

SELIM KRYCZYŃSKI

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego —
Akademia Rolnicza w Warszawie*

WIROIDY JAKO NOWA GRUPA CZYNNIKÓW CHOROBOTWÓRCZYCH ROŚLIN

Wstęp

Podręcznikowe definicje wirusów roślinnych uwzględniają zazwyczaj następujące fakty: 1) wirusy są najmniejszymi ze znanych czynników chorobotwórczych roślin, 2) nie posiadają własnej przemiany materii, 3) pod względem chemicznym są to nukleoproteidy. W praktyce często dziś jeszcze określa się chorobę jako wirusową na tej tylko podstawie, że jest to choroba infekcyjna, dająca objawy typowe dla chorób wirusowych, a nigdy nikomu nie udało się z porażonego materiału roślinnego wyizolować żadnych grzybów ani bakterii, które można by uznać za czynniki etiologiczne tej choroby. Nic więc dziwnego, że przy takim braku precyzji definicji, a zwłaszcza praktycznych kryteriów, ostatnio spośród wirusów roślinnych wyróżnia się nowe, zupełnie odrębne grupy czynników chorobotwórczych roślin. I tak w latach sześćdziesiątych wyodrębnione zostały mykoplazmy, a obecnie, w świetle prac Dienera i współpracowników (7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 45, 65, 66, 67), trzeba będzie chyba wyodrębnić wiroidy (ang. viroids). Prace te dotyczą „wirusa” wrzecionowatości bulw ziemniaka, który okazał się pierwszym opisanym wiroidem. Przedstawiony tu artykuł jest przeglądem wyników tych badań oraz przeglądem koncepcji i hipotez Dienera dotyczących namnażania i pochodzenia wiroidów. Przedstawiono także krótko wyniki prac nad innymi czynnikami chorobotwórczymi z tej grupy.

Prace nad wrzecionowatością bulw ziemniaka

Choroba wrzecionowatości bulw ziemniaka opisana została w 1922 roku przez Martina (41). Już pierwsze prace wykazały (47), że choroba ta łatwo przenosi się w warunkach polowych m.in. przez mszyce. Goss (32) pisał, że choroba ta może być przenoszona mechanicznie na nożu używanym do krojenia bulw. Wrzecionowatość bulw ziemniaka uważana była za chorobę wirusową, a czynnikowi chorobotwórczemu nadano na-

zwę wirus wrzecionowatości bulw ziemniaka (ang. potato spindle tuber virus, PSTV) (20). Uważano ją za ważną chorobę degeneracyjną ziemniaków, ale badania nad samym wirusem utrudniał m.in. brak odpowiednich roślin wskaźnikowych. Jedynym znanym gospodarzem PSTV był ziemniak i dopiero praca Raymera i O'Brien (44), w której ustalono, że PSTV daje charakterystyczne objawy na pomidorach odmiany Rutgers, umożliwiła dokonanie istotnego postępu w tych badaniach. Nie uniknięto jednak i później wielu nieporozumień. Podawano na przykład, że PSTV jest szczepem wirusa X ziemniaka (1), że jest to wirus o cząstkach kulistych i średnicy 25 nm (60), a nawet udało się otrzymać surowicę przeciw PSTV (3), która, jak się później okazało, reagowała po prostu z białkiem roślinnym (59).

Próby wyizolowania czynnika chorobotwórczego z porażonych pomidorów i ziemniaków podjęli Diener i Raymer (18, 19, 45). Ekstrakcja porażonego materiału roślinnego słabymi (0,005 M) buforami nie dawała żadnych wyników. Dopiero zastosowanie silnych (0,05—0,5 M) buforów pozwoliło otrzymać po wirowaniu z niską szybkością (10 tys. obrotów na minutę) supernatant o wysokiej infekcyjności. Próby skoncentrowania poszukiwanego wirusa przez wirowanie tego supernatantu z dużą szybkością nie powiodły się. Niespodziewanie okazało się, że większość materiału infekcyjnego pozostaje w supernatancie nawet po 3 godzinach wirowania przy 105 tys. g (45). Strefowe wirowanie nieoczyszczonych ekstraktów PSTV z pomidorów wykazało, że duża część czynnika infekcyjnego sedymentuje z szybkością odpowiadającą stałej sedymentacji około 10 S (19). Reszta czynnika infekcyjnego była rozproszona w różnych frakcjach gradientu odpowiadających zakresowi 10—200 S (7).

Klarowanie ekstraktów mieszaniną chloroformu i n-butanolu nie wpływało ujemnie na czynnik infekcyjny (18), natomiast tracił on całkowicie infekcyjność po inkubacji z RN-azą, a nie był podatny na działanie DN-azy (19).

Cechy takie, jak mała szybkość sedymentacji i wrażliwość na rybonukleazę, a także właściwości chromatograficzne pozwoliły uznać czynnik infekcyjny o stałej sedymentacji 10 S otrzymany z roślin porażonych przez PSTV za wolny kwas rybonukleinowy. Ponadto izolacja składników subkomórkowych z zakażonych tkanek ujawniła, że ten czynnik infekcyjny występuje głównie w jądrach komórkowych i jąderkach, a ściślej mówiąc związany jest z chromatyną (7).

Na ogół wartość stałej sedymentacji dla poznanych do tej pory pod tym względem wirusów roślinnych mieści się w granicach 100—200 S. Najmniejszy ze znanych wirusów roślinnych — satelitarny wirus pierścieniowej plamistości tytoniu — ma stałą sedymentacji około 50 S, przy czym wiadomo, że wirus ten namnaża się w oparciu o informację gene-

tyczną wirusa pierścieniowej plamistości tytoniu. Sam jest zbyt mały, aby mógł posiadać pełny kod genetyczny niezbędny do uruchomienia w komórce roślinnej biosyntetycznych procesów samoreplikacji (8). Mimo więc uzyskania przekonywujących danych eksperymentalnych, że PSTV ma stałą sedymentacji 10 S, a więc jest jeszcze mniejszy, wątpliwości budzi sprawa mechanizmu replikacji tego czynnika chorobotwórczego. Ponieważ zaś część materiału infekcyjnego sedymentowała szybciej (10—200 S), można by przypuścić, że PSTV występuje w postaci pełnych wirionów o wielkości zbliżonej do konwencjonalnych wirusów, ale w trakcie ekstrakcji i wirowania wiriony te ulegają stopniowej degradacji uwalniając wolny infekcyjny RNA.

Dane eksperymentalne przedstawione przez Dienera (7) nie potwierdzają jednak takiej hipotezy. Szybciej sedymentujący materiał infekcyjny z roślin porażonych PSTV był raczej mniej trwały niż materiał sedymentujący wolniej, a pełne wiriony powinny być trwalsze od wolnego RNA. Poza tym traktowanie ekstraktów fenolem oraz dodecylsulfianem sodowym (SDS) nie zmieniało właściwości sedymentacyjnych ekstraktów, a wiadomo, że związki te powodują właśnie degradację wirionów i uwalnianie RNA. Dla zbadania możliwości, że duża szybkość sedymentacji niektórych frakcji PSTV wynika ze związania części czynnika infekcyjnego z DNA lub białkiem gospodarza, sklaryfikowane ekstrakty z tkanki poddano działaniu DN-azy i pronazy. Inkubacja z DN-azą nie wpłynęła w istotny sposób na rozmieszczenie czynnika infekcyjnego w gradiencie gęstości sacharozy po wirowaniu. Inkubacja z pronazą zmniejszyła nieco infekcyjność frakcji wytrącanej po 2,5 godzinach wirowania, ciągle jeszcze jednak dużą infekcyjność wykazywała frakcja o właściwościach sedymentacyjnych, które odpowiadałyby nukleoproteinie wirionów (7). Wobec tego hipotetyczne wiriony PSTV musiałyby mieć zupełnie niezwykle właściwości. Z jednej strony otoczka białkowa musiałaby być na tyle luźno związana z RNA, aby umożliwić dostęp RN-azy, a z drugiej związek ten musiałby być na tyle ścisły, że wiriony takie byłyby odporne na działanie fenolu i SDS.

Nie jest możliwe, przy stosowanych obecnie technikach badawczych, przeprowadzenie niezbitego dowodu, że wiriony PSTV nie istnieją w komórkach *in situ*, a nie są wykrywane w ekstraktach tylko dlatego, że są tak nietrwałe, iż rozpadają się momentalnie nawet w trakcie ekstrakcji buforem fosforanowym. Diener (7) wykazał jednak, że nawet *in situ* PSTV jest podatny na działanie RN-azy wprowadzonej do całych liści pod odpowiednim ciśnieniem. Ponadto staranne poszukiwania przy użyciu mikroskopu elektronowego nie doprowadziły do odnalezienia żadnych cząstek przypominających nukleoproteinę wirusową w tkankach jakichkolwiek roślin porażonych PSTV. Podobnie, analiza białek w tych

roślinach nie dostarczyła żadnych danych, które wskazywałyby na produkcję białka wirusowego i nikomu dotychczas nie udało się otrzymać surowicy reagującej specyficznym z PSTV (13, 14, 15, 16, 59).

Bardziej prawdopodobne jest więc, że ekstrakty z roślin porażonych PSTV zawierają jednak wolny RNA. Polidispersyjny rozkład czynnika infekcyjnego w gradientach gęstości sacharozy może być po prostu wynikiem specyficznych właściwości PSTV-RNA. Część czynnika infekcyjnego sedymentuje szybciej być może dlatego, że jest on związany z jądrami komórkowymi lub składnikami tych jąder. Warto dodać, że spektrum absorpcji w UV preparatów fenolowych z ekstraktów tkanek porażonych PSTV było typowe dla kwasów nukleinowych i nigdy nie udało się tam wykryć białek (19). Wydaje się więc nieprawdopodobne, aby w tkankach roślin porażonych PSTV występowały wiriony, a gdyby one istniały, musiałyby być niezwykle nietrwałe i w naturze nie miałyby żadnego znaczenia w przenoszeniu czynnika chorobotwórczego. Istotną rolę w tym względzie odgrywa natomiast infekcyjny kwas rybonukleinowy.

Mała szybkość sedymentacji infekcyjnego PSTV-RNA niekoniecznie musi wynikać z małej masy cząstek. Takie zachowanie kwasu rybonukleinowego może być również wynikiem jego szczególnej budowy utrudniającej sedymentację (13, 14, 15). Można jednak rozróżnić te dwie cechy oznaczając masę RNA równoległe dwiema metodami — przez wirowanie w gradientach gęstości i przez elektroforezę w żelach poliakrylamidowych. Badania takie zostały przeprowadzone (8), a jako porównawcze standardowe wyznaczniki użyte w nich zostały inne kwasy rybonukleinowe o znanej masie i budowie. Stwierdzono przede wszystkim, że szybkość sedymentacji użytych wyznacznikowych kwasów rybonukleinowych była rzeczywiście proporcjonalna do ich stałych sedymentacji, co stanowiło potwierdzenie prawidłowości zastosowanej metody. Wirowanie badanego PSTV-RNA łącznie z wyznacznikowymi kwasami rybonukleinowymi pozwoliło stwierdzić obecność dwóch frakcji infekcyjnych, dla których stałe sedymentacji S_{20w} wyniosły 5,5 dla frakcji o najwyższej infekcyjności oraz 7,0 dla frakcji o nieco niższej infekcyjności. Ponieważ wszystkie użyte standardowe kwasy były pojedynczymi niciami RNA, można z pewnym przybliżeniem wyliczyć ich masy przeliczając wartości stałych sedymentacji według wzoru Gierera (31). Uzyskane w analogiczny sposób masy dla obu frakcji PSTV-RNA wyniosły $4,7 \cdot 10^4$ daltona oraz $7,5 \cdot 10^4$ daltona. Dane te mogą być jednak obciążone pewnym błędem, gdyż wzór Gierera stosuje się tylko do pojedynczych nici RNA, a PSTV-RNA niekoniecznie musi mieć taką właśnie budowę.

Ruchliwość elektroforetyczna kwasów rybonukleinowych w żelach poliakrylamidowych jest na ogół odwrotnie proporcjonalna do ich mas

cząsteczkowych (13). Natomiast ukształtowanie łańcucha RNA wpływa na jego ruchliwość elektroforetyczną odwrotnie niż na szybkość sedymentacji (40). W przeprowadzonych przez Dienera (8) badaniach okazało się, że ruchliwość elektroforetyczna zastosowanych wzorcowych kwasów rybonukleinowych odpowiadała w zasadzie ich masom cząsteczkowym wyliczonym innymi metodami. Metoda ta mogła więc zostać użyta do wyznaczania masy PSTV-RNA, a wyliczone masy dwóch frakcji o najwyższej infekcyjności wyniosły $5 \cdot 10^4$ i $9,4 \cdot 10^4$ daltona.

Zgodność wyników uzyskana obiema metodami [masa $4,7 \cdot 10^4$ daltona oznaczona przez wirowanie w gradiencie gęstości oraz $5 \cdot 10^4$ daltona wyznaczona metodą elektroforezy w żelu 3% (8)] wskazywałaby, że wyliczone masy są prawdopodobnie prawidłowe, a poza tym, że budowa PSTV-RNA odpowiada budowie użytych wzorcowych kwasów rybonukleinowych, a więc, że jest to pojedyncza nić RNA. Obie metody wykazały jednak obecność więcej niż jednej frakcji infekcyjnej PSTV. Zastosowano więc (8) elektroforezę w żelach poliakrylamidowych o mniejszych porach (5, 7,5 i 10%), co powinno pozwolić na bardziej precyzyjne rozdzielanie poszczególnych frakcji. We wszystkich żelach uzyskano znów polidispersyjny rozkład PSTV, a masy cząsteczkowe wyliczone dla poszczególnych frakcji były zbliżone do wartości $2,5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $7,5 \cdot 10^4$ oraz $1 \cdot 10^5$ daltona. Ponieważ wszystkie te liczby są wielokrotnościami podstawowej masy $2,5 \cdot 10^4$ daltona, pozwala to przypuszczać, że pojedyncze cząstki PSTV mają tę właśnie masę, zaś cząstki większe są polimerami cząstek o najniższej masie. Przypuszczenie takie potwierdzają wyniki elektroforezy PSTV w żelu poliakrylamidowym 20%, w którym uzyskano monodispersyjny rozkład czynnika infekcyjnego (22), a wyznaczona masa wyniosła $5 \cdot 10^4$ daltona. Pozwala to postawić hipotezę, że PSTV występuje w różnej wielkości agregatach, a agregaty te mogą rozpadać się i ponownie formować w czasie ekstrakcji, wirowania czy elektroforezy.

Przedstawione tu wyniki, potwierdzone zresztą w innych badaniach (59, 61, 64), pozostawiają niewiele miejsca na wątpliwości co do tego, że choroba wrzecionowatości bulw ziemniaka powodowana jest przez wolny RNA o niskiej masie cząsteczki, który po wprowadzeniu do odpowiedniego gospodarza może się namnażać i wywoływać typowe objawy chorobowe. Należałoby się jednak ustosunkować do innych możliwych wyjaśnień.

Nie jest możliwe, aby PSTV przemieszczał się wyłącznie po powierzchni żelu nie penetrując go w ogóle, gdyż nigdy, nawet z powierzchni żelu 20%, gdzie zjawisko takie byłoby najbardziej prawdopodobne, nie udało się wymyć czynnika infekcyjnego (22). Wykluczyć również należy możliwość, że cząstki PSTV-RNA tylko częściowo zagłębiały

się w żelu, gdyż w takim przypadku najwięcej czynnika infekcyjnego winno znaleźć się we frakcjach bliskich punktu nałożenia na żel, a dane eksperymentalne wskazują na coś zupełnie odwrotnego (8). Trudno byłoby również wytłumaczyć, dlaczego w żelu 3% tak mało czynnika infekcyjnego wykryto we frakcji odpowiadającej RNA o dużej masie, gdyby PSTV-RNA taką właśnie dużą masę miał posiadać.

Jeśli jednak przypuścić, że PSTV-RNA ma rzeczywiście tak małą masę, powstaje pytanie, w jaki sposób kwas rybonukleinowy o takiej masie może posiadać informację genetyczną niezbędną do namnażania się w roślinie. RNA o masie $5 \cdot 10^4$ daltona może zakodować najwyżej 55 aminokwasów (8, 13, 14, 15), a więc nie jest to kod wystarczający do wytworzenia prostego nawet białka, a co dopiero do zakodowania enzymu — polimerazy (replikazy) RNA — niezbędnego w podobnym procesie replikacji.

Można by założyć, że niezbędny do tego celu kod zawarty jest na kilku podobnych długością cząstkach PSTV-RNA o różnej sekwencji nukleotydów. Cząstki takie mogłyby się łączyć w większe łańcuchy tworząc genom wirusowy o konwencjonalnej wielkości, gdyby na przykład zakończenie jednej nici RNA miało sekwencję nukleotydów komplementarną w stosunku do końca innej nici. Tego rodzaju połączenia mogłyby się tworzyć *in vitro* po wymyciu PSTV z żelu, lub *in vivo*, już po inokulacji. Jednak w eluatach z frakcji żelu odpowiadających cząstkom o małej masie nie stwierdzono obecności cząstek o większej masie i nic nie wskazywało na tworzenie się takich cząstek *in vitro* (8). Przeprowadzone przez Singha (57) doświadczenia wykazały, że krzywa infekcyjności dla PSTV jest typowa dla infekcji jednocząsteczkowych, a odbiega wyraźnie od krzywej dla infekcji wielocząsteczkowych (np. wirusem mozaiki lucerny). Wskazywałoby to na fakt, że cząstki PSTV-RNA o masie $5 \cdot 10^4$ daltona są w stanie samodzielnie dokonać infekcji i namnażać się nie łącząc się po inokulacji w większe łańcuchy.

Znane są dobrze przykłady występowania tzw. wirusów satelitarnych, które nie namnażają się same, lecz zawsze towarzyszą większym wirusom i namnażają się w oparciu o kod zawarty w tych pomocniczych wirusach. Być może więc PSTV namnaża się również dzięki obecności takiego wirusa pomocniczego.

Jednak nigdy, mimo wielu prób, nie udało się takiego wirusa wykryć. Nie udało się go wyizolować z tkanek roślin, w których PSTV się namnaża, ani wyprodukować surowicy przeciw temu wirusowi pomocniczemu, ani też znaleźć go w preparatach badanych pod mikroskopem elektronowym. W opisanych tu doświadczeniach Dienera użyto 40 tys. roślin pomidorów (8, 13), z których wiele inokulowano nawet eluatami z żelu poliakrylamidowego, które nie mogły zawierać żadnego wiru-

sa o konwencjonalnej wielkości. Na wszystkich tych roślinach PSTV się namnażał, a więc wszystkie one musiałyby zawierać wirus pomocniczy. Tak powszechnie występujący wirus musiałyby się więc przenosić przez nasiona w 100%. Żaden ze znanych wirusów roślinnych nie przenosi się przez nasiona w tak wysokim stopniu. Na ziemniakach w ogóle żaden poza PSTV wirus nie przenosi się przez nasiona, a na pomidorach znane są dwa takie wirusy, dla których jednak częstotliwość przeniesienia wynosi 1,8 i 19%. Dienerowi (25) udało się zainfekować eluatami z żelu poliakrylamidowego po elektroforezie PSTV również i inne rośliny: *Nicotiana tabacum* Samsun i Whit Burley, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *Datura stramonium*, *D. metel*, *Nicandra physalodes*, *Capsicum annuum*, *Physalis floridana* i *P. peruviana*. Wykluczone jest chyba, aby we wszystkich tych roślinach znajdował się już przed inokulacją hipotetyczny wirus pomocniczy. Tym bardziej, że większość z tych roślin, a zwłaszcza tytonie Samsun i Whit Burley, jest często używana w badaniach wirusologicznych, tkanki ich wielokrotnie były badane pod mikroskopem elektronowym przez wielu badaczy, a nikt do tej pory nie znalazł żadnego nieznanego wirusa, który mógłby być tym hipotetycznym wirusem pomocniczym dla PSTV. Jeśli zaś wirus ten miałby występować w tak małych ilościach, że utrudniałoby to jego wykrycie, to fakt ten musiałby limitować namnażanie się PSTV i dodanie tego hipotetycznego „wirusa” do inokulum PSTV powinno by zwiększyć infekcyjność inokulum. Tymczasem nie zaobserwowano (8), aby dodawanie do inokulum PSTV „wirusowych frakcji” z liści zdrowych pomidorów podnosiło w jakimkolwiek stopniu infekcyjność inokulum.

Wydaje się więc, że PSTV namnaża się jednak samodzielnie, a dalsze prace Dienera dostarczyły przekonujących dowodów, że jest to RNA o wyjątkowo niskiej masie. Z dużej ilości liści pomidorów Rutgers udało się (9) uzyskać tak dużą próbkę PSTV, że pozwoliło to na stwierdzenie, że absorpcja w świetle UV jest typowa dla kwasów nukleinowych, a denaturacja termiczna przebiega w sposób typowy dla pojedynczej nici RNA. Wreszcie, w 1973 roku udało się (65) zobaczyć PSTV pod mikroskopem elektronowym. Okazało się, że są to pojedyncze nici RNA długości około 500 Å o dużych skłonnościach do agregatowania.

Wykazanie obecności patogenicznej RNA o niskiej masie cząsteczkowej, namnażającego się w wolniej od innych czynników chorobotwórczych roślinie, zmusza do przedstawienia jakiejś koncepcji namnażania się tego RNA, mimo skąpych informacji, jakie są obecnie na ten temat dostępne.

Jak dotychczas nie jest znany żaden samodzielnie namnażający się wirus o masie niższej niż $4 \cdot 10^6$ daltona (8, 13, 14, 15) i masie genomu niższej niż $1 \cdot 10^6$ daltona. Doprowadziło to do przyjęcia poglądu, że ten

właśnie stopień komplikacji budowy niezbędny jest do samoreplikacji RNA. Jasną jest sprawą, że replikacja wszelkich wirusów odbywa się w oparciu o zdolności enzymatyczne komórki gospodarza i składniki tej komórki, wykorzystywane do budowy wirusa. Termin „samoreplikacja” używany jest dla podkreślenia faktu (11, 42), że wirusy poza biernym użytkowaniem istniejących już wcześniej mechanizmów biosyntetycznych gospodarza wprowadzają do tej komórki własną informację genetyczną, która, bezpośrednio lub pośrednio, ulega translacji w systemie syntezy białkowej komórki gospodarza do specyficznych dla wirusa białek. W przypadku PSTV informacja ta może być zredukowana, gdyż czynnik ten nie posiada kapsydu, którego budowa musiałaby być w przeciwnym razie kodowana na nici PSTV-RNA. Oprócz białek kapsydu RNA wirusowe koduje zazwyczaj jeden lub dwa enzymy (replikazy, polimerazy RNA), które działają specyficznym w procesie replikacji kwasu nukleinowego wirusa.

Ten aktywny aspekt replikacji wirusa może mieć jednak mniejsze znaczenie, niż to sądzono dotychczas. W jednym przynajmniej przypadku, mianowicie faga Q β na *Escherichia coli*, wykazano, że enzym replikujący kwas nukleinowy faga i występujący tylko w zakażonych komórkach bakterii zbudowany jest z czterech łańcuchów polipeptydowych, z których jeden tylko jest indukowany specyficznym przez faga, a pozostałe są specyficzne dla samej bakterii (8, 13, 14, 15). Istnieją więc takie przypadki, kiedy niewielka tylko część informacji genetycznej wprowadzanej do komórki gospodarza przez konwencjonalne czynniki wirusowe jest użytkowana w procesie replikacji kwasu nukleinowego wirusa, a więc samoreplikacja niekoniecznie musi być uwarunkowana dużą masą RNA. Można więc sobie wyobrazić istnienie replikujących się czynników infekcyjnych znacznie prostszych niż konwencjonalne wirusy.

Przedstawiciele tutaj wydają się kwalifikować PSTV jako pierwszy przykład takiego subwirusowego patogena. Diener (8, 13, 14, 15, 16) proponuje dla tego rodzaju czynnika chorobotwórczego nazwę wiroid (ang. viroid). Nazwa ta prawdopodobnie zostanie powszechnie zaakceptowana mimo pewnych argumentów krytycznych (11, 42). Natomiast Singh (63, 64) proponuje nazwę metawirus (ang. metavirus). Obie nazwy wyraźnie sugerują, że chodzi o czynnik chorobotwórczy mający wiele cech wspólnych z wirusami. Wiroidy różnią się jednak wyraźnie od konwencjonalnych wirusów. Nie posiadają zdolności syntezy białka kapsydu (6), a zatem nie występują one nigdy w tak charakterystycznej dla wirusów formie wirionów, którą uznać można za fazę spoczynkową wirusa (8, 13, 14, 15). Znane są tylko w formie wolnego kwasu nukleinowego, czyli w fazie wegetatywnej. Kwas nukleinowy wiroidu jest tak mały, że może zawierać tylko bardzo podstawowe informacje genetyczne, np. niewiele więcej niż własne kodony rozpoznawcze.

Inne wiroidy

Citrus exocortis „virus” (CEV). Do najlepiej poza PSTV zbadanych czynników chorobotwórczych z grupy wiroidów należy *Citrus exocortis* „virus” (CEV). Pod wieloma względami jest on podobny do PSTV. W obu przypadkach pierwszymi objawami choroby jest zakłócenie wzrostu roślin i występowanie zniekształceń (43, 47, 62). Oba czynniki chorobotwórcze przenoszone są przez nasiona (29, 37, 56, 63) i oba łatwo przenoszą się mechanicznie (30, 32). W trakcie przeprowadzonych ostatnio badań okazało się również, że CEV występuje w postaci wolnego kwasu rybonukleinowego o małej masie (49, 50, 51, 52, 53, 54). Masa kwasu rybonukleinowego CEV obliczona w wyniku wirowania w gradientach gęstości i elektroforezy w żelach poliakrylamidowych wynosi, według różnych danych, $1 \cdot 10^5$ do $1,5 \cdot 10^5$ daltona (48, 49, 52, 54), co z grubsza zgadza się z niektórymi wynikami uzyskanymi dla PSTV, tym bardziej, że wyniki te mogą zależeć od stężenia użytego żelu (49). Porównując reakcje roślin testowych na CEV i PSTV uzyskano wyniki (58, 62) wskazujące, że oba czynniki chorobotwórcze są identyczne lub przynajmniej są blisko spokrewnionymi izolatami, czy szczepami tego samego czynnika chorobotwórczego. Przez inokulację kwasem rybonukleinowym CEV udało się uzyskać na pomidorach (54) i ziemniakach (48) objawy typowe dla PSTV, co potwierdza identyczność tych czynników chorobotwórczych. Bardzo dokładna analiza pozwoliła stwierdzić (50), że preparaty kwasu rybonukleinowego CEV są pozbawione śladów białka i DNA i zawierają następujące ilości nukleotydów: 29,4% CMP, 21,5% AMP, 28,8% GMP oraz 19,9% UMP. W zasadzie jest to pojedyncza nić RNA z tym, że w niektórych miejscach tworzą się wiązania podobne jak w podwójnosznurowych kwasach rybonukleinowych (49, 50).

„Wirus” karłowatości złocieni (*chrysanthemum stunt* „virus”). „Wirus” karłowatości złocieni (CSV) znany jest od 1947 roku (26). Od dawna wiadomo (4), że CSV jest bardzo odporny na działanie wysokiej temperatury. Hollings i Stone (33) uzyskali infekcyjne ekstrakty z tkanek złocieni przy użyciu 0,1M buforu fosforanowego, przy czym słabe bufony (0,02 M) nie ekstrahowały „wirusa”. Czynniki chorobotwórcze okazały się wrażliwe na działanie RN-azy (34). Nikomu nie udało się również zobaczyć CSV pod mikroskopem elektronowym (39). Dopiero Diener i Lawson (17) ostatecznie potwierdzili przynależność CSV do wiroidów. Wykazali oni, że CSV jest wolnym kwasem rybonukleinowym o masie około $4,7\text{—}4,8 \cdot 10^4$ daltona, a więc jeszcze mniejszym niż PSTV. Wyniki szerokich badań nad CSV przedstawili ostatnio również Hollings i Stone (35). Potwierdzają oni również, że wiele właściwości CSV podobnych jest do właściwości wiroidów. Jednak CSV nie

przenosi się przez nasiona, a także nie zakaża takich roślin jak pomidor, *Citrus limon* i *Gynura aurantiaca*, co różni go od CEV i PSTV.

„Wirus” chlorotycznej pstrości złocieni (*chrysanthemum chlorotic mottle „virus”*). Chlorotyczna pstrość złocieni została opisana przez Dimocka, Geissingera i Horsta (27), jako choroba prawdopodobnie wirusowa. W dalszych badaniach (38) uzyskano dane potwierdzające wirusową etiologię choroby i nadano czynnikowi chorobotwórczemu nazwę *chrysanthemum chlorotic mottle virus* (ChCMV), choć pewne cechy wskazują na przynależność tego czynnika chorobotwórczego do wiroidów. ChCMV udało się przenieść przez sok dopiero po zastosowaniu ekstrakcji w niskich temperaturach lub w obecności bentonitu (38, Kryczyński — nieopublikowane), co wskazywałoby, że czynnik chorobotwórczy jest w soku inaktywowany przez jakiś enzym, być może RN-azę, której działanie hamuje bentonit (5, 28, 55). Punkt termicznej inaktywacji ChCMV wynosi około 95°C (46, Kryczyński — nieopublikowane), co odpowiada właściwościom wiroidów (59). Stabilizujące działanie bentonitu na ChCMV w ekstraktach z liści złocieni wykazane zostało również i w innych pracach (36, 46). Inne czynniki, hamujące działanie RN-azy, jak. np. środowisko alkaliczne, czy wysokie stężenie jonów w środowisku również poprawiały przenoszenie ChCMV przez sok (36, 46). Wykazano również (36, 46), że ChCMV ulega inaktywacji przez RN-azę, natomiast nie jest wrażliwy na DN-azę. Podatność na RN-azę zależała od stężenia enzymu i czasu ekspozycji (46). ChCMV nie sedymentował w ciągu 3 godzin wirowania przy 120 tys. g. W gradiencie gęstości sacharozy otrzymano polidispersyjny rozkład czynnika infekcyjnego, a stała sedymentacji dla głównej frakcji infekcyjnej wyniosła 6—14 S (46). Również odporność na działanie chloroformu, n-butanolu, fenolu i SDS wskazywałaby na przynależność ChCMV do wiroidów.

ChCMV nie zakaża jednak roślin będących gospodarzami PSTV i CEV — np. nie zakaża pomidora (Kryczyński — nieopublikowane, 46). Od CSV różni się natomiast wyraźnie objawami na złocieniach oraz niską, w przeciwieństwie do CSV, infekcyjnością soku, wynikającą z małej stabilności ChCMV w ekstraktach. Testy wzajemnej immunizacji (cross-protection) między CSV i ChCMV dały zresztą negatywne wyniki (46). „Wirus” chlorotycznej pstrości złocienia jest więc prawdopodobnie wiroidem różnym od PSTV, CEV i CSV *).

Wiroidy zwierzęce. U owiec występuje choroba układu ner-

*) W czasie przygotowania artykułu do druku dotarła informacja o wykryciu jeszcze jednego wiroidu występującego na ogórkach w Holandii: van Dorst H. J. i Peters D. — Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Neth. J. Plant Path.* 80, 85—96, 1974.

wowego powodowana przez czynnik chorobotwórczy znany pod angielską nazwą „scrapie”. Jest to również wolny kwas rybonukleinowy o masie $1,5 \cdot 10^5$ daltona (2). Czynnik ten pod wieloma względami podobny jest do wiroidów roślinnych (10, 12, 14, 15, 16). Scrapie jest ściśle związany z niektórymi składnikami komórkowymi (np. histonami), podobnie jak PSTV związany jest z chromatyną. Oba czynniki chorobotwórcze mogą osiągać w swoich gospodarzach wysokie koncentracje, ale oba mają długi okres inkubacji. Nie można żadnego z tych czynników chorobotwórczych zobaczyć pod mikroskopem elektronowym przy zastosowaniu technik używanych dla konwencjonalnych wirusów. W obu przypadkach nie udało się nigdy wyprodukować specyficznych surowic. Specyficznym dla scrapie środowiskiem jest tkanka nerwowa, poza którą może się on namnażać nie powodując jednak zmian patologicznych. PSTV zaś może namnażać się w innych niż ziemniak i pomidor roślinach, nie powodując tam jednak również objawów chorobowych. Scrapie i PSTV wykazują zbliżoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące i zbliżoną odporność na promieniowanie UV i wysokie temperatury. Zarówno scrapie, jak i PSTV trudno ekstrahują się z zakażonych tkanek, przy czym również podobnie zachowują się w trakcie ekstrakcji słabymi i silnymi buforami. Podobna jest również wielkość i budowa cząstek oraz ich właściwości sedymentacyjne.

Scrapie różni się jednak od wiroidów podatnością na działanie różnych czynników chemicznych. Scrapie jest mianowicie wrażliwy na działanie fenolu, chlorku cezu, mocznika i eteru, podczas gdy np. PSTV nie jest na te odczynniki wrażliwy. Z kolei PSTV jest łatwo inaktywowany przez RN-azę, podczas gdy enzym ten nie działa na kwas rybonukleinowy scrapie. Różnice te łatwo jednak dadzą się wytłumaczyć faktem, że badania nad chemiczną wrażliwością scrapie prowadzono na nieoczyszczonych homogenatach tkankowych, w których kwas rybonukleinowy scrapie mógł być związany z różnymi strukturami subkomórkowymi, chroniącymi go na przykład przed działaniem RN-azy, a z kolei łatwo ulegającym uszkodzeniom przez fenol, chlorek cezu, mocznik i eter, co mogło być błędnie interpretowane jako wrażliwość samego RNA scrapie. Natomiast analogiczne badania nad PSTV prowadzono na częściowo przynajmniej oczyszczonych preparatach PSTV-RNA. Wydaje się więc, że znane dotychczas właściwości PSTV i scrapie pozwalają zaliczyć je do tej samej grupy czynników chorobotwórczych, mianowicie wiroidów (10, 12, 14, 15, 16).

Możliwości namnażania się wiroidów

Zbyt mało na razie wiadomo o wiroidach, aby pokusić się o sformułowanie teorii namnażania się tych czynników chorobotwórczych.

W świetle przedstawionych faktów, z których wynika, że wolny kwas rybonukleinowy o masie rzędu $5 \cdot 10^4$ daltona replikuje się jednak w zakażonych komórkach, warto rozpatrzyć możliwości przebiegu tego procesu, nawet gdyby miało to doprowadzić do przewartościowania pewnych, ogólnie przyjętych zasad (8, 13, 14, 15, 16).

Istnieje następująca alternatywa (8, 13, 14, 15, 16):

1. Kwas rybonukleinowy wiroidów syntetyzowany jest podobnie jak normalny RNA komórkowy, a więc w oparciu o transkrypcję ze wzorcowego DNA.

2. Kwas sybonukleinowy wiroidów replikuje się samodzielnie, tzn. jego synteza w komórce jest niezależna od DNA.

W przypadku syntezy zależnej od DNA trzeba by założyć, że w genomie roślin, w których PSTV może się namnażać, występuje fragment lub fragmenty DNA kodujące kwas rybonukleinowy PSTV. Jeśli tak, to w roślinach nie inokulowanych PSTV ta informacja genetyczna musiałaby pozostawać w stanie pełnej represji, a wprowadzenie PSTV przez inokulację tych roślin musiałoby wyzwać działanie jakiegoś derepresora tego fragmentu DNA. Hipoteza taka jest mało prawdopodobna, bo taki fragment DNA, pozostający w stanie pełnej represji, a zawierający informację szkodliwą dla organizmu, powinien zostać wyeliminowany w trakcie ewolucji. Ponadto choćby sporadycznie powinny występować przypadki samorzutnej depresji tego fragmentu DNA. Tymczasem nie obserwuje się przecież pojawów choroby powodowanej przez PSTV w wielkotowarowej produkcji np. pomidorów, na których objawy są wyraźne i musiałby być dostrzeżone.

W roślinach zainfekowanych PSTV mogłaby też zachodzić synteza nowego DNA, dla którego PSTV-RNA byłby wzorcem, to znaczy w komórce musiałby występować enzymy o działaniu odwrotnym do transkryptaz — polimerazy DNA kierowane przez RNA. Polimerazy takie musiałby występować w normalnych komórkach lub powstawać w wyniku łączenia się protein komórki zdrowej z polipeptydem powstającym przez translację z RNA wiroidu. Istnienie takiego systemu informacyjnego stwierdzono ostatnio w przypadku niektórych wirusów onkogennych. Ponieważ PSTV-RNA ma niską masę i nie posiada białek, które mogłyby zawierać potrzebne enzymy, przypuszczenie takie wydaje się mało prawdopodobne. Ciekawe jednak, że Actinomycyna D, o której wiadomo, że hamuje specyficznie transkrypcję DNA w RNA, hamuje namnażanie PSTV (24, 67). Sugerowałoby to, że namnażanie PSTV zachodzi jednak za pośrednictwem DNA.

Alternatywna koncepcja (samoreplikujący się RNA bez udziału DNA) jest sprzeczna z dobrze udokumentowanym poglądem, że synteza całego RNA w komórkach zdrowych zachodzi w drodze transkrypcji ze

wzorcowego DNA. Jednakże przeprowadzone ostatnio obserwacje wskazują, że w niektórych, a może nawet we wszystkich komórkach może zachodzić replikacja RNA zależna od RNA. Zakłada się tu obecność polimerazy RNA kierowanej przez RNA, albo powstawanie takiej polimerazy przez łączenie występujących w komórce protein z polipeptydem kodowanym przez RNA wiroidu. Wykazano ostatnio obecność w komórkach różnych zdrowych tkanek podwójnych nici RNA, co może świadczyć o syntezie RNA kierowanej przez RNA. Ciekawe, że Actinomycina D wpływa na syntezę tych podwójnych nici w znacznie mniejszym stopniu niż na syntezę normalnego RNA, co również potwierdza, że jest to synteza niezależna od DNA. Możliwe są tu oczywiście różne interpretacje, ale możliwe jest też, że niektóre samoreplikujące się formy RNA mogą stać się częścią informacji genetycznej komórki. Jeśli tak, to w komórkach takich musi istnieć system replikacji RNA niezależnej od DNA i w komórkach takich PSTV-RNA mógłby namnażać się dzięki temu systemowi.

Pochodzenie i funkcje biologiczne wiroidów

W oparciu o posiadane obecnie informacje trudno ustalić jakieś rzeczywiste filogenetyczne powiązania wiroidów z innymi czynnikami infekcyjnymi. Można jedynie porównać ich cechy z cechami innych, nienormalnych kwasów rybonukleinowych, występujących w komórkach żywych (zdegenerowane wirusy, wirusy pierwotne i nienormalny RNA komórkowy).

W ostatnich latach parokrotnie wykryto (15) obecność niskocząsteczkowych kwasów rybonukleinowych towarzyszących infekcji różnymi wirusami (adenowirusy w komórkach KB, bakteriofag Q β w komórkach *Escherichia coli*, wirusy onkogenne, TMV w liściach tytoniu i wirus mozaiki bobu w liściach bobu). Funkcja żadnego z tych kwasów rybonukleinowych nie jest znana. Jeśli jednak przyjąć, że synteza niskocząsteczkowego RNA jest pospolicie występującą konsekwencją infekcji przez wirusy, można by przypuścić, że wiroidy rozwinęły się z takiego niskocząsteczkowego RNA, pierwotnie indukowanego przez wirusy, który później stał się autonomiczny. Wiroidy można by w takim przypadku określić jako zdegenerowane wirusy.

W komórkach różnych zdrowych tkanek zwierzęcych, podobnie jak i w liściach pomidora znaleziono (15) kwasy rybonukleinowe o właściwościach podwójnej nici RNA. Synteza tych kwasów, jak już wspomniano wyżej, jest w niewielkim tylko stopniu hamowana przez Actinomycinę D, co sugeruje, że są to samoreplikujące się kwasy rybonukleinowe, które stały się częścią genetycznej informacji komórki. Niektóre z właś-

ciwości tych kwasów (współczynnik sedymentacji, podatność na RN-azę, zachowanie w kolumnach sephadeksowych, przebieg denaturacji termicznej) podobne są do właściwości wiroidów i wskazują, że połączenie obu nici nie jest pełne. Jeśli kwasy takie występują w większości komórek, to wiroidy pochodzić mogą od tych właśnie komórkowych kwasów rybonukleinowych i mogłyby być wobec tego uznane za prymitywne wirusy (prawirusy), które nie osiągnęły jeszcze właściwego konwencjonalnym wirusom stopnia komplikacji budowy.

Poza t-RNA i RNA rybosomowym o stałej sedymentacji 5 S, w zdrowych komórkach, a zwłaszcza w jądrach i jąderkach, występują inne niskocząsteczkowe kwasy rybonukleinowe (15) związane na ogół z chromatyną. Funkcja tych kwasów również nie jest znana, przypuszcza się jednak, że mogą one brać udział w regulacji procesów transkrypcji RNA z genomu. Również i PSTV-RNA jest związany z chromatyną i ma podobną do tych kwasów masę cząsteczkową. Być może wiroidy pochodzą od tych właśnie kwasów rybonukleinowych, będących normalnymi składnikami jąder komórkowych. Zmiana tego RNA na czynnik patogeniczny mogła nastąpić na skutek mutacji albo na skutek przypadkowego wprowadzenia tego RNA do obcego gatunku, w którym kwas ten był zdolny do replikacji. W obu tych przypadkach choroba byłaby wynikiem zakłócenia funkcji normalnie występującego w jądrze komórkowym RNA.

Wnioski

Okazuje się, że występowanie w komórkach roślinnych samoreplikujących się kwasów rybonukleinowych nie jest takim wyjątkowym zjawiskiem. Przez długi czas pozostawały one nie wykryte, bo 1) stanowią nieznaczną tylko frakcję RNA komórkowego, 2) replikują się znacznie wolniej niż RNA komórkowe i wirusowe, co utrudnia wykrycie ich np. przez znakowanie pierwiastkami radioaktywnymi, 3) nie były dotąd znane żadne biologiczne efekty występowania tych kwasów rybonukleinowych (8, 13, 14, 15, 16).

Jeden z tych kwasów, a mianowicie PSTV-RNA, okazał się patogeniczny dla pewnych organizmów, co doprowadziło do wykrycia tych samoreplikujących się kwasów rybonukleinowych — wiroidów. Te formy RNA mają cechy zarówno RNA komórkowego, jak i wirusowego. Podobnie jak RNA komórkowe mają one małą masę, nie kodują białek kapsydu, ale mogą być może, kodować specyficzne dla siebie replikazy. Podobnie jak RNA komórkowe RNA wiroidów staje się częścią genetycznej informacji komórki. Podobieństwo tych form RNA do wirusów polega natomiast na ich zdolności do samoreplikacji oraz na posiadaniu zdolności patogenicznych, przynajmniej w stosunku do pewnych organizmów.

Poznane do tej pory właściwości PSTV-RNA doskonale ilustrują te cechy. PSTV przenoszony jest zarówno przez pyłek, jak i przez nasiona zakazonych roślin, a więc może stanowić część informacji genetycznej komórki. Wiroid ten nie koduje ani białek kapsydu, ani, prawdopodobnie, własnej replikazy. W niektórych roślinach PSTV namnaża się i powoduje choroby podobne w przebiegu do wirusowych. Na innych jednak roślinach PSTV, choć osiąga podobną koncentrację, nie wywołuje żadnych objawów chorobowych (podobieństwo do podwójnych nici RNA występujących w „zdrowych” komórkach).

Być może, patogenów takich może być jeszcze znacznie więcej. Niektóre z nich mogą być trudne do wykrycia, bo ze względu na małą stabilność mogą z trudnością przenosić się poziomo (z rośliny na roślinę), jak to ma miejsce w przypadku „wirusa” chlorotycznej pstrości złocieni. Inne, podobnie jak PSTV, mimo braku ochrony kapsydu, mogą przenosić się nie tylko pionowo (na potomstwo), ale i poziomo, ze względu na dużą skłonność do tworzenia bardziej stabilnych agregatów.

Wiroidy mogą mieć duże znaczenie ogólnobiologiczne. Być może są one brakującym ogniwem między wirusami a genami i mogą być czynnikami dziedziczenia pozachromosowego. Mogą też brać udział w zjawiskach transformacji komórek i w onkogenezie i stanowić hipotetyczne, od dawna poszukiwane onkogeny (8, 13, 14, 15, 16). Nie jest wykluczone, że badania prowadzone w najbliższych latach dostarczą w tym zakresie interesujących wyników.

LITERATURA

1. Allington W.B., Ball E.M., Galvez G.: Potato spindle tuber caused by a strain of potato virus X. *Plant Dis. Repr.* 48, 597—598, 1964.
2. Alper T., Haig D.A., Clarke M.C.: The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 278—284, 1966.
3. Bagnall R.H.: Serology of the potato spindle tuber virus. *Phytopath.* 57, 533—534, 1967.
4. Brierley P.: Exceptional heat tolerance and some other properties of the chrysanthemum stunt virus. *Plant Dis. Repr.* 36, 243—244, 1952.
5. Brownhill T.J., Jones A.S., Stacey M.: The inactivation of ribonuclease during the isolation of ribonucleic acids and ribonucleoproteins from yeasts. *Biochem. J.* 73, 434—438, 1959.
6. Davies J.W., Kaesberg P., Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology* 61, 281—286, 1974.
7. Diener T.O.: Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question whether virions exist in extracts or in situ. *Virology* 43, 75—89, 1971.

8. Diener T.O.: Potato spindle tuber „virus”. IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* 45, 411—428, 1971.
9. Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid. VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology* 50, 606—609, 1972.
10. Diener T.O.: Is the scrapie agent a viroid? *Nature. New Biology* 235, 218—219, 1972.
11. Diener T.O.: Virus terminology and the viroid: a rebuttal. *Phytopath.* 63, 1328—1329, 1973.
12. Diener T.O.: Similarities between the scrapie agent and the agent of the potato spindle tuber disease. *Ann. clinical Res.* 5, 268—278, 1973.
13. Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid: a novel type of pathogen. Persistent virus infections. *Perspectives of virology*, tom 8, rozdz. 2, 7—30. Acad. Press Inc., New York and London, 1973.
14. Diener T.O.: Viroids: the smallest known agents of infectious disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 28, 23—39, 1974.
15. Diener T.O.: Viroids as prototypes or degeneration products of viruses. Viruses, evolution and cancer. *Rozdz.* 28, 757—783, Acad. Press Inc., New York, San Francisco, London, 1974.
16. Diener T.O.: The smallest known agents of infectious disease. *Reticuloendothelial Soc. J.*, April 1974, 322—333, 1974.
17. Diener T.O., Lawson R.H.: Chrysanthemum stunt: a viroid disease. *Virology* 51, 94—101, 1973.
18. Diener T.O., Raymer W.B.: Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* 158, 378—381, 1967.
19. Diener T.O., Raymer W.B.: Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. II. Characterization and partial purification. *Virology* 37, 351—366, 1969.
20. Diener T.O., Raymer W.B.: Potato spindle tuber virus. *Descriptions of Plant Viruses. Commonwealth Myc. Inst. and Ass. Appl. Biologists, Ferrylane, Kew, Surrey, England, No 66*, 1971.
21. Diener T.O., Schneider I.R., Smith D.R.: Potato spindle tuber viroid. XI. A comparison of the ultraviolet light sensitivities of PSTV, tobacco ringspot virus, and its satellite. *Virology* 57, 577—581, 1974.
22. Diener T.O., Smith D.R.: Potato spindle tuber viroid. VI. Monodisperse distribution after electrophoresis in 20% polyacrylamide gels. *Virology* 46, 498—499, 1971.
23. Diener T.O., Smith D.R.: Potato spindle tuber viroid. IX. Molecular weight determination by gel electrophoresis of formylated RNA. *Virology* 53, 359—365, 1973.
24. Diener T.O., Smith D.R.: Potato spindle tuber viroid. XIII. Inhibition of replication by Actinomycin D. *Virology* 63, 421—427, 1975.
25. Diener T.O., Smith D.R., O'Brien M.J.: Potato spindle tuber viroid. VII. Susceptibility of several solanaceous plant species to infection with low molecular-weight RNA. *Virology* 48, 844—846, 1972.
26. Dimock A.W.: Chrysanthemum stunt. *N.Y. State Flower Growers Bull.* 26, 2, 1947.
27. Dimock A.W., Geissinger C.M., Horst R.K.: Chlorotic mottle: a newly recognized disease of chrysanthemum. *Phytopath.* 61, 415—419, 1971.
28. Dunn D.B., Hitchborn J.H.: The use of bentonite in the purification of plant viruses. *Virology* 25, 171—192, 1965.

29. Fernow K.M., Peterson L.C., Plaisted R.L.: Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected potato plants. *Amer. Potato J.* 47, 75—80, 1970.
30. Garnsey S.M., Jones J.W.: Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools. *Plant Dis. Repr.* 51, 410—413, 1967.
31. Gierer A.: Grösse und Structur der Ribonucleinsäure des Tabakmosaikvirus. *Zeitschr. Naturforsch. B* 13, 477—484, 1958.
32. Goss R.W.: Transmission of potato spindle tuber by cutting knives and seed piece contact. *Phytopath.* 16, 299—303, 1926.
33. Hollings M., Stone O.M.: Chrysanthemum stunt. *Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.* 1968, 103—104, 1968.
34. Hollings M., Stone O.M.: Chrysanthemum stunt virus. *Rep. Glasshouse Crops Res. Inst.* 1969, 129, 1969.
35. Hollings M., Stone O.M.: Some properties of chrysanthemum stunt, a virus with the characteristics of an uncoated ribonucleic acid. *Ann. appl. Biol.* 74, 333—348, 1973.
36. Horst R.K., Geissinger C.M., Staszewicz M.: Treatments that improve mechanical transmission of chrysanthemum chlorotic mottle virus. *Acta Hort.* 36, 59—63, 1974.
37. Hunter D.E., Darling H.M., Beale W.L.: Seed transmission of potato spindle tuber virus. *Amer. Potato J.* 46, 247—250, 1969.
38. Kryczyński S.P., Horst R.K., Dimock A.W.: Some properties of chrysanthemum chlorotic mottle virus. *Phytopath.* 61, 899, 1971.
39. Lawson R.H., Hearon S.S.: Ultrastructure of chrysanthemum stunt virus-infected and stunt-free Mistletoe chrysanthemum. *Phytopath.* 61, 653—656, 1971.
40. Loening U.E.: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.* 102, 251—257, 1967.
41. Martin W.H.: „Spindle-tuber”, a new potato trouble. *Hints to Potato Growers*, N.Y. State Potato Ass. 3, 8, 1922.
42. McKinney H.H.: Comments on virus terminology and the „viroid”. *Phytopath.* 63, 438, 1973.
43. Moreira S.: Citrus virus diseases. *FAO Plant Prot. Bull.* 12, 57—66, 1964.
44. Raymer W.B., O'Brien M.J.: Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. *Amer. Potato J.* 39, 401—408, 1962.
45. Raymer W.B., Diener T.O.: Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. I. Assay, extraction, and concentration. *Virology* 37, 343—350, 1969.
46. Romaine C.P., Horst R.K.: Suggested viroid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease. *Virology* 64, 86—95, 1975.
47. Schultz E.S., Folsom D.: A „spindling-tuber disease” of Irish potatoes. *Science* 57, 149, 1923.
48. Semancik J.S., Magnuson D.S., Weathers L.G.: Potato spindle tuber disease produced by pathogenic RNA from citrus exocortis disease: evidence for the identity of the causal agents. *Virology* 52, 292—294, 1973.
49. Semancik J.S., Morris T.J., Weathers L.G.: Structure and conformation of low molecular weight pathogenic RNA from exocortis disease. *Virology* 53, 448—456, 1973.
50. Semancik J.S., Weathers L.G., Rodorf B.F., Kearns D.R.: Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology* 63, 160—167, 1975.

51. Semancik J.S., Weathers L.G.: Exocortis virus of citrus: Association of infectivity with nucleic acid preparation. *Virology* 36, 326—328, 1968.
52. Semancik J.S., Weathers L.G.: Exocortis disease: Evidence for a new species of „infectious” low molecular weight RNA in plants. *Nature. New Biology* 237, 242—244, 1972.
53. Semancik J.S., Weathers L.G.: Exocortis disease: An infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology* 47, 456—466, 1972.
54. Semancik J.S., Weathers L.G.: Pathogenic 10 S RNA from exocortis disease recovered from tomato bunchy-top plants similar to potato spindle tuber virus infection. *Virology* 49, 622—625, 1972.
55. Singer B., Fraenkel-Conrat H.: Effects of bentonite on infectivity and stability of TMV-RNA. *Virology* 14, 59—65, 1961.
56. Singh R.P.: Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *Amer. Potato J.* 47, 225—227, 1970.
57. Singh R.P.: A local lesion host for potato spindle tuber virus. *Phytopath.* 61, 1034—1035, 1971.
58. Singh R.P.: Experimental host range of the potato spindle tuber „virus”. *Amer. Potato J.* 50, 111—123, 1973.
59. Singh R.P., Bagnal R.H.: Infectious nucleic acid from host tissues infected with the potato spindle tuber virus. *Phytopath.* 58, 692—699, 1968.
60. Singh R.P., Benson A.P., Salma F.M.: Purification and electron microscopy of potato spindle tuber virus. *Phytopath.* 56, 901—902, 1966.
61. Singh R.P., Clark M.C.: Infectious low molecular weight ribonucleic acid from tomato. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44, 1077—1083, 1971.
62. Singh R.P., Clark M.C.: Similarity of host response to both potato spindle tuber and citrus exocortis viruses. *FAO Plant Prot. Bull.* 21, 121—125, 1973.
63. Singh R.P., Finnie R.E.: Seed transmission of potato spindle tuber metavirus through the ovule of *Scopolia sinensis*. *Canad. Plant Dis. Survey* 53, 153—154, 1973.
64. Singh R.P., Michniewicz J.J., Narang S.A.: Multiple forms of potato spindle tuber metavirus ribonucleic acid. *Canad. J. Biochem.* 52, 809—812, 1974.
65. Sogo J.M., Koller Th., Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid. X. Visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* 55, 70—80, 1973.
66. Stollar B.D., Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid. V. Failure of immunological tests to disclose double-stranded RNA or RNA-DNA hybrids. *Virology* 46, 168—170, 1971.
67. Takahashi T., Diener T.O.: Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology* 64, 106—111, 1975.