

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 lineales 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.