

**Cezary Żekanowski**  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
Warszawa

## Wiroidy – infekcyjne cząsteczki RNA

### 1. Wiroidy nie są wirusami

W latach 1917 – 1918 w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej zaobserwowano pojawienie się nowej choroby ziemniaka. Porażone rośliny stawały się karłowate, ich liście były wydłużone i skręcone a bulwy mniejsze i wrzecionowate. Choroba rozprzestrzeniała się szybko. Główną drogą przekazywania infekcji był bezpośredni kontakt rośliny chorej ze zdrową. Do zakażenia dochodziło najłatwiej w czasie zabiegów agrotechnicznych. Badania przeprowadzone w latach trzydziestych i czterdziestych wykazały, że czynnik wywołujący chorobę wrzecionowatości bulw ziemniaka (*Potato Spindle Tuber Viroid*, PSTV) występuje wśród dziko rosnących w Ameryce Południowej i Północnej gatunków z rodziny *Solanaceae*. Jego rozprzestrzenianie się w naturalnych, bogatych ekosystemach jest jednak ograniczone. Dopiero wprowadzenie monokultur ziemniaka i rozwój technik rolniczych umożliwiły rozprzestrzenianie się choroby (1,2).

Przez co najmniej pięćdziesiąt lat usiłowano wyodrębnić czynnik zakaźny, przypuszczając, że patogen jest klasycznym wirusem roślinnym (3). Jednak w trakcie podejmowanych prób stwierdzono, że nie ma on właściwości immunogennych, jest niewrażliwy na działanie proteinaz, DNaz i fenolu, ulega natomiast inaktywacji pod działaniem RNaz. Wskazywało to, że "wirusem" jest wolny kwas rybonukleinowy. Badania z użyciem mikroskopu elektronowego potwierdziły, że RNA PSTV składa się z krótkich, pałeczkowatych cząsteczek, o wymiarach charakterystycznych dla podwójnej helisy RNA. RNA wiroida (nazwę tę wprowadził w 1971 r. T. O. Diener) poddano stopniowej denaturacji termicznej, analizując jednocześnie obraz w mikroskopie elektronowym. Wraz ze wzrostem temperatury znajdowano formy częściowo rozplecione, a także koliste o długości dwa razy większej od długości natywnej, pałeczkowatej postaci. Czynnik infekcyjny jest zatem kolistym zamkniętym RNA, o wysokim stopniu sparowania zasad. Taka struktura warunkuje m.in. dużą odporność wiroidowego RNA na działanie RNaz.

### 2. Struktura RNA określa funkcje życiowe wiroidów

W 1978 r. opublikowano pełną sekwencję nukleotydową PSTV (4). Okazało się, że w RNA wiroida nie występują w ogóle kodony inicjatorowe AUG. Zlokalizowano natomiast sześć trójek terminujących i siedem kodonów GUG (u prokariotów mogą one pełnić rolę kodonów inicjatorowych). Wykryto również kilka otwartych ramek odczytu. Jednak cechy pierwszo- i drugorzędowej struktury tego RNA (brak wolnego końca 5' ze strukturą "cap" oraz brak sekwencji regulacyjnych przed kodonami GUG) uniemożliwiają przyłączenie się rybosomów i syntezę białek.

Wcześniej, w latach siedemdziesiątych, prowadzono badania nad zdolnością PSTV i CEV (*Citrus Exocortis Viroid*) do kodowania białek. W różnych układach translacyjnych (zarówno pro- jak eukariotycznych) nie zaobserwowano syntezy swoistych polipeptydów. Również *in vivo*, w komórkach zakażonych roślin, nie pojawiają się dodatkowe, swoiste białka (5).

Obecnie przyjmuje się, że genom wiroidów nie zawiera informacji wystarczającej do syntezy własnych białek. Wskazuje to, że proces namnażania wiroidów oparty jest całkowicie na wykorzystaniu enzymów istniejących w komórkach gospodarza.

Oprócz wiroida wrzecionowatości bulw ziemniaka wykryto wiele czynników patogennych, które swą budową przypominają PSTV. Powodują one infekcje o podobnych objawach i sposobie przenoszenia w uprawach pomidorów, ogórków, awokado, palm kokosowych, tytoniu, owoców cytrusowych i winorośli. Przykłady wiroidów należących do pięciu różnych grup, wyodrębnionych na podstawie podobieństw w sekwencji RNA (5) przedstawiono w tab.

Tabela

**Wiroidy. Przykłady i uproszczona klasyfikacja (według (5), zmienione)**

Nazwa	Długość cz. RNA (nukl.)	Podobieństwo sekwencji do RNA PSTV (%)
grupa PSTV		
podgrupa PSTV		
1. Potato spindle tuber viroid PSTV	359	100
2. Tomato planta macho viroid TPMV	360	83
3. Tomato apical stunt viroid TASV	360	73
4. Citrus exocortis viroid CEV	371	73
5. Chrysanthemum stunt viroid CSV	354/356	73/69
podgrupa HSV		
1. Hop stunt viroid HSV	297	55
2. Cucumber pale fruit viroid CPFV	303	55
grupa CCCV		
1. Coconut cadang-cadang viroid	246-301	11
grupa ASBV		
1. Avocado sunblotch viroid	247	18
grupa ASSV		
1. Apple skar skin viroid	330	36

Dokładniejsze badania procesu denaturacji termicznej PSTV i innych wiroidów ujawniły wiele interesujących właściwości tego RNA. W trakcie denaturacji powstaje kilka, dających się zaobserwować w mikroskopie elektronowym, struktur pośrednich. Jedna z nich zawiera trzy dwuniciowe odcinki typu "szpilek do włosów", stabilizowane dwuniciowym fragmentem, którego sekwencja nukleotydowa jest wspólna dla wielu wiroidów (centralny region konserwatywny). W cząsteczce RNA PSTV występują również regiony ulegające rozpleceniu w pierwszej kolejności (z j.ang. *premelting regions*) (6). W czasie wieloletnich badań opisano szereg szczepów PSTV różniących się nasileniem zmian, wywoływanych na roślinach porażonych (szczepy ostre, łagodne, podostre, letalne). Różnice polegają na zamianie niewielu (od 2 do 10) nukleotydów, w regionach o niskiej stabilności termodynamicznej (4,5).

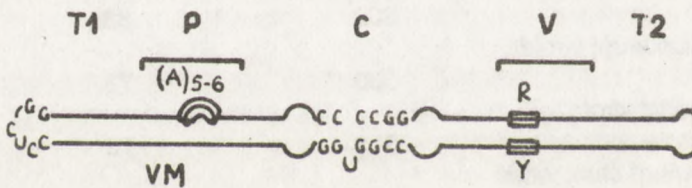
Porównanie sekwencji nukleotydowych i możliwych struktur drugorzędowych wiroidów należących do grupy PSTV pozwoliło zbudować ogólny model cząsteczki wiroida. Wyróżniono pięć regionów (domen) strukturalnych, którym przypisano określone funkcje (7):

1. Domena centralna – C – stanowi konserwatywny rdzeń cząsteczki, wspólny dla wszystkich znanych wiroidów (z wyjątkiem ASBV). Jest, być może, miejscem rozpoznawanym przez replikazę. Mutacje w tym obszarze znoszą całkowicie infekcyjność wiroidów.

2. Domena P – związana ze stopniem patogenności danego szczepu. Charakteryzuje ją obecność sekwencji oligo ( $A_{5-6}$ ).

3. Domena V – wykazująca największą zmienność sekwencji. Wspólnym dla różnych wiroidów elementem tej domeny jest krótki, helikalny odcinek, zawierający przynajmniej trzy pary G:C (na rys. 1 odpowiednio – R:Y). Jest związana z patogennością szczepu.

4. Domeny T1, T2 – uczestniczą w międzycząsteczkowej rekombinacji i rearanzacji RNA wiroidów.



Rys. 1. Ogólny model budowy cząsteczki wiroida.

Przedstawiono względne położenie pięciu domen strukturalnych (T1, P, C, V, i T2) oraz odcinka VM, określonych na podstawie podobieństw sekwencji różnych wiroidów. R:Y – krótka helisa oligopurynowo: oligopirimidynowa.

(A)<sub>5-6</sub> – trakt oligoadeninowy.

Wiroidy są organizmami o skomplikowanej budowie cząsteczkowej. Wyodrębnione obszary, o określonej strukturze pierwszo- i drugorzędowej mogą pełnić – przynajmniej funkcjonalnie – rolę odrębnych genów. Patogenność, kontrola replikacji,

zmienność rekombinacyjna i inne funkcje życiowe wiroidów są – najprawdopodobniej – kontrolowane bezpośrednio przez określone domeny strukturalne.

### 3. Replikacja wiroidów

Choć wydaje się dowiedzione, że namnażanie wiroidów zachodzi przy udziale enzymów występujących w komórkach gospodarza – proces ten nie jest dotychczas dokładnie poznany.

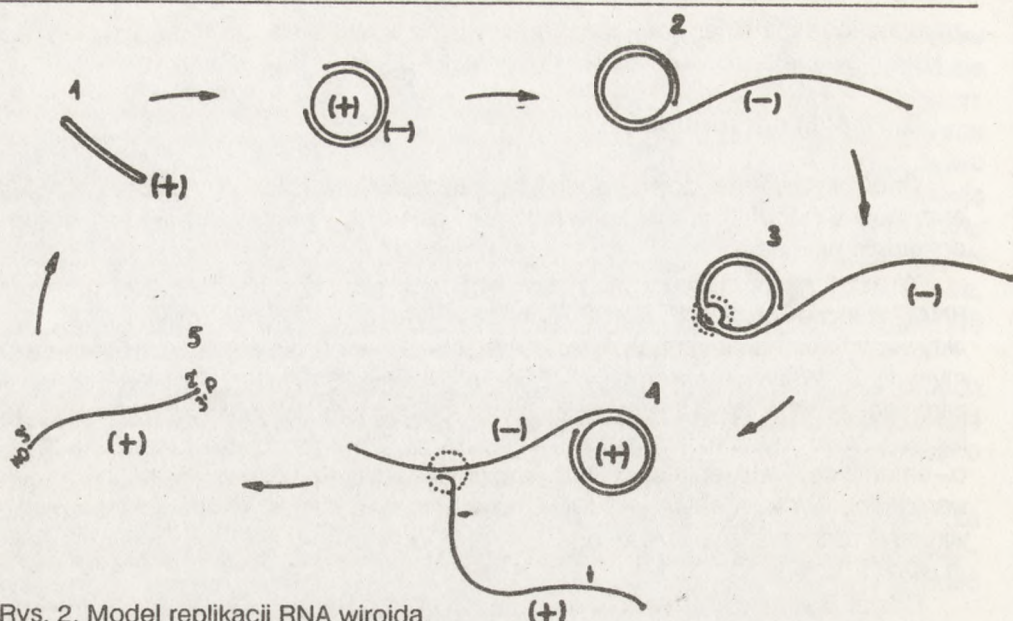
W 1981 r. zaproponowano, że w replikacji wiroidów bierze udział polimeraza II RNA, zależna od DNA (8). Enzym ten syntetyzuje komórkowy mRNA, a jego aktywność jest hamowana przez  $\alpha$ -amanitynę (w stężeniu 0,01 – 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) i aktynomycynę D. Wpływ aktynomycyny D na replikację PSTV, CEV i CPFV obserwowano zarówno *in vivo*, jak *in vitro* (w izolowanych jądrach komórkowych, protoplastach i liściach zakażonych roślin) (9,10,11). Replikacja CPFV jest hamowana również przez II  $\alpha$ -amanitynę, w stężeniu specyficznym działającym na polimerazę II RNA (11). W tych warunkach synteza tRNA, 5S RNA, organellarnego RNA i namnażanie niektórych wirusów zachodzi bez przeszkód. Podobnie wpływa  $\alpha$ -amanityna na replikację CEV *in vitro* (12).

Udział polimerazy II RNA w tym procesie nie jest jednak bezspornie dowiedziony. Z wyników późniejszych doświadczeń wynika, że stężenie aktynomycyny D hamujące replikację wiroidów zmniejsza jednocześnie syntezę komórkowego RNA w około 80% (13). Z drugiej strony  $\alpha$ -amanityna, nawet w wysokich stężeniach, nie ogranicza całkowicie replikacji RNA PSTV (14).

W 1985 r. Spiesmacher (15) podał, że w układzie z jąder komórek ziemniaka, zakażonych PSTV, aktynomycyna D hamuje syntezę nici (+) RNA wiroida (czyli nici infekcyjnej) o około 65%, natomiast synteza nici (-) – komplementarnej do nici (+) – jest zmniejszona tylko o około 10%.  $\alpha$ -amanityna natomiast hamuje syntezę obu typów nici RNA w około 70%. Ponieważ PSTV gromadzi się głównie w jąderkach zakażonych roślin wysunięto hipotezę o udziale w namnażaniu wiroidów obok polimerazy II, również polimerazy I RNA (syntetyzującej komórkowy rRNA). Polimeraza II syntetyzowałaby oligomeryczną nić (-) RNA na matrycy infekcyjnej, kolistej nici (+). Polimeraza I RNA odpowiedzialna byłaby za tworzenie nici (+) RNA.

Topologia procesu replikacji wiroidów została nieco lepiej poznana. W komórkach roślin zakażonych PSTV odnaleziono szereg replikacyjnych form pośrednich. Przede wszystkim dwuniciowe cząsteczki RNA (16), (-) nici RNA występujące w postaci liniowych oligomerów (17), częściowo w połączeniu z monomerycznymi nićmi (+) (18) oraz liniowe oligomeryczne nici (+) RNA (19,20). Takie formy pośrednie mogą powstawać w wyniku replikacji typu "obracającego się koła". Przyjmuje się, że wnikająca do komórki, infekcyjna nić (+) wiroida zostaje wykorzystana jako matryca do syntezy nici (-) RNA, na której syntetyzowana jest oligomeryczna nić (+) RNA wiroida. Przez jej fragmentację i cyklizację powstają kółka zamknięte monomeryczne nici (+) wiroida. Miejsce cięcia w cząsteczce RNA PSTV znajduje się między 260 a 270 nukleotydem (21).

Mechanizm fragmentacji oligomerycznej nici (+) RNA nie jest do końca wyjaśniony. Zwraca się uwagę, że analiza sekwencji RNA wszystkich wiroidów wykazała istnienie, wspólnego z intronami grupy I, 16 nukleotydowego odcinka (21,22).



Rys. 2. Model replikacji RNA wiroida.

Wnikająca do komórki kolista cząsteczka (+) RNA (1) służy jako matryca do syntezy długich, oligomerycznych nici (-) (2), na których powstają oligomeryczne nici (+) (3). Oligomery (+) ulegają fragmentacji na odcinki o długości genomu wiroida (4), które pod wpływem enzymów gospodarza ulegają cyklizacji (5).

Występuje on w dolnej części domeny centralnej. W odpowiednich warunkach RNA wiroida mógłby tworzyć formy zbliżone do struktur intronów grupy I (stabilizowane być może białkami komórkowymi). Fragmentacja byłaby więc procesem autokatalitycznym. Ostatnio jednak opublikowano szereg prac poddających w wątpliwość mechanizm samowycinania infekcyjnych monomerów. Proces ten, jak się okazało, zachodzi z niewielką wydajnością (3-5%) w warunkach optymalnych dla samowycinania intronów grupy I (23).

Efektywna autofragmentacja ma natomiast miejsce w układach zawierających ekstrakt z jąder komórek roślinnych (24). Może sugerować to udział specyficznych RNaz gospodarza. Sugestię tę potwierdza, jak się wydaje, fakt hamowania tego procesu przez łożyskowy inhibitor RNaz (24).

Inna hipoteza przewiduje powstawanie w długich, liniowych cząsteczkach RNA wiroidowego, stabilnych struktur drugorzędowych wyznaczających miejsca cięcia dla rybonukleaz. Formy te mogłyby być stabilizowane przez roślinne białka o charakterze zasadowym (25). W 1986 r. Diener zaproponował model podający teoretycznie możliwe miejsca fragmentacji oligomerycznych nici PSTV (26). Potwierdzają go niektóre dane eksperymentalne. Model Dienera nie podaje jednak mechanizmu tego procesu.

Obecnie wydaje się, że podobieństwa w sekwencji intronów i wiroidów mówią więcej o ich ewolucyjnej przeszłości, aniżeli sugerują konkretny model replikacji tych ostatnich (1).

#### 4. Molekularne modele patogenności

Jedno z najciekawszych pytań dotyczy sposobu w jaki organizmy nie kodujące własnych białek, zakłócają metabolizm komórki gospodarza. Istnieje na ten temat kilka hipotez.

Najprostsza, zakłada, że RNA wiroidów współzawodniczy z komórkowym DNA o polimerazę II RNA (8). Hipoteza ta jest jednak mało prawdopodobna, zważywszy dobry wzrost zakażonych kultur tkankowych, mimo gromadzenia się dużych ilości RNA wiroidowego w komórkach (17).

Model zaproponowany przez Elizabeth Dickson w 1981 r. przyjmuje, że wiroidy zakłócają proces wycinania intronów z pre-mRNA gospodarza (27). Hipoteza opiera się na fakcie podobieństwa sekwencji niskocząsteczkowego jądrowego RNA U1 (mRNA U1) i sekwencji RNA PSTV. W RNA wiroida sekwencje te mają długość 9 i 12 nukleotydów (pozycje: 306-314 i 112-123) i są położone w regionie o małej stabilności termodynamicznej. W pre-mRNA, na granicy między eksonami i intronami, występują odcinki komplementarne do sekwencji 5' końca snRNA U1. Powstanie stabilnej struktury dwuniciowej między tymi odcinkami umożliwia prawidłowe wycinanie intronów. Częsteczką RNA PSTV mogłaby, w odpowiednich warunkach – naśladując strukturę U1 RNA, zakłócać proces składania genowego.

Inne modele wskazują na podobieństwa sekwencji o długości 23-25 nukleotydów (pozycja: 258-279/282) w nici (-) RNA PSTV i sekwencji położonej blisko końca 5' U1 RNA (22,28). Możliwe jest, że nic (-) PSTV łączy się z U1 RNA i zmniejsza jego stężenie w komórce. Odpowiednio, nic (+) może łączyć się z pre-mRNA gospodarza.

Dla innych niż PSTV wiroidów wykryto podobieństwa sekwencyjne z pochodzącymi z komórek zwierzęcych U3 i U4 snRNA (29,30).

Źródła patogenności wiroidów upatrywano również w zakłócaniu dojrzewania rybosomalnego RNA, jako że RNA PSTV występuje głównie w jąderkach zakażonych komórek i ma odcinki komplementarne do sekwencji w pre-rRNA (31).

Ostatnio zaproponowano hipotezę tłumaczącą różnice w ostrości szczepów PSTV różną stabilnością termodynamiczną domeny P (im większa ostrość, tym mniejsza stabilność drugorzędowej struktury odcinka VM tej domeny) (32). Zależność tę obserwowano jedynie dla nici (+) RNA, która *in vitro* występuje w dużej ilości kopii w komórce ( $10^4$ ). Być może ta właśnie nic jest odpowiedzialna za patogenność. Porównując bowiem sekwencję nici (+) różnych wiroidów znaleziono w odcinku VM znaczne podobieństwa do sekwencji 7S RNA z komórek pomidora. U ssaków, i prawdopodobnie również u roślin, 7S RNA w połączeniu z sześcioma białkami tworzy SRP (z j.ang. *signal recognition particle*) – cząsteczkę odpowiedzialną za transport niektórych polipeptydów przez błony retikulum endoplazmatycznego (33). Tworzenie stabilnych kompleksów 7S RNA i RNA wiroidowego prowadziłoby do uszkodzenia systemu translacji i integracji białek błonowych. Przypuszczenia te znajdują potwierdzenie w badaniach anatomicznych, które wykazały, że komórki roślin porażonych mają nieprawidłowo wykształcone systemy błon i ściany celulozowe.

Wydaje się, że żadna z przedstawionych hipotez nie tłumaczy w pełni źródeł patogenności wiroidów na poziomie molekularnym. Wszystkie jednak sugerują, że wiroidy pełnią rolę antysensownego RNA zakłócającego różnorodne procesy komórkowe, których elementem regulacyjnym jest RNA gospodarza (34,35).

## 5. Znaczenie gospodarcze chorób wiroidowych

Zniszczenia powodowane przez choroby wiroidowe wśród różnych roślin uprawnych mogą być znaczne. W 1927 r. na Filipinach zaobserwowano groźną chorobę palm kokosowych – *cadang-cadang*, która w ciągu ostatnich 40 lat przyczyniła się do straty 30 000 000 palm kokosowych. Nadal ginie ponad 500 000 drzew rocznie (36). Na początku lat siedemdziesiątych choroba karłowatości chryzantem (CSV) zniszczyła niemal całkowicie plantacje tej rośliny w USA. Epidemie PSTV zdarzają się rzadziej, lecz od 60 lat obszar występowania PSTV rozszerza się, zmniejszając znacznie plony w niektórych krajach. Problem chorób wiroidowych występuje z różną mocą na plantacjach awokado, ogórków, pomidorów, chmielu, roślin cytrusowych i in. (37).

Pochodzenie chorób wiroidowych pozostaje dotąd nie wyjaśnione. Wydaje się jednak pewne, że wiroidy występują w wielu naturalnych ekosystemach, stąd mogą się rozprzestrzeniać na rośliny o znaczeniu gospodarczym (37). Wiele roślin uprawnych jest rozmnażanych wegetatywnie z niewielkiej ilości form rodzicielskich. Są one następnie hodowane w monokulturach i poddawane intensywnym zabiegom agrotechnicznym. Wszystkie te czynniki sprzyjają występowaniu epidemii chorób wiroidowych (1). Dlatego tak pilne stało się podjęcie działań mających na celu kontrolę i ograniczenie rozprzestrzeniania się epidemii. Dotyczy to przede wszystkim PSTV, wiroidów roślin cytrusowych i winorośli.

W Polsce, podobnie jak w krajach zachodniej Europy już w latach siedemdziesiątych rozpoczęto eliminowanie z hodowli materiału zakażonego PSTV. Selekcja taka była możliwa dzięki zastosowaniu skutecznych metod detekcji wiroidów.

Istnieją cztery główne metody wykrywania zakażenia wiroidowego. Pierwsza, to obserwacja roślin. Metoda ta wymaga jednak od obserwatora dużej rutyny i jest całkowicie obiektywna jedynie w przypadku infekcji szczepem ostrym (1).

Drugą metodą jest test biologiczny, polegający na zakażeniu sokiem pochodzącym z rośliny badanej, odpowiedniej rośliny wskaźnikowej. Sposób ten jest czasochłonny (3-4 tygodnie) i wymaga odpowiednich warunków szklarniowych (38).

Trzecia, polega na analizie elektroforetycznej kwasów nukleinowych wyekstrahowanych z rośliny badanej. Obecność dodatkowego prążka RNA świadczy o infekcji. Metoda ta – choć dość szybka – jest stosunkowo pracochłonna i nie nadaje się do testowania wielu próbek (39,40,41).

Czwarty sposób detekcji oparty jest na hybrydyzacji wyznakowanej (np. radioaktywnym fosforem) sondy cDNA lub RNA komplementarnej do RNA wiroida (42). Sondą może być plazmid zawierający wstawkę o sekwencji odpowiadającej RNA wiroidowemu. Wiroida wykrywa się w zdenaturowanych i nakroplonych na nitrocelulozę sokach otrzymanych z roślin badanych. Czulość metody hybrydyzacyjnej jest wyższa niż metod poprzednich – w zależności od długości sekwencji cDNA można wykryć od 50 do 1 pg RNA wiroida (43). Sondą molekularną może być również wyznakowany radioaktywnie RNA powstający w wyniku transkrypcji wstawki cDNA wiroida w plazmidzie zawierającym promotor dla polimerazy faga SP6 lub T7. Czulość wzrasta wtedy od 3 do 40 razy (44). Metoda hybrydyzacyjna nadaje się znakomicie do analizy próbek w skali masowej (43). W latach osiemdziesiątych, w wyniku współpracy Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN i Instytutu Ziemiaka w Młochowie opracowano system kontroli sadzeniaków i eliminowania z hodowli materiału zakażonego PSTV w

oparciu o tę metodę. Specyficzność testu i jego zgodność z uznawaną dotąd za najbardziej miarodajną metodą biologiczną jest bardzo wysoka. W teście wykorzystano sondy DNA zawierające bądź pełną kopię genomu wiroida, bądź syntetyczny, 80 nukleotydowy odcinek, komplementarny do części domeny centralnej (45).

## 6. Perspektywy

W ciągu ostatnich kilkunastu lat wiroidy zajęły szczególne miejsce w badaniach naukowych. Przestały interesować wyłącznie fitopatologów i stały się przedmiotem intensywnej działalności doświadczalnej biochemików, fizykochemików i biologów molekularnych. Obecnie wiroidy należą do najlepiej poznanej strukturalnie – obok tRNA – grupy cząsteczek RNA (46). Niektórym cechom struktury udało się przypisać specyficzne funkcje w molekularnym mechanizmie patogenności. Wykorzystanie klonów cDNA wiroidów daje nowe możliwości badania technikami inżynierii genetycznej poszczególnych etapów infekcji. Duże nadzieje praktyczne wiąże się z podejmowanymi próbami stworzenia odmian roślin łączących oporność na choroby wirusowe i wiroidowe oraz wykorzystania odpowiednio przekształconych cDNA wiroidów jako wektorów do wprowadzania obcego DNA do komórek roślinnych.

## Literatura

1. Diener T. O., ed., (1987), *The Viroids*, Plenum Press.
2. Zagórski W., Wetnicki M., Skrzeczkowski J., (1987), *Kosmos*, 36, 247–263.
3. Diener T. O., (1984), *Intervirolology*, 22, 1–16.
4. Gross H., Domedey H., Jank P., Lossow C., Raba M., Alberty H., Sanger H., (1978), *Nature*, 273, 203–208.
5. Riesner D., Gross H., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 531–564.
6. Schnolzer M., Haas B., Ramm A., Hofmann H., Sanger H., (1985), *EMBO J.*, 4, 2171–2191.
7. Semancik J., ed., (1987), *Viroids and viroid – like pathogens* CRC Press.
8. Rackwitz H., Rohde W., Sanger H., (1981), *Nature*, 291, 298–301.
9. Diener T. O., Smith R., (1975), *Virology*, 63, 421–435.
10. Takahashi T., Diener T. O., (1975), *Virology*, 64, 106–114.
11. Mühlbach H., Sanger H., (1979), *Nature*, 278, 185–188.
12. Flores R., Semancik J., (1982), *PNAS*, 79, 6285–6287.
13. Crill L., Semancik J., (1980), *Nature*, 283, 399–400.
14. Semancik J., Harper K., (1984), *PNAS*, 81, 4429–4432.
15. Spiesmacher E., Mühlbach H., Schnolzer M., Sanger H., Tabler M., (1985), *Biosci. Rep.*, 5, 251–265.



16. French R., (1982), *Nature*, 295, 259-260.
17. Mühlbach H., Faustmann O., Sanger H., (1983), *Plant Mol. Biol.*, 2, 239-247.
18. Owens R., Diener T. O., (1982), *PNAS*, 79, 113-117.
19. Spiesmacher E., Mühlbach H., Schnolzer M., Haas B., Sanger H., (1983), *Biosci. Rep.*, 3, 767-774.
20. Branch A., Robertson H., (1984), *Science*, 223, 450-455.
21. Dietner-Gottlieb G., (1986), *PNAS*, 83, 6250-6254.
22. Diener T. O., (1981), *PNAS*, 78, 5014-5017.
23. Robertson H., Rosen D., Branch A., (1985), *Virology*, 142, 441-447.
24. Tsagris M., Tabler M., Sanger H., (1987), *Virology*, 157, 227-231.
25. Wolff P., Gilz R., Schumacher J., Riesner D., (1985), *NAR*, 13, 355-367.
26. Diener T. O., (1986), *PNAS*, 83, 58-62.
27. Dickson E., (1981), *Virology*, 115, 216-221.
28. Gross H., Krupp G., Domedey H., Raba M., Jank P., Lossow C., Alberty H., Ramm K., Sanger H., (1982), *Eur. J. Biochem.*, 121, 249-257.
29. Kiss T., Postai J., Solymosy F., (1983), *FEBS Lett.*, 163, 217-222.
30. Kiss T., Solymosy F., (1982), *FEBS Lett.*, 144, 318-327.
31. Jakab G., Kiss T., Solymosy F., (1986), *Bioch. Bioph. Acta*, 868, 190-197.
32. Haas B., Klanner A., Ramm K., Sanger H., (1988), *EMBO J.*, 7, 4063-4074.
33. Siegel V., Walters P., (1988), *Cell*, 52, 39-49.
34. Green P., Pines O., Inouye M., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 569-597.
35. Symons B., (1989), *Nature*, 338, 542-543.
36. Haseloff J., Mohamed N., Symons R., (1982), *Nature*, 299, 316-321.
37. Hall T., Davies J., eds., (1979), *Nucleic Acids in Plants*, vol. II CRC Press.
38. Fernow K., (1967), *Phytopathology*, 57, 1347-1352.
39. Morris T., Wright N., (1975), *Am. Potato.*, 52, 57-63.
40. Morris T., Smith T., (1977), *Phytopathology*, 67, 145-150.
41. Pflannestiel M., Slack S., (1980), *Phytopathology*, 70, 1015-1018.
42. Pwens R., Diener T. O., (1981), *Science*, 213, 670-672.
43. Owens R., Diener T. O., (1984), *Methods in Virology*, 7, 173-187.
44. Salazar L., Balbo I., Owens R., (1988), *Potato Res.*, 31, 431-442.
45. Wełnicki M., Skrzeczkowski J., Sołtyńska A., Jończyk P., Markiewicz W., Kierzek R., Imiołczyk B., Zagórski W., (1989), *J. Virol. Methods*, 24, 141-152.
46. Hecker R., Wang Z., Steger G., Riesner D., (1988), *Gene*, 72, 59-74.

---

**S u m m a r y****Viroids – infectious RNA molecules**

Viroids are the smallest (246–371 nucleotides long) infectious agents known today, consisting of single-stranded, circular RNA molecules, with characteristic rod-like secondary structures. Viroids – about 15 have been described so far – cause diseases of higher plants, and significantly affect agriculture. The molecular structure of some viroids has been elucidated and correlated, to some extent, with their function. Viroid-coding proteins have not been found. It is generally accepted that viroids exert pathogenic effect by interfering with vital cellular processes in which host RNA is a key element. The study of replication intermediates and host polymerases led to a rolling-circle model of viroids replication. Construction of cDNA clones has allowed for the development of a new, efficient method of viroid detection. Finally, studies using infectious cDNA clones may lead to a practical use of viroids as vectors in plant recombinant DNA technology and may facilitate a deeper insight into molecular mechanisms of pathogenicity.

---

**Cezary Żekanowski, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.**

**Zagrożenia zdrowia człowieka pestycydami**

Amerykańskie Towarzystwo Medyczne przebadalo wpływ szeregu pestycydów stosowanych w rolnictwie na organizm ludzki i odrzuciło zarzut ich rakotwórczego działania. Raport Towarzystwa wymienia jako niebezpieczne jedynie chlorek arsenu i chlorek winylu, stwierdza jednakże, że liczba ewentualnych zachorowań jest minimalna, ponieważ jedynie bezpośredni kontakt człowieka z tymi substancjami w dużym stężeniu jest szkodliwy.

*M.F.*

Opracowano na podstawie: (1988), Farm Chemicals, 151, 10.

---

Technikę rzutowego wysiewu nasion lucerny, żyta i tymotki w zawieszinie żelowej łącznie z nawozami i pestycydami zastosowano z powodzeniem w USA. Jest ono przyspieszone w wyniku synergistycznego działania nawozu, bezpośrednio dostępnego przy kiełkowaniu. Łączenie kilku czynności obniża koszty upraw i skraca czas zabiegów.

*M.F.*

Opracowano na podstawie: (1988), Farm Chemicals, 151, 21.