한국식물병리학회지 1(3) : 199-206(1985)
Korean J. Plant Pathol. 1(3) : 199-206(1985)

바이로이드—가장 작은 植物病原體

李 在 悅

慶北大學校 微生物學科

Viroid—the Smallest Plant Pathogen

Jai Youl Lee

Department of Microbiology Kyungpook National University

要 約

바이로이드(viroid)는 그의 완전한 분자구조가 처음으로 밝혀진 植物病原體이며, coat-protein이 제거된 viral-RNA가 아닌 바이로이드로서의 獨立的인 特性과 病原性을 가진 가장 작은 크기의 병원체임이 밝혀짐으로써 미생물의 영역을 한 단계 넓혀서 생각하도록 하였다. 일반적으로 생각되는 微生物 즉 곰팡이, 세균, 마이코플라스마, 바이러스들이 動物과 植物 및 人體에 病原體로서 作用하는데 바이로이드는 현재까지 高等植物에서만 발견되는 病原體이다. 따라서 바이로이드가 動物 및 人體에서 아직까지 밝혀지지 않고 있는 병의 병원체일 가능성이 있으므로 이에 대한 연구가 계속되고 있다. 바이로이드는 작은 크기임에도 獨自的인 自己增殖을 하는 능력과 生存을 유지하는 특성이 있기 때문에 이들의 분자구조 및 생물적 특성을 연구하는데 좋은 資料가 되며, 최근에 급속한 진전을 보이고 있는 분자생물학 및 유전공학적인 방법과 기술을 이용하여 Viroid의 여러가지 성질과 생물학적인 위치에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 앞으로 연구가 계속되어 Viroid의 增殖과 病原性에 대한 문제가 해결된다면, 바이로이드病의 예방이나 치료법이 확립될 것이며 또한 목적하는 유전자를 운반하는 Vector로 개발하여 생물공학 분야에 적극적으로 활용할 수 있을 것이다.

ABSTRACT

Viroids are the smallest, well-characterized infectious agents presently known, and so far viroids have been found only in higher plants. The structures of viroid-molecules are single-stranded, covalently closed circular RNA molecules with a range of 240 to 380 nucleotides according to the various viroids. Viroids are remarkable not only as a new category of pathogen, which cause economically important diseases, but also as an excellent model system for biochemical and biophysical investigations because of their small size, relative stability and their self-replication. Four different patato spindle tuber viroid isolates, which express the different symptoms on the same host plant exchange only 2 to 6 nucleotides in the total number of 359 nucleotides, but now the mechanism of viroid pathogenicity is not explained fully. Viroid-melecules are replicated without any special viroid-associated proteins, and during the process of viroid replication oligomeric viroid-associated RNAs are detected at nuclei of viroid infected leaf tissue. The mechanism of viroid replication can now be illustrated according to a possible explanation of rolling-circle system. Although the rapid progress have been made in elucidation of the biochemical and biophysical properties of PSTV and other viroids, the mechanism of viroid replication and pathogenicity is less known and is still a matter of speculation. When these problems can be sufficiently explained, the viroid molecule could play an important role as an available vector in plant genetic engineering.

1. 緖 論

바이로이드(viroid)는 이제까지 알려진 식물병원체 가운데 완전한 2차구조가 밝혀진 병원체로서, 그 病徵이 바이러스와 매우 닮았기 때문에 "Viroid"라는 이름이 붙여졌으며 지금까지 고등식물에서만 존재하는 것으로 알려져 있다.

현재까지 알려진 바이로이드의 일반적인 특징은 전형적인 바이러스와 달리 단백질을 갖지 않고 240~380개의 염기로 된 단일가닥의 RNA만으로 구성되어 있으며, 그 크기는 보통 바이러스의 1/100 정도이며 가장 작은 RNA-Virus인 MS-2의 1/10에 불과하다(1, 2, 3).

이러한 작은 크기의 바이로이드분자가 기주식물에 들어가면 이 바이로이드에 관련된 특이한 단백질의 합성없이 獨自的인 증식이 가능하며 바이로이드 고유한 病原性을 나타내기 때문에 Viral-RNA의 개념을 벗어난 바이로이드로서의 獨特한 성질을 갖고 있다.

이들 바이로이드에 대한 연구는 2차구조가 밝혀진 이래 급속한 진전을 보이고 있지만, 바이로이드의 복제와 병원성기작에 대해서 완전히 밝혀지지 않고 있으므로 현재 이에 대한 연구가 집중적으로 진행되고 있다.

2. 바이로이드病의 種類

감자병의 하나인 감자·갈쭉병(potato spindle tuber virus)에 대한 연구가 1920년대부터 미국에서 계속되다가 1971~1972년에 이르러 이의 病原體는 기존의 virus와 달리 단백질이 없는 핵산(RNA)만으로 구성되었다는 사실이 Diener 등에 의해서 발표되었고, 1920년대부터 발생된 것으로 여겨지는 citrus exocortis virus 역시 바이로이드가 병원체인 것이 Sänger와 Semancik에 의해 독립적으로 발표되었다(4, 5, 6).

이후 오랜동안 병원체가 밝혀지지 않은 여러가지 동·식물의 병원체 역시 바이로이드일 것이라는 가능성으로 연구가 계속되었으나, 아직까지 바이로이드는 고등식물에서만 발견되었으며 그 종류는 표 1에서 보는 바와 같이 12종류에 이르고 있다.

기주식물에 나타나는 바이로이드의 외형적인 病徵은 식물바이러스의 병징과 비슷하게 變形과 變色(CEV, CCMV, TBTV, TASV), 열매의 異狀(PSTV, ASBV, CPFV), 萎縮現狀(CSV, BSV, HSV) 이외에 이병식물의 死滅(CCCV) 등의 病徵을 보인다. 특히 PSTV나 CEV의 경우에 罹病株의 新梢부분에서 잎이 뒷면으로 휘말아 감기는 전형적인 病徵(epinasty)을 보여 준다(그림 1).

Table 1. The viroid diseases presently known and the corresponding abbreviations

Viroid disease	Viroid
1. Potato spindle tuber	PSTV
2. Citrus exocortis	CEV
3. Chrysanthemum stunt	CSV
4. Chrysanthemum chlorotic mottle	CCMV
5. Cucumber pale fruit	CPFV
6. Coconut 'cadang-cadang'	CCCV
7. Hop stunt	HSV
8. Avocado sunblotch	ASBV
9. Tomato bunchy top	TBTV
10. Tomato apical stunt	TASV
11. Tomato 'planta macho'	TPMV
12. Burdock stunt	BSV

Fig. 1. Symptoms of PSTV in tomato plants (cv. Rutgers). Right : healthy control plants.

한편 이들 바이로이드의 기주범위는 그 종류에 따라서 차이를 보이기는 하지만 바이러스의 경우와 비교하여 보다 좁은 기주범위를 보인다. CCMV의 기주범위는 단지 국화에 한정되어 있으며, CCCV의 경우에는 유사한 몇 가지 種의 야자나무에만 기주범위가 한정되어 있다.

3. 바이로이드의 傳染과 防除法

바이로이드는 바이러스와 비슷한 방법으로 傳染되는데 바이로이드의 진염방법에는 상처를 통한 기계적 전염과 汁液傳染(7, 8), 種子나 꽃가루를 통한 垂直傳染

(9, 10), 寄生植物에 의한 전염(11), 接木이나 挿木을 통한 전염이 있으며(12), PSTV의 경우에는 매우 낮은 빈도이기는 하나 진딧물에 의한 전염도 보인다(13, 14). Viroid 病은 주로 재배식물에 발생하는데 포장해서 바이로이드의 傳播는 人爲的이거나 농기구에 의한 기계적인 접촉감염(PSTV, CSV), 또는 과경, 삽목, 접목을 통한 영양번식법에 의해서 전염되고 있다.

대부분의 바이로이드病은 罹病株를 사멸시키거나 열매를 變形 또는 變色시켜서 상품성을 떨어뜨림으로써 경제적으로 큰 피해를 준다. 특히 필리핀에서는 CCCV의 病害로 심각한 피해를 보고 있는데 이제까지 약 3천만 그루의 야자나무가 枯死했으며 매년 500,000 그루 이상의 야자나무가 죽어가는 것으로 추정되고 있으나 아직까지 이 CCCV의 자연적인 전파과정은 의문으로 남아 있다.

바이로이드病害에 대한 防除는 바이로이드의 전염방법이 밝혀짐에 따라 어느 정도 가능하게 되었다. 일반적인 바이로이드병에 대한 防除法은 바이러스病의 방제법과 대체로 비슷하며, 바이로이드 病害防除에 효과가 있는 약제도 개발되지 않았고 원핵세포생물에 효과가 있는 抗生物質도 바이로이드의 방제에는 효과가 없다. Viroid 病害는 대부분 단일종이 재배되는 포장에서 바이로이드 罹病株의 영양번식과 기계적인 접촉감염에 의해서 發生하게 되므로 가장 현실적인 방제법은 바이로이드 罹病株를 찾아내어 初期에 이를 제거하는 방법이다. 그러나 경우에 따라서는 野生種의 바이로이드寄主植物에서 바이로이드가 병징이 발현되지 않은 잠복상태로 존재하다가 단일종을 재배하는 대면적의 포장에 전파되는 경우가 있으므로(15) 이러한 경우는 수시로 점검되어야 할 것이다.

한편 흥미있는 결과의 하나로 바이러스病에 대한 고온처리 방법과 달리 바이로이드의 경우에는 저온처리 방법이 어느 정도 효과가 있는 것으로 알려졌으며(16), PSTV의 각 Strain 간에도 교차저항성이 있다는 것이 밝혀졌으나(17), 이러한 방법들이 바이로이드병의 완전한 방제법이 될 수는 없고 단지 부수적인 방제법으로 이용될 수 있을 것이다.

4. 바이로이드의 検定法

바이로이드의 확인을 위한 간단한 방법으로 寄主植物을 이용한 生物検定法이 있으나 이 방법으로는 정확하고 신속한 바이로이드의 검정이 이루어질 수 없다. 일반적으로 바이로이드의 병징은 바이러스의 병징과 서로를 쉽게 구별하기 힘들고, 바이로이드의 기주식물 범위는 몇 개의 科(family)에 국한되어 있고, 특히 mild strain 의 경우에는 指標植物에서 뚜렷한 바이로이드病徵을 보이지 않으며, 더구나 바이로이드가 指標植物에 병징을 發現시키기에는 몇 週 정도의 긴 시간이 소요되기 때문이다.

바이로이드는 coat-protein이 없이 RNA만으로 구성되어 있으므로 단백질에 대한 항체가 생성되지 않으며 따라서 바이러스 검정에 널리 이용되는 항혈청 검정방법은 바이로이드 검정에는 이용할 수 없다. 그러므로 현재 가장 널리 사용되고 있는 바이로이드의 검정방법은 Polyacrylamide gel을 이용한 전기영동법으로써, gel에 나타나는 Viroid-band의 有無를 통하여 바이로이드의 존재를 확인하는 방법이다. 이렇게 전기영동법을 이용할 때에는 우선 罹病株에서 Viroid-RNA를 淨化해야 하는 번거로움을 가지고 있으나 이 방법은 비교적 소량의 바이로이드를 정확하게 확인할 수 있는 장점이 있다. 최근에 개발된 질산은을 이용한 염색법(silver staining)을 이용하면(18) 微量의 바이로이드분자를 확인할 수 있다.

최근에 이르러 분자생물학적인 연구가 급속히 발전된 결과, 바이로이드 분자의 complementary DNA (cDNA)를 합성하고, recombinant DNA기술과 molecular Hybridization 방법을 이용하여 보다 빠르고 確實한 바이로이드 감정방법이 개발되었다(19, 20, 21). 이 방법은 고도로 민감한 반응을 보이는 분석방법이나 현재 손쉽게 이용하기에는 비용이 많이 드는 단점이 있다. 그러나 앞으로 이 방법에 대한 기술이 개선되고 대량생산 체계가 확립되면 가장 확실하고 빠른 바이로이드 검정법으로써 實用化될 전망이 크다.

5. 바이로이드의 構造

바이로이드 분자는 한 가닥의 RNA가 닫혀진 고리모양의 구조를 가지는데(1, 22) 염기쌍들이 서로 결합하여 막대모양을 유지하고 있고 염기쌍을 갖지 않는 부분은 loop 모양을 하고 있다. 이들 loop 간에는 서로 상관되는 염기쌍을 갖지 않으며, 또한 바이로이드 분자에는 fMethionine 이나 valine의 tRNA가 결합할 수 있는 anticodon 부위가 존재하지 않으므로 바이로이드 분자는 굽어진 3차구조를 갖지 않는다.

바이로이드의 염기배열은 종류에 따라서 다르지만 240～380개의 염기로 구성되며(1, 2, 23, 24), 이들 바이로이드 분자의 염기배열 가운데 변하지 않는 부분(conserved area)이 존재하는데 이 부분이 증식과 생

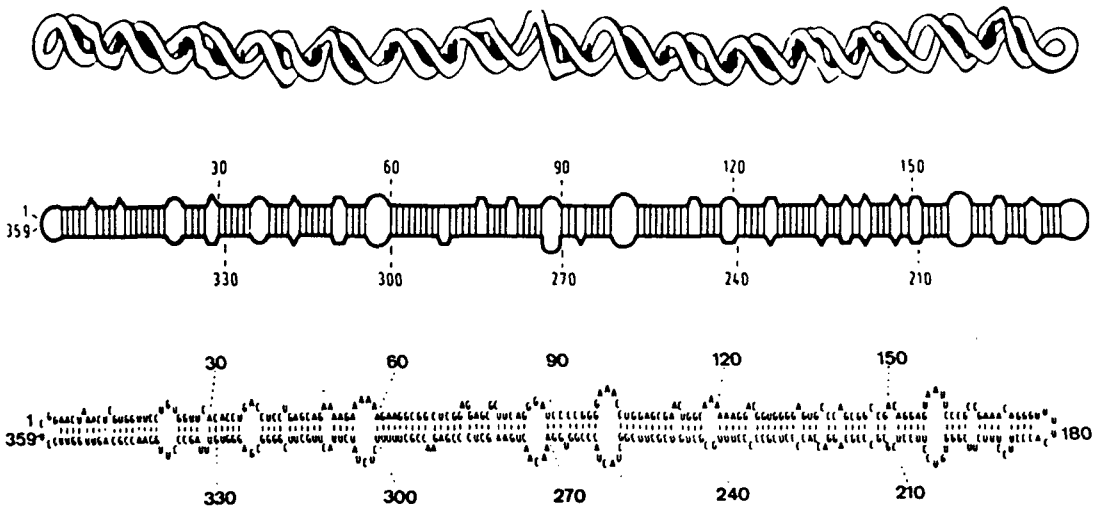

Fig. 2. The secondary structure of PSTV represented by nucleotide sequences(below), diagramatic form (middle) and three dimensional model(above) (Sänger, 1976).

존에 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다. 특히 CCCV-RNA의 경우에서는 바이로이드 복제과정에서 나타나는 형태와 전기영동의 이동성의 차이에 따라 4개의 RNA구조를 보여주고 있다. CCCV-RNA 1 fast와 CCCV-RNA 2 fast는 發病初期에 나타나고 1년 이상 병징이 진전된 罹病株에서 CCCV-RNA 1 slow와 CCCV-RNA 2 slow가 나타나는데 이들 가운데 CCCV-RNA 1 fast가 CCCV-RNA의 기본형이 되는 것으로 추측된다(23, 25).

한편 Viroid-RNA는 formamide와 尿素의 존재아래에서 전기영동을 거치게 되면 고리모양과 선모양의 Viroid-RNA로 분리되며 이들 두 가지 형태는 모두 病原性을 가지고 있다. 고리모양의 바이로이드 분자의 어느 한 부분이 이러한 변성상태에서 잘려져 나가 선모양의 바이로이드 분자로 되는데 이 때에 Mg^{++} 이온이 영향을 미치는 것으로 알려졌으며 또한 선모양의 Viroid-RNA는 RNA-ligase에 의해서 *in vitro* 에서도 고리모양의 Viroid-RNA로 전환될 수 있다(26, 27). 이러한 사실들로 미루어 보아 Viroid-RNA는 in vivo에서 대부분 단히진 고리모양을 유지하고 있으며 이러한 형태의 viroid 분자가 복제의 기본형이 된 것으로 여겨진다.

6. 바이로이드의 복제

바이로이드는 coat-protein이나 envelope에 쌓여 있지 않은 아주 작은 크기의 RNA분자로서 다른 바이러스들과 달리 자신의 증식에 필요한 효소를 갖지 않은 채로 존재한다. 왜냐하면 240~380개의 염기를 가진 바이로이드 분자의 유전정보의 함유량은 그들의 복제에 필요한 복제효소의 암호를 가지기에 불충분한 크기이기 때문이다. 이로 미루어 보아 바이로이드의 복제기작은 기주체에 이미 존재하는 핵산의 합성기작에 그 기본을 두고 있다고 볼 수 있다. 실제로 Viroid-RNA는 罹病株의 세포 안에서 핵산합성이 이루어지고 있는 핵과 관련된 부위에 주로 분포하고 있다(28, 29).

Viroid-RNA의 가능한 복제방법으로 기주세포에 들어간 Viroid-RNA가 DNA를 거치거나 또는 직접 RNA를 합성하여 이들로부터 바이로이드의 자손을 만들어 낸다고 생각해 볼 수 있다. 그러나 기주세포에서 RNA를 기질로 하여 DNA를 합성한 수 있는 역전사효소(reverse transcriptase)는 아직까지 식물체에서 발견되지 않으며, 또한 기주식물체 안에서 억제된 상태로 존재하는 것으로 가정되는 바이로이드에 특이성을 가지는 기주의 DNA도 PSTV, CEV의 기주식물인 토마토와 gynura에서 molecular hybridization 실험에 의해서 그 존재가 확인되지 못하였다(30). 이제까지 발표된 실험결과에 의하면 바이로이드에 감염되지 않은 건전주의 세포내에서 바이로이드에 특이성을 보이는 DNA가 보이지 않으나, 바이로이드에 감염된 罹病株의 세포내에서는 바이로이드에 특이성을 갖는 oligomeric (−) RNA 중간체가 발견되고 있다(31, 32, 33). 따라서 바이로이드의 가능한 복제기작은 감염가 가지고 있는 원래의 DNA 또는 RNA 의 RNA 중합효소에 의해서 RNA를 만들고 이것을 바탕으로 바이로이드 분자를 복제하는 것으로 생각할 수 있다.

토마토의 원형질체 배양을 이용하여 세포단계에서 PSTV-RNA의 복제과정을 조사한 결과에 의하면, DNA 의존 RNA 중합효소II의 작용은 억제시키는 α-amanitin 의 낮은 농도(10^{-8}M)에서 PSTV-RNA 의 복제가 억제되었고 다른 RNA들의 합성은 영향을 받지 않았다. 또한 토마토와 烟草에서 분리, 추출한 DNA 의존 RNA 중합효소를 이용한 *in vitro* 실험에서도 PSTV-RNA를 기질로 사용하면 PSTV-RNA 가 복제되었다(34, 35). Viroid-RNA의 독특한 구조를 살펴볼 때 바이로이드의 염기배열에는 열역학적인 안정성과 변성에 관여하는 G:C의 결합이 도처에 존재하므로 이는 비슷한 크기의 DNA분자와 상당히 유사한 성질을 가진 것으로 보인다. 이러한 성질 때문에 Viroid-RNA는 宿主에 존재하는 DNA 의존 RNA 중합효소의 기질로 작용한 것이라고 설명할 수 있으나 실제로 이와같은 반응이 기주세포 안에서 일어나는지에 대해서는 실험적인 증거가 필요하다. 한편 健全株의 토마토 잎에서 분리, 추출한 RNA 의존 RNA 중합효소를 이용하여 PSTV-RNA를 기질로 하여 *in vitro* 에서 실험해본 그 효율은 낮으나 완전한 길이의 PSTV-RNA를 복제한다고 한다(36).

이와 같은 바이로이드의 복제과정에 대한 실험결과를 종합해 볼 때 바이로이드의 복제는 rolling-circle 방법에 의한다는 설명도 나오고 있다(37, 38). 즉 바이로이드의 복제는 感染源이 되는 고리모양의 viroid-RNA를 (+)로 가정하면 이 (+)RNA는 기주세포 내의 핵에서 oligomer 형태를 가지는 (−)RNA를 전사시키는데 이때 기주에 존재하는 DNA 의존 RNA 중합효소에 의해서 rolling-circle 복제방법에 따라 전사되고 이렇게 생성된 (−)RNA가 기질로 작용하여 oligomer 형태를 가지는 (+)RNA가 생성된다. 이 oligomer (+)RNA는 Viroid (+)RNA의 전구체로써 특이한 효소작용에 의하여 Viroid와 같은 길이로 잘라져서 마지막으로 ligase에 의해 Viroid (+)RNA 형태인 고리모양을 갖추게 된 것이라는 설명이다.

Viroid-RNA의 복제는 위와 같이 설명될 수 있으나 아직까지 바이로이드의 복제기작에 대한 완전한 실험적인 증거가 불충분하며, 바이로이드 분자가 가지는 독특한 구조적인 특성으로 보아 2중가닥이나 단일가닥의 RNA로서 가질 수 있는 성질을 함께 갖추고 있는 보다 복잡한 복제기작을 가질 수도 있다. 앞으로 이에 대한 연구가 계속됨에 따라 보다 확실한 바이로이드 분자의 복제기작이 밝혀질 것으로 기대된다.

7. 바이로이드의 病原性

바이로이드의 일반적인 병징은 바이러스의 病徵과 서로 비슷하기 때문에 쉽게 서로를 구별할 수 없다. 바이로이드 罹病株의 組織絶片을 전자현미경으로 관찰해 보면 바이러스 罹病株의 조직절편에서 보이는 viroplast가 나타나지 않으며, 핵, mitochondria, chloroplast ribosome 등에서 어떠한 구조적인 變形도 나타나지 않고 다만 바이로이드 罹病株의 세포막에서 부분적인 변형이 보일 뿐이다(39). 이러한 세포막의 부분적인 變形에 의해서 Viroid 병징의 특징적인 epinasty와 같은 증상이 일어나는 것으로 생각된다.

바이로이드는 바이러스와 달리 coat-protein 이나 envelope이 없이 RNA만으로 구성되어 있는데 Viroid-RNA의 염기배열을 살펴보면 단백질합성의 개시암호인 AUG염기배열이 보이지 않는다. 또한 PSTV나 CEV-RNA가 *in vitro*에서 어떤 특이한 단백질 합성을 촉진하거나 방해하지 않으며, *in vivo* 에서도 viroid-RNA에 특이성을 가지는 어떠한 단백질의 합성도 보이지 않는다(40, 41). 한편 Viroid 罹病株에서 상당량의 단백질합성이 확인되나 이러한 단백질은 Viroid가 아닌 기주식물에 특이성을 가지는 단백질이다(42, 43). 다른 바이러스 및 진균에 감염된 이병주에서도 바이로이드의 이병주에서 보여주는 같은 단백질의 양적인 증가를 볼 수 있으며 전전주에서도 소량이나마 같은 단백질을 확인할 수 있기 때문이다.

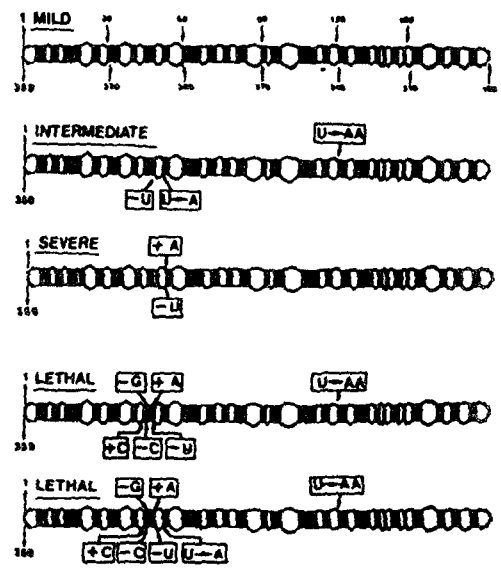

Fig. 3. The nucleotide exchanges in various PSTV isolates (Sänger, 1984).

이와 같은 사실로 보아 Viroid-RNA는 어떤 단백질 합성을 위한 암호도 갖지 않은채 핵산을 복제하며, 마찬가지로 바이로이드의 병원성도 Viroid에 특이성을 보이는 어떠한 단백질의 합성없이 기주식물의 핵산복제와 Viroid-RNA의 복제과정 사이에서 일어나는 직접적인 관계에 의한 것으로 생각된다.

또한 생물학적인 면에서 바이로이드의 병원성을 살펴보면 바이로이드의 病徵發現은 바이로이드 분자가 가지는 유전자의 表現만으로 특징지워지지 않고 寄主植物의 유전자에 의해서도 영향받는 것을 알 수 있다. 병징에 따라 다르게 구별되는 PSTV의 分離型들은 (lethal, severe, intermediate, mild isolates) 그림 3에서와 같이 359개의 PSTV 염기배열 가운데 각각 2개 내지 6개의 염기배열의 변화를 보여 준다(37).

또한 이들 分離型은 같은 품종의 이병주에서 각기 다른 병징을 보일 뿐만 아니라, 한가지 분리형이 다른 品種의 寄主植物에 感染되면 罹病株의 품종에 따라 각기 다른 병징을 發現시킨다. 토마토의 Rutgers 品種에서 심한 병징을 보여주는 PSTV분리형이 Rentita品種에서는 약한 병징을 보이며 Hilda品種에서는 병징을 거의 보이지 않는다.

이미 확인된 바이로이드 분자의 염기배열 순서를 살펴보면, 진핵세포 내에서 intron이 제거되는 splicing 과정에 참여하는 U1 RNA의 一部分과 同一한 염기배열을 가진 부분이 있다(44, 45). 이러한 同一部分의 염기배열에 의해서, 세포 안에서 DNA로부터 전사된 RNA에 Viroid-RNA가 U1 RNA 대신에 결합함으로써 splicing 과정이 방해받게 된다. 이 결과로 단백질합성에 직접 관여하지 못하는 intron이 제거되지 못하기 때문에 세포 내에서 정상적으로 일어나야 하는 단백질합성이 교란되어 바이로이드가 가지는 특이한 병징이 나타나게 된다고 생각할 수 있다. 물론 이러한 설명을 뒷받침할만한 실험적인 증거에 대하여는 앞으로 계속 연구되어야 하겠지만, 바이로이드의 病徵發現 기작은 바이로이드 분자가 포함하고 있는 유전인자에 따라 병징이 발현될 뿐만 아니라, 바이로이드의 복제기작과 함께 기주식물과의 사이에서 일어나는 관계에 의해서도 병징이 發現되는 復合的인 기작에 의한다고 보아야 할 것이다.

參 考 文 獻

1. GROSS, H. J., DOMDEY, H., LOSSOW, C., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H. & SÄNGER, H. L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273: 203-208.
2. GROSS, H. J., KRUPP, G., DOMDEY, H., RABA, M., ALBERTY, H., LOSSOW, C. H., RAMM, K. & SÄNGER, H. L. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.* 121: 249-257
3. FIERS, W., CONTREAS, R., DUERINCK, F., HAEGEMAN, G., MIN YOU, W., MOLEMANS, F., RAEYMADERS, A., VAN DEN BERGHE, A., VOLKAERT, G. & YSEBAERT, M. (1976). Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260: 500-507.
4. DIENER, T. O. (1971). Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45: 411-428.
5. SÄNGER, H. L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.* 8: 103-116.
6. SEMANCIK, J. S. & WEATHERS, L. G. (1972). Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature (New Biol.)* 237: 242-244.
7. BONDE R. (1927). The spread of spindle tuber by the knife. *Am. Potato J.* 4: 51-52.
8. BONDE, R. & MERRIAM, D. (1951). Studies on the dissemination of the potato spindle tuber virus by mechanical inoculation. *Am. Potato J.* 28: 558-560.
9. FERNOW, K. H., PETERSON, L. C. & PLAISTED, R. L. (1970). Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected potato plants. *Am. Potato J.* 47: 75-80.
10. WALLACE, J. M. & DRAKE, R. J. (1962). A high rate of seed transmission of avocado sunblotch virus from symptomless trees and the origin of such trees. *Phytopathology* 52: 237-241.
11. VAN DORST, H. J. M. & PETERS, D. (1974). Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Neth. J. Plant Pathol.* 80: 85-96.
12. DIMOCK, A. W., GEISSINGER, C. M. & HORST, R. K. (1971). Chlorotic mottle: A newly recogniz-

ed disease of chrysanthemum. *Phytopathology* 61: 415-419.

13. DE BOKX, J. A. & PIRON, P. G. M. (1981). Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Neth. J. Plant Pathol.* 87: 31-34.
14. LEE, J. Y. (1982). Untersuchungen zur Übertragung des Viroids der Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV) durch Insekten und zu seinem Nachweis durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. *Justus-Liebig-Universität Giessen* Dissertation.
15. SINGH, R. P. (1973). Experimental host range of the potato spindle tuber "virus". *Am. Potato J.* 50: 111-123.
16. LIZARAGA, R. E., SALAZAR, L. F., ROCA, W. M. & SCHILDE-RENTSCHLER. L. (1980). Elimination of potato sindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. *Phytopathology* 70: 754-755.
17. NIBLETT, C. L., DICKSON, E., FERNOW, K. H., HORST, R. K. & ZAITLIN, M (1978). Cross protection among four viroids. *Virology* 91: 198-203.
18. GOLDMANN, D. & MERRIL, C. R. (1981). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis* 3: 24-26.
19. ALLEN, R. N. & DALE, J. L. (1981). Application of rapid biochemical methods for detecting avocado sunblotch disease. *Ann. Appl. Biol.* 98: 451-461.
20. OWENS, R. A. & DIENER, T. O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic-acid hybridization. *Science* 213: 670-672.
21. MOHAMED, N. A. & IMPERIAL, J. S. (1984). Detection and concentration of coconut cadang-cadang viroid in coconut leaf extracts. *Phytopathology* 74: 165-169.
22. SÄNGER, H. L., KLOTZ, G., RIESNER, D., GROSS, H. J. & KLEINSCHMIDT, A. K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 73: 3852-3856.
23. HASELOFF, J., MOHAMED, N. A. & SYMONS, R. H. (1982). Viroid RNAs of the cadangcadang disease of coconuts. *Nature* 299: 316-322.
24. SYMONS, R. H. (1981). Avocado sunblotch voroid-primary sequence and proposed secondary structure. *Nucl. Acids Res.* 9: 6527-6537.
25. MOHAMED, N. A., BAUTISTA, R., BUENAFLOR, G. & IMPERIAL, J. S. (1985). Purification and infectivity of the coconut cadang-cadang viroid. *Phytopathology* 75: 79-83.
26. OWENS, R. A., ERBE, E., HADIDI, A., STEERE, R. L. & DIENER, T. O. (1977). Seperation and infectivity of circular and linear forms of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3859-3863.
27. SÄNGER, H. L., RAMM, K., DOMDEY, H., GROSS, H. J., HENCO, K. & RIESNER, D. (1979). Conversion of circular viroid molecules to linear strands. *FEBS Lett.* 99: 117-122.
28. SEMANCIK, J. S., TSURUDA, D., ZANER, L., GEELEN, J. L. M. C. & WEATHERS, J. G. (1976). Exocortis disease: Subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology* 69: 669-676.
29. SCHUMACHER, J., SÄNGER, H. L. & RIESNER, D. (1983). Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.* 2: 1549-1555.
30. HADIDI, A., JONES, D. M., GILLESPIE, D. H., WONG-STAAL, F. & DIENER, T. O. (1976). Hybridization of potato spindle tuber viroid to cellular DNA of normal plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2453-2457.
31. ROHDE, W. & SÄNGER, H. L. (1981). Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by northern blot hybridization. *Biosci. Rep.* 1: 327-336.
32. OWENS, R. A. & DIENER, T. O. (1982). RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 113-117.
33. SPIESMACHER, E., MÜHLBACH, H.- P., SCHNÖLZER, M., HAAS, B. & SÄNGER, H. L. (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* 3: 767-774.
34. MÜHLBACH, H. - P., & SÄNGER, H. L. (1979).

Viroid replication is inhibited by α-amanitin. *Nature* 278: 185-188.

35. RACKWITZ, H. - R., ROHDE, W. & SÄNGER, H. L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant-origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* 291: 297-301.
36. BOEGE, F., ROHDE, W. & SÄNGER, H. L. (1982). In vitro transcription of viroid RNA into full length copies by RNA-dependent RNA polymerase from healthy tomato leaf tissue. *Biosci. Rep.* 2: 185-194.
37. SÄNGER, H. L. (1984). Minimal infectious agents: the viroids. *The Microbe* 1984: Part I Viruses, Cambridge Univ. Press pp 281-334.
38. BRANCH, A. D. & ROBERTSON, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science* 223: 450-455.
39. WAHN, K., ROSENBERG DE GOMEZ, R. & SÄNGER, H. L. (1980). Cytopatholgie von viroid-infiziertem Pflanzengewebe. I. Veranderungen des Plasmalemmas und der Zellwand bei *Gynura aurantiaca* DC nach Infektion mit dem Viroid der Citrus Exocortis Krankheit (CEV). *Phytopathol. Z.* 98: 1-18.
40. DAVIES, J. W., KAESBERG, P. & DIENER, T. O. (1974). Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology* 61: 281-286.
41. SEMANCIK, J. S., CONJERO, V. & GERHART, J. (1977). Citrus exocortis viroid: survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology* 80: 218-221.
42. CAMACHO-HENRIQUEZ, A. & SÄNGER, H. L. (1982). Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after infection with a viroid, two viruses and fungus and partial purification of the 'pathogenesis-related' protein p. 14. *Arch. Virology* 74: 181-193.
43. CONJERO, V. & SEMANCIK, J. S. (1977). Exocortis viroid: Alteration in the proteins of *Gynura aurantiaca* accompanying viroid infection. *Virology* 77: 221-232.
44. CRICK, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* 204: 264-271.
45. DIENER, T. O. (1981). Are viroids escaped introns? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 5014-5015.