

タマネギ軟腐病細菌のテンプレートファージの諸性質

田中 民夫* 齋藤 泉**

罹病タマネギから分離した軟腐病細菌60菌株から一つの溶原菌E 816を検出した。本細菌の溶原性は遺伝的に安定した性質であり、この溶原菌が生産したテンプレートファージは感受性菌を溶原化した。E 816菌ファージの溶菌斑は15, 20および25℃の各温度条件下で形成されたが、30℃では形成されなかった。また、本ファージの溶菌斑は小型であり、その直径は上層寒天に添加する感受性菌の密度により変化した。一方、E 816ファージは80℃、10分間の熱処理で不活化されたが、クロロホルム耐性であった。一段増殖実験の結果、感染菌体内におけるファージの潜伏期は110~120分、感染菌の平均ファージ放出量は16~18であった。E 816菌ファージは73×77nmの多面体頭部と29×108nmの収縮性尾部をもち、尾部で感受性菌の細胞表面に吸着した。アクリジンオレンジ染色および後処理したE 816菌ファージ核酸の紫外線照射下における蛍光色およびDNase分解性から本ファージは2本鎖DNAを含有すると考えられた。

緒 言

Erwinia carotovora subsp. *carotovora*は多くの作物に軟腐病を引き起こすが、Coonsら¹⁾は軟腐症状を示したニンジンの組織中に*E. carotovora* subsp. *carotovora*の生育を抑制する伝達性の溶菌因子(バクテリオファージ)が存在することをはじめて報告した。その後、本細菌のバクテリオファージはいろいろな野菜の腐敗組織から分離されることが明かとなり^{2, 6, 10, 14, 15)}、これらのファージの形態が電子顕微鏡を用いて観察された^{3, 14, 16)}。また、*E. carotovora* subsp. *carotovora*によってもたらされる作物組織の腐敗をファージを用いて防止しようとする研究^{4, 7, 8)}、ファージを利用した土壌中の*E. carotovora* subsp. *carotovora*の検出法¹⁶⁾、定量法¹¹⁾に関する研究およびファージ型をマーカーとした作物組織内における*E. carotovora* subsp. *carotovora*系統間の競合に関する研究が行われた¹⁷⁾。しかし、これまでの*E. carotovora* subsp. *carotovora*のファージに関する諸報告はその多くがいわゆるビルレントファージ(virulent phage)に関するものであり、本細菌に寄生するテンプレートファージ

(temperate phage)に関する報告は少なく^{5, 9, 19)}、またタマネギ軟腐病細菌(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)に寄生するテンプレートファージの存否およびその諸性質についてはこれまで明らかではなかった。

本報告では、タマネギ軟腐病細菌*E. carotovora* subsp. *carotovora*の溶原菌を検出し、本細菌が生産するテンプレートファージの諸性質を調べたのでその結果を報告する。

実験材料および方法

1. 溶原菌の検索

主に北海道網走支庁管内で採取した軟腐病罹病タマネギから分離した60菌株の*E. carotovora* subsp. *carotovora*¹²⁾をテンプレートファージ(以下、ファージと略記)の生産菌および指示菌として溶原菌の検索に供試した。直径9 cmのペトリ皿に入れた5 mlのλ培地¹⁸⁾中で供試細菌60菌株をそれぞれ25℃で3時間静置培養した。50cmの高さからこの培養液に紫外線(殺菌灯, GL-15)を40秒間照射してファージ生産の誘発処理を行った後、継続してこれらの培養液を暗黒中で3時間培養した。その後、これらの培養液にクロロホルムを添加してよく攪拌した後、ファージの被検液として供試した。

ファージ被検液を白金耳でλ寒天培地¹⁸⁾平板上に静置した後、被検液が培地に吸収されるのを待って、この培地平板に指示菌を添加した約2.5mlのλ上層寒天培地¹⁸⁾

1995年11月30日受理

*北海道立北見農業試験場、099-14 常呂郡訓子府町
(現北海道立中央農業試験場、069-13 夕張郡長沼町)

**同上(現北海三共株式会社、061-11 札幌郡広島町)

を流し込んだ。これらの培地平板を25℃で24時間培養した後、溶菌斑形成の有無を観察した。なお、1枚の培地平板に10菌株のファージ被検液を静置して溶原菌検索の効率化を図った。

2. 溶原性の遺伝性および溶原化

溶原菌である *E. carotovora* subsp. *carotovora* E816 (以下、E816と略記) の単一集落3個を分離し、それぞれ普通寒天培地平板上で画線培養を繰り返して10代継代培養を行った。継代培養後の各集落のファージ生産性およびそのファージの宿主域を継代培養前の集落と比較した。

E816菌ファージによる感受性菌 *E. carotovora* subsp. *carotovora* E8125 (以下、E8125と略記) の溶原化が生じるか否かを次の方法で検討した。感受性菌E8125をλ培地中で24時間培養した後(25℃)、この培養液をλ培地で希釈して菌密度を1mlあたり 10^2 個とした。この細菌浮遊液2mlとファージ液(10^7 pfu/ml) 2mlを混合し、20℃で培養した。経時的に培養液中の細菌をλ寒天培地平板上に画線培養した。平板上に生育した単一集落5個を分離し、それぞれ5代継代培養を行った後、各集落のファージ生産性の有無および生産ファージの宿主域を調査した。

3. 溶菌斑形成およびファージ活性

1) 溶菌斑形成と培養温度 溶解したλ上層寒天培地2.5mlを約50℃に保温し、これにE816菌ファージ液0.1mlと感受性菌E8125の菌体浮遊液0.1mlを添加、混合した後、λ寒天培地平板上にそれぞれ流し込んだ(以下、本法を重層法と称する)。これらの平板を15, 20, 25および30℃で24時間培養し、溶菌斑形成の有無を観察した。

2) 溶菌斑形成と感受性菌密度 ファージ感受性菌E8125の菌体浮遊液をλ培地で倍数希釈して菌密度を 1.21×10^{10} cfu/mlから 1.9×10^8 cfu/mlまでそれぞれ調整した後、重層法を実施して、菌密度別に形成される溶菌斑の直径を計測した。

3) 耐熱性 λ培地を添加してファージ密度を705 pfu/mlに調整したファージ液1mlを小型試験管の中に入れ、種々の温度条件下にある浴槽中で10分間熱処理した。その後、重層法を実施してファージ数を計数した。

4) クロロホルム耐性 ファージ液5mlにクロロホルム0.5mlを添加して振とうした後、経時的にファージ液を採取し、重層法を実施してファージ数を計数した。

4. ファージの精製

溶解したλ上層寒天培地3mlを約50℃に保温し、これにE816菌ファージ液(6.9×10^6 pfu/ml) 0.1mlと感受性菌E8125菌体浮遊液(10^8 cfu/ml) 0.1mlを添加、

混合した後、100枚のλ寒天培地平板上にそれぞれ流し込んだ。これらの平板を20℃で16時間培養した後、上層寒天を採取し、これに100mlの脱イオン水を加えてミキサーで静かに攪拌した。この液を5,000rpm、10分間遠心分離にかけて上清を採取し、この上清をハイフロスーパーセルおよびメンブランフィルター(孔径 $0.2 \mu\text{m}$)でろ過し、ろ液を粗精製ファージ試料(1.06×10^{11} pfu/ml)として保存した。

粗精製ファージ液50mlにDNaseおよびRNaseをそれぞれ30 μg/mlになるように添加し、37℃で1時間処理した。このファージ液を10,000g(36,000rpm)で1時間遠心分離にかけて沈殿物を回収し、この沈殿物をリン酸緩衝液(pH7.2) 2mlに溶解した後、さらに1,824g(4,000rpm)で15分間遠心分離を行って上清を採取した。これらの遠心分離操作をもう一度反復し、最終沈殿物をリン酸緩衝液0.5mlに溶解し、精製ファージ試料として保存した(ファージ密度: 1.5×10^{13} pfu/ml)。

5. 一段増殖実験

普通寒天斜面培地で25℃、24時間培養したE8125菌体を10mlのλ培地に浮遊させ、この1mlを10mlのλ培地に添加して5時間培養(25℃)した。この培養液を5,000rpmで10分間、遠心分離にかけて菌体を採取し、これに5mlの生理食塩水を添加して 2.27×10^9 cfu/mlの菌体浮遊液に調整した。この浮遊液2mlとE816菌ファージ液(5.47×10^7 pfu/ml) 2mlとを混合し、22℃に10分間静置してファージ粒子を菌体に吸着させた。この混合液を5,000rpmで10分間、遠心分離にかけた後(4℃)、上清をすて上清に存在する未吸着ファージを除去した。沈殿した菌体に2mlのλ培地を添加して浮遊させ、さらにこの菌体浮遊液をλ培地で 10^4 倍に希釈した。その後、この菌体浮遊液10mlを22℃で培養し、経時的に培養液を採取し、重層法により培養液中のファージ数を計数した。なお、未吸着ファージによって生じた溶菌斑数を求めるため、培養開始直後に別途採取した培養液にクロロホルムを滴下してけん濁し、重層法を実施した。平均ファージ放出量は次式により算出した。

ファージ感染を受けファージを生産した細菌数=培養開始直後の溶菌斑数-未吸着ファージによって生じた溶菌斑数

$$\text{平均ファージ放出量} = (A - B) \div C$$

A: 定常期の溶菌斑数

B: 培養開始直後の未吸着ファージによって生じた溶菌斑数

C: ファージ感染を受けファージを生産した細菌数
同一の実験を2回実施した。

6. 電子顕微鏡観察

粗精製E 816菌ファージ液 (6.6×10^{10} pfu/ml) とリンタングステン酸2%水溶液 (pH 7.0) を等量混合した被検試料を支持膜を張ったグリット上に置き、余分の液をろ紙で吸い取り、室温で乾燥した。この試料をJEM-100CX型電子顕微鏡 (日本電子株式会社) で観察した。

E 816菌ファージ粒子の細菌細胞への吸着を次のように観察した。すなわち、ペプトン水 1 ml に浮遊させた E 8125菌 (10^8 cfu/ml) と粗精製 E 816ファージ液 (6.6×10^{10} pfu/ml) 1 ml を混合し、室温で20分間静置した。その後、遠心分離を行って (3,000rpm, 10分間) 菌体を採取し、これに0.5mlのペプトン水を加えて被検試料とした。この試料を同様の方法で電子顕微鏡観察した。

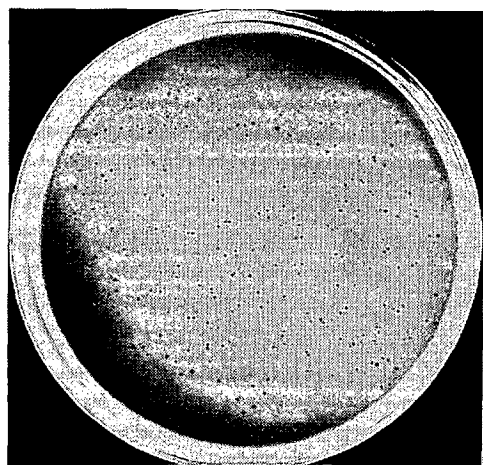
7. ファージ核酸の種類

カバーガラスに塗布した精製ファージ液を温風乾燥し、カルノア液で5分間固定した。この試料を無水エタノールで洗浄した後、温風乾燥し、以下、Bradleyの方法¹⁾に準拠してファージ核酸のアクリジンオレンジ染色、後処理およびDNase, RNase処理を行った。

結 果

1. 溶原菌の検索および溶原性の遺伝性と溶原化

タマネギ軟腐病細菌 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) 60菌株を指示菌として、これら60菌株の培養液中のファージ活性を検索した結果、E 816菌株の培養液にのみファージ活性を認めた。本ファージに感受性を示す菌株は供試した60菌株の中に5菌株存在した。E 816菌ファージをこのファージに感受性を示すE 8125菌株と混合培養する



第1図 タマネギ軟腐病細菌のテンプレートファージの溶菌斑20℃、48時間培養

と、培地上に溶菌斑が形成された (第1図)。しかし、ファージ生産菌株であるE 816菌株は自己の生産するファージに感受性を示さなかった。

E 816菌株の単一集落を10代継代培養した結果、E 816菌株はファージ生産性を保持しており、継代培養前後におけるE 816菌株が生産するファージの宿主域は一致した (第1表)。

第1表 継代培養前後におけるファージ生産性菌株E 816のファージ生産性とそのファージの宿主域

指示菌	継代培養前 の生産ファージ	10代継代培養後の生産ファージ		
		集落1	集落2	集落3
E 8125	+	+	+	+
E 8126	+	+	+	+
E 8127	+	+	+	+
E 8128	-	-	-	-
E 8130	+	+	+	+
E 8131	+	+	+	+
E 8132	-	-	-	-

+: 溶菌斑形成、-: 溶菌斑形成なし

E 816菌ファージに感受性を示すE 8125菌株にはファージ生産性は認められなかった。しかし、このE 8125菌株とE 816菌ファージ液を混合培養した結果、ファージ生産性を示すようになったE 8125菌株の集落が認められ、これらの集落が生産するファージの宿主域はE 816菌ファージの宿主域と一致した (第2表)。

第2表 E 816菌ファージと感受性菌E 8125を混合培養した後の感受性菌のファージ生産性の獲得とそのファージの宿主域

指示菌	ファージと混合培養した後の感受性菌の集落					混合培養前の集落
	1	2	3	4	5	
E 8125	-	+	+	+	-	-
E 8126	-	+	+	+	-	-
E 8127	-	+	+	+	-	-
E 8128	-	-	-	-	-	-
E 8130	-	+	+	+	-	-
E 8131	-	+	+	+	-	-
E 8132	-	-	-	-	-	-

+: 溶菌斑形成、-: 溶菌斑形成なし

2. 溶菌斑形成とファージ活性に影響する諸要因

1) 溶菌斑形成と培養温度 溶菌斑の形成は15から25℃の培養温度で認められたが、30℃では認められなかった (第3表)。

2) 溶菌斑形成と感受性菌の密度重層法において供試した感受性菌の密度が増加するにしたがって、形成される溶菌斑の直径は減少した (第4表)。

3) 耐熱性 ファージ液の処理温度が60℃以下では形成される溶菌斑数はわずかに減少しただけであったが、これより処理温度が上昇するにしたがって、溶菌斑数は

第3表 溶菌斑形成におよぼす培養温度の影響

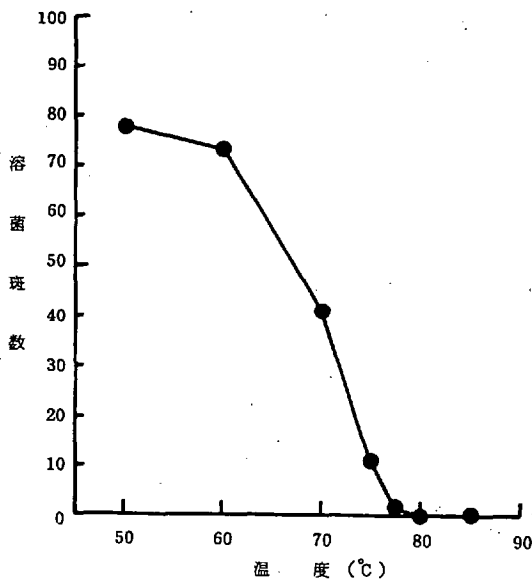
培養温度	溶菌斑	
	形成数 ¹⁾	直径 ²⁾
15℃	110	0.61±0.02
20	114	1.04±0.03
25	55	1.06±0.02
30	0	0

- 1) ペトリ皿2枚の平均値
- 2) 直径 (mm) は溶菌斑50個の平均値±標準誤差で表示した。

第4表 溶菌斑の大きさにおよぼす感受性菌密度の影響

感受性菌密度 ¹⁾	直径 ²⁾
1.90×10^8	1.21±0.02
3.80×10^8	1.08±0.01
7.60×10^8	1.87±0.02
1.52×10^9	0.62±0.01
3.03×10^9	0.5 以下
6.05×10^9	0.5 以下
1.21×10^{10}	0.5 以下

- 1) 1mlあたりの生菌数
- 2) 直径 (mm) は溶菌斑50個の平均値±標準誤差で表示した。



第2図 耐熱性

溶菌斑数はペトリ皿2枚の平均値

顕著に減少し、80℃、10分間の熱処理では溶菌斑の形成はまったく認められなかった(第2図)。

4) クロロホルム耐性 フェージ液をクロロホルムで処理した後、5時間経過してもフェージ活性の低下は認められなかった(第5表)。

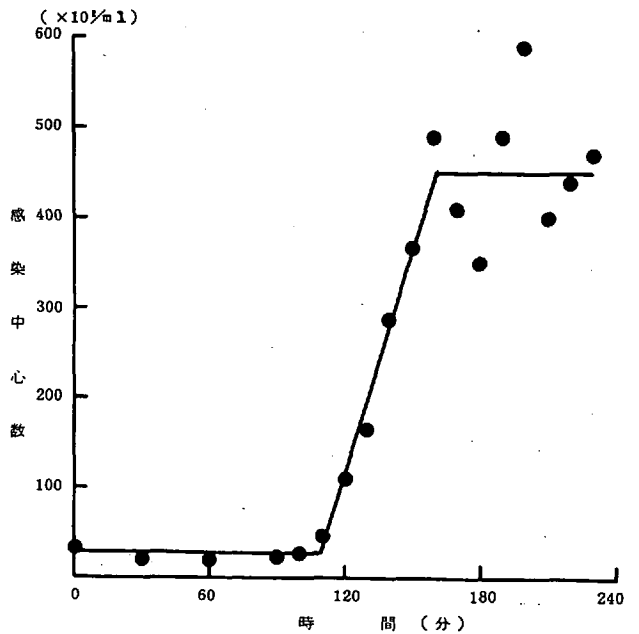
第5表 クロロホルム処理がフェージ活性におよぼす影響

処理後の経過時間	溶菌斑数 ¹⁾
0 hr	72.5
1	63.0
3	74.0
5	96.5

1) ペトリ皿2枚の平均値

3. 一段増殖実験

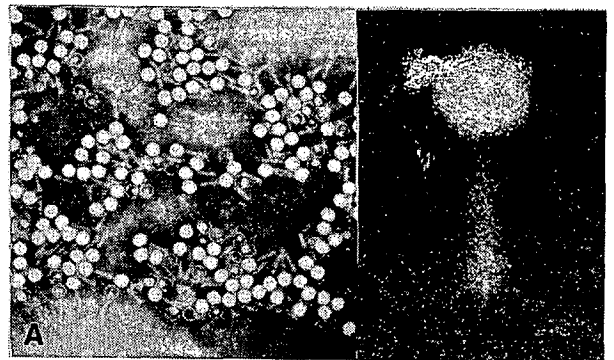
感染菌体内におけるフェージの潜伏期は110から120分であり、感染菌の平均フェージ放出量は16から18であった(第3図)。



第3図 一段増殖

4. フェージの形態と菌体への吸着

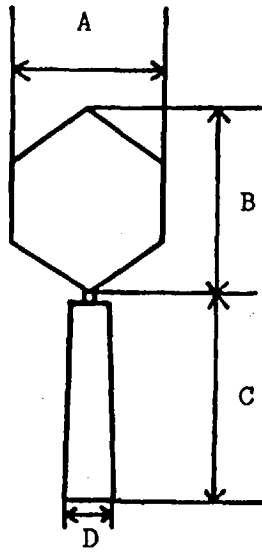
電子顕微鏡による観察の結果、E816菌フェージは多面体の頭部と収縮性の尾部から構成されていた(第4図)。



第4図 タマネギ軟腐病細菌のテンプレートフェージの形態

A : PTAで陰性染色、横棒100nm
B : 拡大写真、横棒100nm

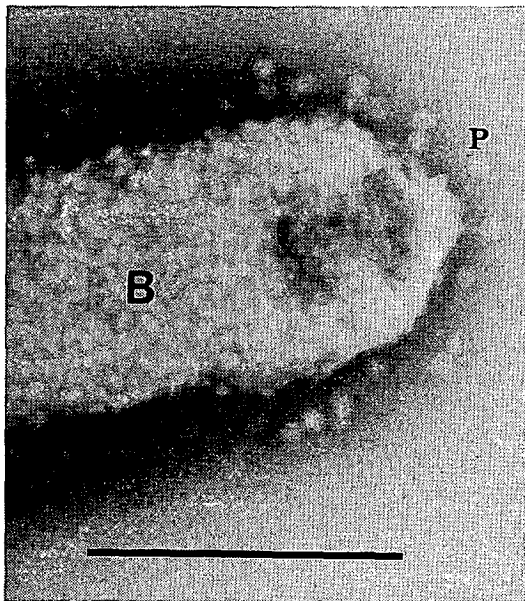
本ファージの部位別の長さを第5図に示した。本ファージは感受性菌E 8125菌株の菌体表面に吸着するのが観察された(第6図)。



第5図 テンペレクトファージの形態模式図

- A : 73±0.41nm
- B : 77±0.47nm
- C : 108±0.53nm
- D : 29±0.37nm

部位別の長さはファージ粒子65個の平均値±標準誤差で表示した。



第6図 タマネギ軟腐病細菌のテンペレクトファージの細菌細胞への吸着

- P : ファージ粒子
- B : 細菌細胞、PTAで陰性染色
- 横棒は1 μm

5. ファージ核酸の種類

固定したE 816菌ファージ試料をアクリジンオレンジ

溶液で処理した場合、紫外線を照射することによりファージ試料が赤色の蛍光を発するのが観察された。このファージ試料をNa₂HPO₄溶液で処理すると、ファージ試料が発する蛍光は黄緑色に変化した。さらにMoO₃溶液で処理しても、この黄緑色の蛍光は退色しなかった。一方、このファージ試料をMoO₃溶液とは別に酒石酸溶液中に浸漬すると、ファージ試料が発する蛍光は黄緑色からオレンジ色に変化した。

固定したE 816菌ファージ試料をRNaseで処理し、同様の染色処理を行った場合、蛍光の発生を認めたが、DNase処理では蛍光の発生は認められなかった(第6表、第6表 アクリジンオレンジ染色および後処理したファージ核酸が紫外線照射下において発する蛍光色と核酸分解酵素に対する分解性

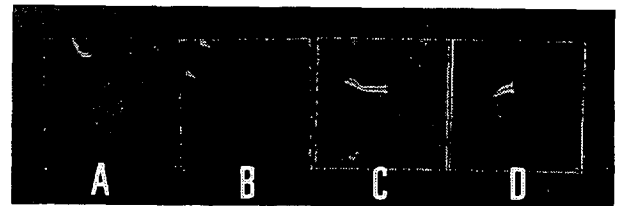
核酸 ¹⁾	アクリジンオレンジ染色後の処理			核酸分解酵素	
	Na ₂ HPO ₄	MoO ₃	酒石酸	RNase	DNase
被検ファージ	黄緑	黄緑	オレンジ	- ²⁾	+
2-DNA	緑	緑	オレンジ	-	+
2-RNA	緑	緑・退色	赤	-	-
1-DNA	赤	淡緑	淡緑	-	+
1-RNA	赤	淡赤	淡赤	+	-

1) 1-: 1本鎖、2-: 2本鎖

2) +: 分解、-: 非分解

3) DNAおよびRNAの反応結果はBradley (1966)に基づく。

第7図)。すなわち、ファージ核酸をアクリジンオレンジ



第7図 紫外線照射下における蛍光発生の有無より見たファージ核酸の核酸分解酵素に対する分解性

A : アクリジンオレンジ染色後、0.15MNa₂HPO₄+10% (W/V) CH₃COOH (pH 5.5) 中で2時間処理

B : DNaseを0.02% (W/V) 含有した上記の溶液中で37℃、2時間処理

C : アクリジンオレンジ染色後、変法McIlvaine緩衝液 (pH 3.8) 中で37℃、2時間処理

D : RNaseを0.1% (W/V) 含有した上記の緩衝液中で37℃、2時間処理

蛍光検査灯 (FI-31 S、東京光学機械株式会社) で紫外線を照射し、蛍光を観察した。

ジ染色後、後処理したときの蛍光色および核酸分解酵素に対する反応は2本鎖DNAの反応に一致した。

考 察

タマネギ軟腐病細菌 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*) 60菌株の中でE816菌株の培養液にのみ、ファージ活性が認められた。このファージ生産菌株E816は10代継代培養を行ってもファージ生産性を保持しており、しかも継代培養前後のE816菌株がそれぞれ生産するファージの宿主域は一致したところからE816菌株のファージ生産性は遺伝的に安定した性質であることが明らかになった。すなわち、E816菌株のファージ生産性は遺伝するところからE816菌株は溶原菌と見なされる。一方、ファージ生産性を示さない感受性菌とE816菌ファージとを混合培養することによりこの感受性菌はファージ生産性を獲得した。しかも、このファージの宿主域はE816菌ファージと一致したところからE816菌ファージは感受性菌を溶原化することが明らかになった。また、E816菌ファージは本ファージを生産するE816菌株に吸着したが¹³⁾、本ファージとE816菌株を混合培養しても溶菌斑の形成は認められなかった。すなわち、E816菌株は自己の生産するファージに免疫性 (immunity) を示した。これらの事実から軟腐病細菌E816菌株が生産するファージはビルレントファージではなくテンプレートファージであると見なされた。

タマネギ軟腐病細菌が生産するテンプレートファージE816菌ファージの諸性質を既報の軟腐病細菌のファージと比較した。軟腐病細菌のビルレントファージには、小型の溶菌斑^{6, 10, 16)}を形成するもの以外に、大型のもの¹⁵⁾も知られている。一方、E816菌ファージの溶菌斑の大きさは培養温度および感受性菌の密度によって変化したが、総じて小型であった。また、E816菌ファージは30℃で溶菌斑を形成しなかったが、30℃で溶菌斑を形成する軟腐病細菌のテンプレートファージも報告されている¹⁹⁾。E816菌ファージの耐熱性は軟腐病細菌のビルレントファージ¹⁵⁾と比較してより強い。そ菜類軟腐病菌のテンプレートファージはクロロホルムに耐性を示すとの報告があるが¹⁹⁾、E816菌ファージをクロロホルム処理してもファージ活性の低下が認められなかったところから本ファージもクロロホルム耐性と見なされる。既報のテンプレートファージ^{5, 9, 19)}と比較して、本ファージの潜伏期は110から120分であり長く、平均ファージ放出量は16から18と少なかった。

アクリジンオレンジ染色および後処理したE816菌ファージ核酸が紫外線照射下において発する蛍光色および核酸分解酵素に対する反応は2本鎖DNAの反応に一致するところから、E816菌ファージは2本鎖DNAを含有する

と考えられる¹⁾。さらに、本ファージは多面体の頭部と収縮性の尾部から構成されているところから、Bradley²⁾にしたがえば、ファージのA群に分類される。

タマネギ軟腐病細菌の溶原菌は稀にしか存在せず、その溶原性は遺伝的に安定した性質である。しかも、この溶原菌が生産するテンプレートファージの宿主域には特異性がある。したがって、溶原性およびファージの宿主域は一種の標識に成り得るところからタマネギ軟腐病の生態的研究に溶原菌を指標菌として利用することが可能と考えられる。

謝 辞 電子顕微鏡を使用するにあたり種々のご便宜とご指導をいただいた北海道立中央農業試験場特別研究員

玉田哲男博士 (現岡山大学) ならびに同病虫部 萩田孝志博士 (現北見農試病虫科長) に厚くお礼を申し上げます。また、本論文のご校閲をいただきました中央農業試験場病虫部長児玉不二雄博士ならびに同佐々木一男生化学部長に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Bradley, D. E. "The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids". *J. gen. Microbiol.* 44, 383-391 (1966).
- 2) Bradley, D. E. "Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins". *Bact. Rev.* 31, 230-314 (1967).
- 3) Chapman, G.; Hillier, J.; Johnson, F. H. "Observations on the bacteriophage of *Erwinia carotovora*". *J. Bact.* 61, 261-268 (1950).
- 4) Coons, G. H.; Kotila, J. E. "The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens". *Phytopathology*. 15, 357-370 (1925).
- 5) Grigoryan, Yu. A.; Ruban, V. I.; Kishko, Ya. G. "The features of *Erwinia carotovora* temperate phage E. 105". *Mikrobiologicheskii Zhurnal*. 44, 28-33 (1982) (*Rev. Plant Pathology* 62, 2, 1983).
- 6) Matsumoto, T.; Sawada, Y. "Bacteriophage specific for *Bacillus aroideae*". *Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa* 28, 247-256 (1938).
- 7) Matsumoto, T. "Phage-produced resistant strains of *Bacillus aroideae* III. Culture in soils and host plants". *Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa* 31, 145-154 (1941).
- 8) 三宅市朗, 濱田正實. "「ニンジン」軟腐病細菌 *Bacillus carotovorus* Jones bacteriophage に関する研究 (続報 1)". *日植病報*. 16, 181 (1952).

- 9) 仲谷房治. 津山博之.“そ菜類軟腐病菌の生産するファージについて”. 日植病報. 40, 202(1974).
- 10) 塩見敏樹. 藤井 溥.“野菜軟腐病細菌に寄生するファージについて”. 日植病報. 38, 199(1972).
- 11) Suzuki, Y.; Togashi, J. “Estimating the number of soft rot bacteria, *Erwinia aroideae*, in soil by bacteriophage”. *Phytopath. Z.* 93, 137-147(1978).
- 12) 田中民夫. 坪木和男.“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”. 北海道立農試集報. 48, 32-39(1982).
- 13) 田中民夫. 未発表.
- 14) 寺田正中ら.“Alkalescens Dispar No.5 並びに植物寄生病原細菌を宿主とする諸種細菌性ウィールスの電子顕微鏡的研究”. 電子顕微鏡. 3, 182-187(1954).
- 15) 富樫二郎. 鈴木義久.“軟腐病菌のファージの分離と2・3の性質”. 日植病報. 38, 199(1972).
- 16) 富樫二郎.“ファージによる土壌中の軟腐病菌の検出法”. 山形大学紀要(農学). 7, 347-366(1976).
- 17) 富樫二郎.“植物組織内における軟腐病菌 *Erwinia carotovora* 系統間の競合”. 日植病報. 45, 591-595(1979).
- 18) 富沢純一.“バクテリオファージの実験”. 岩波書店. 1979. 96 p.
- 19) 津山博之ら.“そ菜類軟腐病菌のテンプレートファージについて”. 日植病報. 47, 104(1981).

Characteristics of Temperate Phage of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Causing Bacterial Soft Rot of Onions

Tamio TANAKA* and Izumi SAITO

Summary

A lysogenic strain (E816) was newly detected in 60 isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* from soft-rot onion plants. The lysogenicity of the strain E816 was genetically stable, and a temperate phage from the strain lysogenized a sensitive strain of the bacterium. The phage formed a small plaque at 15, 20 and 25°C in the top layer of a medium in which the sensitive strain of the bacterium multiplied, but not at 30°C. The diameter of the plaque was dependent upon the cell density of the sensitive strain which was added to the top medium. The phage was inactivated at 80°C for 10 min., and resistant to chloroform. In experiments on one-step growth at 22°C, the latent period of the phage in an infected bacterial cell was 110–120 min., and the average burst size was 16–18. The phage had a polyhedral head at an average of 73×77 nm and a contractile tail averaged at 29×108 nm, and the phage particles adsorbed to the cell surface of the sensitive strain by their tails. The nucleic acid of the phage seemed to be double-stranded DNA, as indicated by colours of phage specimens under ultraviolet light after acridin-orange with post-staining treatments and susceptibility to DNase.

*Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, (Present Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido 069-13, Japan)