



**Degradación *in vivo* de un viroide de replicación nuclear:
rutas catalizadas por proteínas Argonauta cargadas con
pequeños RNAs viroidales y por otras ribonucleasas que
generan RNAs subgenómicos**

SOFIA MINOIA

Tesis doctoral

Directores

**Doctor RICARDO FLORES PEDAUYÉ
Doctor FRANCESCO DI SERIO
Doctora BEATRIZ NAVARRO RAMIREZ**

Valencia, Marzo 2015



Degradación *in vivo* de un viroide de replicación nuclear: rutas catalizadas por proteínas Argonata cargadas con pequeños RNAs viroidales y por otras ribonucleasas que generan RNAs subgenómicos

Memoria presentada por

SOFIA MINOIA

para optar al grado de

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

Directores

Doctor RICARDO FLORES PEDAUYÉ

Doctor FRANCESCO DI SERIO

Doctora BEATRIZ NAVARRO RAMIREZ

Tutor

Doctor JOSÉ-MARÍA BELLÉS ALBERT

Valencia, Marzo 2015

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del proyecto "Viroides: dominios estructurales, iniciación de la transcripción, interacción con proteínas Argonautas del huésped, y tasas de mutación (BFU2011-28443)" del Ministerio de Ciencia e Innovación con una beca predoctoral asociada a dicho proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
RESUM	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Aspectos generales de los viroides	9
1.1. Clasificación y estructura	9
1.2. Estructura secundaria	12
1.3. Propiedades biológicas	13
1.3.1. Gama de huéspedes	13
1.3.2. Sintomatología.....	13
1.3.3. Movimiento	14
1.4. Localización subcelular	15
1.5. Transmisión y epidemiología	15
1.6. Replicación.....	16
1.6.1. Mecanismo de círculo rodante.....	16
1.6.2. Transcripción, corte y ligación del RNA	18
1.6.2.1. Transcripción de los intermediarios replicativos	18
1.6.2.2. Corte y ligación de los intermediarios replicativos	19
1.7. Viroide objeto de estudio: el causante del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd)	21
2. El silenciamiento génico mediado por RNA	23
2.1. Aspectos generales	23
2.2. Funciones biológicas: la regulación génica transcripcional y postranscripcional	23
2.3. Mecanismos moleculares del silenciamiento génico	25
2.4. Las distintas rutas del silenciamiento de RNA en plantas	27
2.4.1. miRNAs	27
2.4.2. siRNAs	28
2.4.2.1. trans-acting siRNAs (ta-siRNAs).....	28
2.4.2.2. siRNAs derivados de transcritos naturales antisentido (nat-siRNAs).....	29
2.4.2.3. siRNAs asociados a transposones o secuencias repetidas (ra-siRNAs)	30
2.5. Componentes enzimáticos principales de la maquinaria del silenciamiento	32
2.5.1. Las proteínas DCL.....	32
2.5.2. Las proteínas AGO	33
2.5.2.1. Estructura, dominios y actividad.....	34
2.5.2.2. Papel de las AGO de <i>A. thaliana</i>	35
2.5.2.2.1. Los componentes del grupo 1: AGO1, AGO5 y AGO10.....	36
2.5.2.2.2. Los componentes del grupo 2: AGO2, AGO3 y AGO7.....	38
2.5.2.2.3. Los componentes del grupo 3: AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9	38
2.5.3. Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs).....	39
2.6. Papel del silenciamiento del RNA en la defensa antiviral	40
2.6.1. Supresión viral del silenciamiento mediado por RNA.....	41
2.7. Los viroides y los pequeños RNAs derivados de viroides (vd-sRNAs)	42
2.8. Papel del silenciamiento del RNA en la interacción planta-viroide	43
3. Rutas de síntesis y degradación del RNA	45

OBJETIVOS	51
CAPÍTULO 1	
Specific ARGONAUTES bind selectively small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation <i>in vivo</i>	54
CAPÍTULO 2	
Viroid RNA turnover: characterization of the subgenomic RNAs of potato spindle tuber viroid accumulating in infected tissues provides insights into decay pathways operating <i>in vivo</i>	96
DISCUSIÓN.....	139
1. Degradación <i>in vivo</i> del PSTVd: ruta catalizada por proteínas Argonauta cargadas con pequeños RNAs viroidales.....	141
2. Degradación <i>in vivo</i> del PSTVd: ruta catalizada por ribonucleasas que generan RNAs subgenómicos	146
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161
AGRADECIMIENTOS	187

RESUMEN

Los viroides, los agentes infecciosos más simples de la escala biológica, están constituidos por una molécula circular de RNA monocatenario de aproximadamente 250-400 nucleótidos (nt) que no codifica proteína alguna. A pesar de esta simplicidad estructural, los viroides son capaces de replicarse autónomamente, moverse sistémicamente y en muchos casos causar enfermedades en sus plantas huéspedes. Las infecciones producidas por viroides representativos generan la acumulación de pequeños RNAs viroidales (vd-sRNAs) de 21-24 nt con características similares a los pequeños RNA interferentes (siRNAs), la huella dactilar del silenciamiento mediado por RNA. La identificación de los vd-sRNAs implica que los viroides son diana de la primera barrera de silenciamiento mediado por RNA, formada por las RNasas ‘Dicer-like’ (DCLs). Para examinar si los vd-sRNAs se unen a las proteínas AGOs —el componente clave del complejo RISC (‘RNA-induced silencing complex’) que constituye la segunda barrera del silenciamiento mediado por RNA— hojas de *Nicotiana benthamiana* infectadas por el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) se agroinfiltraron con nueve de las diez proteínas AGOs de *Arabidopsis thaliana*. Inmunoprecipitaciones a partir de los halos agroinfiltrados y análisis ‘Western-’ y ‘Northern-blot’ han mostrado que todas las AGOs se expresaron y, a excepción de AGO6, AGO7 y AGO10, unieron vd-sRNAs: AGO1, AGO2 y AGO3 los de 21 y 22 nt, mientras que AGO4, AGO5 y AGO9 también mostraron afinidad por los de 24 nt. La secuenciación masiva mostró que las AGO1, AGO2, AGO4 y AGO5 agroexpresadas unen los PSTVd-sRNAs en función de su tamaño y nucleótido 5'-terminal, y que los perfiles de los correspondientes vd-sRNAs cargados en las AGOs adoptan una distribución específica a lo largo del genoma viroidal. La agroexpresión de AGO1, AGO2, AGO4 y AGO5 en hojas de *N. benthamiana* infectadas con PSTVd atenuó la acumulación de los RNAs genómico viroidales, indicando que éstos, o sus precursores, también son diana de RISC. En contraste con los ribovirus, la infección de PSTVd en *N. benthamiana* no afectó de forma significativa la regulación mediada por miR168 de la AGO1 endógena, que carga vd-sRNAs con especificidad similar a su homóloga de *A. thaliana*.

Mientras se conoce bien la biogénesis de los RNA viroidales, su degradación está restringida a algunos datos que implican al silenciamiento mediado por RNA. En el curso de nuestros estudios sobre el PSTVd, hemos observado consistentemente un patrón de 6-7 RNAs subgenómicos (sgRNAs) de polaridad (+) que aparecen junto con los RNAs

monoméricos circulares y lineares en berenjena, un huésped experimental de este viroide. Hibridaciones ‘Northern-blot’ con sondas de tamaño parcial y completo, mostraron que los sgRNAs (+) de PSTVd derivan de diferentes regiones del RNA genómico y que algunos son parcialmente solapantes. Parte de los sgRNAs (+) de PSTVd se observaron también en *N. benthamiana* y tomate, donde han pasado desapercibidos a causa de su menor acumulación. El análisis por extensión de cebador de sgRNAs (+) de PSTVd representativos excluye que sean productos de terminaciones prematuras de la transcripción, pues carecen del extremo 5’ común que cabría esperar si ésta empezara en una posición específica. Ulteriores análisis mediante 5’- y 3’-RACE indican que los sgRNAs (+) de PSTVd tienen extremos 5’-OH y 3’-P, que probablemente resultan de cortes endonucleolíticos de precursores más largos catalizados por RNAsas típicas que generan este tipo de extremos. Análisis de sgRNA (-) de PSTVd, que también se acumulan en berenjena infectada, mostraron que presentan características estructurales muy similares a los sgRNA (+). Nuestros resultados proporcionan una nueva visión de cómo ocurre la degradación *in vivo* de los RNAs viroidales, posiblemente durante su replicación, y sugieren que síntesis y degradación de las cadenas de PSTVd están conectadas, como se ha observado en los mRNAs.

SUMMARY

Viroids represent the lowest step of the biological scale: they consist of unencapsidated, circular, single-stranded, non-protein-coding RNAs of about 250 to 400 nucleotides (nt). Despite their structural simplicity, viroids replicate autonomously in their host plants and elicit symptoms in most instances. Infections by representative viroids produce the accumulation of viroid-derived small RNAs (vd-sRNAs) of 21-24 nt with the characteristics of the small interfering RNAs, the hallmarks of RNA silencing. Identification of vd-sRNAs supports their targeting by the first host RNA silencing barrier formed by Dicer-like RNases. To examine whether vd-sRNAs are loaded by AGO proteins —at the core of the RNA-induced silencing complex (RISC) that forms the second RNA silencing barrier— leaves of *Nicotiana benthamiana* infected by potato spindle tuber viroid (PSTVd) were agroinfiltrated with nine of the ten AGOs from *Arabidopsis thaliana*. Immunoprecipitations from the agroinfiltrated halos and Western- and Northern-blot analyses revealed that all AGOs were expressed and, except AGO6, AGO7 and AGO 10, bound vd-sRNAs: AGO1, AGO2 and AGO3 those of 21 and 22 nt, while AGO4, AGO5 and AGO9 bound additionally those of 24 nt. Deep sequencing revealed that the agroexpressed AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 bind vd-sRNAs according to their size and 5'-terminal nucleotide, with the profiles of the corresponding AGO-loaded vd-sRNAs adopting specific hot spot distributions along the viroid genome. Agroexpression of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 on PSTVd-infected tissue attenuated the level of the genomic RNAs, indicating that they, or their precursors, are RISC-targeted. In contrast to RNA viruses, PSTVd infection of *N. benthamiana* did not affect miR168-mediated regulation of the endogenous AGO1, which loaded vd-sRNAs with specificity similar to its *A. thaliana* counterpart.

While biogenesis of viroid RNAs is well-known, how they decay is restricted to data involving host RNA silencing. In the course of our studies on PSTVd, we have consistently observed a pattern of 6-7 (+) subgenomic RNAs (sgRNAs) that appear together with the genomic circular and linear RNAs in eggplant, an experimental host of this viroid. Northern-blot hybridizations with full- and partial-length probes revealed that the PSTVd (+) sgRNAs derive from different regions of the genomic RNA, and that some are partially overlapping. Part of the PSTVd (+) sgRNAs were also observed in *N. benthamiana* and tomato, wherein they have been overlooked due to their low accumulation. Analysis by primer extension of representative (+) sgRNAs showed the lack of a common 5' terminus, excluding that they

could result from aborted transcription initiated at one specific site. Further examination by 5'- and 3'-RACE indicated that the (+) sgRNAs have 5'-OH and 3'-P termini, most likely resulting from endonucleolytic cleavage of longer precursors catalyzed by RNases that typically generate these termini. Analysis of PSTVd (-) sgRNAs, which also accumulate in infected eggplant, showed that they present features very similar to those of their (+) counterparts. Our results provide a novel insight on how viroid decay proceeds *in vivo*, possibly during replication, and suggest that synthesis and decay of PSTVd strands might be connected as observed in mRNA.

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 nucleòtids (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.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales de los viroides

Durante los años 1970 y 1971 Theodor O. Diener, estudiando el agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata (“potato spindle tuber”), descubrió un replicón infeccioso con un genoma aproximadamente diez veces menor que el del más pequeño de los virus conocidos, al que denominó viroide (Diener, 1971a; Diener, 2003). Casi cincuenta años más tarde, los viroides siguen siendo los agentes infecciosos más pequeños, con una gama de huéspedes restringida a ciertas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas en las que frecuentemente provocan enfermedades de importancia económica.

Los viroides son pequeños RNAs circulares de 250-400 nucleótidos (nt) con un elevado contenido en estructura secundaria (Diener, 2003; Tabler y Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2005; Daròs *et al.*, 2006; Ding, 2009; Navarro *et al.*, 2012b). Son, como ya se ha dicho, los agentes infecciosos más simples de la escala biológica (Diener, 1971b), no codifican proteína alguna (Diener, 1987) y no requieren la cooperación de un virus auxiliar, por lo que necesitan utilizar la maquinaria transcripcional y de procesamiento del huésped para su replicación. En los viroides, toda la información necesaria para completar su ciclo infeccioso reside en su estructura primaria y de orden superior que les permite interactuar con factores del huésped. Esta situación también conlleva que los efectos patogénicos inducidos por los viroides son consecuencia de la interacción directa de su RNA genómico, o de un derivado del mismo, con una o más dianas celulares (Flores *et al.*, 2005).

1.1. Clasificación y estructura

En la actualidad se han caracterizado biológica y molecularmente unas treinta especies de RNAs viroidales y numerosas variantes de secuencia de las mismas (Fig. 1). Existe una clasificación avalada por el ‘International Committee on Taxonomy of Viruses’ (ICTV) (Flores *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2012), así como una base de datos que contiene las secuencias y estructuras secundarias de las variantes de los distintos viroides que se han descrito (Rocheleau y Pelchat, 2006).

POSPIVIROIDAE	POSPIVIROID	PSTVd (Viroide del tubérculo fusiforme de la patata) 359 nt Gross <i>et al.</i> , 1978
		TCDVd (Viroide del enanismo clorótico del tomate) 360 nt Singh <i>et al.</i> , 1999
		MPVd (Viroide de la papita mexicana) 360 nt Martínez-Soriano <i>et al.</i> , 1996
		TPMVd (Viroide de la planta macho del tomate) 360 nt Kiefer <i>et al.</i> , 1983
		CEVd (Viroide de la exocortis de los cítricos) 371 nt Gross <i>et al.</i> , 1982
		CSVd (Viroide del enanismo del crisantemo) 356 nt Haseloff y Symons, 1981
		TASVd (Viroide del enanismo apical del tomate) 360 nt Kiefer <i>et al.</i> , 1983
		IrVd 1 (Viroide 1 de iresine) 370 nt Spieker, 1996
		CLVd (Viroide latente de columnea) 370 nt Hammond <i>et al.</i> , 1989
	PCFVd (Viroide achatamiento del fruto del pimiento) 348 nt Verhoeven <i>et al.</i> , 2009	
	HOSTUVIROID	HSVd (Viroide del enanismo del lúpulo) 297 nt Ohno <i>et al.</i> , 1983
		DLVd (Viroide latente de la dalia) 342 nt Verhoeven <i>et al.</i> , 2013
	COCADVIROID	CCCvD (Viroide del cadang-cadang del cocotero) 246 nt Haseloff <i>et al.</i> , 1982
		CTVd (Viroide del tinangaja del cocotero) 254 nt Keese <i>et al.</i> , 1988
		HLVd (Viroide latente del lúpulo) 256 nt Puchta <i>et al.</i> , 1988
		CVd-IV (Viroide de la corteza agrietada de los cítricos) 284 nt Puchta <i>et al.</i> , 1991
	APSCAVIROID	ASSVd (Viroide de la piel cicatrizada de la manzana) 329 nt Hashimoto y Koganewaza, 1987
		CDVd (Viroide del enanismo de los cítricos) 294 nt Rakowski <i>et al.</i> , 1994
		CVd-V (Viroide V de los cítricos) 294 nt Serra <i>et al.</i> , 2008
CVd-VI (Viroide VI de los cítricos) 330 nt Ito <i>et al.</i> , 2001		
ADFVd (Viroide del fruto picado del manzano) 306 nt Di Serio <i>et al.</i> , 1996		
GYSVd-1 (Viroide 1 del moteado amarillo de la vid) 367 nt Koltunow y Rezaian, 1988		
GYSVd-2 (Viroide 2 del moteado amarillo de la vid) 363 nt Koltunow <i>et al.</i> , 1989		
CBLVd (Viroide de la hoja curvada de los cítricos) 318 nt Ashulin <i>et al.</i> , 1991		
PBCVd (Viroide de los chancros pustulosos del peral) 315 nt Hernández <i>et al.</i> , 1992		
AGVd (Viroide australiano de la vid) 369 nt Rezaian, 1990		
COLEVIROID	CbVd-1 (Viroide 1 del coleus blumei) 248 nt Spieker <i>et al.</i> , 1990	
	CbVd-2 (Viroide 2 del coleus blumei) 301 nt Spieker, 1996b	
	CbVd-3 (Viroide 3 del coleus blumei) 361 nt Spieker <i>et al.</i> , 1996a	
AVSUNVIROIDAE	AVSUNVIROID	ASBVd (Viroide del manchado solar del aguacate) 247 nt Symon <i>et al.</i> , 1981
	PELAMOVIROID	PLMVd (Viroide del mosaico latente del melocotonero) 337 nt Hernández y Flores, 1992
		CChMVd (Viroide del moteado clorótico del crisantemo) 399 nt Navarro y Flores, 1997
	ELAVIROID	ELVd (Viroide latente de la berenjena) 333 nt Fadda <i>et al.</i> , 2003

Figura 1. Clasificación de los viroides (Flores *et al.*, 2005, con modificaciones de Owens *et al.*, 2012). Éstos se agrupan en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que se dividen en cinco y tres géneros, respectivamente. Las especies tipo de cada género se destacan en gris. Para cada especie se indica la abreviatura de su nombre en inglés, junto con el nombre en castellano, el tamaño en nucleótidos de una variante típica y la referencia bibliográfica del artículo donde se describió su estructura molecular.

Diversas características estructurales y biológicas han permitido la clasificación de los viroides en dos grandes familias: *Pospiviroidae*, con el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (potato spindle tuber viroid, PSTVd) como miembro tipo, y *Avsunviroidae*, cuyo miembro tipo es el viroide del manchado solar del aguacate (avocado sunblotch viroid, ASBVd) (Fig. 1). Los miembros de la primera familia se caracterizan por la presencia de una serie de motivos conservados de secuencia y estructura —que incluyen la región central conservada (‘central conserved region’, CCR), la región terminal conservada (‘terminal conserved region’, TCR) y la horquilla terminal conservada (‘terminal conserved hairpin’, TCH) (Fig. 2A)—, por replicarse y acumularse en el núcleo, y por la ausencia de dominios

de autocorte ribozimáticos. La secuencia de la CCR, y la presencia o ausencia de TCR y TCH, permiten clasificar a los miembros de esta familia en cinco géneros. Por el contrario, los miembros de la segunda familia no poseen estos motivos, se replican y acumulan en el cloroplasto, y sus RNAs de ambas polaridades se autocortan mediante estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo (Owens *et al.*, 2012).

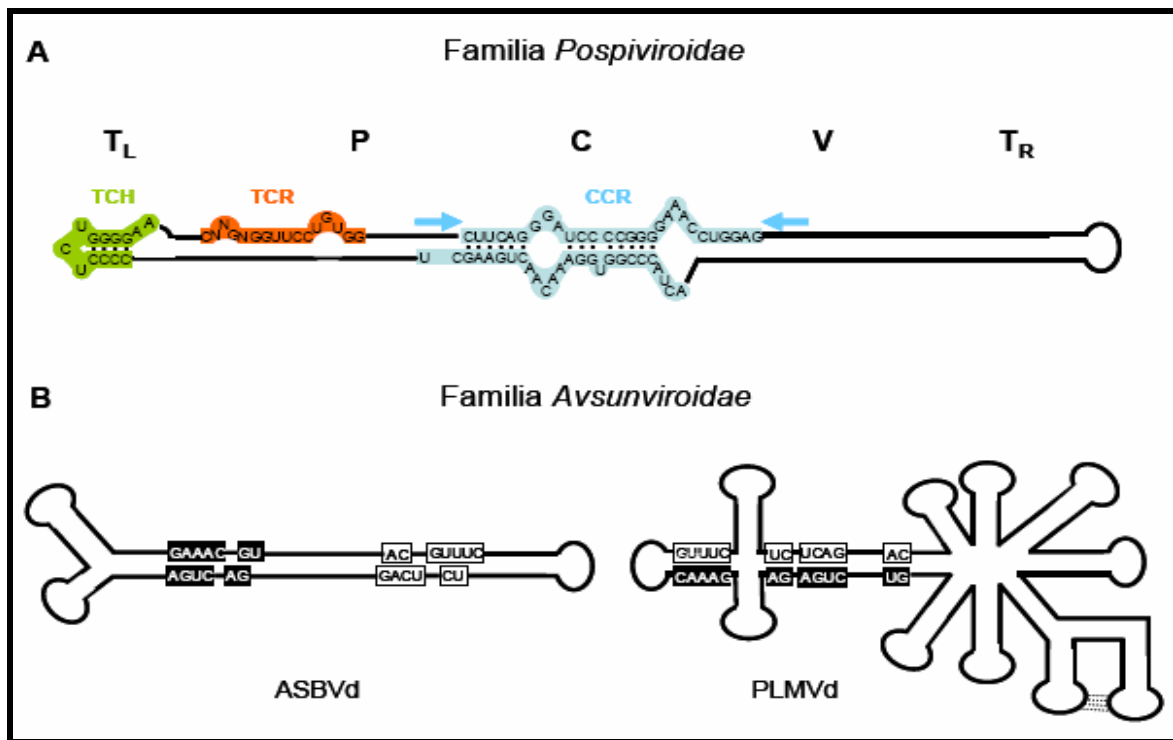


Figura 2. Estructura de los viroides. **(A)** Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para los miembros del género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae*. La localización de los cinco dominios se indica en la parte superior de la figura: C (central), P (patogénico), V (variable) y TL y TR (terminal izquierdo y terminal derecho, respectivamente). Los nucleótidos que forman las regiones conservadas CCR, TCR y TCH se representan en negro sobre un fondo azul, naranja y verde, respectivamente. Las flechas que flanquean la rama superior de la CCR indican los nucleótidos que forman, junto con los estrictamente conservados, repeticiones invertidas imperfectas. **(B)** Representación esquemática de las estructuras secundarias de tipo cuasi-varilla y ramificada del ASBVd y del PLMVd, respectivamente, de la familia *Avsunviroidae*. Los nucleótidos estricta o altamente conservados en las ribozimas de cabeza de martillo naturales se representan en recuadros con fondo negro y blanco para las polaridades positiva y negativa respectivamente. En el viroide del mosaico latente del melocotonero (peach latent mosaic viroid, PLMVd), una interacción terciaria entre dos bucles se representa con líneas discontinuas.

1.2. Estructura secundaria

La estructura secundaria de mínima energía libre que adoptan los viroides *in vitro* en condiciones no desnaturalizantes ha sido predicha mediante cálculos termodinámicos. La conformación más estable propuesta para la mayoría de los miembros de la familia *Pospiviroidae* es de tipo varilla (Fig. 2A), que es la observada en el PSTVd mediante microscopía electrónica (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976), aunque también se han descrito otras conformaciones posibles de cuasi-varilla. En estas conformaciones de varilla o cuasi-varilla formadas como consecuencia de la gran autocomplementariedad de las secuencias viroidales, predominan regiones de apareamiento intramolecular que se alternan con pequeños bucles de bases aparentemente desapareadas.

A partir de comparaciones de secuencia se han definido cinco dominios en la estructura de tipo varilla del PSTVd y de otros viroides relacionados (Keese y Symons, 1985) (Fig. 2A): el dominio central (C) flanqueado por los dominios patogénico (P) y variable (V), y los dominios terminales derecho e izquierdo (TR y TL, respectivamente). La CCR está localizada en el dominio C, y la TCR y la TCH en el dominio TL. A estos dominios estructurales se les ha asociado funciones específicas. El dominio C contiene el sitio donde los RNAs viroidales multiméricos de polaridad (+) son cortados y ligados (Baumstark *et al.*, 1997; Gas *et al.*, 2007). El dominio P se ha asociado con los efectos patogénicos en el PSTVd y otros viroides relacionados (Sano *et al.*, 1992; Qi y Ding, 2003b). Por último, el dominio TR parece estar implicado en fenómenos de recombinación (Keese y Symons, 1985) y el TL en modular la replicación o acumulación (Sano e Ishiguro, 1998).

Dentro de la familia *Avsunviroidae*, el ASBVd y el viroide latente de la berenjena (eggplant latent viroid, ELVd) adoptan estructuras secundarias de cuasi-varilla (Fig. 2B) (Symons, 1981; Fadda *et al.*, 2003a). Sin embargo, el viroide del mosaico latente del melocotonero (peach latent mosaic viroid, PLMVd) (Hernández y Flores, 1992) y el del moteado clorótico del crisantemo (chrysanthemum chlorotic mottle viroid, CChMVd) (Navarro y Flores, 1997), presentan una conformación ramificada (Fig. 2B) estabilizada por elementos de estructura terciaria que se establecen entre bucles ('kissing loops') (Bussiere *et al.*, 1999). La estructura ramificada de PLMVd *in vitro* ha sido confirmada mediante SHAPE ('RNA-selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension'), que ha también mostrado la posible existencia de otras interacciones terciarias (Dubé *et al.*, 2011). Esta misma metodología ha sido utilizada recientemente para confirmar la conformación en forma de varilla o cuasi-varilla adoptada *in vitro* por cinco miembros de la familia *Pospiviroidae* (Xu *et al.*, 2012) y por el ASBVd y otros de la familia *Avsunviroidae* (Delan-Forino *et al.*,

2014; Giguère *et al.*, 2014). Estas conformaciones compactas tienen posiblemente relevancia biológica *in vivo*, si bien sólo existen pruebas indirectas que en la familia *Pospiviroidae* incluyen: i) la preservación de la conformación en varilla en variantes naturales del coconut cadang–cadang viroid (CCCVd) y del citrus exocortis viroid (CEVd) de tamaño mayor que las típicas debido a secuencias repetidas (Haseloff *et al.*, 1982; Semancik *et al.*, 1994; Fadda *et al.*, 2003b), ii) la identificación en plantas agrotransformadas con formas diméricas no infecciosas de PSTVd, a causa de una delección de 9 nt, de una variante de PSTVd con una delección de otros 9 nt que restaura la conformación en varilla y recupera la infectividad (Wassenegger *et al.*, 1994), y iii) la función fisiológica en el movimiento del PSTVd atribuida a la presencia de algunos bucles en la estructura de varilla de este viroide (Zhong *et al.*, 2008). En la familia *Avsunviroidae*, la relevancia *in vivo* de la estructura ramificada de PLMVd y de CChMVd está principalmente respaldada por la heterogeneidad de secuencia observadas en las variantes naturales de estos viroides: la mayoría de las mutaciones ocurren en los bucles, y cuando afectan a bases apareadas, los cambios son co-variaciones o sustituciones que no distorsionan la conformación ramificada predicha (Ambrós *et al.*, 1998; 1999; De la Peña *et al.*, 1999; Pelchat *et al.*, 2000; Rodio *et al.*, 2006; Yazarlou *et al.*, 2012).

1.3. Propiedades biológicas

1.3.1. Gama de huéspedes

La gama de huéspedes de los viroides está restringida al reino vegetal, y concretamente a las plantas superiores. Se han descrito infecciones viroidales en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas de gran interés económico, tanto herbáceas (patata, tomate, pepino, lúpulo, crisantemo), como leñosas (cítricos, aguacate, melocotonero, ciruelo, manzano, peral y cocotero).

En general los miembros de la familia *Pospiviroidae* son capaces de infectar varias especies botánicas, en algún caso filogenéticamente distantes. Sin embargo, los miembros de la familia *Avsunviroidae* tienen una gama de huéspedes restringida esencialmente a los huéspedes en los que han sido inicialmente descritos (Flores *et al.*, 2005).

1.3.2. Sintomatología

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los virus, la replicación y acumulación de los viroides y la aparición de los síntomas que inducen se ven favorecidos por temperaturas

elevadas (25-35°C) (Sanger y Ramm, 1975) y por altas intensidades luminosas (Harris y Browning, 1980). La expresi3n de dichos síntomas es el resultado de la interacci3n entre el propio RNA viroidal (o un derivado del mismo) y factores celulares del hu3sped que conducen a cambios en el desarrollo y la fisiología del mismo (Flores *et al.*, 2005). Las alteraciones más frecuentes incluyen: i) enanismo de la planta, ii) epinastia, distorsiones, clorosis y necrosis de las hojas, iii) necrosis, distorsiones y decoloraciones de los frutos, iv) agrietamientos del tallo y de la corteza, v) alteraciones del color de los p3talos, y vi) malformaciones en semillas y 3rganos de reserva. Algunas infecciones viroidales causan la muerte de las plantas mientras que otras inducen síntomas suaves o son asintomáticas.

1.3.3. Movimiento

Los viroides muy probablemente necesitan interactuar directamente con factores del hu3sped que facilitan su movilidad. La infecci3n sist3mica de un viroide en una planta hu3sped ocurre en varias etapas.

Despu3s de entrar en una c3lula, el RNA viroidal debe moverse hasta su sitio de replicaci3n, bien sea el n3cleo o el cloroplasto. En el PSTVd, el transporte al n3cleo parece ser un proceso específico y regulado (Woo *et al.*, 1999) que requiere la formaci3n de un complejo ribonucleoproteico (Zhao *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual los miembros de la familia *Avsunviroidae* alcanzan el cloroplasto se desconoce y, de hecho, no se han descrito RNAs celulares que invadan o salgan del cloroplasto (Ding *et al.*, 1999). Recientemente se ha propuesto un mecanismo selectivo de transporte del ELVd al cloroplasto a trav3s de una etapa previa en el n3cleo (G3mez y Pallas, 2012).

Una vez que el viroide ha infectado las primeras c3lulas, puede colonizar otras adyacentes y a partir de 3stas invadir sist3micamente la planta. Los RNAs viroidales, al igual que ciertas proteínas y RNAs end3genos del hu3sped, se mueven de c3lula a c3lula a trav3s de los plasmodesmos, que ofrecen conexiones citoplasmáticas entre c3lulas adyacentes (Ding *et al.*, 1997; Di Serio y Flores, 2008).

El movimiento a larga distancia de los viroides ocurre a trav3s del sistema vascular, por el que se desplazan a tejidos y 3rganos alejados del sitio inicial de la infecci3n. Este transporte conlleva la descarga del viroide al floema que, siguiendo la ruta de los fotoasimilados, alcanza otros 3rganos de la planta hasta invadirla sist3micamente (Ding y Owens, 2003; Zhu *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2007). Tanto para el movimiento de c3lula a c3lula como a larga distancia, los viroides requieren motivos estructurales definidos que presumiblemente favorecen la interacci3n con los factores del hu3sped implicados en el desplazamiento de

RNAs endógenos; alguno de estos motivos estructurales han sido identificados (Gómez y Pallás, 2001; Owens *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2011).

1.4. Localización subcelular

Los primeros ensayos de centrifugación diferencial para localizar intracelularmente a los viroides detectaron al PSTVd, CEVd y al viroide del enanismo del lúpulo (hop stunt viroid, HSVd) en fracciones nucleares (Diener, 1971a; Sanger, 1972; Takahashi y Diener, 1975; Semancik *et al.*, 1976; Schumacher *et al.*, 1983). Estudios posteriores de hibridaci3n *in situ* con sondas fluorescentes y microscopía láser confocal de preparaciones de núcleos purificados mostraron que el PSTVd se acumula en el nucleolo (Harders *et al.*, 1989). Subsiguientes estudios empleando cultivos celulares y plantas infectadas de *N. benthamiana* han mostrado que las cadenas de polaridad negativa del PSTVd se concentran en el nucleoplasma, mientras que las de polaridad positiva se detectan tanto en el nucleoplasma como en el nucleolo. Estos datos sugieren que el PSTVd se transcribe en el nucleoplasma y que los intermediarios de polaridad positiva son transferidos y procesados en el nucleolo (Qi y Ding, 2003a).

En contraste con lo anterior, en hojas de plantas infectadas con ASBVd o con PLMVd, la mayoría del RNA viroidal se localiza en el cloroplasto (Mohamed y Thomas, 1980; Lima *et al.*, 1994; Bonfiglioli *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 1999; Navarro *et al.*, 1999).

1.5. Transmisión y epidemiología

Los viroides son transmitidos de forma mecánica en la mayoría de sus huéspedes, pudiendo mantenerse infecciosos por largos períodos de tiempo en herramientas de corte y poda que previamente se han empleado con plantas infectadas, lo que constituye posiblemente la fuente fundamental de diseminaci3n a corta distancia en el campo (Wah y Symons, 1999; Timmermann *et al.*, 2001). Para algunos viroides, como el ASBVd (Wallace y Drake, 1962) y en menor medida el PSTVd (Singh *et al.*, 1991), se ha descrito la transmis3n por polen y semilla botánica. El PSTVd puede sobrevivir en semillas de plantas infectadas por largos períodos de tiempo; para este mismo viroide existen además pruebas de transmis3n por el afido *Macrosiphum euphorbiae*, si bien con baja frecuencia y de forma no persistente (De Bokx y Pirone, 1981). En todo caso, la dispersi3n a larga distancia de los viroides que infectan especies de valor agron3mico multiplicadas vegetativamente, tanto

herbáceas (por ejemplo, patata y tomate) como leñosas (por ejemplo, cítricos, vid y diversos frutales), es muy probablemente consecuencia del empleo de material de propagación infectado.

1.6. Replicación

Los viroides, a pesar de que todas las pruebas disponibles indican que no codifican proteína alguna, son capaces de replicarse autónomamente sin la asistencia de un virus auxiliar (como requieren los RNAs satélites). Por lo tanto las actividades catalíticas necesarias para este proceso deben ser, o bien enzimas del huésped, o bien ribozimas contenidas en el RNA viroidal.

1.6.1. Mecanismo de círculo rodante

Teniendo en cuenta la naturaleza circular de los RNAs viroidales, se propuso para su replicación un mecanismo de círculo rodante con solo intermediarios de RNA. La presencia de RNAs viroidales oligoméricos de ambas polaridades en tejidos infectados por miembros de ambas familias es consistente con esta hipótesis (Branch y Robertson, 1984; Hutchins *et al.*, 1985). En este contexto se han propuesto dos variantes del mecanismo de replicación, simétrica o asimétrica dependiendo de la familia viroidal, teniendo en cuenta el tipo de molécula que sirve como molde en la segunda parte del ciclo (Fig. 3). Según el modelo de círculo rodante, el RNA circular monomérico infeccioso más abundante, al que se le asigna arbitrariamente la polaridad positiva, es reconocido por una RNA polimerasa celular que después de varios ciclos de transcripción reiterada de este molde genera oligómeros de polaridad complementaria que pueden seguir dos vías diferentes. Por un lado, en la variante asimétrica, este oligómero sirve de molde para la síntesis de otros oligómeros de polaridad positiva, que son luego procesados a monómeros lineales y ligados a las correspondientes formas circulares maduras. Por otro lado, en la variante simétrica, los oligómeros de polaridad negativa son procesados y ligados dando lugar a moléculas circulares de la misma polaridad, que sirven como molde en un segundo círculo rodante que es simétrico del primero. La molécula clave que permite diferenciar cuál de las dos variantes es la que opera es el monómero circular de polaridad negativa: su presencia indica que la replicación sigue la variante simétrica del modelo.

Aunque el monómero circular de polaridad negativa del PSTVd inicia la infección viroidal en plantas transgénicas que expresan constitutivamente RNAs de esta polaridad

(Feldstein *et al.*, 1998), nunca se ha detectado este tipo de molécula en plantas infectadas de forma natural, lo que ha llevado a concluir que dicho viroide, y por extensión los de su familia, se replican por la variante asimétrica del modelo (Branch *et al.*, 1988). Por el contrario, en la familia *Avsunviroidae*, la detección en tejidos infectados de los monómeros circulares de polaridad negativa (Daròs *et al.*, 1994; Bussièrre *et al.*, 1999; Navarro y Flores, 1997; Delgado *et al.*, 2005), así como la observación de que los RNAs de ambas polaridades son capaces de autocortarse *in vitro* mediante ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a), indican que los miembros de esta familia se replican siguiendo la variante simétrica del modelo.

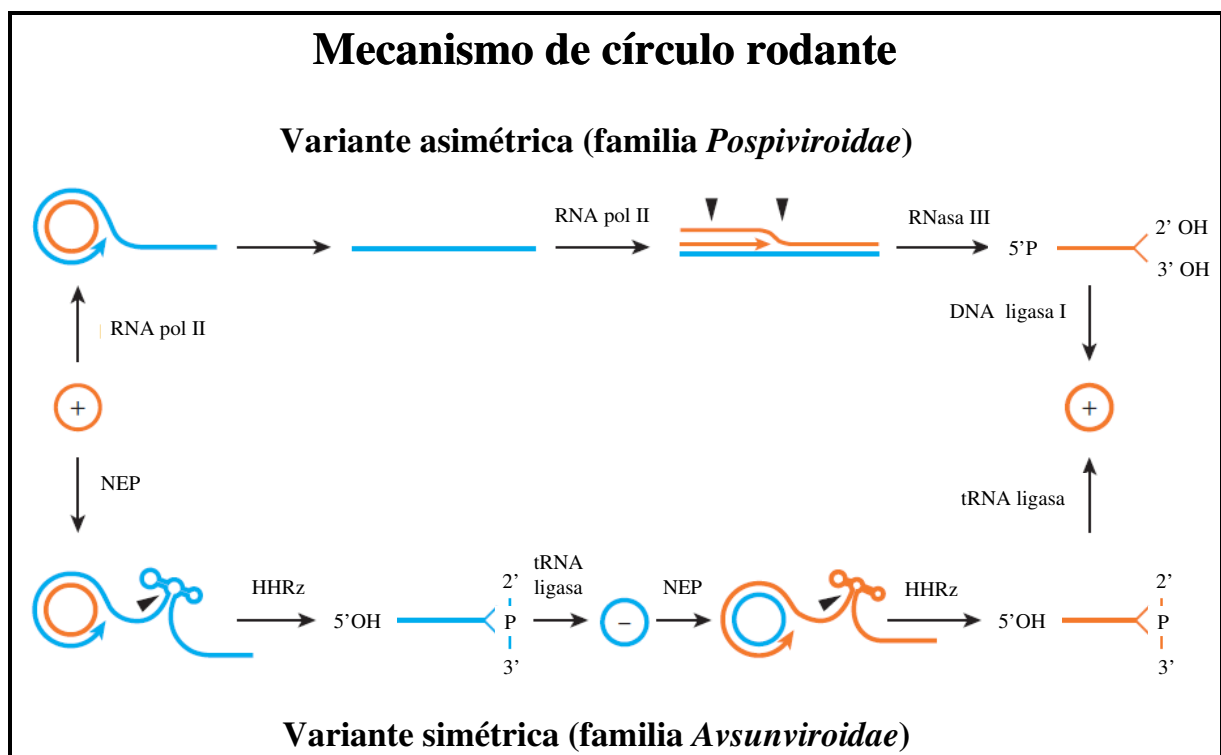


Figura 3. Variantes asimétrica y simétrica del mecanismo del círculo rodante propuesto para la replicación de los miembros de las familias *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, respectivamente. Los colores naranja y azul se refieren a las polaridades positivas y negativas, respectivamente, con los sitios de cortes indicados con puntas de flechas. Las enzimas y ribozimas que presumiblemente catalizan las distintas etapas están indicadas. Nótese que la RNA polimerasa II (y la NEP) son redirigidas a transcribir moldes de RNA, y la DNA ligasa 1 a circularizar substratos de RNA. Abreviaturas: HHRz, ribozima de cabeza de martillo (‘hammerhead ribozyme’); NEP, RNA polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo (‘nuclear encoded polymerase’) (Reproducido de Flores *et al.*, 2014).

1.6.2. Transcripción, corte y ligación del RNA

En ambas variantes del ciclo replicativo se requieren tres actividades catalíticas: una RNA polimerasa para la síntesis del RNA, una RNasa para el corte del RNA a unidades monoméricas y una RNA ligasa para la circularización de estas últimas. A diferencia de los virus que codifican proteínas que intervienen en su propia replicación, los viroides requieren que todas estas actividades catalíticas estén mediadas por proteínas del huésped, salvo las reacciones autocatalíticas mediadas por ribozimas en los miembros de la familia *Avsunviroidae*.

1.6.2.1. Transcripción de los intermediarios replicativos

La primera etapa del ciclo replicativo, la polimerización de las cadenas de RNA, conlleva que los viroides sean reconocidos y transcritos por RNA polimerasas celulares. La replicación de un viroide no tiene necesariamente que darse en el mismo compartimento subcelular en el que se acumula mayoritariamente, ya que podría ser sintetizado en un lugar y posteriormente ser traslocado a otro. Sin embargo, la detección de intermediarios replicativos del PSTVd en el núcleo (Spiesmacher *et al.*, 1983) y del ASBVd en el cloroplasto (Navarro *et al.*, 1999), ha mostrado que tanto la replicación como la acumulación de los miembros de la familia *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae* tienen lugar en el núcleo y el cloroplasto, respectivamente.

En la familia *Pospiviroidae* varios estudios han mostrado que la enzima implicada en la transcripción del PSTVd (Schindler y Mühlback, 1992), del CEVd (Flores y Semancik, 1982; Flores, 1989; Rivera-Bustamante y Semancik, 1989) y del HSVd (Yoshikawa y Takahashi, 1986), es la RNA polimerasa II (Pol II), que utiliza DNA como molde en condiciones fisiológicas normales. Estos resultados han sido confirmados por otros estudios donde se observó que, en preparaciones de tejido infectado por CEVd, las cadenas de RNA viroidal de ambas polaridades son inmunoprecipitadas con un anticuerpo contra la subunidad mayor de la Pol II (Warrilow and Symons, 1999). Más recientemente, otros experimentos de inmunoprecipitación han identificado una región específica de la cadena de polaridad positiva del PSTVd como el sitio de unión de la Pol II (Bojic *et al.*, 2012).

La replicación de los miembros de la familia *Avsunviroidae* podría estar mediada por la actividad de una de las dos RNA polimerasas cloroplásticas dependientes de DNA, la RNA polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo ('nuclear encoded polymerase', NEP), o la RNA polimerasa cloroplástica codificada en el genoma plástido ('plastid encoded

polymerase', PEP) (Stern *et al.*, 1997). Para discernir entre las dos alternativas se han realizado varios estudios empleando metodologías distintas; ensayos de transcripción con preparaciones cloroplásticas obtenidas de hojas de aguacate infectado con el ASBVd han mostrado que, mientras la transcripción de diferentes genes cloroplásticos catalizada por la PEP es sensiblemente afectada por el inhibidor bacteriano tagetitoxina, no ocurre así con la síntesis de los oligómeros viroidales, implicando por lo tanto a la NEP en este último proceso (Navarro *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios *in vitro* con el PLMVd y la RNA polimerasa de *Escherichia coli*, relacionada filogenéticamente con la PEP, sugieren la participación de esta última (Pelchat *et al.*, 2001), aunque este sistema dista mucho de reflejar la situación fisiológica real. De hecho, la síntesis y la acumulación del PLMVd en melocotonero infectado son particularmente altas en aquellas zonas de las hojas que muestran albinismo (calico), donde los plastidios carecen de ribosomas funcionales y muestran una actividad reducida de PEP (Rodio *et al.*, 2007). Estas observaciones son más concordantes con la idea de que, al igual que en el ASBVd, la NEP es la enzima involucrada en la replicación del PLMVd, al tiempo que sugieren que otros factores cloroplásticos que pudieran mediar este proceso también son de codificación nuclear. Por lo tanto, los viroides son capaces de modificar la especificidad de molde de ciertas RNA polimerasas (nucleares y cloroplásticas), forzándolas a transcribir moldes de RNA.

1.6.2.2. Corte y ligación de los intermediarios replicativos

La segunda actividad enzimática requerida en la replicación de los RNAs viroidales es una RNasa que catalice el corte de los intermediarios oligoméricos y genere las correspondientes formas monoméricas lineales. En los miembros de la familia *Avsunviroidae* dicha actividad está contenida en las propias cadenas de RNA de ambas polaridades, que se autocortan *in vitro* a través de ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987; Hernández y Flores, 1992; Darós *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 1997; Flores *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2003b).

En los miembros de la familia *Pospiviroidae* no hay unanimidad acerca de si las actividades catalíticas que median el corte de los oligómeros de polaridad positiva (y la ligación de los monómeros lineales resultantes), residen o no en la propia molécula viroidal. En uno de los primeros trabajos que abordaron esta cuestión se observó que RNAs oligoméricos de ambas polaridades del PSTVd sintetizados *in vitro* eran incapaces de autocortarse o autoligarse al incubarlos en ausencia de proteínas (Tsagris *et al.*, 1987).

Aunque Liu y Symons (1998) posteriormente sugirieron el autocorte (ribozimático) en el caso del CCCVd, otros autores han propuesto la participación de enzimas del huésped (Baumstark y Riesner, 1995; Baumstark *et al.*, 1997) y en particular de RNAsas del tipo III (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008).

La última actividad enzimática implicada en la replicación de los viroides es una RNA ligasa que media la circularización de los monómeros lineales generados en la etapa anterior. Las RNA ligasas que catalizan dichas reacciones deben ser distintas para los miembros de las dos familias viroidales, ya que éstos se replican en orgánulos celulares diferentes. En la familia *Pospiviroidae* se ha observado autoligación *in vitro* de los RNAs lineales monoméricos del PSTVd en ausencia de proteínas (Baumstark *et al.*, 1997). Sin embargo, otros estudios *in vitro* e *in vivo* (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008) proponen que la circularización en los viroides nucleares está probablemente catalizada por una actividad RNA ligasa capaz de unir los extremos generados por RNasa del tipo III. De hecho la enzima del huésped responsable de esta actividad de ligación ha sido identificada recientemente (Nohales *et al.*, 2012). Los autores han mostrado que el RNA monomérico lineal del PSTVd abierto por el sitio de procesamiento fisiológico y con extremos 5'-fosfomonoéster (5'-P) y 3'-hidroxilo (3'-OH) —los generados por RNAsas del tipo III— se circulariza *in vitro* en presencia de ATP y ciertas fracciones cromatográficas de proteínas de hojas de tomate. Análisis mediante espectrometría de masas han revelado que la correspondiente actividad enzimática reside en la DNA ligasa 1 (Nohales *et al.*, 2012). Por lo tanto, los miembros de la familia *Pospiviroidae* no solo son capaces de modificar la especificidad de molde de la RNA polimerasa que transcribe sus cadenas, sino también la especificidad de sustrato de la ligasa que circulariza los RNAs monoméricos lineales resultantes del procesamiento de dichas cadenas.

En la familia *Avsunviroidae* también se ha observado la autoligación *in vitro* de los RNAs lineales monoméricos del PLMVd en ausencia de proteínas (Lafontaine *et al.*, 1995; Côté *et al.*, 2001), aunque otros datos apuntan a la implicación de una función específica del huésped en esta reacción (Reid y Lazinski, 2000; Delgado *et al.*, 2005; Rodio *et al.*, 2007) y más concretamente a una RNA ligasa cloroplástica (Flores *et al.*, 2009). Estudios recientes (Nohales *et al.*, 2012) mediante ensayos de ligación *in vitro* han mostrado que una isoforma cloroplástica de tRNA ligasa de berenjena cataliza eficientemente la circularización de los RNAs monoméricos lineales procedentes de autocorte del ASBVd, PLMVd, CChMVd y ELVd, reconociendo específicamente los extremos de RNA 5'-hidroxilo (5'-OH) y 2',3'-fosfodiéster cíclico (2',3'>P), que son los que producen las ribozimas de cabeza de martillo.

1.7. Viroide objeto de estudio: el causante del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd)

La enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata fue descrita por primera vez en Estados Unidos por Martin (1922), pero hasta casi cincuenta años más tarde (1971) no se demostró que el agente causal era un RNA infeccioso de bajo peso molecular (Diener, 1971a).

El PSTVd se ha detectado en Alemania (EPPO, 2006), Australia (Walter y McLeod, 1982), Austria (EPPO, 2008a), Brasil (Ávila *et al.*, 1990), Canadá (Singh *et al.*, 1988), Chile (Shamloul *et al.*, 1997), China (Tien, 1985; Singh *et al.*, 1991), Costa Rica (Badilla *et al.*, 1999), Eslovenia (IPPC, 2007), Grecia (Puchta *et al.*, 1990), Holanda (Verhoeven *et al.*, 2004), Italia (Di Serio, 2007), Reino Unido (Harris *et al.*, 1979), Estados Unidos (Diener, 1971a; Singh y Clark, 1971), India (Owens *et al.*, 1992), Nueva Zelanda (Puchta *et al.*, 1990), Republica Checa (EPPO, 2008b) y Rusia (Huttinga *et al.*, 1987). Sin embargo, su distribución geográfica actual es limitada a causa de las estrictas medidas adoptadas por los países desarrollados para su control y erradicación (Singh *et al.*, 2003a). Los daños económicos provocados por la enfermedad son importantes como consecuencia de la pérdida de calidad comercial de los tubérculos, sin contar con el riesgo que supone en la producción de material de propagación infectado y en su almacenamiento en bancos de germoplasma (Randles, 2003). La gama de huéspedes del PSTVd es amplia. Infecta varias especies de la familia *Solanaceae* que incluyen patata, tomate y algunas ornamentales (*Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, *S. rantonnetti* y *Streptosolen jamesonii*) en las que el viroide no produce síntomas, pepino (*Cucurbitaceae*), aguacate (*Lauraceae*) y otras especies de las familias *Compositae*, *Boraginaceae*, *Campanulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Convolvulaceae*, *Dipsacaceae*, *Sapindaceae*, *Scrophulariaceae*, y *Valerianaceae* (Singh *et al.*, 2003b). El síntoma más característico en plantas de patata y que da nombre a la enfermedad es la deformación de los tubérculos, que adoptan una apariencia ahusada (Fig. 4B) y además presentan ojos prominentes (Diener y Raymer, 1971). Como huéspedes experimentales se utilizan tomate, *N. benthamiana* y más recientemente berenjena (Fig. 4C, D y E, respectivamente) donde el PSTVd provoca retardos en el crecimiento y epinastia de las hojas; estos huéspedes, sobre todo el segundo, son útiles para experimentos de expresión transitoria de secuencias viroidales mediante agroinfiltración.

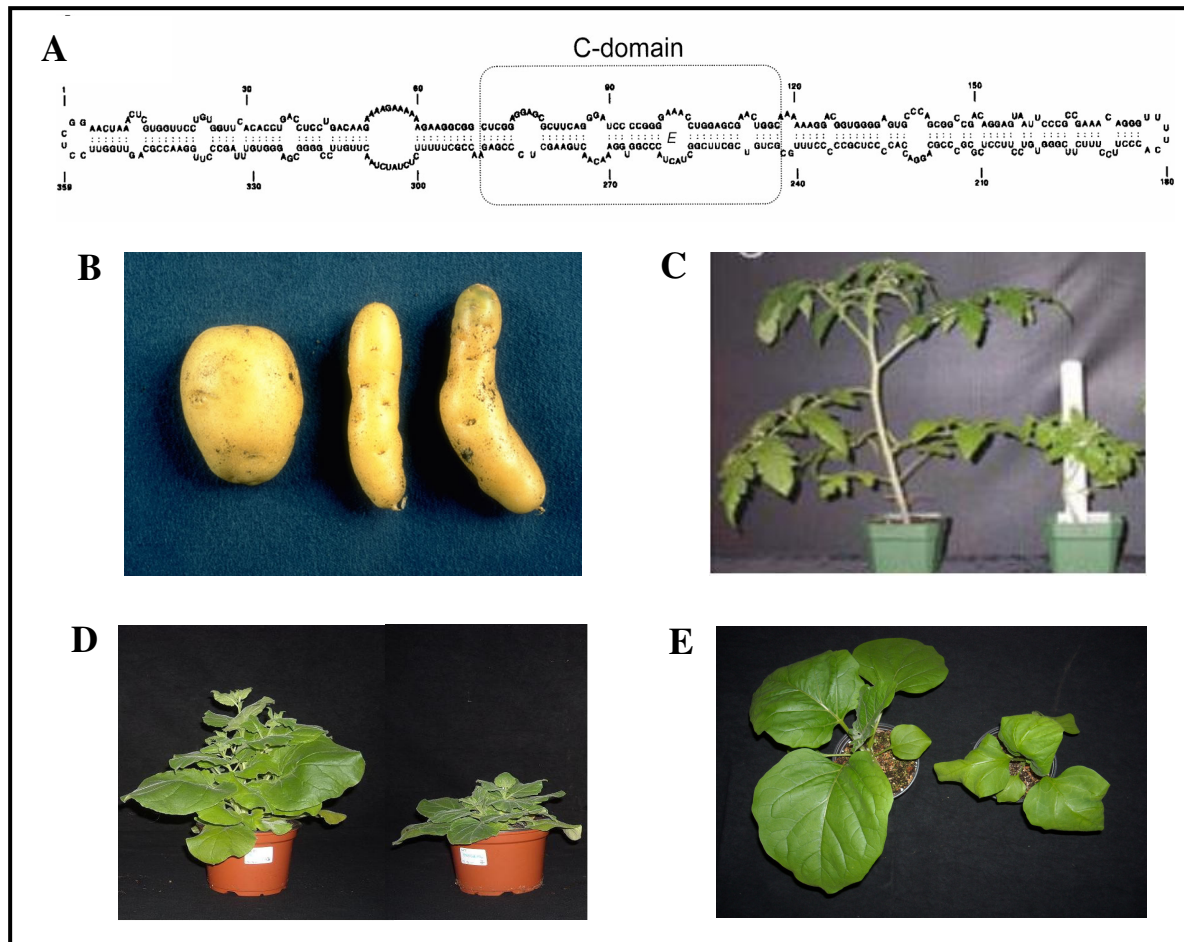


Figura 4. Viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd). (A) Estructura secundaria de mínima energía libre de tipo varilla propuesta para el RNA viroidal (cepa intermedia) (Hammond y Owens, 1987). (B) Sintomatología inducida en patata: tubérculos deformados (derecha) y control sano (izquierda). (C, D y E) Sintomatología inducida en tomate cv. Rutgers, *N. benthamiana* y berenjena cv. Black beauty, respectivamente: retardo en el crecimiento y epinastia de las hojas (derecha) y controles sanos (izquierda).

El PSTVd con un genoma de 359 nt, pertenece al género *Pospiviroid* dentro de la familia *Pospiviroidae*. Fue el primer viroide secuenciado (Gross *et al.*, 1978) y es el mejor caracterizado molecularmente. Su estructura secundaria *in vitro* derivada de predicciones termodinámicas, análisis bioquímicos y observaciones con el microscopio electrónico (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976) es de tipo varilla (Fig. 4A), con regiones apareadas separadas por bucles aparentemente desapareados. Existen más de 130 variantes de secuencia de distintos aislados depositadas en las bases de datos, algunas de los cuales se han caracterizado biológicamente (Gross *et al.*, 1978; Hammond y Owens, 1987; Lakshman y Tavantzis, 1993; Gruner *et al.*, 1995). En el presente trabajo se ha utilizado el PSTVd-NB, que es una variante de secuencia del PSTVd-NT, pues las dos se diferencian en cinco

substituciones nucleotídicas (G201U, A309U, A47U, U313A y U315C). Si bien ambas variantes infectan tabaco (*Nicotiana tabacum*), la variante NB se acumula a niveles más altos que la NT. Esta diferencia puede deberse a la distinta eficiencia de replicación o de distribución celular, ya que la variante NT se localiza principalmente en el floema, mientras la NB lo hace en el floema, el mesófilo y la epidermis (Qi *et al.*, 2004).

2. El silenciamiento génico mediado por RNA

2.1. Aspectos generales

Las primeras observaciones de la existencia de mecanismos de silenciamiento génico mediado por RNA se realizaron en 1990, a partir de estudios con plantas transgénicas cuyo objetivo era sobreexpresar un gen introduciendo copias extra del mismo mediante transformación génica. En contra de lo esperado se observó que la sobreexpresión en petunias transgénicas del gen de la chalcona sintetasa (CHS) —una enzima implicada en la génesis del color de las flores— hacía perder la pigmentación en vez de intensificarla, sugiriendo la existencia de una cosupresión del transgén y del gen homólogo endógeno (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990). Además, la cosupresión era consecuencia de la reducción o anulación de los niveles del correspondiente RNA mensajero (mRNA), por lo que al fenómeno también se le denominó silenciamiento génico postranscripcional (ver más abajo).

Sin embargo, el gran avance en este campo se produjo pocos años después, cuando se determinó que procesos similares al silenciamiento génico observado en plantas —que permite silenciar genes de manera específica y dependiente de su secuencia nucleotídica— operan de forma generalizada en muchos otros organismos eucariotas (Fire *et al.*, 1998; Kennerdell y Carthew, 1998). Estos resultados promovieron un avance muy rápido en la caracterización bioquímica de dichos procesos, englobados bajo el término general de silenciamiento génico mediado por RNA, y en la comprensión del papel que desempeñan en los organismos eucariotas (Zamore y Haley, 2005).

2.2. Funciones biológicas: la regulación génica transcripcional y postranscripcional

Tecnologías basadas en el silenciamiento mediado por RNA pueden ser utilizadas para estudiar la función de genes (Waterhouse y Heliwell, 2003). La regulación de la expresión de genes es crucial para todas las formas de vida y garantiza la diferenciación celular, la

organogénesis, el desarrollo, la respuesta celular al estrés y al entorno, e incluso la muerte celular programada, entre otros procesos.

El silenciamiento génico es un mecanismo de vigilancia y de regulación génica que está presente en todos los organismos eucariotas a excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Baulcombe, 2004). El término silenciamiento génico mediado por RNA incluye una serie de procesos que operan a nivel transcripcional ('transcriptional gene silencing', TGS) o postranscripcional ('post-transcriptional gene silencing', PTGS), que tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA por pequeñas moléculas de RNA ('small RNAs', sRNAs). El TGS en plantas es el resultado de la metilación del DNA y la modificación de las histonas en una determinada región del genoma, y conduce a la formación de la heterocromatina en la que el DNA altamente condensado es inaccesible a la maquinaria transcripcional (compuesta esencialmente por factores de transcripción y RNA polimerasas). Por lo tanto, la formación de la heterocromatina produce la ausencia o reducción de la transcripción en el núcleo e impide la acumulación del correspondiente transcrito (habitualmente un mRNA) en el citoplasma, bloqueando su expresión (Fagard y Vaucheret, 2000). El PTGS, en cambio, impide la acumulación o traducción del mRNA en el citoplasma, anulando o atenuando de forma específica la síntesis de la proteína correspondiente (Kooter *et al.*, 1999; Fagard y Vaucheret 2000) (Fig. 5).

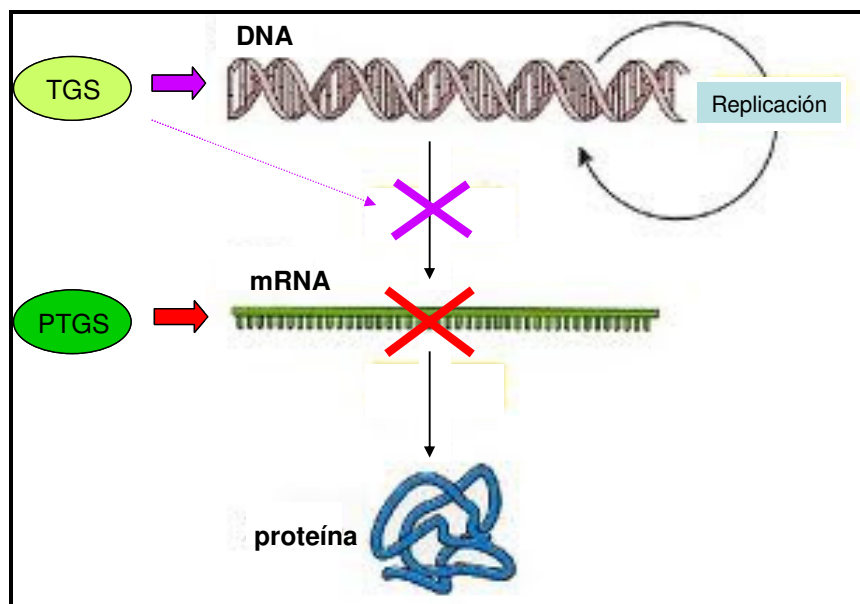


Figura 5. Niveles a los que actúa el silenciamiento mediado por RNA: transcripcional (TGS) y post-transcripcional (PTGS).

Estos procesos tienen distintas funciones que incluyen: i) la regulación de la estabilidad del genoma (Baulcombe, 2004; Wassenegger, 2005; Vaucheret, 2006), ii) el control de la expresión de genes relacionados con la proliferación y el desarrollo (Carrington y Ambros, 2003; Baulcombe, 2004; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007), y iii) la defensa frente a virus, transposones y transgenes (Voinnet, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2004; Li y Ding, 2005; Ding y Voinnet, 2007).

2.3. Mecanismos moleculares del silenciamiento génico

A nivel molecular el silenciamiento génico mediado por RNA se induce en la célula a partir de la formación de RNAs bicatenarios (dsRNA) o monocatenarios (ssRNA) con elevado contenido en estructura secundaria que pueden: i) tener origen endógeno, ii) ser las formas genómicas o los intermediarios replicativos de un virus, iii) haber sido introducidos artificialmente, o iv) provenir de la transcripción de un RNA antisentido. El RNA de doble cadena (perfecta o parcial) es reconocido por RNAsas de tipo III denominadas Dicer ('Dicer-like', DCLs, en plantas) (Fire *et al.*, 1998; Molnar *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009) y procesados en pequeños RNAs ('small RNAs', sRNAs) de 21 a 24 nt; el corte es asistido por una de las cinco proteínas de unión a dsRNA (HYL1, DRB2-5) que interactúan directamente con las DCL. Los sRNAs presentan dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3' de sus cadenas de ambas polaridades. Estas últimas son separadas por una helicasa y una de ellas (la cadena guía del sRNA) es incorporada en un complejo proteico efector, al que proporciona especificidad, que contiene un miembro de la familia Argonauta (AGO) (Höck y Meister, 2008; Vaucheret, 2008) y una proteína HSP90 ('heat shock protein'), que permite el mantenimiento de la conformación abierta de la proteína AGO de forma que puedan incorporarse los sRNA (Johnston *et al.*, 2010; Iki *et al.*, 2010; Iwasaki *et al.*, 2010). En el PTGS, el complejo efector denominado RISC ('RNA-induced silencing complex') (Hammond *et al.*, 2000) es guiado hasta un mRNA de secuencia complementaria al que se une, inhibiendo su traducción o degradándolo mediante la actividad RNasa H de la proteína AGO (Baumberger y Baulcombe, 2005). En el TGS, el complejo efector RITS ('RNA-induced transcriptional silencing complex') es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria al que se une, induciendo su metilación, bloqueando su transcripción y participando en la formación de la heterocromatina (Verdel *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2004; Matzke y Birchler, 2005; Wassenegger, 2005).

En plantas existe además una etapa de amplificación del silenciamiento génico que ocurre mediante la producción de dsRNAs adicionales derivados del ssRNA inductor. En esta amplificación interviene una RNA polimerasa dependiente de RNA ('RNA-dependent RNA polymerase', RDR) que, empleando ssRNA como molde, cataliza la síntesis de dsRNAs que son procesados por una DCL generando así los denominados pequeños RNAs interferentes ('small interfering RNAs', siRNAs) secundarios (Vaistij *et al.*, 2002). Las nuevas moléculas de dsRNA sintetizadas hacen que el silenciamiento persista incluso si la molécula que originó la señal se degrada (Voinnet y Baulcombe, 1997), y que la señal de silenciamiento génico pueda propagarse de célula a célula y de forma sistémica (Voinnet, 2005; Kalantidis *et al.*, 2008) (Fig. 6).

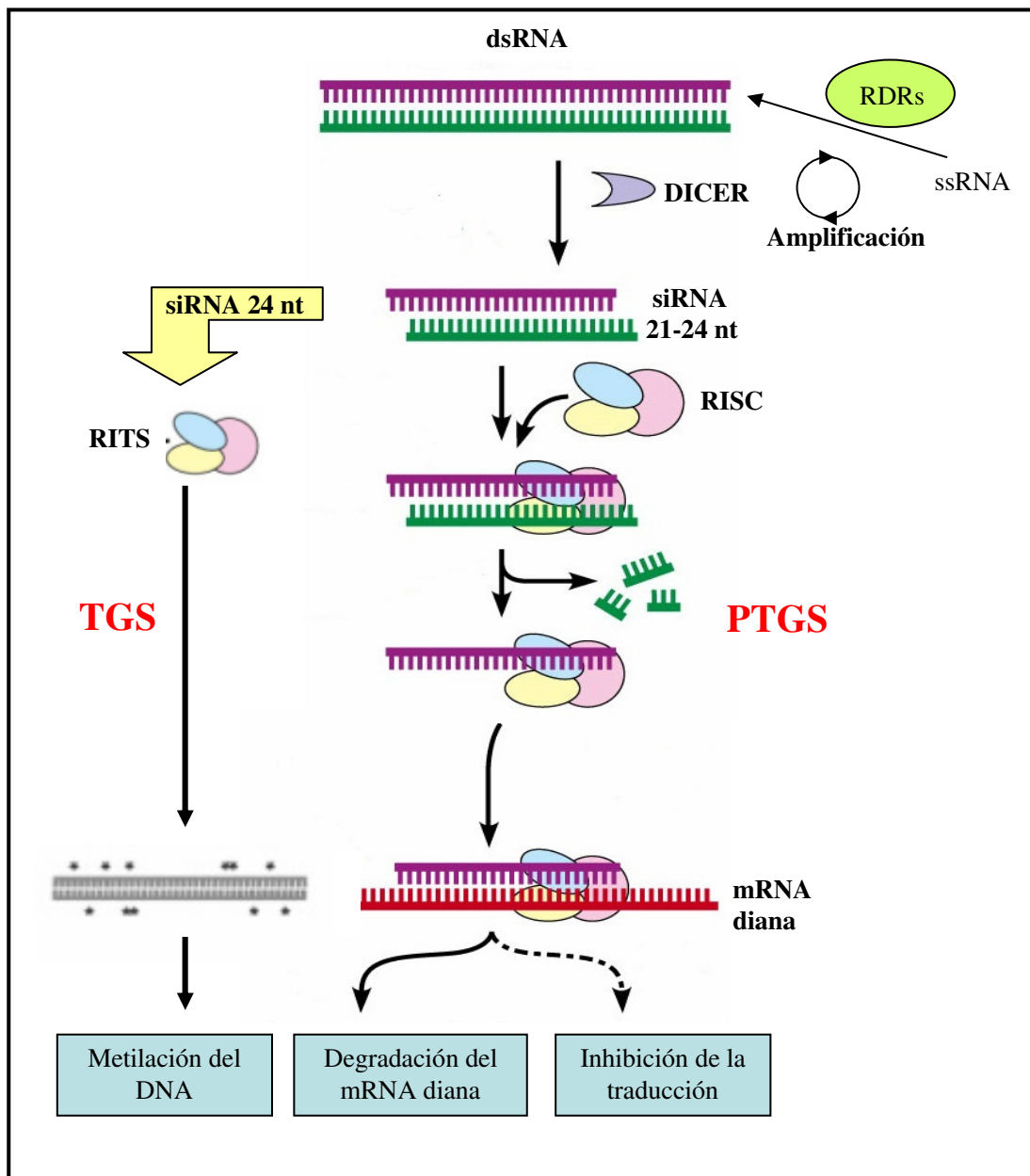


Figura 6. Etapas clave del silenciamiento génico mediado por RNA en plantas. La ruta se inicia con el procesamiento de los dsRNAs (de doble cadena perfecta o parcial) por una DCL, generándose siRNAs. Una de las cadenas del siRNA es reclutada por un complejo efector (RITS o RISC) para bloquear la transcripción, o inducir la degradación de un RNA de secuencia complementaria o impedir su traducción. La respuesta de silenciamiento génico puede amplificarse mediante la síntesis de siRNAs secundarios. La propagación de la señal de silenciamiento génico ocurre célula a célula y de forma sistémica.

2.4. Las distintas rutas del silenciamiento de RNA en plantas

En plantas se han identificado diversos tipos de sRNAs según su distinta biogénesis y función. Los sRNAs se clasifican fundamentalmente en dos grupos de acuerdo a la estructura de su RNA precursor: los siRNAs resultantes del procesamiento de dsRNAs o ssRNAs en horquilla con tallo perfectamente apareado, y los microRNAs (miRNAs) generados a partir de transcritos que adoptan un plegamiento en horquilla con tallo parcialmente apareado.

2.4.1. miRNAs

Los miRNAs, pequeños RNAs endógenos de usualmente 21-22 nt, se generan por transcripción de los genes MIR mediada por la Pol II, produciendo inicialmente miRNAs primarios (pri-miRNAs) con estructura de caperuza ('cap') y cola poliadenilada. Estos pri-miRNAs adoptan una estructura secundaria parcialmente plegada que es procesada para dar lugar a otro precursor de tipo horquilla (pre-miRNAs) de los que son finalmente excindidos los dúplex de miRNAs (Kim, 2005; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Chapman y Carrington, 2007) (Figura 7, panel A). DCL1 está involucrada en este mecanismo y actúa en el núcleo (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Papp *et al.*, 2003; Kurihara y Watanabe, 2004), en asociación con diversos factores, en unos centros de procesamiento nucleares denominados cuerpos D o cuerpos SmD3/SmB, donde se lleva a cabo la conversión de pri-miRNA a pre-miRNA (Kurihara *et al.*, 2006; Fang y Spector, 2007). Los miRNAs de plantas guían AGO1 a sus mRNAs diana (Llave *et al.*, 2002; Kasschau *et al.*, 2003). El complejo RISC, con AGO1 cargado por el miRNA, reconoce su mRNA complementario y, generalmente, dirige su corte entre las bases 10 y 11 contadas desde el extremo 5' del miRNA (Kidner y Martienssen, 2005). Uno de los fragmentos del mRNA resultantes tras el corte es degradado por la 5'-3' exoribonucleasa 4 (XRN4) en el citoplasma. AGO1 no solamente media el corte del mRNA homólogo al miRNA, sino que también puede reprimir su traducción (Brodersen *et al.*, 2008). Este tipo de inhibición de la expresión génica requiere una menor complementariedad de

secuencia entre el miRNA y el mRNA diana, cuyo sitio de reconocimiento está generalmente situado en la región 3' no traducible (3'-UTR). La represión de la traducción es el mecanismo de PTGS más frecuente en animales, pero en plantas se conocen menos ejemplos. En estas últimas, los miRNAs están implicados en la regulación postranscripcional de genes relacionados con procesos de proliferación y desarrollo de la hoja y la flor (Aukerman y Sakai, 2003; Emery *et al.*, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Chen, 2004; Juarez *et al.*, 2004a, 2004b; Baker *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005), la formación y desarrollo de raíces laterales (Rhoades *et al.*, 2002; Chen, 2005; Zhang *et al.*, 2006a), y la respuesta a estreses abióticos tan diversos como salinidad y frío (Sunkar y Zhu, 2004).

2.4.2. siRNAs

La segunda ruta es la mediada por los siRNAs, inducida por genes endógenos bajo el control de promotores invertidos, y por genes endógenos o transgenes con secuencias invertidas, así como por los dsRNAs de origen viral (como los intermediarios de replicación o los resultantes de la acción de una RDR endógena) (Chapman y Carrington, 2007). Estos dsRNAs pueden ser procesados por DCL2 o DCL4 a siRNAs de 22 y 21 nt, respectivamente, y ser incorporados a RISC para impedir la traducción o dirigir el corte de un RNA de secuencia complementaria (PTGS) (Deleris *et al.*, 2006), o por DCL3 para generar siRNAs de 24 nt que dirigen la metilación de DNAs de secuencia complementaria (TGS) (Xie *et al.*, 2004). Los siRNAs participan en: i) la formación y mantenimiento de la heterocromatina, ii) la defensa frente a virus, transgenes y transposones, iii) la regulación postranscripcional de ciertos transcritos sintetizados por genes de defensa frente a patógenos y de respuesta a estrés, y iv) la amplificación de la señal de silenciamiento génico (Chapman y Carrington, 2007).

2.4.2.1. trans-acting siRNAs (ta-siRNAs)

Los ta-siRNAs provienen de loci génicos definidos ('ta-siRNA-generating loci', TAS) y son sintetizados por la misma maquinaria de la ruta que media la biogénesis de los miRNAs (Vaucheret, 2006). Los genes TAS se transcriben en largos RNAs primarios que no codifican proteínas y cuya única función es ser los precursores de la producción de ta-siRNAs (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005). Su biogénesis se inicia con la transcripción mediada por la Pol II de los genes TAS, siendo los correspondientes RNAs reconocidos y cortados por miRNAs específicos, generando transcritos aberrantes que a su

vez son reconocidos y transcritos por el complejo RDR6/SGS3 para formar un dsRNA. Este dsRNA es posteriormente cortado secuencialmente por DCL4 generando una serie de siRNAs de 21 nt a los que se denomina ta-siRNAs (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Gascioli *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005). Si bien en general se acepta que este proceso ocurre en el núcleo (ya que RDR6 y DCL4 tienen localización nuclear), existen datos que cuestionan que la biogénesis de los ta-siRNAs esté restringida exclusivamente a este orgánulo (Hiraguri *et al.*, 2005; Luo y Chen, 2007). Una vez generados, los ta-siRNAs son reclutados por RISC y median el silenciamiento de distintos mRNAs, la mayoría de ellos relacionados con el desarrollo de la planta (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004) (Figura 7, panel B). El término ‘trans-acting’ les fue asignado por este motivo, pues sus mRNAs diana son diferentes tanto en secuencia como en origen de los genes TAS. En *A. thaliana* se han identificado ocho loci TAS que se agrupan en cuatro familias (TAS1-4) (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Rajagopalan *et al.*, 2006). Las dianas de los ta-siRNAs son mRNAs de genes que codifican factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF3-4), factores de transcripción MYB, y proteínas de función desconocida (Adenot *et al.*, 2006; Fahlgren *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2006; Rajagopalan *et al.*, 2006).

2.4.2.2. siRNAs derivados de transcritos naturales antisentido (nat-siRNAs)

Los transcritos naturales antisentido (‘natural antisense transcripts’, NATs), que se originan a partir de genes endógenos de la planta, codificantes o no, comparten complementariedad de secuencia con otros RNAs. Hay dos subclases, cis-NATs y trans-NATs, dependiendo de si la hebra complementaria se encuentra en el mismo locus (cis) o en otro locus del genoma (trans). Los cis-NATs suelen tener una gran complementariedad entre las hebras sentido y antisentido, mientras que los trans-NATs suelen tener una complementariedad imperfecta (Jin *et al.*, 2008). La biogénesis de los nat-siRNAs se produce en dos fases. En la fase de iniciación el dsRNA formado por los transcritos cis-antisentido (uno constitutivamente expresado y el otro expresado en respuesta a algún tipo de estrés) es procesado en nat-siRNAs primarios por DCL1 o DCL2. Estos nat-siRNAs primarios actúan sobre el transcrito que se expresa de forma constitutiva. La siguiente fase ocurre de manera similar como en los tasiRNAs: el transcrito cortado es convertido en dsRNA por la acción del complejo RDR6/SGS3 y procesado por DCL1 para producir nat-siRNAs secundarios que a su vez actúan sobre el transcrito constitutivo silenciándolo (Figura 7, panel C). El genoma de *A.*

thaliana contiene al menos mil genes que podrían tener una configuración en antisentido cis (Borsani *et al.*, 2005). La ruta de los nat-siRNAs podría funcionar como un mecanismo de adaptación o protección frente a estreses tanto bióticos como abióticos (Xie y Qi, 2008).

2.4.2.3. siRNAs asociados a transposones o secuencias repetidas (ra-siRNAs)

En muchos eucariotas, la metilación del DNA dirigida por RNA ('RNA directed DNA methylation', RdDM), es frecuentemente asociada al TGS (Mette *et al.*, 2000; Onodera *et al.*, 2005) y se considera un proceso fundamental para mantener la estabilidad del genoma (Moazed, 2009; Feng *et al.*, 2010). Un componente del RdDM, muy relevante en *A. thaliana*, son los pequeños RNAs interferentes derivados de transposones o secuencias repetidas, llamados ra-siRNA ('repeat associated siRNA'); tienen localización nuclear y un tamaño de 24 nt, y unidos a proteínas AGOs dirigen la metilación del DNA (Cao *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005; Moazed, 2009; Feng *et al.*, 2010). En *A. thaliana* el DNA metilado sirve como molde para la transcripción de RNA aberrantes por la RNA polimerasa IV (Pol IV), que mediante la intervención de RDR2, se convierten en dsRNAs sobre los que actúa DCL3 produciendo una serie de dúplex de ra-siRNAs de 24 nt (Xie *et al.*, 2004; Herr *et al.*, 2005; Kanno *et al.*, 2005; Onodera *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2009). Sobre los ra-siRNAs actúa a continuación HEN1 metilándolos, siendo finalmente cargada una única hebra del dúplex por AGO4, AGO6 o AGO9 (Zilberman *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2007; Havecker *et al.*, 2010). Estas AGO cargadas, mediante la acción de una metiltransferasa 2 (DRM2), catalizan la metilación específica de secuencia del DNA (Cao *et al.*, 2003; Zilberman *et al.*, 2003; Kanno *et al.*, 2005; El-Shami *et al.*, 2007; Wierzbicki *et al.*, 2008) (Figura 7, panel D). En la RdDM están involucrados otros factores [DNA metiltransferasa, Metiltransferasa 1 (MET1) y Cromometilasa 3 (CMT3)] responsables del mantenimiento de la metilación (Eamens *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2012).

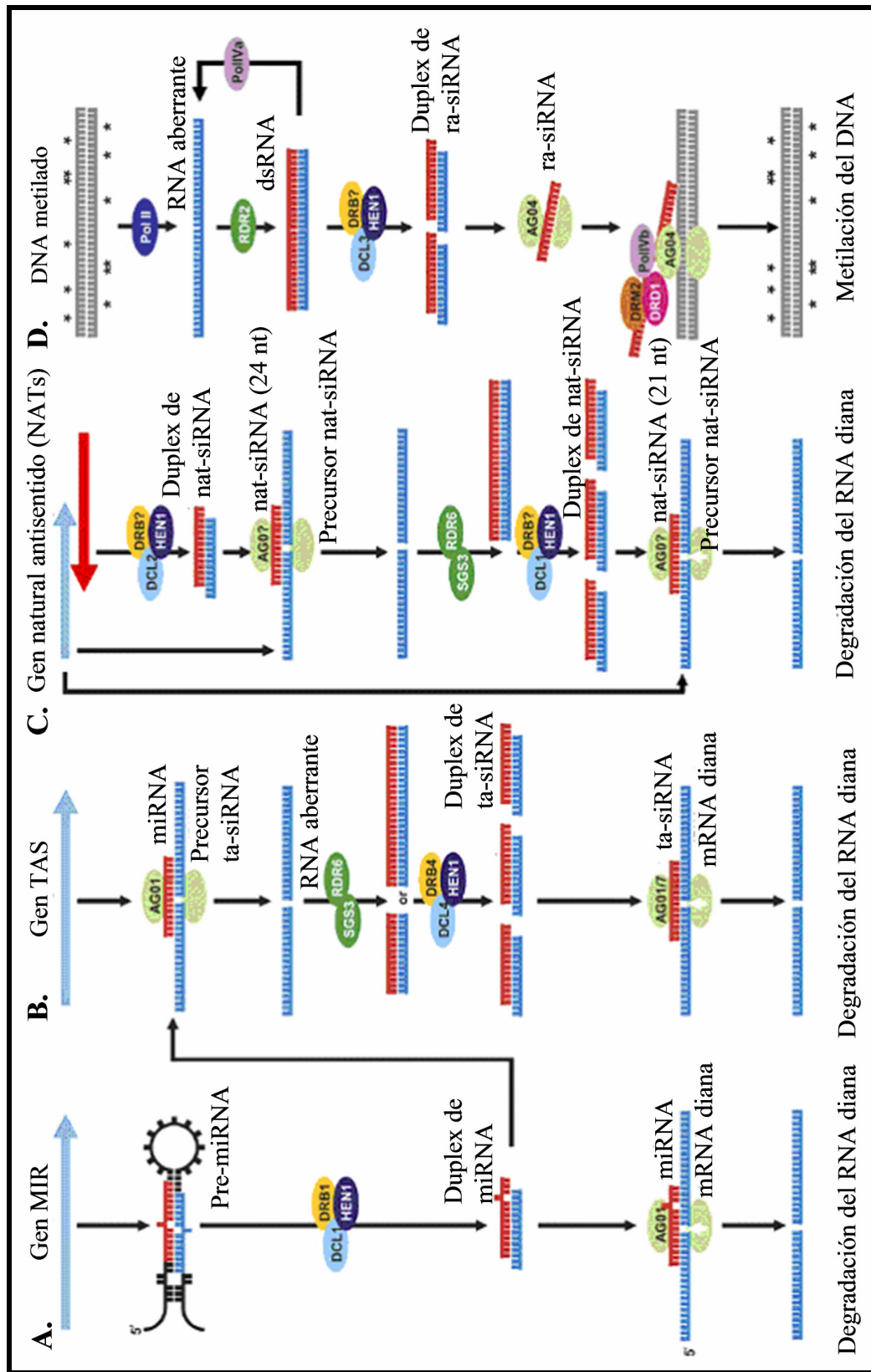


Figura 7. Representación de rutas del silenciamiento mediado por RNA en *A. thaliana*. Esquema de la producción de sRNAs, que se clasifican en microRNAs (miRNAs) (A) y siRNAs: ta-siRNAs (B), nat-siRNAs (C) y ra-siRNAs (D). (Reproducido de Eamens *et al.*, 2008).

2.5. Componentes enzimáticos principales de la maquinaria del silenciamiento

2.5.1. Las proteínas DCL

Las enzimas DCL descritas en plantas son endoribonucleasas de tipo III, de ~200 kDa, que procesan dsRNA y pri-miRNA en sRNAs bicatenarios de entre 21 y 24 nt con extremos 5' fosfomonoéster (5'-P) y 3' hidroxilo (3'-OH), con dos nucleótidos protuberantes en 3'. El término Dicer fue propuesto cuando se descubrió la actividad “cortadora” (‘dicing’) de estas enzimas sobre dsRNAs (Bernstein *et al.*, 2001). En plantas, insectos, protozoos y hongos como *Neurospora crassa* o *Magnaporthe oryzae*, dichas enzimas forman pequeñas familias génicas compuestas por 2, 4 o 5 miembros. En contrapartida, solamente se ha descrito una proteína Dicer en vertebrados, nemátodos, *Schizosaccharomyces pombe*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Caenorhabditis elegans* (Chapman y Carrington, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Las proteínas DCLs contienen seis dominios (Figura 8): DExD helicasa y ATPasa/helicasa-C, Duf283 (domain of unknown function), PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), RNasa III (a y b) y dsRBD (‘double stranded RNA-binding domains’) (Finnegan *et al.*, 2003; Margis *et al.*, 2006). Los dominios PAZ, RNasa III y dsRBD permiten la unión y digestión del dsRNA. El dominio PAZ se encuentra directamente conectado al dominio RNasa IIIa por una hélice alfa y puede unirse específicamente al final de un dsRNA con dos bases libres en 3' (Macrae *et al.*, 2006) o a un ssRNA (Kini y Walton, 2007). Se ha propuesto (Zhang *et al.*, 2004) que Dicer actuaría a través de la dimerización intramolecular de sus dos dominios RNasa III. El dominio RNasa III se une directamente a la caja PIWI de las proteínas AGO. El dominio dsRBD discrimina entre distintos sustratos de RNA y la consiguiente incorporación de complejos efectores (Margis *et al.*, 2006), mientras que el dominio Duf283 parece estar relacionado con la selección de la hebra que será cargada en las proteínas AGO (Dlakic, 2006). El tamaño del sRNA generado por las diferentes DCLs viene determinado por la longitud y el ángulo de la hélice alfa que conecta los dominios PAZ y RNasa III (Macrae *et al.*, 2006).

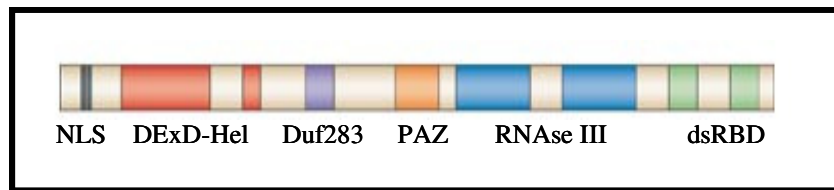


Figura 8. Dominios y estructura de la proteína DCL1 de *A. thaliana*. Los dominios de las proteínas Dicer son: DExD y ATPasa/helicasa-C, Duf283, PAZ, RNasa III (a y b) y dsRBD. NLS: señal de localización nuclear. Entre los dominios PAZ y RNasa III se localiza la hélice alfa que determina el tamaño de corte de Dicer (Reproducido de Chapman y Carrington, 2007).

En *A. thaliana* se han descrito cuatro proteínas DCLs (DCL1 a DCL4), con redundancia funcional (Deleris *et al.*, 2006; Henderson, 2006) y localización nuclear, excepto DCL2 que es citoplasmática (Moissard y Voinnet, 2006). DCL1 está implicada en la biogénesis de los miRNAs de 21-22 nt en el núcleo (Voinnet, 2009) y de los siRNAs de tamaño similar (Meng *et al.*, 2014). DCL4 está involucrada en la defensa antiviral y genera siRNAs de 21 nt (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005) que regulan la expresión de algunos genes endógenos (ta-siRNAs) y los transgenes que inducen RNAi (Dunoyer *et al.*, 2005). DCL3 produce siRNAs de 24 nt, los ra-siRNA que dirigen la metilación del DNA y la formación de heterocromatina (Xie *et al.*, 2004; Raja *et al.*, 2014). Finalmente, DCL2 sintetiza siRNAs de 22 nt como los nat-siRNAs a partir de los ‘natural antisense transcripts’ implicados en respuestas a estrés (Xie *et al.*, 2004; Deleris *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que las cuatro DCLs están implicadas en el silenciamiento antiviral y generan siRNA virales (Dunoyer *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; García-Ruiz *et al.*, 2010) y viroidales (ver más abajo).

2.5.2. Las proteínas AGO

Las proteínas de esta familia son el componente catalítico de los complejos RISC y RITS, y tienen un papel importante en la ruta del silenciamiento génico mediado por RNA. Aunque la función efectora de las proteínas AGOs está altamente conservada entre los eucariotas, el número y la diversidad de las AGOs codificadas en especies diferentes varía ampliamente (Tolia y Joshua-Tor, 2007; Hutvagner y Simard, 2008; Vaucheret, 2008): *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) expresa 27 AGOs, *Drosophila melanogaster* cinco, *Homo sapiens* ocho y la levadura *S. pombe* solo una. En *A. thaliana* y *Oryza sativa* la familia de las AGOs está

formada por 10 y 18 miembros, respectivamente (Höck *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Vaucheret, 2008).

2.5.2.1. Estructura, dominios y actividad

Las AGOs son proteínas de entre 90 y 100 kDa, con un dominio variable N-terminal y unos dominios conservados: PAZ, unido al dominio N-terminal a través de la región enlazadora ('linker') L1, y el C-terminal PIWI unido al dominio MID ('middle'), a través de la región enlazadora L2 (Vaucheret, 2008; Jinek y Doudna, 2009) (Fig. 9 a y b).

El dominio N-terminal permite la separación de la doble cadena de RNA formada por el sRNA y el RNA de secuencia complementaria, al que se une. El dominio MID forma un "bolsillo" de unión que permite el reconocimiento del grupo fosforilo presente en 5' del sRNA (Ma *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2010), mientras que el dominio PAZ reconoce el extremo 3' (Tolia y Joshua-Tor, 2007; Hutvagner *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Parker, 2010). El dominio PIWI adopta una estructura plegada similar a la de las RNasas H y tiene potencial actividad endonucleolítica asociada a un sitio activo que contiene la tríada Asp-Asp-His (DDH) (Rivas *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010). Algunas proteínas AGOs median el corte de sus mRNAs diana en el centro de la secuencia del siRNA o miRNA que forma parte del complejo RISC (Fig. 9c). En *A. thaliana*, por ejemplo, de las 10 proteínas AGO descritas solo algunas (AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 y AGO10) poseen capacidad de corte confirmada (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Montgomery *et al.*, 2008; Carbonell *et al.*, 2012).

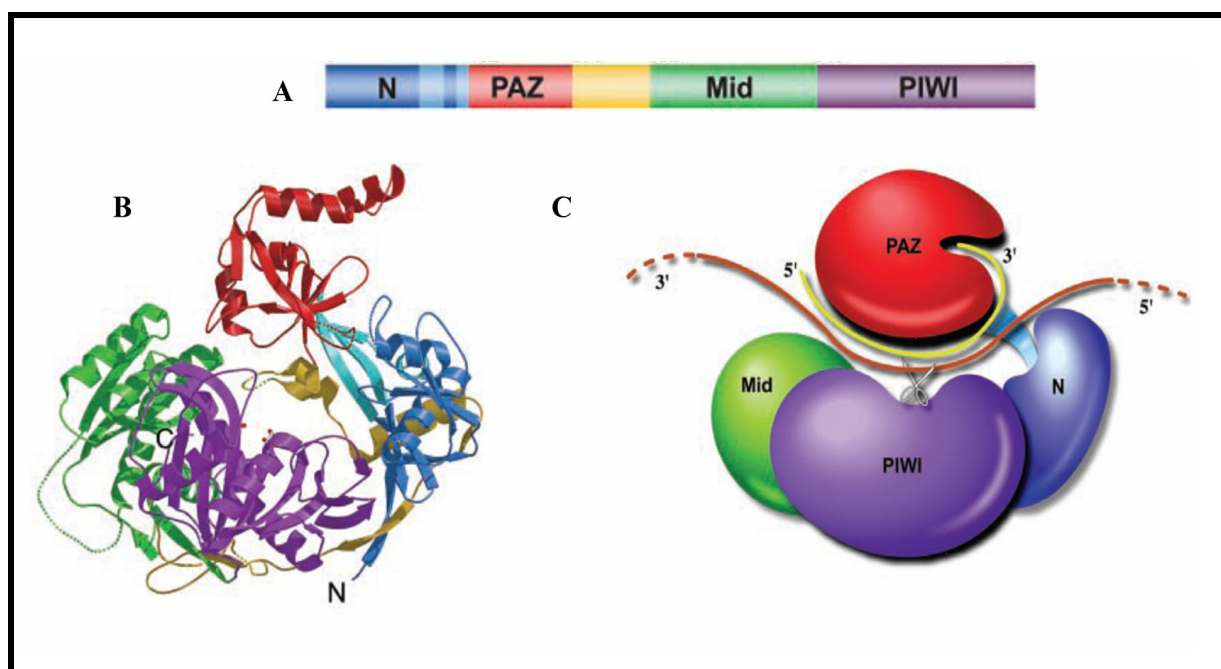


Figura 9. Dominios y estructura de las proteínas AGO. **(A)** Esquema de los dominios. **(B)** Estructura tridimensional de la proteína AGO de *Pyrococcus furiosus*. El dominio amino-terminal (N) (azul marino) se une al PAZ (rojo) a través de la región L1 (azul). La L2 (amarillo) une el dominio PAZ con el MID (verde) al que sigue el dominio PIWI (violeta), en la región carboxi-terminal (C) de la proteína. **(C)** Reproducción esquemática del mecanismo de acción de las proteínas AGO. El dominio PAZ reconoce el extremo 3' del sRNA mientras el dominio MID reconoce el 5'. El N-terminal separa la doble cadena de RNA formado por el sRNA y el RNA de secuencia complementaria y finalmente el dominio PIWI media la inactivación del mRNA diana, inhibiendo su traducción o degradándolo. (Reproducido de Song *et al.*, 2004).

2.5.2.2. Papel de las AGO de *A. thaliana*

Las proteínas AGO están muy conservadas entre las plantas y los animales (Catalanotto *et al.*, 2000; Fagard *et al.*, 2000). Análisis filogenéticos de las 10 proteínas AGO de *A. thaliana* han permitido dividir las en tres grupos diferentes: AGO1/AGO5/AGO10, AGO2/AGO3/AGO7 y AGO4/AGO6/AGO8/AGO9 (Morel *et al.*, 2002; Vaucheret, 2008). La distribución de las 10 proteínas en los diferentes grupos se basa en la homología de secuencia aminoacídica y no conlleva necesariamente similitud en la actividad o en el papel que desempeñan. Se han identificado varios casos de miembros del mismo grupo con redundancia funcional: por ejemplo entre AGO1 y AGO10 (Mallory *et al.*, 2009), y entre AGO4, AGO6 y AGO9 (Havecker *et al.*, 2010).

Además, mediante experimentos de inmunoprecipitación, se ha demostrado que las AGOs unen preferentemente sRNAs de un cierto tamaño y/o nucleótido 5' terminal (Kim, 2008; Mi

et al., 2008; Takeda *et al.*, 2008; Havecker *et al.*, 2010). AGO1 une pequeños RNAs de 21 y 22 nt (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Montgomery *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011) con extremo 5' terminal U (Mi *et al.*, 2008), mientras que AGO2 une siRNAs de 21 nt con extremo 5' terminal A (Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). AGO5 une selectivamente siRNAs de 24 nt con C en el extremo 5' terminal (Takeda *et al.*, 2008), mientras que AGO4, AGO6 y AGO9 unen preferentemente siRNAs de 24 nt con A en el extremo 5' terminal (Zheng *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2008; Havecker *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Los datos a este respecto de AGO3, 7, 8 y 10 son escasos (Tabla 1).

Proteína Argonauta	Grupo	Tamaño (aa)	Extremo 5'-terminal del sRNA	Tamaño sRNA (nt)
AGO1	1/5/10	1048	U	21-22
AGO2	2/3/7	1014	A	21
AGO3	2/3/7	1194		
AGO4	4/6/8/9	924	A	24
AGO5	1/5/10	997	C	24
AGO6	4/6/8/9	878	A	24
AGO7	2/3/7	990		
AGO8	4/6/8/9	850		
AGO9	4/6/8/9	896	A	24
AGO10	1/5/10	988		

Tabla 1. Resumen del tamaño (nt) y de la naturaleza del nucleótido localizado en el extremo 5' de los sRNAs que se unen a las proteínas AGO de *A. thaliana*, determinados por inmunoprecipitación.

2.5.2.2.1. Los componentes del grupo 1: AGO1, AGO5 y AGO10

En *A. thaliana*, AGO1 tiene un papel importante en la ruta de los miRNAs y está implicada en el PTGS de los transgenes, y de los RNAs diana de los ta-siRNAs y los siRNAs virales (Baumberger y Baulcombe, 2005; Qi *et al.*, 2005; Vazquez, 2006; Zhang *et al.*, 2006a; Montgomery *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Vaucheret, 2008; Azevedo *et al.*, 2010). Estudios con plantas mutantes en AGO1 (*argonauta1*, *ago1*) han mostrado que la acumulación de miRNA se ve reducida, mientras los niveles de sus mRNAs diana aumentan respecto a las plantas silvestres (Vaucheret *et al.*, 2004). La deficiencia de AGO1 (*ago1*) en *A. thaliana* produce retardos en el desarrollo, con un fenotipo típico pronunciado en comparación con otros mutantes deficientes en otras proteínas AGO, que

presentan defectos limitados de desarrollo (como *ago7* y *ago 10*) o muy leves (como *ago2*, *ago3*, *ago4*, *ago5*, *ago6* y *ago9*). El nivel de expresión de AGO1 en plantas está controlado por un miRNA (miR168) muy probablemente a través de la inhibición de la traducción de su mRNA (Rhoades *et al.*, 2002; Vaucheret *et al.*, 2004; Vaucheret, 2009; Varallyay *et al.*, 2010). Existen además otros factores de regulación del nivel de AGO1: i) la acción de siRNAs derivados del gen AGO1 sobre su mRNA (Mallory y Vaucheret, 2009), ii) la estabilización post-transcripcional de miR168 mediada por AGO1 y, iii) la co-regulación transcripcional de los genes AGO1 y del precursor del miR168 (MIR168) (Vaucheret *et al.*, 2006). Estos mecanismos permiten que los niveles de AGO1 permanezcan constantes y, a su vez, garantizan el normal desarrollo de la planta. AGO1 es uno de los principales componentes del sistema de defensa antiviral de las plantas basado en el silenciamiento del RNA (ver más abajo). Estudios en *A. thaliana* han mostrado que AGO1 se expresa en tejidos meristemáticos y vasculares y que está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma; de hecho, cuando actúa en el silenciamiento de los ribovirus su localización es preferentemente citoplasmática (Vaucheret *et al.*, 2004). Otros estudios han revelado su localización nuclear, alrededor de pequeños cuerpos nucleares, llamados cuerpos D ('D-bodies' de 'nuclear dicing bodies') (Fang y Spector, 2007; Song *et al.*, 2007).

A diferencia de AGO1, AGO5 se expresa en tejidos reproductivos (Schmid *et al.*, 2005) y se acumula en el citoplasma de las células espermáticas, en el polen maduro y en los tubos polínicos en crecimiento (Borges *et al.*, 2011). En otras células AGO5 puede localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma y une sRNAs de diferentes tamaño, entre ellos al miR169 (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Aunque se desconoce la función del miR169 en *A. thaliana*, este miRNA, altamente conservado, está implicado en el desarrollo floral en petunia y *Anthirrinum majus* (Combiér *et al.*, 2006; Cartolano *et al.*, 2007).

Finalmente, AGO10 desempeña un papel crítico en el mantenimiento del estadio indiferenciado de las células madre en el desarrollo de meristemas apicales ('SAM', de 'shoot apical meristem') (Moussian *et al.*, 1998; Lynn *et al.*, 1999), y actúa como regulador del mantenimiento del SAM mediante su interacción con algunos miRNA como miR165 y miR166 (Liu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011), por los que AGO10 tiene mayor afinidad que AGO1. Además, cuando no hay interacción entre los miR165 y miR166 con AGO10, las plantas presentan síntomas característicos de SAM defectuoso. Alelos mutantes de AGO10 (*pinhead* y *zwille*) presentan síntomas de desarrollo anormal del SAM. AGO10 y AGO1 tienen una elevada similitud de secuencia por lo que es posible que AGO10 desempeñe una función parecida a la de AGO1. De hecho, un estudio ha mostrado que el doble mutante

ago1:ago10 es letal para los embriones, sugiriendo la posible redundancia funcional entre las dos proteínas durante el desarrollo post-embriónico (Lynn *et al.*, 1999).

2.5.2.2.2. Los componentes del grupo 2: AGO2, AGO3 y AGO7

AGO2 y AGO3 tienen una elevada similitud de secuencia aminoacídica en *A. thaliana* y, consecuentemente, es posible que las dos tengan un papel similar en el silenciamiento génico mediado por RNA. Estas proteínas se expresan pronunciadamente durante el desarrollo de las semillas y las silicuas, mientras que tienen niveles más bajos de expresión en hojas senescentes y flores (Vaucheret, 2008). AGO2 y AGO3 pueden localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma (Takeda *et al.*, 2008). Al igual que AGO1, AGO2 también está involucrada en el PTGS de los siRNAs virales (ver más abajo).

AGO7 está involucrada en la ruta de síntesis de los ta-siRNA. Experimentos de inmunoprecipitación han mostrado que AGO7 une específicamente el miR390 (Montgomery *et al.*, 2008), que guía el corte del RNA precursor TAS3. De los ta-siRNAs, solamente el que deriva del precursor TAS3 controla el desarrollo de las plantas desde el estadio juvenil hasta el adulto (Adenot *et al.*, 2006; Fahlgren *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2006). AGO7 se expresa en células y tejidos que rodean el SAM (Montgomery *et al.*, 2008). Mutantes de AGO7 (*ago7*) manifiestan defectos en la morfogénesis floral, característica fenotípica asociada a plantas en que la biogénesis de TAS3 no es funcional (Adenot *et al.*, 2006; García *et al.*, 2006).

2.5.2.2.3. Los componentes del grupo 3: AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9

AGO4 desempeña un papel importante en el TGS, une los ra-siRNA de 24 nt, y además está involucrada en la RdDM y la modificación de la cromatina (Zilberman *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). AGO4 se localiza exclusivamente en el núcleo, donde está asociada con los cuerpos de Cajal y los cuerpos AB ('AB-bodies') (Li *et al.*, 2006, 2008); en el citoplasma solamente se une a la cadena guía de los siRNA antes de desplazarse al núcleo (Miyoshi *et al.*, 2010). En plantas de *A. thaliana* infectadas con virus, los siRNA de 24 nt se acumulan a niveles detectables aunque más bajos que los siRNA de 21 nt. Plantas mutantes *ago4* son susceptibles a un patógeno bacteriano como *Pseudomonas syringae* (Agorio y Vera, 2007), lo que sugiere que AGO4 puede desempeñar un papel de defensa contra patógenos específicos.

AGO6 tiene una actividad parcialmente redundante con AGO4, y las dos desempeñan sus funciones en tejidos parecidos y en el mismo estadio de desarrollo. Esta proteína está involucrada en el TGS dirigido por RNA en los meristemos apicales (de tallos y raíces) (Havecker *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2007) y une los ra-siRNA (Eun *et al.*, 2011). AGO6 se localiza predominantemente en el núcleo, en consonancia con la función que desempeña en la metilación del DNA y el TGS (Zheng *et al.*, 2007).

AGO8 y AGO9 tienen una secuencia aminoacídica parecida y posiblemente desempeñen funciones similares. En *A. thaliana*, el mRNA de AGO8 se expresa a niveles muchos más bajos que el de AGO9. Los mutantes *ago8* y *ago9* no presentan ningún defecto en el desarrollo y acumulan miRNAs, ta-siRNAs y siRNAs a niveles parecidos a los de plantas silvestres. La proteína AGO9 se expresa en los óvulos, en las anteras y en la cubierta de la semilla (Olmedo-Monfil *et al.*, 2010; Calarco y Martienssen, 2011).

2.5.3. Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs)

Otros componentes de la maquinaria de silenciamiento son las RDRs, que en plantas desempeñan un papel importante en la etapa de amplificación del silenciamiento génico generando los siRNAs secundarios (Vaistij *et al.*, 2002). Estas enzimas actúan sobre los RNAs derivados de virus, transposones, y otros percibidos por la célula como aberrantes o extraños (Voinnet, 2008). El genoma de *A. thaliana* codifica seis RDRs (RDR1, RDR2, RDR3a, RDR3b, RDR3c y RDR6) que participan en las rutas de silenciamiento génico (Wassenegger y Krczal, 2006). Las RDR3a, RDR3b y RDR3c comparten un motivo aminoacídico DFDGD en el dominio catalítico, que define este grupo filogenético. Por contra, RDR1, RDR2 y RDR6 comparten el motivo catalítico DLDGD canónico en el dominio C-terminal (Wassenegger y Krczal, 2006). Estudios *in vitro* con RDRs purificadas a partir de tomate (RDR1) y *A. thaliana* (RDR6), han mostrado que estas enzimas catalizan la síntesis de un RNA copia (cRNA) a partir de un ssRNA o de un ssDNA, pero no de un dsRNA o un dsDNA (Schiebel *et al.*, 1993; Curaba y Chen, 2008). Las RDRs actúan de forma independiente de secuencia y son muy procesivas, iniciando la síntesis del RNA complementario desde el extremo 3' del molde y permaneciendo ambos unidos formando largos dsRNAs *in vitro*. Todas las RDRs de plantas comparten una gran similitud en la región C-terminal, siendo dicha región suficiente para sus funciones *in vitro* (Makeyev y Grimes, 2004).

Los efectos de las RDRs están íntimamente ligados a las funciones de DCL y AGO. RDR1 está inducida por ciertas infecciones virales (Zabel *et al.*, 1974; Dorssers *et al.*, 1984),

viroidales (Khan *et al.*, 1986) y por tratamientos con ácido salicílico (Xie *et al.*, 2001), y participa en la defensa frente a virus (Xie *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). RDR2 interviene en la metilación del DNA, en la formación de heterocromatina (Chan *et al.*, 2004) y en el TGS de transposones, donde necesita la actividad de DCL3 y AGO4 (Dalmay *et al.*, 2000). Finalmente, RDR6 participa en la respuesta de amplificación del silenciamiento génico mediado por RNA de transgenes (Béclin *et al.*, 2002), en la biogénesis de los ta-siRNAs (Vázquez *et al.*, 2004) y en mecanismos de defensa contra viroides (Di Serio *et al.*, 2010) y virus requiriendo, en este último caso, la actividad de DCL4 y AGO1 (Mourrain *et al.*, 2000; Dalmay *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005).

2.6. Papel del silenciamiento del RNA en la defensa antiviral

Los virus son patógenos intracelulares obligados, capaces de transmitirse de un organismo huésped a otro y de utilizar la maquinaria celular del huésped que infectan para replicarse, causándole alteraciones en el metabolismo y el desarrollo. En las plantas, una de las funciones del silenciamiento mediado por RNA es la defensa frente a virus. Los dsRNAs derivados de virus pueden formarse por distintos mecanismos. En aquellos virus cuyo genoma está constituido por ssRNA, como consecuencia de la replicación o como resultado de que ciertas regiones del genoma poseen un alto grado de autocomplementariedad. En virus cuyo genoma está constituido por un DNA circular, por apareamiento de algunos de sus mRNAs transcritos en orientaciones complementarias. Además, los RNAs virales pueden generar dsRNAs mediante la actividad de RDRs del huésped que los reconoce como RNAs aberrantes.

AGO1 es un componente clave en la defensa antiviral de las plantas como sugieren las siguientes observaciones: i) una de manera específica siRNAs de origen viral (Zhang *et al.*, 2006a), ii) supresores de silenciamiento génico diferentes codificados por fitovirus son capaces de interactuar directamente con AGO1 e inhibir su función antiviral (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2010; Csorba *et al.*, 2010), iii) plantas mutantes en AGO1 (*ago1*) resultan altamente susceptibles a diferentes virus, como los polerovirus (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Giner *et al.*, 2010) y el cucumber mosaic virus (CMV) (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008). Estudios recientes han mostrado la inducción del miR168 y del mRNA de AGO1 en plantas infectadas con diversos virus (Zhang *et al.*, 2006a; Csorba *et al.*, 2007; Havelda *et al.*, 2008; Varallyay *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2011); sin embargo, los niveles de la proteína Ago1

disminuyen debido muy probablemente a la represión de la traducción de su mRNA (Varallyay *et al.*, 2010). La inducción del mRNA de AGO1 forma parte del sistema de defensa antiviral de la planta, mientras que la inducción del miR168 mediada principalmente por los supresores de silenciamiento de los virus, y el consecuente control del nivel de la proteína a través de la represión de la traducción, forman parte de la estrategia de contra-defensa viral (Varallyay *et al.*, 2010; Varallyay y Havelda, 2013; Varallyay *et al.*, 2014).

Otras proteínas AGO también están implicadas en la defensa antiviral basada en el mecanismo de PTGS, como por ejemplo AGO5 y AGO2 (Morel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006a; Qu *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010). AGO5, al igual que AGO1, une los siRNAs del CMV (Takeda *et al.*, 2008), mientras que AGO2 de *N. benthamiana* actúa en el silenciamiento de un toombusvirus, tomato bushy stunt virus (TBSV) (Scholthof *et al.*, 2011) y su papel es comparable al de AGO2 de *A. thaliana* que es capaz de degradar el RNA del turnip crinkle virus (TCV), del CMV (Harvey *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011) o del potato virus X (PVX) (Jaubert *et al.*, 2011). Plantas de *A. thaliana* mutantes en AGO2 (*ago2*) infectadas con TCV o CMV muestran síntomas intensos, pero sólo efectos transitorios sobre la acumulación del virus (Harvey *et al.*, 2011). Las plantas mutantes en AGO7 (*ago7*) son susceptibles a la infección de TCV (Qu *et al.*, 2008), lo que sugiere un papel antiviral también para esta proteína.

2.6.1. Supresión viral del silenciamiento mediado por RNA

Las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa que inactiva el RNA viral. Sin embargo, muchos virus codifican proteínas que inhiben este mecanismo a distintos niveles, atenuando así la defensa del huésped frente a la infección viral. Las proteínas supresoras del PTGS tienen un origen evolutivo distinto, aunque comparten una función en común que es contrarrestar este mecanismo de defensa de la planta. Muchos virus de plantas codifican un supresor del silenciamiento y en algunos casos más de uno, como ocurre con los géneros *Closterovirus*, *Crinivirus* y *Begomovirus* (Díaz-Pendón y Ding, 2008; Burguán y Havelda, 2011). Los supresores de silenciamiento son muy diversos en secuencia, estructura y, en su caso, actividad catalítica. La mayoría de estas proteínas suelen ser determinantes de patogenicidad del virus y están relacionadas con la replicación y el movimiento del mismo dentro de la planta, o con la regulación de la traducción. El mecanismo molecular de la supresión del silenciamiento por proteínas virales se ha determinado en un número limitado de casos, pero se sabe que es muy específico y que actúa a distintos niveles de la ruta del silenciamiento (Csorba *et al.*, 2010). Algunos supresores bloquean etapas claves del

silenciamiento, ya que afectan a la actividad de DCL o RISC, mientras que otros operan en etapas aparentemente menos importantes (Ding y Voinnet, 2007). La principal estrategia de supresión del silenciamiento consiste en secuestrar tanto dsRNAs como siRNAs, impidiendo su funcionalidad o estabilidad. De hecho, esta actividad se encuentra en supresores de miembros de los géneros *Tospovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Tombusvirus*, *Closterovirus*, *Vitivirus*, *Tobamovirus* y *Hordeivirus* (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006; Cuellar *et al.*, 2009). Ciertos supresores no afectan al silenciamiento intracelular pero suprimen el silenciamiento a larga distancia (Yaegashi *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2004). Además, existen supresores que pueden actuar en más de una etapa del silenciamiento, por ejemplo inhibiendo la actividad RISC y evitando la propagación de la señal de silenciamiento sistémica (Zhang *et al.*, 2006b). Una diana principal de los supresores virales en plantas es AGO1, para inactivar al complejo RISC (Li y Ding, 2006; Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010; Shimura y Pantaleo, 2011). Finalmente, también se han descrito supresores que actúan sobre las RDRs para impedir la formación de dsRNAs (Glick *et al.*, 2009).

2.7. Los viroides y los pequeños RNAs derivados de viroides (vd-sRNAs)

Al igual que ocurre con los virus, las plantas parecen defenderse de los viroides mediante un mecanismo de PTGS. Las infecciones producidas por viroides de ambas familias generan sRNAs viroidales (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002; Carbonell *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2012a). Más concretamente, mediante técnicas de hibridación molecular de tipo Northern, y por secuenciación convencional y masiva se han detectado sRNAs viroidales ('viroid-derived small RNAs', vd-sRNAs) de 21-24 nt en diversas plantas infectadas por miembros representativos de las dos familias: PSTVd en tomate (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Itaya *et al.*, 2007; Machida *et al.*, 2007) y en *N. benthamiana* (Di Serio *et al.*, 2010), CEVd también en tomate (Martín *et al.*, 2007) y en gynura (Markarian *et al.*, 2004), el viroide del moteado amarillo de la vid 1 (grapevine yellow speckle viroid 1, GYSVd 1) y HSVd en vid (Navarro *et al.*, 2009), el viroide de las depresiones crateriformes de la manzana (apple dimple fruit viroid, ADFVd) en higuera (Chiumenti *et al.*, 2014), PLMVd y CChMVd en melocotonero y crisantemo, respectivamente (Martínez de Alba *et al.*, 2002; Di Serio *et al.*, 2009; Bolduc *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2012a), y ASBVd en aguacate (Markarian *et al.*, 2004).

Los vd-sRNAs presentan características similares a los siRNAs: los derivados de la familia *Pospiviroidae* tienen un tamaño de 21, 22 y 24 nt (Itaya *et al.*, 2007; Machida *et al.*,

2007; Navarro *et al.*, 2009; Di Serio *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010) y un grupo fosforilo y otro metilo en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Martín *et al.*, 2007), mientras que los derivados de la familia *Avsunviroidae* son mayoritariamente de 21 y 22 nt (Di Serio *et al.*, 2009; Bolduc *et al.*, 2010). La presencia de vd-sRNAs en infecciones viroidales implica la participación en su biogénesis de alguna DCL que actúe sobre los RNAs genómicos muy estructurados y/o sobre sus intermediarios replicativos de dsRNA y/o sobre dsRNAs generados por la actividad de RDRs. En principio, análogamente a lo que ocurre con los ribovirus (Deleris *et al.*, 2006), los vd-sRNAs primarios podrían originarse por la acción de DCL2 o DCL4 sobre los RNAs viroidales maduros, que debido a su alto contenido en estructura secundaria y a que no están encapsidados parecen particularmente vulnerables a enzimas de este tipo. Por otra parte, los vd-sRNAs secundarios podrían provenir del procesamiento por DCL2 o DCL4 de dsRNAs generados por la acción de la RDR6 sobre los ssRNAs viroidales, bien transcribiendo directamente los mismos o bien utilizando ciertos vd-sRNAs primarios como cebadores. Además, en los miembros de la familia *Pospiviroidae*, DCL1 o DCL3 podrían actuar en el núcleo sobre las formas viroidales maduras o sobre los dsRNAs resultantes de su replicación. En los miembros de la familia *Avsunviroidae* la producción de los vd-sRNAs debería ocurrir exclusivamente en el citoplasma durante el movimiento célula a célula del RNA genómico, ya que no se han identificado DCLs cloroplásticas (Flores *et al.*, 2005).

2.8. Papel del silenciamiento del RNA en la interacción planta-viroide

La presencia de vd-sRNAs en plantas infectadas sugiere que los viroides son inductores y dianas del silenciamiento génico mediado por RNA. Ciertos datos indican que, como los virus, también los viroides son susceptibles al mecanismo de defensa mediado por siRNAs, pues se ha comprobado que su infectividad disminuye al ser co-inoculados con dsRNAs y con siRNAs viroidales (Carbonell *et al.*, 2008), aunque los viroides son capaces de sortear el mecanismo de defensa ya que esta disminución sólo se da en plazos de tiempo relativamente cortos y en condiciones de temperatura no óptimas para la infección. Estudios más recientes han mostrado que la acumulación del RNA genómico y de los vd-sRNAs de PSTVd es incrementada en hojas de plantas transgénicas de *N. benthamiana* deficientes en la enzima RDR6 (NbRDR6i) con respecto a plantas silvestres (Nbwt), sobre todo en etapas iniciales de la infección, mientras estas diferencias disminuyen o desaparecen en etapas tardías. Además, experimentos de hibridación *in situ* revelaron que el PSTVd puede invadir los meristemos

florales y vegetativos de plantas NbRDR6i, mientras que es excluido de estos tejidos en plantas Nbwt (Di Serio *et al.*, 2010). Otro estudio ha mostrado la disminución de la acumulación del PSTVd en plantas silvestres injertadas sobre plantas transgénicas de tabaco transformadas con una construcción en horquilla ('hairpin') de PSTVd no infeccioso. Estos resultados se han interpretado como la consecuencia de una actividad antiviroidal de los vd-sRNA derivados de la horquilla de RNA de PSTVd expresada en el portainjerto que, traslocados en la parte silvestre, activarían un mecanismo de silenciamiento contra el PSTVd (Kasai *et al.*, 2013). Aunque aún falten pruebas directas, el conjunto de estos resultados sugiere claramente la existencia de un papel antiviroidal del silenciamiento génico.

Cómo los viroides evaden este mecanismo de defensa de las plantas es una cuestión aún abierta. En ausencia de supresores del silenciamiento, los viroides tienen que haber desarrollado estrategias alternativas basadas en otra clase de mecanismos (replicación muy activa, compartimentalización en orgánulos, o asociación con proteínas, entre otros) (Flores *et al.*, 2005). Más específicamente, la acumulación nuclear o cloroplástica de los viroides podría ejercer un papel en su resistencia a la degradación mediada por la maquinaria del silenciamiento del RNA, ya que el complejo RISC se localiza en el citoplasma celular donde los viroides sólo se encuentran transitoriamente en el curso de su movimiento célula a célula. Con respecto a sus propiedades estructurales, algunos trabajos sugieren que los viroides podrían haber evolucionado hacia una estructura secundaria compacta, pero no estrictamente de dsRNA, que les hiciera parcialmente resistentes a algunas DCLs (Wang *et al.*, 2004), y totalmente resistentes a RISC (Wang *et al.*, 2004; Itaya *et al.*, 2007; Gómez y Pallas, 2007), que actúan preferentemente sobre RNAs muy estructurados y poco estructurados, respectivamente. Alternativamente, la estructura secundaria de los viroides podría haber evolucionado hacia una situación de compromiso que les permitiera establecer la infección aún siendo sustratos (subóptimos) de las DCLs y de RISC (Flores *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, las sintomatologías que inducen virus y viroides son muy parecidas, lo que sugiere que la patogénesis de ambas entidades pueda estar mediada, al menos en parte, por mecanismos comunes. Sin embargo, los datos acerca de proteínas supresoras de silenciamiento de virus apuntan a que su patogénesis se debe, al menos parcialmente, a que no sólo interfieren con el mecanismo de defensa de la planta sino también con el de regulación endógena del desarrollo, ambos mediados por sRNAs. En una infección viroidal, sin embargo, no existiendo supresores del silenciamiento, hay que considerar necesariamente mecanismos alternativos a los supresores del silenciamiento del RNA para justificar su patogénesis.

Para explicar la expresión de síntomas en infecciones inducidas por viroides se ha propuesto que algunos vd-sRNAs podrían dirigir la metilación de regiones del DNA del huésped y bloquear la expresión de ciertos genes (Pelissier y Wassenegger, 2000; Martínez *et al.*, 2014), o actuar como miRNAs dirigiendo el procesamiento o inhibiendo la traducción de mRNAs del huésped (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005; Ding y Itaya, 2007). En concordancia con esta última hipótesis, se ha observado una correlación directa entre la intensidad de los síntomas y los niveles de vd-sRNAs en infecciones con PSTVd y ASBVd (Itaya *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004), aunque una correlación similar también existe con las formas genómicas. La hipótesis que vd-sRNAs puedan dirigir la degradación específica de mRNAs del huésped se ha confirmado recientemente en experimentos en los que se determinó que dos vd-sRNA de PLMVd pueden actuar como miRNA endógenos; esos vd-sRNAs contienen el determinante de patogenicidad de una enfermedad del melocotonero (PC, de ‘peach calico’) y tienen como diana una determinada secuencia del mRNA del huésped, que codifica una HSP90 cloroplástica; la degradación de este mRNA mediada por los vd-sRNAs ha sido relacionada con la aparición de síntomas específicos (Navarro *et al.*, 2012a). Este mecanismo basado en el silenciamiento génico, si actuara reprimiendo la expresión de otros genes del huésped, explicaría cómo el viroide puede utilizar su propio genoma para modificar de forma directa la expresión génica del huésped.

3. Rutas de síntesis y degradación del RNA

La acumulación de los RNAs viroidales en tejidos infectados, así como de otros RNAs de la planta, es el resultado final del balance entre la síntesis y degradación de los mismos. En general, mientras los mecanismos de síntesis de los RNAs se han estudiado ampliamente, se conoce bastante menos respecto a las rutas de su degradación (Dori-Bachash *et al.*, 2011; Pérez-Ortín *et al.*, 2013). En el caso de los viroides, el silenciamiento mediado por RNA tiene probablemente un papel importante en este contexto, pero se desconoce si otras rutas de degradación están también implicadas. Es interesante observar que los viroides comparten con los mRNAs elementos comunes en su biogénesis. Como ya se ha dicho, la síntesis de los RNAs viroidales está mediada por una RNA polimerasa dependiente de DNA que en los viroides nucleares es la RNA polimerasa II, la misma que transcribe los mRNAs nucleares. Las rutas de síntesis y de degradación de los mRNAs están conectadas (Komili y Silver,

2008) y coordinadas a través de factores de regulación (Harel-Sharvit *et al.*, 2010). Hasta qué punto los viroides comparten con los mRNAs estos factores de regulación es desconocido.

A diferencia del DNA, el RNA y las proteínas pueden acumular errores durante su síntesis porque no existen mecanismos de reparación. Sin embargo, sí existen mecanismos de vigilancia que reconocen las moléculas defectuosas y las degradan (Nicholson *et al.*, 2010; Balagopal *et al.*, 2012; Parker, 2012). Además, una cantidad excesiva de mRNA en la célula puede resultar tóxica y por lo tanto requiere su control (Houseley y Tollervey, 2009). De hecho, la regulación de la degradación del mRNA desempeña un papel importante en el control de la expresión génica, y en algunos sistemas puede ser tan importante como la regulación de la transcripción (Wang *et al.*, 2002; Garneau *et al.*, 2007; Romero-Santacreu *et al.*, 2009; Elkon *et al.*, 2010; Castells-Roca *et al.*, 2011).

Estudios diversos han mostrado que existen dos rutas de degradación del mRNA, una que actúa en el núcleo y otra en el citoplasma. En general, el sustrato de la ruta de degradación del mRNA no es el mRNA desnudo sino un complejo ribonucleoproteico (mRNP, de 'mRNA ribonucleoprotein particle') que se forma durante o después de la transcripción (Pérez-Ortín *et al.*, 2012). Errores durante el procesamiento del mRNA nuclear pueden llevar a su degradación, en la que tienen un papel importante exonucleasas como la Rrp6 (LaCava *et al.*, 2005). Si el mRNA escapa a este control nuclear, es exportado al citoplasma donde será reconocido por el sistema de vigilancia propio de este compartimento. En esta segunda ruta, la degradación del mRNA maduro citoplasmático puede ocurrir siguiendo diferentes mecanismos (Balagopal *et al.*, 2012; Parker, 2012; Schoenberg y Maquat, 2012; Wu y Brewer, 2012). Uno de ellos contempla la desadenilación de la cola poli(A) en 3' del mRNA, seguida por la eliminación de la caperuza ('cap') en 5' antes de ser degradado completamente por una 5'-3' exoribonucleasa citoplasmática, Xrn1 (Hsu y Stevens, 1993; Muhrad *et al.*, 1994; Garneau *et al.*, 2007; Parker, 2012; Pérez-Ortín *et al.*, 2013; Haimovich *et al.*, 2013a), muy conservada en los organismos eucariotas (Haimovich *et al.*, 2013b). Además, recientemente se ha mostrado que la transcripción y la degradación del mRNA tienen en común enzimas y factores de regulación, como los DFs ('mRNA decay factors') (Haimovich *et al.*, 2013b), que se localizan tanto en el núcleo en asociación con la cromatina (Rhee y Pugh, 2012), como en el citoplasma (Brune *et al.*, 2005; Teixeira y Parker, 2007).

La expresión génica es un proceso continuo en el que las etapas de síntesis y degradación están conectadas entre ellas para mantener el equilibrio y permitir que sean relativamente constantes los niveles de mRNA (Haimovich *et al.*, 2013b). Es muy posible que mecanismos

similares regulen el nivel de acumulación final que los RNAs viroidales alcanzan en sus huéspedes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se han estudiado las rutas de degradación *in vivo* del viroide del tubérculo fusiforme de la patata (potato spindle tuber viroid, PSTVd). Datos previos muestran que los viroides son diana de un grupo de RNasas de tipo III (Dicer-like DCLs) implicadas en el silenciamiento mediado por RNA, indicando que este mecanismo de degradación del RNA podría desempeñar un papel para limitar, al menos en parte, la infección. Sin embargo, la posible implicación de otras proteínas o complejos enzimáticos que también actúan en el silenciamiento mediado por RNA, como las proteínas Argonauta, no está clara. Además, se desconoce si otra(s) ribonucleasa(s) celulares son capaces de degradar los RNAs viroidales *in vivo*, contribuyendo finalmente a determinar los niveles de acumulación de estos RNAs en los tejidos infectados.

Los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación se han centrado en:

- i) Averiguar, mediante inmunoprecipitación asociada a hibridación Northern, si las proteínas Argonauta cargan efectivamente los pequeños RNAs viroidales (vd-sRNAs) del PSTVd, y en su caso identificar cuáles de ellas presentan esta propiedad.
- ii) Establecer mediante técnicas de secuenciación masiva si los vd-sRNAs se unen selectivamente a alguna AGO en función del tamaño y extremo 5' de los primeros, como se ha demostrado para otros pequeños RNAs (microRNAs y siRNAs).
- iii) Estudiar si las proteínas AGO que incorporan a los vd-sRNA desempeñan una función antiviroidal.
- iv) Caracterizar, mediante técnicas de extensión del cebador y de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE), los extremos 5' y 3' de los RNAs subgenómicos (sgRNAs) del PSTVd que se acumulan durante la infección.
- v) Determinar el mecanismo de biogénesis de dichos sgRNAs del PSTVd, identificando su posible sustrato.

CAPÍTULO 1

**Specific ARGONAUTES bind selectively small
RNAs derived from potato spindle tuber viroid and
attenuate viroid accumulation *in vivo***

Specific ARGONAUTES bind selectively small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo

Sofia Minoia¹, Alberto Carbonell², Francesco Di Serio³, Andreas Gisel⁴, James C. Carrington², Beatriz Navarro^{3*}, and Ricardo Flores^{1*}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain, ²Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, USA, ³Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italy and ⁴Istituto di Tecnologie Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italy

Journal of Virology 88(20):11933-11945, 2014.

doi: 10.1128/JVI.01404-14.

ABSTRACT

The identification of viroid-derived small RNAs (vd-sRNAs) of 21-24 nucleotides (nt) in plants infected by viroids (infectious non-protein-coding RNAs of just 250-400 nt), supports their targeting by dicer-like enzymes, the first host RNA silencing barrier. However, whether viroids, like RNA viruses, are also targeted by the RNA-induced silencing complex (RISC) remains controversial. At the RISC core is one Argonaute (AGO) protein that, guided by endogenous or viral sRNAs, targets complementary RNAs. To examine whether AGO proteins also load vd-sRNAs, leaves of *Nicotiana benthamiana* infected by potato spindle tuber viroid (PSTVd) were agroinfiltrated with plasmids expressing epitope-tagged versions of AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, AGO5, AGO6, AGO7, AGO9 and AGO10 from *Arabidopsis thaliana*. Immunoprecipitation analyses of the agroinfiltrated halos revealed that all AGOs, except AGO6, AGO7 and AGO10, associated with vd-sRNAs: AGO1, AGO2 and AGO3 preferentially with those of 21 and 22 nt, while AGO4, AGO5 and AGO9 additionally bound those of 24 nt. Deep sequencing analyses showed that sorting of vd-sRNAs into AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 depended essentially on their 5'-terminal nucleotide, with the profiles of the corresponding AGO-loaded vd-sRNAs adopting specific hot spot distributions along the viroid genome. Furthermore, agroexpression of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 on PSTVd-infected tissue attenuated the level of the genomic RNAs, suggesting that they, or their precursors, are RISC-targeted. In contrast to RNA viruses, PSTVd infection of *N. benthamiana* did not affect miR168-mediated regulation of the endogenous AGO1, which loaded vd-sRNAs with specificity similar to its *A. thaliana* counterpart.

IMPORTANCE

To contain invaders, particularly RNA viruses, plants have evolved an RNA silencing mechanism relying on the generation by Dicer-like (DCL) enzymes of virus-derived small RNAs of 21-24 nucleotides (nt) that load and guide Argonaute (AGO) proteins to target and repress viral RNA. Viroids, despite their minimal genomes (non-protein-coding RNAs of only 250-400 nt), infect and incite disease in plants. The accumulation in these plants of 21-24 nt viroid-derived small RNAs (vd-sRNAs) supports that DCLs also target viroids, but does not clarify whether vd-sRNAs activate one or more AGOs. Here, we show that in leaves of *Nicotiana benthamiana* infected by potato spindle tuber

viroid, the endogenous AGO1 and distinct AGOs from *Arabidopsis thaliana* that were overexpressed, associated with vd-sRNAs displaying the same properties (5'-terminal nucleotide and size) previously established for endogenous and viral small RNAs. Overexpression of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 attenuated viroid accumulation, supporting their role in antiviral defense.

Viroids, regardless of having minimal genomes restricted to a single-stranded (ss) non-protein-coding RNA of solely ~250-400 nucleotides (nt), can parasitize the higher plants they infect and replicate, spread systemically, and frequently incite disease (1 to 3). Most of the approximately 30 viroids characterized so far, including the type species potato spindle tuber viroid (PSTVd) (4, 5), have been assigned to the family *Pospiviroidae* on the basis of a rod-like (or quasi-rod-like) secondary structure with a central conserved region (CCR), and replication in the nucleus through an asymmetric rolling-circle mechanism with double-stranded RNA (dsRNA) intermediates (6 to 10). This mechanism is catalyzed by the RNA polymerase II forced to transcribe RNA templates (11 to 13), an RNase most likely of class III (14), and the DNA ligase I redirected to act as an RNA ligase (15), with the CCR playing a critical role in the cleavage of the oligomeric (+) strands generated by the rolling circle-mechanism (14) and in the ligation (circularization) of the resulting monomeric (+) strands (16). The remaining four viroids, members of the family *Avsunviroidae*, display a quasi-rod-like or clearly branched secondary structure without CCR but with hammerhead ribozymes in both polarity strands; these catalytic RNA motifs mediate self-cleavage of the oligomeric strands produced by a symmetric rolling-circle mechanism occurring in plastids, mostly chloroplasts (17). To complete their infectious cycle, viroids must move at short (cell-to-cell) and long distance through the plasmodesmata and phloem, respectively. Some of the RNA motifs that mediate these movements have been finely dissected in PSTVd and include trafficking from the bundle sheath to mesophyll (18), entry of PSTVd from non-vascular into phloem tissue (19), and trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll (20). A genome-wide mutational analysis has mapped loops/bulges in the secondary structure of PSTVd, crucial or relevant for replication in single cells (protoplasts) or for systemic movement (21).

In addition to replicate and move, viroids need to overcome their host surveillance responses, salient among which is RNA silencing (22, 23). This regulatory mechanism, which functions at the transcriptional and post-transcriptional level and is particularly sophisticated in plants, tunes endogenous gene expression and plays a defensive role restricting pathogen invasion and transposon proliferation. The key elicitors of RNA silencing, dsRNAs and snap-folded ssRNA, are processed by specific Dicer-like (DCL) isozymes into small RNAs (sRNAs), mainly small interfering RNAs (siRNAs) of 21, 22 and 24 nt, and microRNAs (miRNAs) of 21 and 22 nt (24, to 26). One strand of these sRNAs, and of some secondary siRNAs resulting from an amplification pathway catalyzed by endogenous RNA-directed RNA polymerases (RDRs) and DCLs (27, 28), preferentially loads and guides the RNA-

inducing silencing complex (RISC), particularly its core consisting of an Argonaute (AGO) protein, to target and inactivate their cognate RNAs or DNAs (29).

Arabidopsis thaliana contains 10 AGO proteins classified in three clades: i) AGO1, AGO5, and AGO10, ii) AGO2, AGO3, and AGO7, and iii) AGO4, AGO6, AGO8, and AGO9. This phylogenetic grouping, however, does not necessarily imply functional similarity (29, 30). AGO1, AGO2, and AGO7 associate with 21- or 22-nt sRNAs (and AGO5 additionally with 24-nt sRNAs), either endogenous or exogenous (as those derived from viruses), and at least AGO1, AGO2 and AGO5 operate in post-transcriptional silencing through cleavage or translation arrest of their RNA targets (31 to 37). AGO4, AGO6, and AGO9 associate with 24-nt siRNAs to mediate transcriptional silencing through RNA-directed DNA methylation (38, 39), and at least AGO4 binds to diverse classes of sRNAs including siRNAs originating from transposable and repetitive elements, and cleaves target RNA transcripts (40). AGO10 acts in the translational control of several miRNA targets, like the mRNAs coding for AGO1 (41, 42). Finally, the role of AGO3 and AGO8 in sRNA-directed regulation remains unclear (29, 30). A recent transcriptome assembly has identified in *N. benthamiana* homologues for each AGO from *A. thaliana*, except for AGO3 and AGO9 (returned as AGO2 and as a variant of AGO4, respectively) (43).

Several independent lines suggest that, in addition to playing a key role in antiviral defense, RNA silencing is also involved in antiviroid defense. First, viroid infection results in the genomic RNA progeny folding upon itself into collapsed secondary structures and in the production of dsRNAs, either replicative intermediates or RDR products. Northern hybridizations have detected viroid-derived sRNAs (vd-sRNAs), with properties akin to the host and virus sRNAs generated by DCLs, accompanying infections by representative members of the two viroid families; these vd-sRNAs have been subsequently sequenced by conventional and high-throughput approaches (44, 45). Second, the expression of a reporter gene and the accumulation in infected plants of the genomic viroid RNA appear to be repressed by vd-sRNAs in a sequence-specific mode (46 to 49). Third, increased levels of the genomic PSTVd RNA have been detected in early infection stages of *Nicotiana benthamiana* deficient for RDR6, in which, additionally, PSTVd entry into floral and vegetative meristems is facilitated (50). Fourth, two vd-sRNAs containing the albinism determinant of a chloroplast-replicating viroid guide cleavage of the host mRNA coding for the chloroplastic heat-shock protein 90 (cHSP90) as predicted by RNA silencing, thus providing a feasible mechanism of pathogenesis (51). Fifth, the titer of a viroid is enhanced in co-infections with a virus, with this effect occurring via the expression of viral-encoded silencing suppressors

(52). And, last but not least, early pioneering research discovered that PSTVd-cDNA introduced into the tobacco genome via *Agrobacterium tumefaciens* became methylated only following viroid RNA-RNA replication, thus unveiling an RNA-directed and sequence-specific mechanism for *de novo* methylation of genomic sequences in plants (53); this mechanism of transcriptional silencing is now known to be mediated by specific DCL-dependent siRNAs and AGOs. More recently, viroid infection has been associated with changes in DNA methylation of host ribosomal RNA genes (54), but whether those changes result from direct or indirect effects is not known. However, despite all these data, no direct evidence exists supporting that AGOs recruit vd-sRNAs. We report here that certain members of the AGO family, specifically AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 load vd-sRNAs from PSTVd, and eventually attenuate the viroid titer.

MATERIALS AND METHODS

PSTVd inoculation. *Nicotiana benthamiana* seedlings were grown in a controlled chamber (28°C with fluorescent light for 16 h and 25°C in darkness for 8 h) and, at the cotyledon/first true leaf stage, they were infiltrated with cultures of *Agrobacterium tumefaciens* C58 carrying a binary plasmid empty or with a head-to-tail dimeric insert of PSTVd (NB variant, GenBank accession number AJ634596.1) under the control of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (CaMV) (55).

Agroinfiltration assays. Binary plasmids for expressing, under the control of the 35S promoter of CaMV, AGO versions from *A. thaliana* tagged at their N-terminal region with three tandem repeats of the HA epitope (AGO1, AGO2, AGO7 and AGO10), or with a single HA epitope (AGO3, AGO4, AGO5, AGO6 and AGO9), were described previously (34, 37). Binary plasmids for expressing miR390 from *A. thaliana* and the beta-glucuronidase (GUS) from *Escherichia coli*, both under the control of the 35S promoter of CaMV, were also described previously (34). Transient expression assays in *N. benthamiana* leaves with cultures of *A. tumefaciens* were performed as described previously (56, 57).

RNA extraction and analysis by PAGE and Northern-blot hybridization. Total RNA preparations (RNA-Input) or immunoprecipitates (RNA-IP, see below) from PSTVd-infected upper non-inoculated leaves of *N. benthamiana* (and from mock-inoculated controls) were obtained by double extraction with buffer-saturated phenol, precipitated with ethanol, and resuspended. RNAs were then separated by denaturing PAGE (in 1X TBE buffer and 8 M urea) on either 5% gels (for the monomeric circular, *mc*, and linear, *ml*, PSTVd forms) or 17%

gels (for vd-sRNAs and miRNAs) that were stained with ethidium bromide for assessing equal loading by the fluorescence emitted by the 5S or 4S RNAs. Following electrotransference of RNAs to Hybond-N+ membranes (Roche Diagnostics GmbH), they were hybridized with internally-radiolabeled full-length riboprobes (synthesized by *in vitro* transcription) for detecting PSTVd (+) strands, or with 5'-radiolabeled deoxyribonucleotide probes [prepared according to standard procedures (58)] for detecting specific miRNAs. Hybridization was at 70°C in the presence of 50% formamide (for detecting *mc* and *ml* forms), or at 42°C with PerfectHyb Plus hybridization buffer (Sigma) (for detecting vd-sRNAs) (50). After washing at 60°C in 0.1X SSC with 0.1% SDS (*mc* and *ml* forms), or at 55°C in 1X SSC with 0.1% SDS (vd-sRNAs and miRNAs), the membranes were analyzed with a phosphoimager (Fujifilm FLA-5100) using programs Image Reader FLA-5100 and Image Gauge 4.0.

RNA Immunoprecipitation assays. RNA-IP were obtained with a rabbit polyclonal antibody (GenScript) against the N-terminal region of AGO1 from *N. benthamiana* (MVRKKRTDVPGGAESFESHEC), which is characteristic of this AGO isoform, and with a mouse monoclonal antibody (12CA5, Roche Diagnostics GmbH) against an epitope of the hemagglutinin (HA) from human influenza virus. Immunoprecipitation assays were performed as reported previously (37) with minor modifications. In brief, *N. benthamiana* leaves (0.5-1 g) were homogenized with liquid nitrogen and mixed with 12 ml/g (HA antibody) or 3 ml/g (AGO1 antibody) of lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2.5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1% Nonidet P-40, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and one tablet of complete proteinase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH)]. The insoluble material was removed by centrifugation at 8000 X *g* for 5 min at 4°C and, after taking two aliquots (of 20 µl and 1 ml) for analysis of the Protein- and RNA-Input fractions, respectively, the remaining clarified lysate was incubated at 4°C for 15 min with 4 µg/ml of one (HA) or the other (AGO1) antibody, and then at 4°C for 30 min with 100 µl/ml of Protein-A agarose beads (Roche Diagnostics GmbH). Beads were washed six times for 10 min with lysis buffer at 4°C and, after taking one aliquot (20 µl) of the final bead suspension for Protein-IP analysis, the rest was used for RNA-IP analysis. RNAs were released by incubating the beads at 65°C for 15 min in 0.5 vol of proteinase K buffer [0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 300 mM NaCl, 2% SDS, and 1 µg/µl proteinase K (Roche Diagnostics GmbH)]. RNA-Input and RNA-IP aliquots were extracted with saturated phenol pH 4.5 (Amresco), phenol:chloroform:isoamyl alcohol, and chloroform, and recovered by ethanol precipitation. For sRNA gel blot assays, 2-5 µg of RNA of the RNA-Input fraction, and one

half of the RNA-IP fraction, were used as indicated in the previous section. For protein blot assays, 20 μ l of the Protein-Input and Protein-IP fractions were mixed with the same volume of 2X PDB buffer (1.25 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 80% glycerol, 10% β -mercaptoethanol and 0.02% bromophenol blue) and heated at 100°C for 3 min; aliquots (10 and 2.5 μ l, respectively) were applied onto NuPAGE Bis-Tris minigels (4-12%) (Novex, Life Technologies) and equal loading was assessed by the intensity generated by the large subunit of Rubisco after staining with Ponceau S (Sigma). HA-AGOs were electrotransferred to PVDF membranes and detected by chemiluminescence with anti-HA peroxidase antibody (Roche Diagnostics GmbH) at a 1:1000 dilution and Western Lighting plus-ECL substrate (Perkin-Elmer). AGO1 from *N. benthamiana* was similarly detected, but using the antibody against its N-terminal region at a 1:1000 dilution and a goat anti-rabbit IgG (H&L) secondary antibody conjugated to horse radish peroxidase (Agrisera) at a 1:20000 dilution, and the same substrate.

Deep sequencing analysis of sRNAs. Experimental details on sRNA purification, adapter ligation, RT-PCR amplification, library purification, and high-throughput DNA sequencing on the Illumina Genome Analyzer Hi-Seq 2000 (FASTERIS SA, Plan-les-Ouates, Switzerland), has been described previously (50). In the first deep sequencing four bar-coded samples, corresponding total sRNAs (inputs) and immunoprecipitates (IPs, obtained with an anti-HA monoclonal antibody) from PSTVd-infected *N. benthamiana* overexpressing HA-tagged AGO1 and -AGO2, were run in the same channel. In the second deep sequencing we proceeded as in the first, but the four bar-coded samples corresponded to sRNAs inputs and IPs from PSTVd-infected *N. benthamiana* overexpressing HA-tagged AGO4 and -AGO5. In the third deep sequencing, we proceeded again as in the first, but the four bar-coded samples corresponded to sRNAs inputs and IPs (obtained with an anti-AGO1 polyclonal antibody) from mock-inoculated and PSTVd-infected *N. benthamiana*. The resulting reads, after barcode identification, were processed by removing the adaptor and grouping them into different files according to their sequence length. Only 18-26 nt reads were mapped against the PSTVd sequence (variant NB) (59). To filter, analyze and visualize the mapping data, a set of perl scripts was developed. IP enrichment or depletion was calculated for each unique 21-, 22- or 24-nt vd-sRNA as $\log_2 [(IP\ reads + 1)/(Input\ reads + 1)]$, and plotted for each size class as the fraction (%) of unique vd-sRNA sequences enriched >2-fold ($\log_2 >1$) or depleted >2-fold ($\log_2 <1$) in the IP compared to the input.

RESULTS

PSTVd infection of *N. benthamiana* does not affect miR168-mediated AGO1 accumulation. As indicated above, AGO1 is a key player of the antiviral defense mediated by RNA silencing. Infection by plant RNA viruses induces and reduces the accumulation of AGO1 mRNA and AGO1 protein, respectively (42, 60). The explanation for this apparent paradox is that expression of AGO1 mRNA is translationally repressed by miR168 (61), the accumulation of which is elicited by virus infection (42, 60). In view of these results, we first checked whether a similar situation occurs during a viroid infection. For this purpose, plants of *N. benthamiana* were inoculated by leaf infiltration with cultures of *A. tumefaciens* carrying binary plasmids for expressing a head-to-tail dimeric (+) insert of PSTVd [*35S:dPSTVd(+)*] or the beta-glucuronidase (GUS) (*35S:GUS*), both under the control of the 35S promoter of CaMV. Western-blot analysis of PSTVd-infected upper non-inoculated leaves—using a polyclonal antibody raised specifically against the N-terminal region of AGO1 from *N. benthamiana*—revealed that infection by PSTVd induced a slight increase in the accumulation of AGO1 compared with mock-inoculated controls (expressing GUS) of the same developmental stage. This effect was observed in leaves collected at early (15 dpi, when symptoms start appearing) and later infection stages (20, 25 and 30 dpi) (Fig. 1A). However, no significant effect on AGO1 was detected when the leaves of *N. benthamiana* agroinfiltrated with the plasmid for expressing the head-to-tail dimeric insert of PSTVd were directly examined at 4, 6 and 8 dpi (using again as control leaves agroinfiltrated with *35S:GUS*) (Fig. 1B).

Although these results anticipated that miR168 levels were most likely not affected by PSTVd infection, we confirmed that this was indeed the case examining total RNA preparations from the same samples by Northern-blot hybridization to detect miR168 (Fig. 1A and B). Altogether our data showed that, in contrast with the situation observed for representative RNA viruses (42, 60), the effect of viroid infection on AGO1, if any, is not mediated by miR168 targeting of AGO1 mRNA.

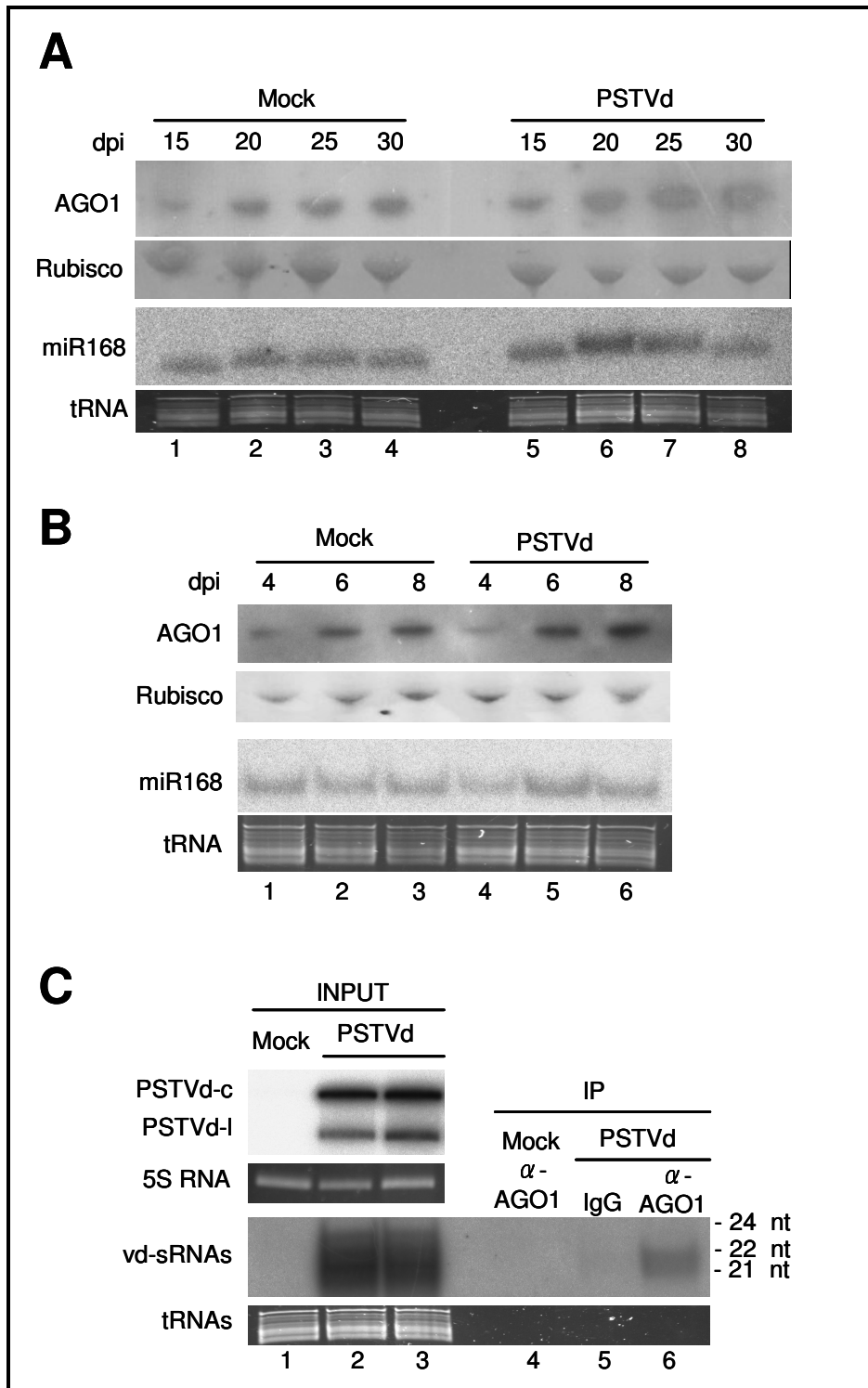


Fig. 1. PSTVd infection of *N. benthamiana* has no significant effect on AGO1 or miR168 accumulation in the upper non-inoculated leaves (**A**) or in the agroinfiltrated leaves (**B**). Western-blot analyses were performed with a rabbit polyclonal antibody against the N-terminal region of AGO1 from *N. benthamiana* (α -AGO1) and a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Total proteins were separated by PAGE in 4-12% gels and equal loading was assessed by the intensity of the large subunit of Rubisco after staining with Ponceau S. Northern-blot hybridizations were carried out with a 5'-radiolabeled

oligodeoxyribonucleotide complementary to miR168. Total RNAs were separated by denaturing PAGE in 17% gels and equal loading was assessed by the intensity of tRNA after staining with ethidium bromide. Samples in (A) were collected at 15 (lanes 1 and 5), 20 (lanes 2 and 6), 25 (lanes 3 and 7) and 30 (lanes 4 and 8) days post inoculation (dpi); samples in (B) were collected at four (lanes 1 and 4), 6 (lanes 2 and 5) and eight (lanes 3 to 6) dpi. (C) Endogenous AGO1 loads vd-sRNAs during PSTVd infection of *N. benthamiana*. Aliquots of total sRNA (INPUT) and of the sRNA fraction immunoprecipitated with a rabbit polyclonal antibody against the N-terminal region of AGO1 from *N. benthamiana* (IP), were separated by denaturing PAGE in 17% gels and revealed by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands. Lanes 1 and 4 correspond to a mock-inoculated control, and lanes 2, 3, 5 and 6 to PSTVd-infected upper non-inoculated leaves collected at 25 days post inoculation. IPs were obtained with the antibody against AGO1 (α -AGO1) (lanes 4 and 6) or with a preimmune rabbit immunoglobuline fraction (IgG) (lane 5). Mock inoculations were performed with cultures of *A. tumefaciens* with a binary plasmid expressing GUS instead of the head-to-tail dimeric (+) transcript of PSTVd. Accumulation of the PSTVd *mc* and *ml* forms was also examined in the RNA Inputs after denaturing PAGE in 5% gels (upper panel). Equal loading was assessed by the intensity of the bands generated by the 5S and tRNAs after staining with ethidium bromide.

Endogenous AGO1 loads vd-sRNAs during PSTVd infection of *N. benthamiana*.

Using the polyclonal antibody against AGO1 from *N. benthamiana*, we next tested whether this protein interacts *in vivo* with vd-sRNA. Approximately three weeks after inoculation, plants displayed a stunted phenotype with curling and reduction of the foliar area when compared with the mock-inoculated controls, as reported previously for this and other PSTVd strains (50, 62). Analysis of total RNA preparations by denaturing PAGE (in 5% gels) and Northern-blot hybridization confirmed the accumulation of the monomeric circular (*mc*) and linear (*ml*) PSTVd (+) RNAs in upper non-inoculated leaves collected at 20, 25 and 30 days postinfiltration (dpi) (Fig. 1C). Parallel analysis of the same samples, fractionated by denaturing PAGE (in 17% gels), revealed intense hybridization signals in the gel region corresponding to vd-sRNAs of 21 to 24 nt (Fig. 1C). Moreover, a minor fraction of the vd-sRNAs of 21-22 nt were also detected in the immunoprecipitates generated by the AGO1-specific antibody (Fig. 1C), hence showing that the host AGO1 indeed interacts with PSTVd-sRNAs with the expected size specificity (29). A more detailed description of those PSTVd-sRNAs loaded by AGO1 from *N. benthamiana* is provided below.

Setting up a system for the study of AGO/vd-sRNA interactions: agroexpressed AGO1 and AGO2, but neither AGO7 nor AGO10, bind PSTVd-sRNAs. To circumvent the problem posed by the inability of PSTVd to infect *A. thaliana* (10) and by the lack of specific antibodies against most other AGOs from *N. benthamiana*, we then tested whether overexpressing AGO1 and other AGO members from *A. thaliana* in PSTVd-infected *N. benthamiana* resulted in their loading with vd-sRNAs. To increase recovery in

immunoprecipitates, we used AGO versions tagged at their N-terminal region with three tandem repeats of the HA epitope (AGO1, AGO2, AGO7 and AGO10) (34, 37), or with a single HA epitope (AGO3, AGO4, AGO5, AGO6 and AGO9, kindly provided by Drs. A. Takeda and Y. Watanabe). First we reproduced results obtained with a protocol reported previously showing that AGO7 and miR390 from *A. thaliana* interact specifically when overexpressed in *N. benthamiana* (34). On the one hand, leaves of non-infected *N. benthamiana* were agroinfiltrated with a culture of *A. tumefaciens* with the construct *35S:miR390* for expressing miR390 under the control of the 35S promoter. On the other hand, this same culture was coagroinfiltrated with others carrying plasmids for expressing either AGO1 or AGO7, both tagged with the HA epitope and under the control of the same promoter (*35S:HA-AGO1* and *35S:HA-AGO7*, respectively). Northern-blot hybridizations with a 5'-radiolabeled oligodeoxyribonucleotide complementary to miR390 revealed that while this RNA accumulated to high levels in the total RNA fraction from infiltrated halos, it was only detected in AGO7 immunoprecipitate (Fig. S1). Given that AGO7, but not AGO1, binds specifically miR390 (34), and that Western-blot analysis with an anti-HA-peroxidase monoclonal antibody showed similar accumulation of AGO1 and AGO7 in the total protein and in the immunoprecipitate fractions (Fig. S2), these results provided the support needed for extending the same approach to investigate whether one or more AGOs interact specifically with vd-sRNAs.

We initially examined AGO1, AGO2, AGO7 and AGO10 from *A. thaliana* because some of them have been involved in defense against RNA viruses, namely AGO1, AGO2 and AGO7 against turnip crinkle virus (TCV), AGO2 against turnip mosaic virus (TuMV) (37) and AGO1 and AGO2 against cucumber mosaic virus (CMV) (31, 33, 36), and also because they display distinct size and sequence specificity for some sRNAs (29, 30). Moreover, when the present work was started, association of AGO10 with sRNAs had not been shown (29), thus serving this protein as a non-sRNA binding AGO control. To begin with, each plasmid for expressing the HA-tagged AGOs was coagroinfiltrated with the *35S:dPSTVd(+)* construct to trigger infection. Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization revealed the presence of vd-sRNAs in the total RNA fractions from the coagroinfiltrated halos —with higher intensity at three than at two dpi— but not in the corresponding immunoprecipitates (data not shown). In view of these results, we took an alternative approach: plants were first agroinfiltrated with the *35S:dPSTVd(+)* construct and 19 days later, when PSTVd had spread systemically, upper non-inoculated leaves were then agroinfiltrated with the HA-tagged AGO constructs (*35S:3xHA-AGO1*, *35S:3xHA-AGO2*, *35S:3xHA-AGO7* or *35S:3xHA-AGO10*).

Analysis as stated above of the corresponding halos at two days after the second agroinfiltration showed high accumulation of vd-sRNAs of 21 to 24 nt in the total RNA fractions of the four samples, in contrast with the immunoprecipitates, wherein only vd-sRNAs of 21-22 nt were detected and exclusively associated with AGO1 and AGO2 (Fig. 2A). Western-blot analyses showed that the four agroinfiltrated AGOs (AGO1, AGO2, AGO7 and AGO10) were expressed (Fig. 2A). Altogether, these results indicated that vd-RNAs behave like other sRNAs of viral and endogenous origin (29), being specifically loaded in some, but not in all, AGOs according mainly to their size (and possibly to other structural properties, see below).

Agroexpressed AGO3, AGO4, AGO5 and AGO9 also bind vd-sRNAs with different affinity. We then extended these analyses to other available constructs, also under the control of the 35S promoter, for expressing the single HA-tagged AGOs from *A. thaliana*: *35S:HA-AGO3*, *35S:HA-AGO4*, *35S:HA-AGO5*, *35S:HA-AGO6* and *35S:HA-AGO9*; *35S:3xHA-AGO2* was used as an internal control for linking results from these experiments with those of the previous one. Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization of the corresponding halos at two days after the second agroinfiltration revealed high levels of vd-sRNAs of 21, 22 and 24 nt in the total RNA fractions of all samples, except in a negative control in which the *35S:dPSTVd(+)* construct used in the first agroinfiltration for triggering PSTVd infection was replaced by the *35S:GUS* construct (Fig. 2B). However, the immunoprecipitate fractions behaved in a different manner: the vd-sRNAs of 21-22 nt were detected in samples expressing AGO2 and AGO3, while in the samples expressing AGO4 and AGO5 (and to a lower extent in that expressing AGO9) vd-sRNAs of 24 nt were additionally detected; in contrast, essentially no vd-sRNAs were observed in the sample expressing AGO6 (Fig. 2B). Recovery of AGO-bound vd-sRNAs from immunoprecipitates could be influenced by the HA epitope being single or triple and by the distinct stability of AGOs against endogenous proteases, although Western-blot analyses with the anti-HA-peroxidase monoclonal antibody showed that, even if with different extension, all agroinfiltrated AGOs were expressed (Fig. 2B). AGO6 inability to bind vd-sRNAs was nevertheless confirmed in further experiments (data not shown). Collectively, these results are consistent with vd-RNAs being differentially sorted into specific AGOs according to the size reported previously for other viral and endogenous sRNAs (29, 30).

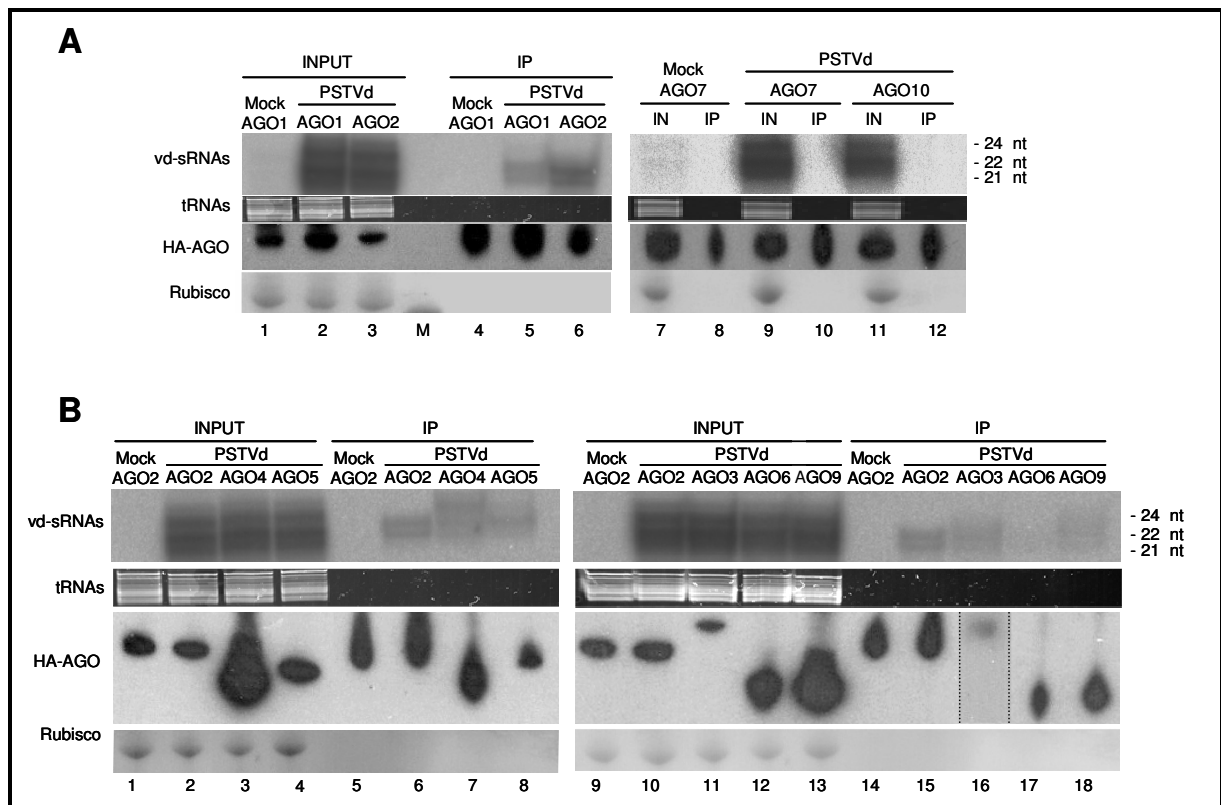


Fig. 2. (A) AGO1 and AGO2, but neither AGO7 nor AGO10, bind specifically certain vd-sRNAs. Northern-blot hybridizations with a full-length radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands of total RNAs (INPUT) from mock- and PSTVd-inoculated *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures of *A. tumefaciens* with binary plasmids for expressing HA-tagged AGO1 (lanes 1 and 2), AGO2 (lane 3), AGO7 (lanes 7 and 9) and AGO10 (lane 11). A size marker was included in lane M. RNA immunoprecipitates (IP) generated with an anti-HA monoclonal antibody from the halos agroexpressing HA-tagged AGO1 (lanes 4 and 5), AGO 2 (lane 6), AGO7 (lanes 8 and 10) and AGO10 (lane 12) were similarly analyzed. (B). Other agroinfiltrated AGOs, apart from AGO1 and AGO2, bind also vd-sRNAs with different affinity. Northern-blot hybridizations with a full-length radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands of total RNAs (INPUT) from mock- and PSTVd-inoculated *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures of *A. tumefaciens* with binary plasmids for expressing HA-tagged AGO2 (lanes 1, 2, 9 and 10), AGO4 (lane 3), AGO5 (lane 4), AGO3 (lane 11), AGO6 (lane 12) and AGO9 (lane 13). RNA immunoprecipitates (IP) generated with an anti-HA monoclonal antibody from the halos agroexpressing HA-tagged AGO2 (lanes 5, 6, 14 and 15), AGO4 (lane 7), AGO5 (lane 8), AGO3 (lane 16, overexposed to make the band visible), AGO6 (lane 17) and AGO9 (lane 18) were similarly analyzed. RNAs were separated by denaturing PAGE in 17% gels, and equal loading was assessed by the intensity of tRNA after staining with ethidium bromide. Western-blot analyses of total proteins from halos were carried out with the anti-HA monoclonal antibody following protein separation by PAGE in 4-12% gels; equal loading was assessed by the intensity of the large subunit of Rubisco after staining with Ponceau S. Mock inoculations were performed with cultures of *A. tumefaciens* with a binary plasmid expressing GUS instead of the head-to-tail dimeric transcript of PSTVd. In all cases samples were processed two days after agroinfiltration of plants that were PSTVd-infected, or mock-inoculated, 19 days before.

Deep sequencing reveals that sorting of vd-sRNAs into AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 mainly depends on their size and 5'-terminal nucleotide. To better understand the differential AGO affinity for vd-sRNAs, AGO1 and AGO2 (as representatives of those members of the family that associate preferentially with the sRNAs of 21-22 nt), and AGO4 and AGO5 (as representatives of those members of the family that associate additionally with the sRNAs of 24 nt) (29, 30), were selected for further examination. Moreover, while AGO1, AGO2 and AGO5 are able to bind virus-derived sRNAs and have been involved in antiviral defense presumably via post-transcriptional gene silencing (31, 33, 36, 37), AGO4 mostly mediates transcriptional silencing (38). Previous immunoprecipitation assays have also revealed that the identity of the 5'-terminal nucleotide and the length of the sRNAs contribute to their sorting into these four AGO proteins (34, 35, 63).

The first deep sequencing of sRNAs resulted in approximately 137.500.000 reads, 95.6% of which corresponding to the four bar-coded samples run in the same channel: the total sRNAs (inputs) and immunoprecipitates (IPs) from PSTVd-infected *N. benthamiana* overexpressing AGO1 and AGO2, with the fraction of each sample representing 23-29% of the total number of reads (Table S1, upper panel). Within the range of 18-26 nt, vd-sRNAs amounted to about 22% in the inputs, and 34% and 53% in AGO1-IP and AGO2-IP, respectively. The second deep-sequencing of sRNAs generated roughly 209.300.000 reads, 96.6% of which corresponding to the four bar-coded samples run in the same channel: the inputs and IPs from PSTVd-infected *N. benthamiana* overexpressing AGO4 and AGO5, with the fraction of each sample representing 19-29% of the total number of reads. Within the range of 18-26 nt, vd-sRNAs amounted to 11-15% in the inputs, and 14% and 28% in AGO4-IP and AGO5-IP, respectively (Table S1, lower panel).

Therefore, with respect to the inputs, the proportion of vd-sRNA was enriched in the IPs, making up a significant fraction of the total. This bias was also observed (particularly in AGO4 and AGO5) when the vd-sRNAs were disaggregated into size classes (Fig. 3).

Analysis of the vd-sRNA reads from the inputs revealed a similar size distribution in the four samples: 44-45% were of 21 nt, 36-38% of 22 nt, and 9-9.5 of 24 nt, in agreement with previous results (50). However, the situation was somewhat different in the IPs, dominated in AGO1 and AGO2 by vd-sRNAs of 21 and to a lower extent 22 nt (with those of 24 nt being essentially absent), while the preponderant vd-sRNA species in AGO4 and AGO5 were of 22 nt (and to a lower extent of 21 nt), with those of 24 nt amounting to 18 and 10%, respectively (Table S2). Hence, the AGO proteins exert some size-based selection on the vd-sRNAs they capture. On the other hand, the bias between (+) and (-) vd-sRNAs (derived from the most

and less abundant viroid strands accumulating *in vivo*, respectively) was minor in inputs and IPs, except in the AGO2-IP, wherein the fraction of vd-sRNAs of (+) polarity was significantly higher (Fig. S3).

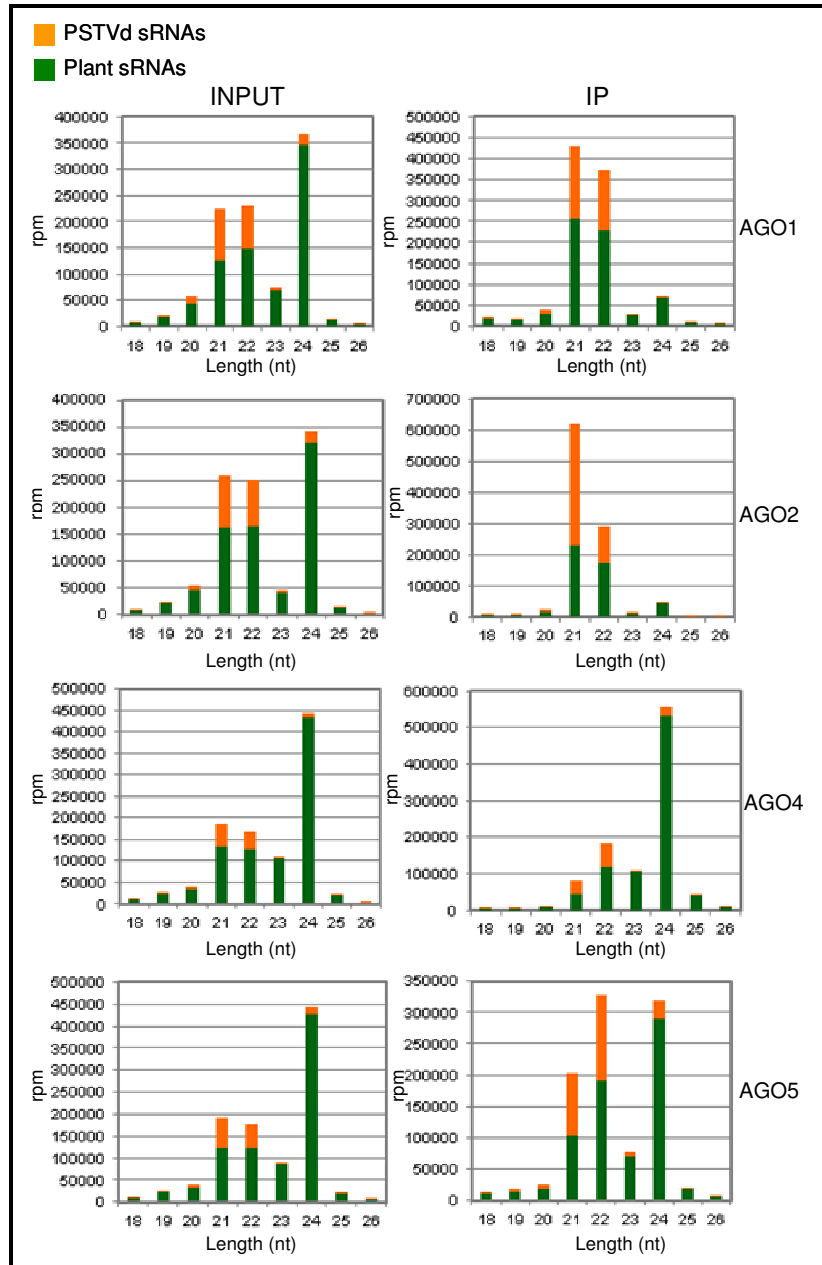


Fig. 3. Size distribution of PSTVd and plant sRNAs (orange and green, respectively) in total RNAs (INPUT) and immunoprecipitates (IP) from halos of PSTVd-infected *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures of *A. tumefaciens* with binary plasmids for expressing HA-tagged versions of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 from *A. thaliana*. The histograms compare the distribution of 18–26-nt total sRNA reads. The IP fractions were generated with an anti-HA monoclonal antibody. Notice that the scales are not identical in the different histograms, and that the fraction of PSTVd-sRNAs could be higher considering that the viroid may not invade all cells.

We next compared the distribution of the vd-sRNAs with respect to their 5'-terminal nucleotide, considering that in Arabidopsis this feature has a crucial role in sorting the sRNAs into the different AGOs (34, 35, 63). While 21- and 22-nt vd-sRNAs with a 5'-terminal U and C were moderately predominant in the inputs (up to 37% and 33%, respectively), the corresponding IP patterns were highly biased in their 5'-terminal nucleotides: 81% (U), 98% (A), 59% (A) and 72% (C) in AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5, respectively (Fig. 4). As for the 24-nt vd-sRNAs, those with a 5'-terminal G were moderately prevalent (33%) in the AGO4 input, as also were those with a 5'-terminal U or C in the AGO5 input (29%); yet, the distribution in their IP counterparts was clearly biased for vd-sRNAs with a 5'-terminal C, which were underrepresented in AGO4-IP (8%) but prevalent in AGO5-IP (77%). This result indicates that the strong preference of AGO5 for binding vd-sRNAs with a 5'-terminal C is size independent. Similar distributions were obtained when the (+) and (-) vd-sRNAs from the IPs were examined separately (Fig. S4).

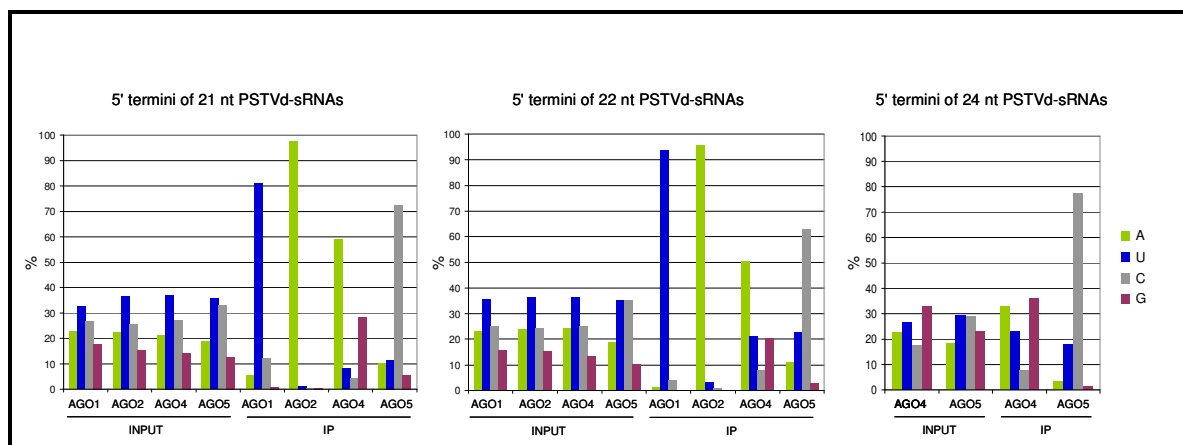


Fig. 4. Sorting of PSTVd-sRNAs into AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 mainly depends on their 5'-terminal nucleotide. The histograms display, in total RNA (INPUT) and in RNA immunoprecipitates (IP), the fraction (in %) of total reads corresponding to the 21-, 22- and 24-nt PSTV-sRNAs (panels A, B and C, respectively) with distinct 5' termini.

Altogether, these results support that the 5'-terminal nucleotide of vd-sRNAs is a major determinant for AGO sorting, following similar rules as those governing AGO sorting of endogenous and viral sRNAs (34, 35, 63). However, as proposed for certain endogenous sRNAs (39), characteristics other than the 5'-terminal nucleotide may also contribute to vd-sRNA loading.

The profiles of AGO-loaded vd-sRNAs adopt specific hot spot distributions along the viroid genome. Analysis of the vd-sRNA reads from AGO IPs revealed that they mapped at numerous positions of the genomic (+) and (-) viroid strands, with a significant fraction of the reads accumulating in specific regions (hot spots), and displaying some peculiarities (Fig. 5). First, the hot spot profiles of the vd-sRNAs immunoprecipitated by each of the four AGO tested were different, as a consequence of their affinity for specific 5'-terminal nucleotides and of the uneven distribution of the four nucleotides in the PSTVd (+) and (-) genomic strands. Yet, the IP profiles were not a direct reflection of their corresponding input counterparts (see for instance the vd-sRNAs with their 5'-terminal U mapping at positions ~240 and ~333 in the (+) strand, and ~123 and ~281 in the (-) strand, which are overrepresented in the AGO1 IP with respect to the AGO1 input), thus indicating the existence of some bias (Fig. 5). Second, hot spots in both input and IP profiles mapped at regions with a high G+C content, a likely consequence of the preference of DCLs for such regions (64, 65). And third, focusing on the vd-sRNAs mapping around positions 45-50 and 308-318 of the pathogenic (P) domain, 119-122 in the limit between the central (C) and variable (V) domains, and 257 and 259 of the C domain—all associated with pathogenesis (66, 67)—striking accumulation of those of (-) and (+) polarity around positions 119-122 were observed in the AGO1 and AGO2 IPs, respectively (Fig. 5). This result may have implications on the mechanism of symptom induction, despite the observation that low-abundant vd-sRNAs can be functionally relevant (see Discussion).

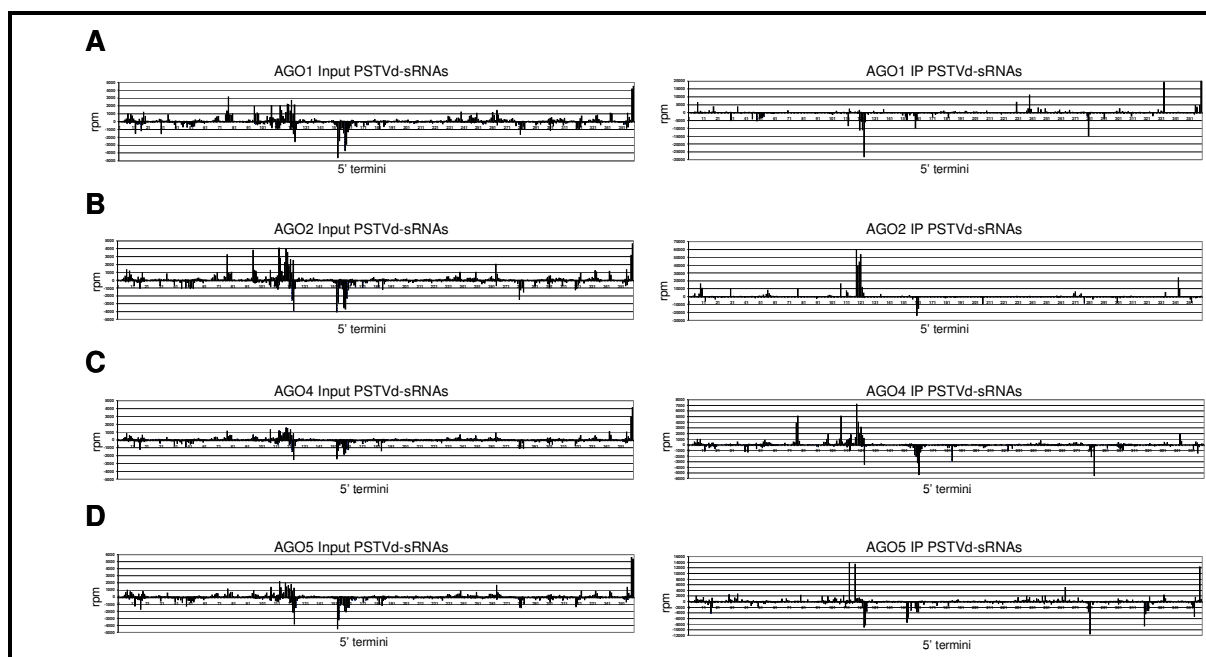


Fig. 5. AGO-loaded vd-sRNAs adopt along the viroid genome hot spot distributions that are specific for each of the four HA-tagged AGO from *A. thaliana* agroexpressed in PSTVd-infected *N. benthamiana*. Location and frequency in the genomic PSTVd RNA of the 5' termini of the plus-strand (positive values) and minus-strand (negative values) vd-sRNA reads per million (rpm) from total RNAs (INPUT) and from immunoprecipitates (IP) generated with an anti-HA monoclonal antibody. (A) to (D), profiles corresponding to AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5, respectively. Note that the same numbers are used in the plus polarity (5' to 3' orientation is from left to right) and in the minus polarity (5' to 3' orientation is from right to left).

Agroexpression of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 on PSTVd-infected tissue attenuates the level of the genomic RNAs. To test whether AGO-loaded vd-sRNAs could have a functional effect, we next examined the titer of the *mc* and *ml* PSTVd (+) forms. For this purpose, plants of *N. benthamiana* were agroinfected with PSTVd as indicated previously and, eight days later, upper non-inoculated leaves were agroinfiltrated with *A. tumefaciens* cultures for expressing HA-AGO1 or HA-AGO2; total RNA preparations from the corresponding halos were extracted two days afterward. Subsequent to some preliminary experiments, we chose this early sampling time to avoid that the potential effects of AGOs could be masked at later infectious stage, when the accumulation levels of the genomic viroid RNA increase very rapidly. Plants of *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures for expressing HA-AGO7 and GUS, as well as mock-inoculated plants, were included as controls based on previous results (Fig. 2). Analysis by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization showed that the titer of *mc* and *ml* PSTVd (+) RNAs in plants expressing HA-AGO1 and HA-AGO2 was lower than that of the controls expressing HA-AGO7 and GUS (Fig. 6A). Similar effects (attenuation of the titer of *mc* and *ml* PSTVd (+) RNAs with respect to the same controls) were observed in plants expressing HA-AGO4 and HA-AGO5 (Fig. 6B).

These results are consistent with the view that AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5, loaded with vd-sRNAs and forming part of RISC, target PSTVd RNAs. Thus, not only DCLs —as revealed by the generation of vd-sRNAs in viroid infected tissues (see above)— but also RISCs, seem to operate in containing viroid titer below certain levels.

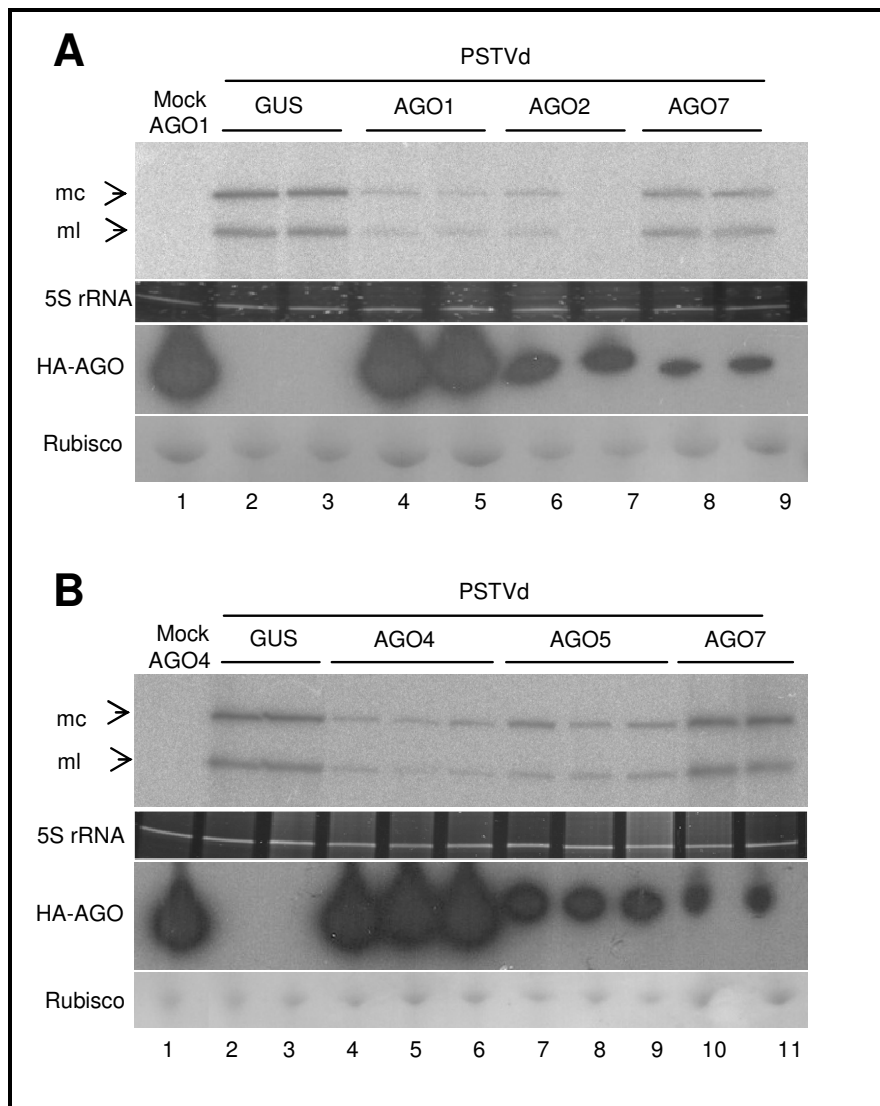


Fig. 6. Agroexpression of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5, but neither of AGO7 nor of GUS, attenuates viroid accumulation. Northern-blot hybridizations with a full-length radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands of total RNAs from halos of mock- and PSTVd-inoculated *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures of *A. tumefaciens* with binary plasmids for expressing HA-tagged AGO1 (panel **A**, lanes 1, 4 and 5), AGO2 (panel **A**, lanes 6 and 7), AGO4 (panel **B**, lanes 1, 4, 5 and 6), AGO5 (panel **B**, lanes 7, 8 and 9) and AGO7 (panel **A**, lanes 8 and 9, and panel **B**, lanes 10 and 11), and GUS (panels **A** and **B**, lanes 2 and 3). Mock inoculations were performed as indicated in the legend to Fig. 3. Total RNAs, extracted two days after agroinfiltration, were separated by denaturing PAGE in 5% gels, and equal loading was assessed by the intensity of tRNA after staining with ethidium bromide. Western-blot analyses of total proteins from halos were carried out with the anti-HA monoclonal antibody following protein separation by PAGE in 4-12% gels; equal loading was assessed by the intensity of the large subunit of Rubisco after staining with Ponceau S. In all cases samples were processed two days after agroinfiltration of plants that were PSTVd-infected, or mock-inoculated, eight days before.

Deep sequencing confirms loading of vd-sRNA by the endogenous AGO1 of *N. benthamiana* infected by PSTVd. As a final control in an experimental context excluding agroexpression of AGO proteins from *A. thaliana*, we also performed a deep sequencing analysis of the vd-sRNAs in the input and IP generated by a polyclonal antibody against the endogenous AGO1 from PSTVd-infected *N. benthamiana* (Fig. 1C). The analysis of the two bar-coded samples run in the same channel resulted in 3.839.392 reads of 18-26 nt vd-sRNAs (8.5% of total reads of the input) and 4.270.376 reads of 18-26 nt vd-sRNA (9.3% of total reads of the IP). While the proportion of vd-sRNAs of 21, 22 and 24 nt in the input were similar (27-32%), the 21- and 22-nt vd-sRNAs in the IP amounted to 63 and 28%, respectively, with those of 24 nt only representing 2% (Table S3). Therefore, AGO1 from *N. benthamiana* exerted a size selection on the vd-sRNAs similar to its homologue from *A. thaliana*, displaying a clear preference for binding those of 21 and (to lower extent) 22 nt. Regarding polarity, the (+) and (-) vd-sRNAs in the input represented 66 and 34%, respectively, while the ratio in the IP was reversed (39 and 61%, respectively). The size selection exerted by AGO1 from *N. benthamiana* on vd-sRNAs (see above) was not significantly influenced by their polarity.

An enrichment/depletion analysis of vd-sRNA reads in the IP versus the input showed a significant enrichment in the IP of (+) and (-) vd-sRNAs of 21 and 22 nt (but not of 24 nt) with a 5'-terminal U (but not with the three other 5'-terminal nucleotides) (Fig. 7). Therefore, regarding binding specificity for vd-sRNAs, AGO1 from *N. benthamiana* behaved similarly to its agroexpressed homologue from *A. thaliana*.

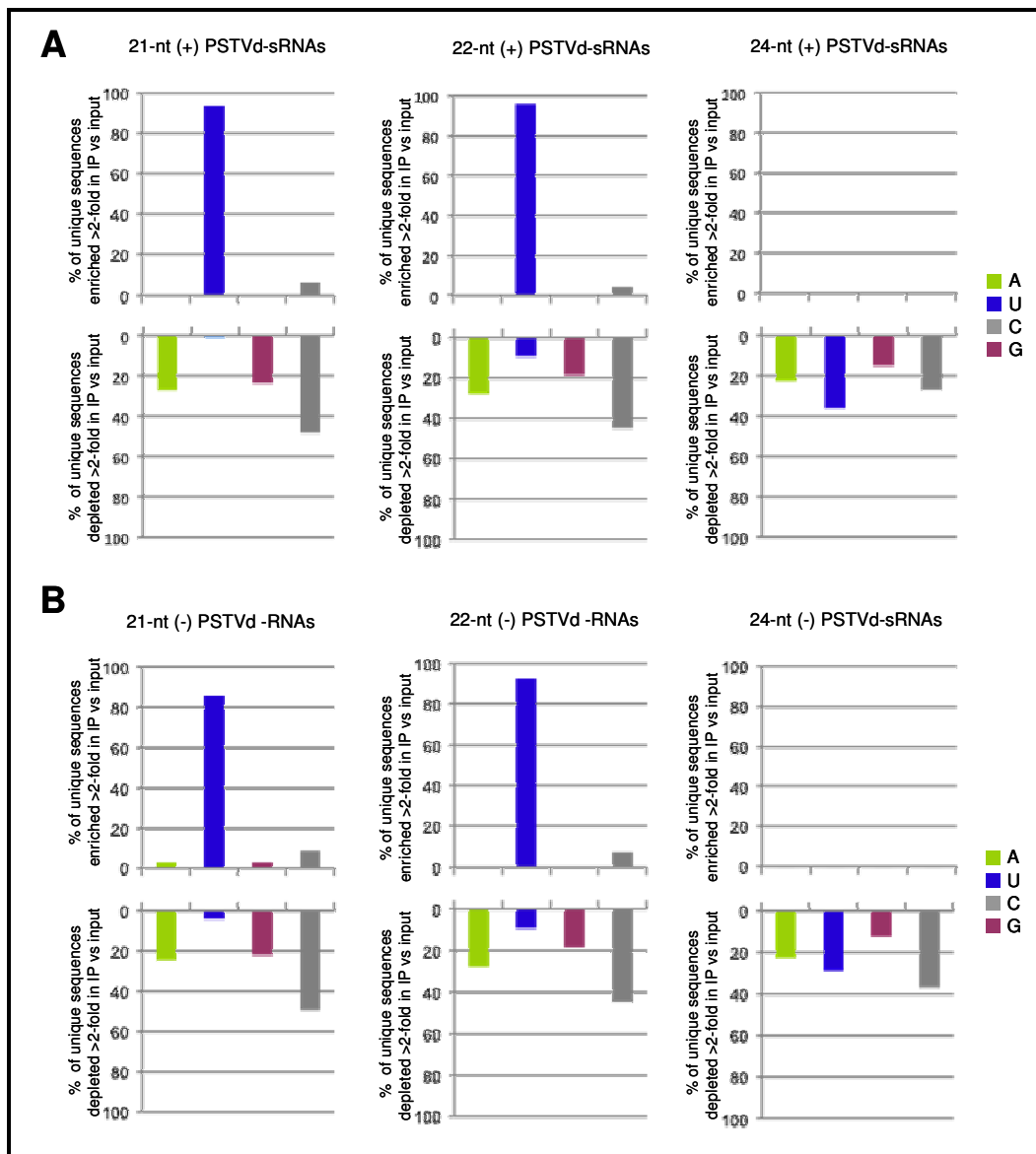


Fig. 7. Analysis of vd-sRNAs in the IP versus the INPUT generated by a polyclonal antibody against AGO1 from *N. benthamiana* reveals a clear enrichment in the IP of (+) (A) and (-) (B) vd-sRNAs of 21 and 22 nt (but not of 24 nt) with a 5'-terminal U. IP enrichment or depletion was determined for each unique 21-, 22- or 24-nt vd-sRNA as $\log_2 [(IP \text{ reads} + 1)/(INPUT \text{ reads} + 1)]$, and plotted for each size class as the fraction (%) of unique vd-sRNA sequences enriched >2 -fold ($\log_2 > 1$) or depleted >2 -fold ($\log_2 < 1$) in the IP compared.

Finally, the profile of vd-sRNAs loaded by AGO1 from *N. benthamiana* presented a specific hot spot distribution along the viroid genome (Fig. 7 or 8), thus recapitulating the situation previously observed with the agroexpressed AGOs from *A. thaliana*. However, the vd-sRNA profiles corresponding to the agroinfiltrated AGO1 from *A. thaliana* and the endogenous AGO1 from *N. benthamiana* differed, most likely because of the different experimental conditions: in the first instance the AGO1 from *A. thaliana* was over-expressed,

while in the second instance the accumulation of the endogenous AGO1 should be considerably lower and possibly subjected to developmental regulation.

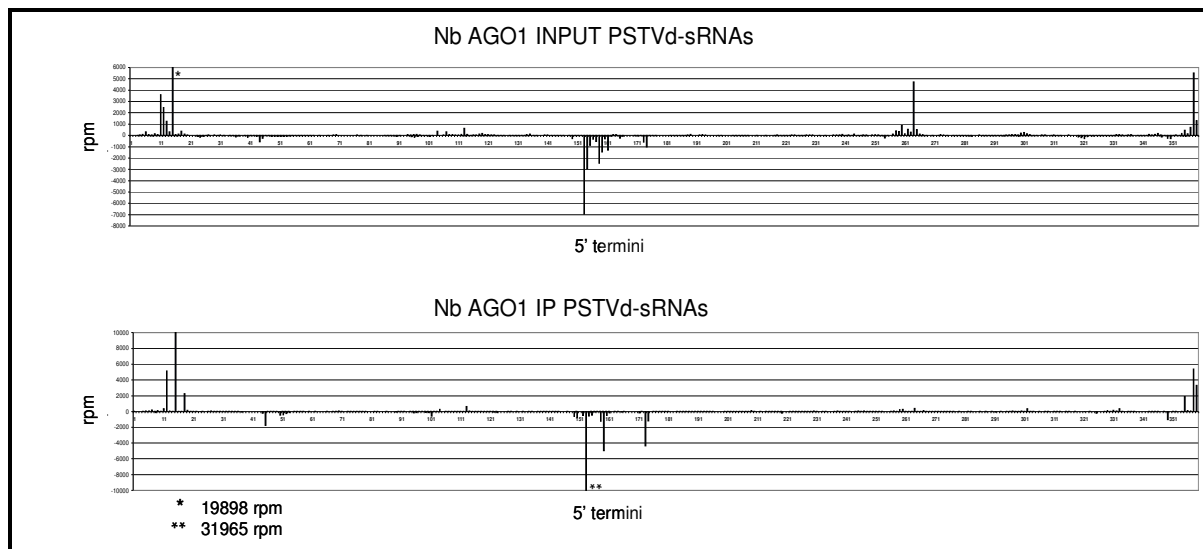


Fig. 8. AGO1-loaded vd-sRNAs adopt along the viroid genome a hot spot distribution in PSTVd-infected *N. benthamiana*. Location and frequency in the genomic PSTVd RNA of the 5' termini of the plus-strand (positive values) and minus-strand (negative values) vd-sRNA reads per million (rpm) from total RNAs (INPUT, top panel) and from the immunoprecipitate (IP, bottom panel) generated with an anti-*Nicotiana benthamiana* AGO1 (Nb AGO1) polyclonal antibody. Other details as in the legend to figure 5.

DISCUSSION

Our first immunoprecipitation assays, using PSTVd-infected leaves of *N. benthamiana* and a polyclonal antibody specific for its endogenous AGO1, showed that this protein indeed binds preferentially vd-sRNAs with the expected size (21- 22 nt). However, PSTVd infection of *N. benthamiana* did not affect significantly the accumulation of either endogenous AGO1 or miR168 (which regulates AGO1 mRNA expression), as opposed to the situation observed in the same host following infection by different RNA viruses (42, 60). Considering that in the latter case the specific induction of miR168 is promoted by viral-encoded protein suppressors of RNA silencing, and that PSTVd is a non-protein coding RNA, this result is not surprising. Moreover, it does not either favor that vd-sRNAs, as proposed previously for transgene siRNAs and endogenous siRNAs and miRNAs (68), could compete to bind to AGO1 and lead to a reduction in AGO1-miR168 complexes and a decline in AGO1 mRNA cleavage. However, recent data indicate that infection by citrus exocortis viroid, a close

relative of PSTVd, induces the accumulation of other enzymes mediating RNA silencing steps in tomato (69). Whether this accumulation is a direct or indirect effect, and which is the nature of the underlying mechanism, remains unknown.

Previous reports indicate that viroids are significantly resistant to RISC-mediated degradation (47, 70, 71), suggesting that they may have evolved their secondary structures as a response against this selection pressure. In such a scenario, the compact secondary structure of PSTVd (+) strands may hinder their targeting (and inactivation) by AGO proteins loaded with vd-sRNAs, being even more difficult targeting PSTVd (-) strands because they mostly form part of double-stranded replicative complexes (8). From an alternative perspective, the secondary structure of viroids could have emerged as a compromise between resistance to DCL and RISC, which act preferentially against RNAs with compact and relaxed conformations, respectively (48). Indeed, data obtained in other experimental contexts indicate that viroids are RISC-sensitive (46, 48, 49, 52), and recent results show that RISC promotes cleavage of viral RNAs with a packed secondary structure—resembling that of viroids—by targeting bulged regions within this structure (72). However, the evidence that one or more AGOs are loaded with vd-sRNAs and function in antiviral RISC is circumstantial, with no data providing direct support for this view.

The finding in tissues infected by typical members of both viroid families of vd-sRNAs with the characteristic features of DCL products (see above), does not necessarily entail their loading in one or more AGO proteins. Previous data from a study with an RNA virus have shown that the bulk of virus-derived sRNAs in latently infected *Drosophila* cells are not loaded into any AGO member, suggesting that dicing of viral dsRNAs, by itself, plays a key function in maintaining the latent state (73). Although dicing of the snap-folded genomic viroid ssRNA (or, more likely, of its dsRNA replication intermediates) could play a role in containing infection below a threshold value, extension of the “dicing-only” model to PSTVd does not seem justified. In support of this view, when nine of the ten AGOs from *A. thaliana* were agroexpressed in PSTVd-infected leaves of *N. benthamiana* all, except AGO6, AGO7 and AGO 10, bound vd-sRNAs: AGO1, AGO2 and AGO3 those of 21 and 22 nt, while AGO4, AGO 5 and AGO9 bound additionally those of 24 nt. Deep sequencing showed that, when agroexpressed in PSTVd-infected *N. benthamiana* leaves, AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 bound the vd-sRNA, particularly those of 21 and 22 nt, primarily according to their 5'-terminal nucleotide, as reported previously for endogenous and viral sRNAs (34, 35, 63). Moreover, the ratio of vd-sRNA to total sRNAs in the AGO-IPs was higher than that in the inputs, indicating that vd-sRNA were loaded into these AGO proteins even with some

preference. Therefore, DCLs could function as the first defense barrier against viroid infection and, additionally, provide vd-sRNAs for priming the second RISC-based defensive barrier.

Viroids, lacking protein-coding ability, might have also evolved a sort of RNA-mediated decoy mechanism protecting them against RNA silencing similar to that developed by alphaviruses, like Semliki forest virus (SFV), which neither encode RNA silencing suppressors. More specifically, alphaviruses have been proposed to produce decoy virus-derived sRNAs to hamper the RNA silencing machinery and to provide time to the virus for replication before being eventually silenced (74). In consonance with this view, the predominant virus sRNAs derived from hot spots are less effective at silencing SFV accumulation than those derived from cold spots (74). Regarding viroids, infections by PSTVd and the chloroplast-replicating peach latent mosaic viroid (PLMVd) (75), are accompanied by large amounts of vd-sRNAs (44, 45; this work). Moreover, the experimental evidence available supports that vd-sRNAs, mapping at cold spots, are biologically active. Specifically, variants of PLMVd inducing a severe albinism have a particular hairpin insertion of 12-14 nt (76, 77), and two low-abundant (-) vd-sRNAs containing this insertion target for cleavage—as predicted by RNA silencing—the peach mRNA coding for cHSP90 involved in plastid-to-nucleus signal transduction (51). The two vd-sRNAs are of 21-nt, fulfill the criteria for being functional sRNAs (78, 79), and have a 5'-terminal U indicating that they are most likely loaded in AGO1; these criteria are also met by a 22-nt RNA, which contains the region responsible for the yellow phenotype incited by the Y satellite RNA of CMV and directs cleavage, via RNA silencing, of the mRNA of a gene involved in chlorophyll biosynthesis (80, 81). A similar mechanism has been proposed for the phenotypes induced by artificial miRNAs (amiRNAs) derived from the virulence-modulating region of PSTVd (82), although the evidence is indirect and the amiRNAs do not fulfill all the above-mentioned criteria. The finding that host mRNAs are targeted by AGOs loaded with sRNAs derived from viroids and satellite RNAs, supports that these subviral replicons, like RNA viruses, are also targets of RISC.

Previously, hypomorphic *ago1* mutants have been tested against virus infection, with their hypersensitive reaction and overaccumulation of viral RNA being interpreted as a confirmation of the involvement of RNA silencing, and particularly of AGO1, in antiviral defense (31). Here we have taken the opposite approach: to overexpress certain AGO proteins and examine whether they result in viroid underaccumulation. Specifically, the synchronized overexpression of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 in leaves of *N. benthamiana* at early stages of PSTVd infection has facilitated the observation of the attenuating effects of these

proteins on viroid titer. These results, together with the specific loading of vd-sRNAs of the expected size and 5'-terminal nucleotide by agroinfiltrated AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 from *A. thaliana*, as well as by the endogenous AGO1 of *N. benthamiana*, are consistent with the view that those members of the AGO family may play a role in anti-PSTVd defense.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs. A. Takeda and Y. Watanabe for kindly providing *35S:HA-AGO3*, *35S:HA-AGO4*, *35S:HA-AGO5*, *35S:HA-AGO6*, *35S:HA-AGO8* and *35S:HA-AGO9* constructs, to Dr. N. Fahlgren for helping in developing scripts for the deep sequencing analyses, to Dr. M. Cambra for a rabbit preimmune serum, to Dr. J. Burgyan for a rabbit polyclonal antibody against the N-terminal region of AGO1 from *N. benthamiana* that we used in preliminary experiments, and to A. Ahuir for excellent technical assistance. Research in R.F. laboratory is currently funded by grant BFU2011-28443 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Spain). S.M. has been supported by a fellowship and a predoctoral contract from MINECO. Research in B.N. and F.D.S. laboratory has been funded by the a dedicated grant of the Ministero dell'Economia e Finanze Italiano to the CNR (CISIA, Legge n. 191/2009). Research in J.C.C. laboratory was supported by grants from the National Science Foundation (MCB-0956526, MCB-1231726) and National Institutes of Health (AI043288).

REFERENCES

1. **Flores R, Hernández C, Martínez de Alba AE, Daròs JA, Di Serio F.** 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:117-139.
2. **Tsagris EM, Martínez de Alba AE, Gozmanova M, Kalantidis K.** 2008. Viroids. *Cell Microbiol.* **10**:2168–2179.
3. **Ding B.** 2009. The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**:105-131.
4. **Diener TO.** 1967. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* **158**:378-381.
5. **Gross HJ, Domdey H, Lossow C, Jank P, Raba M, Alberty H, Sänger HL.** 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* **273**:203-208.
6. **Grill LK, Semancik JS.** 1978. RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**:896-900.
7. **Ishikawa M, Meshi T, Ohno T, Okada Y, Sano T, Ueda I, Shikata E.** 1984. A revised replication cycle for viroids: the role of longer than unit RNA in viroid replication. *Mol. Gen. Genet.* **196**:421-428.
8. **Branch AD, Benenfeld BJ, Robertson HD.** 1988. Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:9128-9132.
9. **Feldstein PA, Hu Y, Owens RA.** 1998. Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:6560-6565.
10. **Daròs JA, Flores R.** 2004. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:6792-6797.
11. **Mühlbach HP, Sänger HL.** 1979. Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature* **278**:185-188.
12. **Flores R, Semancik JS.** 1982. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**:6285-6288.
13. **Schindler IM, Mühlbach HP.** 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* **84**:221-229.

14. **Gas ME, Hernández C, Flores R, Daròs JA.** 2007. Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog.* **3**:1813-1826.
15. **Nohales MA, Flores R, Daròs JA.** 2012. Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**:13805-13810.
16. **Gas ME, Molina-Serrano D, Hernández C, Flores R, Daròs JA.** 2008. Monomeric linear RNA of citrus exocortis viroid resulting from processing *in vivo* has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: implications for the ribonuclease and RNA ligase involved in replication. *J. Virol.* **82**:10321-10325.
17. **Flores R, Daròs JA, Hernández C.** 2000. The *Avsunviroidae* family: viroids with hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.* **55**:271-323.
18. **Qi Y, Péliissier T, Itaya A, Hunt E, Wassenegger M, Ding B.** 2004. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell* **16**:1741-1752.
19. **Zhong X, Tao X, Stombaugh J, Leontis N, Ding B.** 2007. Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.* **26**:3836-3846.
20. **Takeda R, Petrov AI, Leontis NB, Ding B.** 2011. A three-dimensional RNA motif in potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **23**:258-272.
21. **Zhong X., Archual AJ, Amin AA, Ding B.** 2008. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell* **20**:35-47.
22. **Carthew RW, Sontheimer EJ.** 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**:642-655.
23. **Ding SW.** 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**:632-644.
24. **Axtell MJ.** 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**:137-159.
25. **Incarbone M, Dunoyer P.** 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci.* **18**:382-392.
26. **Pumplin N, Voinnet O.** 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**:745-760.
27. **Schiebel W., Péliissier T, Riedel L, Thalmeir S, Schiebel R, Kempe D, Lottspeich F, Sänger HL, Wassenegger M.** 1998. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* **10**:2087-2101.

28. **Voinnet O.** 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* **13**:317-328.
29. **Mallory A, Vaucheret H.** 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* **22**:3879-3889.
30. **Bologna NG, Voinnet O.** 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**:473-503.
31. **Morel JB, Godon C, Mourrain P, Béclin C, Boutet S, Feuerbach F, Proux F, Vaucheret H.** 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**:629-639.
32. **Baumberger N, Baulcombe DC.** 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:11928-11933.
33. **Qu F, Ye X, and Morris TJ.** 2008. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:14732-14737.
34. **Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, AL Alexander, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC.** 2008. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**:128-141.
35. **Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y.** 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* **49**:493-500.
36. **Alvarado VY, Scholthof HB.** 2011. AGO2: a new Argonaute compromising plant virus accumulation. *Front. Plant Sci.* **2**:article 112.
37. **Carbonell A, Fahlgren N, García-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T, Cuperus JT, Carrington JC.** 2012. Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* **24**:3613-3629.
38. **Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE.** 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**:716-719.
39. **Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC.** 2010. The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* **22**:321-334.

40. **Qi Y, He X, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ.** 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**:1008-1012.
41. **Mallory AC, Hinze A, Tucker MR, Bouché N, Gascioli V, Elmayan T, Laressergues D, Jauvion V, Vaucheret H, Laux T.** 2009. Redundant and specific roles of the ARGONAUTE Proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. *PLoS Genet* **5**:e1000646.
42. **Várallyay E., Valoczi A, Agyi A, Burgyán J, Havelda Z.** 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.* **29**:3507–3519.
43. **Nakasugi K., Crowhurst RN, Bally J, Wood CC, Hellens RP, Waterhouse PM.** 2013. De novo transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* **8**:e59534.
44. **Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F.** 2012. Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* **94**:1474-1480.
45. **Hamann C, Steger G.** 2012. Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.* **9**:809-819.
46. **Vogt U, Pelissier T, Putz A, Razvi F, Fischer R, Wassenegger M.** 2004. Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.* **1**:107-118.
47. **Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, Harris AR, Molina C, Nelson RS, Ding B.** 2007. A structured viroid RNA is substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J. Virol.* **81**:2980-2994.
48. **Carbonell A, Martínez de Alba AE, Flores R, Gago S.** 2008. Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with infection of representative members of the two viroid families. *Virology* **371**:44-53.
49. **Schwind N, Zwiebel M, Itaya A, Ding B, Wang MB, Krczal G, Wassenegger M.** 2009. RNAi-mediated resistance to potato spindle tuber viroid in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Mol. Plant Pathol.* **10**:459-469.
50. **Di Serio F, Martínez de Alba AE, Navarro B, Gisel A, Flores R.** 2010. RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a nuclear-replicating viroid. *J. Virol.* **84**:2477-2489.

51. **Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F.** 2012. Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.* **70**:991-1003.
52. **Serra P, Bani-Hashemian SM, Fagoaga C, Romero J, Ruiz-Ruiz S, Gorris MT, Bertolini E, Duran-Vila N.** 2014. Virus-viroid interactions: citrus tristeza virus enhances the accumulation of citrus dwarfing viroid in Mexican lime via the viral-encoded silencing suppressors. *J. Virol.* **88**:1394-1397.
53. **Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sänger HL.** 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants, *Cell* **76**:567-576.
54. **Martínez G, Castellano M, Tortosa M, Palls V, Gómez G.** 2014. A pathogenic non-coding RNA induces changes in dynamic DNA methylation of ribosomal RNA genes in host plants. *Nucleic Acids Res.* **42**:1553-1562.
55. **Grimsley N, Hohn B, Hohn T, Walden R.** 1986. Agroinfection, an alternative route for viral-infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:3282-3286.
56. **Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC.** 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**:2053-2056.
57. **Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA, Carrington JC.** 2010. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**:997-1003.
58. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
59. **Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL.** 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**:R25.
60. **Vrallyay E, Havelda Z.** 2013. Unrelated suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.* **14**:567-575.
61. **Mallory AC, Vaucheret H.** 2009. ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep.* **10**:521-526.
62. **Matousek J, Kozlov P, Orctová L, Schmitz A, Pesina K, Bannach O, Diermann N, Steger G, Riesner D.** 2007. Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase of nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* **388**:1-13.

63. **Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, Chen S, Hannon GJ, Qi Y.** 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**:116-127.
64. **Ho T, Wang H, Palletta D, Dalmay T.** 2007. Evidence for targeting common siRNA hotspots and GC preference by plant Dicer-like proteins *FEBS Lett.* **581**:3267-3272.
65. **Zhang Y, Chenghuan Y, Hanhui K.** 2014. GC content fluctuation around plant small RNA-generating sites. *FEBS Lett.* **588**:764-769.
66. **Qi Y, Ding B.** 2003. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* **15**:1360-1374.
67. **Schnölzer M, Haas B, Ramm K, Hofmann H, Sängler HL.** 1985. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.* **4**:2181-2190.
68. **Martínez de Alba AE, Jauvion V, Mallory AC, Bouteiller N, Vaucheret H.** 2011. The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**:9339-9344.
69. **Campos L, Granell P, Tárraga S, López-Gresa P, Conejero V, Bellés JM, Rodrigo I, Lisón P.** 2014. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* **77**:35-43.
70. **Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, RM Wu, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A, Dennis ES, Waterhouse PM.** 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:3275-3280.
71. **Gómez G, Pallás V.** 2007. Mature monomeric forms of hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.* **51**:1041-1049.
72. **Schuck J, Gursinsky T, Pantaleo V, Burgyan J, Behrens SE.** 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Res.* **41**:5090-50103.
73. **Flynt A, Liu N, Martin R, Lai EC.** 2009. Dicing of viral replication intermediates during silencing of latent Drosophila viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**:5270-5275.
74. **Siu RW, Fragkoudis R, Simmonds P, Donald CL, Chase-Topping ME, Barry G, Attarzadeh-Yazdi G, Rodriguez-Andres J, Nash AA, Merits A, Fazakerley JK, Kohl A.** 2011. Antiviral RNA interference responses induced by Semliki Forest virus infection of mosquito cells: characterization, origin, and frequency-dependent functions of virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.* **85**:2907-2917.

75. **Hernández C, Flores R.** 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:3711-3715.
76. **Malfitano M, Di Serio F, Covelli L, Ragozzino A, Hernández C, Flores R.** 2003. Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* **313**:492-501.
77. **Rodio ME, Delgado S, De Stradis AE, Gómez MD, Flores R, Di Serio F.** 2007. A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* **19**:3610-3626.
78. **Iwakawa HO, Tomari Y.** 2013. Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell* **52**:591-601.
79. **Liu Q, Wang F, Axtell MJ.** 2014. Analysis of complementarity requirements for plant microRNA targeting using a *Nicotiana benthamiana* quantitative transient assay. *Plant Cell* **26**:741-753.
80. **Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba JI, Sueda K, Burguán J, Masuta C.** 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* **7**:e1002021.
81. **Smith NA, Eamens AL, Wang MB.** 2011. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* **7**:e1002022.
82. **Eamens AL, Smith NA, Dennis ES, Wassenegger M, Wang MB.** 2014. In *Nicotiana* species, an artificial microRNA corresponding to the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid directs RNA silencing of a soluble inorganic pyrophosphatase gene and the development of abnormal phenotypes. *Virology* **450-451**:266-277.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Distribution of sequence inserts *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated with HA-tagged AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 from *Arabidopsis thaliana*.

Sample	Total reads	Fraction (%)	Inserts 18-26 nt (%)	PSTVd-sRNAs (%)
AGO1 INPUT	32556497	23.7	94.2	22.2
AGO2 INPUT	32562478	23.7	94.9	22.4
AGO1 IP	40223213	29.3	82.9	34.0
AGO2 IP	32160810	23.4	96.4	52.6
TOTAL	137502998			

Sample	Total reads	Fraction (%)	Inserts 18-26 nt (%)	PSTVd-sRNAs (%)
AGO4 INPUT	56330301	26.9	92.9	10.9
AGO5 INPUT	40232579	19.2	92.9	15.4
AGO4 IP	52755419	25.2	97.0	13.7
AGO5 IP	60010056	28.7	90.2	28.2
TOTAL	209328355			

Table S2. Length and fraction (%) of PSTVd-sRNA sequenced inserts from inputs and immunoprecipitates of PSTVd-infected *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated with HA-tagged AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 from *Arabidopsis thaliana*.

Length (nt)	INPUT AGO1	INPUT AGO2	INPUT AGO4	INPUT AGO5	IP AGO1	IP AGO2	IP AGO4	IP AGO5
18	0.6	0.6	0.8	0.79	0.2	0.1	0.23	0.41
19	1.1	0.9	1.28	1.32	0.4	0.2	0.48	1.21
20	5.8	4.4	5.65	4.57	3.2	1.8	2.56	2.24
21	44.0	43.7	44.82	44.43	50.8	74.3	25.87	34.54
22	36.6	38.0	36.07	36.28	43.0	22.8	47.6	48.33
23	2.5	2.4	2.21	2.59	1.0	0.4	4.22	2.73
24	9.0	9.5	8.82	9.52	1.2	0.2	18.32	9.99
25	0.3	0.3	0.28	0.38	0.2	0.0	0.57	0.37
26	0.1	0.1	0.08	0.13	0.0	0.0	0.15	0.17

Table S3. Length and fraction (%) of PSTVd-sRNA sequenced inserts from the input and immunoprecipitate (obtained with a polyclonal antibody specific for the endogenous AGO1) of PSTVd-infected *Nicotiana benthamiana*.

Length (nt)	INPUT AGO1 Nb	IP AGO1 Nb
18	1.4	0.4
19	1.4	0.8
20	5.1	3.8
21	30.4	63.3
22	26.9	28.3
23	2.2	1.0
24	32.1	2.2
25	0.5	0.1
26	0.1	0.0

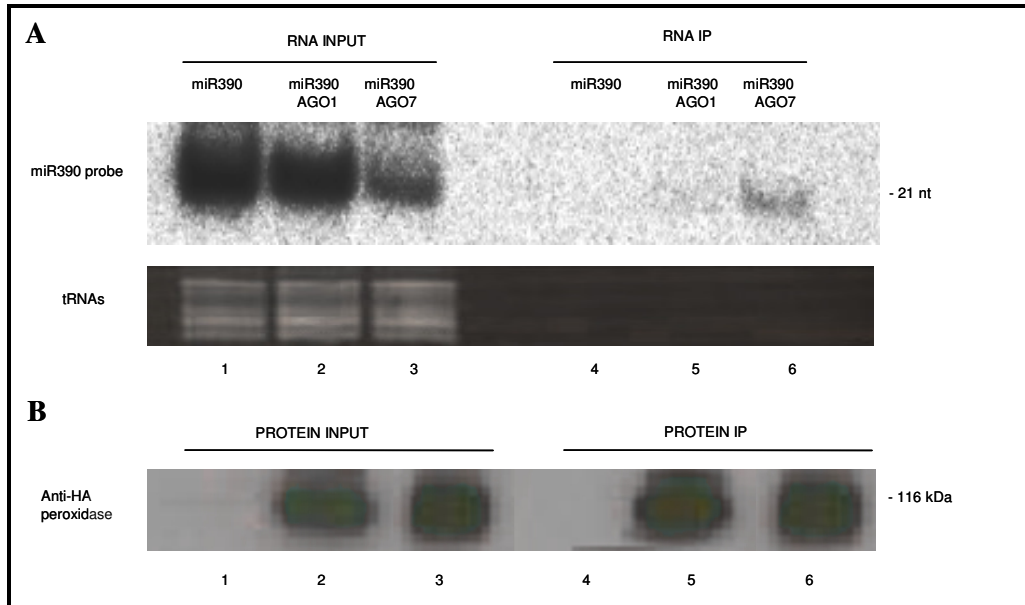


Fig. S1. AGO7, but not AGO1, binds specifically miR390. **(A)** Northern-blot hybridizations with a 5'-radiolabeled oligodeoxyribonucleotide complementary to miRNA390 of total RNAs (Input) from *N. benthamiana* agroinfiltrated with a culture of *A. tumefaciens* with a binary plasmid for expressing miR390 (lane 1), and coagroinfiltrated with this same culture and others carrying plasmids for expressing HA-tagged AGO1 (lane 2) or AGO7 (lane 3). RNA immunoprecipitates (IP) generated with an anti-HA monoclonal antibody from the halos agroexpressing miR390, miR390 plus HA-AGO1, and miR390 plus HA-AGO7, were similarly analyzed (lanes 4 to 6, respectively). RNAs were separated by denaturing PAGE in 17% gels, and equal loading was assessed by the intensity of tRNA after staining with ethidium bromide. **(B)** Western-blot analysis with an anti-HA-peroxidase monoclonal antibody showing similar AGO1 and AGO7 accumulation in inputs and IPs. Total proteins were separated by PAGE in 4-12% gels.

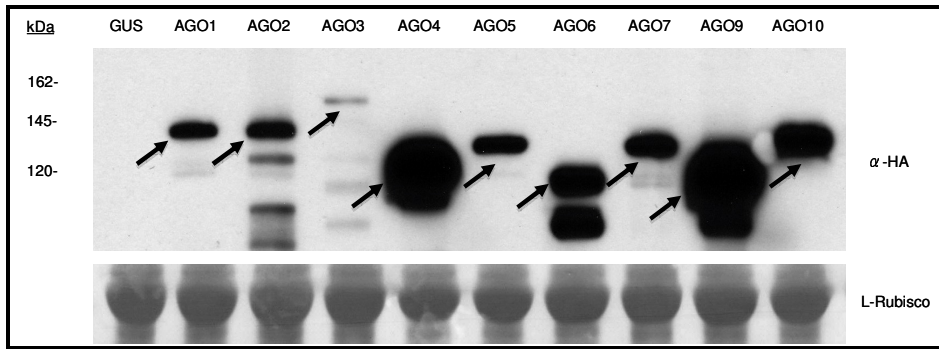


Fig. S2. Even if with different extension, all agroinfiltrated AGOs are expressed in leaves of *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures of *A. tumefaciens* with binary plasmids for expressing HA-tagged versions of nine of the ten AGOs from *A. thaliana*. Western-blot analysis was performed with an anti-HA-peroxidase monoclonal antibody. Total proteins were separated by PAGE in 4-12% gels and equal loading was assessed by the intensity of the large subunit of Rubisco after staining with Ponceau S.

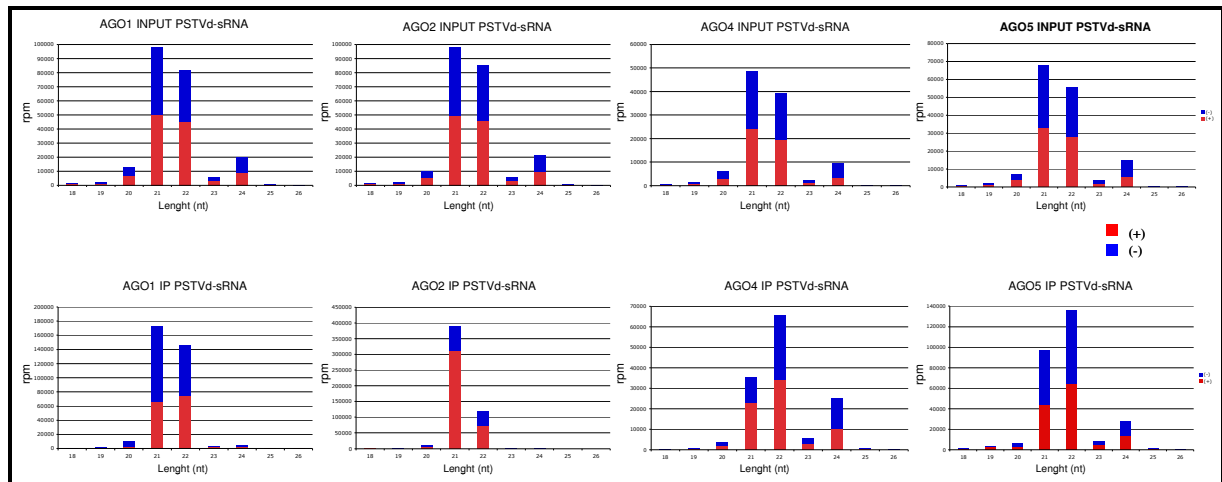


Fig. S3. Histograms comparing the distribution of the 18–26-nt reads from plus (red) and minus (blue) PSTVd-sRNAs in total RNAs (Input) and immunoprecipitates (IP) from halos of PSTVd-infected *N. benthamiana* agroinfiltrated with cultures of *A. tumefaciens* with binary plasmids for expressing HA-tagged versions of AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 from *A. thaliana*. The IP fractions were generated with an anti-HA monoclonal antibody.

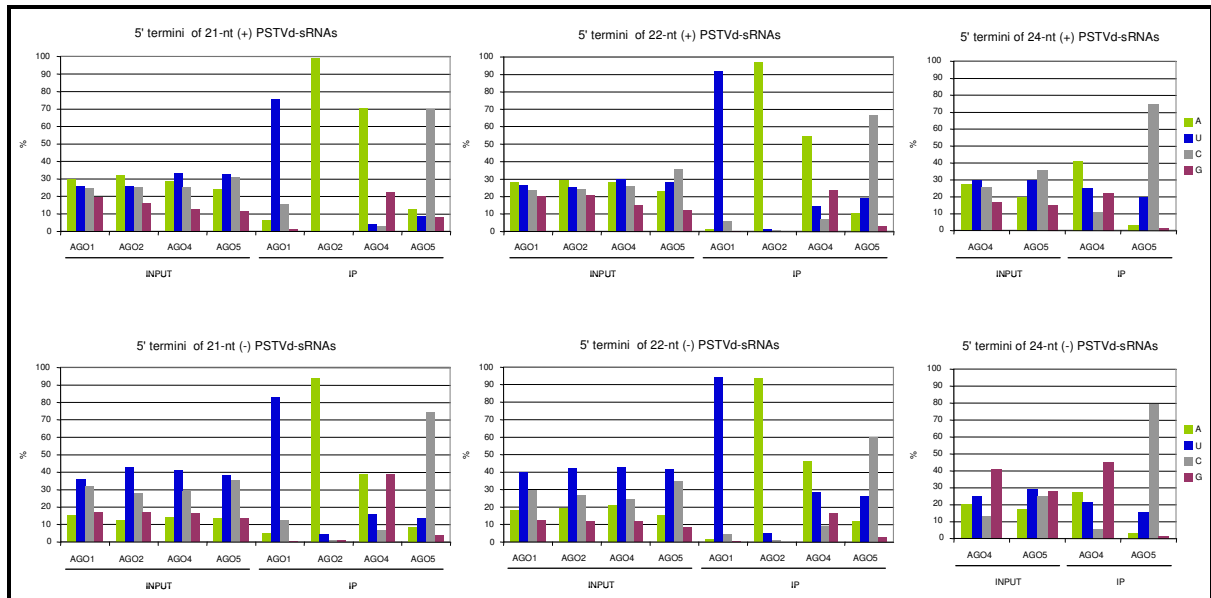


Fig. S4. HA-tagged AGO1, AGO2, AGO4 and AGO5 from *A. thaliana* agroexpressed in PSTVd-infected *N. benthamiana* bind (+) and (-) PSTVd-sRNAs essentially according to their 5'-terminal nucleotide. The histograms display, in total RNA (inputs) and in RNA immunoprecipitates (IPs), the fraction (in %) of total reads corresponding to the 21-, 22- and 24-nt PSTV-sRNAs of both polarities with distinct 5' termini.

CAPÍTULO 2

Viroid RNA turnover: characterization of the subgenomic RNAs of potato spindle tuber viroid accumulating in infected tissues provides insights into decay pathways operating *in vivo*

Viroid RNA turnover: characterization of the subgenomic RNAs of potato spindle tuber viroid accumulating in infected tissues provides insights into decay pathways operating *in vivo*

Sofia Minoia¹, Beatriz Navarro², Sonia Delgado¹, Francesco Di Serio^{2,*}, and Ricardo Flores^{1,*}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain, and ²Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, UOS Bari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italy

Nucleic Acids Research (in press), 2015

doi: 10.1093/nar/gkv034.

ABSTRACT

While biogenesis of viroid RNAs is well-known, how they decay is restricted to data involving host RNA silencing. Here we report an alternative degradation pathway operating on potato spindle tuber viroid (PSTVd), the type species of nuclear-replicating viroids (family *Pospivioidae*). Northern-blot hybridizations with full- and partial-length probes revealed a set of PSTVd (+) subgenomic (sg)RNAs in early-infected eggplant, some partially overlapping and reaching levels comparable to those of the genomic circular and linear forms. Part of the PSTVd (+) sgRNAs were also observed in *Nicotiana benthamiana* (specifically in the nuclei) and tomato, wherein they have been overlooked due to their low accumulation. Primer extensions of representative (+) sgRNAs failed to detect a common 5' terminus, excluding that they could result from aborted transcription initiated at one specific site. Supporting this view, 5'- and 3'-RACE indicated that the (+) sgRNAs have 5'-OH and 3'-P termini most likely generated by RNase-mediated endonucleolytic cleavage of longer precursors. These approaches also unveiled PSTVd (-) sgRNAs with features similar to their (+) counterparts. Our results provide a mechanistic insight on how viroid decay may proceed *in vivo* during replication, and suggest that synthesis and decay of PSTVd strands might be coupled as in mRNA.

INTRODUCTION

Viroids are a singular class of subviral replicons just composed by a small (around 250-400 nt) single-stranded RNA with circular structure and compact folding that results from extensive self-complementarity (1-4). Considering their structural and functional features, viroids have been assigned to two families: i) *Pospiviroidae*, including those that adopt a rod-like secondary structure with a central conserved region, and replicate in the nucleus through an asymmetric rolling-circle mechanism catalyzed by host enzymes (5-7), and ii) *Avsunviroidae* comprising those with a quasi-rod-like or clearly branched secondary structure, and with replication in plastids (mostly chloroplasts) through a symmetric rolling-circle mechanism catalyzed by host enzymes and viroid-embedded hammerhead ribozymes (8-10). A significant portion of past and recent investigations on viroids has been focused on potato spindle tuber viroid (PSTVd), the type species of the family *Pospiviroidae* and the first that was discovered, characterized structurally and sequenced (11-14), which has thus become a model system. The picture that has emerged from numerous studies on the biosynthesis (replication) of PSTVd and closely-related viroids is fairly complete. The RNA polymerase II, redirected to accept RNA templates, transcribes reiteratively the infecting monomeric circular RNA —arbitrarily attributed the (+) polarity— into multimeric complementary (-) strands, which are the templates for a second RNA-RNA transcription catalyzed by the same enzyme that results into multimeric (+) strands (15-18). The latter are cleaved into unit-length forms, presumably by a class III RNase (19,20), and then circularized by DNA ligase I redirected to accept RNA substrates (21). The finding by *in situ* hybridization of PSTVd (+) strands in the nucleolus and nucleoplasm, but of (-) strands only in the nucleoplasm (22), is consistent with RNA polymerization taking place in this latter compartment, while processing of the (+) strands would occur in the nucleolus wherein the precursors of rRNAs and tRNAs are also processed (23).

Viroid accumulation, however, is determined by the balance between replication (transcription and processing) and degradation, with the progress achieved in understanding replication having not been matched with that on viroid decay. This case is not specific for viroids because whereas transcription has been extensively studied for mRNAs —one the most in-depth analyzed classes of cellular RNAs— little is still known on regulation of mRNA degradation and its coupling with transcription (24,25); only very recently it has been shown that mRNA transcription and decay are linked through common factors (26). The

accumulation in tissues infected by members of the two families of viroid-derived small RNAs (vd-sRNAs) with the typical properties of the sRNAs generated by dicer-like enzymes (DCLs) (27-31), clearly indicates that viroids are targeted by this first RNA silencing defensive barrier raised by the host against invading RNAs (32,33). Moreover, the subsequent loading of PSTVd-sRNAs on different Argonaute (AGO) proteins and their attenuating effects observed on PSTVd titer (34), supports the view that viroids are also targeted by the second RNA silencing defensive barrier of the host: the RNA induced silencing complex (RISC), the core of which is invariably formed by one member of the AGO family (35-37). It is likely that other degradation routes may also act on viroid RNAs, but the available information is essentially restricted to: i) the increase in PSTVd-infected tomato of some nucleolytic activities that have been linked to symptom appearance rather than to viroid RNA degradation (38), and ii) the accumulation in immature pollen from hop plants infected by hop latent viroid (family *Pospiviroidae*) of viroid RNA fragments (100 to 230 nt) that were not further characterized and have been associated with developmentally activated nucleases (39).

In the course of our studies on PSTVd infection in different solanaceous hosts, we have consistently observed in eggplant a pattern of viroid subgenomic RNAs (sgRNAs) accompanying the monomeric circular (*mc*) and linear (*ml*) forms. Molecular analysis of the PSTVd-sgRNAs, including their size and terminal groups, has expanded our view upon how viroid decay occurs.

MATERIALS AND METHODS

Host plants and viroid source

Seedlings from eggplant (*Solanum melongena* L.) cv. 'Black beauty', *Nicotiana benthamiana*, and tomato (*S. lycopersicum* L.) cv. 'Rutgers', were maintained in a growth chamber (28°C with fluorescent light for 16 h and 25°C in darkness for 8 h). At the cotyledon/first true leaf stage they were mock- or viroid-inoculated by: i) agroinfiltration (eggplant and *N. benthamiana*) with cultures of *Agrobacterium tumefaciens* C58 carrying a binary plasmid with a head-to-tail dimeric insert of PSTVd (NB variant, GenBank accession number AJ634596.1) under the control of the 35S promoter of cauliflower mosaic virus (40), or ii) mechanically (tomato) with an RNA preparation from tissue infected with the same PSTVd strain.

RNA extraction and Northern-blot hybridization

Total leaf nucleic acid preparations, obtained by double extraction with buffer-saturated phenol, were ethanol-precipitated, resuspended and separated by denaturing PAGE (in 1X TBE buffer and 8 M urea) on either 5% gels (for unit-length and sgRNAs) or 17% gels (for vd-sRNAs) and stained with ethidium bromide. Equal loading was assessed by the fluorescence emitted by the 5S RNA. Following electrotransference of RNAs to Hybond-N+ membranes (Roche Diagnostics GmbH), they were hybridized with internally radiolabeled full-length riboprobes (synthesized by *in vitro* transcription) for detecting PSTVd (+) and (-) strands, or with 5'-radiolabeled deoxyribonucleotide probes (prepared with T4 polynucleotide kinase (PK) (Roche Diagnostics GmbH) and [γ P³²]-ATP, 3000 Ci/mmol, Perkin Elmer) complementary to specific regions of the PSTVd (+) RNA (Table S1). Radiolabeling of the probes was according to standard procedures (41). Hybridization was at 70°C in the presence of 50% formamide (for detecting the *mc* and *ml* forms and the sgRNAs with full-length riboprobes), or at 42°C with PerfectHyb Plus hybridization buffer (Sigma) (for detecting *mc* and *ml* forms and the sgRNAs with the deoxyribonucleotide probes, and vd-sRNAs with a full-length riboprobe) (42). After washing at 60°C in 0.1X SSC with 0.1% SDS (for unit-length and sgRNAs), or at 55°C in 1X SSC with 0.1% SDS (for vd-sRNAs), the membranes were analyzed with a phosphoimager (Fujifilm FLA-5100) using programs Image Reader FLA-5100 and Image Gauge 4.0.

Primer extension analysis

Chemically-synthesized primers (Fisher Scientific) were purified as indicated previously (43). PSTVd *ml* forms and sgRNAs were gel-eluted overnight at 37°C with Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 containing 1 mM EDTA and 0.1% SDS, and recovered by ethanol precipitation. The 5' termini of the purified RNAs were determined by primer extension catalyzed by reverse transcriptase (SuperScript II RNase H⁻; Invitrogen) as reported before (44) with the exception that primers (Table S2) were previously 5'-labeled as indicated above. The extension products were run in 6% sequencing polyacrylamide gels in parallel with four sequencing ladders, generated by T7 DNA polymerase-catalyzed extensions of the same 5'-radiolabeled primers in reaction mixtures containing a recombinant plasmid with a full-length PSTVd-cDNA insert and mixtures of deoxy and dideoxy nucleoside triphosphates (Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit, USB, Affimetrix, Inc).

RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends (RLM-RACE)

Unless otherwise stated, two aliquots of each gel-purified RNA, one pretreated with PK and ATP (41), and the other untreated, were fused to an RNA adaptor (5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3') using T4-RNA ligase 1 (Epicentre) and ATP in the buffer recommended by the supplier (Roche Diagnostics GmbH) as previously described (44). When using as control a full-length PSTVd (-) *in vitro* transcript with 5'-triphosphorylated and 3'-hydroxyl termini, one aliquot was left untreated while the other was treated with RNA 5' polyphosphatase (PP) (Epicentre) to convert the 5'-triphosphorylated group into a 5'-monophosphorylated group. The ligation products were reverse transcribed with suitable PSTVd-specific primers, and then PCR-amplified with an adapter-specific primer and viroid-specific primers internal with respect to the preceding ones (Table S3), using the Expand High Fidelity DNA polymerase in the buffer recommended by the supplier (Roche Diagnostics GmbH) (44). After an initial denaturation at 94°C for 2 min, the amplification profile consisted of 30 cycles at 94°C for 30 s, 58 to 72°C for 30 s, and 72°C for 2 min. Following non denaturing PAGE (in TAE buffer) in 5% gels, those amplicons of expected length were eluted, cloned and sequenced with a ABI 3100 XL (Life Technologies) apparatus.

PolyA-mediated rapid amplification of 3' cDNA ends (3'-RACE)

Two aliquots of the gel-purified RNAs of interest, one pretreated with alkaline phosphatase (AP) (Roche Diagnostics GmbH) and the other untreated, were polyadenylated with yeast poly(A) polymerase (USB, Affimetrix, Inc) and ATP following the conditions recommended by the supplier. The polyadenylated products were reverse transcribed with a polyA tail-complementary primer (5'-CCGGATCCTCTAGATCGGCCGCT₁₇V-3', where V is A, C, or G) (20), and subjected to PCR amplification with this same primer and PSTVd-specific primers derived from the corresponding sgRNAs. After an initial denaturation at 94°C for 2 min, the amplification profile consisted of 38 cycles at 94°C for 30 s, 63 to 68°C for 30 s, and 72°C for 2 min. Following non denaturing PAGE in 5% gels, those amplicons of expected length were eluted, cloned and sequenced as indicated above.

Isolation of nuclei

PSTVd-infected leaves (5 g) of *N. benthamiana* were processed as reported previously (45) with some modifications. In brief, they were ground with liquid nitrogen to a fine powder and resuspended in five volumes of ice-cold nuclear isolation buffer (NIB): 10 mM MES-KOH pH 5.4, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 2.5 mM EDTA, 250 mM sucrose, 0.1 mM spermine, 0.5

mM spermidine and 1 mM DTT. The homogenate was filtered through two layers of cheesecloth and one of Miracloth, and Triton X-100 (10%) was added dropwise until a final concentration of 0.5 %. After incubation for 20 min at 4°C with gentle agitation, the suspension was centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C. The white pellet containing the crude nuclear preparation was slowly resuspended in 1 ml of NIB, loaded on top of a 1.3 ml cushion of 2.5 M sucrose in NIB, and centrifuged at 12000 g for 10 min. The pellet of purified nuclei was washed twice by resuspension in 1 ml of NIB and centrifugation at 1000 g for 5 min, and their integrity was assessed by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining and observation with a fluorescence microscope.

RESULTS

An unexpected finding: PSTVd (+) sgRNAs of precise size accumulate to high levels in early infectious stages in eggplant

Since the very initial research on viroids, most studies on PSTVd have been performed using tomato because this experimental host is easy to grow in the greenhouse, reacts to intermediate and severe PSTVd strains with clear symptoms in about two weeks, and accumulates relatively high titers of the agent (46). More recently, some studies have focused on *N. benthamiana* (38,42,47,48), regarded as a model host in plant virology given that it allows replication of a wide array of viruses and certain viroids including PSTVd—possibly as a consequence of being deficient in at least one RNA silencing antiviral pathway (49)—and that it is particularly appropriate for agroinfiltration experiments (50). Lately, we have also become interested in eggplant, which like the other two preceding species belongs to the family *Solanaceae*, given that it is one of the few plants able to sustain replication of members of the two viroid families, PSTVd (51) and eggplant latent viroid (ELVd) (52), a feature convenient for comparative studies. In contrast to ELVd, which as reflected in its name replicates symptomlessly, we have observed a stunted phenotype in PSTVd-infected eggplant (data not shown), in agreement with a previous report (51).

In an attempt to follow the progress of PSTVd accumulation in eggplant inoculated by agroinfiltration, which induces a more efficient and reproducible infection, we examined at different time intervals nucleic acid preparations by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a radioactive riboprobe for detecting PSTVd (+) strands. The PSTVd (+) *mc* and linear (*ml*) genomic forms were observed in upper non-inoculated leaves 15 days post-inoculation (dpi); intriguingly, a set of accompanying 6-8 viroid sgRNAs were also visible,

with the intensity of some of their signals being similar or even higher than those generated by the *mc* and *ml* forms (Fig. 1). The clear band definition, as opposed to a smear, excluded that the PSTVd (+) sgRNAs could emerge from non-specific degradation; moreover, their absence in a preparation from non-infected eggplant artificially supplemented with purified PSTVd *mc* forms (Fig. 2), dismissed the possibility that these sgRNAs could be generated *in vitro* during extraction (in contrast to the *ml* forms resulting from artifactual single nicks introduced in the *mc* form). A band profile essentially identical to that observed in eggplant leaves at 15 dpi was obtained when leaves of a similar developmental stage were collected from the same infected plants at 20 and 25 dpi, but with a quantitative difference: the relative intensity of the *mc* and *ml* bands increased with time (Fig. 1). This difference was even more pronounced in another experiment where we also examined the intensity of vd-sRNA bands, which paralleled that of the *mc* and *ml* forms (Fig. S1) in consonance with previous results (38,42,53,54).

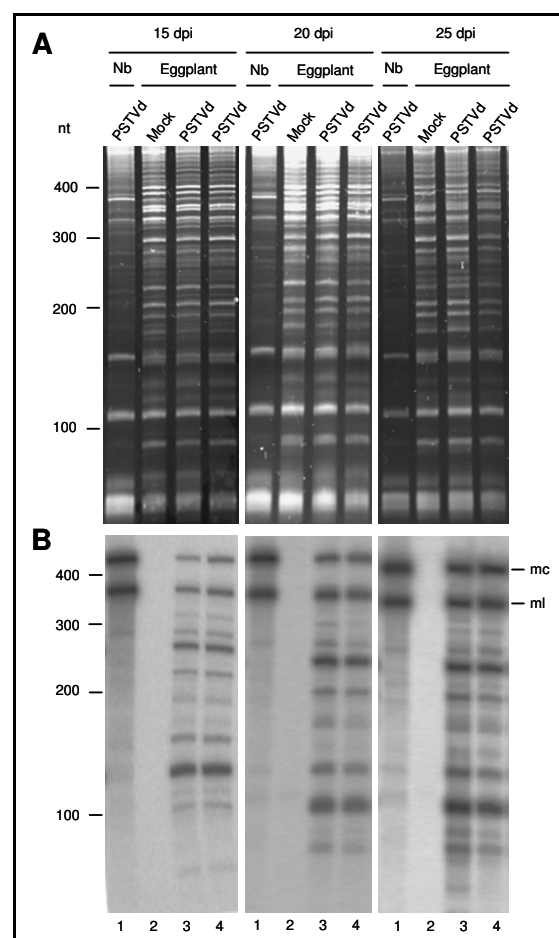


Figure 1. Infection of eggplant by PSTVd results in the accumulation of a series of PSTVd (+) sgRNAs accompanying the genomic *mc* and *ml* (+) forms. Total RNAs from upper non-

inoculated leaves collected at 15, 20 and 25 dpi were separated by denaturing PAGE in 5% gels and revealed with ethidium bromide (A), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands (B). In each panel lane 1 corresponds to PSTVd-infected *N. benthamiana*, lane 2 to mock-inoculated eggplant, and lanes 3 and 4 to PSTVd-infected eggplant. Positions of RNA markers (in nt) are indicated on the left, and those of the PSTVd *mc* and *ml* forms on the right.

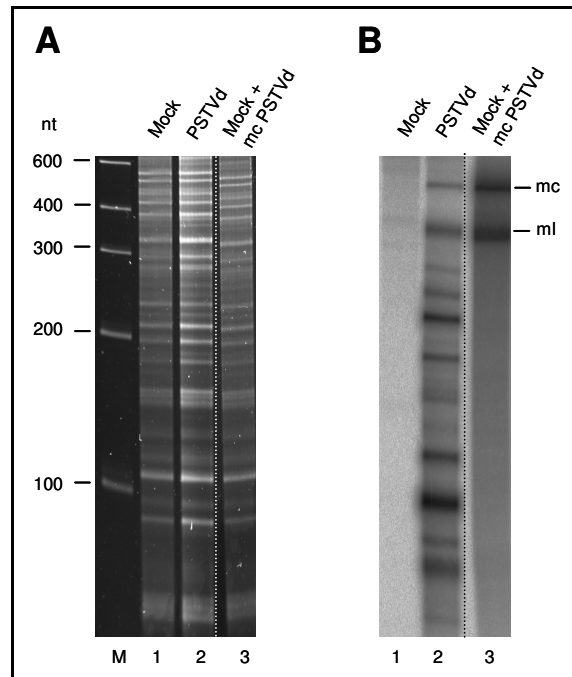


Figure 2. PSTVd (+) sgRNAs are not artifacts generated during *in vitro* extraction. Total RNAs were separated by denaturing PAGE in 5% gels and revealed with ethidium bromide (A), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands (B). Lane M, RNA markers; lanes 1, mock-inoculated eggplant; lanes 2, PSTVd-infected eggplant; lanes 3, mock-inoculated eggplant supplemented before extraction with PSTVd *mc* forms from infected tissue. Positions of RNA markers (in nt) are indicated on the left, and those of the *mc* and *ml* forms on the right.

To check whether these PSTVd-sgRNAs were idiosyncratic for eggplant, we applied the same analytic procedure to nucleic acid preparations from *N. benthamiana* and tomato leaves taken at similar time intervals: at least some of the lower-than-unit-length bands were observed co-migrating with those of eggplant, but with a significant lesser intensity in most cases; the intensity of the *mc* forms, however, was higher in *N. benthamiana* and tomato than in eggplant (Fig. 3).

Moreover, we also examined the agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana* at 4, 6 and 8 dpi. Interestingly, the PSTVd-sgRNAs became even more apparent than in the upper non-

inoculated leaves —particularly when comparing the intensity of their bands with that of the *mc* and *ml* forms— possibly because the primary PSTVd dimeric transcript also served as a precursor of the PSTVd-sgRNAs (Fig. S2). Altogether these results disclosed that, besides the *mc* and *ml* forms upon which most of the attention has been previously focused, PSTVd infection gives also rise to a series of (+) sgRNAs that have been overlooked so far since, in contrast to eggplant, they accumulate in other solanaceous hosts like *N. benthamiana* and tomato at relatively low levels. We assumed that determining where the sgRNAs come from and how they are generated might provide some valuable *in vivo* insights into PSTVd synthesis or degradation, because at this stage we could not discriminate from which of these two major routes the (+) sgRNAs resulted from.

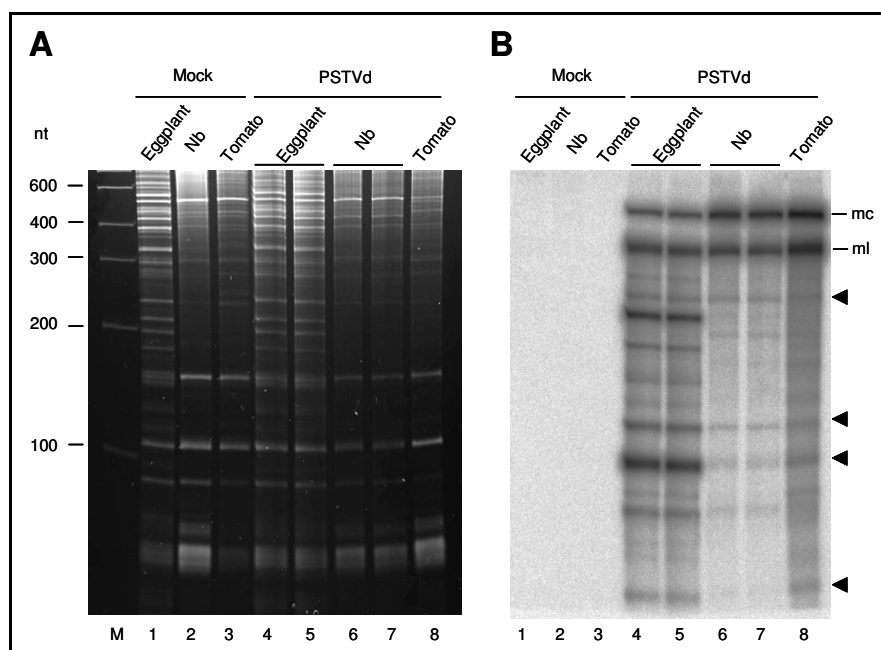


Figure 3. Accumulation in three different hosts of PSTVd (+) *mc*, *ml* and sgRNAs. Total RNAs from upper non-inoculated leaves were separated by denaturing PAGE in 5% gels and revealed with ethidium bromide (A), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands (B). Lanes 1 to 3, mock-inoculated controls of eggplant, *N. benthamiana* and tomato, respectively. Lanes 4 to 8, PSTVd-infected eggplant (lanes 4 and 5), *N. benthamiana* (lanes 6 and 7) and tomato (lane 8). Loading was equalized by the intensity of the 5S RNA stained with ethidium bromide (not shown). Positions of the PSTVd (+) *mc* and *ml* forms are indicated on the right and those of RNA markers (in nt) on the left. Arrowheads mark some PSTVd (+) sgRNAs common to the three hosts. Leaves were collected at similar time intervals (20-25 dpi).

Delimiting the PSTVd (+) RNA regions from which the sgRNAs originate

To get a first outlook about where the sgRNAs map on the genomic PSTVd (+) RNA, we next examined eggplant nucleic acid preparations by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with six 5'-radiolabeled oligodeoxyribonucleotide probes complementary to different segments of the full-length PSTVd (+) RNA: three (probes I to III) derived from the lower strand of the rod-like secondary structure and the other three (probes IV to VI) from the upper strand (Table S1 and Fig. S3A). As anticipated, all probes hybridized—with different intensity—with the *mc* and *ml* RNAs from the preparations of infected eggplant and *N. benthamiana*. However, this was not the case with the (+) sgRNAs. For instance, of the five sgRNAs selected for further characterization (see below), probe II hybridized strongly with sgRNA 5, while probes IV and V hybridized strongly with sgRNAs 1 and 3 (Fig. S3B). Although these data should be interpreted with care due to the low temperature used for hybridization (42°C), collectively they indicated that the sgRNAs come from different regions of the genomic PSTVd (+) RNA, and that some of them could be partially overlapping or even form part of others.

To better define their properties, five (+) sgRNAs (1 to 5) were eluted from denaturing polyacrylamide gels and their purity re-assessed by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with the full-length riboprobe (Fig. S4); the *ml* forms were also similarly recovered and used as an additional control. Each of these purified RNAs served as templates in independent reverse transcriptase-catalyzed extensions of two appropriate 5'-radiolabeled primers, either corresponding to some of the probes indicated above or newly designed (Table S2). Running the primer extension products in long denaturing 6% sequencing gels in parallel with four sequencing ladders—obtained with the same primer and a recombinant plasmid with a complete PSTVd-cDNA insert—resulted in the identification of the following 5' termini: U296 (sgRNAs 1 and 3), G72 (sgRNA 2), C13 (sgRNA 4) and G201 (sgRNA 5) (Fig. 4). These termini—together with the estimated size of the sgRNAs inferred from their mobility in denaturing polyacrylamide gels—were consistent with results from the hybridization experiments using the specific probes reported above, as also was the observation that sgRNAs 1 and 3 have the same 5' termini (thus denoting that the latter is contained in the former). Although this finding might be interpreted as the sgRNAs 3 resulting from premature transcription termination of the sgRNAs 1, the lack of a 5' terminus common for the five (+) sgRNAs and other additional evidence (see below), excluded this possibility. Inspection of the positions where the 5' termini of the sgRNAs map in the rod-like

secondary structure of PSTVd (+) RNA did not reveal any clear preference for loops or double-stranded segments (Fig. 4). Interestingly, extension of the *ml* RNA generated a clear stop at G96 (Fig. 4), in agreement with previous results indicating that this is the cleavage site *in vitro* (55) and *in vivo* (19,20) of the oligomeric (+) strands of PSTVd and other representative members of the family *Pospiviroidae*.

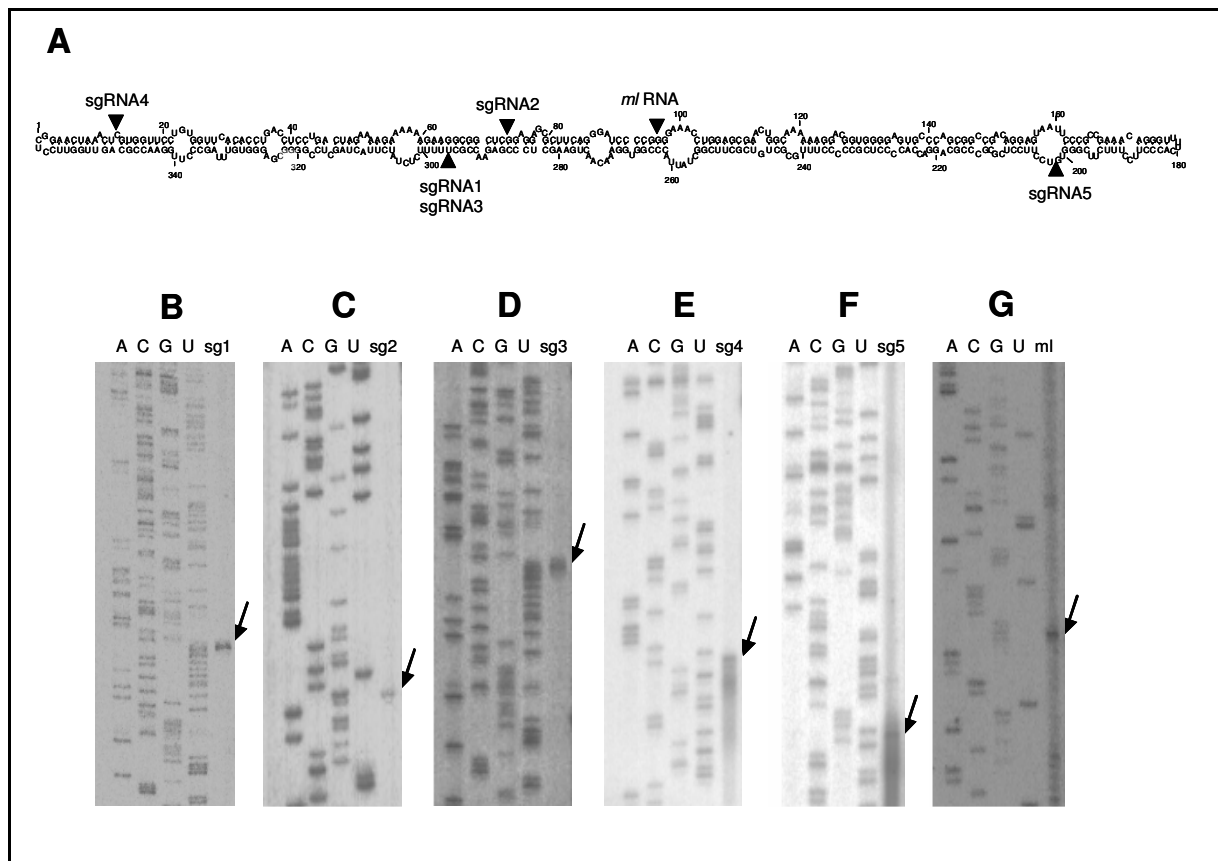


Figure 4. (A) Primer extension analysis of five PSTVd (+) sgRNAs and of the *ml* form reveals a complex population of 5' termini (marked by arrowheads) mapping at different domains of the secondary structure of the genomic (+) viroid RNA predicted by Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>) and supported by structural/functional analysis of a slightly different strain (48). Notice, however, that the 5' termini of the (+) sgRNAs 1 and 3 map at the same position (U296). (B to G) Representative examples of extensions using primers RF-1242 (for sgRNAs 1 and 2, and for the *ml* form), RF-1194 (for sgRNAs 3 and 4) and RF-1191 (for sgRNA 5). In the six panels the sequencing ladders were obtained with the same primers and a recombinant plasmid containing a monomeric PSTVd-cDNA insert of the same variant (NB) used for inoculation. Arrows point to cDNA bands corresponding to 5' termini.

The terminal groups of the PSTVd (+) sgRNAs reveal that they do not result from aborted transcription but from endonucleolytic cleavage of longer viroid RNAs

To obtain further independent evidence for the 5' termini of the sgRNAs, we applied a 5' RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE). When implemented with proper modifications, this approach provides additional data about the chemical groups of these termini, from which their origin can be inferred (44). More specifically, we examined in this respect the (+) sgRNAs 1 to 5, using as a control the PSTVd (+) *ml* form—delimited by positions C1 and G2 with 5'-hydroxyl and 2',3'-cyclic phosphodiester termini, respectively—resulting from self-cleavage of a full-length *in vitro* transcript flanked by hammerhead and hepatitis delta virus ribozymes (21).

To characterize their corresponding 5' termini, the RNAs were eluted from denaturing polyacrylamide gels and two aliquots of each were ligated to an RNA adaptor using T4 RNA ligase 1, which demands 5'-P and 3'-OH termini; one aliquot was pretreated with T4 PK and ATP (to phosphorylate 5'-OH termini) while the other remained untreated. The resulting ligation products were reverse transcribed with appropriate PSTVd-specific primers (in some instances the same used before as probes), and PCR-amplified with an adapter-specific primer and viroid-specific primers internal with respect to the previous ones (Table S3). PCR products were fractionated by non-denaturing PAGE and those of the expected size cloned and sequenced. The amplification product containing the terminus predicted for the PSTVd (+) *ml* forms generated *in vitro* was only observed in the PK-pretreated aliquot, thus validating the approach used. Similarly, amplification products containing the termini expected for the (+) sgRNAs 1 to 5 were only observed in the PK-pretreated aliquots, confirming with a second independent approach the data from primer extensions and unveiling the presence of 5'-OH in these termini (Fig. 5).

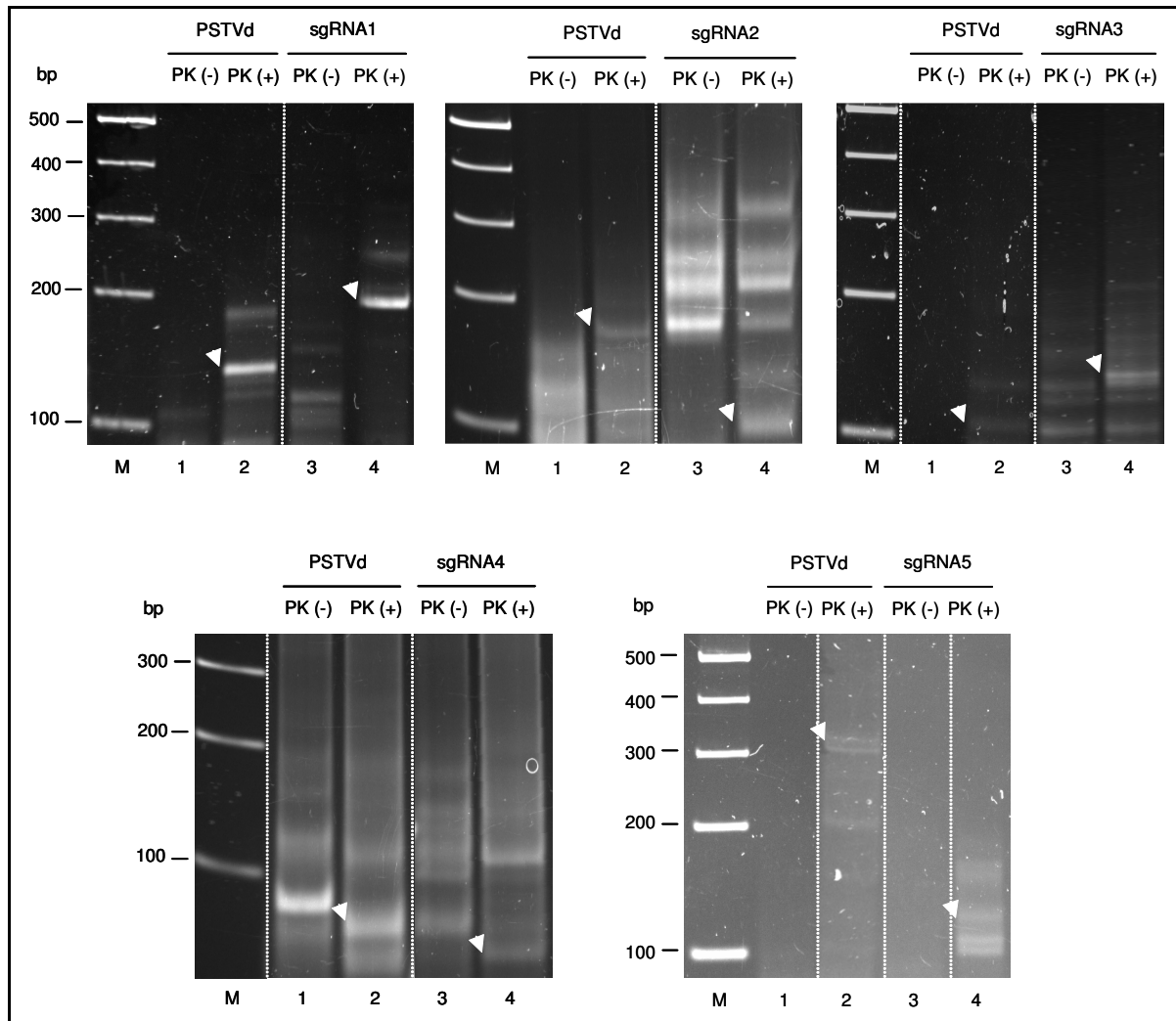


Figure 5. RLM-RACE analysis of the 5' termini of the PSTVd (+) sgRNAs 1 to 5, using as control a PSTVd (+) *ml* form with 5'-hydroxyl (G2) and 2',3'-cyclic phosphodiester (C1) termini resulting from ribozyme-mediated self-cleavage. Prior to RLM-RACE (see Table S3 for the RNA adaptor and primers used), aliquots of each RNA were left untreated (lanes 1 and 3) or treated with PK and ATP to phosphorylate 5'-hydroxyl groups (lanes 2 and 4), with the resulting amplification products being then separated by non denaturing PAGE and stained with ethidium bromide. Arrowheads indicate the amplicons of expected length that were eluted, cloned and sequenced. Lane M, DNA markers.

The previous results strongly suggested that the (+) sgRNAs are cleavage products and, accordingly, that their other terminal group was a 3'-P. To verify that this was indeed the case, we applied a 3'-RACE strategy. Two aliquots of the purified (+) sgRNAs 1 to 5 and of a full-length PSTVd (+) RNA control delimited by positions U179-U180 —obtained by *in vitro* transcription and, therefore, with 5'-triphosphorylated and 3'-OH termini— were polyadenylated with yeast poly(A) polymerase, which catalyzes incorporation of AMP

residues (from ATP) to 3'-OH terminal groups. The first aliquot remained untreated, while the second was pretreated with AP to remove phosphoryl groups from 3'-P termini. The polyadenylated products were reverse transcribed with a poly(A) tail-complementary primer (consisting of a 5' moiety of 22 nt followed by 17 Ts ending with a degenerated A, C or G residue), PCR-amplified with this same primer and PSTVd-specific primers derived from the (+) sgRNAs 1 to 5 (Table S3), fractionated by non-denaturing PAGE, and those of the expected size cloned and sequenced. As anticipated, the amplification product containing the terminus predicted for the PSTVd (+) *ml* forms was observed regardless of the AP pretreatment. Yet, amplification products containing the termini expected for the (+) sgRNAs 1 to 5—according with their size and 5'-termini previously determined—were only detected in the AP-pretreated aliquots, disclosing the presence of 3'-P in these termini (Fig. S5 and data not shown). The 3'-P termini of the (+) sgRNAs 1 to 5 were mapped at positions U178, C248, C94, C103, and C273, respectively, suggesting the participation of a pyrimidine-specific RNase in their genesis.

Overall, these results showed that the PSTVd (+) sgRNAs: i) do not have a common 5' terminus and, consequently, do not result from aborted transcription initiated at one specific site, and ii) do have free 5'-OH and 3'-P termini most likely generated by one or more endoRNase producing these termini, and not by DCL or RISC that give rise to 5'-P and 3'-OH termini. A schematic mapping of the PSTVd (+) sgRNAs 1 to 5 on the secondary structure of the *mc* (+) form is presented below.

PSTVd (+) sgRNAs accumulate in the nucleus and most likely derive from cleavage of replicative intermediates

To gain an understanding of the potential substrate(s) giving rise to the PSTVd (+) sgRNAs, we examined their subcellular accumulation site and, particularly, whether this site was the nucleus wherein PSTVd replication takes place. Because preliminary experiments showed that obtaining nuclei preparations from *N. benthamiana* was much easier than from eggplant, we focused on the former host in which, even if the titer of PSTVd (+) sgRNAs is lower, still is sufficient to be detected (Fig. 3). After confirming by DAPI staining and fluorescence microscopy the presence of nuclei in our preparations (data not shown), their RNA composition was compared with that of an equivalent amount of total RNAs by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a radioactive riboprobe for detecting PSTVd (+) strands. The resulting profiles were essentially identical, thus showing that the nucleus is the preferential accumulation site of the PSTVd (+) *mc* and linear (*ml*) genomic forms, in

agreement with previous results (22,56), and, interestingly, also of the PSTVd (+) sgRNAs (Fig. S6). This observation, in conjunction with the finding that the 5' termini of the (+) sgRNAs do not map preferentially at loops in the rod-like secondary structure of the circular PSTVd (+) RNA (Fig. 4)—in contrast with what would be expected if the latter were the substrate of the former—and also together with the detection of PSTVd (-) sgRNAs in infected tissue (see next section), is consistent with the sgRNAs being generated from replicative intermediates during their synthesis in the nucleus.

PSTVd (-) sgRNAs also accumulate in infected eggplant

To get a more comprehensive view, we finally examined the existence of PSTVd (-) sgRNAs. Because of the high self-complementarity of viroid RNAs, and because PSTVd (-) strands accumulate in infected tissue to significant lower amounts than their (+) counterparts (6), detection by Northern-blot hybridization of the former in the presence of a vast excess of the latter posed a potential problem. Therefore, we chose highly restrictive conditions (50% formamide and 70°C) and confirmed that, under such conditions, radiolabeled PSTVd full-length riboprobes of each polarity hybridized only with their complementary unlabeled strand, and not with that of the same polarity (Fig. 6). Moreover, while the *mc* and *ml* (+) forms were clearly visible in PSTVd-infected eggplant, no signals were observed in the position expected for the *mc* and *ml* (-) forms; this result is in agreement with previous data showing that these latter forms do not accumulate in infected tomato, wherein the prevalent (-) strands are multimeric (6,7). However, a pattern of PSTVd (-) sgRNAs, weaker in intensity and different in size from that of PSTVd (+) sgRNAs, was reproducibly detected (Fig. 6).

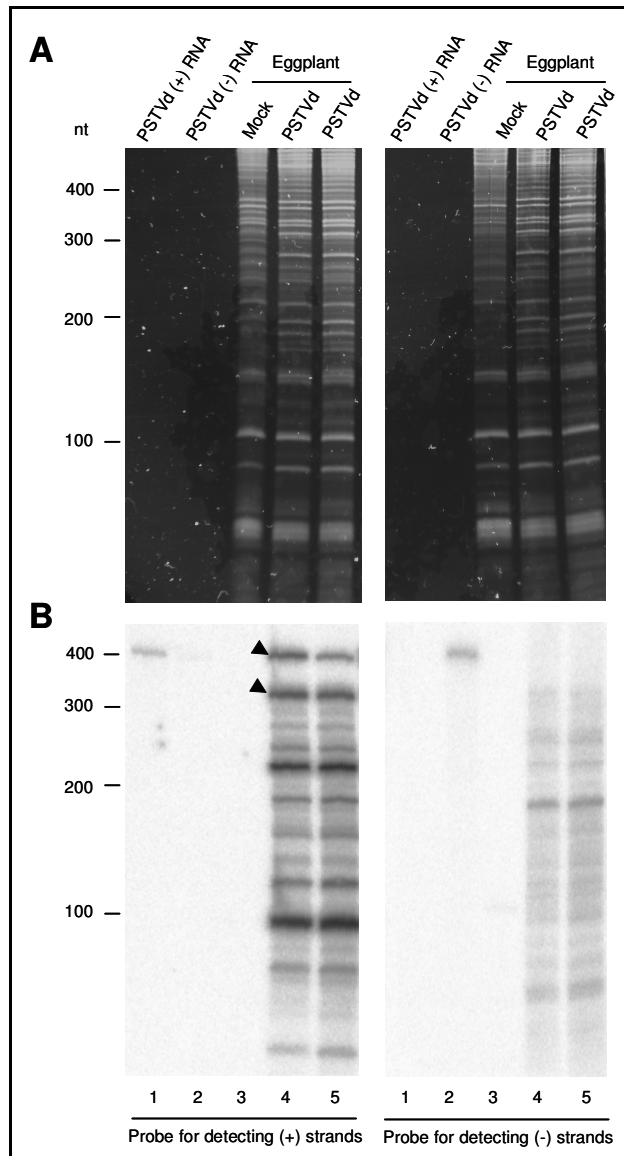


Figure 6. Infection of eggplant by PSTVd also results in the accumulation of a series of PSTVd (-) sgRNAs. Total RNAs from upper non-inoculated leaves collected at 20 dpi were separated by denaturing PAGE in 5% gels and revealed with ethidium bromide (**A**), and by Northern-blot hybridization with full-length radiolabeled riboprobes (equalized in acid-precipitable counts) for detecting PSTVd (+) or (-) strands (**B**). In each panel lanes 1 and 2 correspond to equal amounts of full-length PSTVd (+) and (-) transcripts, respectively (in both cases with 5' and 3' plasmid tails), lanes 3 to mock-inoculated eggplant, and lanes 4 and 5 to PSTVd-infected eggplant. Positions of the PSTVd (+) *mc* and *ml* forms are indicated with arrowheads and those of RNA markers (in nt) on the left.

Following the same approach described above, three PSTVd (-) sgRNAs (1 to 3) were gel-eluted (1 and 2 together because they appear as a doublet) and checked for purity by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with a complementary full-length riboprobe (Fig. S7). The sgRNAs were then used as templates for reverse transcriptase-

mediated extensions with two 5'-radiolabeled primers each, and analyzed in parallel gel lanes with the sequencing ladders generated with the same primers. Examination of the autoradiograms revealed the C128, C156 and U159 as the 5' termini for the (-) sgRNAs 1, 2 and 3, respectively (Fig. 7), again showing the lack of a common 5' terminus. Further characterization of the most abundant PSTVd (-) sgRNAs 3 via 5-' and 3'-RACE (Fig. S8) and subsequent cloning and sequencing as reported above, revealed a size of 184 nt consistent with that estimated from denaturing PAGE (Fig. S7), as well as 5'-OH (U159) and 3'-P (C335) termini, thus supporting the involvement in their genesis of a mechanism similar to that proposed for the PSTVd (+) sgRNAs. A schematic mapping of the PSTVd (+) sgRNAs 1 to 5 on the secondary structure of the *mc* (+) form, and of the PSTVd (-) sgRNAs 1 to 3 on the secondary structure of the *mc* (-) form, is presented in Fig. 8.

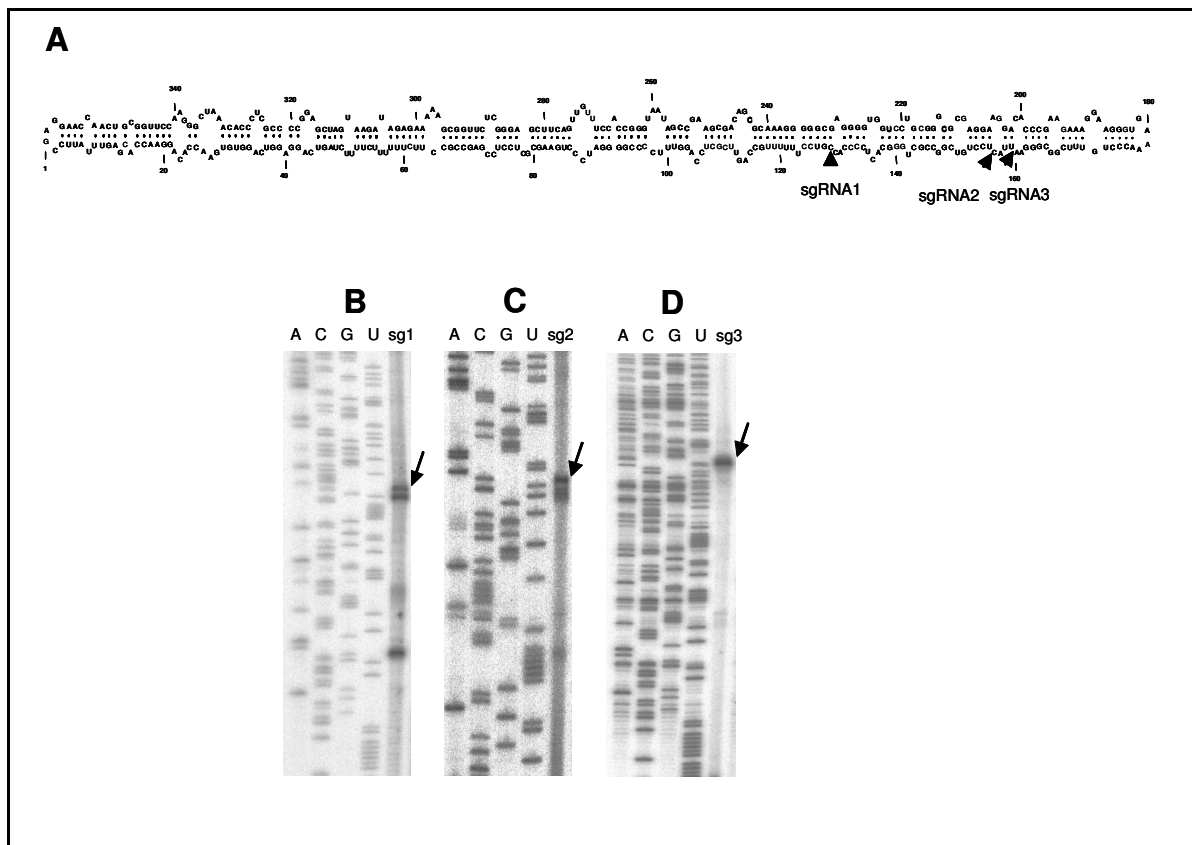


Figure 7. (A) Primer extension analysis of three PSTVd (-) sgRNAs showing their 5' termini (marked by arrowheads) mapping at different positions on the secondary structure of the genomic (-) viroid RNA predicted by Mfold and validated by temperature-gradient gel electrophoresis. (B to D) Representative examples of extensions using primers RF-1294 (for sgRNAs 1 and 3) and RF-1263 (for sgRNA 2). In the three panels the sequencing ladders were obtained with the same primers and a recombinant plasmid containing a monomeric

PSTVd-cDNA insert of the same variant (NB) used for inoculation. Arrows point to cDNA bands corresponding to 5' termini.

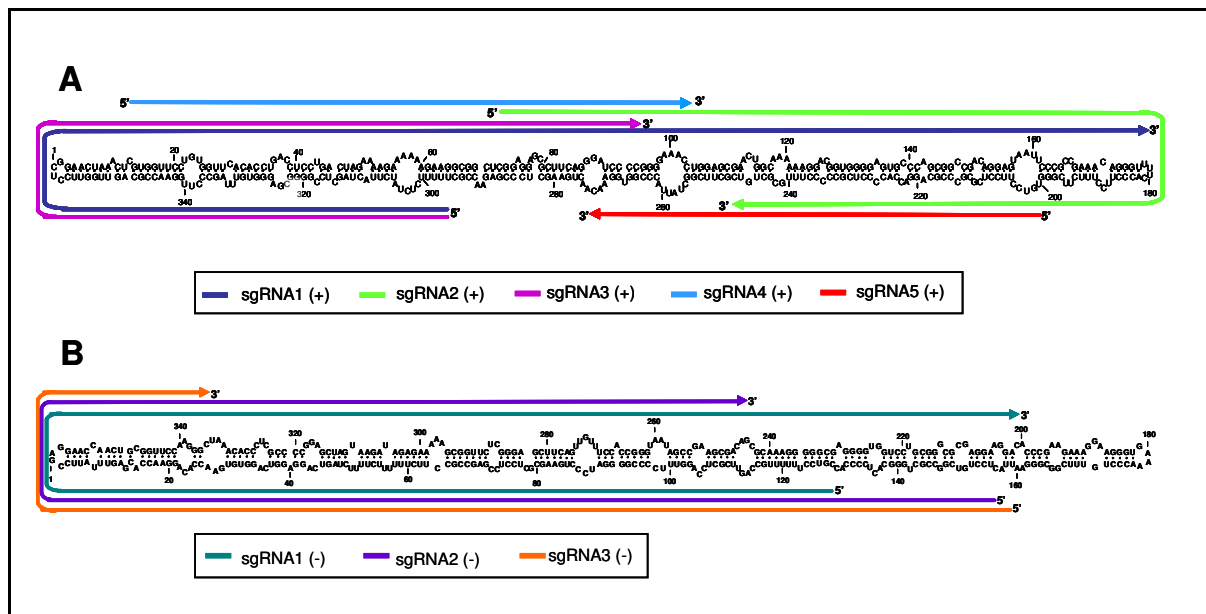


Figure 8. Schematic mapping of the PSTVd (+) sgRNAs 1 to 5 and of the (-) sgRNAs 1 to 3 on the genomic PSTVd (+) (A) and (-) (B) secondary structures, respectively. For easier comparison, the PSTVd (-) form is presented as a circular form, although this form has not been detected in infected tissue (7). The size of (+) sgRNAs 1 to 5 (242, 177, 158, 91 and 73 nt, respectively), and of the (-) sgRNAs 3 (184 nt), has been accurately determined by primer extension and 5'- and 3'-RACE; the size of the (-) sgRNAs 1 and 2 (285 and 280 nt) has been inferred from primer extension and mobility on denaturing PAGE, and is only approximate. Notice that the 5' termini of the (+) sgRNAs 1 and 3 are coincidental, and that cleavage of the former at a specific site would generate the latter. Numbering in the (-) polarity is the same as in the (+) polarity.

DISCUSSION

The sgRNAs, which appear together with those of genomic size in infections by many positive-strand RNA viruses, serve usually for expressing viral proteins (57,58). However, this cannot be the role played by sgRNAs resulting from infection by viroids, because they are non-protein-coding RNAs. Previously, sgRNAs of both polarities have been found in association with two members of the family *Avsunviroidae*. More explicitly, in avocado infected by avocado sunblotch viroid (ASBVd) (59), viroid (+) and (-) sgRNAs of 137 and about 148 nt, respectively, were detected. Their 5' termini are identical to those produced in the *in vitro* self-cleavage of dimeric (+) and (-) ASBVd strands, while their 3' counterparts

could represent sites of premature termination because, at least that of the ASBVd (+) sgRNA is not phosphorylated (9). On the other hand, in peach infected by peach latent mosaic viroid (PLMVd) (60), viroid (+) and (-) sgRNAs were also reported (44,61). Analyses of both sgRNAs regarding their size (about 240 nt) and 5' termini (a triphosphorylated group), strongly support that they result from initiation at specific sites in each polarity strand and subsequent self-cleavage at the sites predicted by the corresponding hammerhead structures (before the first replication round was completed) (44). Therefore, the ASBVd and PLMVd sgRNAs have different origins: their 5' termini mark the self-cleavage sites in the former and the transcription initiation sites in the latter.

Inspired by these findings, we assumed that molecular characterization of the PSTVd (+) sgRNAs accumulating reproducibly in infected eggplant could open a window on viroid dynamics *in vivo*. The observation of a similar, albeit weaker, profile of (+) sgRNAs in PSTVd-infected tomato and *N. benthamiana* strengthened our conviction that they were not artifacts generated *in vitro* during extraction, further reinforced by their absence in nucleic acid preparations from non-infected eggplant spiked with purified PSTVd *mc* forms. In principle, the PSTVd (+) sgRNAs could either be products of premature transcription termination, or result from endonucleolytic cleavage of longer viroid RNAs—either during replication or once it is completed—catalyzed by one or more RNases.

A first examination of nucleic acids from PSTV-infected eggplant by denaturing PAGE and Northern-blot hybridization with six probes revealed that the (+) sgRNAs come from different regions of the genomic PSTVd (+) RNA. Subsequent primer extension analyses of five (+) sgRNAs showed the lack of a common 5' terminus, dismissing the possibility that they could result from aborted transcription initiated at one specific site, which if existing, should have a triphosphorylated or a capped group. Further supporting this view, 5'- and 3'-RACE experiments indicated that the (+) sgRNAs have 5'-OH and 3'-P termini most likely resulting from RNase-mediated endonucleolytic cleavage of longer viroid RNAs. Application of this methodology to the other polarity strand unveiled the accumulation of some PSTVd (-) sgRNAs with structural features similar to their (+) counterparts, thus leading to similar conclusions about their origin.

Studies like those reported here have been most likely disregarded so far by implicitly assuming that degradative pathways operating on viroid RNAs should generate heterogeneous products difficult to characterize. Our results show that this is not necessarily the case and that, by choosing the proper viroid-host combination, dissection of decay pathways—which together with biosynthesis determine the final RNA accumulation levels *in vivo*—becomes

experimentally tractable and provides a fresh and intriguing insight into viroid turnover. More specifically, PSTVd degradation pathways appear to operate in an ordered and maybe even hierarchical manner. Why PSTVd sgRNAs of both polarities accumulate to higher levels in eggplant than in *N. benthamiana* and tomato remains a conundrum. These RNAs could be more stable in eggplant due to less active exonucleases; pertinent to this respect is the observation that the band pattern of total RNA preparations revealed by denaturing PAGE and ethidium bromide staining is more complex and intense in eggplant than in *N. benthamiana* and tomato (Fig. 3A). Alternatively, or concurrently, the endoRNases involved in the genesis of the PSTVd sgRNAs, which presumably are enzymes developmentally regulated (62), could be more active in eggplant, particularly at early stages of viroid replication. In this context, two classes of plant endoRNases, I and II, have been described generating 3'-P termini (62).

Directly connected with these nucleolytic enzymes are their substrates. According to previous data from *in situ* hybridization (22), at least two PSTVd pools can be envisaged: one in the nucleoplasm, where elongation of viroids strands of both polarities occurs, and the other in the nucleolus, where only (+) polarity strands are processed, with the endoRNases present in both subnuclear compartments being most likely different. The finding of PSTVd sgRNAs of both polarities suggests that they are generated in the nucleoplasm during polymerization of viroid strands, a notion consistent with the nuclear accumulation of the PSTVd (+) sgRNAs in *N. benthamiana*. This view is further supported by the higher levels of the (+) PSTVd-sgRNAs detected in the agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana* (wherein an earlier and more synchronous infection is established) than in the upper non-inoculated leaves. The most direct interpretation for this observation is that a significant part of the PSTVd (+) sgRNAs results from cleavage of the primary PSTVd (+) dimeric transcript, which mimics a replicative intermediate. Previous data obtained with transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing dimeric (+) transcripts of two PSTVd-related viroids have shown that these transcripts are indeed recognized and processed as replicative intermediates (63). Moreover, since most RNases generating 5'-OH and 3'-P termini, like pancreatic RNase (64), have a preference for single-stranded regions and we have not observed the 5' termini of the PSTVd (+) sgRNAs mapping preferentially at loops in the rod-like secondary structure of the *mc* (+) form, this RNA does not appear a plausible precursor. There is solid evidence supporting the existence and function—in replication and, particularly, in movement—of some of these loops (48,65,66); yet, a significant fraction of the *mc* (+) form may function as a reservoir molecule, most likely interacting *in vivo* with host proteins that protect its structure and make it less accessible to RNases. On the other hand, detection of PSTVd (-) sgRNAs is

consistent with their coming from endonucleolytic cleavage of nascent (-) strands, because the strands of this polarity forming part of replicative intermediates or replicative forms should be less sensitive to endoRNases with preference for single-stranded RNAs.

In closing, viroid RNA turnover raises specific questions because, in contrast to RNA viruses whose genome is protected by a capsid protein, viroid genomes are naked RNAs more vulnerable to endoRNases (but not to exonucleases due to their circular structure). Moreover, while replication of RNA viruses occurs in organelle-associated membranous vesicles connected with the cytoplasm (67), that of PSTVd and other representative members of its family takes place in the nucleus (22,56,68). Our results provide a novel insight on a complementary pathway: how viroid decay may proceed *in vivo*, possibly during replication. The pathway here reported, combined with others based on RNA silencing that could target double-stranded replicative intermediates or the *mc* (+) form during its movement, would ultimately counteract synthesis of viroid strands, thus finely tuning their final accumulation in infected tissues. The possibility that synthesis and decay of PSTVd strands might be coupled—somehow resembling the situation observed in mRNA—cannot be excluded, particularly considering that transcription is mediated by RNA polymerase II in both cases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to A. Ahuir for excellent technical assistance, and to Drs. J.A. Daròs, M. de la Peña and C. Hernández for valuable suggestions or materials.

FUNDING

Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) [BFU2011-28443 to R.F.]; MINECO [to S.M. and S.D.]; Funding for open access charge: MINECO (BFU2011-28443 to R.F.). Ministero dell'Economia e Finanze Italiano to the CNR (CISIA, Legge 191/2009 to B.N. and F.D.S.).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Diener,T.O. (2003) Discovering viroids—a personal perspective. *Nature Rev. Microbiol.*, **1**, 75-80.
2. Tabler,M., and Tsagris,M. (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.*, **9**, 339-348.
3. Flores,R., Hernández,C., Martínez de Alba,A.E., Daròs,J.A., and Di Serio,F. (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 117-139.
4. Ding,B. (2009) The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **47**, 105-131.
5. Ishikawa,M., Meshi,T., Ohno,T., Okada,Y., Sano,T., Ueda,I., and Shikata,E. (1984) A revised replication cycle for viroids: the role of longer than unit RNA in viroid replication. *Mol. Gen. Gen.*, **196**, 421-28.
6. Branch,A.D., Benefeld,B.J., and Robertson,H.D. (1988) Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9128-9132.
7. Feldstein,P.A., Hu,Y., and Owens,R.A. (1998) Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6560-6565.
8. Hutchins,C., Rathjen,P.D., Forster,A.C., and Symons,R.H. (1986) Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 3627-3640.
9. Daròs,J.A., Marcos,J.F., Hernández,C., and Flores,R. (1994) Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12813-12817.
10. Flores,R., Daròs,J.A., and Hernández,C. (2000) The *Avsunviroidae* family: viroids with hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.*, **55**, 271-323.
11. Diener,T.O. (1971) Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, **45**, 411-428.
12. Sänger,H.L., Klotz,G., Riesner,D., Gross,H.J., and Kleinschmidt, A. (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.

13. Gross,H.J., Domdey,H., Lossow,C., Jank,P., Raba,M., Alberty,H., and Sänger,H.L. (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, **273**, 203-208.
14. Owens,R.A. (2007) Potato spindle tuber viroid: the simplicity paradox resolved? *Mol. Plant Pathol.*, **8**, 549-560.
15. Mühlbach,H.P., and Sänger,H.L. (1979) Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature*, **278**, 185-188.
16. Flores,R., and Semancik,J.S. (1982) Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6285-6288.
17. Schindler,I.M., and Mühlbach,H.P. (1992) Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.*, **84**, 221-229.
18. Warrilow,D., and Symons,R.H. (1999) Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. *Arch. Virol.*, **144**, 2367-2375.
19. Gas,M.E., Hernández,C., Flores,R., and Daros,J.A. (2007) Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog.*, **3**, 1813-1826.
20. Gas,M.E., Molina-Serrano,D., Hernández,C., Flores,R., and Daros,J.A. (2008) Monomeric linear RNA of citrus exocortis viroid resulting from processing *in vivo* has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: implications for the ribonuclease and RNA ligase involved in replication. *J. Virol.*, **82**, 10321-10325.
21. Nohales,M.A., Flores,R., and Daros,J.A. (2012) Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13805-13810.
22. Qi,Y., and Ding,B. (2003) Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell*, **15**, 2566-2577.
23. Lewis,J.D., and Tollervey,D. (2000) Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science*, **288**, 1385-1389.
24. Dori-Bachash,M., Shema,E., and Tirosh,I. (2011) Coupled evolution of transcription and mRNA degradation. *PLoS Biol.*, **9**, e1001106.
25. Pérez-Ortín,J.E., Alepuz,P., Chávez,S., Choder,M. (2013) Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *J. Mol. Biol.*, **425**, 3750-3775.
26. Haimovich,G., Medina,D.A., Causse,S.Z., Garber,M., Millan-Zambrano,G., Barkai,O., Chávez,S., Pérez-Ortín,J.E., Darzacq,X., and Choder,M. (2013) Gene expression is

- circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*, **153**, 1000-1011.
27. Papaefthimiou,I., Hamilton,A.J., Denti,M.A., Baulcombe,D.C., Tsagris,M., and Tabler,M. (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2395-2400.
 28. Itaya,A., Folimonov,A., Matsuda,Y., Nelson,R.S., and Ding,B. (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 1332-1334.
 29. Martínez de Alba,A.E., Flores,R., and Hernández,C. (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of the small RNAs associated with post-transcriptional gene silencing. *J. Virol.*, **76**, 13094-13096.
 30. Navarro,B., Gisel,A., Rodio,M.E., Delgado,S., Flores,R., and Di Serio,F. (2012) Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie*, **94**, 1474-1480.
 31. Hammann,C., and Steger,G. (2012) Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.*, **9**, 809-819.
 32. Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
 33. Qi,Y., Denli,A.M., and Hannon,G.,J. (2005) Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol. Cell*, **19**, 421-428.
 34. Minoia,S., Carbonell,A., Di Serio,F., Gisel,A., Carrington,J.C., Navarro,B., and Flores,R. (2014) Specific ARGONAUTES bind selectively small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *J. Virol.*, **88**, 11933-11945.
 35. Bohmert,K., Camus,I., Bellini,C., Bouchez,D., Caboche,M., and Benning,C. (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.*, **17**, 170-180.
 36. Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., and Hannon,G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, **404**, 293-296.
 37. Mallory,A., and Vaucheret,H. (2010) Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell*, **22**, 3879-3889.

38. Matousek,J., Kozlová,P., Orctová,L., Schmitz,A., Pesina,K., Bannach,O., Diermann,N., Steger,G., and Riesner,D. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.*, **388**, 1-13.
39. Matousek,J., Orctová,L., Skopek,J., Pesina,K., and Steger, G. (2008). Elimination of hop latent viroid upon developmental activation of pollen nuclease. *Biol. Chem.*, **389**, 905-918.
40. Grimsley,N., Hohn,B., Hohn,T., and Walden,R. (1986) Agroinfection, an alternative route for viral-infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3282-3286.
41. Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
42. Di Serio,F., Martínez de Alba,A.E., Navarro,B., Gisel,A., and Flores,R. (2010) RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a nuclear-replicating viroid. *J. Virol.*, **84**, 2477-2489.
43. Carbonell,A., Flores,R., and Gago,S. (2011) *Trans*-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: *in vitro* and *in vivo* activity against a structured viroid RNA. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2432-2444.
44. Delgado,S., Martínez de Alba,A.E., Hernández,C., and Flores,R. (2005) A short double-stranded RNA motif of peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.*, **79**, 12934-12943.
45. Sikorskaite,S., Rajamäki,M.L., Baniulis,D., Stanys,V., and Valkonen,J.P.T. (2013) Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Meth.*, **9**, 31.
46. Raymer,W.B., and O'Brien,M.J. (1962) Transmission of potato spindle tuber virus to tomato. *Am. Potato J.*, **39**, 401-408.
47. Qi,Y., and Ding,B. (2002) Replication of potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. *Virology*, **302**, 445-456.
48. Zhong,X., Archual,A.J., Amin,A.A., and Ding,B. (2008) A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell*, **20**, 35-47.
49. Yang,S.J., Carter,S.A., Cole,A.B., Cheng,N.H., and Nelson,R.S. (2004) A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6297-6302.

50. Goodin,M.M., Zaitlin,D., Naidu,R.A., and Lommel,S.A. (2008) *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **21**, 1015-1026.
51. O'Brien,M.J. (1972) Hosts of potato spindle tuber virus in suborder *Solanineae*. *Am. Potato J.*, **49**, 70-72.
52. Fadda,Z., Daròs,J.A., Fagoaga,C., Flores,R., and Duran-Vila,N. (2003) Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). *J. Virol.*, **77**, 6528-6532.
53. Markarian,N., Li,H.W., Ding,S.W., and Semancik,J.S. (2004) RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.*, **149**, 397-406.
54. Carbonell,A., Martínez de Alba,A.E., Flores,R., and Gago,S. (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with infection of representative members of the two viroid families. *Virology*, **371**, 44-53.
55. Baumstark,T., Schröder,A.R. and Riesner,D. (1997) Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**, 599-610.
56. Harders,J., Lukacs,N., Robert-Nicoud,M., Jovin,J.M., and Riesner,D. (1989) Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.*, **8**, 3941-3949.
57. Miller,W.A., and Koev,G. (2000) Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*, **273**, 1-8.
58. Sztuba-Solinska,J., Stollar,V., and Bujarski,J.J. (2011) Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology*, **412**, 245-255.
59. Symons,R.H. (1981) Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6527-6537.
60. Hernández,C., and Flores,R. (1992) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3711-3715.
61. Pelchat,M., Côté,F., and Perreault,J.P. (2001) Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Arch. Virol.*, **146**, 1753-1763.
62. Green,P.J. (1994) The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **45**, 421-445.

63. Daròs,J.A., and Flores,R. (2004) *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family *Pospiviroidae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6792-6797.
64. Cuchillo,C.M., Nogués,M.V., and Raines,R.T. (2011) Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Biochemistry*, **50**, 7835-7841.
65. Zhong,X., Tao,X., Stombaugh,J., Leontis,N., and Ding,B. (2007) Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.*, **26**, 3836-3846.
66. Takeda,R., Petrov,A.I., Leontis,N.B., and Ding,B. (2011) A three-dimensional RNA motif in potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, **23**, 258-272.
67. den Boon,J.A., and Ahlquist,P. (2010) Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.*, **64**, 241-56.
68. Bonfiglioli,R.G., Webb,D.R., and Symons,R.H. (1996) Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang-cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.*, **9**, 457-465.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Deoxyribonucleotide probes complementary to different segments of the full-length PSTVd (+) RNA

Probes	Sequence (5' → 3')	Position
I	GGCGCGAGGAAGGAACACCGAAGAAAGGAAGGGTGA	180-215
II	GTTGTTTCCACCGGTAATAGCCGAAGCGACAGCGC	241-276
III	GAGGAACCAACTGCGGTTCCAAGGGCTAACACCCT	325-1
IV	GTCAGGAGGTCAGGTGTGAACCACAGGAACCACGAG	11-46
V	GGGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGTGCCGCTTCTT	59-94
VI	GGCGGGAATTACTCCTGTCTGGCCGCTGGGCACTCCC	132-167

Table S2. Primers used for extension analysis of the PSTVd sgRNAs and the *ml* forms

Primer (polarity)	Sequence (5' → 3')	Positions	RNA
RF-1191 (-)	GTTGTTTCCACCGGGTAATAGCCGAAGCGACAGCGC	241-276	(+) sgRNA 5
RF-1193 (-)	GTCAGGAGGTCAGGTGTGAACCACAGGAACCACGAG	11-46	(+) sgRNA 3
RF-1194 (-)	GGGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGTGCCGCCTTCTT	59-94	(+) sgRNAs 1, 3 and 4
RF-1242 (-)	AAACCCTGTTTCGGCGGGAATTAC	156-179	(+) sgRNAs 1, 2 and <i>ml</i> forms
RF-1258 (-)	GCACTCCCACCGTCCTTTTTTGC	116-139	(+) sgRNA 4
RF-1271 (-)	CCCTGTTTCGGCGGGAATTAC	156-176	(+) sgRNA 2
RF-1280 (-)	GGGTAATAGCCGAAGCGA	247-264	(+) sgRNA 5
RF-1262 (+)	CGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCT	318-339	(-) sgRNAs 1 and 3
RF-1263 (+)	CCTGTGGTTCACACCTGACCTC	20-41	(-) sgRNA 2
RF-1294 (+)	TGTTTAGCCCTTGAACCGCAGT	329-351	(-) sgRNAs 1 and 3
RF-1295 (+)	CACCTGACCTCCTGACTAGAA	31-52	(-) sgRNA 2

Table S3. Primers used for 5' and 3' RACE

Primer (polarity)	Sequence (5' → 3')	Positions	RNA
PSTVd-specific (5'RLM-RACE)			
RF-1191 (-)	GTTGTTTCCACCGGGTAATAGCCGAAGCGACAGCGC	241-276	(+) sgRNA 5 (RT)
RF-1193 (-)	GTCAGGAGGTCAGGTGTGAACACAGGAACACGAG	11-46	(+) sgRNA 3 (PCR)
RF-1194 (-)	GGGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGTGCCGCCTTCTT	59-94	(+) sgRNAs 1 (PCR), 3 and 4 (RT)
RF-1242 (-)	AAACCCTGTTTCGGCGGGAATTAC	156-179	(+) sgRNA 1 (RT)
RF-1257 (-)	GGCGGGAATTACTCCTGTCGG	147-167	(+) sgRNA 2 (PCR)
RF-1258 (-)	GCACTCCCACCGTCCTTTTTTGC	116-139	(+) sgRNA 2 (nested-PCR)
RF-1271 (-)	CCCTGTTTCGGCGGGAATTAC	156-176	(+) sgRNA 2 (RT)
RF-1280 (-)	GGGTAATAGCCGAAGCGA	247-264	(+) sgRNA 5 (PCR)
RF-1294 (+)	TGTTTAGCCCTTGAACCGCAGT	329-351	(-) sgRNA 3 (RT)
RF-1295 (+)	CACCTGACCTCCTGACTAGAA	31-51	(-) sgRNA 3 (PCR)
RF-1335 (-)	CCCTGAAGCGCTCCTCGAGCCGCC	64-88	(+) sgRNA 4 (PCR)
RF-1336 (-)	CGGCCTCTTTTTCTTTTCTAGTC	44-68	(+) sgRNA 4 (nested-PCR)
Adaptor-specific (5'RLM-RACE)			
RF-465	GGAGCACGAGGACACTGACATGG		sgRNA 1, 3 and 5 (PCR)
RF-553	TGGAGCACGAGGACACTGACATG		sgRNA 2 and 4 (PCR)
RF-554	GACACTGACATGGACTGAAGGAGTAG		sgRNA 2 and 4 (nested-PCR)
PSTVd-specific (3'RACE)			
RF-1261 (+)	CGCTTCAGGGATCCCCGGGGAA	79-100	(+) sgRNA 1, 2 (PCR)
RF-1295 (+)	CACCTGACCTCCTGACTAGAA	31-51	(+) sgRNA 3 and 4 (PCR)
RF-1296 (+)	CCTTCCTCGCGCCCGCAGGA	203-222	(+) sgRNA 5 (PCR), and 2 (nested-PCR)
RF-1319 (-)	GATCCTGAAGCGCTCCTCCG	71-91	(-) sgRNA 3 (PCR)
RF-1338 (+)	CTGACTAGAAAAGAAAAAGAAGCGG	42-68	(+) sgRNA 4 (nested-PCR)
PolyA tail (3'RACE)			
RF-1260	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCT ₍₁₇₎ V		sgRNA 1, 2, 3, 4, 5 (RT and PCR)
RF-1260b	CCGGATCCTCTAGAGCGGCCGCT		sgRNA 2, 4 (nested-PCR)

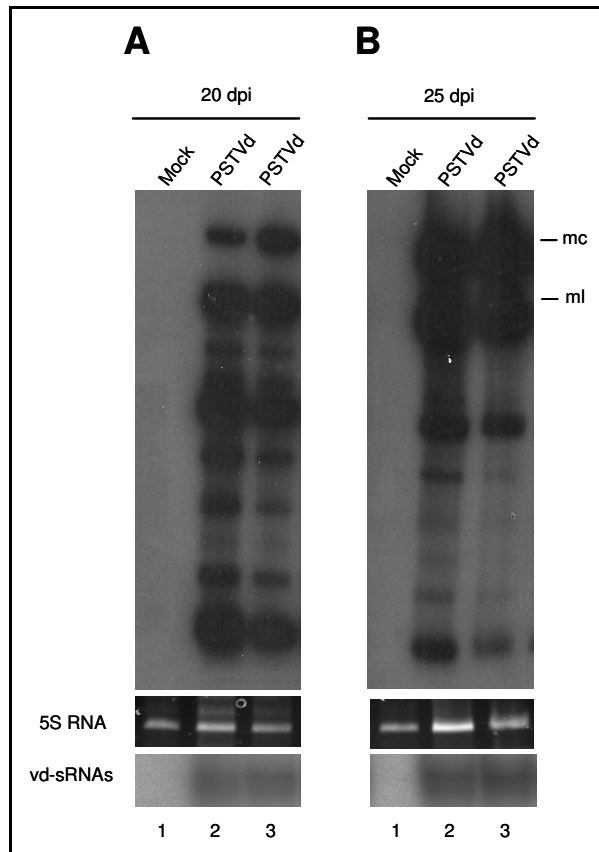


Figure S1. Infection of eggplant by PSTVd results in the accumulation of a series of PSTVd (+) sgRNAs accompanying the *mc* and *ml* (+) forms. Total RNAs from upper non-inoculated leaves collected at 20 (A) and 25 dpi (B) were separated by denaturing PAGE in 5% (upper panels) or 17% (lower panels) gels and revealed by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands. In each panel lane 1 corresponds to mock-inoculated eggplant, and lanes 2 and 3 to PSTVd-infected eggplant. Positions of the PSTVd *mc* and *ml* forms are indicated on the right. Equal loading was assessed by the intensity of the band generated by 5S RNA after staining with ethidium bromide (middle panel).

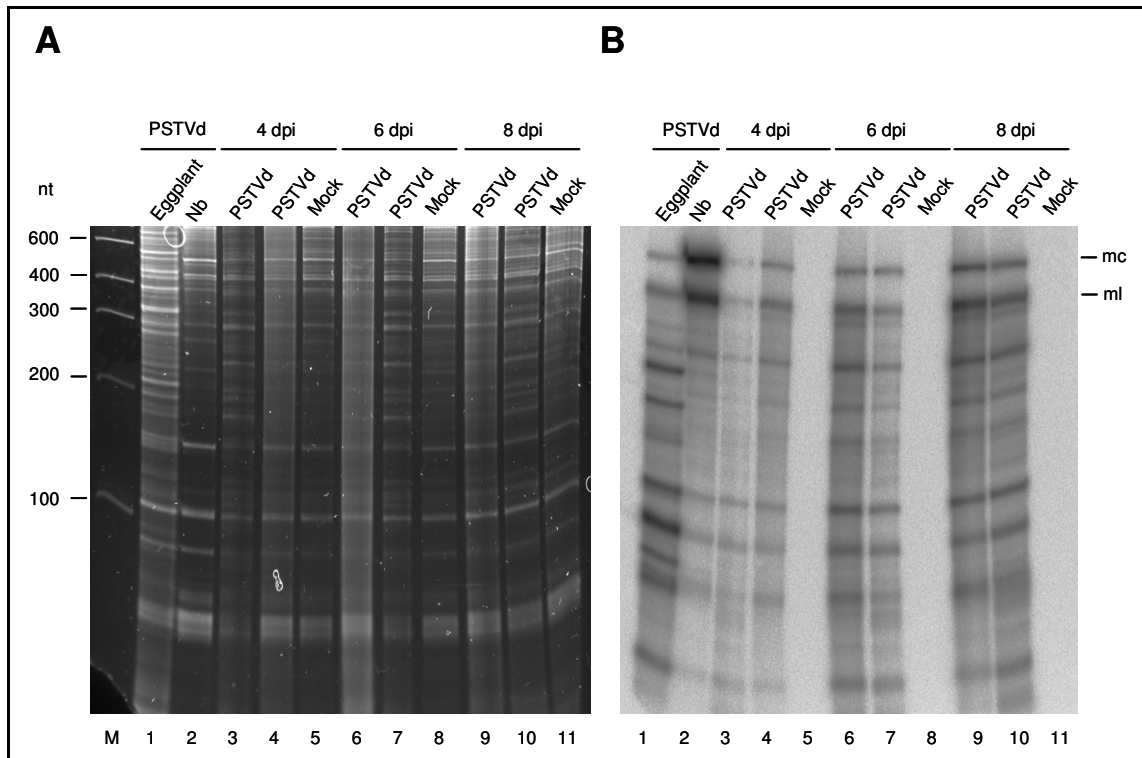


Figure S2. Leaves of *N. benthamiana* agroinfiltrated with a culture of *A. tumefaciens* carrying a binary plasmid with a head-to-tail dimeric insert of PSTVd accumulate, together with the *mc* and *ml* (+) forms, a series of PSTVd (+) sgRNAs. Total RNAs from agroinfiltrated leaves collected at 4, 6 and 8 dpi were separated by denaturing PAGE in 5% gels and revealed with ethidium bromide (**A**), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands (**B**). In each panel lane 1 and 2 correspond to PSTVd-infected upper non-inoculated leaves of eggplant and *N. benthamiana*, respectively, and lanes 5 and 8 to mock-agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana*. Positions of RNA markers (in nt) are indicated on the left of lane M, and those of the PSTVd *mc* and *ml* forms on the right.

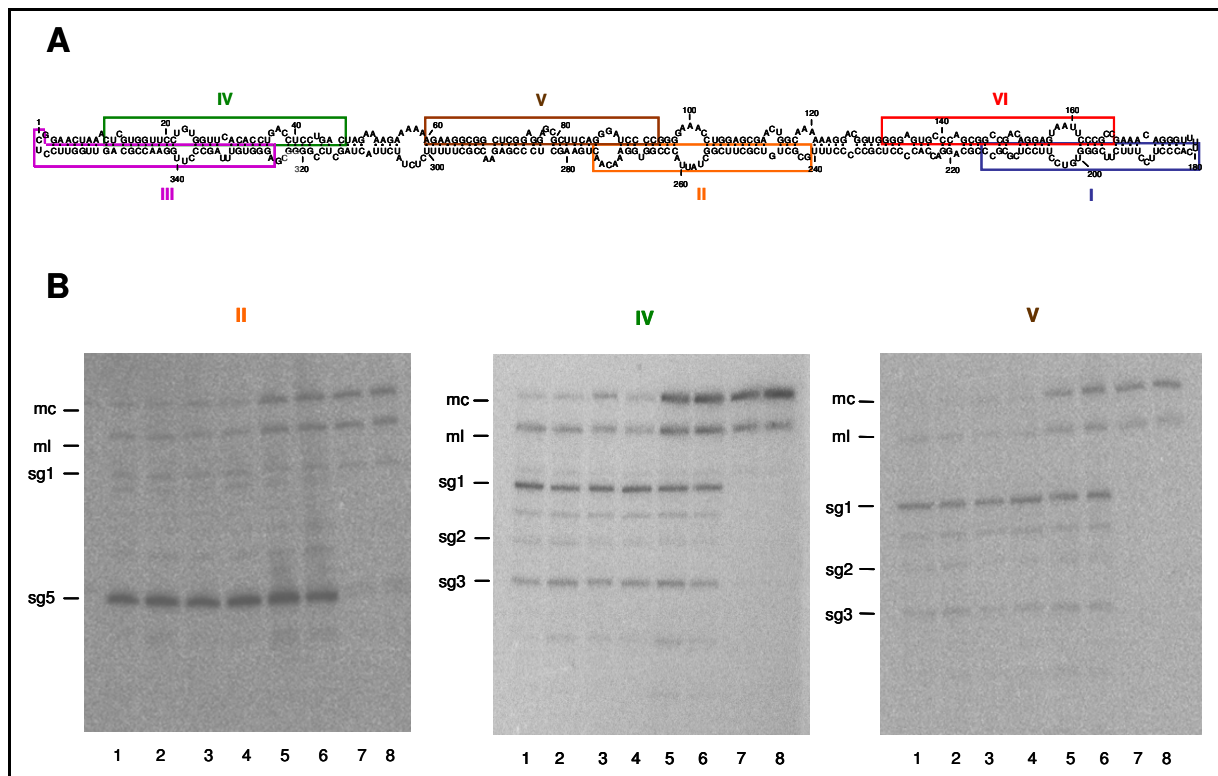


Figure S3. (A) Mapping of the six oligodeoxyribo probes for detecting PSTVd (+) strands on the secondary structure of the genomic (+) viroid RNA predicted by Mfold and supported by structural/functional analysis of a slightly different strain (45). (B) Northern-blot hybridizations with three radiolabeled oligonucleotide probes for detecting PSTVd (+) strands. In each panel lanes 1 and 2, lanes 3 and 4, and lanes 5 and 6 correspond to pairs of PSTVd-infected eggplants collected at 15, 20 and 25 dpi, respectively, and lanes 7 and 8 to a pair of PSTVd-infected *N. benthamiana* plants. Positions of some PSTVd (+) sgrNA and of the *mc* and *ml* forms are indicated on the left.

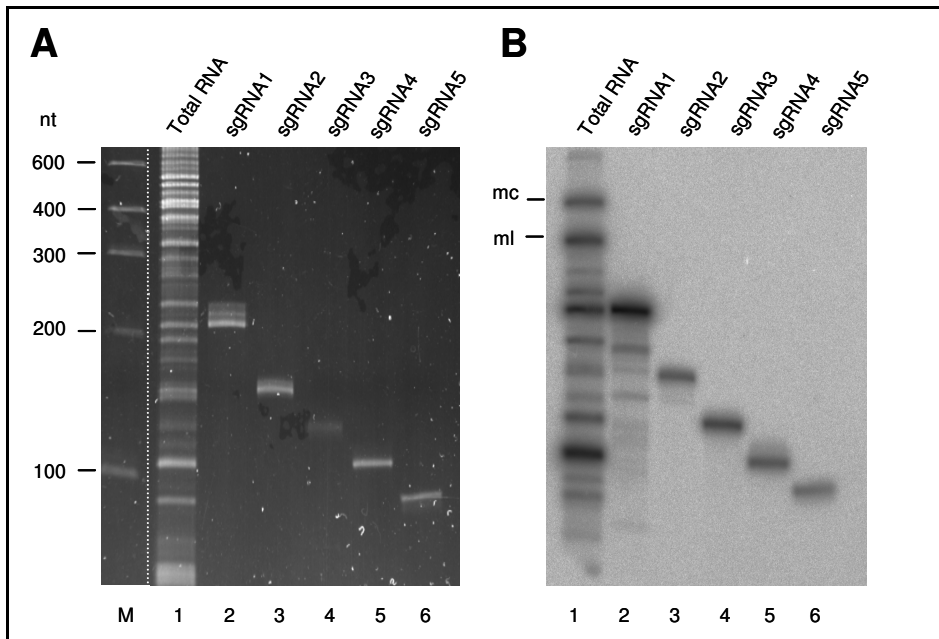


Figure S4. Assessment of the purification status of five PSTVd (+) sgRNAs by denaturing PAGE in 5% gels and ethidium bromide staining (**A**), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands (**B**). In each panel lane 1 corresponds to PSTVd-infected eggplant and lanes 2 to 6 to sgRNAs 1 to 5, respectively. Lane M corresponds to RNA markers, with their size (in nt) indicated on the left of panel A. Positions of the PSTVd *mc* and *ml* forms are indicated on the left of panel B.

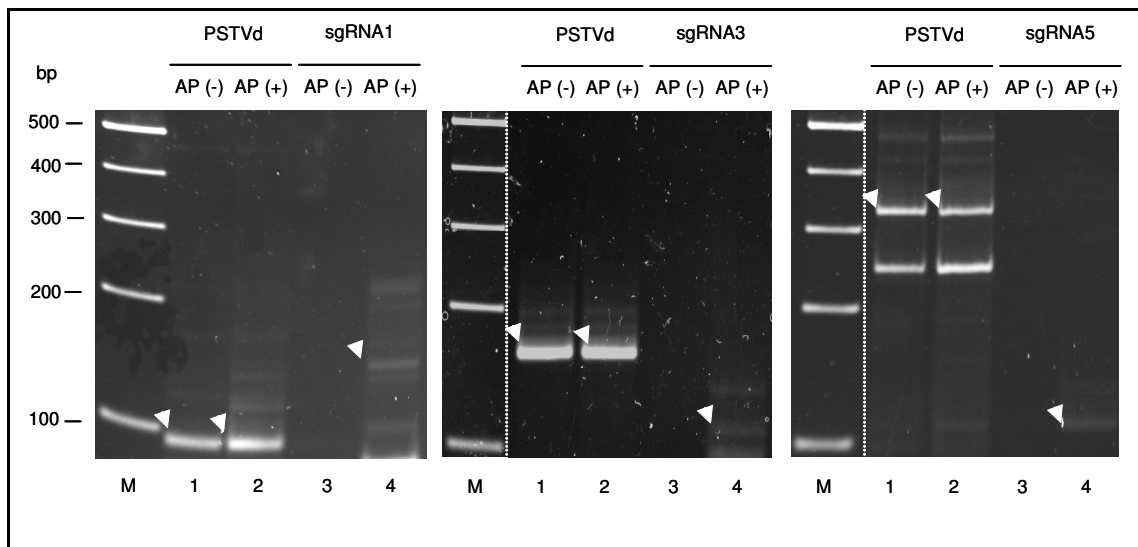


Figure S5. RACE analysis of the 3' termini of the PSTVd (+) sgRNAs 1, 3 and 5, using as control a full-length PSTVd (+) *in vitro* transcript with a 3'-hydroxyl terminus. Prior to polyadenylation and RACE (see Table S3 for the primers used), aliquots of each RNA were left untreated (lanes 1 and 3) or treated with alkaline phosphatase (AP) to dephosphorylate 3'-phosphorylated groups (lanes 2 and 4), with the resulting amplification products being then separated by non denaturing PAGE and stained with ethidium bromide. Arrowheads indicate the amplicons of expected length that were eluted, cloned and sequenced. Lane M, DNA markers.

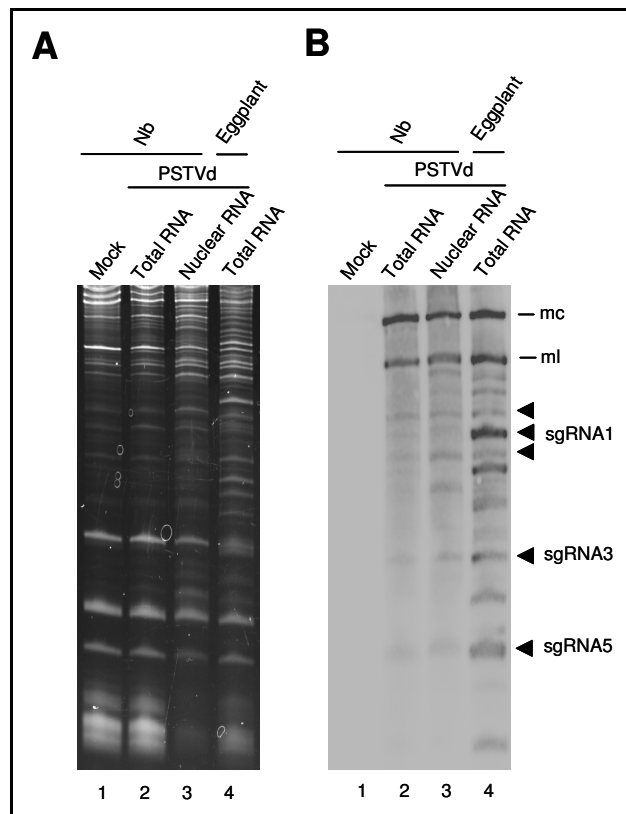


Figure S6. PSTVd *mc* and *ml* (+) forms and the (+) sgRNAs have a preferential nuclear accumulation as revealed by denaturing PAGE in 5% gels and ethidium bromide staining (**A**), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (+) strands (**B**). In each panel lane 1 corresponds to total RNAs (T) from mock-inoculated *N. benthamiana*, lanes 2 and 3 to total and nuclear RNAs (N) from PSTVd-infected *N. benthamiana*, respectively, and lane 4 to total RNAs from PSTVd-infected eggplant. Positions of the *mc* and *ml* forms are indicated on the right. Arrowheads mark positions of some common PSTVd (+) sgRNAs, including PSTVd (+) sgRNAs 1, 3 and 5. Leaves were collected at 20 dpi. Notice that bands corresponding to tRNAs, those with the fastest mobility in panel (A), are absent in the preparation of nuclear RNA.

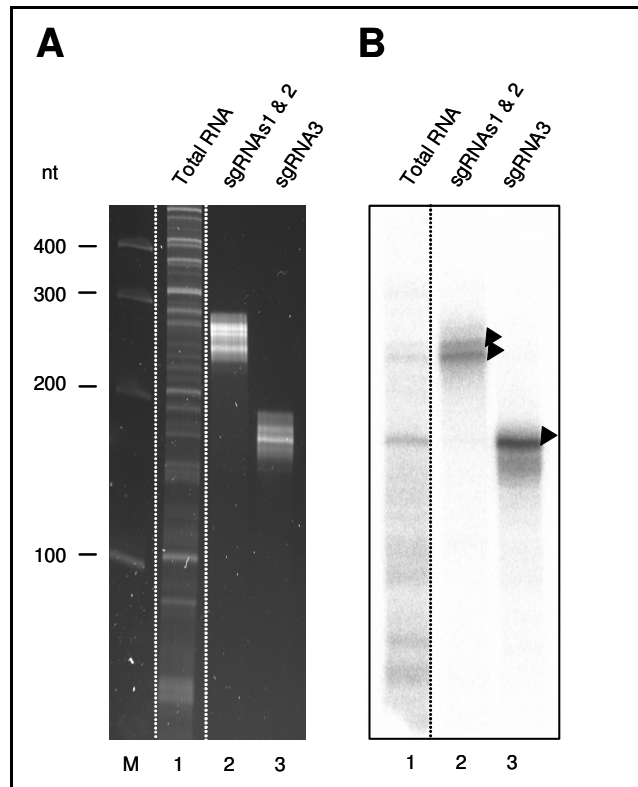


Figure S7. Assessment of the purification status of three PSTVd (-) sgRNAs by denaturing PAGE in 5% gels and ethidium bromide staining (**A**), and by Northern-blot hybridization with a radiolabeled riboprobe for detecting PSTVd (-) strands (**B**). In each panel lane 1 corresponds to PSTVd-infected eggplant, lanes 2 to a mixture sgRNAs 1 and 2, and lane 3 to sgRNA 3. Lane M corresponds to RNA markers, with their size (in nt) indicated on the left. Arrowheads mark positions of PSTVd (-) sgRNAs 1, 2 and 3.

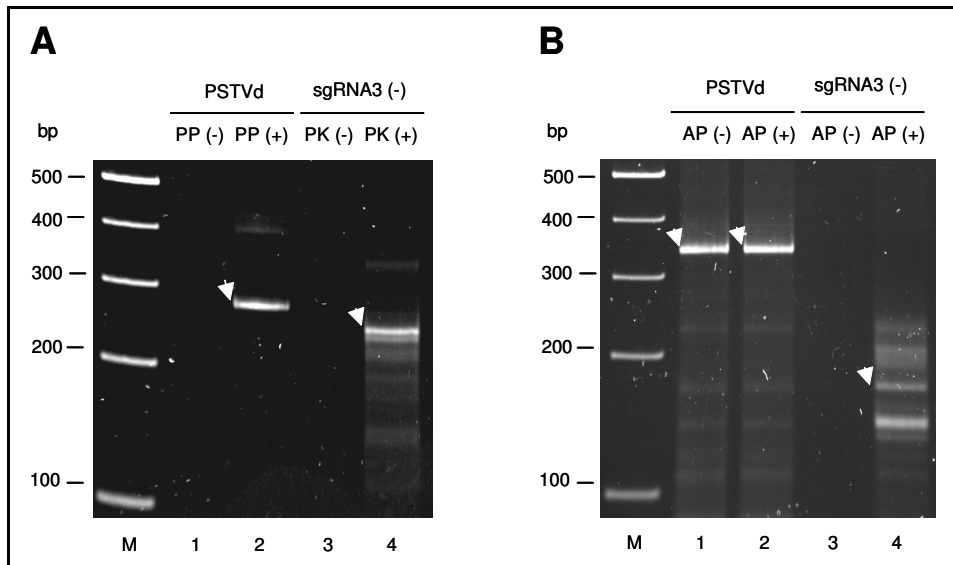


Figure S8. 5'- and 3'-RACE of the most abundant PSTVd (-) sgRNAs 3, using as control a full-length PSTVd (-) *in vitro* transcript with 5'-triphosphorylated and 3'-hydroxyl termini. (A) Prior to 5'-RACE, aliquots of the PSTVd (-) RNA were left untreated (lane 1) or treated with RNA 5' polyphosphatase (PP) to convert the 5'-triphosphorylated group into a 5'-monophosphorylated group (lane 2), while aliquots of the PSTVd (-) sgRNA3 were left untreated (lane 3) or treated with PK and ATP to phosphorylate 5'-hydroxyl groups. (B) Prior to polyadenylation and 3'-RACE, aliquots of the RNAs were left untreated (lanes 1 and 3) or treated with alkaline phosphatase (AP) to dephosphorylate 3'-phosphorylated groups (lanes 2 and 4). In all cases the resulting amplification products were separated by non denaturing PAGE and stained with ethidium bromide. Arrowheads indicate the amplicons of expected length that were eluted, cloned and sequenced. Lane M, DNA markers. For the RNA adaptor and primers used, see Table S3.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los viroides son patógenos de plantas con una elevada simplicidad genómica y estructural capaces de infectar un gran número de especies vegetales. No codifican proteínas y, por lo tanto, todas las fases de su ciclo infeccioso son dependientes de la interacción directa con factores del huésped. De hecho, los RNAs viroidales contienen elementos estructurales similares a los de los RNAs del huésped, adquiriendo así la capacidad de utilizar las maquinarias de transcripción, procesamiento y translocación de su huésped (Flores *et al.*, 2012). Debido a estas características, los viroides constituyen un modelo simple para estudiar las propiedades funcionales y reguladoras tanto de los RNA infecciosos como de los celulares. La utilidad de este modelo en la identificación de mecanismos moleculares previamente desconocidos está muy bien documentada por el descubrimiento de las ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986) y del papel fundamental desempeñado por el RNA en la metilación *de novo* del DNA celular (Wassenegger *et al.*, 1994), un mecanismo de gran importancia en la regulación de la expresión génica en eucariotas (Wassenegger *et al.*, 1994; Matzke y Birchler, 2005; Zhang *et al.*, 2006a; Huettel *et al.*, 2007; Law y Jacobsen, 2010).

De forma similar a otros RNAs celulares o virales, el nivel de acumulación de los RNAs viroidales en los tejidos del huésped es el resultado de un balance dinámico entre su síntesis y degradación. Por un lado, los mecanismos de replicación viroidal, que se han investigado con detalle en el pasado y de los que se conoce su localización subcelular, las diferentes etapas y las enzimas del huésped implicadas (Schindler y Mühlback, 1992; Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2009; Bojic *et al.*, 2012; Nohales *et al.*, 2012), generan en el tejido infectado nuevas moléculas de estos RNAs. Por otro lado, los niveles de acumulación de los mismos viene limitada por sistemas de degradación activados por el huésped. Estos últimos mecanismos, que pueden tener un papel fundamental en la defensa de las plantas contra estos agentes infecciosos, se desconocen casi completamente.

La limitada información respecto a los mecanismos de degradación no está solo restringida a los RNAs viroidales. También en el caso de los RNAs celulares, incluidos los mRNAs, las rutas de síntesis (y de traducción) han sido profusamente estudiadas, mientras que poco se sabe sobre las de degradación. A este respecto, en los últimos años se han identificado diferentes mecanismos celulares implicados en la degradación de los mRNAs, que actúan tanto a nivel nuclear como citoplasmático (Dori-Bachash *et al.*, 2011; Pérez-

Ortín *et al.*, 2013). Estas rutas de degradación generalmente operan sobre complejos formados de mRNAs y proteínas que se generan durante o después de la transcripción. La degradación nuclear de los mRNAs está fundamentalmente dirigida a eliminar los mensajeros defectuosos por medio de sistemas de control basados en los exosomas nucleares (Hilleren *et al.*, 2001; Libri *et al.*, 2002; La Cava *et al.*, 2005; Houseley *et al.*, 2006; Vanacova y Stefl, 2007; Pérez-Ortín *et al.*, 2013). Después de su transcripción y maduración en el núcleo, los mRNAs llegan al citoplasma para ser traducidos. En el citoplasma también actúan rutas de degradación de los mRNAs que permiten tanto mantener los niveles óptimos de cada uno de ellos, como de eliminar los mRNAs defectuosos que hayan escapado al control nuclear (Anderson y Parker, 1998; Lykke-Andersen *et al.*, 2011). La degradación de los mRNAs en el citoplasma transcurre en los exosomas citoplásmicos, consistentes en complejos multiproteicos. Además, también se conocen sistemas de degradación que actúan durante la traducción en los cuerpos de procesamiento ('processing bodies', 'P-bodies') (Sheth y Parker, 2003; Balagopal y Parker, 2009) o fuera de ellos (Pérez-Ortín *et al.*, 2013). Si bien aún se ignoran las bases moleculares implicadas en estas rutas, la idea de que los mecanismos de degradación de los mRNAs forman parte de un complejo proceso finamente controlado está generalmente aceptada.

También en los RNAs virales los estudios se han centrado mayoritariamente en los mecanismos de replicación y expresión génica (Waterhouse y Heliwell, 2003). De todas formas, el relativamente reciente descubrimiento del PTGS y sus implicaciones en la interacción planta-virus han favorecido, al menos en parte, el aumento del interés hacia los procesos de degradación de los RNAs virales. A este respecto, los conocimientos han progresado rápidamente, confirmando de manera convincente el papel en defensa antiviral de los mecanismos de silenciamiento post-transcriptional mediados por pequeños RNAs cargados en proteínas AGOs (Zhang *et al.*, 2006b; Bortolamiol *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010; Scholthof *et al.*, 2011; Miozzi *et al.*, 2013). Por el contrario, el papel de otras rutas de degradación en el control de los niveles de acumulación de los RNAs virales, ha sido poco estudiado hasta ahora. Solo recientemente se ha propuesto que las rutas de degradación de los mRNA pueden también tener un papel importante en la regulación de los RNA de los *Potyvirus* (Mäkinen y Hafrén, 2014).

De manera similar a los virus, los mecanismos y los factores del huésped que pueden contribuir a la degradación de los viroides han empezado a ser caracterizados solamente después de identificar estos RNAs infecciosos como diana del silenciamiento mediado por

RNA. La implicación de ciertas endoribonucleasas de tipo III, las DCLs, en la defensa antiviral de las plantas, se infirió a partir de la identificación en tejidos infectados de vd-sRNAs de 21-24 nt derivados de los RNAs viroidales y con estructura similar a los miRNAs y siRNAs (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martín *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2012b). Si, como ya se ha mostrado con los RNAs virales (Montgomery *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010; Miozzi *et al.*, 2013), los RNAs viroidales también son degradados por el complejo RISC y, más precisamente por la actividad de proteínas AGOs cargadas con vd-sRNAs, era aún una cuestión no resuelta cuando empezamos nuestro estudio. Tampoco estaba explorada la posibilidad de que otros procesos de degradación de los RNAs celulares, diferentes del mecanismo de silenciamiento mediado por RNA, pudieran operar en el caso de los viroides.

Nuestro estudio se ha propuesto contestar a la pregunta relativa a cuáles son las rutas celulares implicadas en la degradación de los RNAs viroidales. Por un lado, se han realizado experimentos dirigidos a aclarar el papel de las proteínas AGOs en la defensa antiviral, y por otro lado se ha caracterizado una serie de RNA subgenómicos viroidales para determinar si pudieran ser productos de una posible ruta de degradación desconocida hasta ahora.

1. Degradación *in vivo* del PSTVd: ruta catalizada por proteínas Argonata cargadas con pequeños RNAs viroidales

El silenciamiento mediado por RNA es un mecanismo que las plantas utilizan para regular la expresión de sus genes y para defenderse de ácidos nucleicos invasores. La observación de que, tanto los RNA virales como los viroidales, son diana de DCLs no implica que los sRNAs que estas enzimas generan a partir de los mismos sean necesariamente cargados en proteínas AGOs que finalmente guíen al complejo RISC a degradar los RNAs infecciosos. De hecho, en la infección latente de *Drosophila* por el virus 'flock house' se han detectado sRNAs virales que en su mayoría no están unidos a proteínas AGOs, lo que sugiere que el procesamiento mediado por Dicer de los intermediarios de la replicación viral (dsRNAs), por sí mismo, desempeña una función clave en mantener latente al virus, y que las proteínas AGO no parecen ser necesarias (Flynt *et al.*, 2009).

En ciertos virus de plantas, estudios de genética inversa realizados con líneas de *A. thaliana* que expresan proteínas AGOs mutadas, han demostrado de forma convincente el papel antiviral desempeñado por estas proteínas (Morel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006b; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008; Giner *et al.*, 2010;

Harvey *et al.*, 2011). Estudios similares no han podido realizarse con los viroides porque, por un lado, *A. thaliana* no es huésped de ningún viroide conocido, y por otro, los huéspedes naturales o experimentales de los viroides identificados hasta ahora no se prestan a desarrollar estudios de genética inversa. Por lo tanto, aún quedan por contestar muchas preguntas sobre la función biológica de los vd-sRNAs.

Sin embargo, algunas propiedades de los viroides, como la conformación particularmente compacta de sus RNA genómicos, podrían conferir resistencia a la degradación mediada por RISC, sugiriendo que estos RNA infecciosos habrían evolucionado a adoptar esta estructura secundaria para protegerse de la inactivación por las proteínas AGOs (Wang *et al.*, 2004; Gómez y Pallás, 2007; Itaya *et al.*, 2007). Sin embargo, resultados recientes muestran que RNAs virales con estructura secundaria compacta similar a la de los viroides son degradados por el complejo RISC (Schuck *et al.*, 2013), poniendo de manifiesto que dicha estructura no es un obstáculo insalvable frente a las proteínas AGOs.

Por otra parte, aunque de forma indirecta, otros estudios han mostrado que en determinadas condiciones algunos viroides podrían ser sensibles a la degradación mediada por RISC. Por ejemplo, la infectividad de algunos viroides se ve afectada negativamente cuando se co-inoculan con sus respectivos dsRNAs o siRNAs (Carbonell *et al.*, 2008), o cuando se inoculan en plantas que acumulan vd-sRNAs homólogos como resultado de la expresión transgénica de dsRNAs de origen viroidal (Schwind *et al.*, 2009), sugiriendo que proteínas AGOs, cargadas con los vd-sRNAs, degradan específicamente los RNAs viroidales. Si bien otros estudios han mostrado que los vd-sRNAs pueden actuar como miRNAs, inactivando de forma específica mRNAs complementarios en sistemas transgénicos (Vogt *et al.*, 2004) y naturales (Navarro *et al.*, 2012a), no hay ninguna prueba directa de la capacidad de las proteínas AGOs para incorporar los vd-sRNAs.

Con el fin de aportar datos directos en esta dirección, como primera etapa de nuestro estudio se han llevado a cabo ensayos de inmunoprecipitación empleando hojas de *N. benthamiana* infectadas con PSTVd y un anticuerpo policlonal específico contra la proteína AGO1 endógena.

En *A. thaliana*, AGO1 desempeña un papel muy importante en la ruta de los miRNAs, y asimismo es uno de los principales componentes del sistema de defensa antiviral de las plantas vía PTGS (Baumberger y Baulcombe, 2005; Montgomery *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Vaucheret, 2008; Azevedo *et al.*, 2010). Además, la expresión de AGO1 está a su vez regulada por un mecanismo de PTGS mediado por el miRNA168 (Rhoades *et al.*, 2002; Vaucheret *et al.*, 2004, 2006; Csorba *et al.*, 2007; Várallyay *et al.*,

2010; Várallyay y Havelda, 2013). Nuestros primeros ensayos de inmunoprecipitación, combinados con hibridación Northern-blot, mostraron que AGO1 une preferentemente vd-sRNAs de PSTVd del tamaño esperado (21 y 22 nt). Además de confirmar de forma directa la capacidad de AGO1 para cargar vd-sRNAs, este experimento ofreció también la oportunidad de averiguar si existían otras similitudes entre las infecciones de *N. benthamiana* por PSTVd y por ribovirus, en particular con respecto a la regulación de la expresión de AGO1. Las infecciones de *N. benthamiana* por diferentes ribovirus está acompañada por una disminución de la acumulación de la proteína AGO1, a su vez asociada a un incremento del nivel de miR168 y del mRNA diana del mismo que codifica AGO1. Para resolver esta aparente contradicción se ha propuesto que miR168, cuya expresión está inducida por supresores del silenciamiento, inhibe la traducción del mRNA que codifica AGO1 (Várallyay *et al.*, 2010; Várallyay y Havelda, 2013). Sin embargo, contrariamente a lo que se ha observado con los ribovirus, la acumulación de la AGO1 endógena o la expresión de miR168 no se ven afectadas de forma significativas por la infección con PSTVd. Este resultado no es sorprendente, teniendo en cuenta que PSTVd no codifica ninguna proteína y, por lo tanto, en las células infectadas por este viroide no hay supresores del silenciamiento que puedan inducir la expresión de miR168. Por otra parte, la posibilidad que los vd-sRNAs puedan competir con miR168 en la unión con AGO1, como se ha previamente propuesto para siRNA y miRNA endógenos (Martínez de Alba *et al.*, 2011), no parece factible en nuestro sistema porque no se observa una reducción en los niveles de la proteína AGO1.

Después de haber comprobado que la AGO1 endógena de *N. benthamiana* une vd-sRNAs de PSTVd, nuestro siguiente objetivo fue investigar si también otras AGOs muestran la misma propiedad. En ausencia de anticuerpos específicos para todas las AGOs de *N. benthamiana*, y para superar el obstáculo resultante de la incapacidad de PSTVd de infectar *A. thaliana*, pusimos a punto un sistema alternativo basado en la sobreexpresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* de AGO1 y de otras AGOs de *A. thaliana* marcadas con un epítipo de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe para examinar por inmunoprecipitación si (y en su caso cuáles) vd-sRNAs se cargan en ellas. Ya que la interacción específica entre AGO7 y miR390 está bien caracterizada (Mi *et al.*, 2008), ajustamos la técnica de inmunoprecipitación empleando este sistema AGOs-miR390. Comprobamos que en nuestras condiciones de laboratorio miR390 fue inmunoprecipitado específicamente utilizando preparaciones de plantas que expresaban AGO7 y no con las que expresaban AGO1. Así

pues, dichas condiciones mostraron ser apropiadas para aplicarlas al estudio de otras proteínas AGO que pudieran formar complejos con los vd-sRNAs.

En nuestro estudio de interacción entre los miembros de la familia Argonauta y los vd-sRNAs, se utilizaron plantas de *N. benthamiana* infectadas sistémicamente por el PSTVd que se agroinfiltraron con nueve de las diez proteínas AGOs de *A. thaliana*. Todas, a excepción de AGO6, AGO7 y AGO10, resultaron estar cargadas con vd-sRNAs: AGO1, AGO2 y AGO3 con los de 21 y 22 nt, mientras que AGO4, AGO5 y AGO9 también mostraron afinidad por los de 24 nt. Por lo tanto, además de AGO1, la capacidad de cargar vd-sRNAs es compartida por otras AGOs, que muestran especificidad por ciertos vd-sRNAs. Mientras que la incapacidad de AGO7 para cargar vd-sRNAs es explicable por la gran especificidad de esta AGO por miR390 (Mi *et al.*, 2008), la razón por la cual AGO6 y AGO10 no cargan vd-sRNAs está por determinar. Como AGO4, AGO6 también está involucrada en la metilación y en el TGS dirigido por RNA (Havecker *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2007) y une los rasiRNA de 24 nt (Mi *et al.*, 2008; Eun *et al.*, 2011). Por su parte, AGO10 actúa como regulador del mantenimiento del SAM mediante su interacción y elevada especificidad por algunos miRNA como miR165 y miR166 (Liu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011). Las diferentes AGOs se pueden localizar en uno o más compartimentos celulares que no tienen necesariamente que coincidir con aquellos donde se localizan los vd-sRNAs. Se ha demostrado que AGO1, AGO2, AGO3, AGO4 y AGO5 se acumulan tanto en el núcleo que en el citoplasma (Vaucheret *et al.*, 2004; Fang y Spector, 2007; Li *et al.*, 2006, 2008; Song *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2010), mientras AGO6 lo hace exclusivamente en el núcleo (Zheng *et al.*, 2007). Por otra parte, aunque los vd-sRNAs se localizan predominantemente en el citoplasma (Denti *et al.*, 2004), no puede excluirse su posible presencia en el núcleo. Así pues, aunque existan otras posibles explicaciones, no es descartable que la aparente incapacidad de AGO6 y AGO10 de unirse a los vd-sRNAs se deba a que no colocalizan con ellos.

Mediante experimentos de inmunoprecipitación, se ha mostrado previamente que las AGOs unen preferentemente los sRNAs endógenos o virales de un cierto tamaño y que presentan un determinado nucleótido en su extremo 5' (Kim, 2008; Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Havecker *et al.*, 2010). Para averiguar si la incorporación de los vd-sRNAs en las AGOs sigue las pautas típicas identificadas en estos sistemas, caracterizamos más detalladamente los vd-sRNAs inmunoprecipitados mediante secuenciación masiva. Nuestros resultados con muestras de RNA total y RNA inmunoprecipitado correspondientes a las distintas AGOs, mostraron que AGO1, AGO2, AGO4 y AGO5 unen PSTVd-sRNAs, sobre

todo los de 21 y 22 nt, con la misma especificidad por el nucleótido 5' terminal que cada una de ellas presenta frente a sRNAs celulares y virales. Además, la unión preferencial de los PSTVd-sRNAs a las AGOs se confirmó por la mayor abundancia relativa de los primeros (respecto a los sRNAs totales) en las librerías de RNAs inmunoprecipitados que en las de RNA total (no inmunoprecipitado).

La incorporación de los vd-sRNAs en AGOs es un factor necesario para que estas proteínas puedan desempeñar algún papel antiviral. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue establecer si las AGOs cargadas eran capaces de degradar el RNA viroidal de secuencia complementaria, como ya se ha mostrado en algunos ribovirus de plantas (Takeda *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2010; Scholthof *et al.*, 2011; Schuck *et al.*, 2013). La implicación de las AGOs en la defensa antiviral se ha estudiado fundamentalmente utilizando plantas de *A. thaliana* que expresan formas mutadas y no funcionales de una o más proteínas AGOs. Una vez infectadas, las plantas mutantes presentan una acumulación de RNA viral mayor que las silvestres y resultan altamente susceptibles a diferentes virus, como polerovirus (Zhang *et al.*, 2006b; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Giner *et al.*, 2010) y cucumovirus (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008); de hecho, estos efectos sirven para confirmar la implicación del silenciamiento mediado por RNA, y en particular de AGO1, AGO2 y AGO7 (Qu *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011), en la defensa antiviral (Morel *et al.*, 2002).

En ausencia de un sistema adecuado como el de las plantas mutantes, en nuestro estudio sobreexpresamos algunas de las proteínas AGOs para estudiar su efecto sobre el título viroidal: la disminución de dicho título podría interpretarse como una prueba a favor de su papel antiviral. Cuando se agroinfiltraron AGO1, AGO2, AGO4 y AGO5 en hojas de *N. benthamiana* en las primeras etapas de infección con PSTVd (8 dpi), se detectó una menor acumulación del RNA genómico viroidal con respecto a las plantas agroinfiltradas con GUS y AGO7 (que une exclusivamente el miR390). Este resultado, junto con los de la unión de las proteínas AGOs a vd-sRNAs del tamaño esperado y con el del extremo 5' terminal específico para cada una de ellas, es consistente con que los vd-sRNAs unidos a las AGOs dirigen el complejo RISC contra el RNA viroidal de secuencia complementaria promoviendo su degradación. Así pues, el PSTVd no sólo sería diana de las DCLs, sino también de las proteínas AGO (formando parte de RISC) que funcionarían como una segunda barrera antiviral.

En infecciones por PSTVd y PLMVd (Hernández y Flores, 1992), se produce una elevada cantidad de vd-sRNAs (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002;

Navarro *et al.*, 2012b; Hamman y Steger, 2012; este trabajo), algunos de los cuales han mostrado una actividad biológica que puede interferir con el desarrollo de las plantas infectadas. Por ejemplo, las proteínas AGOs cargadas con vd-sRNAs pueden tener un papel importante en patogénesis, como es el caso de la sintomatología denominada calico (una clorosis muy pronunciada) del melocotonero, causada por algunas variantes de PLMVd. Esta sintomatología es inducida por dos vd-sRNA de origen viroidal que actúan como miRNA endógenos dirigiendo la degradación específica de secuencia del mRNA del huésped que codifica una proteína de choque térmico (HSP90) cloroplástica implicada en el desarrollo del cloroplasto (Navarro *et al.*, 2012a). Un mecanismo de patogénesis similar ha sido también descrito para un RNA satélite del CMV (Shimura *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011). Considerando que tanto el número de diferentes vd-sRNAs cargados por las AGOs como el de potenciales mRNAs diana es muy elevado (Machida *et al.*, 2007; Diermann *et al.*, 2010; Hamman y Steger, 2012; Navarro *et al.*, 2012a; este trabajo), la posibilidad que el viroide pueda utilizar los vd-sRNAs para modular la expresión génica de la planta, alterando rutas metabólicas no necesariamente vinculadas a la patogénesis, no parece demasiado especulativa. Podría incluso ocurrir que estos mecanismos de regulación de la expresión génica del huésped mediada por vd-sRNAs favorecieran el proceso infeccioso viroidal. Por lo tanto, los resultados descritos en este trabajo, que muestran de forma más convincente la acción antiviroidal de los vd-sRNAs, tienen también implicaciones adicionales desde un punto de vista evolutivo. El silenciamiento mediado por RNA genera unos efectores (vd-sRNAs) que, cargados en AGOs, pueden desempeñar una doble función según la diana a la que se dirige el complejo RISC. Si la diana es el mismo RNA viroidal, el sistema de degradación funciona como un mecanismo de defensa de la planta contra éstos. Si la diana son los mRNAs de la planta, el mismo sistema mediado por AGOs se transforma en un mecanismo de patogénesis activado por dichos RNAs o, quizás, de regulación de los genes del huésped para favorecer su ciclo infeccioso.

2. Degradación *in vivo* del PSTVd: ruta catalizada por ribonucleasas que generan RNAs subgenómicos

La identificación del silenciamiento mediado por RNA como mecanismo que limita la acumulación de los viroides en tejidos infectados, no excluye que otros mecanismos de degradación de los RNAs celulares también puedan actuar contra los RNA viroidales. En tal situación, es factible que dicha degradación transcurra en etapas sucesivas que generen

intermediarios de tamaño inferior al RNA genómico viroidal (RNAs subgenómicos, sgRNAs). En todo caso, la posibilidad de estudiar los procesos degradativos de los RNAs viroidales a partir de la caracterización de estos potenciales sgRNAs no ha sido abordada hasta ahora, posiblemente porque se ha considerado improbable que productos de degradación de tamaño definido se acumulen *in vivo* en cantidad suficiente para ser caracterizados con las técnicas convencionales.

Sin embargo, la síntesis de RNAs subgenómicos ha sido estudiada en profundidad en los ribovirus de cadena (+), particularmente en los de plantas, como consecuencia de que una gran mayoría de ellos produce sgRNAs (Lehto *et al.*, 1990; Balmori *et al.*, 1993; Johnston y Rochon, 1995; Haasnoot *et al.*, 2000; Koev y Miller, 2000; Miller y Koev, 2000; Wierzechoslowski *et al.*, 2004). Estos estudios han definido algunas características estructurales de los sgRNAs, que se producen en células infectadas sin interferir con la replicación viral y, generalmente, presentan secuencias co-terminales con el extremo 3' del RNA genómico, y alguna vez también con su extremo 5' (Sztuba-Solińska *et al.*, 2011). Desde un punto de vista funcional, los sgRNAs de muchos ribovirus de cadena positiva (+) permiten la expresión de genes virales que codifican proteínas necesarias (Grzelishvili *et al.*, 2000; Miller y Koev, 2000; Sztuba-Solińska *et al.*, 2011), aunque también pueden tener un papel en la replicación del RNA viral (Shen y Miller, 2004), y en la recombinación del RNA (Cheng y Nagy, 2003; Chetverin *et al.*, 2005).

Volviendo a los sgRNAs viroidales, su presencia ha sido identificada en raras ocasiones, sólomente en aguacate y melocotón infectados por los viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*) ASBVd (Symons, 1981) y PLMVd (Hernández y Flores, 1992), respectivamente. Sin embargo, puesto que los viroides no codifican proteínas, el origen y función de estos sgRNAs debería ser distinto al de los sgRNA virales implicados en la traducción. De hecho, la caracterización de los sgRNAs de polaridad (+) y (-) de 137 y 148 nt, respectivamente, que se acumulan en aguacate infectado con ASBVd mostró extremos 5' idénticos a los productos que resultan del autocorte *in vitro* de las formas diméricas (+) y (-) del ASBVd. En cuanto a los extremos 3', podrían resultar de paradas de transcripción prematuras, ya que al menos el correspondiente al sgRNA (+) de ASBVd no está fosforilado (Darós *et al.*, 1994). Por otro lado, en melocotón infectado con PLMVd (Hernández y Flores, 1992), también se detectaron y caracterizaron sgRNAs (+) y (-) mediante técnicas de extensión del cebador, RLM-RACE y RT-PCR (Pelchat *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2005). Análisis de los sgRNAs de ambas polaridades, con respecto a su tamaño (en torno a 240 nt) y extremo 5' (con un grupo trifosforilado), confirmaron que los mismos resultan del inicio

de la transcripción en sitios específicos en las hebras de ambas polaridades que se autocortan en los sitios predichos por las estructuras de cabeza de martillo (antes de que concluya la primera ronda de replicación) (Delgado *et al.*, 2005). Por lo tanto, aunque los sgRNAs de ASBVd y PLMVd tengan orígenes diferentes (los extremos 5' de los sgRNAs de ABSVd corresponden al sitio de autocorte, mientras los del PLMVd a los sitios de inicio de la transcripción), en ambos casos su génesis no está relacionada con los procesos de degradación de los RNAs viroidales.

En el presente estudio, la identificación inicial de 6-8 sgRNAs de polaridad (+) del PSTVd en hojas de berenjena infectadas sistémicamente por este viroide, nos ofreció la posibilidad de profundizar en sus propiedades estructurales y dinámica de acumulación.

La intensidad de la señal de hibridación de alguno de los sgRNAs, separados mediante PAGE desnaturizante, generada por sondas específicas para detectar la polaridad (+), fue incluso superior a la de las señales correspondientes a los monómeros circulares (*mc*) y lineares (*ml*) del viroide. El tamaño definido de las bandas de estos sgRNAs y su reproducibilidad en experimentos de hibridación independientes, nos permitió excluir desde un principio que pudieran resultar de una degradación inespecífica de los RNAs viroidales. Además, la identificación —aunque a un nivel de acumulación inferior— de sgRNAs con un patrón similar al observado en berenjena en otros huéspedes, como *N. benthamiana* y tomate, reforzó la idea que los sgRNAs deberían derivar de algún mecanismo específico.

En principio, asumimos que los sgRNAs (+) de PSTVd podrían ser, bien productos de la terminación prematura de la transcripción, o de cortes endonucleolíticos catalizados por RNAsas durante la replicación o una vez concluida ésta. Para discriminar entre las dos posibilidades, en primer lugar se analizaron mediante PAGE desnaturizante e hibridación Northern-blot preparaciones de ácidos nucleicos de berenjena infectada con PSTVd, empleando para este fin seis sondas de polaridad (-) diseñadas sobre distintas regiones de la molécula de PSTVd. Estos ensayos mostraron que los sgRNAs correspondían a diferentes regiones del RNA genómico (+) de PSTVd, y que en algún caso solapaban parcialmente entre ellos o estaban incluidos uno dentro de otro. En segundo lugar, análisis de extensión del cebador de cinco sgRNAs (+) revelaron que cada sgRNA presentaba un extremo 5' terminal diferente de los demás, a excepción del sgRNA1 y sgRNA3. Estos datos nos permitieron descartar que los sgRNAs fueran el resultado de una terminación prematura de la transcripción. También en el caso del sgRNA1 y del sgRNA3, los únicos con extremo 5' terminal común, la posibilidad de que derivaran de una terminación prematura de la transcripción pudo descartarse teniendo en cuenta la ausencia en dicho extremo de un grupo

trifosforilado o de una estructura de caperuza, como hubiera cabido esperar para un sitio de inicio genuino.

Con el fin de determinar la posición y el grupo químico de los extremos 5' y 3' terminales, se empleó la técnica de 5' y 3' RACE, observándose extremos 5' OH libre y 3' fosforilado en los sgRNAs (+) analizados. Estos datos sustentan la hipótesis de que los sgRNAs (+) PSTVd resultan de cortes endonucleolíticos de RNAs viroidales más largos catalizados por una (o más) RNasa convencional.

Para aclarar si esta(s) RNasa(s) actuaría exclusivamente sobre las cadenas de polaridad (+) del viroide, se aplicó la misma metodología analítica a la detección en berenjena de sgRNA de PSTVd de polaridad negativa (-) y a la caracterización de sus extremos. Estos sgRNA (-) fueron efectivamente detectados, aunque su concentración resultó algo más baja que la de los de polaridad (+). Además, comprobamos que los sgRNAs (-) presentaban características estructurales parecidas a los sgRNA (+), sugiriendo que un mecanismo similar podría estar involucrado en su generación y subsecuente acumulación.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que elegir una adecuada combinación viroide-huésped puede hacer abordable el análisis de las rutas de degradación de los RNA viroidales. El sistema experimental utilizado en nuestro caso (berenjena infectada por PSTVd) nos ha proporcionado una nueva e interesante visión sobre el balance o recambio de los RNAs viroidales, desvelándonos que otras RNasas, además de las identificadas en los mecanismos del silenciamiento mediado por RNA, están posiblemente implicadas en determinar los niveles de acumulación final de los RNAs genómicos viroidales en tejidos infectados. Se desconoce la razón por la que los sgRNAs del PSTVd de ambas polaridades se acumulan a niveles más altos en berenjena que en *N. benthamiana* y tomate. Es posible que algunos factores implicados en la ruta de degradación de los sgRNAs una vez formados (por ejemplo, exoribonucleasas), sean menos activos o estén menos concentrados en berenjena, aumentando la estabilidad de los mismos. Alternativamente, las endoRNAsas implicadas en la génesis de los sgRNA de PSTVd, que presumiblemente son enzimas reguladas por el desarrollo (Green, 1994), podrían ser más activas en berenjena, sobre todo en las primeras etapas de la replicación viroidal, como sugiere la mayor acumulación de los sgRNAs en fases tempranas de la infección.

Si bien nuestros datos muestran con claridad la existencia de una ruta de degradación específica, previamente desconocida, que actúa sobre los RNAs viroidales, quedan todavía por aclarar muchas otras cuestiones que derivan de esta observación. Son necesarios estudios adicionales para determinar cuáles son las RNasas implicadas en estos procesos de

degradación, en qué compartimento celular residen y sobre qué sustrato (RNAs maduros o intermediarios replicativos) actúan. Con respecto a las RNAsas involucradas, suponemos que las de las familias I y II, que generan extremos 3'-P (Green, 1994), podrían contribuir a la génesis de los sgRNA (+) y (-) de PSTVd.

En directa relación con estas enzimas nucleolíticas se encuentran sus sustratos. A este respecto, varias consideraciones apuntan a que la molécula circular (+) madura de PSTVd no es sustrato para la génesis de los sgRNAs. En primer lugar, la mayoría de las RNAsas que generan extremos 5'-OH y 3'-P, como la RNasa pancreática (Cuchillo *et al.*, 2011), tienen preferencia por regiones de simple cadena y, en nuestro estudio, no hemos observado que los extremos 5' de los sgRNAs se localicen preferentemente en los bucles de la estructura secundaria predicha para la molécula circular (+) de PSTVd. Estos bucles tienen un papel relevante en la replicación o el movimiento de PSTVd (Zhong *et al.*, 2007, 2008; Takeda *et al.*, 2011), posiblemente porque interactúan con proteínas del huésped que contribuirían a reducir la accesibilidad de la forma *mc* (+) a las RNAsas. Además, en los tejidos infectados se han detectado también sgRNAs (-) con extremos similares a los sgRNA (+), indicando que las RNAsas involucradas actúan sobre las cadenas de ambas polaridades.

Estos últimos datos tienen implicaciones tanto en la localización subcelular de las RNAsas involucradas en este proceso de degradación de los RNAs viroidales como en una mejor definición de sus posibles sustratos. Qi y Ding (2003a), considerando la diferente localización subnuclear de los RNAs de PSTVd de ambas polaridades, propusieron un modelo de replicación en el que: i) los RNAs ologoméricos del PSTVd de polaridad (+) y (-) se sintetizan en el nucleoplasma, ii) los RNAs (-) quedan retenidos en este compartimento subnuclear, y iii) los RNAs (+) son transportados selectivamente al nucleolo y procesados a las formas *mc* (+). Por lo tanto, la identificación de sgRNAs de PSTVd de ambas polaridades sugiere que se generan en el nucleoplasma, una idea consistente con la detección de dichos RNAs de polaridad (+) en preparaciones nucleares de *N. benthamiana*. Además, teniendo en cuenta que como ya se ha dicho, las RNAsas presumiblemente implicadas tienen preferencia por RNAs de simple cadena, es improbable que el sustrato a partir del cual se generan los sgRNAs sean las formas replicativas, constituidas por cadenas de ambas polaridades formando dobles hebras. Es más factible que el sustrato de las RNAsas implicadas en la génesis de los sgRNAs sean las simples cadenas nacientes de ambas polaridades que se sintetizan durante el proceso replicativo. Esta posibilidad es también consistente con los altos niveles de sgRNA (+) de PSTVd detectados en las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* (en las que se establece una infección temprana sincrona) respecto a las hojas

superiores no inoculadas. La interpretación más plausible es que los sgRNAs (+) de PSTVd resultan del corte endonucleolítico del transcripto dimérico primario de PSTVd (+) que se asemeja a un intermediario replicativo naciente. Estudios previos basados en plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan transcritos diméricos (+) de CEVd y HSVd, que como PSTVd pertenecen a la familia *Pospiviroidae*, han mostrado que dichos transcritos son reconocidos y procesados como intermediarios replicativos (Darós y Flores, 2004).

El recambio del RNA viroidal plantea preguntas específicas que son en buena medida distintas de las que plantea el mismo proceso en los RNAs virales. Al contrario de los ribovirus, cuyo RNA genómico está protegido por una o más proteínas capsídicas, los genomas viroidales son RNAs desnudos y por lo tanto más vulnerables a la acción de las endoribonucleasas (pero no de las exonucleasas debido a su estructura circular). Además, mientras que la replicación del RNA viral ocurre en vesículas membranosas asociadas a orgánulos conectados al citoplasma (den Boon y Ahlquist, 2010), la del PSTVd y otros miembros representativos de esta familia ocurre en el núcleo (Spiesmacher *et al.*, 1983; Harders *et al.*, 1989; Bonfiglioli *et al.*, 1996; Qi y Ding, 2003a). En este contexto, los RNAs viroidales presentan una relación más estrecha con los mRNAs celulares, que también son transcritos por la RNA polimerasa II. Los datos obtenidos en nuestro estudio nos permiten proponer una nueva visión sobre el recambio de los RNAs viroidales, en la que los procesos de degradación de los mismos están estrictamente vinculados a los de su síntesis (Fig. 10). Este modelo en cierto modo recapitula los modelos más recientes propuestos para el recambio de los mRNAs, donde la conexión entre las etapas de síntesis y de degradación se considera muy relevante para preservar niveles relativamente constantes de mRNA (Haimovich *et al.*, 2013b). La nueva ruta de degradación identificada en nuestro estudio, que posiblemente opera sobre las cadenas nacientes de los RNAs viroidales, actuaría conjuntamente y a niveles distintos de otras como en el silenciamiento mediado por RNA, cuyos sustratos podrían ser distintos e incluir las formas circulares (+) maduras.

A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los virus (Kalantidis *et al.*, 2002; Szittyá *et al.*, 2003), la acumulación de los viroides y la aparición de los síntomas que inducen se ven favorecidos por temperaturas elevadas (25-35°C) (Carbonell *et al.*, 2008; Sanger y Ramm, 1975). Hasta el momento este efecto de la temperatura sobre el título viroidal se ha interpretado considerando que estimularía la replicación. Puesto que nuestros datos muestran que tanto el silenciamiento RNA como otra ruta de degradación catalizada por RNAsas alternativas contribuyen a determinar el título viroidal en los tejidos infectados, conviene reinterpretar el efecto de la temperatura no solamente sobre la replicación de los viroides,

sino también sobre su degradación. En el silenciamiento mediado por RNA, es bien conocido el efecto inhibitorio que las temperatura bajas tienen sobre la génesis de siRNAs y la eficacia de este sistema como defensa antiviral (Szittyá *et al.*, 2003). Si la temperatura también influye en la defensa antiviroidal a través del silenciamiento mediado por RNA, y/o por la otra ruta de degradación identificada en este trabajo, queda por determinar.

Además, es muy probable que las dos rutas de degradación estudiadas tengan como diana RNAs viroidales que difieren en sus propiedades estructurales y en su localización subcelular. Las DCLs, por ejemplo, podrían actuar sobre RNAs muy estructurados, y más particularmente sobre dsRNA generados durante la replicación o por la actividad de una o más RDR, mientras que las proteínas AGOs actuarían sobre RNAs menos estructurados que permitan el acceso del complejo RISC; en ambos casos la actividad degradativa de estas proteínas debería ser compatible con su localización nuclear y/o citoplasmática. Por su parte, las RNasas de la nueva ruta de degradación operarían en el núcleo durante la replicación. Estas rutas de degradación funcionarían integradamente (con posibles efectos sinérgicos y/o de complementación) a determinar el título viroidal final (Fig. 10).

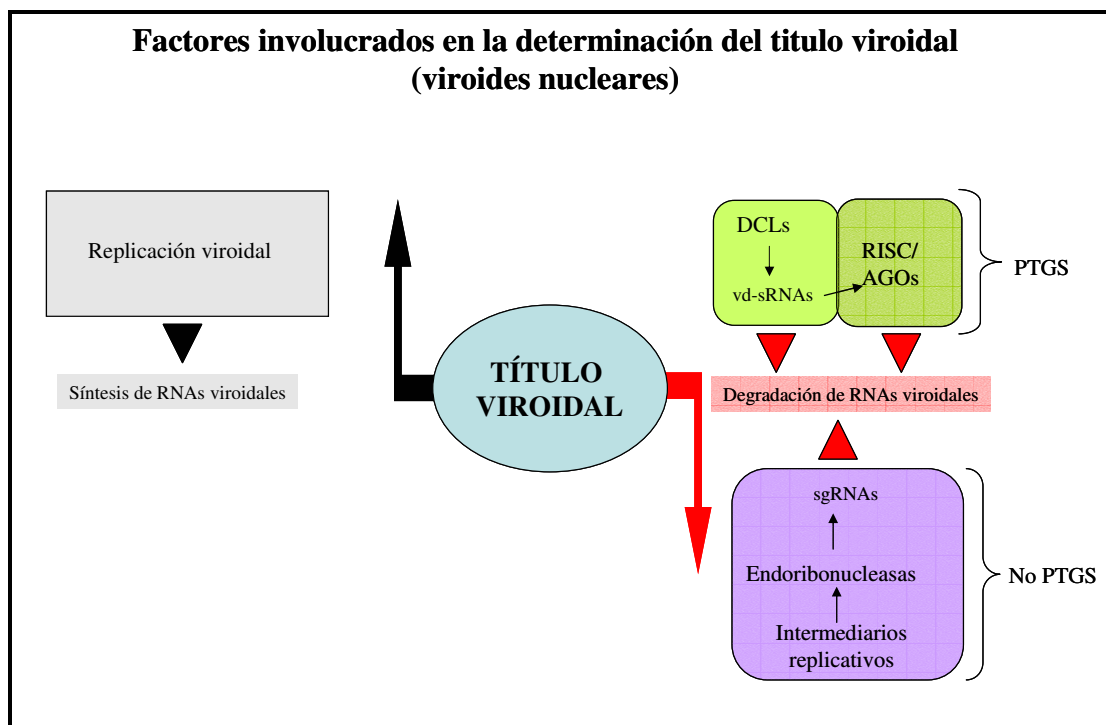


Figura 10. Modelo de la interacción entre los mecanismos que determinan el título viroidal en los tejidos infectados. Por un lado, la replicación viroidal conduce a un incremento del título viroidal; por otro, las rutas de degradación de los RNAs viroidales conllevan una disminución del mismo. El PTGS se inicia con el procesamiento de RNAs muy estructurados por una DCL, generando vd-sRNAs que luego serán reconocidos por el

complejo RISC/AGOs y llevarán a la degradación del viroide. Otra ruta de degradación está catalizada por endoribonucleasas que actúan sobre intermediarios replicativos viroidales, generando sgRNAs.

En resumen, el presente estudio nos proporciona una visión más completa de los mecanismos implicados en la determinación del título viroidal en los tejidos infectados, en la que las rutas de síntesis (replicación) y de degradación (silenciamiento mediado por RNA y otras endoribonucleasas) se integran por primera vez.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las proteínas AGOs de *A. thaliana* agroexpresadas en *N. benthamiana* infectada con PSTVd, excepto AGO6, AGO7 y AGO10, unen los vd-sRNAs. AGO1, AGO2 y AGO3 los de 21 y 22 nt; AGO4, AGO5 y AGO9, además, los de 24 nt.
2. Las proteínas AGO muestran preferencia respecto al nucleótido 5' de los vd-sRNAs que capturan: AGO1 por U; AGO2 y AGO4 por A, y AGO5 por C. Esta especificidad es similar a la que presentan frente a miRNAs y siRNAs endógenos.
3. La proteína AGO1 endógena de *N. benthamiana* muestra la misma afinidad por vd-sRNAs que su homóloga de *A. thaliana*: tamaño de 21 o 22 nt y U en el extremo 5'. La infección de *N. benthamiana* con PSTVd no afecta la expresión del mRNA de AGO1 regulada por el miRNA168. En este aspecto los viroides se comportan de manera diferente a los virus.
4. La sobreexpresión de AGO1, AGO2, AGO4 y AGO5 en *N. benthamiana* infectada con PSTVd induce una menor acumulación del RNA génomico viroidal, posiblemente incorporando los vd-sRNAs y ensamblándose en el complejo RISC.
5. En plantas de berenjena, y en menor medida de *N. benthamiana* y tomate infectadas por PSTVd, se han detectado sgRNAs viroidales de ambas polaridades acompañando a las formas monoméricas circular y lineal.
6. Los sgRNAs están compuestos por diversos fragmentos del PSTVd; algunos solapan parcialmente entre sí o forman parte unos de otros.
7. Los sgRNAs carecen de un extremo 5' común, lo que descarta que sean productos de terminación prematura de la transcripción.
8. Los sgRNAs (+) y (-) de PSTVd presentan extremos 5'-OH y 3'-P, que implican a una o más endoRNAsas en su génesis a partir de RNA viroidales de mayor tamaño.
9. Los sgRNAs podrían generarse en el núcleo durante la replicación catalizada por la RNA polimerasa II, mediante un mecanismo similar al propuesto para algunos mRNAs celulares.

Por lo tanto, la degradación *in vivo* del PSTVd parece transcurrir por al menos dos vías: la primera catalizada por enzimas del silenciamiento mediado por RNA, y la segunda por otras endoRNAsas de presumible localización nuclear.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- ADENOT, X., ELMAYAN, T., LAURESSERGUES, D., BOUTET, S., BOUCHE, N., GASCIOLLI, V., VAUCHERET, H. (2006). DRB4-dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Curr. Biol.* **16**, 927-932.
- AGORIO, A., VERA, P. (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3778-3790.
- ALLEN, E., XIE, Z., GUSTAFSON, A.M., CARRINGTON, J.C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**, 207-221.
- AMBRÓS, S., HERNÁNDEZ, C., DESVIGNES, J.C., FLORES, R. (1998). Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. *J. Virol.* **72**, 7397-7406.
- AMBRÓS, S., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (1999). Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *J. Gen. Virol.* **80**, 2239-2252.
- ANDERSON, J.S., PARKER, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**, 1497-1506.
- ASHULIN, L., LACHMAN, O., HADAS, R., BAR-JOSEPH, M. (1991). Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd), isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4767.
- AUKERMAN, M.J., SAKAI, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* **15**, 2730-2741.
- ÁVILA, A.C., SINGH, R.P., DUSI, A., FONSECA, M.E.N., DE CASTRO, L.A.S. (1990). Lack of evidence of the presence of potato spindle tuber viroid in the main potato crop of Brazil. *Fitopatol. Brasil* **15**, 186-189.
- AZEVEDO, J., GARCIA, D., PONTIER, D., OHNESORGE, S., YU, A., GARCIA, S., BRAUN, L., BERGDOLL, M., HAKIMI, M.A., LAGRANGE, T., VOINNET, O. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* **24**, 904-915.
- BADILLA, R., HAMMOND, R., RIVERA, C. (1999). First report of potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Dis.* **83**, 1072.
- BAKER, C.C., SIEBER, P., WELLMER, F., MEYEROWITZ, E.M. (2005). The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **15**, 303-315.
- BALAGOPAL, V., PARKER, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol.* **21**, 403-408.
- BALAGOPAL, V., FLUCH, L., NISSAN, T. (2012). Ways and means of eukaryotic mRNA decay. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 593-603.
- BALMORI, E., GILMER, D., RICHARDS, K., GUILLEY, H., JONARD, G. (1993). Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* **75**, 517-521.
- BAULCOMBE, D.C. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- BAUMBERGER, N., BAULCOMBE, D.C. (2005). *Arabidopsis* ARGONATUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11928-11933.

- BAUMBERGER, N., TSAI, C.H., LIE, M., HAVECKER, E., BAULCOMBE, D.C. (2007). The polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE protein for degradation. *Curr. Biol.* **17**, 1609-1614.
- BAUMSTARK, T., RIESNER, D. (1995). Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4246-4254.
- BAUMSTARK, R., SCHRÖDER, A.R.W., RIESNER, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* **16**, 599-610.
- BÉCLIN, C., BOUTET, S., WATERHOUSE, P., VAUCHERET, H. (2002). A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Curr. Biol.* **12**, 684-688.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A.A., HAMMOND, S.M., HANNON, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- BOJIC, T., BEEHARRY, Y., ZHANG, D.J., PELCHAT, M. (2012). Tomato RNA polymerase II interacts with the rod-like conformation of the left terminal domain of the potato spindle tuber viroid positive RNA genome. *J. Gen. Virol.* **93**, 1591-1600.
- BOLDUC, F., HOAREAU, C., ST-PIERRE, P., PERREAULT, J.P. (2010). In-depth sequencing of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *BMC Mol. Biol.* **11**, 16.
- BONFIGLIOLI, R.G., MCFADDEN, G.I., SYMONS, R.H. (1994). *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang-cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* **6**, 99-103.
- BONFIGLIOLI, R.G., WEBB, D.R., SYMONS, R.H. (1996). Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang-cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.* **9**, 457-465.
- BORGES, F., PEREIRA, P.A., SLOTKIN, R.K., MARTIENSSEN, R.A., BECKER, J.D. (2011). MicroRNA activity in the Arabidopsis male germline. *J. Exp. Bot.* **62**, 1611-1620.
- BORSANI, O., ZHU, J., VERSLUES, P.E., SUNKAR, R., ZHU, J.K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**, 1279-1291.
- BORTOLAMIOL, D., PAZHOUHANDEH, M., MAROCCO, K., GENSHIK, P., ZIEGERGRAFF, V. (2007). The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr. Biol.* **17**, 1615-1621.
- BRANCH, A.D., ROBERTSON, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-455.
- BRANCH, A.D., BENENFELD, B.J., ROBERTSON, H.D. (1988). Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9128-9132.
- BRODERSEN, P., SAKVARELIDZE-ACHARD, L., BRUUN-RASMUSSEN, M., DUNOYER, P., YAMAMOTO, Y.Y., SIEBURTH, L., VOINNET, O. (2008). Widespread translation inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185-1190.
- BRUNE, C., MUNCHEL, S.E., FISCHER, N., PODTELEJNIKOV, A.V., WEIS, K. (2005). Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* **11**, 517-531.
- BURGYÁN, J., HAVELDA, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* **16**, 265-272.

- BUSSIÈRE, F., LEHOUX, J., THOMPSON, D.A., SKRZECZKOWSKI, L.J., PERREAULT, J. (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group a viroids. *J. Virol.* **73**, 6353-6360.
- CALARCO, J.P., MARTIENSSSEN, R.A. (2011). Genome reprogramming and small interfering RNA in the Arabidopsis germline. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 134-139.
- CAO, X., AUFSATZ, W., ZILBERMAN, D., METTE, M.F., HUANG, M.S., MATZKE, M., JACOBSEN, S.E. (2003). Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. *Curr. Biol.* **13**, 2212-2217.
- CARBONELL, A., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., FLORES, R., GAGO, S. (2008). Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with infection of representative members of the two viroid families. *Virology* **371**, 44-53.
- CARBONELL, A., FAHLGREN, N., GARCIA-RUIZ, H., GILBERT, K.B., MONTGOMERY, T.A., NGUYEN, T., CUPERUS, J.T., CARRINGTON, J.C. (2012). Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* **24**, 3613-3629.
- CARRINGTON, J.C., AMBROS, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **301**, 336-338.
- CARTOLANO, M., CASTILLO, R., EFREMOVAL, N., KUCKENBERG, M., ZETHOF, J., GERATS, T., SCHWARZ-SOMMER, Z., VANDENBUSSCHE, M. (2007). A conserved microRNA module exerts homeotic control over *Petunia hybrida* and *Antirrhinum majus* floral organ identity. *Nat. Genet.* **39**, 901-905.
- CASTELLS-ROCA, L., GARCIA-MARTINEZ, J., MORENO, J., HERRERO, E., BELLI, G., PÉREZ-ORTÍN, J.E. (2011). Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *PLoS One* **6**, e17272.
- CATALANOTTO, C., AZZALIN, G., MACINO, G., COGONI, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* **404**, 245-245.
- CHAN, S.W., ZILBERMAN, Z., XIE, L., JOHANSEN, L.K., CARRINGTON, J.C., JACOBSEN, S.E. (2004). RNA silencing genes control *de novo* DNA methylation. *Science* **303**, 1336.
- CHAN, S.W., HENDERSON, I.R., JACOBSEN, S.E. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 351-360.
- CHAPMAN, E., CARRINGTON, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 884-896.
- CHEN, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**, 2022-2025.
- CHEN, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett.* **579**, 5923-5931.
- CHENG, C.P., NAGY, P.D. (2003). Mechanism of RNA recombination in carmo- and tombusviruses: evidence for template switching by the RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *J. Virol.* **77**, 12033-12047.
- CHETVERIN, A.B., KOPEIN, D.S., CHETVERINA, H.V., DEMIDENKO, A.A., UGAROV, V.I. (2005). Viral RNA-directed RNA polymerases use diverse mechanisms to promote recombination between RNA molecules. *J. Biol. Chem.* **280**, 8748-8755.
- CHIUMENTI, M., TORCHETTI, E.M., DI SERIO, F., MINAFRA, A. (2014). Identification and characterization of a viroid resembling apple dimple fruit viroid in fig (*Ficus carica* L.) by next generation sequencing of small RNAs. *Virus Res.* **188**, 54-59.
- COMBIER, J.P., FRUGIER, F., de BILLY, F., BOUALEM, A., EL-YAHYAOU, F., MOREAU, S., VERNIÉ, T., OTT, T., GAMAS, P., CRESPI, M., NIEBEL, A. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev.* **20**, 3084-3088.

- CÔTÉ, F., LEVESQUE, D., PERREAULT, J.P. (2001). Natural 2', 5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. *J. Virol.* **75**, 19-25.
- CSORBA, T., BOVI, A., DALMAY, T., BURGYN, J. (2007). The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* **81**, 11768-11780.
- CSORBA, T., PANTALEO, V., BURGYN, J. (2010). RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv. Virus Res.* **75**, 35-71.
- CUCHILLO, C.M., NOGUÉS, M.V., RAINES, R.T. (2011). Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Biochemistry*, **50**, 7835-7841.
- CUELLAR, W.J., KREUZE, J.F., RAJAMÄKI, M.L., CRUZADO, K.R., UNTIVEROS, M., VALKONEN, J.P.T. (2009). Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 10354-10358.
- CURABA, J., CHEN, X. (2008). Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J. Biol. Chem.* **283**, 3059-3066.
- DALMAY, T., HAMILTON, A., RUDD, S., ANGELL, S., BAULCOMBE, D.C. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**, 543-553.
- DALMAY, T., HORSEFIELD, R., BRAUNSTEIN, T.H., BAULCOMBE, D. (2001). SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *EMBO J.* **20**, 2069-2077.
- DARÒS, J.A., MARCOS, J.F., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12813-12817.
- DARÒS, J.A., FLORES, R. (2004). Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6792-6797.
- DARÒS, J.A., ELENA, S.F., FLORES, R. (2006). Viroids: an Ariadne thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep.* **7**, 593-598.
- DE BOKX, J.A., PIRONE, P.G. (1981). Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Neth. J. Plant Pathol.* **87**, 31-34.
- DE LA PEÑA, M., NAVARRO, B., FLORES, R. (1999). Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop with in the in vivo branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9960-9965.
- DELAN-FORINO, C., DEFORGES, J., BENARD, L., SARGUEIL, B., MAUREL, M.C., TORCHET, C. (2014). Structural analyses of Avocado sunblotch viroid reveal differences in the folding of plus and minus RNA strands. *Viruses* **6**, 489-506.
- DELERIS, A., GALLEGO-BARTOLOME, J., BAO, J., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C., VOINNET, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68-71.
- DELGADO, S., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (2005). A short doublestranded RNA motif of peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.* **79**, 12934-12943.
- den BOON, J.A., AHLQUIST, P. (2010). Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 241-56.
- DENTI, M.A., BOUTLA, A., TSAGRIS, M., TABLER, M. (2004). Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J.* **37**, 762-769.
- DI SERIO, F., APARICIO, F., ALIOTO, D., RAGOZZINO, A., FLORES, R. (1996). Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *J. Gen. Virol.* **77**, 2833-2837.

- DI SERIO, F. (2007). Identification and characterization of potato spindle tuber viroid infecting *Solanum jasminoides* and *S. rantonnetii* in Italy. *J. Plant Pathol.* **89**, 297-300.
- DI SERIO, F., FLORES, R. (2008). Viroids: molecular implements for dissecting RNA trafficking in plants. *RNA Biol.* **5**, 128-131.
- DI SERIO, F., GISEL, A., NAVARRO, B., DELGADO, S., MARTINEZ DE ALBA, A.E., DONVITO, G., FLORES, R. (2009). Deep sequencing of the small RNAs derived from two symptomatic variants of a chloroplastic viroid: implications for their genesis and for pathogenesis. *PLoS ONE* **4**, e7539.
- DI SERIO, F., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., NAVARRO, B., GISEL, A., FLORES, R. (2010). RNA-Dependent RNA Polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J. Virol.* **84**, 2477-2489.
- DÍAZ-PENDÓN, J.A., DING, S.W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 303-326.
- DIENER, T.O., RAYMER, W.B. (1971). Potato spindle tuber "virus", *CMI/AAB Descr. Plant Viruses* **66**.
- DIENER, T.O. (1971a). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exit in extracts or *in situ*. *Virology* **43**, 75-98.
- DIENER, T.O. (1971b). Potato spindle tuber virus. IV. Replicating, low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411-428.
- DIENER, T.O. (1987). Biological properties. In *The Viroids* (T.O. Diener, Ed.), pp. 9-35. Plenum Press, New York.
- DIENER, T.O. (2003). Discovering viroids, a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 75-80.
- DIERMANN, N., MATOUŠEK, J., JUNGE, M., RIESNER, D., STEGER, G. (2010). Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato. *Biol. Chem.* **391**, 1379-1390.
- DING, B., KWON, M.O., HAMMOND, R., OWENS, R.A. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.* **12**, 931-936.
- DING, B., ITAYA, A., WOO, Y.M. (1999). Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants. *Internal. Rev. Cytol.* **190**, 251-316.
- DING, B., OWENS, R.A. (2003). Movement. In: *Viroids*. (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J.S. Semancik, Ed.), pp. 49-54. CSIR. Collingwood, Australia. Science Publishers, Inc. New Hampshire, USA.
- DING, B., ITAYA, A. (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 7-20.
- DING, B. (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 105-31.
- DING, S.W., LI, H., LU, R., LI, F., LI, W.X. (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res.* **102**, 109-115.
- DING, S.W., VOINNET, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.
- DLAKIC, M. (2006). DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA binding fold. *Bioinformatics* **22**, 2711-2714.
- DORI-BACHASH, M., SHEMA, E., TIROSH, I. (2011). Coupled evolution of transcription and mRNA degradation. *PLoS Biol.* **9**, e1001106.
- DORSSERS, L., VAN DER KROL, S., VAN DER MEER, J., VAN KAMMEN, A., ZABEL, P. (1984). Purification of Cowpea mosaic virus RNA replication complex: identification of a virus-encoded 110,000 dalton polypeptide responsible for RNA chain elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1951-1955.

- DUBÉ, A., BOLDUC, F., BISAILLON, M., PERREAULT, J.P. (2011). Mapping studies of the Peach latent mosaic viroid reveal novel structural features. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 688-701.
- DUNOYER, P., HIMBER, C., VOINNET, O. (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat. Genet.* **37**, 1356-1360.
- EAMENS, A., WANG, M.B., SMITH, N.A., WATERHOUSE, P.M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiol.* **147**, 456-468.
- ELKON, R., ZLOTORYNSKI, E., ZELLER, K.I., AGAMI, R. (2010). Major role for mRNA stability in shaping the kinetics of gene induction. *BMC Genomics* **11**, 259.
- EL-SHAMI, M., PONTIER, D., LAHMY, S., BRAUN, L., PICART, C., VEGA, D., HAKIMI, M.A., JACOBSEN, S.E., COOKE, R. LAGRANGE, T. (2007). Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev.* **21**, 2539-2544.
- EMERY, J.F., FLOYD, S.K., ALVAREZ, J., ESHED, Y., HAWKER, N.P., IZHAKI, A., BAUM, S.F., BOWMAN, J.L. (2003). Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr. Biol.* **13**, 1768-1774.
- EPPO (2006). Isolated finding of potato spindle tuber viroid on *Solanum jasminoides* in Germany. *OEPP/EPPO Reporting Service* **8** (2006/159), 2.
- EPPO (2008a). Situation of potato spindle tuber viroid in Austria in 2008. *OEPP/EPPO Reporting Service* **9** (2008/177), 3.
- EPPO (2008b). Potato spindle tuber viroid detected on ornamental *Solanaceae* in the Czech Republic. *OEPP/EPPO Reporting Service* **9** (2008/176), 2.
- EUN, C., LORKOVIC, Z.J., NAUMANN, U., LONG, Q., HAVECKER, E.R., SIMON, S.A., MEYERS, B.C., MATZKE, A.J.M., MATZKE, M. (2011). AGO6 function in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* **6**, e25730.
- FADDA, Z., DARÒS, J.A., FAGOAGA, C., FLORES, R., DURÁN-VILA, N. (2003a). Eggplant latent viroid, the candidate type species for a new genus within the family *Avsunviroidae*. *J. Virol.* **77**, 6528-6532.
- FADDA, Z., DARÒS, J.A., FLORES, R., DURÁN-VILA, N. (2003b). Identification in eggplant of a variant of citrus exocortis viroid (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. *Virus Res.* **97**, 145-149.
- FAGARD, M., BOUTET, S., MOREL, J., BELLINI, C., AND VAUCHERET, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11650-11654.
- FAGARD, M., VAUCHERET, H. (2000). (Trans) Gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **151**, 167-194.
- FAHLGREN, N., MONTGOMERY, T.A., HOWELL, M.D., ALLEN, E., DVORAK, S.K., ALEXANDER, A.L., CARRINGTON, J.C. (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **16**, 939-944.
- FANG, Y., SPECTOR, D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr. Biol.* **17**, 818-823.
- FELDSTEIN, P.A., HU, Y., OWENS, R.A. (1998). Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6560-6565.
- FENG, S., JACOBSEN, S.E., REIK, W. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* **330**, 622-627.

- FINNEGAN, E.J., MARGIS, R., WATERHOUSE, P.M. (2003). Post-transcriptional gene silencing is not compromised in the Arabidopsis CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from Drosophila. *Curr. Biol.* **13**, 236-240.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- FLORES, R., SEMANCIK, J.S. (1982). Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6285-6288.
- FLORES, R. (1989). Synthesis of RNAs specific to Citrus exocortis viroid by a fraction rich in nuclei from infected *Gynura aurantiaca*: examination of the nature of the products and solubilisation of the polymerase-template complex. *J. Gen. Virol.* **70**, 2695-2706.
- FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., DE LA PEÑA, M., VERA, A., DARÒS, J.A. (2001). Hammerhead ribozyme structure and function in plant replication. *Met. Enzymol.* **341**, 540-552.
- FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., DARÒS, J.A., DI SERIO, F. (2005). Viroids and viroid-hosts interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 117-139.
- FLORES, R., GAS, M.E., MOLINA-SERRANO, D., NOHALES, M.A., CARBONELL, A., GAGO, S., DE LA PEÑA, M., DARÒS, J.A. (2009). Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses* **1**, 317-334.
- FLORES, R., SERRA, P., MINOIA, S., DI SERIO, F., NAVARRO, B. (2012). Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front. Microbiol.* **3**, 217.
- FLORES, R., GAGO-ZACHERT, S., SERRA, P., SANJUÁN, R., ELENA, S.F. (2014). Viroids: survivors from the RNA world? *Annu. Rev. Microbiol.* **68**, 395-414.
- FLYNT, A., LIU, N., MARTIN, R., LAI, E.C. (2009). Dicing of viral replication intermediates during silencing of latent Drosophila viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5270-5275.
- FORSTER, A.C., SYMONS, R.H. (1987). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* **49**, 211-220.
- FRANK, F., SONENBERG, N., NAGAR, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* **465**, 818-822.
- GARCIA, D., COLLIER, S.A., BYRNE, M.E., MARTIENSSEN, R.A. (2006). Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the trans-acting siRNA pathway. *Curr. Biol.* **16**, 933-938.
- GARCÍA-RUIZ, H., TAKEDA, A., CHAPMAN, E.J., SULLIVAN, C.M., FAHLGREN, N., BREMPELIS, K.J., CARRINGTON, J.C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during turnip mosaic virus infection. *Plant Cell* **22**, 481-496.
- GARNEAU, N.L., WILUSZ, J., WILUSZ, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 113-126.
- GAS, M.E., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R., DARÒS, J.A. (2007). Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Path.* **3**, 1813-1826.
- GAS, M.E., MOLINA-SERRANO, D., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R., DARÒS, J.A. (2008). Monomeric linear RNA of citrus exocortis viroid resulting from processing *in vivo* has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: implications for the RNase and RNA ligase involved in replication. *J. Virol.* **82**, 10321-10325.
- GASCIOLLI, V., MALLORY, A.C., BARTEL, D.P., VAUCHERET, H. (2005). Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr. Biol.* **15**, 1494-1500.

- GIGUÈRE, T., RAJ ADKAR-PURUSHOTHAMA, C., PERREAULT, J.P. (2014). Comprehensive Secondary Structure Elucidation of Four Genera of the Family *Pospiviroidae*. *PLoS ONE* **9**, e98655.
- GINER, A., LAKATOS, L., GARCÍA-CHAPA, M., LÓPEZ-MOYA, J.J., BURGYÁN, J. (2010). Viral protein inhibits RISC activity by Argonaute binding through conserved WG/GW Motifs. *PLoS Pathog.* **6**, e1000996.
- GLICK, E., ZRACHYA, A., LEVY, Y., METT, A., GIDONI, D., BELAUSOV, E., CITOVSKY, V., GAFNI, Y. (2009). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 4571-4571.
- GÓMEZ, G., PALLÁS, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 910-913.
- GÓMEZ, G., PALLÁS, V. (2007). Mature monomeric forms of hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.* **51**, 1041-1049.
- GÓMEZ, G., PALLÁS, V. (2012). A pathogenic non coding RNA that replicates and accumulates in chloroplasts traffics to this organelle through a nuclear-dependent step. *Plant Signal Behav.* **7**, 882-884.
- GRDZELISHVILI, V.Z., CHAPMAN, S.N., DAWSON, W.O., LEWANDOWSKI, D.J. (2000). Mapping of the Tobacco mosaic virus movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. *Virology* **275**, 177-192.
- GREEN, P.J. (1994) The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 421-445.
- GROSS, H.J., DOMDEY, H., LOSSOW, C.H., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H., SÄNGER, H.L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of Potato spindle tuber viroid. *Nature* **273**, 203-208.
- GROSS, H.J., KRUPP, G., DOMDEY, H., RABA, M., JANK, P., LOSSOW, C., ALBERTY, 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.
- GRUNER, R., FELS, A., QU, F., ZIMMAT, R., STEGER, G., RIESNER, D. (1995). Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology* **209**, 60-69.
- GUO, H.S., XIE, Q., FEI, J.F., CHUA, N.H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* **17**, 1376-1386.
- HAASNOOT, P.C., BREDERODE, F.T., OLSTHOORN, R.C., BOL, J.F. (2000). A conserved hairpin structure in *Alfamovirus* and *Bromovirus* subgenomic promoters is required for efficient RNA synthesis in vitro. *RNA* **6**, 708-716.
- HAIMOVICH, G., CHODER, M., SINGER, R.H., TRCEK, T. (2013a). The fate of the messenger is pre-determined: A new model for regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1829**, 643-653.
- HAIMOVICH, G., MEDINA, D.A., CAUSSE, S.Z., GARBER, M., MILLAN-ZAMBRANO, G., BARKAI, O., CHAVEZ, S., PÉREZ-ORTÍN, J.E., DARZACQ, X., CHODER, M. (2013b). Gene expression is circular: factors form RNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* **153**, 1000-1011.
- HAMMANN, C., STEGER, G. (2012). Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.* **9**, 809-819.
- HAMMOND, R.W., OWENS, R.A. (1987). Mutational analysis of potato spindle tuber viroid reveals complex relationships between structure and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3967-3971.

- HAMMOND, R.W., SMITH, D.R., DIENER, T.O. (1989). Nucleotide sequence and proposed secondary structure of columnnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10083-10094.
- HAMMOND, S.M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., HANNON, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296.
- HARDERS, J., LUKÁCS, N., ROBERT-NICOUD, M., JOVIN, T.M., RIESNER, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridisation and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941-3949.
- HAREL-SHARVIT, L., ELDAD, N., HAIMOVICH, G., BARKAI, O., DUEK, L., CHODER, M. (2010). RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell* **143**, 552-563.
- HARRIS, P.S., MILLER-JONES, D.N., HOWELL, P.J. (1979). Control of potato spindle tuber viroid: the special problems of a disease in plant breeders material. In: *Plant Health: the Scientific Basis for Administrative Control of Plant Parasites*. (D.L Ebbels, J.E. King, Eds.) pp 232-237. Blackwell: Oxford, England.
- HARRIS, P.S., BROWNING, I.A. (1980). The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of potato spindle tuber viroid. *Potato Res.* **23**, 85-94.
- HARVEY, J.J., LEWSEY, M.G., PATEL, K., WESTWOOD, J., HEIMSTÄDT, S., CARR, J.P., BAULCOMBE, D.C. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS ONE* **6**, e14639.
- HASELOFF, J., SYMONS, R.H. (1981). Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2741-2752.
- HASELOFF, J., MOHAMED, N.A., SYMONS, R.H. (1982). Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* **299**, 316-321.
- HASHIMOTO, J., KOGANEZAWA, H. (1987). Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7045-7052.
- HAVECKER, E.R., WALLBRIDGE, L.M., HARDCASTLE, T.J., BUSH, M.S., KELLY, K.A., DUNN, R.M., SCHWACH, F., DOONAN, J.H., BAULCOMBE, D.C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* **22**, 321-334.
- HAVELDA, Z., VÁRALLYAY, E., VÁLÓCZI, A., BURGYÁN, J. (2008). Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant J.* **55**, 278-288.
- HENDERSON, I.R., ZHANG, X., LU, C., JOHNSON, L., MEYERS, B.C., GREEN, P., JACOBSEN, S.E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* **38**, 721-725.
- HERNÁNDEZ, C., FLORES, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3711-3715.
- HERR, A.J., JENSEN, M.B., DALMAY, T., BAULCOMBE, D.C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* **308**, 118-120.
- HILLEREN, P., MCCARTHY, T., ROSBASH, M., PARKER, R., JENSEN, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**, 538-542.
- HIRAGURI, A., ITOH, R., KONDO, N., NOMURA, Y., AIZAWA, D., MURAI, Y., KOIWA, H., SEKI, M., SHINOZAKI, K., FUKUHARA, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **57**, 173-188.

- HÖCK, J., MEISTER, G. (2008). The Argonaute protein family. *Gen. Biol.* **9**, 210.
- HOUSELEY, J., LACAVA, J., TOLLERVEY, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 529-539.
- HOUSELEY, J., TOLLERVEY, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**, 763-776.
- HSU, C.L., STEVENS, A. (1993). Yeast cells lacking 5' →3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4826-4835.
- HUETTEL, B., KANNO, T., DAXINGER, L., BUCHER, E., VAN DER WINDEN, J., MATZKE, A.J., MATZKE, M. (2007). RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta.* **1769**, 358-374.
- HUNTER, C., WILLMANN, M.R., WU, G., YOSHIKAWA, M., DE LA LUZ GUTIERREZ-NAVA, M., POETHIG, S.R. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 2973-2981.
- HUTCHINS, C.J., KEESE, P., VISVADER, J.E., RATHJEN, P.D., McINNES, J.L., SYMONS, R.H. (1985). Comparison of plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Mol. Biol.* **4**, 293-304.
- HUTCHINS, C.J., RATHJEN, P.D., FORSTER, A.C., SYMONS, R.H. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch. *Nucleic Acid Res.* **14**, 3627-3640.
- HUTTINGA, H., MOSCH, W.H.M., TREUR, A. (1987). Comparison of bidirectional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect Potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *EPPO Bull.* **17**, 37-43.
- HUTVAGNER, G., SIMARD, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 22-32.
- IKI, T., YOSHIKAWA, M., NISHIKIORI, M., JAUDAL, M.J., MATSUMOTO-YOKOYAMA, E., MITSUHARA, I., MESHU, T., ISHIKAWA, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell* **39**, 282-291.
- IPPC (2007). First outbreak of *Potato spindle tuber pospoviroid* (PSTVd) in Slovenia. International Phytosanitary Portal, *Report SI 4/3*.
- ITAYA, A., FOLIMONOV, A., MATSUDA, Y., NELSON, R.S., DING, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 1332-1334.
- ITAYA, A., ZHONG, X., BUNDSCHUH, R., QI, Y., WANG, Y., TAKEDA, R., HARRIS, A.R., MOLINA, C., NELSON, R.S., DING, B. (2007). A structured viroid RNA is substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J. Virol.* **81**, 2980-2994.
- ITO, T., IEKI, H., OZAKI, K., ITO, T. (2001). Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed citrus viroid OS. *Arch. Virol.* **146**, 975-982.
- IWASAKI, S., KOBAYASHI, M., YODA, M., SAKAGUCHI, Y., KATSUMA, S., SUZUKI, T., TOMARI, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell* **39**, 292-299.
- JAUBERT, M., BHATTACHARJEE, S., MELLO, A.F.S., PERRY, K.L., MOFFETT, P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**, 1556-1564.
- JIN, H., VACIC, V., GIRKE, T., LONARDI, S., ZHU, J.K. (2008). Small RNAs and the regulation of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis*. *BMC Mol. Biol.* **9**, 6.

- JINEK, M., DOUDNA, J. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**, 405-412.
- JOHNSTON, J.C., ROCHON, D.M. (1995). Deletion analysis of the promoter for the cucumber necrosis virus 0.9-kb subgenomic RNA. *Virology* **214**, 100-109.
- JOHNSTON, M., GEOFFROY, M.C., SOBALA, A., HAY, R., HUTVAGNER, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1462-1469.
- JONES-RHOADES, M.W., BARTEL, D.P., BARTEL, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 19-53.
- JUAREZ, M.T., KUI, J.S., THOMAS, J., HELLER, B.A., TIMMERMANS, M.C. (2004a). microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* **428**, 84-88.
- JUAREZ, M.T., TWIGG, R.W., TIMMERMANS, M.C. (2004b). Specification of adaxial cell fate during maize leaf development. *Development* **131**, 4533-4544.
- KALANTIDIS, K., PSARADAKIS, S., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2002). The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**, 826-833.
- KALANTIDIS, K., SCHUMACHER, H.T., ALEXIADIS, T., HELM, J.M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell* **100**, 13-26.
- KANNO, T., HUETTEL, B., METTE, M.F., AUFSATZ, W., JALIGOT, E., DAXINGER, L., KREIL, D.P., MATZKE, M., MATZKE, A.J. (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* **37**, 761-765.
- KASAI, A., SANO, T., HARADA, T. (2013). Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS ONE* **8**, e57736.
- KASSCHAU, K.D., XIE, Z., ALLEN, E., LLAVE, C., CHAPMAN, E.J., KRIZAN, K.A., CARRINGTON, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**, 205-217.
- KEESE, P., SYMONS, R.H. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4582-4586.
- KEESE, P., OSORIO-KEESE, M.E., SYMONS, R.H. (1988). Coconut tinangaja viroid: sequence homology with coconut cadang-cadang viroid and other potato spindle tuber viroid related RNAs. *Virology* **162**, 508-510.
- KENNERDELL, J.R., CARTHEW, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026.
- KHAN, Z.A., HIRIYANNA, F., CHAVEZ, F., FRAENKEL-CONRAT, H. (1986). RNA-directed RNA polymerases from healthy and from virus-infected cucumber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2382-2386.
- KIDNER, C.A., MARTIENSSSEN, R.A. (2005). The developmental role of microRNA in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 38-44.
- KIEFER, M.C., OWENS, R.A., DIENER, T.O. (1983). Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6234-6238.
- KIM, K.W., EAMES, A.L., WATERHOUSE, P.M. (2011). RNA Processing Activities of the Arabidopsis Argonaute Protein Family. In Grabowski, Paula (Ed.) *RNA Processing*.
- KIM, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 376-385.
- KIM, V.N. (2008). Sorting out small RNAs. *Cell* **133**, 25-26.

- KINI, H.K., WALTON, S.P. (2007). In vitro binding of single-stranded RNA by human Dicer. *FEBS Lett.* **581**, 5611-5616.
- KOEV, G., MILLER, W.A. (2000). A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters. *J Virol.* **74**:5988-59996.
- KOLTUNOW, A.M., KRAKE, L.R., JOHNSON, S.D., REZAIAN, M.A. (1989). Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. Gen. Virol.* **70**, 3411-3419.
- KOLTUNOW, A.M., REZAIAN, M.A. (1988). Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* **16**, 849-864.
- KOMILI, S., SILVER, P.A. (2008). Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 38-48.
- KOOTER, J.M., MATZKE, M.A., MEYER, P. (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* **4**, 340-347.
- KURIHARA, Y., WATANABE, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12753-12758.
- KURIHARA, Y., TAKASHI, Y., WATANABE, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* **12**, 206-212.
- LACAVA, J., HOUSELEY, J., SAVEANU, C., PETFALSKI, E., THOMPSON, E., JACQUIER, A., TOLLERVEY, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* **121**, 713-724.
- LAFONTAINE, D., BEAUDRY, D., MARQUIS, P., PERREAULT, J.P. (1995). Intra- and intermolecular non-enzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**, 705-709.
- LAKATOS, L., CSORBA, T., PANTALEO, V., CHAPMAN, E.J., CARRINGTON, J.C., LIU, Y.P., DOLJA, V.V., CALVINO, L.F., LÓPEZ-MOYA, J.J., BURGÝÁN J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* **25**, 2768-2780.
- LAKSHMAN, D.K., TAVANTZIS, S.M. (1993). Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *Arch. Virol.* **128**, 319-331.
- LANG, Q., JIN, C., LAI, L., FENG, J., CHEN, S., CHEN, J. (2011). Tobacco microRNAs prediction and their expression infected with Cucumber mosaic virus and Potato virus X. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 1523-1531.
- LAW, J.A., JACOBSEN, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* **11**, 204-220.
- LEHTO, K., GRANTHAM, G.L., DAWSON, W.O. (1990). Insertion of sequences containing the coat protein subgenomic RNA promoter and leader in front of the tobacco mosaic virus 30K ORF delays its expression and causes defective cell-to-cell movement. *Virology* **174**, 145-157.
- LI, C.F., PONTES, O., EL-SHAMI, M., HENDERSON, I.R. BERNATAVICHUTE, Y.V., CHAN, S.W., LAGRANGE, T., PIKAARD, C.S., JACOBSEN, S.E. (2006). An ARGONAUTE4-containing nuclear processing center colocalized with Cajal bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **126**, 93-106.
- LI, C.F., HENDERSON, I.R., SONG, L., FEDOROFF, N., LAGRANGE, T. JACOBSEN, S.E. (2008). Dynamic regulation of ARGONAUTE4 within multiple nuclear bodies in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* **4**, e27.
- LI, H.W., DING, S.W. (2005). Antiviral silencing in animals. *FEBS Lett.* **579**, 5965-5973.
- LI, H.W., DING, S.W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 503-531.

- LIBRI, D., DOWER, K., BOULAY, J., THOMSEN, R., ROSBASH, M., JENSEN, T.H. (2002). Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 8254-8266.
- LIMA, M.I., FONSECA, M.E., FLORES, R., KITAJIMA, E.W. (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch. Virol.* **138**, 385-390.
- LIN, B., WANG, Z., MALANOSKI, A.P., O'GRADY, E.A., WIMPEE, C.F., VUDDHAKUL, V., ALVES J.N., THOMPSON, F.L., GOMEZ-GIL, B., VORA, G.J. (2010). Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**, 81-89.
- LIU, Q., FENG, Y., ZHU, Z. (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct. Integr. Genomics* **9**, 277-286.
- LIU, Y.H., SYMONS, R.H. (1998). Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* **4**, 418-429.
- LLAVE, C., XIE, Z., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**, 2053-2056.
- LU, R., FOLIMONOV, A., SHINTAKU, M., LI, W.X., FALK, B.W., DAWSON, W.O., DING, S.W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15742-15747.
- LUO, Z., CHEN, Z. (2007). Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 943-958.
- LYKKE-ANDERSEN, S., TOMECKI, R., JENSEN, T.H. Y DZIEMBOWSKI, A. (2011). The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biol.* **8**, 61-66.
- LYNN, K., FERNANDEZ, A., AIDA, M., SEDBROOK, J., TASAKA, M., MASSON, P., BARTON, M.K. (1999). The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* **126**, 469-481.
- MA, J.B., YUAN, Y.R., MEISTER, G., PEI, Y., TUSCHL, T., PATEL D. J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**, 667-670.
- MACHIDA, S., YAMAHATA, N., WATANUKI, H., OWENS, R.A., SANO, T. (2007). Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J. Gen. Virol.* **88**, 3452-3457.
- MACRAE, I.J., LI, F., ZHOU, K., CANDE, W.Z., DOUDNA, J.A. (2006). Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **71**, 73-80.
- MAKEYEV, E.V., GRIMES, J.M. (2004). RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA bacteriophages. *Virus Res.* **101**, 45-55.
- MÄKINEN, K., HAFRÉN, A. (2014). Intracellular coordination of potyviral RNA functions in infection. *Front Plant Sci.* **5**, 110.
- MALLORY, A.C., HINZE, A., TUCKER, M.R., BOUCHÉ, N., GASCIOLLI, V., ELMAYAN, T., LAURESSERGUES, D., JAUVION, V., VAUCHERET, H., LAUX, T. (2009). Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *PLoS Genet.* **5**, e1000646.
- MALLORY, A.C., VAUCHERET, H. (2009). ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Rep.* **10**, 521-526.

- MARGIS, R., FUSARO, A.F., SMITH, N.A., CURTIN, S.J., WATSON, J.M., FINNEGAN, E.J., WATERHOUSE, P.M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.* **580**, 2442-2450.
- MARKARIAN, N., LI, H.W., DING, S.W., SEMANCIK, J.S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* **149**, 397-406.
- MARTÍN, R., ARENAS, C., DARÒS, J.A., COVARRUBIAS, A., REYES, J.L., CHUA, N.H. (2007). Characterization of small RNAs derived from citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* **367**, 135-146.
- MARTIN, W.H. (1922). Spindle tuber, a new potato trouble. *Hints to potato growers, N.J. State Potato Assoc.* **3**.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., FLORES, R., HERNÁNDEZ, C. (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of the small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **76**, 13094-13096.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., JAUVION, V., MALLORY, A.C., BOUTEILLER, N., VAUCHERET, H. (2011). The miRNA pathway limits AGO1 availability during siRNA-mediated PTGS defense against exogenous RNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9339- 9344.
- MARTÍNEZ, G., CASTELLANO, M., TORTOSA, M., PALLÁS, V., GOMEZ, G. (2014). A pathogenic non-coding RNA induces changes in dynamic DNA methylation of ribosomal RNA genes in host plants. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1553-1562.
- MARTÍNEZ, G., DONAIRE, L., LLAVE, C., PALLÁS, V., GOMEZ, G. (2010). High-throughput sequencing of hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 347-359.
- MARTÍNEZ-SORIANO, J.P., GALINDO-ALONSO, J., MAROON, C.J.M., YUCEL, I., SMITH, D., DIENER, T.O. (1996). Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9397-9401.
- MATZKE, M.A., BIRCHLER, J.A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 24-35.
- MENG, Y., SHAO, C., WANG, H., CHEN, M. (2014). Uncovering DCL1 dependent small RNA loci on plant genomes: a structure-based approach. *J. Exp. Bot.* **65**, 395-400.
- MERAI, Z., KERENYI, Z., KERTESZ, S., MAGNA, M., LAKATOS, L., SILHAVY, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* **80**, 5747-5756.
- METTE, M.F., AUFSATZ, W., VAN DER WINDEN, J., MATZKE, M.A., MATZKE, A.J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**, 5194-5201.
- MI, S., CAI, T., HU, Y., CHEN, Y., HODGES, E., NI, F., WU, L., LI, S., ZHOU, H., LONG, C., CHEN, S., HANNON, G.J., QI, Y. (2008). Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**, 116-127.
- MILLER, W.A., KOEV, G. (2000). Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* **273**, 1-8.
- MIOZZI, L., GAMBINO, G., BURGIAN, J., PANTALEO, V. (2013). Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral siRNAs in *Vitis vinifera*. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 30-43.
- MIYOSHI, T., TAKEUCHI, A., SIOMI, H., SIOMI, M. C. (2010). A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1024-1026.
- MOAZED, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **457**, 413-420.
- MOHAMED, N.A., THOMAS, W. (1980). Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. *J. Gen. Virol.* **46**, 157-167.

- MOISSARD, G., VOINNET, O. (2006). RNA silencing of host transcripts by Cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 19593-19598.
- MOLNAR, A., CSORBA, T., LAKATOS, L., VÁRALLYAY, E., LACOMME, C., BURGYÁN, J. (2005). Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* **79**, 7812-7818.
- MONTGOMERY, T.A., HOWELL, M.D., CUPERUS, J.T., LI, D., HANSEN, J.E., ALEXANDER, A.L., CHAPMAN, E.J., FAHLGREN, N., ALLEN, E., CARRINGTON, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* **133**, 128-141.
- MOREL, J.B., GODON, C., MOURRAIN, P., BECLIN, C., BOUTET, S., FEUERBACH, F., PROUX, F., VAUCHERET, H. (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629-639.
- MOURRAIN, P., BECLIN, C., ELMAYAN, T., FEUERBACH, F., GODON, C., MOREL, J.B., JOUETTE, D., LACOMBE, A.M., NIKIC, S., PICAULT, N., REMOUE, K., SANIAL, M., VO, T.A., VAUCHERET, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-542.
- MOUSSIAN, B., SCHOOF, H., HAECKER, A., JÜRGENS, G., LAUX, T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J.* **17**, 1799-1809.
- MUHLRAD, D., DECKER, C.J., PARKER, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* **8**, 855-866.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- NAVARRO, B., FLORES, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11262-11267.
- NAVARRO, B., PANTALEO, V., GISEL, A., MOXON, S., DALMAY, T., BISZTRAY, G., DI SERIO, F., BURGYAN, J. (2009). Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PLoS ONE* **4**, e7686.
- NAVARRO, B., GISEL, A., RODIO, M.E., DELGADO, S., FLORES, R., DI SERIO, F. (2012a). Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.* **70**, 991-1003.
- NAVARRO, B., GISEL, A., RODIO, M.E., DELGADO, S., FLORES, R., DI SERIO, F. (2012b). Viroids: How to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* **94**, 1474-1480.
- NAVARRO, J.A., DARÒS, J.A., FLORES, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of Avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**, 77-85.
- NAVARRO, J.A., VERA, A., FLORES, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* **268**, 218-225.

- NICHOLSON, P., YEPISKOPOSYAN, H., METZE, S., ZAMUDIO OROZCO, R., KLEINSCHMIDT, N., MUHLEMANN, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 677-700.
- NOHALES, M.A., FLORES, R., DARÓS, J.A. (2012a). Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 13805-13811.
- NOHALES, M.A., MOLINA-SERRANO, D., FLORES, R., DARÓS, J.A. (2012b). Involvement of the chloroplastic isoform of tRNA ligase in the replication of viroids belonging to the family Avsunviroidae. *J. Virol.* **86**, 8269-8276.
- OHNO, T., TAKAMATSU, N., MESHI, T., OKADA, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6185-6187.
- OLMEDO-MONFIL, V., DURAN-FIGUEROA, N., ARTEAGA-VAZQUEZ, M., DEMESA-ARÉVALO, E., AUTRAN, D., GRIMANELLI, D., SLOTKIN, R.K., MARTIENSSEN, R.A., VIELLE-CALZADA, J.P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature* **464**, 628-632.
- ONODERA, Y., HAAG, J.R., REAM, T., NUNES, P.C., PONTES, O. PIKAARD, C.S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**, 613-622.
- OWENS, R.A., KHURANA, S.M.P., SMITH, D.R., SINGH, M.N., GARG, I.D. (1992). A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Dis.* **76**, 527-529.
- OWENS, R.A., BLACKBURN, M., DING, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**, 905-909.
- OWENS, R.A., SANO, T., DURAN-VILA, N. (2012). Plant viroids: isolation, characterization/detection, and analysis. *Methods Mol. Biol.* **89**, 253-71.
- PALATNIK, J.F., ALLEN, E., WU, X., SCHOMMER, C., SCHWAB, R., CARRINGTON, J.C., WEIGEL, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**, 257-263.
- PAPAEFTHIMIOU, I., HAMILTON, A., DENTI, M., BAULCOMBE, D.C., TSAGRIS, M., TABLER, M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2395-2400.
- PAPP, I., METTE, M.F., AUFSATZ, W., DAXINGER, L., SCHAUER, S.E., RAY, A., VAN DER WINDEN, J., MATZKE, M., MATZKE, A.J. (2003). Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol.* **132**, 1382-1390.
- PARK, W., LI, J., SONG, R., MESSING, J., CHEN, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.* **12**, 1484-1495.
- PARKER, J.S. (2010). How to slice: snapshots of Argonaute in action. *Silence* **1**, 1-10.
- PARKER, R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671-702.
- PAZHOUHANDEH, M., DIETERLE, M., MARROCCO, K., LECHNER, E., BERRY, B., BRAULT, V., HEMMER, O., KRETSCH, T., RICHARDS, K.E., GENSHIK, P., ZIEGLER-GRAFF, V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1994-1999.
- PELCHAT, M., LEVESQUE, D., OUELLET, J., LAURENDEAU, S., LEVESQUE, S., LEHOUX, J., THOMPSON, D.A., EASTWELL, K.C., SKRZECZKOWSKI, L.J., PERREAULT, J.P. (2000). Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine

- North American peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure. *Virology* **271**, 37-45.
- PELCHAT, M., CÔTÉ, F., PERREAULT, J.P. (2001). Study of the polymerization step of the rolling circle replication of Peach latent mosaic viroid. *Arch. Virol.* **146**, 1753-1763.
- PELISSIER, T., WASSENEGGER, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* **6**, 55-65.
- PERAGINE, A., YOSHIKAWA, M., WU, G., ALBRECHT, H.L., POETHIG, R.S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* **18**, 2368-2379.
- PÉREZ-ORTÍN, J.E., ALEPUZ, P., CHÁVEZ, S., CHODER, M. (2013). Eukaryotic mRNA decay: methodologies, pathways, and links to other stages of gene expression. *J. Mol. Biol.* **425**, 3750-3775.
- PUCHTA, H., RAMM, K., SÄNGER, H.L. (1988). The molecular structure of Hop latent viroid (HLV) a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* **16**, 4197-4216.
- PUCHTA, H., HEROLD, T., VERHOEVEN, K., ROENHORST, A., RAMM, K., SCHMIDT-PUCHTA, W., SÄNGER, H.L. (1990). A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-Nb) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequence so far. *Plant Mol. Biol.* **15**, 509-511.
- PUCHTA, H., RAMM, K., LUCKINGER, R., HADAS, R., BAR-JOSEPH, M., SÄNGER, H.L. (1991). Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd-IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6640.
- QI, Y., DING, B. (2003a). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* **15**, 2566-2577.
- QI, Y., DING, B. (2003b). Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* **15**, 1360-1374.
- QI, Y., PELISSIER, T., ITAYA, A., HUNT, E., WASSENEGGER, M., DING, B. (2004). Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell* **16**, 1741-1752.
- QI, Y., DENLI, A.M., HANNON, G.J. (2005). Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell* **19**, 421-428.
- QI, Y., HE, X., WANG, X.J., KOHANY, O., JURKA, J., HANNON, G.J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**, 1008-1012.
- QU, F., YE, X., HOU, G., SATO, S., CLEMENTE, T.E., MORRIS, J. (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* **79**, 15209-15217.
- QU, F., YE, X., MORRIS, T.J. (2008). *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 14732-14737.
- RAJA, P., JACKEL, J.N., LI S., HEARD, I.M., BISARO, D.M. (2014). Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J. Virol.* **88**, 2611-2622.
- RAJAGOPALAN, R., VAUCHERET, H., TREJO, J., BARTEL, D.P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **20**, 3407-3425.
- RAKOWSKI, A.G., SZYCHOWSKY, J.A., AVENA, Z.S., SEMANCIK, J.S. (1994). Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J. Gen. Virol.* **75**, 3581-3584.
- RANDLES, J.W. (2003). Economic impact of viroid diseases. In *Viroids* (A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles, J.S. Semancik, Eds.) pp 3-11. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.

- REID, C.E., LAZINSKI, D.W. (2000). A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 424-429.
- REINHART, B.J., WEINSTEIN, E.G., RHOADES, M.W., BARTEL, B., BARTEL, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**, 1616-1626.
- REZAIAN, M.A. (1990). Australian grapevine viroid: evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1813-1818.
- RHEE, H.S., PUGH, B.F. (2012). Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* **483**, 295-301.
- RHOADES, M.W., REINHART, B.J., LIM, L.P., BURGE, C.B., BARTEL, B., BARTE, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513-520.
- RIVAS, F.V., TOLIA, N.H., SONG, J.J., ARAGON, J.P., LIU, J., HANNON, G.J., JOSHUA-TOR, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 340-349.
- RIVERA-BUSTAMANTE, R.F., SEMANCIK, J.S. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* **70**, 2707-2716.
- ROCHELEAU, L., PELCHAT, M. (2006). The subviral RNA database: a toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNAs research. *BMC Microbiol.* **6**, 24.
- RODIO, M.E., DELGADO, S., FLORES, R., DISERIO, F. (2006). Variants of peach latent mosaic viroid inducing peach calico: uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J. Gen. Virol.* **87**, 231-240.
- RODIO, M.E., DELGADO, S., DE STRADIS, A., GÓMEZ, M.D., FLORES, R., DI SERIO, F. (2007). A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell.* **1**, 3610-3626.
- ROMERO-SANTACREU, L., MORENO, J., PÉREZ-ORTÍN, J.E., ALEPUZ P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **15**, 1110-1120.
- SÄNGER, H.L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: the agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.* **8**, 103-106.
- SÄNGER, H.L., RAMM, K. (1975). Radioactive labelling of viroid RNA. In: *Modification of the Information Content of Plant Cells* (Markham, R., Davies, DR., Hopwood, D.A., Horne, R.W.) (Eds.). North Holland, Amsterdam. 229-252.
- 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.
- SANO, T., CANDRESSE, T., HAMMOND, R.W., DIENER, T.O., OWENS, R.A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10104-10108.
- SANO, T., ISHIGURO, A. (1998). Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* **240**, 238-244.
- SCHIEBEL, W., HAAS, B., MARINKOVIC, S., KLANNER, A., SANGER, H.L. (1993). RNAdirected RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J. Biol. Chem.* **268**, 11858-11867.
- SCHINDLER, I.M., MÜHLBACH, H.P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* **84**, 221-229.
- SCHMID, M., DAVISON, T.S., HENZ, S.R., PAPE, U.J., DEMAR, M., VINGRON, M., SCHÖLKOPF, B., WEIGEL, D., LOHMANN, J.U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **37**, 501-506.

- SCHOENBERG, D.R., MAQUAT, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 246-259.
- SCHOLTHOF, H.B., ALVARADO, V.Y., VEGA-ARREGUIN, J.C., CIOMPERLIK, J., ODOKONYERO, D., BROSSEAU, C., JAUBERT, M., ZAMORA, A., MOFFETT, P. (2011). Identification of an ARGONAUTE for Antiviral RNA Silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **156**, 1548-1555.
- SCHUCK, J., GURSINSKY, T., PANTALEO, V., BURGYAN, J., BEHRENS, S.E. (2013). AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Res.* **41**, 5090-50103.
- 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.
- SCHWACH, F., VAISTIJ, F.E., JONES, L., BAULCOMBE, D. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by Potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* **138**, 1842-1852.
- SCHWIND, N., ZWIEBEL, M., ITAYA, A., DING, B., WANG, M.B., KRCZAL, G., WASSENEGGER, M. (2009). RNAi-mediated resistance to potato spindle tuber viroid in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 459-469.
- SEMANCIK, J.S., TSURUDA, D., ZANER, L., GEELEN, J.L., WEATHERS, J.G. (1976). Exocortis disease: subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology* **80**, 218-221.
- 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.
- SERRA, P., BARBOSA, C.J., DARÒS, J.A., FLORES, R., DURAN-VILA N. (2008). Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology* **370**, 102-112.
- SHAMLOUL, A.M., HADIDI, A., ZHU, S.F., SINGH, R.P., SAGREDO, B. (1997). Sensitive detection of Potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Can. J. Plant Pathol.* **19**, 89-96.
- SHEN, R., MILLER, W.A. (2004). Subgenomic RNA as a riboregulator: negative regulation of RNA replication by Barley yellow dwarf virus subgenomic RNA 2. *Virology* **327**, 196-205.
- SHETH, U., PARKER, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808.
- SHIMURA, H., PANTALEO, V. (2011). Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**, 601-612.
- SHIMURA, H., PANTALEO, V., ISHIHARA, T., MYOJO, N., INABA, JI., SUEDA, K., BURGYÁN, J., MASUTA, C. (2011). A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* **7**:e1002021.
- SINGH, R.P., CLARK, M.C. (1971). Infectious low-molecular weight ribonucleic acid from tomato. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1077-1083.
- SINGH, R.P., DEHAAN, T.L., JASWAL, A.S. (1988). A survey of the incidence of Potato spindle tuber viroid in Prince Edward Island using two testing methods. *Can. J. Plant Sci.* **68**, 1229-1236.
- SINGH, R.P., BOUCHER, A., WANG, R.G. (1991). Detection, distribution and long-term persistence of potato spindle tuber viroid in true potato seed from Heilongjiang, China. *Am. Potato J.* **68**, 65-74.

- SINGH, R.P., NIE, X., SINGH, M. (1999). Tomato chlorotic dwarf viroid: an evolutionary link in the origin of pospiviroids. *J. Gen. Virol.* **80**, 2823-2828.
- SINGH, R.P., READY, K.F.M., HADIDI, A. (2003a). Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. En: 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J. S. Semancik, Eds.) pp 255-264. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- SINGH, R.P., READY, K.F.M., NIE, X. (2003b). Biology. In *Viroids* (A. Hadidi, R. Flores, J. W. Randles, J.S. Semancik, Eds.) pp 30-48. CSIRO Publ: Collingwood, Aust.
- SMITH, N.A., EAMENS, A.L., WANG, M.B. (2011). Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* **7**:e1002022.
- SOGO, J.M., KOLLER, T., DIENER, T.O. (1973). Potato spindle tuber viroid. X. Visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* **55**, 70-80.
- SONG, J.J., SMITH, S.K., HANNON, G.J., JOSHUA-TOR, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**, 1434-1437.
- SONG, L, HAN, M.H., LESICKA, J., FEDOROFF, N. (2007). Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5437-5442.
- SPIEKER, R.L., HAAS, B., CHARNG, Y.C., FREIMÜLLER, K., SÄNGER, H.L. (1990). Primary and secondary structure of a new viroid "species" (CbVd1) present in the *Coleus blumei* cultivar "Bienvenue". *Nucleic Acids Res.* **18**, 3998.
- SPIEKER, R.L., MARINKOVIC, S., SÄNGER, H.L. (1996). A new sequence variant of *Coleus blumei* viroid 3 from the *Coleus blumei* cultivar 'Fairway Ruby'. *Arch Virol.* **141**, 1377-1386.
- SPIEKER, R.L. (1996a). The molecular structure of iresine viroid, a new viroid species from *Iresine herbstii* (beefsteak plant). *J. Gen. Virol.* **77**, 2631-2635.
- SPIEKER, R.L. (1996b). A new sequence variant of *coleus blumei* viroid-1 from the *Coleus blumei* cultivar "Rainbow Gold". *Arch. Virol.* **141**, 2153-2161.
- SPIESMACHER, E., MÜLBACH, H.P., SCHNÖLZER, M., HAAS, B., SÄNGER, H.L. (1983). Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.* **3**, 767-774.
- STERN, D.S., HIGGS, D.C., YANG, J. (1997). Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **2**, 308-315.
- SUNKAR, R., ZHU, J.K (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2001-2019.
- SYMONS, R.H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary structure and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527-6537.
- SZITTYA, G., SILHAVY, D., MOLNÁR, A., HAVELDA, Z., LOVAS, A., LAKATOS, L., BÁNFALVI, Z., BURGÝÁN, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* **22**, 633-640.
- SZTUBA-SOLIŃSKA, J., STOLLAR, V., BUJARSKI, J.J. (2011) Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology* **412**, 245-255.
- TABLER, M., TSAGRIS, M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* **9**, 339-348.
- TAKAHASHI, T., DIENER, T.O. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology* **64**, 106-114.
- TAKEDA, A., IWASAKI, S., WATANABE, T., UTSUMI, M., WATANABE, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* **49**, 493-500.

- TAKEDA, R., PETROV, A.I., LEONTIS, N.B., DING, B. (2011). A three-dimensional RNA motif in potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **23**, 258-272.
- TEIXEIRA, D., PARKER, R. (2007). Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2274-2287.
- TIEN, P. (1985). Viroids and viroid diseases in China. In *Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions*. (K. Maramorosch, J. J. McKelvey, Eds.), pp 124-136. Academic Press: Orlando, FL.
- TIMMERMANN, C., MUHLBACH, H.P., BANDTE, M., BUTTNER, C. (2001). Control of mechanical viroid transmission by the disinfection of tables and tools. *Biol. Wet.* **66**, 151-156.
- TOLIA, N. H. Y L. JOSHUA-TOR (2007). Slicer and the argonauts. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 36-43.
- TSAGRIS, M., TABLER, M., SÄNGER, H.L. (1987). Oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNAs do. *Virology* **157**, 227-231.
- VAISTIJ, F.E., JONES, L., BAULCOMBE, D.C. (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* **14**, 857-867.
- VAN DER KROL, A.R., MUR, L.A., BELD, M., MOL, J.N., STUITJE, A.R. (1990). Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-299.
- VANACOVA, S., STEFL, R. (2007). The exosome and RNA quality control in the nucleus. *EMBO Rep.* **8**, 651-657.
- VÁRALLYAY, E., VÁLÓCZI, A., AGYI, A., BURGYÁN, J., HAVELDA, Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J.* **29**, 3507-3519.
- VÁRALLYAY, E., HAVELDA, Z. (2013). Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 567-575.
- VÁRALLYAY É, OLÁH E, HAVELDA Z. (2014). Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Res.* **42**, 599-608.
- VAUCHERET, H., VAZQUEZ, F., CRETE, P., BARTEL, D.P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev.* **18**, 1187-1197.
- VAUCHERET, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **20**, 759-771.
- VAUCHERET, H., MALLORY, A.C., BARTEL, D.P. (2006). AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Mol. Cell* **22**, 129-136.
- VAUCHERET, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci.* **13**, 350-358.
- VAUCHERET, H. (2009). AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One* **4**, e6442.
- VÁZQUEZ, F., VAUCHERTET, H., RAJAGOPALAN, R., LEPERS, C., GASCIOLLI, V., MALLORY, A., HILBERT, J. L., BARTEL, D., CRÉTÉ, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol. Cell* **16**, 69-79.
- VAZQUEZ, F. (2006). Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends Plant Sci.* **11**, 460-468.

- VERDEL, A., JIA, S., GERBER, S., SUGIYAMA, T., GYGY, S., GREWAL, S.I., MOAZED, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**, 672-676.
- VERHOEVEN, J.T., JASEN, C.C.C., WILLEMEN, T.M., KOX, L.F.F., OWENS, R.A., ROENHORST, J.W. (2004). Natural infections of tomato by citrus exocortis viroid, columnnea latent viroid, potato spindle tuber viroid and tomato chlorotic dwarf viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 823-831.
- VERHOEVEN, J.T., JANSEN, C.C.C., ROENHORST J.W., FLORES, R., DE LA PEÑA, M. (2009). Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. *Virus Res.* **144**, 209-214.
- VERHOEVEN, J.T., MEEKES, E.T.M., ROENHORST, J.W., FLORES, R., SERRA, P. (2013). Dahlia latent viroid: a recombinant new species of the family *Pospiviroidae* posing intriguing questions about its origin and classification. *J. Gen. Virol.* **94**, 711-719.
- VOGT, U., PELISSIER, T., PUTZ, A., RAZVI, F., FISCHER, R., WASENEGGER, M. (2004). Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.* **1**, 107-118.
- VOINNET, O., BAULCOMBE, D.C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553-553.
- VOINNET, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**, 449-459.
- VOINNET, O. (2005). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.* **579**, 5858-5871.
- VOINNET, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci.* **13**, 317-328.
- VOINNET, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669-687.
- WAH, Y.F.W.C., SYMONS, R.H. (1999). Transmission of viroids via grape seeds. *J. Phytopathol.* **147**, 285-291.
- WALLACE, J.M., DRAKE R.J. (1962). A high rate of seed transmission of avocado sun-blotch virus from symptomless trees and the origin of such trees. *Phytopathology* **5**, 237-241.
- WALTER, J., McLEOD, R. (1982). New records of plant diseases in New South Wales. *Dept. Agric. Plant Dis. Survey* 1981-82.
- WANG, M.B., BIAN, X.Y., WU, L.M., LIU, L.X., SMITH, N.A., ISENEGGER, D., WU, R.M., MASUTA, C., VANCE, V.B., WATSON, J.M., REZAIAN, A., DENNIS, E.S., WATERHOUSE, P.M. (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3275-3280.
- WANG, X.B., JOVEL, J., UDOMPORN, P., WANG, Y., WU, Q., LI, W-X., GASCIOLLI, V., VAUCHERET, H., DING, S.W. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 1625-1638.
- WANG, Y., LIU, C.L., STOREY, J.D., TIBSHIRANI, R.J., HERSCHLAG, D., BROWN, P. O. (2002). Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 5860-5865.
- WANG, Y., JURANEK, S., LI, H., SHENG, G., TUSCHI, T., PATEL, D.J. (2008). Structure of fan argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* **456**, 921-926.
- WANG, Y., JURANEK, S., LI, H., SHENG, G., WARDLE, G.S., TUSCHI, T., PATEL, D.J. (2009). Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**, 754-761.

- WARRILOW, D., SYMONS, R.H. (1999). Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. *Arch. Virol.* **144**, 2367-2375.
- WASSENEGGER, M., HEIMES, S., SÄNGER, H.L. (1994). An infectious viroid RNA replicon evolved from an in vitro-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion in vivo. *EMBO J.* **13**, 6172-6177.
- WASSENEGGER, M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**, 13-16.
- WASSENEGGER, M., KRCZAL, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* **11**, 142-151.
- WATERHOUSE, P.M., WANG, M.B., LOUGH, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- WATERHOUSE, P.M., HELLIWELL, C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced genesilencing. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 29-38.
- WIERZBICKI, A.T., HAAG, J.R., PIKAARD, C.S. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* **135**, 635-648.
- WIERZCHOSLAWSKI, R., DZIANOTT, A., BUJARSKI, J.J. (2004). Dissecting the requirement for subgenomic promoter sequences by RNA recombination of Brome mosaic virus in vivo: evidence for functional separation of transcription and recombination. *J. Virol.* **78**, 8552-8864.
- WOO, Y.M., ITAYA, A., OWENS, R.A., TANG, L., HAMMOND, R.W., CHOU, H.C., LAI, M.M.C., DING, B. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* **17**, 627-635.
- WU, X., BREWER, G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene* **500**, 10-21.
- XIE, M., REN, G., COSTA-NUNES, P., PONTES, O., YU, B. (2012). A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4422-4431.
- XIE, Z., FAN, B., CHAN, C., CHAN, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6516-6521.
- XIE, Z., JOHANSEN, L.K., GUSTAFSON, A.M., KASSCHAU, K.D., LELLIS, A.D., ZILBERMAN, D., JACOBSEN, S.E., CARRINGTON, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* **2**, E104.
- XIE, Z., ALLEN, E., WILKEN, A., CARRINGTON, J.C. (2005). DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12984-12989.
- XIE, Z., QI, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 720-724.
- XU, W., BOLDUC, F., HONG, N., PERREAULT, J.P. (2012). The use of a combination of computer-assisted structure prediction and SHAPE probing to elucidate the secondary structures of five viroids. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 666-676.
- YAEGASHI, H., TAKAHASHI, T., ISOGAI, M., KOBORI, T., OHKI, S., YOSHIKAWA, N. (2007). Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **88**, 316-324.
- YAZARLOU, A., JAFARPOUR, B., TARIGHI, S., HABILI, N., RANDLES, J.W. (2012). New Iranian and Australian peach latent mosaic viroid variants and evidence for rapid sequence evolution. *Arch. Virol.* **157**, 343-347.

- YOSHIKAWA, M., PERAGINE, A., PARK, M.Y., POETHIG, R.S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**, 2164-2175.
- YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, T. (1986). Inhibition of hop stunt viroid replication by α -amanitin. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **93**, 62-71.
- YU, D., FAN, B., MACFARLANE, S., CHEN, Z. (2003). Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 206-216.
- ZABEL, P., WEENEN-SWAANS, H., VAN KAMMEN, A. (1974). *In vitro* replication of Cowpea mosaic virus RNA. I. Isolation and properties of the membrane-bound replicase. *J. Virol.* **14**, 1049-1055.
- ZAMORE, P.D., HALEY, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519-1524.
- ZHANG, B., PAN, X., COBB, G.P., ANDERSON, T.A. (2006a). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol.* **289**, 3-16.
- ZHANG, X., YUAN, Y.R., PEI, Y., LIN, S.S., TUSCHL, T., PATEL, D.J., CHUA, N.H. (2006b). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**, 3255-3268.
- ZHANG, Y., DOREY, S., SWIDERSKI, M., JONES, J.D. (2004). Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J.* **40**, 213-224.
- ZHAO, Y., OWENS, R.A., HAMMOND, R.W. (2001). Use of a vector based on potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Virol.* **82**, 1491-1497.
- ZHENG, B., WANG, Z., LI, S., YU, B., LIU, J.Y., CHEN, X. (2009). Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* **23**, 2850-2860.
- ZHENG, X., ZHU, J., KAPOOR, A., ZHU, J.K. (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *EMBO J.* **26**, 1691-1701.
- ZHONG, X., TAO, X., STOMBAUGH, J., LEONTIS, N., DING, B. (2007). Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.* **26**, 3836-3846.
- ZHONG, X., ARCHUAL, A.J., AMIN, A.A., DING, B. (2008). A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell* **20**, 35-47.
- ZHU, H., HU, F., WANG, R., ZHOU, X., SZE, S.H., LIOU, L.W., BAREFOOT, A., DICKMAN, M., ZHANG, X. (2011). Arabidopsis Argonaute10 specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. *Cell* **145**, 242-256.
- ZHU, Y., GREEN, L., WOO, Y.M., OWENS, R.A., DING, B. (2001). Cellular basis of Potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* **279**, 69-77.
- ZILBERMAN, D., CAO, X., JACOBSEN, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**, 716-719.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar tengo que manifestar mi agradecimiento a Ricardo, Francesco y Beatriz, mis directores, por haberme dado la oportunidad de incorporarme en sus grupos de investigación para desarrollar mi doctorado y haber tenido paciencia conmigo.

De forma similar, tengo que expresar mi agradecimiento a todos los que han sido y son parte del equipo de trabajo en el laboratorio 1.04. del IBMCP. A Marcos, Selma, Sonia, Susana, Amparo, Amelia, Pedro por su calurosa acogida inicial y por estar siempre dispuestos a compartir sus conocimientos conmigo y tener paciencia en el aprendizaje de las tareas propias del trabajo diario. A ellos un agradecimiento especial por convertirse, más que en compañeros, en amigos y cómplices en el día a día de mi última etapa, y porque sin su compañía, apoyo y ayuda no habría logrado llegar hasta este punto de mi vida.

Naturalmente, mención especial para Amparo por su calidad humana y su profesionalidad, para Carmen Hernández por su generosa ayuda durante la tesis y para Lynne que ha tenido tanta paciencia conmigo y resulto mis dudas.

A todos aquellos que he ido conociendo en el IBMCP. A Borja que siempre me ha aconsejado y ayudado, a Marta Blanco por su paciencia y cariño, a Félix por su sonrisa, por escucharme y animarme, a Gaetano por la charlas en los pasillos y por su infinita paciencia, y a Miryam y Marta Serra, por estar siempre ahí, en los buenos y en los malos momentos, por su amistad, compañía, ayuda incondicional, paciencia conmigo, sonrisas, cariño y alegría.

Gracias a todos aquellos que me han tendido una mano cuando lo he necesitado. Gracias por los cafés y helados de media tarde. Gracias por convertirlos en mis amigos.

A mi madre por su apoyo total desde siempre y por su capacidad de animarme.

A Pasquale, gracias por su paciencia, apoyo y amor en todo momento, y por sacrificarse durante estos años.

A los que he olvidado nombrar, gracias también.

