Rhizoctonia solani AG4 異常株の発現と消失

百町 満朗*・角野 晶大**・本間 善久***

Mitsuro HYAKUMACHI*, Akio SUMINO** and Yoshihisa HOMMA***:

Occurrence or Disappearance of Abnormal Isolates
in *Rhizoctonia solani* AG4

Abstract

Occurrence or disappearance of abnormality in normal or abnormal isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 (AG4) by several treatments were examined. Abnormality has not disappeared by heat (40~60 °C) treatment, chemical (streptomycin sulfate, oxytetracycline, chloramphenicol, cycloheximide, ethidium bromide, acriflavine) treatment, hyphal tip or mass transfer, and single protoplast isolation of abnormal isolates. On the other hand, abnormal isolates occurred from healthy isolates by single protoplast isolation and hyphal tip transfer with low frequency of 0.9% and 0.2%, respectively. These results showed that agent(s) stimulating abnormality had already existed in healthy isolates. Development of abnormality was also highly seen when normal isolates were dipped into a culture broth or macerated suspension of abnormal isolates. However, it was not seen in the case of a culture broth or macerated suspension filtrated through membrane (0.45 µm). Lethal isolates which produced brown-black pigment in medium and could not survive after transfer were obtained both from normal and abnormal isolates. Besides agent(s) stimulating abnormality, the existence of lethal agent(s) has been suggested.

(Received August 1, 1988)

Key words: fungal abnormality, *Rhizoctonia solani* AG4, abnormal agent(s), lethal agent(s).

結 言

数種の植物病原糸状菌には、培養形態が異常を呈し、生育が遅く、病原性の弱い株が存在する。さらに、これら異常株の中には菌糸融合により正常な株を異常にし、病原性を低下させる株の存在が知られている^{3,4,8,17,19,24}。これは、異常株に内在する異常因子が細胞質内を移行し正常株に入り込んだ結果、正常株が異常になったためと考えられている。異常因子として、二本鎖 RNA が *Endothia parasitica*^{7,10}、*Helminthosporium victoriae*²³ および *Rhizoctonia solani*⁶ で、プラスミド DNA が *R. solani*¹⁴ で、および d-

因子が *Ceratocystis ulmi*³⁰ で報告されている。これらの菌では異常因子が正常株に導入されると病原性が低下することから、異常因子を利用した生物防除の可能性が示唆されている^{1,5,11,13,20,26,27}。一方、植物病原菌を含む数種の糸状菌では、異常株の培養液や菌体破碎液に正常株を浸漬することで、正常株が異常株になる(異常の発現)¹⁹ ことや、逆に、異常株を温度処理^{2,22,28} したり抗生物質や色素を処理^{9,10,25} することにより、あるいは、異常株の菌糸先端部を移植^{4,22} したり、単プロトプラスト分離¹² を行うことにより、異常株が正常株に回復する(異常の消失)ことが知られている。

* 岐阜大学農学部 Faculty of Agriculture, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-11, Japan

** サントリー(株)研究センター基礎研究所 Institute for Fundamental Research, Research Center, Suntory Ltd., 1-1-1 Wakaya-Dai, Shimamoto-Cho, Mishima-Gun, Osaka 618, Japan

*** 北海道農業試験場 Hokkaido National Agricultural Experiment Station, Toyohira-ku, Sapporo 004, Japan

本研究は *R. solani* 菌糸融合群第 4 群 [anastomosis group (AG)4] の正常株と異常株を用いて、各種処理による異常の発現と消失の有無を調べ、異常の発現機構解明への手掛りを得ることを目的とした。

実験材料および方法

供試菌株 *R. solani* AG4 の正常株 1271 と 1271L、および異常株 RI64 と RI66 を用いた。1271L は 1271 の継代培養中に出現した株で、1271 に比べ菌叢が疎で、褐色色素による培地着色が著しいが、異常株とは明らかに異なり、正常な生育を示す。異常株 RI64 と RI66 は正常株 1271 を土壌に繰り返し接種してダイコン苗立枯病が衰退した土壌から分離された¹⁶⁾。

異常の発現と消失の判定 異常の発現と消失は、ジャガイモ・グルコース・寒天培地 (PDA) 上での菌糸生育速度と菌叢形態で判定した。すなわち、各処理後の菌体を PDA 斜面培地に移植し、25 C、3 週間培養中の菌糸の伸びと菌叢の形態を調べ、正常株と同様のものは正常株、異常株と同様なものは異常株とした。

異常株の培養液および菌体破砕液への浸漬処理

異常株を 15 ml の 2% 蔗糖加用ジャガイモ煎汁液体培地 (PSB) で 25 C、2 週間静置培養後、濾紙 (東洋濾紙 No. 1) で濾過したものを「培養液の原液」とし、また、菌体と培養液を 1:2 (w/v) の割合で混合し、ワーリングブレンダーで 10,000 rpm、5 分間破砕したものを「破砕液の原液」とした。実験にはこれらの原液のほか、培養液の原液を殺菌蒸留水で、1/1、1/10、1/100 に希釈した液、および孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで除菌した液、また、破砕液の原液をメンブランフィルターで除菌した液、および破砕液の原液をフェノールで除たんぱく処理した液を用いた。これらの各液に、PDA 上で、25 C、1 週間培養した正常株の菌叢から、直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いた含菌寒天片をそれぞれ 10 個浸漬し、25 C で 48 時間培養した。培養後、含菌寒天片を取り出し、滅菌濾紙で水分を取り除き、酸性素寒天平板培地 (AWA, pH 4.5) に移植した。2~3 日後、AWA 上に伸展した菌糸の先端部 (4 mm²) を PDA 斜面培地に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。なお、対照として PSB 48 時間浸漬培養した正常株の含菌寒天片を PDA 斜面培地に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。実験は 4 反復行った。

温度処理 PDA 斜面培地で 25 C、1 週間培養した正常株 1271 と異常株 RI64 を、それぞれ試験管ごと 40 C、45 C、50 C、55 C および 60 C に調整したウ

ォーターバス内に 10 分、20 分および 30 分間浸漬した。浸漬後、菌糸片 (5 mm $\times$ 5 mm) を切り取り、新たに PDA 斜面培地に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。実験は各区につき 10 個の菌糸片を供試し、それぞれ 3 反復行った。

抗生物質処理および色素処理 ストレプトマイシン・サルフェイト、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール、シクロヘキシミドの各抗生物質と臭化エチジウム、アクリフラビンの各色素を所定濃度 (Table 3) 加えた PDA 平板培地に異常株 RI64 と RI66 を移植し、25 C、3 日間培養した。培養後 PDA 上に生育した菌叢先端部の菌糸片 (5 mm $\times$ 5 mm) を PDA 斜面培地に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。対照として正常株 1271 および異常株 RI64 と RI66 を抗生物質や色素を含まない PDA 上に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。なお、実験はそれぞれ 5 個の菌糸片を用い 2 反復行った。

菌糸先端部移植および菌糸片移植 菌糸先端部移植は正常株と異常株をそれぞれ素寒天培地 (WA) に 25 C、2~3 日間培養後、伸展した 1 本の主軸菌糸の先端部約 2 mm² を 150 個切り取り、PDA 斜面培地に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。比較として WA 平板上に生育した菌叢先端部の菌糸片 (5 mm $\times$ 5 mm) を同様に移植した。

単プロトプラスト分離 正常株と異常株からのプロトプラストの作成および再生は Hashiba and Yamada¹⁵⁾ の方法に準じた。すなわち、1% ペプトン加用 PSB で 25 C、15~20 時間培養した菌体 1 g を β -グルクロニターゼ 0.06 ml/ml、セルラーゼオノゾカ R-S 20 mg/ml、マセロチーム R-10 5 mg/ml を含む 0.6 M マニトール液 (pH 5.2) 10 ml に懸濁後、30 C で緩く 3 時間振盪培養した。培養後、二重ガーゼで濾過し、濾液を 2,500 rpm、5 分間遠心分離し、粗プロトプラストを集めた。0.6 M マニトール液で数度洗浄した粗プロトプラストを 2 ml の 0.6 M マニトール液に懸濁後、0.6 M 蔗糖液 4 ml の上に静かに積層し、1,000 rpm、5 分間遠心分離した。二層の界面に集まったプロトプラストをバスターールピペットで取り出し、これを単プロトプラスト分離に供試した。各菌株のプロトプラスト懸濁液をそれぞれ 0.6 M マニトール加用 WA 上に流し、25 C で培養した。24 時間後、発芽したプロトプラストを単胞子分離の要領でそれぞれ 150~206 個分離し、PDA 斜面培地に移植し、菌糸伸長と培養形態を調べた。

結 果

異常株の培養液および菌体破砕液への浸漬処理による異常の発現

正常株 1271 と 1271L を異常株の培養液の原液に浸漬すると、異常株と暗褐色の色素を産生して死滅する致死株が多数出現した (Table 1)。また、培養液を 1/10 と 1/100 に希釈しても異常株や致死株が出現したが、その出現頻度は希釈が増すにつれて減少した。一方、メンブランフィルターで除菌した培養液に浸漬すると異常株は出現せず、致死株のみが出現した。致死株の出現は 1271 より 1271L で多かった。

正常株 1271 と 1271L を異常株の菌体破砕液に浸漬すると、高頻度で異常株や致死株が出現した (Table 2)。培養液と同様に菌体破砕液をメンブランフィルターで除菌すると、異常株は出現せず致死株のみが出現した。一方、菌体破砕液をフェノール処理すると、異常株や致死株は出現しなかった。

温度処理による異常の発現と消失

いずれの処理区とも正常株からは正常株、異常株か

らは異常株のみが出現し、温度処理による異常の発現、消失は認められなかった。

抗生物質処理および色素処理による異常の消失

抗生物質や色素を添加した PDA 上での異常株 RI64 と RI66 の菌糸伸長速度は無添加の場合と大差はなかったが、対照とした正常株 1271 の伸長速度と比較すると明らかに劣った (Table 3)。また、抗生物質や色素を含む培地上で生育した異常株の菌叢から菌糸片を取り出し、新たに PDA 斜面培地に移植しても、菌糸の生育は悪く、培養形態は異常を呈したままであった。すなわち、異常株に抗生物質や色素を処理しても異常の消失は認められなかった。

菌糸先端移植および菌糸片移植による異常の発現と消失

正常株 1271 の菌糸先端部を移植した 242 株からは異常株は出現しなかったが、1271L から移植した 302 株のうち 1 株 (1271LHTD1) (0.3%) は異常を呈し、正常株からの異常の発現が認められた (Table 4) (Plate I-1)。一方、異常株 RI64 と RI66 の菌糸先端部を移植した合計 543 株からは正常株は出現しなかつ

Table 1. Occurrence of abnormality in normal isolates of *Rhizoctonia solani* AG4 by dipping into culture broth of abnormal isolate treated in various ways

Normal isolate	Culture broth ^{a)}	Treatment ^{b)}	Appearance (%) ^{d)} of		
			Normal isolate	Abnormal isolate	Lethal isolate
1271	A	1/1	15	85	0
		1/10	90	10	0
		1/100	100	0	0
		1/1, M	55	0	45
		1/1	25	35	40
	B	1/10	100	0	0
		1/100	100	0	0
		1/1, M	55	0	45
		Control ^{c)}	100	0	0
		Control	100	0	0
1271L	A	1/1	0	50	50
		1/10	65	15	20
		1/100	55	20	25
		1/1, M	23	0	78
		1/1	40	50	10
	B	1/10	25	55	20
		1/100	85	5	10
		1/1, M	45	0	55
		Control	100	0	0
		Control	100	0	0

a) A: obtained from the abnormal isolate RI64.

B: obtained from the abnormal isolate RI66.

b) Diluted 1/1, 1/10 and 1/100 with sterile distilled water.

M: filtrate passed through the membrane (0.45 μ m).

c) Dipped into PSB (2% potato sucrose broth).

d) Out of total 40 mycelial fragments.

Table 2. Occurrence of abnormality in normal isolates of *Rhizoctonia solani* AG4 by dipping into macerated suspension of abnormal isolates treated in various ways

Normal isolate	Macerated ^{a)} suspension	Treatment ^{b)}	Appearance (%) ^{d)} of			
			Normal isolate	Abnormal isolate	Lethal isolate	
1271	A	M	33	55	13	
		MM	46	0	55	
		PM	100	0	0	
	B	M	28	0	73	
		MM	68	0	33	
		PM	100	0	0	
	Control ^{c)}		100	0	0	
	1271L	A	M	10	83	8
			MM	38	0	63
PM			100	0	0	
B		M	40	13	48	
		MM	33	0	68	
		PM	100	5	0	
Control		100	0	0		

a) A: obtained from the abnormal isolate RI64.

B: obtained from the abnormal isolate RI66.

b) M: macerated suspension of mycelium.

MM: macerated suspension of mycelium filtered through the membrane (0.45 μ m).

PM: phenol extract of macerated suspension of mycelium.

c) Dipped into PSB (2% potato sucrose broth).

d) Out of total 40 mycelial fragments.

Table 3. Effect of various antibiotics and dyes on mycelial growth of the abnormal isolates of *Rhizoctonia solani* AG4

Antibiotic or dye	Concentration	Growth length of mycelium on PDA during 3 days (mm)	
		RI64	RI66
Streptomycin sulfate	10 μ g/ml	49	15
	100 μ g/ml	44	8
	1,000 μ g/ml	46	22
Oxytetracycline	10 μ M/ml	39	21
	100 μ M/ml	35	7
	1,000 μ M/ml	26	13
Chloramphenicol	10 μ M/ml	42	21
	100 μ M/ml	43	13
	1,000 μ M/ml	9	23
Cycloheximide	5 μ M/ml	14	5
	10 μ M/ml	10	3
	50 μ M/ml	1	7
Ethidium bromide	10 μ M/ml	38	14
	100 μ M/ml	5	13
	500 μ M/ml	4	1
Acriflavine	10 μ M/ml	13	12
	50 μ M/ml	3	10
	100 μ M/ml	5	4
No treatment		44	14
Control ^{a)}			58

a) Normal isolate 1271.

Table 4. Occurrence or disappearance of abnormality in *Rhizoctonia solani* AG4 caused by hyphal mass or tip transfers

Transfer	Isolate ^{a)}	Appearance of		
		Normal isolate	Abnormal isolate	Lethal isolate
Hyphal mass	1271	150/150 ^{b)}	0/150	0/150
		100.0%	0.0%	0.0%
	1271L	110/150	0/150	40/150
		73.3%	0.0%	26.6%
	RI64	0/150	149/150	1/150
Hyphal tip	1271	0.0%	99.3%	0.7%
		0/150	47/150	103/150
	1271L	0.0%	31.3%	68.7%
		242/242	0/242	0/242
	RI64	100.0%	0.0%	0.0%
		149/302	1/302	152/302
	RI66	49.3%	0.3%	50.3%
		0/245	245/245	0/245
	RI66	0.0%	100.0%	0.0%
		0/298	76/298	222/298
		0.0%	25.5%	74.5%

a) 1271 and 1271L: normal isolates.

RI64 and RI66: abnormal isolates.

b) No. of normal, abnormal or lethal isolates / No. of isolates tested.

Table 5. Occurrence or disappearance of abnormality in *Rhizoctonia solani* AG4 caused by single protoplast isolation

Isolate		Appearance of		
		Normal isolate	Abnormal isolate	Lethal isolate
Normal	1271	132/150 ^{a)}	3/150	15/150
		88.0%	2.0%	10.0%
	1271L	163/194	0/194	31/194
Abnormal	RI64	84.0%	0.0%	16.0%
		0/195	195/195	0/195
	RI66	0.0%	100.0%	0.0%
		0/206	46/206	160/206
		0.0%	22.3%	77.7%

a) No. of normal, abnormal or lethal isolates / No. of isolates tested.

た。菌叢先端部の菌糸片を移植した場合は、正常株から異常株あるいは異常株から正常株が出現することはなかった。正常株 1271L や異常株 RI66 では菌糸先端部あるいは菌糸片を移植することにより致死株が高頻度に出現した。

単プロトプラスト分離による異常の発現と消失

正常株 1271 の単プロトプラスト分離株 150 株のうち 3 株 (1271PD1, 1271PD2, 1271PD3) (0.2%) が異常を呈し、正常株からの異常の発現が認められた

(Table 5) (Plate I-2)。正常株 1271L の単プロトプラスト分離株 194 株からは異常株は出現しなかった。また、異常株 RI64 と RI66 の単プロトプラスト分離株の合計 401 株からは正常株の出現は認められなかった。一方、正常株 1271 と 1271L および異常株 RI66 を単プロトプラスト分離することにより、致死株はそれぞれ 10.0%、16.0% および 77.7% の割合で出現した。

考 察

今回の実験結果、*Rhizoctonia solani* AG4 の正常株を異常株の培養液や菌体破砕液に浸漬することで異常株が高率に出現すること、また、正常株の菌糸先端部を移植したり、単プロトプラスト分離しても低率ながら異常株が出現することが明らかになった。異常株の培養液やその希釈液および菌体破砕液に正常株を浸漬することにより、正常株から異常株が出現したことは、Lindberg¹⁹⁾ が *Helminthosporium victoriae* で行った実験と同様の結果であり、これらの溶液中に異常因子が存在したことを示唆している。一方、これらの液をメンブランフィルターで除菌すると異常の発現はみられなかった。このことは、培養液や菌体破砕液に含まれていた異常株が移植後、正常株に混じって出現した可能性を示している。しかし培養液は濾紙で大部分の菌体を取り除かれていたにもかかわらず、異常株が高頻度に出現したこと、あるいは培養液を 1/100 に希釈してもなお異常株が出現したことから、異常の発現が単に液体中に残存した異常株の菌体による混入とは考え難い。

本実験に供試した異常株は、正常株を土壌に繰り返し接種し、病気が衰退した土壌から分離された¹⁶⁾が、正常株が異常株に変化した理由として、(1) 異常因子を含む微生物の正常株への感染と、(2) 正常株自体に内在していた異常因子の増殖、の 2 点が考えられている。今回、正常株の菌糸先端部移植や単プロトプラスト分離によりきわめて低頻度ながらも異常株が出現したことは、正常株の菌体中にすでに異常因子が存在していたことを示すものであり、後者の説を裏付けている。また、このことは「正常株の継代培養中に生じたセクター部分から異常株が出現した」との百町ら¹⁷⁾の結果とも一致する。

正常株を異常株の培養液や菌体破砕液に浸漬すると、あるいは正常株と異常株を菌糸先端部移植したり単プロトプラスト分離すると、高頻度に致死株が出現した。致死株は、培養液や菌体破砕液をメンブランフィルターで除菌しても出現したことから、異常因子とは異なる因子(致死因子)の存在が示唆された。また、メンブランフィルターで除菌後の菌体破砕液をフェノール処理すると、異常株や致死株の出現はまったく認められなかった。このことは、*H. victoriae* の結果²¹⁾と類似しており、菌類ウイルスが異常因子や致死因子

として関与している可能性を示している。菌類の異常因子が二本鎖 RNA (菌類ウイルス) の場合は、温度処理^{2,22,28)}、抗生物質処理¹⁰⁾、菌糸先端部移植⁴⁾および単プロトプラスト分離¹²⁾により、また、プラスミド DNA の場合には抗生物質処理や色素処理^{9,25)}により、異常株から正常株が出現するとの報告がある。これらの処理は異常因子を除去したり、あるいは異常因子を不活化させると考えられている。しかし、本実験では上記のいずれの処理においても異常株から正常株が出現することはなかった。この結果は、異常因子が菌体内で一旦増殖すると、それを取り除いたり不活化することがきわめて難しいことを示している。

植物病原糸状菌の異常因子が何であるかを明確にすることは、異常株あるいは異常因子を用いた生物防除法を確立する上できわめて重要である。本実験で用いた異常株は、Castanho and Butler⁵⁾ が報告した *R. solani* AG1 の異常株と同様、病原性が弱く、また、正常株に干渉作用を示す¹⁷⁾ことから、異常因子が病原性に密接に関与していると思われる。この異常株からは、これまでに二本鎖 RNA¹⁸⁾ とプラスミド DNA¹⁴⁾ が検出されている。これら核外遺伝子と異常との関係を明らかにすることは今後の課題である。

摘 要

各種処理による *Rhizoctonia solani* 菌糸融合群第 4 群の正常株と異常株における異常の発現と消失を調べた。異常株を温度 (40 C ~ 60 C) 処理、薬剤 (ストレプトマイシン・サルフェイト、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール、シクロヘキシミド、臭化エチジウム、アクリフラビン) 処理、菌糸先端部移植、菌糸片移植および単プロトプラスト分離したが、異常株から正常株が出現することはなかった。一方、正常株を単プロトプラスト分離すると、分離した 344 株のうち 3 株 (0.9%) が、また、菌糸先端部移植すると、移植した 544 菌株のうち 1 株 (0.2%) が異常を呈し、正常株から異常株の出現が認められた。このことは、異常因子が正常株中にすでに存在していることを示している。正常株を異常株の培養液と菌体破砕液に浸漬すると異常株が高率に出現したが、これらの液を、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで除菌すると異常株は出現しなかった。暗褐色の色素を産生して死滅する致死株が正常株と異常株の両者から出現したが、異常因子とは異なる致死因子の存在が示唆された。

Plate I

Plate I.

1. Abnormal isolate 1271LHTD1 obtained from normal isolate 1271L by the hyphal tip transfer.
2. Abnormal isolate 1271PD1 and normal isolate 1271PH1 obtained from healthy isolate 1271 by the single protoplast isolation.

引用文献

1. Anagnostakis, S.L. (1982). *Science* 215: 466-471.
2. Banks, G.T., Buck, K.W., Chain, E.B., Himmelweit, F., Marks, J.E., Tyler, J.M., Hollings, M., Last, F.T. and Stone, O.M. (1968). *Nature* 218: 542-545.
3. Brasier, C.M. (1983). *Ibid.* 305: 220-223.
4. Castanho, B. and Butler, E.E. (1978). *Phytopathology* 68: 1505-1510.
5. Castanho, B. and Butler, E.E. (1978). *Ibid.* 68: 1511-1514.
6. Castanho, B., Butler, E.E. and Shepherd, R.J. (1978). *Ibid.* 68: 1515-1519.
7. Day, P.R., Dodds, J.A., Elliston, J.E., Jaynes, R.A. and Anagnostakis, S.L. (1977). *Ibid.* 67: 1393-1396.
8. Elliston, J.E. (1985). *Ibid.* 75: 1405-1413.
9. Esser, K. and Tudzynski, P. (1977). *Nature* 265: 454-456.
10. Fulbright, D.W. (1984). *Phytopathology* 74: 722-724.
11. Fulbright, D.W., Weidlich, W.H., Haufler, K.Z., Thomas, C.S. and Paul, C.P. (1983). *Can. J. Bot.* 61: 3164-3171.
12. Ghabrial, S.A., Sanderlin, R.S. and Calvert, L.A. (1979). *Phytopathology* 69: 312-315.
13. 羽柴輝良 (1984). *植物防疫* 38: 28-33.
14. Hasiba, T., Homma, Y., Hyakumachi, M. and Matsuda, I. (1984). *J. gen. Microbiol.* 130: 2067-2070.
15. Hasiba, T. and Yamada, M. (1982). *Phytopathology* 72: 849-853.
16. 本間善久・山下洋子・久保千冬・石井正義 (1981). *日植病報* 47: 388 (講要).
17. 百町満朗・本間善久・宇井格生 (1984). 同上 50: 281-285.
18. 百町満朗・角野晶大・本間善久・上田一郎・四方英四郎 (1985). 同上 51: 372 (講要).
19. Lindberg, G.D. (1959). *Phytopathology* 49: 29-32.
20. Lindberg, G.D. (1960). *Ibid.* 50: 457-460.
21. Lindberg, G.D. (1966). *Ibid.* 56: 1297-1300.
22. Lindberg, G.D. (1968). *J. gen. Microbiol.* 50: 361-365.
23. Sanderlin, R.S. and Ghabrial, S.A. (1978). *Virology* 87: 142-157.
24. 高屋茂雄 (1972). *化学と生物* 10: 476-478.
25. Tudzynski, P. and Esser, K. (1977). *Molec. gen. Genet.* 153: 111-113.
26. Van Alfen, N.K. (1983). *Ann. Rev. Phytopathol.* 20: 349-362.
27. Van Alfen, N.K., Jaynes, R.A., Anagnostakis, S.L. and Day, P.R. (1975). *Science* 189: 890-891.
28. Wood, H.A., Bozarth, R.F. and Mislivec, P.B. (1971). *Virology* 44: 592-598.