

PCR기법을 이용한 오이 모자이크 바이러스 개나리 분리주(CMV-Fk)의 동정과 구분

이상용* · 박선정 · 최장경¹
강원대학교 삼림자원보호학과, ¹농생물학과

Identification and Differentiation of Cucumber Mosaic Virus Isolated from *Forsythia koreana* (CMV-Fk) Using PCR Techniques

Sang Yong Lee*, Sun Jung Park and Jang Kyung Choi¹

Department of Forest Resources Protection, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT: Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used to identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolated from *Forsythia koreana* (CMV-Fk). RT-PCR used by two set of 20-mer primers, one was CMV-common primers and another was CMV subgroup I-specific primers designed in a conserved region of the 3' end of CMV RNA3, amplified about 490 bp and 200 bp DNA fragments from CMV-Fk, respectively. CMV-Fk could be detected by RT-PCR at a dilution as low as 10⁻⁴ in forsythia crude sap extracts. Restriction enzyme analysis of RT-PCR products using *EcoRI* and *MspI* showed that CMV-Fk belonged to CMV subgroup I. But, analysis of RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction (RAP-PCR) showed heterogeneity of RNA3 between CMV-Fk and CMV-Y as a member of subgroup I.

Key words: CMV-Fk, primer, RT-PCR, restriction enzyme, RAP-PCR.

오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)는 현재까지 알려진 식물 바이러스 중에서 기주범위가 가장 넓은 바이러스로서(1, 16), 3종의 게놈 RNA와 외피단백질 서브게놈 RNA 및 RNA 4A 서브게놈 RNA로 구성된 다입자성 바이러스이며(5, 7, 8), 이들 게놈 RNA 이외에 위성 RNA를 갖고 있는 계통도 있다(24). CMV는 그들의 유전적 특성에 따라서 subgroup I(또는 DTL)과 subgroup II(또는 ToRS)로 분류되고 있는데(10, 16, 17), 이와 같은 분류 및 동정은 CMV의 연구에 있어서 가장 먼저 수행해야 할 과제 중의 하나이다. CMV는 혈청학적 검정, 외피단백질의 1차구조 비교 및 유전자 해석 등의 방법에 의하여 분류 및 동정되어 왔으나(3, 6, 9, 10, 15), 이와 같은 방법들은 복잡한 과정과 많은 시간이 소요된다는 단점이 지적되고 있다.

한편, RT-PCR(reverse transcription and polymerase chain reaction)을 이용한 바이러스 검정법은 기존의 방법 보다 실험 과정이 단순하고 정확성이 뛰어나기 때문에 CMV의 검정 및 동정에도 종종 이용되고 있다. 특히 Rizos 등(19)과 Singh 등(22)은 RT-PCR 및 제한효소를 이용하여 CMV subgroup을 분류하였으며, 이

방법은 국내의 CMV 관련 연구에도 적용되어 그 실용성이 인정된 바 있다. 그러나 이 방법으로는 subgroup의 분류는 가능하나, 동일한 subgroup에 속하는 CMV 계통간의 차이는 알 수 없기 때문에, 이와 같은 단점을 보완할 수 있는 기법이 개발되어야 할 필요성이 있다.

따라서, 이 연구는 기존의 제한효소를 이용한 subgroup 분류법과 함께 특이적인 primer를 이용한 subgroup 분류법 및 RAP-PCR(RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction)을 이용한 유연관계 분석법을 개발하여, 개나리로부터 분리한 오이 모자이크 바이러스 CMV-Fk(12)의 subgroup 분류 및 유연관계 구분에 적용시켜 그 실용성을 검정하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 바이러스. 모자이크 병징의 개나리로부터 분리한 CMV-Fk(12)를 공시바이러스로 사용하였으며, 대조 바이러스로는 일본의 Takanami 박사(九州大學)로부터 제공 받은 subgroup I의 CMV-Y 및 미국 Cornell 대학의 Palukaitis 박사로부터 분양받은 subgroup II의 CMV-Ls를 사용하였다. 각 바이러스는 *Nicotiana glutinosa*에 즙액 접종하여 증식시켰으며, 접종 7~10일 후

*Corresponding author.

에 채집하여 실험에 사용하였다.

조즙액 추출. RT-PCR을 위한 조즙액의 추출은 Lee 등(12)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 즉, *N. glutinosa* 및 개나리 이병엽 0.1 g을 액체 질소를 이용하여 마쇄한 다음 TE buffer(pH 8.0) 200 μ l에 현탁 시켰으며, 여기에 같은 양의 phenol/chloroform(1:1 v/v)을 첨가하여 교반한 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심하여 상층액을 얻었다. RT-PCR에 의한 바이러스 검출한계 검정에는 이 상층액을 각각 10배씩 연속적으로 희석하여 사용하였다.

Primer. PCR 검정용 primer는 지금까지 보고된 CMV RNA3의 염기배열(3, 10, 15, 17, 21)을 분석하여 제작하였다. 먼저, CMV subgroup I과 subgroup II에 공통인 primer는, Lee 등(11)의 방법에 따라서, CMV RNA3의 외피단백질 유전자 부분과 3' 말단의 비번역부위에 존재하는 5'-TGATAAGAAGCTTGTTCCGC-3'의 upstream primer(P1)와 5'-TTAGCCGTAAGCT-TGGATGGA-3'의 downstream primer(P2)를 사용하였다. 또한, CMV subgroup I만을 특이적으로 검출하기 위한 primer는 CMV-Y RNA 3 외피단백질 유전자의 1635~1654의 염기배열에 해당하는 5'-CGTAAAGTT-TCTGCCTCCTC-3'의 upstream primer(SP1)와 1814~1835의 염기배열에 해당하는 5'-CGTCTTTTGAATACACGAGG-3'의 downstream primer(SP2)로서, 이는 subgroup I에만 특이적으로 존재하는 염기배열이었다.

RT-PCR. RT-PCR은 Lee 등(11)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 담배 및 개나리 이병엽 조직의 조즙액 2 μ l에 반응완충액(10 mM Tris, pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM dNTP, 10 mM DTT), 및 15 unit AMV reverse transcriptase(Promega)와 primer를 각각 100 pM 첨가한 총 100 μ l 반응액을 42°C에서 30분동안 역전사 반응을 실행한 후, 95°C에서 2분간 변성 처리하였으며, 이 반응액에 2.5 units *Taq* DNA polymerase (Promega)를 첨가하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR은 Minicycler(MJ Research)를 이용하여 94°C에서 45초, 42°C에서 45초 및 72°C에서 2분간 35회 처리하였다(단, 최종회는 72°C에서 10분). PCR에 의한 증폭 산물은 2 Kbp DNA ladder(Bio-Rad)를 분자량 마커로 사용하여 2% agarose gel에서 전기영동에 의하여 분석하였다.

제한효소 처리. RT-PCR 증폭 산물은 제한효소 *EcoRI* 및 *MspI*(Promega)을 이용하여 분석하였다. 즉, 증폭된 DNA 산물 26 μ l에 *EcoRI* 또는 *MspI* 1 μ l(10 unit)와 10X 제한효소 완충액(Promega) 3 μ l를 첨가한 총 30 μ l의 반응액을 37°C에서 2시간 처리한 후 2% agarose gel에서 전기영동에 의하여 분석하였다.

RAP-PCR. RAP-PCR은 Michael 등의 방법(13)에 준하여 실시하였다. 즉, CMV 감염 담배의 조즙액 10 μ l에 2X 반응완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM

KCl, 8 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 0.2 mM dNTPs) 및 15 unit AMV reverse transcriptase(Promega)와 P2 primer 100 pM를 첨가한 총 20 μ l 반응액을 37°C에서 15분동안 역전사 반응을 실시한 다음 95°C에서 2분간 처리 후, 4°C로 냉각시켰다. 그 다음 이 반응액에 20 μ l의 2X 반응완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂), 100 pM P2 primer, 10 M Random Hexamer(Promega) 및 1 unit *Taq* polymerase(Promega)를 첨가하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 40°C에서 5분 및 72°C에서 5분간 1회 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분 및 72°C에서 1분간 35회 실시하였다. 반응 산물은 2% agarose gel에서 분석하였다.

결 과

RT-PCR에 의한 CMV-Fk의 동정. CMV-Fk에 감염된 *N. glutinosa*의 조즙액을 대상으로, CMV RNA3의 공통 primer 및 subgroup I에 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. 먼저 CMV subgroup I 및 subgroup II RNA3의 공통 primer인 P1과 P2를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, CMV-Fk 뿐만 아니라 subgroup I인 CMV-Y 및 subgroup II인 CMV-Ls에서도 증폭 산물이 검출되었다(Fig. 1A). 단, CMV-Fk로부터 증폭된 DNA 단편의 크기는 약 490 bp로 CMV-Y의 경우와 같았으나, CMV-Ls로부터 증폭된 DNA 단편의 크기는 약 500 bp임을 확인할 수 있었다. 한편, CMV subgroup I에 특이적인 primer인 SP1 및 SP2를 이용하여 RT-PCR을 실시하였을 경우, CMV-Fk로부터는 CMV-Y와 마찬가지로 약 200 bp의 DNA 단편이 증폭되었음을 확인할 수 있었으나, subgroup II인 CMV-Ls에서는 증폭 산물을 검출할 수 없었다(Fig. 1B).

RT-PCR에 의한 CMV-Fk의 검정 한계. RT-PCR에 의한 개나리 이병엽 조직으로부터의 바이러스의 검출 한계를 알아보기 위하여, 모자이크 병징을 나타내는 개나리 엽조직으로부터 추출한 조즙액을 10배씩 단계적으로 희석하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, 본 방법에 의하여 RT-PCR을 실시할 경우, 10⁻⁴까지 희석한 조즙액에서도 CMV-Fk의 증폭산물을 명확하게 검출할 수 있었다(Fig. 2). 한편, 원액의 조즙액으로부터 증폭된 DNA산물의 농도는 10⁻⁴까지 희석한 조즙액의 농도보다 상대적으로 낮았다.

***EcoRI* 및 *MspI*을 이용한 CMV-Fk의 subgroup 분류.**

Primer P1 및 P2를 사용하여 RT-PCR을 실시한 후 크기 약 490~500 bp의 증폭된 DNA 산물을 제한효소 *EcoRI*으로 처리한 결과, CMV-Fk의 경우는 CMV-Y와 같이 처리 전과 동일한 크기인 490 bp의 DNA 단편이 검

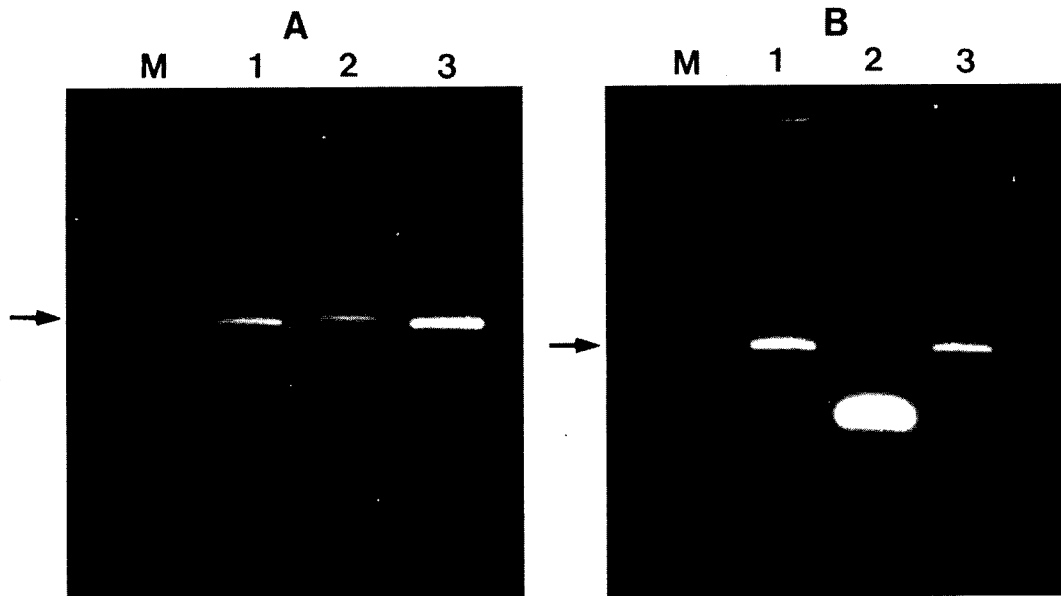


Fig. 1. RT-PCR assays of CMV isolates propagated in *N. glutinosa*. (A) RT-PCR assays with CMV-common primers. (B) RT-PCR assays with CMV subgroup I-specific primers. Each panel consists of a 2 Kbp DNA ladder (M), amplified DNA fragment of CMV-Y (lane 1), CMV-Ls (lane 2), and CMV-Fk (lane 3). Arrows indicate the expected size of DNA fragment amplified by RT-PCR.

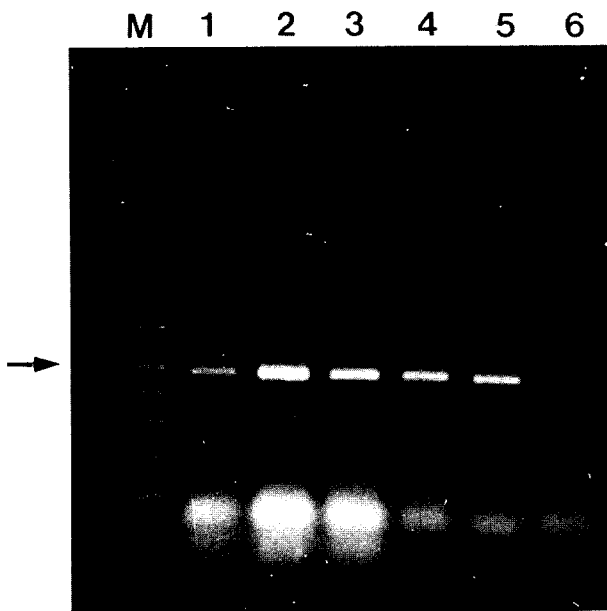


Fig. 2. RT-PCR assays of CMV-Fk from forsythia leaf tissues: Lanes 1 to 6, plant extract from virus-infected leaf tissues diluted 1 to 10^5 times, respectively. M: 2 Kbp DNA ladder. Arrow indicates the expected size of DNA fragment amplified by RT-PCR.

출되어, *EcoRI*의 인식부위가 존재하지 않음이 확인되었으나, subgroup II인 CMV-Ls의 경우는 329 bp와 173 bp의 두종류의 DNA 단편이 검출되어, 한 곳의 *EcoRI* 인식부위가 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3A). 또한 *MspI*의

처리 결과도 CMV-Fk는 CMV-Y와 동일하게 342 bp와 148 bp에 해당하는 두종류의 DNA 단편이 검출되어 한 곳의 *MspI* 인식부위가 존재함이 확인되었다(Fig. 3B, lane 1과 3). 반면 CMV-Ls의 경우는 3곳의 *MspI* 인식부위가 존재하기 때문에, 197 bp, 148 bp, 129 bp 및 28 bp의 4종류의 DNA 단편으로 절단되었으나, 그 중 28 bp의 DNA 단편은 낮은 농도로 인하여 전기영동상으로는 확인할 수 없었다(Fig. 3B, lane 2).

RAP-PCR에 의한 CMV-Fk의 유연관계 분석. 위의 RT-PCR을 이용한 검정에서 CMV-Fk는 CMV-Y와 같이 subgroup I에 속하는 것으로 확인되었으나, 이들 계놈 RNA간의 상동성은 확인할 수 없었다. 따라서 CMV-Fk와 공시 바이러스 간의 유연관계를 분석하기 위하여 CMV RNA3를 대상으로 RAP-PCR을 실시하였다. 그 결과, CMV-Ls에서는 800 bp의 단일의 DNA 단편만이 검출되었으나, CMV-Fk와 Y에서는 800 bp의 DNA 단편 외에 320 bp의 동일한 크기의 DNA 단편이 증폭되었다(Fig. 4). 그러나, 이러한 공통의 DNA 단편 이외에 CMV-Y에서는 600 bp의 DNA 단편이 검출된 반면, CMV-Fk에서는 200 bp의 DNA 단편이 각각의 바이러스에서 특이적으로 검출되어, 이 두 종류의 RNA3의 염기 배열에도 다소의 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

고 찰

CMV-Fk는 CMV-Y와는 혈청학적 성질은 동일하나

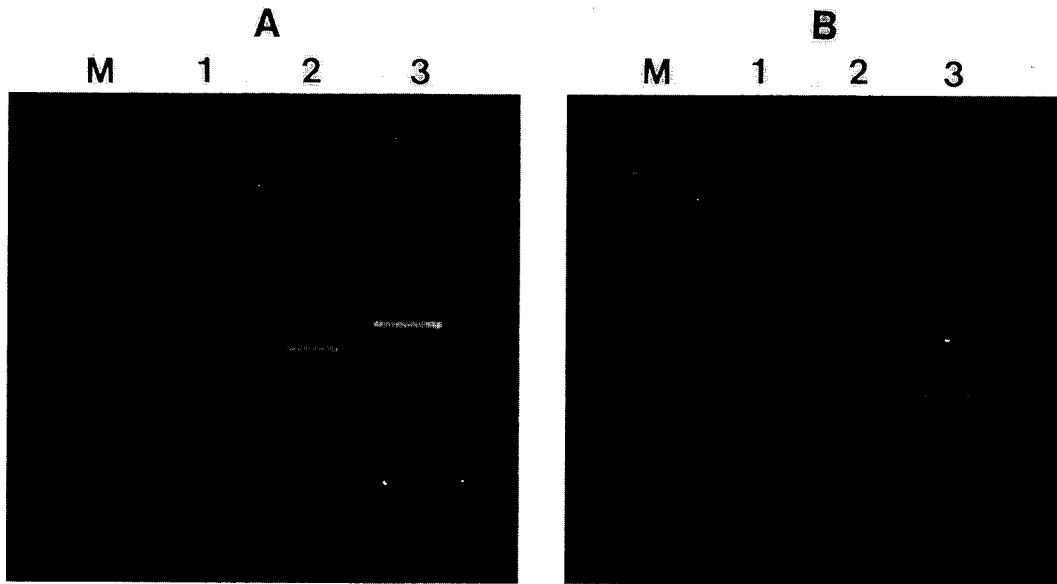


Fig. 3. Restriction enzyme analysis of RT-PCR products from CMV isolates. (A) *EcoRI* restriction analysis of RT-PCR products. (B) *MspI* restriction analysis of RT-PCR products. Each panel consists of a 2 Kbp DNA ladder (M), DNA fragments of CMV-Y (lane 1), CMV-Ls (lane 2), and CMV-Fk (lane 3).

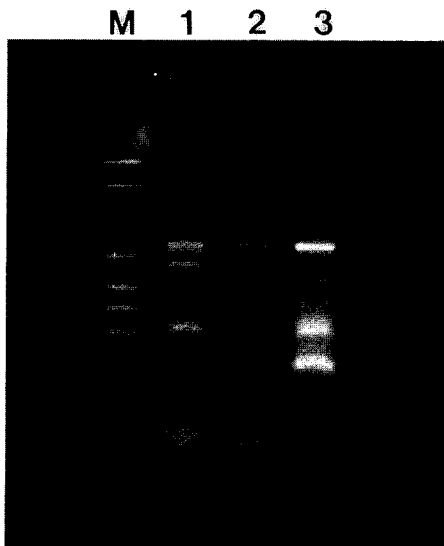


Fig. 4. RAP-PCR analysis of CMV RNA3 using random hexamer primer. Lanes 1 to 3, amplified DNA fragments from RNA3 of CMV-Y, Ls and Fk, respectively. M: 2 Kbp DNA ladder.

위성 RNA를 갖고 있지 않으며 이병즙액의 물리적 성질 및 전신감염 기주식물에서의 병원성이 다른 분리주로 보고 되었으나 subgroup의 분류는 아직 이루어지지 않았다(12). 따라서 본 실험에서는 RT-PCR 기법을 이용하여 CMV-Fk의 subgroup 분류 및 공시한 CMV 계통간의 유연관계를 분석하였다.

RT-PCR은 지금까지의 바이러스 검정방법에 비하여

비교적 간단하게 바이러스를 검출할 수 있기 때문에 여러 바이러스의 검정에 이용되어 왔으며(4, 14, 20, 23), De Blas 등(4)은 담배 이병 조즙액을 10^4 까지 희석시켰을 때도 CMV가 검출되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 개나리 이병엽 조즙액을 대상으로 RT-PCR을 실시하였는데, CMV 검출 한계는 10^4 였으며, 원액의 조즙액으로부터 증폭된 DNA 산물의 농도는 10^4 까지 희석한 조즙액의 농도보다 낮은 결과를 나타내었다. 본 방법에 의하여 바이러스를 검정할 경우 조즙액을 10~100배로 희석하여 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다. Rizos 등(19)과 Singh 등(22)은 CMV subgroup I과 II 간의 RNA3의 염기배열에 특이적인 차이점이 있음을 이용하여 PCR 증폭산물을 제한효소 *EcoRI* 및 *MspI*로 처리하여 그 때의 절단 특성에 따라 subgroup을 분류하였으며, Park 등(18)은 제한효소 *EcoRI* 및 *EcoRV*를 subgroup의 분류에 이용하였다. 또한 Lee 등(11) 및 Choi 등(2)도 우리나라에서 분리한 CMV 분리주들의 동정과 구분에 제한효소 *EcoRI* 및 *MspI*을 사용하여 좋은 결과를 얻은 바 있다. 본 실험에서도 외피단백질 유전자 부분을 포함하는 CMV RNA3의 3' 말단 부위의 PCR 증폭 산물을 *EcoRI* 및 *MspI*으로 처리하여 분석하였을 때, CMV-Fk는 subgroup I인 CMV-Y와 동일한 절단 부위를 갖고 있음이 밝혀졌다.

한편 CMV subgroup I의 외피단백질 유전자 부분에만 존재하는 특이적인 염기배열을 primer로 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과, CMV-Fk 및 CMV-Y에서는 동일한 크기의 DNA 단편이 증폭되었으나, subgroup II인

CMV-Ls에서는 증폭 산물이 검출되지 않았다. 따라서, 제한효소를 사용하지 않고, CMV subgroup I 특이적인 primer를 이용하여 보다 간단하게 subgroup 분류를 할 수 있음을 확인하였다.

RAP-PCR에 의하여 CMV-Fk, Y 및 Ls의 RNA3를 분석하였을 때도 subgroup I과 II간에는 뚜렷한 차이가 있었으며, 더욱이 subgroup I에 속하는 CMV-Fk 와 Y간에도 변이가 인정되었다. RAP-PCR은 주로 균류 및 세균류의 병원형 분류에 사용되는 방법이었으나 염기배열이 밝혀지지 않은 바이러스의 유연관계 추정에도 유용하게 사용할 수 있음이 이 실험의 결과로 확인되었다.

요 약

RT-PCR기법을 이용하여 개나리에서 분리한 오이 모자이크 바이러스(CMV-Fk)를 동정 및 구분하였다. CMV RNA3의 3' 말단 부근의 염기배열 중에서 CMV에 공통인 염기배열 및 CMV subgroup I에 특이적인 염기배열에 기초하여 제작한 2종류의 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 각각 200 bp 및 490 bp의 DNA 단편이 CMV-Fk로부터 증폭되었으며, RT-PCR에 의한 개나리 이병조증액으로부터의 바이러스 검출 한계는 10^4 이었다. 한편, RT-PCR에 의한 증폭산물을 제한효소 *EcoRI*과 *MspI*으로 처리한 결과도 CMV-Fk가 subgroup I에 속한다는 사실을 입증하여 주었다. 그러나, CMV RNA3의 RAP-PCR의 분석 결과는 CMV-Fk가 subgroup I에 속하는 CMV-Y와 다소 차이가 있음을 보여 주었다.

참고문헌

- Bos, L. and Maat, D. Z. 1974. A strain of cucumber mosaic virus seed-transmitted in beans. *Neth. J. Plant Pathol.* 80: 113.
- Choi, J. K., Kim, H. J., Hong, J. S., Kim, D. W. and Lee, S. Y. Identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolates in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 14: 7-12.
- Davies, C. and Symons, R. H. 1988. Further implications for the evolutionary relationships between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA 3. *Virology.* 165: 216-224.
- De Blas, C., Borja, M. J., Saiz, M. and Romero, J. 1994. Broad spectrum detection of cucumber mosaic virus (CMV) using the polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 141: 323-329.
- Ding, S., Li, W. and Symons, R. H. 1995. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J.* 14: 5762-5772.
- Edwards, M. C. and Gonsalves, D. 1983. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. *Phytopathology* 73: 1117-1120.
- Francki, R. I. B. 1985. The Plant Viruses, Vol 1, Polyhedral virions with tripartite genomes. Plenum, New York and London.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W. and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. No.213 In: Description of plant viruses. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England.
- Hasse, A., Richter, J. and Rabenstein, F. 1989. Monoclonal antibodies for detection and sero-typing of cucumber mosaic virus. *J. Phytopathol.* 127: 129-136.
- Hayakawa, T., Mizukami, M., Nakajima, M. and Suzuki, M. 1989. Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain Q : Comparative study of nucleotide sequence and amino acid sequences among CMV strain O. Q. D and Y. *J. Gen. Virol.* 70: 499-504.
- Lee, S. Y., Hong, J. S., Lee, J. S. and Choi, J. K. 1996. Detection of CMV by RT-PCR using a simple and rapid crude sap extraction method. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 432-436.
- Lee, S. Y., Park, S. J. and Choi, J. K. 1997. Characterization of an isolate of cucumber mosaic virus from forsythia (*Forsythia koreana* Nakai.). *Korean J. Plant Pathol.* 13: 358-363.
- Michael, A. L., David, H. G. and John, J. S. 1995. RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. In: PCR Strategies. Academic Press, Inc., New York, pp. 259-267.
- Nishiguchi, M., Mori, M., Suzuki, F., Nagata, R., Morishita, T., Sakai, J., Hanada, K. and Usugi, T. 1995. Specific detection of a severe strain of sweet potato feathery mottle virus (SPFMV-S) by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54: 516-522.
- Nitta, M., Masuta, C., Kuwata, S. and Takanami, Y. 1988. Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA 3 between Y strain and Q strain. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54: 516-522.
- Normand, R. A. and Pirone, T. P. 1968. Differential transmission of strains of cucumber mosaic virus by aphids. *Virology* 36: 538.
- Owen, J., Shintaku, M., Aeschleman, P., Tahar, S. B. and Palukaitis, P. 1990. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strain: CMV RNA3. *J. Gen. Virol.* 71: 2243-2249
- Park, W. M., Ryu, K. H., Kim, S. J. and Choi, J. K. 1995. Rapid detection and identification of cucumber mosaic virus by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction analysis. *J. Plant Biol.* 38(3): 267-274
- Rizos, H., Gunn, L. V., Pares, R. D. and Gillings, M. R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* 73: 2099-2103.
- Roberson, N. L., French, R. and Gray, S. M. 1991. Use of group specific primers and polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. Gen.*

- Viol.* 72:1473-1477.
21. Shintaku, M. 1991. Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *J. Gen. Virol.* 72: 2587-2589.
 22. Singh, Z., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. 1995. Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. *Plant Dis.* 79: 713-716.
 23. Takamatsu, S., Lin, B., Furuta, H. and Makara, K. 1994. RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus coat protein gene. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 60:487-490.
 24. Takanami, Y. 1981. Striking change in symptoms on cucumber mosaic virus infected plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109: 120-126.

(Received June 22, 1998)