

## Phage $\phi$ FSV가 *Lactobacillus casei*의 증식에 미치는 영향

김경태 · 이정준 · 서인영 · 나석환 · 백영진\*

한국야쿠르트유업(주) 연구소

### Effect of the Phage $\phi$ FSV on the Growth of *Lactobacillus casei*

Kim, Gyung-Tae, Jeong-Jun Lee, In-Young Suh,  
Seog-Hwan Na and Young-Jin Baek\*

Hankuk Yakult Institute, Wanggok-dong, Euiwang-si, Kyunggi-do 437-020, Korea

**Abstract**— In order to study effect of the phage  $\phi$  FSV on the growth of lactic acid bacteria, *Lactobacillus casei* YIT 9018 (wild type strain with prophage) or *L. casei* HYM 1213 (prophage cured strain) was infected with various concentrations of phage  $\phi$  FSV (called Lac S21) or wild type virulent phage (called Lac J-1). When *L. casei* YIT 9018 was infected with Lac S21 under the concentration of  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml, the growth and lactic acid production of the strain were normal and the number of phages decreased. But *L. casei* HYM 1213 was susceptible to Lac S21. Regardless of the concentration of the phage infection, the number of phages increased rapidly into  $10^9$  to  $10^{10}$  pfu/ml at 2 day cultures and was maintained  $10^7$  to  $10^8$  pfu/ml phages until 6 day cultures. The lactic acid production of *L. casei* HYM 1213 infected with Lac S21 was abnormal. Therefore, phage  $\phi$  FSV had an evil effect on growth of *L. casei* HYM 1213, but not *L. casei* YIT 9018. On the other hand Lac J-1 caused abnormal fermentation to either *L. casei* YIT 9018 or *L. casei* HYM 1213.

유산균 발효유를 생산할 때 phage는 종균의 생육 저해 등 나쁜 영향을 미치므로서 종종 문제가 되고 있는데, 유산종균인 *Lactobacillus casei* YIT 9018 균주는 chromosome상에 prophage를 가지고 있는 lysogen(1,2)이다.

Sakurai 등(3)과 Tohyama 등(4)에 의하면 *L. casei*와 *L. salivarius*로부터 분리한 temperate phage들은 그 균주들에 대해 사멸효과나 plaque 생성능력이 없다고 하였으며, Yokokura 등(1)은 mitomycin C에 의해 유발된 phage-like particle들은 plaque를 생성할 수 없으면서도 때로는 다른 *Lactobacilli*의 성장을 억제한다고 보고하였는데, 이러한 temperate phage들의 사멸효과나 plaque 형성능력은 불명확한 상태이다.

Shimizu-Kadota 등(5-7)은 단일 유산균을 종균으

로 사용할 때, closed tank system에서 배양함에도 불구하고 나타나는 phage는 host genome에 통합된 prophage  $\phi$  FSV로부터 유래된 것으로 prophage  $\phi$  FSV의 virulent mutants라고 하여 phage  $\phi$  FSV라고 명명하였다.

또한, 이들 phage  $\phi$  FSV의 출현은 prophage cured strain을 이용함으로써 배제시킬 수 있다(6)고 하였으며, Shimizu-Kadota 등(8-10)은 이러한 phage  $\phi$  FSV가 혈청학적으로 prophage  $\phi$  FSV와 동일함을 밝히고, prophage  $\phi$  FSV의 DNA 구조를 보고하였다.

그러나, 이들 phage  $\phi$  FSV가 종균의 배양에 미치는 영향에 대해서는 정확히 보고된 바가 없으며, 더욱이 prophage cured strain에 대한 영향은 의문시되어져 왔다.

따라서, 본 연구에서는 prophage를 갖고 있는 *L. casei* YIT 9018 균주와 Lee 등(11)이 온도감수성 변이주로부터 분리해낸 prophage cured strain인 *L. casei* HYM 1213 균주에 phage  $\phi$  FSV와 wild type

**Key words:** *Lactobacillus casei*, prophage cured strain, phage  $\phi$  FSV, wild type virulent phage, abnormal fermentation

\*Corresponding author

phage인 phage  $\phi$  J-1(12, 13)을 임의의 농도로 감염시켜, 이들이 유산균 발효에 미치는 영향을 파악하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 bacteriophage

본 연구에 사용된 균주는 Table 1과 같으며, bacteriophage는 한국야쿠르트유업(주)의 공장에서 검출된 phage  $\phi$  FSV인 Lac S21과 wild type virulent phage인 Lac J-1을 사용하였다.

### 배지

유산균의 보존 및 활력증강용 배지로는 10% skim milk를 사용하였으며, 배양배지로는 16% skim milk에 3% glucose를 첨가(HSMG)한 배지를 사용하였다. Phage 지시균인 *L. casei* YIT 9021 균주는 MRT broth(14)에 3회 계대하여 4°C에 보관하면서 phage 수 측정에 이용하였다. Phage들은 숙주균과 함께 MRT broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 생성된 lysate를 냉장보관하면서 본 실험에 사용하였다.

### Phage $\phi$ FSV 및 phage $\phi$ J-1의 농도별 감염에 따른 *L. casei*의 증식

10% skim milk에서 충분히 활력을 높인 *L. casei*를 HSMG 배지에 0.5% 접종하고, 여기에 Lac S21 phage 및 Lac J-1 phage의 10배수 희석액을 각각 1.0%씩 감염시켜 37°C에서 6일간 배양하였다. 배양 2일균부터 시료를 채취하여 phage수, 유산균 생균수 그리고 유산생성능을 측정하였다.

### Phage 검사 및 미생물학적 검사

Phage는 시료 1.5 ml를 eppendorf microcentri-

fuge에서 15,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상등액을 10배수 연속 희석법에 따라 희석하여 MRT agar plate에 0.1 ml를 떨어뜨린 후, MRT soft agar 3.0 ml에 *L. casei* YIT 9021 지시균을 0.2 ml 첨가하여 위 MRT agar plate에 overlay한 다음, 도치시켜서 37°C에서 18시간 배양하여 나타나는 plaque를 계수하였다. 유산균의 생균수는 합성 BCP 배지를 이용하여 37°C에서 2일간 배양한 결과를 계수하였으며, 유산생성능은 9g의 시료에 대한 0.1 N NaOH 용액의 중화값을 측정하여 유산 %로 환산하여 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### *L. casei* YIT 9018 균주의 증식에 대한 phage $\phi$ FSV의 영향

*L. casei* YIT 9018 균주의 배양과정 중에 나타나는 phage  $\phi$  FSV의 영향을 간접적으로 증명하기 위해 초기 접종농도가  $3.0 \times 10^6$  cfu/ml(colony forming units per ml)인 *L. casei* YIT 9018 균주에 phage  $\phi$  FSV(Lac S21)를  $6.0 \times 10^6$ ,  $6.0 \times 10^4$ ,  $6.0 \times 10^2$  pfu/ml(plaque forming units per ml)의 농도로 각각 감염시켜 배양하였다.

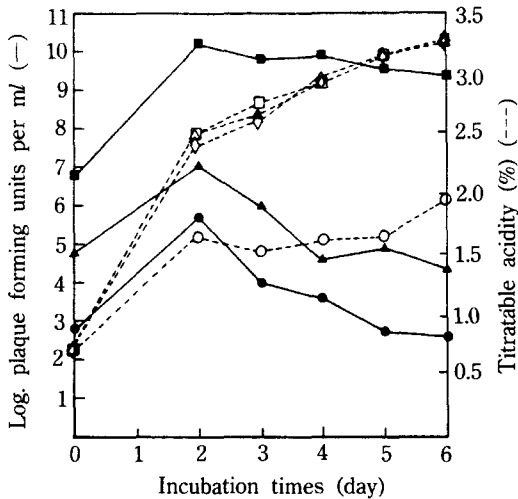
Fig. 1에서 보는 바와 같이 phage는 감염농도에 따라 비례적으로 증가하여 2일균에서 각각 최고치를 나타내었으며,  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml 농도로 Lac S21 phage를 *L. casei* YIT 9018 균주에 감염시킨 경우에는 2일균에서  $1.6 \times 10^{10}$  pfu/ml의 수준으로 phage가 증가되었고, 그 후 계속 배양함에도 불구하고 3일 후에는 더 이상 증가하지 않고 6일균에 이르기까지  $10^9$  pfu/ml의 수준을 유지하였다.

반면에 Lac S21 phage를  $6.0 \times 10^4$  pfu/ml 농도로 *L. casei* YIT 9018 균주에 감염시킨 시료는 2일균에서  $1.1 \times 10^7$  pfu/ml로 증가하였으나, 배양 3일에는  $10^5$  pfu/ml, 4~6일균에서는  $10^4$  pfu/ml로 phage가 감소되었다. 마찬가지로  $6.0 \times 10^2$  pfu/ml phage 감염시료도 2일균에서는 phage가 급격히 증식하여  $10^5$  pfu/ml이었으나 배양 3~4일에는  $10^3$  pfu/ml, 5~6일에는  $10^2$  pfu/ml로 phage가 감소되었다.

이에 따른 *L. casei* YIT 9018 균주의 증식은 Fig. 2와 같다. Lac S21 phage를 감염시키지 않은 대조군과  $6.0 \times 10^4$ ,  $6.0 \times 10^2$  pfu/ml의 농도로 phage를 감염시킨 시료 모두 phage의 감염여부에 관계없이 2일균에서

Table 1. Strains and bacteriophages used

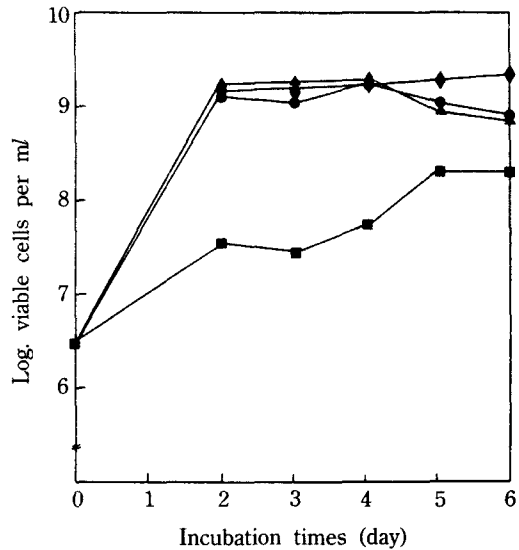
Strains	Description
<i>L. casei</i> YIT 9018	wild type strain with prophage
<i>L. casei</i> YIT 9021	phage indicator strain
<i>L. casei</i> HYM 1213	prophage cured strain
Lac S21	phage $\phi$ FSV
Lac J-1	wild type virulent phage



**Fig. 1. Growth of Lac S21 phage and acid production of *L. casei* YIT 9018 during incubation at 37°C in 16.0 % skim milk plus 3.0% glucose medium.** Concentration of inoculated *L. casei* YIT 9018 was  $3.0 \times 10^6$  cfu/ml and those of infected Lac S21 phage were as follows: (■, □);  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml, (▲, △);  $6.0 \times 10^4$  pfu/ml, (●, ○);  $6.0 \times 10^2$  pfu/ml, (◇); no infection of phage

이미 유산균 생균수가  $10^9$  cfu/ml 수준으로 증식되었고, 6일군까지 계속하여  $10^9$  cfu/ml의 수준을 유지하였다. 그러나  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml의 농도로 phage를 감염시킨 시료는 유산균이 서서히 증식하여 2일군에서 생균수가  $10^7$  cfu/ml 정도였으며, 배양 5~6일에 가서야 비로소  $10^8$  cfu/ml 정도의 생균수를 유지하였다.

유산생성능도 *L. casei* YIT 9018 균주에  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml의 phage를 감염시킨 시료는 다른 시료와는 달리 배양 2일부터 1.5%의 낮은 유산을 생성하여 완료 6일군에서도 2.0% 이상의 유산을 생성하지 못하였다. 그러나  $6.0 \times 10^4$  및  $6.0 \times 10^2$  pfu/ml의 phage 감염시료는 phage를 감염시키지 않은 대조군과 거의 유사한 유산생성능을 가져 6일군에서는 3.0% 이상의 유산을 생성하였다(Fig. 1). 그러므로  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml의 phage 감염시료는 초기 감염농도가 높아 *L. casei* YIT 9018 균주의 증식에 영향을 주었으나, 그보다 낮은 농도에서의 phage 감염시료는 *L. casei* YIT 9018 균주의 증식에 영향을 미치지 못하였다. 또다른 phage  $\phi$  FSV인 Lac S29와 Lac S625 경우에서도 유사한 결과를 얻었다(자료 비참입). 이는 *L. casei* YIT 9018



**Fig. 2. Growth of *L. casei* YIT 9018 ( $3.0 \times 10^6$  cfu/ml) during incubation with Lac S21 phage at 37°C in 16.0 % skim milk plus 3.0% glucose medium.** Concentrations of infected Lac S21 phage were as follows: (■);  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml, (▲);  $6.0 \times 10^4$  pfu/ml, (●);  $6.0 \times 10^2$  pfu/ml, (◆); no infection of phage

균주가 phage  $\phi$  FSV에 대한 저항성을 갖고 있기 때문으로 생각된다.

따라서, *L. casei* YIT 9018 균주의 배양 중 phage  $\phi$  FSV의 유발은 실제적으로 유산균 발효에 영향을 끼치지 못함을 알 수 있었으며, 다만 배양 초기에 검출되는 phage  $\phi$  FSV수가  $10^6$  pfu/ml 정도나 그 이상이 될 때 유산균 배양에 지장을 초래하므로 종균의 적절한 교체시기를 결정하는데 좋은 지표가 될 수 있으리라 본다.

***L. casei* HYM 1213 균주의 증식에 대한 phage  $\phi$  FSV의 영향**

Shimizu-Kadota 등(6-8)에 의하면, southern filter hybridization 기법을 이용하여 실험한 결과 prophage cured strain인 C239 균주는 phage  $\phi$  FSV DNA와 homology가 없고, *L. casei* S-1 균주만 한 개의 복제부가 있으므로 phage  $\phi$  FSV는 prophage  $\phi$  FSV로부터 유래되었다고 하였다. 따라서 prophage cured strain을 이용함으로써 phage  $\phi$  FSV의 출현을 방지할 수 있다고 하였으나, 대부분의 prophage cured strain의 분리과정은 유전자 조작에 의해 prophage 부

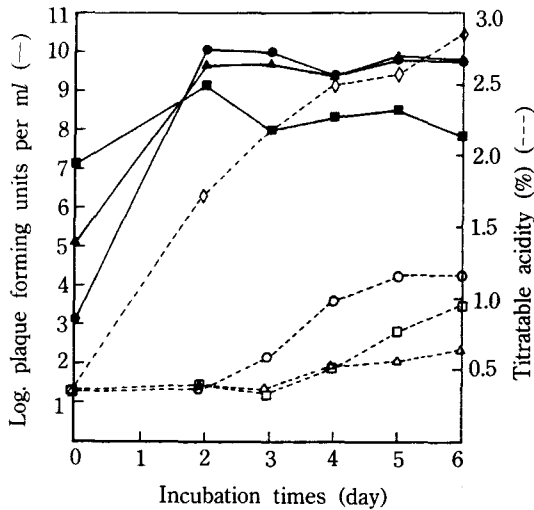


Fig. 3. Growth of Lac S21 phage and acid production of *L. casei* HYM 1213 during incubation at 37°C in 16.0% skim milk plus 3.0% glucose medium.

Concentration of inoculated *L. casei* HYM 1213 was  $1.0 \times 10^7$  cfu/ml and those of infected Lac S21 phage were as follows: (■, □);  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml, (▲, △);  $1.0 \times 10^5$  pfu/ml, (●, ○);  $1.0 \times 10^3$  pfu/ml, (◇); no infection of phage

위판을 상실시키는 것이 아니라 균주에 mitomycin C, UV 또는 열처리를 함으로써 불완전한 chromosomal DNA 배열을 유도하고 이로부터 prophage  $\phi$  FSW가 상실된 균주를 검출하는 것이므로, 이로 인해 유발될 수 있는 phage  $\phi$  FSV의 영향을 완전히 배제할 수는 없다. 따라서, prophage cured strain이 phage  $\phi$  FSV에 감염되었을 때 나타나는 유산균의 증식현상을 조사하였다.

Prophage cured strain인 *L. casei* HYM 1213 균주 ( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)에 Lac S21 phage를  $1.0 \times 10^7$ ,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^3$  pfu/ml의 농도로 각각 감염시킨 결과, Fig. 3에서와 같이 감염농도에 관계없이 모두 급격한 phage 증가로 2일균에서  $10^9 \sim 10^{10}$  pfu/ml로 phage가 검출되었으나, 배양 6일째까지 거의 사멸되지 않고  $10^7 \sim 10^9$  pfu/ml을 유지하였다. 이 때, 오히려  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml의 phage 감염시료는 MOI(Multiplicity of infection)값이 1.0이므로 *L. casei* HYM 1213 균주의 급격한 사멸로 다른 시료보다도 더 낮은 phage 증식을 보였다.

더욱이 *L. casei* HYM 1213 균주는 phage의 급격한 증가로 인해 증식속도가 감소되었고, 여기에 skim

milk의 살균처리로 인해 배지내에 잔존하고 있던 내열성균 등이 2차 오염을 일으켜 생균수 계수가 어려웠다. 유산생성능은 phage 감염이 안된 대조균이 2일균부터 6일균에 이르기까지 1.7, 2.2, 2.5, 2.6, 2.8%로 유산생성이 증가한 반면에 가장 낮은 phage 감염농도인  $1.0 \times 10^3$  pfu/ml 시료에서도 2일균의 유산생성은 0.3%에 불과하였고 6일 배양한 결과도 1.0% 이하였다(Fig. 3).

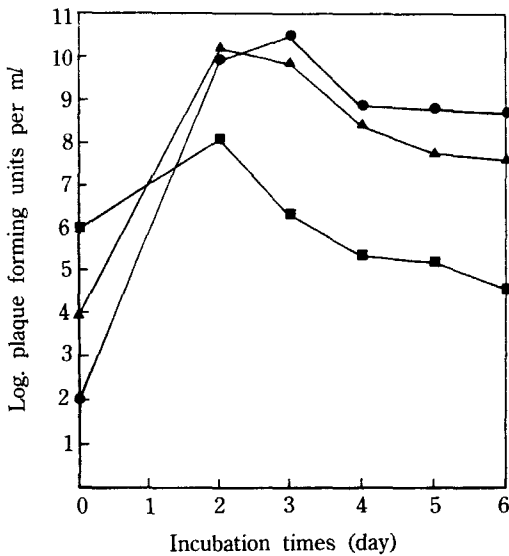
그러므로, prophage  $\phi$  FSW를 갖고 있는 균주는 그 phage에 대해 저항성이 있다(6)고 하였으나, prophage cured strain의 경우는 오히려 wild type strain보다 phage  $\phi$  FSV 감염에 민감하여 정상 발효를 하지 못함을 알 수 있었다. 이는 *L. casei* YIT S-1 균주의 prophage cured strain인 *L. casei* YIT 9029 균주에 대한 실험에서도 동일하게 나타났다(자료 비삽입).

#### *L. casei* YIT 9018 균주와 *L. casei* HYM 1213 균주의 증식에 대한 phage $\phi$ J-1의 영향

Prophage  $\phi$  FSW로부터 유래된 phage  $\phi$  FSV가 *L. casei*의 증식에 미치는 영향에 대한 대조군으로써 wild type virulent phage인 Lac J-1 phage를 *L. casei* YIT 9018 균주와 *L. casei* HYM 1213 균주에 각각 감염시켜 Lac J-1이 유산균 발효에 미치는 영향을 파악하였다.

Wild type virulent phage인 Lac J-1 phage를  $3.0 \times 10^6$  cfu/ml의 *L. casei* YIT 9018 균주에  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^4$ ,  $1.0 \times 10^2$  pfu/ml의 농도로 각각 감염시켰을 때, phage는 2일균에서 각각  $10^7$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  pfu/ml의 농도로 급격히 증가되었고, 계속 배양하여도 커다란 감소없이 6일균에서도  $10^5$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  pfu/ml의 수준으로 각각 phage가 유지되었다(Fig. 4).

마찬가지로 Lac J-1 phage의 *L. casei* HYM 1213 균주( $1.0 \times 10^7$  cfu/ml)에의 phage 농도별 감염효과는 Fig. 5와 같이 균주를 완전히 용균시켜서 2일균에서 phage 초기 감염농도에 관계없이 모두  $10^9 \sim 10^{10}$  pfu/ml로 phage가 증가되었으며,  $1.0 \times 10^5$ ,  $1.0 \times 10^3$  pfu/ml의 phage 초기 감염시료는 6일균까지 계속하여 phage가 감소하지 아니하여  $10^9$  pfu/ml을 유지하였고, 다만  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml의 phage 감염시료만이  $10^6$  pfu/ml로 phage가 감소하였다. 이에 따라 *L. casei* HYM 1213 균주의 증식과 유산생성능은 Lac J-1 phage의

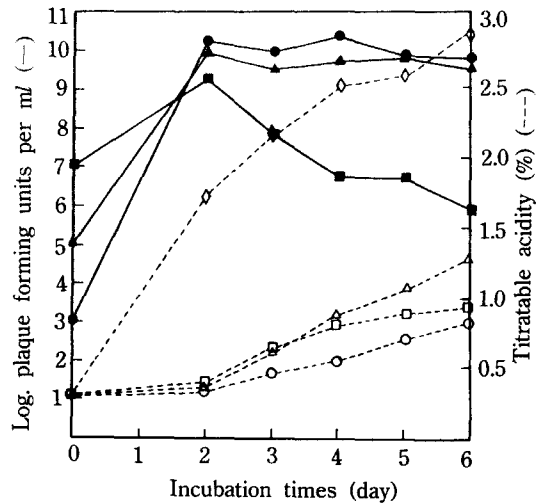


**Fig. 4. Growth of Lac J-1 phage during incubation with *L. casei* YIT 9018 ( $3.0 \times 10^6$  cfu/ml) at 37°C in 16.0% skim milk plus 3.0% glucose medium.**  
Concentrations of infected Lac J-1 phage were as follows: (■);  $1.0 \times 10^6$  pfu/ml, (▲);  $1.0 \times 10^4$  pfu/ml, (●);  $1.0 \times 10^2$  pfu/ml

초기 감염농도에 관계없이 모두 정상적인 발효를 하지 못함을 알 수 있었다.

Lac J-1 phage는 prophage를 가지고 있는 *L. casei* YIT 9018 균주와 prophage가 소실된 *L. casei* HYM 1213 균주에 공통적으로 유사한 패턴의 증식모양을 Fig. 4, 5에서 보여주고 있다. 이 때 Lac J-1 phage를  $1.0 \times 10^6$ 이나  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml 농도로 위 균주에 각각 감염시켰을 때, 오히려 이보다 낮은 농도로 감염시킨 시료보다도 더 적은 phage가 검출되었는데, 이는 균주의 접종농도와 관련된 MOI값이 높기 때문에 용균에 의해 균주의 수가 격감되어 나타난 결과로 추정된다. 따라서, Lac J-1 phage는 prophage를 갖고 있는 wild type strain이나 prophage cured strain에 상관없이, 이에 감염된 유산균의 비정상 발효를 유도함을 알 수 있었다.

그러므로, 환경으로부터의 오염원인 wild type virulent phage는 prophage를 가지고 있는 *L. casei* YIT 9018과 prophage cured strain인 *L. casei* HYM 1213에 관계없이, 어떠한 균주를 종균으로 사용할지라도 유산균 발효에 커다란 영향을 미치게 되지만, phage  $\Phi$  FSV는 prophage  $\Phi$  FSW를 갖고 있는 wild type



**Fig. 5. Growth of Lac J-1 phage and acid production of *L. casei* HYM 1213 during incubation at 37°C in 16.0% skim milk plus 3.0% glucose medium.**  
Concentration of inoculated *L. casei* HYM 1213 was  $1.0 \times 10^7$  cfu/ml and those of infected Lac J-1 phage were as follows: (■, □);  $1.0 \times 10^7$  pfu/ml, (▲, △);  $1.0 \times 10^8$  pfu/ml, (●, ○);  $1.0 \times 10^9$  pfu/ml, (◇, ◇); no infection of phage

strain에는 영향을 미치지 않고 다만 prophage cured strain에 영향을 미침을 알 수 있었다. 즉 prophage cured strain은 wild type virulent phage 뿐 아니라 prophage  $\Phi$  FSW로부터 유발되어 나온 phage  $\Phi$  FSV에도 매우 민감하게 감염되어 나쁜 영향을 받으므로, 유산균 발효용 제조시 prophage cured strain을 종균으로 사용할 때는 각별히 유의해야 함을 알 수 있었다.

이에 따른 구체적인 원인의 규명은 앞으로 phage  $\Phi$  FSV의 흡착기구 및 발현 그리고 DNA의 연구로써 보완되어져야 하리라고 본다.

### 요 약

Phage  $\Phi$  FSV가 유산균의 배양에 미치는 영향을 조사하기 위하여 prophage  $\Phi$  FSW를 보유한 *L. casei* YIT 9018 균주나 prophage cured strain인 *L. casei* HYM 1213 균주에 phage  $\Phi$  FSV(Lac S21)나 wild type phage  $\Phi$  J-1(Lac J-1)을 임의의 농도로 각각 감염시켜 이들 균주의 증식을 비교하였다. Lac S21 phage를 *L. casei* YIT 9018 균주에 감염시켰을 경우,

초기 감염농도가  $6.0 \times 10^6$  pfu/ml 미만인 시료에서는 균주의 성장 및 유산생성능이 정상적이었으며, 오히려 phage수는 감소하였다. 그러나 *L. casei* HYM 1213 균주는 Lac S21 phage에도 민감하게 반응하여, 감염된 균주는 감염시킨 농도에 상관없이 모두 2일균에서 phage가  $10^9 \sim 10^{10}$  pfu/ml로 급격히 증가하였으며, 계속 배양함에도 phage는 감소되지 않고 6일균에서  $10^7 \sim 10^9$  pfu/ml로 유지되었고, 이로 인하여 유산균은 정상 발효를 못하였다. 따라서 phage  $\phi$  FSV는 모균주인 *L. casei* YIT 9018 균주에는 어떠한 영향도 미치지 못하고, 오히려 prophage cured strains에는 민감하게 작용하여 비정상 발효를 유도함을 알 수 있었다. 또한, Lac J-1 phage는 prophage  $\phi$  FSW를 보유한 *L. casei* YIT 9018 균주와 prophage cured strain인 *L. casei* HYM 1213 균주에 모두 민감하게 감염되어 phage의 농도가 급증하고, 이로 인해 균주의 이상발효를 야기시켰다.

### 참고문헌

1. Yokokura, T., S. Kodaira, H. Ishiwa and T. Sakurai: *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 227 (1974)
2. Stetter, K.O.: *J. Virol.*, **24**, 685 (1977)
3. Sakurai, T., T. Takahashi and H. Arai: *Japan. J. Microbiol.*, **14**, 333 (1970)
4. Tohyama, K., T. Sakurai, H. Arai and A. Oda: *Japan. J. Microbiol.*, **16**, 385 (1972)
5. Shimizu-Kadota, M. and T. Sakurai: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1284 (1982)
6. Shimizu-Kadota, M., T. Sakurai and N. Tsuchida: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 669 (1983)
7. Shimizu-Kadota, M., M. Kiwaki, H. Hirokawa and N. Tsuchida: *Dev. Ind. Microbiol.*, **25**, 151 (1984)
8. Shimizu-Kadota, M. and N. Tsuchida: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 423 (1984)
9. Shimizu-Kadota, M., M. Kiwaki, H. Hirokawa and N. Tsuchida: *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 193 (1985)
10. Shimizu-Kadota, M., J.L. Flickinger and B.M. Chassy: *J. Bacteriol.*, **170**, 4976 (1988)
11. 이정준, 김경태, 백영진: 산업미생물학회지, **18**, 215 (1990)
12. Murata, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 667 (1971)
13. Khosaka, T.: *J. Gen. Virol.*, **37**, 209 (1977)
14. Murata, A.: 日農化, **43**, 311 (1969)

(Received March 14, 1991)

1. Yokokura, T., S. Kodaira, H. Ishiwa and T. Saku-