

RESUM

Els viroides, els agents infecciosos més simples de l'escala biològica, estan constituïts per una molècula circular de RNA monocatenari de aproximadament 250-400 nucleotides (nt) que no codifica cap proteïna. Malgrat aquesta simplicitat estructural, els viroides són capaços de replicar-se autònomament, moure's sistèmicament i en molts casos causar malalties a les seues plantes hostes. Les infeccions produïdes pels viroides representatius generen l'acumulació de xicotets RNAs viroidals (vd-sRNAs) de 21-24 nt amb característiques similars als xicotets RNA interferents (siRNAs), l'empremta del silenciament mediat per RNA. La identificació dels vd-sRNAs implica que els viroides són diana de la primera barrera de silenciament mediat per RNA, i que és formada per les RNases 'Dicer-like' (DCLs). Per tal d'avaluar si els vd-sRNAs s'uneixen a les proteïnes AGOs —la component clau del complex RISC ('RNA-induced silencing complex') que constitueix la segona barrera del silenciament mediat per RNA— fulles de *Nicotiana benthamiana* infectades pel viroide del tubercle fusiform de la creïlla (PSTVs) s'agroinfiltraren amb nou de les deu proteïnes AGOs d'*Arabidopsis thaliana*. Immunoprecipitacions fetes a partir dels halos agroinfiltrats i anàlisis 'Western-' i 'Northern-blot' han mostrat que totes les AGOS s'expressen i, a excepció d'AGO6, AGO7 i AGO10, uneixen vd-sRNAs: AGO1, AGO2 i AGO3 els de 21 i 22 nt, mentre que AGO4, AGO5 i AGO9 també van mostrar afinitat pels de 24 nt. La seqüenciació massiva va mostrar que les AGO1, AGO2, AGO4 i AGO5 agroexpressades uneixen els PSTVd-sRNAs en funció del seu tamany i del nucleòtid 5'-terminal, i que els perfils dels corresponents vd-sRNAs units a les AGOS adopten una distribució específica al llarg del genoma viroidal. L'agroexpressió d'AGO1, AGO2, AGO4 i AGO5 en fulles de *N. benthamiana* infectades amb PSTVd va atenuar l'acumulació dels RNAs genòmics viroidals, indicant que aquests, o els seus precursors, també són diana de RISC. En contrast amb els ribovirus, la infecció del PSTVd en *N. benthamiana* no va afectar de forma significativa la regulació mediada per miR168 de la AGO1 endògena, que uneix vd-sRNAs amb especificitat similar a la seua homòloga de *A. thaliana*.

En tant que es coneix bé la biogènesi dels RNA viroidals, el que sabem sobre la seua degradació està restringit a algunes dades que impliquen al silenciament mediat per RNA. En el curs dels nostres estudis sobre el PSTVd, hem observat consistentment un patró de 6-7 RNAs subgenòmics (sgRNAs) de polaritat (+) que apareixen juntament amb els RNAs monomèrics circulars i linears en albergínia, un hoste experimental d'aquest viroide.

Hibridacions 'Northern-blot' amb sondes de grandària parcial i completa, van mostrar que els sgRNAs (+) de PSTVd deriven de diferents regions del RNA genòmic i que alguns són parcialment solapants. Part dels sgRNAs (+) de PSTVd es van observar també en *N. benthamiana* i en tomaca, on han passat desapercebuts a causa de la seua menor acumulació. L' anàlisi per extensió d'encebador dels sgRNAs (+) de PSTVd representatius exclou que siguin productes de terminacions prematures de la transcripció, doncs manquen de l'extrem 5' comú que caldria esperar si aquesta comencés en una posició específica. Ulteriors anàlisis mitjançant 5'- i 3'-RACE indiquen que els sgRNAs (+) de PSTVd tenen extrems 5'-OH i 3'-P, que probablement resulten de talls endonucleolítics de precursors més llargs catalitzats per RNases típiques que generen aquest tipus d'extrems. Anàlisi de sgRNA (-) de PSTVd, que també s'acumulen en albergínia infectada, van mostrar que presenten característiques estructurals molt similars als sgRNA (+). Els nostres resultats proporcionen una nova visió del mecanisme de degradació in vivo dels RNAs viroidals, possiblement durant la seua replicació, i suggereixen que síntesi i degradació de les cadenes de PSTVd estan connectades, com s'ha observat en el mRNA.