菌培地学講座¹⁶⁾の諸方法に準じた。フェニルアラニンデアミナーゼおよびグルコン酸塩の酸化試験にはShaw and Clark¹⁸⁾の変法を用いた。DNase試験にはDNA培地(栄研)を供試し、つぎのように行なった。すなわち、本培地平板上に菌体を1白金耳移植した後、25°Cで2日間培養した。その後、培地面に1.5N塩酸を滴下し、コロニー周囲に鮮明な透明帯が生じたものを陽性と判定した。エリスロマイシンに対する感受性試験は普通寒天培地(栄研)にエリスロマイシンを $50\mu g/ml$ になるよう添加した平板上に細菌浮遊液を1白金耳移植し、コロニーの生育を観察した。ジャガイモ黒脚症状の発現試験は1菌株あたりそれぞれ10個の種イモに菌体を穿刺接種した後、これを本畑に植え付け(1980年5月16日)その後黒脚症状の発現を観察した。ジャガイモ塊茎腐敗はLelliottら¹¹⁾の方法を用いた。

試験はいずれも25°Cで行なったが、ゼラチン液化能は20°Cで試験した。

実験結果および考察

1. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* の分離と同定

立毛中に腐敗症状を示すタマネギ個体および腐敗症状を示す花基から5菌株の細菌(E1, E2, E3, E4およびE5)を分離した。本細菌をタマネギに接種した場合、軟腐病にきわめて類似した腐敗症状が発現した(図版1および2)。したがって、分離細菌はタマネギ軟腐病細菌である可能性が大きい。そこで、これらの細菌の分類学的所属を明らかにするためにその細菌学的諸性質を検討した。

この結果を表1に示した。本細菌は周毛をもつ運動性の桿菌で、グラム陰性、芽胞を形成せず、グルコースを発酵的に分解、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、アドニット、ズルシットおよびメレズイトースから酸を生産せず、グルタミン酸、アルギニン、リジンおよびオルニチンの各アミノ酸脱炭酸酵素活性をもたず、植物組織を腐敗させた。したがって、Bergey's manual 8版¹²⁾によれば、本細菌は*Erwinia*属に所属するものと考えられる。

試験した87項目の細菌学的性質のうち、84項目の性質を*E. carotovora*に関するDye⁴⁾またはLelliott¹²⁾の記載と比較した。その結果、77項目の性質が彼らの記載に一致した。このように、タマネギから分離した*Erwinia*属細菌は*E. carotovora*に強い類似性を示した。

前記の*E. carotovora*に関する記載に一致しない性質の中に、 α -メチルグルコシドからの酸生産およびサッカロースからの還元物質生産があるが、Graham⁷⁾はこれらの性質およびマルトースからの酸生産能を*E. carotovora*とそのvarietyの*atroseptica*とを区別する有用な性質とした。すなわち、var. *atroseptica*に分類される菌株の大部分はマルトースおよび α -メチルグルコシドから酸を生産し、サッカロースから還元物質を生産するという。実際、タマネギから分離した*Erwinia*属細菌の中にこのような性質をもつ菌株がある。一方、谷井²³⁾はマルトースおよび α -メチルグルコシドから酸を生産し、サッカロースから還元物質を生産する軟腐病細菌には塊茎接種によりジャガイモ黒脚病をひきおこす能力を認めなかった。また、谷井²³⁾によれば、軟腐病細菌はすべて36°Cで



A



B

3

図版 1 タマネギ軟腐病の自然感染病徴

葉基部が軟化腐敗し、葉は下垂する

図版 2 分離菌株 E1 を噴霧接種したときに生じた病徴

図版 3 PFD 培地上に形成されたコロニー周囲の陥没

A : 分離菌株 E1, B : 分離菌株 P8011

生育するが, *subsp. atroseptica* は生育できないという。本研究では, タマネギから分離した *Erwinia* 属細菌はすべてジャガイモに黒脚症状を発現せず, また 36°C で生育した。したがって, Graham の分類と一致しない点もあるが, 本細菌は *var. atroseptica* に該当しないものと考えられる。さらに, 植物組織の軟化腐敗をひきおこす *Erwinia* 属細菌には *E. chrysanthemi* があるが, 本細菌はラクトースから酸を生産しない^{4,7,21)}か, または遅延的に生産し^{1,4,6,7,12,17,25)}, マロン酸^{3,4,12,17,25)}および酒石酸^{4,12,25)}を利用し, インドールを生産^{7,12,17,25)}, レシチナーゼ^{7,12,25)}およびホスファターゼ活性^{3,7,12,17,25)}をもち, さらにエリスロマイシンに感受性である^{3,7)}とされており, タマネギの *Erwinia* 属細菌と明らかに区別される。以上の点から, タマネギか

ら分離した *Erwinia* 属細菌をタマネギ軟腐病細菌 (*E. carotovora subsp. carotovora*) とした。

2. PFD 培地上における *Erwinia carotovora subsp. carotovora* コロニーの特徴

E. carotovora subsp. carotovora と同定した分離 5 菌株を PFD 培地表面に画線し, 25°C で培養した場合, いずれも 2 日後に中心部が橙黄色でその周縁が黄色の特徴あるコロニーを形成し, コロニー周縁の培地表面は深く陥没した (図版 3 A)。

一方, PFD 培地に形成される軟腐病細菌コロニー数は King らの B 培地¹⁰⁾のそれとほぼ同じであった (表 2) ので, PFD 培地により軟腐病細菌のコロニー形成が抑制されることはないものと考えられる。

ペクチン質含有培地はこれまで多数考案され,

軟腐病細菌などペクチン質を溶解する細菌の分離^{2,9,13,19)}, 計数^{9,14,15)}および鑑別⁸⁾に用いられてきた。本研究では、軟腐病細菌により PFD 培地上に生じるコロニー周縁の陥没現象およびコロニーの特徴を指標として、PFD 培地をタマネギ軟腐病の診断に用いることができるかどうかを検討した。

表2 PFDおよびKingらのB培地上における *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* のコロニー形成

	E 1		E 4	
	PFD	King B	PFD	King B
1	41	48	30	33
2	35	45	30	40
3	59	45	32	32
平均	45	46	31	35

表中の数字は1平板培地上に形成されたコロニーの数(0.2mlあたり)

3. PFD 培地による細菌の選別とその同定

タマネギ腐敗症状株から PFD 培地表面を陥没させ、中心部が橙黄色でその周縁が黄色のコロニーを形成する細菌を55菌株分離し、その細菌学的諸性質を検討した(表3)。これらの細菌はいずれ

表3 PFD 培地により腐敗タマネギから分離した細菌の諸性質

	形態	分離源			
		立毛中の腐敗症状株			腐敗敗球
	短桿	短桿	短桿	短桿	
	周毛	周毛	周毛	周毛	
O/F試験	F	F	F	F	
グラム染色	-	-	-	-	
黄色色素	-	-	-	-	
ゼラチン溶解	+	+	+	+	
ジャガイモ塊茎腐敗	+	+	+	+	
36°C生育	+	+	+	+	
サッカロースからの還元物質	-	+	+	-	
酸生産	ラクトース	+	+	+	+
	α-メチルグルコシド	-	-	+	-
	トレハロース	+	+	+	+
	マルトース	+	+	+	+
該当菌株数	12	24	15	4	
計		51		4	

も周毛をもつ運動性の桿菌であり、グラム陰性、グルコースを発酵的に分解、ジャガイモ塊茎を軟化腐敗させた。したがって、これらの分離細菌は *Erwinia* 属細菌と考えられる。また、分離細菌は植物組織を軟化腐敗し、ゼラチンを溶解し、黄色色素を生産しないので、*E.carotovora* と考えられる。さらに、ラクトースから24時間以内に酸を生産し、トレハロースから酸を生産することから *E.chrysanthemi* と区別される⁷⁾。一方、α-メチルグルコシドからの酸生産能およびサッカロースからの還元物質の生産能に関して、分離菌株によりその性質は異なるが、いずれの菌株も36°Cで生育することから、分離細菌はすべて *E.carotovora* subsp. *carotovora* と考えられる。

4. 結論

E.carotovora subsp. *carotovora* と同定したタマネギからの分離細菌は PFD 培地上に中心部が橙黄色でその周縁が黄色のコロニーを形成し、そのコロニー周縁の培地表面は深く陥没した。PFD 培地を用いたタマネギ軟腐病診断法の実用性を確認するため、本培地を用いて、培地表面を陥没させ、中心部が橙黄色で周縁が黄色のコロニーを形成する細菌を多数選別し、この細菌の同定を行なった。その結果、これらの細菌はすべて *E.carotovora* subsp. *carotovora* と考えられた。

一方、立毛中のタマネギ個体および貯蔵タマネギ球の腐敗部から PFD 培地表面を陥没させ、青から黄緑色のコロニーを形成する細菌が分離されることがあった。本細菌はいずれも極毛をもつ桿状細菌であり、グラム陰性、グルコースを酸化的に分解、芽胞を形成せず、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ活性は分離菌株により異なるが、陽性を示す菌株が多かった。これらの細菌はいずれも *Pseudomonas* 属細菌と考えられる。本細菌の PFD 培地上のコロニーはコロニーの色調および陥没の形状から明らかに軟腐病細菌のコロニーと区別された(図版3AおよびB)。Cuppels and Kelman²⁾はペクチン質含有培地の1つである CVP 培地を用いた場合、ペクチン質溶解性の *Erwinia* spp.のコロニーを培地上に形成された陥没の形状およびコロニーの形態から *Pseudomonas* spp.のそれと区別できるとしている。

本報に記述した方法によって、PFD 培地上に中心部が橙黄色で周縁が黄色のコロニーを形成し、

そのコロニー周縁の培地表面を陥没させる細菌が腐敗タマネギから分離された場合、そのタマネギ腐敗は軟腐病であると診断する。

謝辞 本稿の御校閲を賜った北見農業試験場場長馬場徹代博士ならびに病虫予察科科長斉藤泉博士、また有益な御助言をいただいた宮島邦之研究員に深く謝意を表する。

引用文献

- 1) Burkholder, W.H.; McFadden, L.A.; Dimock, A.W. "A bacterial blight of chrysanthemums". *Phytopathology*. **43**, 522-526 (1953).
- 2) Cuppels, D.; Kelman, A. "Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue". *Phytopathology*. **64**, 468-475 (1974).
- 3) Dickey, R.S. "Erwinia chrysanthemi: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other Erwinia species". *Phytopathology*. **69**, 324-329 (1979).
- 4) Dyd, D.W. "A taxonomic study of the genus Erwinia II. The "carotovora" group". *N.Z.Jl. Sci.* **12**, 81-97 (1969).
- 5) 舟山広治, 成田武四. "玉葱の細菌性腐敗病の病原細菌について". *日植病報*. **19**, 172 (1955). (講要).
- 6) Goto, M. "Bacterial foot rot of rice caused by a strain of Erwinia chrysanthemi". *Phytopathology*. **69**, 213-216 (1979).
- 7) Graham, D.C. "Identification of soft rot coliform bacteria". In *Proc. Third Int. Conf. Plant Path. Bact.*, Wageningen, 14-21 April 1971, p. 273-279.
- 8) Hildebrand, D.C. "Pectate and pectin gels for differentiation of Pseudomonas sp. and other bacterial plant pathogens". *Phytopathology*. **61**, 1430-1436 (1971).
- 9) King, A.D.; Vaughn, R.H. "Media for detecting pectolytic gram-negative bacteria associated with the softening of cucumbers, olives, and other plant tissues". *Food Sci.* **26**, 635-643 (1961).
- 10) King, E.O.; Ward, M.K.; Raney, D.E. "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin". *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301-307 (1954).
- 11) Lelliott, R.A.; Billing, E.; Hayward, A.C. "A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads". *J. appl. Bact.* **29**, 470-489 (1966).
- 12) Lelliott, R.A. "Genus Erwinia in Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed.", The Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA, 1974, p. 332-340.
- 13) Meneley, J.C.; Stanghellini, M.E. "Isolation of soft-rot Erwinia spp. from agricultural soil using an enrichment technique". *Phytopathology*. **66**, 367-370 (1976).
- 14) Pérombelon, M.C.M. "A semi-selective medium for estimating population densities of pectolytic Erwinia spp. in soil and in plant material". *Potato Res.* **14**, 158-160 (1971).
- 15) Pérombelon, M.C.M. "A quantal method for determining numbers of Erwinia carotovora var. carotovora and E. carotovora var. atroseptica in soils and plant material". *J. appl. Bact.* **34**, 793-798 (1971).
- 16) 坂崎利一. "新細菌培地学講座—上—". 近代出版, 東京, 1978, 419p.
- 17) Schaad, N.W.; Brenner, D. "A bacterial wilt and root rot of sweet potato caused by Erwinia chrysanthemi". *Phytopathology*. **67**, 302-308 (1977).
- 18) Shaw, C.; Clarke, P.H. "Biochemical classification of Proteus and Providence cultures". *J. gen. Microbiol.* **13**, 155-161 (1955).
- 19) Stewart, D.J. "A selective-diagnostic medium for the isolation of pectinolytic organisms in the Enterobacteriaceae". *Nature, Lon.* **195**, 1023 (1962).
- 20) 田部井英夫, 吉田孝二. "玉葱の細菌性腐敗病(心腐病)菌に就いて". *日植病報*. **16**, 84 (1952). (講要).
- 21) 谷井昭夫, 馬場徹代. "北海道における植物細菌病 II Erwinia chrysanthemi Burkholder et al. (Pectobacterium carotovorum var. chrysanthemi) によるジャガイモの萎凋細菌病". *北海道立農試集報*. **24**, 1-10 (1971).
- 22) 谷井昭夫, 馬場徹代. "タマネギの腐敗に關する病菌について". *日植病報*. **38**, 198 (1972). (講要).
- 23) 谷井昭夫. "ジャガイモの黒脚病を起因する細菌と簡易同定法". *日植病報*. **46**, 401 (1980). (講要).
- 24) 富永時任. "日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究. II 日本における牧草および飼料作物細菌病の病原学的研究". *農技研報*. **C25**, 216 (1971).

- 25) 富永時任, 小笠原賢亮. “ジャガイモ萎ちょう細菌病の新潟における発生”. 日植病報. **45**, 474-477 (1979).
- 26) 土屋行夫, 大畑貫一, 白田 昭. “レタス腐敗病原細菌 *Pseudomonas cichorii*, *P. marginalis*, *p. viridiflava* の各種作物に対する病原性”. 農技研報. **C34**, 51-73 (1980).
- 27) 東京大学伝染病研究所学友会. “細菌学実習提要”. 丸善, 1958.

A Simple Diagnosis of Bacterial Soft Rot of Onion by Pectate Medium

Tamio TANAKA* and Kazuo TSUBOKI**

Summary

A simple method using a detective medium was studied to diagnose bacterial soft rot of onion caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. A medium (PED) used in this study was composed of two basal media: medium A (pH 6.9-7.1) contained 1,000ml of deionized water (heated to near boiling), 40ml of 0.2% bromthymol blue solution, 6ml of 10% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 22g of polygalacturonic acid sodium salt (Sigma); medium B (pH 7.2) had 20g of peptone, 1.5g of K_2HPO_4 , 0.7g of MgSO_4 , 10g of glycerin, 5ml of 0.1% crystal violet solution, 4g of agar and 100ml of deionized water. After the basal media were sterilized separately in an autoclave (121°C, 15 min), they were mixed immediately and poured into Petri dishes. On the PED medium, a colony of *E. carotovora* subsp. *carotovora* was composed of an orange-yellow center and yellow margin. Colonies of *E. carotovora* subsp. *carotovora* formed deep pits in the PFD medium and were surrounded by a green to yellow colored zone as the result of the decrease in pH. Colony formation of *E. carotovora* subsp. *carotovora* on PFD medium was equal to that on King's B medium. In the growing and harvest season many bacteria were isolated from diseased onion plants and bulbs and formed pits and characteristic colonies with the orange-yellow center and yellow margin on PFD medium. Based on the bacteriological characteristics, all isolates were identified as *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Color and pit formation of bacterial colony of PFD medium were useful for diagnosis of bacterial soft rot of onion.

* Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, Hokkaido, 099-14, Japan.

** Hokkaido prefectural Tokachi Agricultural Experiment Station, Memuro, Hokkaido, 082, Japan.