

Forsøg på etablering af virusinfektion i plantepatogene svampe

Experiments on virusinfections in phytopathogenic fungi

Lene Lange

Resumé

Infektion af byg sribemosaik virus (BSMV) blev søgt etableret i tre plantepatogene svampe (*Gaeumannomyces graminis*, *Aureobasidium bolleyi* og *Pythium ultimum*), dels ved at svampene voksede i systemisk virusinficeret plantemateriale (byg), dels ved at svampene dyrkedes på BSMV-holdigt substrat.

I begge tilfælde undersøgtes svampene for optagelse af viruset ved inokulation til testplanter og ved elektronmikroskopiske undersøgelser.

Som baggrund for disse forsøg lå oplysninger fra de seneste år, om at en virusinfektion kan ændre styrken i en plantepatogen svamps angreb, og at det skulle være muligt at inficere svampe med plantevira.

Det blev imidlertid i ingen af de her afprøvede forsøgsopstillinger påvist, at en optagelse af BSMV i svampene havde fundet sted.

Ved elektronmikroskopiske undersøgelser af bygrødder inficeret med BSMV og henholdsvis *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum* påvist, at disse svampes mycelium invaderer sikarcellerne, og at viruset også optræder med størst koncentration i denne celletype. Værtscytoplasmaet i umiddelbar nærhed af svampehyferne var typisk stærkt omdannet, men indeholdt tilsyneladende aldrig intakte viruspartikler.

Nøgleord: Byg, BSMV, *Gaeumannomyces*, *Aureobasidium*, *Pythium*.

Summary

The infection of barley stripe mosaic virus (BSMV) in three phytopathogenic fungi (*Gaeumannomyces graminis*, *Aureobasidium bolleyi*, and *Pythium ultimum*) was attempted in two different ways: 1) by growing the fungi in BSMV-infected barley plants or 2) by growing the fungi on agar substrate to which BSMV was added. The fungi were in both cases reisolated and transferred to virus-free media. The fungal mycelia were then used to inoculate test plants in order to determine whether or not an uptake of virus into the fungi had taken place. Further, the fungal mycelium grown free from the host and the double infected barley roots (= infected with both fungus and virus) were prepared for electron microscopy and examined for presence of virus particles inside the fungal hyphae.

These experiments were conducted to test various methods for the *in vitro* infection and fungi with plant viruses in order to test whether a virus infection may alter the pathogenicity of the fungus. No evidence was, however, found in the present experiments for an uptake of BSMV into the fungi. It was shown by EM-studies that the mycelium of both *G. graminis*, *A. bolleyi*, and *P. ultimum* may invade the cells of the phloem region of the roots in which there is the highest concentration of BSMV particles. A possible fungal induced damage to the host cytoplasm in the proximity of the fungal hyphae was frequently observed but the presence of intact BSMV particles in the host cytoplasm altered in this way was not demonstrated.

Keywords: Barley, BSMV, *Gaeumannomyces*, *Aureobasidium*, *Pythium*.

Indledning

Emnet interrelationer mellem svampe og virus har foruden et mykologisk og et virologisk aspekt også generel plantepatologisk relevans (Lemke & Nash, 1974). Med dette som udgangspunkt kan emnet rubriceres i 3 områder, med hver deres plantepatologiske aspekter:

1) Svampebåren virussmitte, hvor svampen fungerer som vektor for planteviruset (Grogan & Campbell, 1966; Lange, 1976).

2) Synergisme ved symptomdannelse, der kan forekomme, hvor en vært er samtidig både svampe- og virusinficeret (Nitzany, 1966; Reyes & Chada, 1972).

3) Ændring i angrebsstyrken hos phytopatogene svampe, forårsaget af en virusinfektion i svampen; det er bemærkelsesværdigt, at der har været påvist eksempler, både på, at en sådan virusinduceret effekt skulle betyde et fald i svampens angrebsstyrke (Hollings & Stone, 1971; Lemaire et al., 1971) og eksempler på, at det har bevirket en stigning i patogeniteten (Bozarth et al., 1972).

De vira, der er tale om under 1) og 2), er egentlige plantevira, der ikke med sikkerhed er påvist at kunne multiplicere inden i svampeceller; partiklerne af disse vira har et nukleinsyreindhold af enkeltstrengt RNA. Derimod er de virusinfektioner, der indtil nu har været tale om under 3), forårsaget af vira, der udelukkende er beskrevet fra infektioner i svampe; de har et nukleinsyreindhold af dobbeltstrengt RNA, og den sfæriske partikelform er den langt overvejende. Disse vira benævnes svampevira eller mycovira. Som virusgruppe betragtet kan mycovira nærmest sammenlignes med grupper inden for de dyriske vira, der ligeledes karakteristisk har et indhold af dobbeltstrengt RNA. (Det er i øvrigt tankevækkende, at de 2 plantevira, der er påvist at indeholde dobbeltstrengt RNA (rice dwarf virus og wound tumour virus), har en dyrisk vektor, hvori viruset også replicerer).

Umiddelbart fremtræder vira, der inficerer højere planter, og mycovira altså som ret veladskilte grupper, men resultater af forsøg de seneste år (Brants, 1971; Subberayudu et al., 1973; Nienhaus & Mack, 1974) væsentligst foretaget med

Pythium-arter og tobak mosaik virus, peger dog i retning af, at der *in vitro* kan etableres smitte af en svamp med et plantevirus.

Som baggrund for det neden for beskrevne projekt (forsøg på at etablere en infektion af byg sribemosaik virus i forskellige plantepatogene svampe) ligger en kombination af de her nævnte erfaringer: dels at en virusinfektion kan ændre styrken i en patogen svamps angreb, og dels muligheden for at svampe kan inficeres med plantevira. Det langsigtede mål om en eventuel anvendelse af vira til biologisk bekæmpelse af nogle patogene svampe er oplagt drivkraften bag disse forsøg.

Materialer og metoder

Forsøgsorganismer: Fra bygplanter af sorten 'Wing', systemisk inficeret med byg sribemosaik virus (BSMV), høstede kerner, der blev bestemt til at have en infektionsprocent på ca. 50–60.

Disse kerner såedes i Peralit, hvori en plade af kartoffel dextrose agar (KDA) med kulturer af henholdsvis *Gaeumannomyces graminis*, *Aureobasidium bolleyi* og *Pythium ultimum* var placeret (se Fig. 1).

Renfremstilling af BSMV: Et parti af ovennævnte BSMV-inficerede bygkerner anvendtes som udgangsmateriale for opformering af BSMV til renfremstilling; symptombærende blade blev høstet ca. 4 uger efter såningen. Som renfremstillingsmetode blev anvendt en teknik beskrevet af L.C. Lane, 1974.

Elektronmikroskopi (EM): a) Udskaarne stykker af BSMV-inficerede bygblade og bygrødder fikseredes i 3 timer i 6 pct. glutaraldehyd (Karnowsky, 1965) ved 20°C og efterfikseredes i 2 pct. osmiumtetroxid i 17 timer ved ca. 4°C. b) Stykker af bygrødder inficeret med BSMV og henholdsvis *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum* fikseredes i 3 timer i 2 pct. glutaraldehyd i fosfatbuffer (ved 20°C) og efterfikseredes i 2 pct. osmiumtetroxid i 4 timer (ved 4°C). a og b). Efter 4 gange skylning i dobbelt destilleret vand kontrastfarvedes materialet i mættet uranyl acetat i 1 time, hvorefter det blev dehydreret i etanol og propylenoxid og indlejret i Spurr resin (Spurr, 1969). Tyndsnit blev fremstillet på en LKB ultramikrotom og farvet i

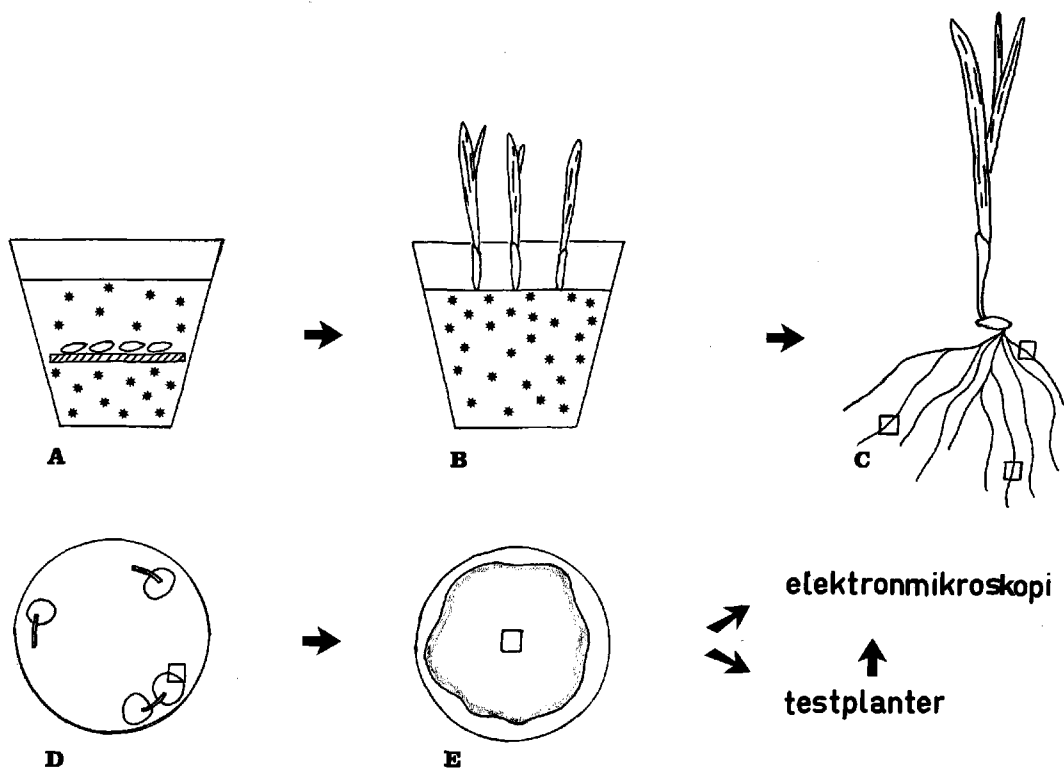


Fig. 1. Skema over forsøgsgangen. a) BSMV-inficerede bygkorn sået i peralit på agarplade med kultur af en af de tre svampearter. b) Bygplanter ca. 2 uger gamle. c) Udtaget plante med stribemosaik symptomer. d) Rødder fra c) lagt på agarplade. Svampevækst angivet ud fra fire rodender. e) svamp fra d) overført til ny agarplade. Efter vækst testes svampen for indhold af BSMV ved elektronmikroskopi og ved inokulation til testplanter.

Fig. 1. Schematic representation of the experimental procedure. a) BSMV-infected barley seeds sown in peralite on agar with growth of one of the three fungal species. b) Barley plants two weeks old; stripe mosaic symptoms may be seen. c) Selected barley plant with BSMV symptoms from which root material is to be taken (designated by small squares). d) Roots from c) placed on agar in a Petrie dish. Fungal growth is designated from 4 root ends. e) The fungus from d) transferred to a new agar media. After growth, the fungus is tested for BSMV-infection by electron microscopy and by test plant inoculations.

uranyl acetat og Reynolds blycitrat (Reynolds, 1963). Undersøgelser og fotografering blev foretaget med et Philips 201 S elektronmikroskop.

Forsøgsopstillinger og resultater (Resultater i kursiv)

Virusinfektion i svampene blev søgt etableret på to måder: I) ved at svampen optager virus fra værtsplanten, ved at parasitere en virusinficeret plante, og II) ved at svampen optager virus fra et agarsubstrat indeholdende virus.

For hver af de 3 svampe, *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum*, opsattes 18 potter med 10 bygkorn sået i hver (se skema over forsøgsgangen, fig. 1). Efter 4 ugers vækst udskilte de bygplanter, der var smittet med *G. graminis*, sig væsentligt fra de andre ved lavere vækst, sparsomt rodnet og svagere BSMV-symptomudvikling. Stribemosaik symptomerne var dog i alle 3 × 18 potter så tydelige i over halvdelen af de ca. 500 bygplanter, at disse kunne udvælges til videre forsøgsbrug.

I a). I første omgang optoges (med den mindst mulige ødelæggelse af rodnettet) 6 planter fra 12 af de 18 potter af hver art. Planterne fra samme potte regnedes for én forsøgsenhed, således at der her var tale om 12 forsøgsenheder pr. svampeart, hvor hver enhed indeholdt flere gentagelser. Rødderne vaskedes i rindende vand, og der udtoges rodstykker af ca. 5 mm's længde, fortrinsvis symptombærende, fra forskellige steder på rodnettet (se fig. 1 c). Disse blev efter sæbeafvaskning og skylning i 30 min. lagt på KDA-plader (fig. 1 d). Der blev opsat 4 plader for hver forsøgsenhed. Efter ca. 2 ugers vækst aflæstes pladerne for svampevækst ud fra enderne af rodstykkerne. Dette var tilfældet for henholdsvis 10, 5 og 7 af de 12 forsøgsenheder af *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum*; for hver enhed var der mellem 1 og 9 rodstykker, der havde slået an (i eksemplet i fig. 1 d er alle 3 rodstykker slået an). Udskårne stykker af disse kolonier anvendtes til at pode over på nye KDA plader (fig. 1 e). Efter vækst blev svampene anvendt som inokulum til blade af testplanter (*Chenopodium amaranticolor* og *C. quinoa*) for påvisning af et eventuelt virusindhold (for symptombillede, se *Kristensen & Engsbro 1970*, fig. 2 og 3). Dette ekstra ompodningsled blev indskudt for at sikre, at en eventuel påvist virusinfektion ikke kunne skyldes diffusion af viruspartikler ud i substratet fra de overskårne rodender. Efter fīndeling af myceliet i morter, tilsat karborundum, inokuleredes til de ligeledes karborundum-pudrede testplanteblade.

Resultatet af samtlige af disse inokulationer var negative, mens kontrolinokulationerne af henholdsvis rodstykker fra de oprindelige bygplanter og af agar tilsat BSMV i forholdet 1:80 gav henholdsvis 80 og 130 lokallæsioner pr. Chenopodium blad.

I b). Fra de resterende 6 af de 18 potter pr. art udtoges de symptombærende planter og anbragtes i fugtigt kammer i fra 1 til 4 uger for at stimulere dannelse af frit mycelium uden for rødderne; dette lykkedes bedst for *G. graminis*. Fra sådanne planter podedes frit mycelium over til agar (tilsat antibiotika), og efter vækst anvendtes disse kulturer direkte til testplante-inokulationer.

Også ved denne fremgangsmåde var samtlige

inokulationer imidlertid uden positive virussymp-tomer. Som kontrol for at selve inokulationsmāden fungerede anvendtes her testplante-inokulationer af rødderne, efter de havde ligget i fugtigt kammer i det pågældende tidsrum. Resultatet var ca. 60 lokallæsioner pr. testplanteblad.

II). For at teste om de 3 forsøgssvampe, *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum* kunne optage BSMV fra et agar-substrat, opsattes følgende forsøg: 400 ml KDA tilsattes (v. 38°C) 5 ml renfremstillet BSMV. Fra stamkulturene podedes de 3 svampearter over på dette substrat. Efter 2 ugers vækst ompodedes til virusfrit substrat. Efter yderligere ca. 2 ugers vækst inokuleredes myceliet fra periferien af de udvoksede kolonier af de 3 svampearter til testplanter som beskrevet ovenfor. *Samtlige inokulationer var negative, mens kontrolinokulationer af den virusholdige agar og af virus fortyndet i forholdet 1:80 gav godt 100 lokallæsioner pr. testplanteblad af C. quinoa og C. amaranticolor.* (Det skal dog bemærkes, at ca. 1/4 af de ompodede kulturer var meget uregelmæssige i deres vækst, hvilket gav kulturerne en væsentlig forskellig fremtræden fra, hvad der var observeret under forsøg I. Forsøgsresultaterne kan imidlertid ikke give nogen forklaring på dette fænomen, da både testplanteinokulationerne og EM-undersøgelserne var negative med hensyn til påvisning af et indhold af virus).

Resultater af EM undersøgelserne

Påvisning af tilstedeværelse af BSMV ved hjælp af elektronmikroskopi blev foretaget ved direkte præparater af både rodstykker og af symptombærende testplanteblade (fig. 2). Indhold af BSMV blev ligeledes demonstreret ved undersøgelse af tyndsnit af indlejrede blade og rødder af forsøgsleddenes bygplanter (fig. 3, 4 og 5).

Koncentrationen af BSMV-partikler i sikarcel-lerne var relativ høj både i blade med stærke symptomer og i blade med svage symptomer på sribemosaik. Viruspartiklerne forekom enten relativt spredt i cytoplasmaet (fig. 3 og 5) eller som tæt pakke formationer. På fig. 5 er med pile angivet eksempler på tværsnit og længdesnit af BSMV-partikler, hvor den centrale lumen i prote-

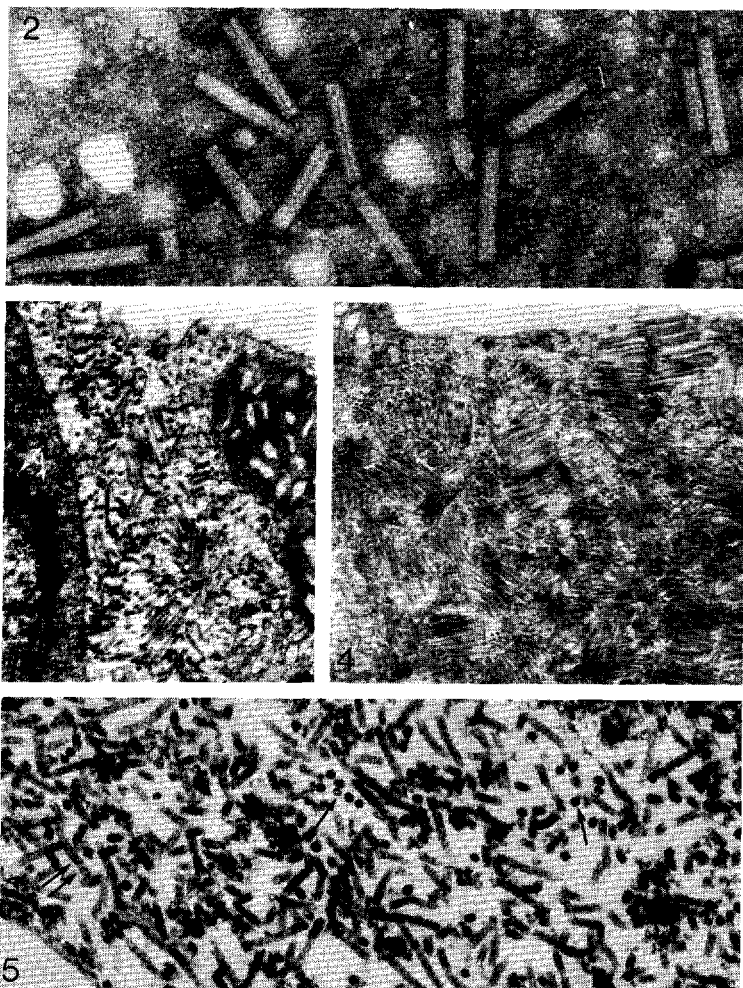


Fig. 2. BSMV partikler, negativt farvet i PTA. Præparatet fremstillet direkte fra BSMV-inficeret bygblad. $\times 128.000$.

Fig. 2. BSMV particles negatively stained in PTA. Prepared from infected barley leaves by the cut-squeeze method. $\times 128.000$.

Fig. 3. BSMV partikler i tyndsnit af bygblad. Chloroplast og mitokondrier delvist ødelagt grundet virusinfektionen. (Pilene angiver rest af grana stakke i chloroplast). $\times 38.000$.

Fig. 3. BSMV particles in ultrathin section of barley leaf. The host organelles (chloroplasts and mitochondria) have a necrotic appearance caused by the virus infection (arrows: remnants of grana in the chloroplast). $\times 38.000$.

Fig. 4. Stor inklusion af BSMV partikler i sikarcelle i bygrød. $\times 24.500$.

Fig. 4. Inclusion of BSMV particles in a phloem cell of a barley root. $\times 24.500$.

Fig. 5. Som fig. 3. Viruspartiklernes centrale hulhed ses både i tværsnit (enkel pil) og længdesnit (dobbel pil). $\times 63.500$.

Fig. 5. As Fig. 3. The central lumen of the virus particles may be seen in both cross section (arrow, single) and in longitudinal section (arrow, double). $\times 63.500$.

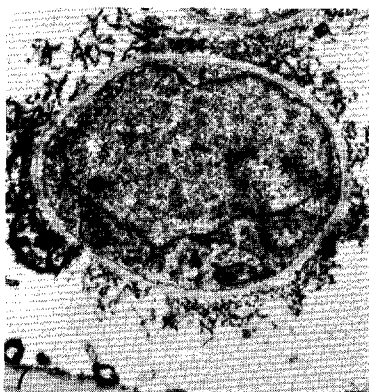
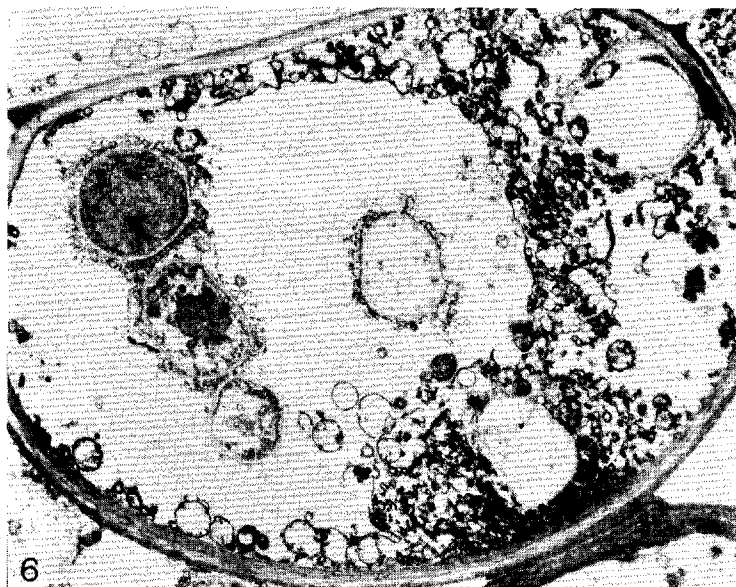


Fig. 6. Sikercelle af bygrod inficeret med *G. graminis*. Foruden tværsnit af svampehyfer ses, at hele værtscellens cytoplasma er nekrotiseret. $\times 5.250$.

Fig. 6. Phloem cell of a barley root infected with *G. graminis*. The fungal hyphae are shown in cross section. The host cytoplasm has a necrotic appearance throughout the cell. $\times 5.250$.

Fig. 7. Tværsnit af *G. graminis* hyfe i sikercelle i bygrod. Svampehyfen er omgivet af rester af værtscytoplasma. $\times 12.000$.

Fig. 7. Cross section of hypha of *G. graminis* in a phloem cell of a barley root. Remnants of host cytoplasm surrounds the hypha. $\times 12.000$.

Fig. 8. Indtrængning af hyfe af *G. graminis* i en ny celle. (V = værtscellevæg). $\times 12.500$.

Fig. 8. *G. graminis* penetrating the host cell wall into a neighbouring cell (v = host cell wall). $\times 12.500$.

inkappen kan skelnes som henholdsvis et lyst centrum eller en lys midterlinje.

I rødderne blev BSMV partiklerne (som i bladene) påvist i en høj frekvens af de undersøgte sikarceller. I fig. 4 er gengivet en stor inklusion af BSMV partikler; mest almindeligt forekom BSMV partiklerne dog i formationer bestående af et langt lavere antal viruspartikler.

Generelt kan det siges om ultrastrukturen i de BSMV-inficerede celler, at den cytoplasmatiske organisation var intakt, men de enkelte organeller (specielt chloroplasterne, men også mitokondrier og ribosomer) bar tydelig præg af startende nedbrydning eller nekrotisering (pilene i fig. 3 angiver en ødelagt grana stak). Ved EM-undersøgelser af negativt-farvede udtæk af findelt mycelium af *G. graminis*, og *A. bolleyi* og *P. ultimum* fra forsøgsleddene under I a, I b og II blev ikke konstateret indhold af BSMV partikler. Der blev heller ikke for nogen af de 3 svampearters vedkommende påvist tilstedeværelse af BSMV i tyndsnit af svampehyfer inden i de dobbeltinficerede rødder. Værtcytoplasmaet var typisk stærkt omdannet i området lige omkring svampehyferne (se fig. 6-8); men svampeinfektionen havde tilsyneladende også en nekrotisk effekt på resten af cellens cytoplasma (fig. 6). Det er bemærkelsesværdigt, at der aldrig blev observeret et indhold af viruspartikler i det således omdannede værtcytoplasma; en høj koncentration af BSMV partikler i en nabocelle til en svampeinficeret celle blev imidlertid iagttaget flere gange.

Diskussion

Resultaterne af de her beskrevne forsøg med byg, BSMV og de plantepatogene svampe *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum* peger entydigt på, at der ikke foregår nogen virusoptagelse i en svamp, der parasiterer en virusinficeret vært, selv om både svamp og virus kan være til stede i samme sikarsområde af værtplantens rod. Ligeledes viser forsøgene, at der ikke i svampen foregår optagelse af virus fra substratet, hvorpå denne dyrkes.

Som kontrol for, at de negative resultater ikke skyldtes omstændigheder ved forsøgsgangen,

blev der anvendt 2 principielt forskellige metoder. Metoden beskrevet under I b må anses for at være den mest besværlige at arbejde med, da der her kun udvikledes frit mycelium i relativt små mængder sammenlignet med kolonier udvokset på agarplader. At forsøgsgangen under I b eliminerer hele udsærings- og afvaskningsprocessen og alligevel giver samme resultat som under I a bestyrker pålideligheden af resultaterne. Det skal dog tilføjes, at forsøgsresultaterne også kan dække over, at små mængder virus optages, men ikke replicerer og spredes i myceliet, hvorved det fortyndes ved svampens vækst og således overordentlig let undgår at blive erkendt ved test baseret på stikprøveudvælgelse.

Selv om de her beskrevne forsøg entydigt peger i én retning, er det forhastet at forsøge at konkludere noget generelt om dette felt. Det skal dog bemærkes, at næsten alle af de (få) beretninger, der eksisterer om *in vitro* optagelse af et plantevirus i en svamp er baseret på forsøg med tobak mosaik virus (Brants, 1971; Subberayudu et al., 1973; Nienhaus & Mack, 1974).

Som det fremgår af fig. 6-8, og som beskrevet under »Resultater« er værtcytoplasmaet i *G. graminis*, *A. bolleyi* og *P. ultimum*-inficerede celler typisk stærkt omdannet. At der ikke har kunnet påvises et indhold af BSMV partikler i disse celler kan lede til en formodning om, at virusreplikation ikke er mulig i cytoplasma, hvor svampe har induceret en nekrotisering. Dette kunne svare til den generelle erfaring, at virusreplikation ved angreb af plantevirus falder efter et vist punkt i takt med en fremadskreden nekrotisering af vævet.

De negative resultater her med hensyn til optagelse af virus stemmer overens med opfattelsen af, at svampevæggen i forbindelse med spredning af mycovira er en meget effektiv barriere; således sker smitte fra et mycelium til et andet så vidt vides kun ved egentlig hyfefusion. Den øvrige spredning foregår ved hjælp af spore- eller konidiesmitte, og der er ikke påvist nogen vektorer for denne virusgruppe. Erfaringer fra protoplastforsøg (Bozarth, 1975; Lapierre et al., 1975) viser, at når denne vægbarriere er elimineret, kan virusinfektion etableres *in vitro* i svampeceller.

Konklusion

Der er ikke i disse forsøg med BSMV og de phytopatogene svampe, *Gaeumannomyces graminis*, *Aureobasidium bolleyi* og *Pythium ultimum* fremkommet noget, der tyder på, at en virusoptagelse i de parasiterende svampe finder sted. Flere forsøg af lignende tilsnit må dog udføres før noget generelt kan udsiges om dette emne. Af speciel interesse ville være forsøgsopstillinger, der åbner mulighed for at følge, hvad der sker når en svampehyfe trænger ind i en allerede virusinficeret celle.

Interessen i at fortsætte forsøgene trods de negative resultater uddybes af følgende: Den øgede viden om mycovira forstærker billedet af, at disse i deres svampeværter oftest giver årsag til latente infektioner, og at egentlige virussympotomer nærmest er undtagelsen (Lemke, 1974). Dette kan pege mod, at en eventuel manipuleret virus-induceret effekt på en svamps patogenitet snarere skal opnås ved en fremmed infektion. Erfaringer fra eksperimenter med virusinfektion af svampeprotoplaster kan blive af betydning for det fremtidige arbejde inden for dette felt og også i arbejdet med interrelationer mellem svampe og virus generelt.

Erkendtlighed

Jeg ønsker at takke laborant Nini Leroul for værdifuld assistance ved forsøgenes udførelse.

Arbejdet indgår som en del af et projekt om interrelationer mellem svampe og vira, der er finansieret af Det Naturvidenskabelige Forskningsråd.

Litteratur

- Bozarth, R.F., 1975: The problem and importance of transmission of mycoviruses using cell-free extracts. – 3rd Intl. Virol. (Madrid). Abstr. p. 148.
- Bozarth, R.F., H.A. Wood and R.R. Nelson, 1972: Virus-like particles in virulent strains of *Helminthosporium maydis*. – *Phytopathology* 62: 748.
- Brants, D.H., 1971: Infection of *Pythium sylvaticum* invitro with tobacco mosaic virus. – *Neth. J. Plant. Path.* 77: 175–177.
- Grogan, R.G. and R.N. Campbell, 1966: Fungi as vectors and hosts of viruses. – *Ann. Rev. Phytopathol.* 4: 29–51.
- Hollings, M. and O.M. Stone, 1971: Viruss that infect fungi. – *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 93–118.
- Karnowsky, M.J., 1965: A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. – *J. Cell. Biol.* 27, 137.
- Kristensen, H. Rønne og B. Engsbø, 1970: Forekomst og undersøgelser af byg sribemosaik i Danmark. – *Tidsskr. f. Planteavl* 74: 326–342.
- Lane, L.C., 1974: The component of barley stripe mosaic and related viruses. – *Virology* 58: 323–333.
- Lange, L., 1976: Some Chytridiaceous fungi their ultrastructure, life cycle, and their function as vectors for plant viruses. – Ph. D. -thesis at the University of Copenhagen, 225 pp.
- Lapierre, H., H. Lecoq, D. Spire, M. Boissonnet, and J. Chevaugnon, 1975: Les Mycovirus. – *Annales de Phytopathologie* 7/3: 236–239.
- Lemaire, J.-M., B. Jouan, B. Perraton and M. Saily, 1971: Perspectives de lutte biologique contre les parasites des céréales d'origine tellurique en particulier *Ophiobolus graminis*. Sacc. *Sciences Agronomiques Rennes*: 1–8.
- Lemke, P.A., 1974: Biochemical and biological aspects of fungal viruses. – *Proc. 1st. Intersec. Cong. IAMS* 3: 380–395.
- Lemke, P.A. and C.H. Nash, 1974: Fungal viruses. – *Bact. Rev.*: 29–56.
- Nienhaus, F. and C. Mack, 1974: Infection of *Pythium arrhenomanes* in vitro with TMV and TNV. – *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 81: 728–731.
- Nitzany, F.E., 1966: Synergism between *Pythium ultimum* and cucumber mosaic virus. – *Phytopath.* 56: 1386–1389.
- Reyes, A.A. and K.C. Chada, 1972: Interaction between *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* and turnip mosaic virus in *Brassica campestris* var. *chinensis* seedlings. *Phytopath.* 62: 1424–1428.
- Reynolds, E.S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. – *J. Cell. Biol.* 17: 208–212.
- Spurr, A.R., 1969: A low viscosity epoxy resin embedding media for electron microscopy. – *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31–43.
- Subberayudu, S., R. Padma, M.D. Gupta, and S.P. Raychaudhuri, 1973: Translocation of tobacco mosaic virus from tobacco callus cultures through hyphae of *Pythium debaryanum* Hesse. – *Current Sci.* 42: 325–326.

Manuskript modtaget den 5. april 1977.