

Moleküler Bitki Hastalık Etmenleri Olarak Viroidlerin Yapısı, Tanı Yöntemleri ve Mücadelesi İçin Öneriler

Hidayet BOSTAN

İrfan ÇORUH

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Erzurum, Türkiye

Geliş Tarihi : 10.12.2003

ÖZET: Viroidler 246-399 nükleotide sahip düşük moleküler ağırlıklı tek sarmal RNA molekülleri olup, moleküler seviyede iyi analiz edilmiş patojenlerdir. Hem tek yıllık, hem de çok yıllık bitkileri enfekte eden viroidlerden bazıları konukçularında önemli derecede zarara neden olurlar. Bazı viroidler ana konukçularında herhangi bir belirtiyeye neden olmamakla birlikte, bunlar inokulum kaynağı olarak hastalık seyrinde rol oynarlar ve latent konukçularına yakın duyarlı kültür bitkilerinde önemli zararlara neden olurlar. Bu derlemede, viroidlerin özellikleri, tanımlanılan tekniklerden indikatör bitkilerde biyolojik testler, poliakrilamid jel elektroforez, moleküler hibridizasyon ve polimer zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve viroid hastalıkları ile mücadele yöntemleri özetlenerek önerilerde bulunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Viroidler, bitki patojenleri, tanı metotları

Structure, Detection Methods and Management of Viroids as Molecular Plant Disease Agents

ABSTRACT: Viroids are low molecular weight single-stranded circular RNA of 246 to 399 nucleotides and their molecular level is well-characterized. They infect both monocotyledonous and dicotyledonous plants. Some of viroid diseases cause significant damages to the host crop. However some of them are latent in their primary host, but can do considerable damage to susceptible crops located near the infected latent host species. In this review, the properties, symptoms on host and indicator plants, transmission and spread and methods used for viroids detection like indicator plants, polyacrylamide gel electrophoresis, molecular hybridization, polymerase chain reaction and control strategies for viroid diseases are highlighted.

Key Words: Viroids, plant pathogens, detection methods

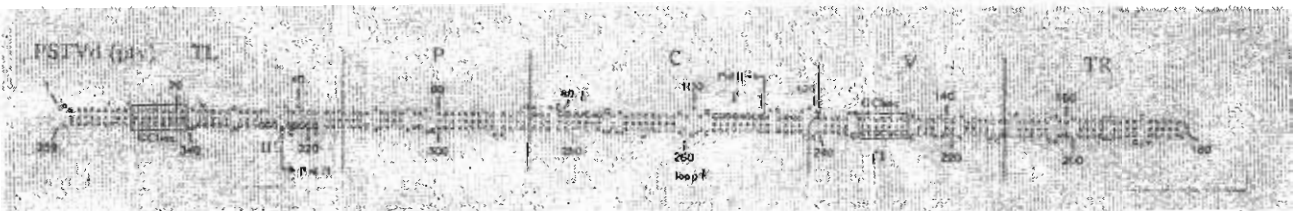
GİRİŞ

İlk defa 1920'li yılların başlarında Kuzey Amerika'da, patates bitkisinde patates iğ yumru viroidi (potato spindle tuber viroid; PSTVd) belirlendiği zaman, etmenin bir virüs olabileceği; 1960'lı yıllarda bu etmenin virüslere benzemediği, 1970'li yılların başında turuncgillerde turuncgil exokortis hastalığının (citrus exocortis viroid; CEVd) belirlenmesi ve her iki etmenin de virüslerden farklı olarak koruyucu protein kapsüle sahip olmadıklarının tespit edilmesi üzerine, bu etmenler için viroid terimi kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda yeni ve hassas tanı tekniklerinin geliştirilmesi ile şu ana kadar kültür bitkilerinden 30'un üzerinde viroid belirlenmiş ve nükleotit dizilişleri arasındaki benzerliğe, merkezi, sağ ve sol korunmuş bitiş bölgelerine sahip olup olmadıklarına göre; sistematik olarak *Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Cocadviroid*, *Apscaviroid* cinsleri *Pospiviroidae*; *Avsunviroid* ve *Pelamoviroid* cinsleri ise *Avsunviroidae* familyası altında toplanmış ve isimlendirilmişlerdir (Koltunow ve Rezaian, 1988; Flores vd., 1998; Hadidi vd., 2003).

Şu ana kadar belirlenmiş en küçük patojen olan viroidler 246 ile 399 arasında değişen sayıda baza sahip tek sarmal sirküler RNA molekülleri olup, replikasyon gibi biyolojik fonksiyonlarının çoğu için gerekli proteinlere sahip olmadıklarından konukçularının proteinlerini kullanırlar. Viroidlerin genomlarının diğer bitki patojenleri ile kıyaslandığında küçük olması nedeniyle hepsinin nükleotit dizilimleri saptanmış ve normal koşullarda çift sarmal olarak çubuksu yada dallanmış yapıda buldukları elektron mikroskopunda görüntülenmiştir. Genellikle virüslerin aksine sıcakta daha yüksek oranda replike oldukları için sıcak iklim patojeni olarak adlandırılmışlardır (Riesner, 1990; Hernandez ve Flores, 1992; Brussiere vd., 1996).

Viroidlerin Yapısı ve Replikasyonu

Viroid nükleik asiti fonksiyonlarına göre beş bölgeye ayrılmıştır (Şekil 1) (Kese ve Symons, 1985; Schnölzer vd., 1985; Sano vd., 1992; Semencik vd., 1994; Spieker, 1996; Hadidi vd., 2003), Buna göre;



TL: Sol bitiş noktası, P: Patojenite bölgesi, C: Korunmuş bölge, V: Değişken bölge, TR: Sağ bitiş noktası

Şekil 1. Karakteristik bir viroidin nükleik asit sarmalındaki fonksiyonel bölgeleri,

1. Sol Bitiş Bölgesi: Son derece korunmuş olan bu bölge *Pospiviroid* ve *Apscaviroid*'lerin çoğunda mevcut olup, nükleik asit molekülünün sol bitiş kısmında yer almaktadır (Şekil 1).

2. Patojenite Bölgesi: Korunmuş merkezi bölgenin sol tarafında yer alan bu bölge viroidlerin konukçu çevresini ve konukçularındaki simptomsu tipini belirlemektedir (Şekil 1).

3. Merkez Korunmuş Bölge: *Pospiviroidae* familyasına mensup viroidlerde görülen, son derece korunmuş olan bu bölge replikasyonu kontrol etmekte ve çift sarmalın her iki kısmında, karşılıklı olarak merkezde yer almaktadır (Şekil 1).

4. Değişken Bölge: Merkezi korunmuş bölgenin sağ tarafında yer al değişken bölge viroid genomu içerisinde varyasyonun en fazla görüldüğü bölgedir (Şekil 1).

5. Sağ Bitiş Bölgesi: Değişken bölgenin sağ tarafında yer almakta olup, sol bitiş noktası gibi bu bölgede son derece korunmuştur (Şekil 1).

Viroid genomlarının korunmuş ve değişken bölgelerinin analizi özellikle guruba, viroide yada viroid izolatlarının belirlenmesi amacıyla primerlerin seçiminde büyük önem taşımaktadır. Genel primerlerin seçiminde korunmuş bölgeler, spesifik primerlerin seçiminde ise değişken bölgeler kullanılmaktadır.

Viroidler kendi replikasyonlarını gerçekleştirecek replikase enzimlerine sahip olmadıklarından, sentezlenebilmeleri için viroide özgü konukçu bitkinin polimerase enzimine bağımlıdır. Pozitif sirküler viroid RNA'sı, lineer negatif komplementer RNA'nın sentezini gerçekleştirir. Sentezlenen bu negatif lineer RNA ise pozitif RNA'nın sentezinde model görevi yapar ve pozitif viroid RNA'sı daha sonra kendi doğal formu olan sirküler forma dönüşür (Owens ve Diener, 1982; Branch ve Robertson, 1984, Ishikawa vd., 1984).

Viroidlerin Taşınma Şekilleri ve Konukçu Bitkilerde Neden Oldukları Simptomlar

Bazı viroidler mekaniksel olarak, tohumla, polenle, böceklerle taşınmakla birlikte en yaygın taşınma şekli vejetatif çoğaltım organlar ile gerçekleşmektedir (Manzer ve Merriam, 1961; Wallace ve Drake, 1962; Singh ve Finnie, 1973; Hanold ve Randless, 1991; Singh vd., 1991a; Ramachandran vd., 1992; Shamloul vd., 1995). Diğer taraftan insanlar ticari ve diğer aktiviteleri ile viroidlerin ülkeler arasında yayılışında en önemli rolü oynamaktadır.

Viroidler bazı doğal ve ara konukçularında belirgin simptomlara neden olurken, diğer bazı konukçularında gözle görülebilir herhangi bir belirti oluşturmamaktadırlar. Bununla birlikte bu tip simptomsuz bitkiler potansiyel inokulum kaynağı olarak viroid enfeksiyonlarının başlamasında rol oynayabilmektedir (Sano vd., 1986; Hanold ve Randless, 1991; Singh vd., 1992a). Ayrıca, viroidlerin neden oldukları simptomlar virüs enfeksiyonlarından ve fizyolojik stres faktörlerinden kaynaklanan simptomlara

benzerlik göstermekte ve viroidlerin konukçularındaki simptomları konukçuya, viroid türüne, viroidin irkına, ortam sıcaklığına, ışık şiddetine, bitki besin elementlerinin dengesine, tek yada birlikte bulunma durumlarına göre de değişkenlikler göstermektedir. Bununla birlikte, genel olarak yaprak sayısının azalması, yaprak ve meyve boyutlarının küçülmesi, yapraklarda kıvrılma, yumru ve meyvelerde deformasyon, bodurluk, meyve ağaçlarında çalılışma viroidlerin neden oldukları başlıca karakteristik belirtiler olarak kaydedilmiştir (Lawson, 1987; Singh ve Boucher, 1988; Salazar vd., 1995; Verhoeven vd., 1998; Hadidi vd., 2003).

Viroidlerin Tanınması

Diğer hastalık etmenlerinde olduğu gibi viroidlerden kaynaklanan hastalıkların kontrolünde de ön koşul viroidlerin hızlı, güvenilir ve spesifik olarak tanınmasıdır. Viroidlerin protein kapsüle sahip olmamaları antijenik özelliğe dayalı serolojik tekniklerin, morfolojik özellikleri nedeni ile de elektron mikroskobu tekniklerinin kullanılmasına olanak tanımamaktadır.

1. Viroidlerin Tanınmasında İndikatör Bitkilerin Kullanılması

İndikatör bitkilerin kullanımı (biyolojik index) virüs ve viroidlerin tanınmasında kullanılan en eski tanı tekniği olup, etmenin patojen olup olmadığının doğrulanmasında, taşınma şeklinin ve konukçu çevresinin belirlenmesinde mutlaka kullanılması gerekli olan bir tekniktir.

Ancak bu teknik zamana, seraya, yoğun iş gücüne ihtiyaç gösterdiği, geniş çaplı testlemelere imkan vermediği, birden fazla bitki türünün bu amaçla kullanımını gerektirdiği ve tek başına tanı için yeterli olmadığı için kesin tanılamalarda bir başka teknik bulgu ile desteklenmelidir (Palukaitis vd., 1981). Zira simptomsu gelişimi sıcaklığa (Van Dors ve Peters, 1974; Sasaki ve Shikata, 1977; Da Graca ve Van Vuuren, 1987), ışık yoğunluğuna (Grasmick ve Slack, 1985), toprağın besin elementi içeriğine (Lee ve Singh, 1972; Singh vd., 1974), viroid irkına (Singh, 1983) ve ayrıca bir viroidin diğer bir viroid yada virüsle birlikte bulunma durumuna göre değişim göstermektedir (Singh vd., 1992b). Bu durumda viroidlerin belirlenmesi ve tanınmasında hassas ve güvenilir tekniklerin kullanılması sertifikasyon programlarında ve gen merkezlerinin korunmasında büyük önem arz etmektedir.

2. Poliakrilamid Jel Elektroferez (PAGE)

Poliakrilamid jel elektroferez tanınmamış viroidlerin tanınmasında mutlaka uygulanması gereken temel bir teknik olup, nükleik asit moleküllerinin jeldeki hareketlerinin moleküler ağırlıklara göre farklı hızlarda hareket etmesi esasına dayalı olarak ilk defa Diener (1971), Semancik ve Weathers (1972) tarafından uygulanmıştır. Daha sonra viroidlerin termodinamik

özelliğine bağlı olarak bu teknik Schumacher ve ark. (1983) tarafından modifiye edilmiş; Singh ve Boucher (1987) tarafından geliştirilmiştir. Bu amaçla günümüzde yaygın olarak return-poliakrilamid jel elektroforez (R-PAGE) sertifikasyon programlarında, viroid ırklarının ayırımında, diğer tekniklerle kombine olarak viroidlerin tanısında ve hatta seyyar laboratuvarlarda da kullanılmaktadır. Çok sayıda örneğin aynı anda testlenmesine olanak veren bu tekniğin ilk aşamasında, oda sıcaklığında ve yüksek tuz konsantrasyonunda lineer ve sirküler viroid RNA'sı birlikte hareket ederek konukçuya ait DNA ve RNA'lar ile renkli maddelerden ayrılırlar. İkinci basamakta, 72 C°de ve düşük tuz konsantrasyonunda viroid RNA'sı daha pürifiye olarak ve sirküler formun lineer forma dönüştürülmesi ve gümüşle boyanması ile viroidlere özgü bir bant görüntülenir (Singh ve Boucher, 1987; Singh vd., 1991b).

3. Nükleik Asit Hibridizasyon Tekniği

Spiegelman (1964), tarafından geliştirilen bu teknik DNA-DNA, DNA-RNA yada RNA-RNA kompleksi için de kullanılmakta olup, DNA ve RNA moleküllerindeki nükleotit dizilimlerinin büyük ölçüde korunmuş bölgelerinden seçilen problemlerin tamamlayıcı olarak kullanılması esasına dayanır. Viroidlerin genomları küçük olduğu için amaca göre prob olarak nükleik asitin tamamı veya bir kısmı kullanılabilirdiği gibi oligonükleotid problemler de amaca göre kullanılabilir.

Nükleik asit hibridizasyonu için geçmişte radyoaktif etiketli problemlerin kullanılması (Owens ve Diener, 1981; Rohde ve Sanger, 1981), sağlık riski nedeniyle bu tekniğin uygulanmasını sınırlandırırken, günümüzde problemlerin radyoaktif özelliği olmayan kimyasallarla etiketlenmesi sayesinde nükleik asit hibridizasyon tekniğinin kullanımını artırmıştır (McInnes vd., 1989; Podleckis ve ark., 1993). Bu teknikte hassasiyet ve seçicilik problemlerin seçileceği bölgeye göre değişkenlik göstermekte olup, problemler korunmuş yada değişken bölgelerden seçilerek guruba ya da ırka özgü karakterler saptanabilmektedir (Melton vd., 1984; Bar-Josph, vd., 1985; Sano vd., 1988; Welnicki vd., 1989; Rey ve Moses, 1993; Hadidi vd., 2003).

Polimerase Zincir Reaksiyonu=Polimerase Chain Reaction (PCR)

PCR, moleküller hastalık etmenlerinin tanılanmasında, belirlenmesinde, küçük örneklerde DNA'nın saptanmasında, DNA örneklerinin karşılaştırılmasında, mutasyonların belirlenmesinde, genomun klonlanması dışında farklı amaçlarla kullanılan ve genomdaki tek bir baz değişiminin bile belirlenmesine olanak veren son derece hassas ve etkili bir moleküller tanı tekniğidir. PCR ile 50 bp (bazparça) kadar kısa bir DNA veya cDNA parçasından 10.000 bp uzunluğundaki bir DNA parçasına kadar olan bütün

DNA molekülleri amplifiye edilebilmektedir (Hadidi vd., 2003). Hadidi ve Yang (1990), RT-PCR tekniğini ilk defa viroidlerin tanılanmasında kullanmış ve bu tekniğin hibridizasyondan 10-100 defa, R-PAGE'den ise 2500 kat daha hassas olduğunu ve enfekteli dokulardan ekstrakte edilen toplam 1-100 pg RNA miktarındaki viroidlerin bile saptanabileceğini kanıtlamışlardır.

PCR son derece spesifik ve hassas bir metot olup, hedef olarak seçilen DNA'nın belirli bölgesine ve amaca göre seçilen primerlerin kullanımı ile gerçekleşmektedir. Amplifikasyon prosedürü;

-Hedef nükleik asitin denatürasyonu

-Komplementerlerinin sentezlenmesi

-DNA polimeraz kullanılarak hedef bölgenin amplifikasyonu

-Termosaykılarda bu işlemlerin yeterli miktara ulaşmaya kadar tekrar edilmesi işlemlerini içermektedir (Arnheim ve Erlich, 1992). Diğer taraftan bu tekniğin başarısı ekstrakte edilen nükleik asitin kalitesine, cDNA'nın sentezinde kullanılan enzimlere, enzimlerin kalitesine, diğer kimyasalların konsantrasyonuna; PCR aşamasında ise magnezyum klorürün konsantrasyonuna, primerlerin seçimine ve primerlerin bağlanma sıcaklığı ile kullanılan tüm kimyasalların optimizasyonuna bağlıdır (Hadidi vd., 2003).

PCR tekniğinde primerlerin aynı cins içerisinde yer alan viroidlerin genomlarının mukayesesi ile son derece korunmuş bölgelerinden seçilmesi aynı cins içerisinde yer alan bütün viroidlerin tanısını sağlamaktadır. Değişken bölgelerin mukayesesi için seçilecek primerlerin kullanılması ile de spesifik olarak bir viroid yada viroidin farklı ırk ve izolatları belirlenebilmektedir (Faggioli vd., 2001; Di Serio vd., 2002; Shamloul vd., 2002). PCR tekniğinin diğer bir avantajı viroidlere spesifik primer çiftlerinin kullanılması ile tek bir işlemde birden fazla viroidin belirlenmesinin mümkün olmasıdır. Multipleks PCR (mPCR) olarak adlandırılan bu teknik hem zaman kazandırmakta hem de tanı maliyetlerini azaltmaktadır (Di Serio vd., 2002; Shamloul vd., 2002). Ancak multipleks PCR tekniğinin viroidlerin spesifik olarak tanılanmasında kullanımını sınırlandıran en önemli problem viroidlerin genomlarının son derece kısa olması nedeni ile birden fazla viroid için farklı primer bölgelerinin belirlenmesinin oldukça güç oluşudur. Zira jelde bantların konumlarının farklı olabilmesi için gerektirmektedir. Yine de birden fazla viroidin aynı anda ve tek işlemde spesifik olmasa da belirlenmesi mümkün olmaktadır.

Viroid Hastalıkların Kontrolü

Viroidlerin verim ve kalite üzerine etkileri viroid türüne, ırkına, yaygınlık oranlarına, yıldan yıla ve yıl içerisinde taşınma şekline, enfeksiyon zamanına, çevre şartlarına, diğer patojenlerle birlikte bulunup bulunmama durumuna, uygulanan tarım sistemine, kültür bitkisine, kültür bitkisinin ekonomik değerine, tek yada çok yıllık

olma durumuna göre değişim göstermektedir (Barker vd., 1985; Lawson, 1987; Singh, 1988; Hadidi ve ark., 2003). Bu nedenle viroid hastalıkları ile etkili bir mücadele yapılabilmesi için gerekli uygulamalar;

1. Karantina ve sertifikasyon programlarının uygulanması

Viroid hastalıklarının kontrolünde başlıca stratejilerden birisi hastalığın görüldüğü ana kıtadan diğer kıtalara, aynı ülke içerisinde ise bir bölgeden diğer bölgelere taşınmasının engellenmesidir. Bunun için bitkisel materyaller hem ana kıta da, hem de taşıyacağı bölgede tam donanımlı bir laboratuvarında testlere tabi tutulmalı, viroid içerip içermedikleri hızlı ve güvenilir tekniklerle belirlenmelidir.

2. Viroidlerden ari üretim materyalinin kullanılması

Bunun için özellikle vejetatif olarak çoğaltılan kültür bitkilerinde viroidlerden ari üretim materyalinin muhafaza edilebileceği ve çoğaltılabileceği tam donanımlı laboratuvarların kurulması ve gerektiği zaman buradan alınacak materyalin ihtiyaca ve amaca göre çoğaltılması gerekmektedir.

3. Viroidlerin bölgeden bölgeye, yada tarla içerisinde yayılışlarının engellenmesi

Bu amaçla viroid hastalıklarının taşınabilecekleri konukçu bitki çevrelerinin, konukçusu olabilecek potansiyel kültür bitkilerinin yada yabancı otların belirlenmesi, duyarlı ticari bitkisel üretim alanları ile bu üretim materyallerinin üretileceği alanların birbirinden yeterince uzak şekilde tesis edilmesi gerekir.

4. Üretim materyallerinden viroidlerin eliminasyonu

Hassas ve güvenilir tekniklerin kullanımı ile virüs yada viroidlerle enfekteli olmayan bitki üretim materyallerinin seçilip, doku kültürü laboratuvarlarında muhafaza edilerek çoğaltılması mümkün olduğu gibi, enfekteli bitkilerden virüs yada viroidler meristem uç kültürü tekniği ile elemine edilebilmektedir. Bu amaçla meristem uç kültürü tekniği tek başına kullanılabileceği gibi virüsler için bitkisel üretim materyalinin önce belirli derecede ve belirli sürede sıcağa, viroidler için ise soğuğa maruz bırakıldıktan sonra meristemlerin izole edilip geliştirilmesi başarı oranını artırmaktadır.

5. Doğal yada transgenik dayanıklı çeşitlerin kullanılması

Doğal olarak dayanıklı olan çeşitler kullanılabileceği gibi, viroidlerin şiddetli ırklarının neden olduğu zararı azaltmak için çapraz korunma (cross protection) için bitkiler önce viroidin zayıf ırkı ile inokule edilip üretimde kullanılması da mümkün olmaktadır. Fakat çapraz koruma yöntemi çok iş gücüne ihtiyaç duyması, mutasyonla şiddetli ırk ortaya çıkma

olasılığı, şiddetli ırkın yayılışının ve enfeksiyon kaynağı olma özelliğinin devam etmesi nedeni ile etkili bir yöntem olarak kabul görmemekte ve pratikte de uygulanamamaktadır. Bu durumda özellikle gen aktarımı ile dayanıklı çeşitlerin geliştirilip kullanılması viroidlerin kontrolünde önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Amheim, N., Erlich, H., 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev. Biochem.*, 61: 131-156.
- Bar-Josph, M., Segev, D., Twizer, S., Rosner, A., 1985. Detection of avacoda sunblotch viroid by hybridization with synthetic oligonucleotide probes. *J.Virol. Methods*, 10: 69-73.
- Barker, J.M., McInnes, J.L., Murphy, P.J., Symons, R.H., 1985. Dot-Blot procedurc with ³²P DNA probes for the sensitive detection of avacoda sunblotch and other viroids in plants. *J.Virol. Methods*, 10: 87-98.
- Branch, A.D., Robertson, H.D., 1984. A replication cycle for viroids and other small infections RNA's. *Science*, 223: 450-455.
- Brussiere, F., Lafontaine, D., Perreault, J.P., 1996. Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. *Nucl. Acid Res.*, 24: 1793-1798.
- Da Graça, J.V., Van Vuuren, S.P., 1987. Use of high temperature to increase the rate of avacoda sunblotch symptom development in indicator seedlings. *Plant Dis.*, 65: 46-47.
- Diener, T.O., 1971. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*. *Virology*, 43, 75.
- Di Serio, F., Malfitano, M., Alioto, D., Ragozzino, A., Flores, R., 2002. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid. *J. Plant Pathol.*, 84: 27-34.
- Faggioli, F., Ragozzino, E., Barba, M., 2001. Simultaneous detection of pome fruit viroids by single tube-RT-PCR. *Acta Horti*, 550: 59-63.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O., 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Achives of Virology*, 143: 623-623.
- Grasmick, M.E., Slack, S.A., 1985. Symptom expression enhanced and low concentration of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Dis.*, 69: 49-51.
- Hadidi, A., Yang, X., 1990. Detection of poma fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods*, 30: 261-270.
- Hadidi, A., Recardo, F., Randles, J.W., Semancik, J.S., 2003. *Viroids*. Science Publishes, Inc., New Hampshire, United States of America. 370 pp.
- Hanold, D., Randles, J.W., 1991. Coconut cadang disease and its viroids agent. *Plant Dis.*, 75: 330-335.
- Hernandez, C., Flores, R., 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Sci. USA*, 89: 3711-3715.
- Ishikawa, M., Meshi, T., Ohano, T., Okado, Y., Sano, T., Uyeda, I., Shikada, E., 1984. A revised replication cycles for viroids: The role of longer than unit length RNA in vitro replication. *Mol. Gen. Genet.*, 196: 421-428.
- Kese, P., Symons, R.H., 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 82: 4582-4586.
- Koltunow, A.M., Rezaian, M.A., 1988. Grapevine yellow speckle viroid. Structural features of a new viroid group. *Nucleic Acid Res.*, 16: 849-864.
- Lawson, R.H., 1987. Controlling virus diseases in major International flowers and bulb crops. *Plant Dis.*, 65: 780-786.
- Lee, C.R., Singh, R.P., 1972. Enhanced of diagnostic symptoms of potato spindle tuber virus by manganese. *Phytopathology*, 62: 516-520.

- Manzer, F.E., Merriam, D., 1961. Field transmission of the potato spindle tuber virus and virus X by cultivating and hilling equipment. *Am. Potato J.*, 38: 347-352.
- McInnes, J.L., Habili, N., Symons, R.H., 1989. Nonradioactive photobiotin-labelled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol. Methods*, 23: 299-312.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, T., Zinn, K., Gren, M.R., 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes for plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.*, 12: 7035-7056.
- 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.
- Owens, R.A., Diener, T.O., 1982. RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Sci. USA.*, 79: 113-117.
- Palukaitis, P., Rakowski, A.G., Alexander, D.McE., Symons, R.H., 1981. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocados using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid. *Ann. Appl. Biol.* 98: 439-449.
- Podleckis, E.V., Hammond, R.W., Hurt, S.S., Hadidi, A., 1993. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labelled dot blot and tissue blot hybridization. *J. Virol. Methods*, 43: 147-158.
- Ramachandran, P., Kumar, D., Varma, A., Pandey, P.K., Singh, R.P., 1992. Coleus viroid in India. *Current Sci.*, 62: 271-272.
- Rey, M.E.C., Moses, A.V., 1993. Detection of avocado sunblotch viroid using cDNA and synthetic oligonucleotide probes. *Phytophylactica*, 25: 413-422.
- Riesner, D., 1990. Structure of viroids and their replication intermediates. Are thermodynamic domains also functional domains? *Seminars in Virol.*, 1: 83-99.
- Rohde, W., Sanger, H.L., 1981. Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by Northern blot hybridization. *Bioscience Reports* 1, 327-336.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I., Lazarte, V., 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leaf roll virus. *Fitopatologia*, 30: 56-58.
- Sano, T., Ohshima, K., Hataya, T., Uyeda, I., Shikata, E., Chou, T.G., Meshi, T., Okada, Y., 1986. A viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the United States and Japan. *J. Gen. Virol.*, 67: 1673-1678.
- Sano, T., Kudo, H., Sugimoto, T., Shikata, E., 1988. Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortisviroid. *J. Virol. Methods*, 19: 109-120.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.V., Diener, T.O., Owens, R.A., 1992. Identification multiple structural domains regulatin viroid pathogenity. *Proc. Nad. Acad. Sci., USA.*, 89: 10104-10108.
- Sasaki, M., Shikata, E., 1977. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proc. Japan Acad.*, 63B: 109-112.
- Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H., Sanger, H.L., 1985. Correlation between structure and pathogenity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *EMBO J.*, 4: 2182-2190.
- Schumacher, J., Randles, J.M., Riesner, D., 1983. A two-dimensional electrophoresis technique for detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.*, 135: 228-295.
- Semancik, J.S., Weathers, L.G., 1972. Exocortis disease: evidence for a species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology*, 237: 242-244.
- Semancik, J.S., Szychowski, J.A., Rakowski, A.G., Symons, R.H., 1994. A Stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. Gen. Virol.*, 75: 727-732.
- Shamloul, A.M., Minafra, A., Hadidi, A., Giunchedi, L., Waterworth, H.E., Alam, E.K., 1995. Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequence of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Hort.*, 386: 522-530.
- Shamloul, A.M., Faggioli, F., Keith, J.K., Hadidi, A., 2002. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: Apiscaviroid, Hostiviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid. *J. Virol. Methods*, 105: 115-121.
- Singh, R.P., Finnie, R.E., 1973. Seed transmission of potato spindle tuber metavirus through the ovules of *Scopolia sinensis*. *Can. Plant Dis. Surv.*, 53: 153-154.
- Singh, R.P., Lee, C.R., Clark, M.C., 1974. Manganese effect on the local lesion symptom of potato spindle tuber "virus" in *Scopolia sinensis*. *Phytopathology*, 64: 1015-1018.
- Singh, R.P., 1983. Viroids and their potential danger to potatoes in hot climates. *Can. Plant Dis. Surv.*, 63: 13-18.
- Singh, R.P., Boucher, A., 1987. Electrophoresis separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathology*, 77: 1588-1591.
- Singh, R.P., 1988. Occurrence, diagnosis and eradication of potato spindle tuber viroid from Canada. Pages 37-50 in: Viroids of plants and their detection, International Seminar, August 12-20. 1986 Warsaw Agricultural University Pres, Warsaw, Poland.
- Singh, R.P., Boucher, A., 1988. Comparative detection of mild strain of potato spindle tuber viroid from the dormant potato tubers by return-polyacrilamide gel electrophoresis and nucleic acid hybridization. *Potato Res.*, 31: 159-166.
- Singh, R.P., Boucher, A., Singh, A., 1991a. High incidence of transmission and occurrence of a varied in commercial seeds of *Coleus* in Can. *Plant Dis.*, 75: 184-187.
- Singh, R.P., Boucher, A., Haas, B., Sanger, H.L., 1991b. Differential migration during polyacrilamide gel electrophoresis suggests conformational difference among strains of potato spindle tuber viroid. *Canadian Journal of Plant Pathol.*, 13: 202-211.
- Singh, R.P., Boucher, A., Wang, R.G., Somerville, T.H., 1992a. Potato spindle tuber viroid is not encapsidated *in vitro* by potato virus Y particles. *Can. J. Plant Pathol.*, 14: 18-21.
- Singh, R.P., Lakshman, D.K., Boucher, A., Tavantzis, S.M., 1992b. A viroid from *Nematanthus wettenii* plants closely related to the *Columnnea* latent viroid. *J. Gen. Virol.*, 73: 2769-2774.
- Spiegelman, S., 1964. Hybrid nucleic acids. *Sci. Am.*, 221: 48-65.
- Spieker, R.L., 1996. The molecular structure of *Iresine* viroid, a new viroid species from *Iresine herbstii*. *J. Gen. Virol.*, 77: 2631-2635.
- Van Dors, H.J.M., Peters, D., 1974. Some biological observations on pale fruit, a varied-incited disease of cucumber. *Neth. J. Plant. Pathol.*, 80: 85-96.
- Verhoeven, N.J.T., Arts, M.S.J., Owens, R.A., Roenhorst, T.J.W., 1998. Natural infection of petunia by cbranthemum stunt viroid. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 383-386.
- Wallace, J.M., Drake, R.J., 1962. A high rate of seed transmission of avocado sunblotch virus from symptomless tree and origin of such trees. *Phytopathology*, 52: 237-241.
- Weinicki, M., Skrzeczkowski, J., Solynska, A., Jonczyk, P., Markiewicz, W., Kierzek, R., Imiolyczyk, B., Zagorski, W., 1989. Characterization of synthetic DNA probe detecting potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods*, 24: 141-152.