



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Disección de la estructura secundaria
in silico, *in vitro* e *in vivo* de RNAs
viroidales nucleares y cloroplásticos**



Doctoranda: **María Amparo López Carrasco**

Director: Dr. Ricardo Flores Pedauyé

Valencia, Mayo de 2017

IMAGEN DE PORTADA:

La fotografía de la planta de *Nicotiana benthamiana* ha sido modificada de la web:
www.plantoftheweek.org



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Disección de la estructura secundaria *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de RNAs viroidales nucleares y cloroplásticos

Memoria presentada por

MARÍA AMPARO LÓPEZ CARRASCO

para optar al grado de

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

Director

Doctor RICARDO FLORES PEDAUYÉ

Tutor

Doctor JOSÉ-MIGUEL MULET SALORT

Valencia, Mayo de 2017

*Ningún mar en calma
hizo experto a un marinero*

ÍNDICE

RESÚMENES	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Viroides	11
1.1 Descripción.....	11
1.2 Clasificación y características generales.....	11
1.3 Estructura.....	13
1.3.1 Estructura de los miembros de la familia <i>Pospiviroidae</i>	15
1.3.2 Estructura de los miembros de la familia <i>Avsunviroidae</i>	21
1.4 Replicación.....	27
1.4.1 Mecanismo del círculo rodante.....	27
1.4.2 Transcripción: enzimas y sitios de inicio.....	29
1.4.3 Corte: enzimas y ribozimas.....	31
1.4.4 Ligación: RNA y DNA ligasas.....	33
1.5 Biología de los viroides: aspectos generales.....	34
2. Viroides objeto de estudio	36
2.1 El viroide latente de la berenjena (ELVd).....	36
2.2 El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd).....	37
2.3 El viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd).....	38
OBJETIVOS	41
CAPÍTULO I	
The transcription initiation sites of eggplant latent viroid strands map within distinct motifs in their <i>in vivo</i> RNA conformations	45
CAPÍTULO II	
Dissecting the secondary structure of the circular RNA of a nuclear viroid <i>in vivo</i> : A “naked” rod-like conformation similar but not identical to that observed <i>in vitro</i>	79

CAPÍTULO III

The predominant circular form of avocado sunblotch viroid accumulates *in planta* as a free RNA adopting a rod-shaped secondary structure unprotected by tightly bound host proteins **105**

DISCUSIÓN **129**

1. Estructura secundaria de los RNAs de polaridad positiva y negativa del ELVd **132**

2. Estructura secundaria del RNA circular de polaridad positiva del PSTVd **138**

3. Estructura secundaria de los RNAs circulares de polaridad positiva y negativa del ASBVd **144**

CONCLUSIONES **151**

BIBLIOGRAFÍA **155**

AGRADECIMIENTOS **179**

Resúmenes

RESUMEN

Los viroides, pequeños RNAs circulares (246-401 nt) con un elevado contenido en estructura secundaria que hasta ahora sólo han sido detectados en plantas superiores, son los agentes infecciosos más simples de la escala biológica y no codifican proteína alguna. Por lo tanto, dependen de motivos de secuencia y estructura de su genoma para utilizar (e incluso modular) la maquinaria de transcripción, procesamiento y tráfico de sus huéspedes con el fin de ser replicados e invadirlos sistémicamente, superando las barreras de defensa que interponen y llegando a producir enfermedades de importancia económica.

La estructura secundaria de los viroides nucleares (familia *Pospiviroidae*) es en general de tipo varilla, mientras que presenta múltiples ramificaciones en algunos viroides cloroplásticos (familia *Avsunviroidae*). Estas conformaciones están sostenidas por datos: i) *in silico*, mediante algoritmos que predicen la estructura secundaria con menor energía libre, ii) *in vitro*, por métodos biofísicos como el estudio de la movilidad electroforética, la microscopía electrónica y la resonancia magnética nuclear, o bioquímicos como el análisis en solución con RNAsas, bisulfito y dimetil sulfato, y más recientemente, por acilación de los grupos 2'-hidroxilo analizada por extensión del cebador (SHAPE), e iii) *in vivo*, derivados de la alta diversidad genética de algunos viroides, de estudios de mutagénesis dirigida de motivos concretos, y de irradiación con luz UV.

La asunción de que la conformación de los RNAs viroidales *in vitro* es similar o incluso idéntica a la que adoptan *in vivo* es cuestionable debido, entre otras razones, a las diferentes condiciones iónicas utilizadas en los análisis *in vitro* con respecto a las existentes *in planta*, así como a las interacciones con proteínas u otros factores del huésped. Por ello, en la presente Tesis Doctoral se han estudiado las estructuras *in vivo* de tres viroides aplicando diferentes metodologías.

En el viroide latente de la berenjena (ELVd), aprovechando su gran variabilidad genética, se han rastreado covariaciones y mutaciones compensatorias en variantes naturales que confirmen o afinen *in vivo* las estructuras de las dos cadenas del viroide predichas *in silico* y las obtenidas *in vitro* mediante SHAPE. Los resultados de las tres metodologías son consistentes entre sí para el ELVd (+) RNA y conducen a una conformación en varilla con una bifurcación en cada extremo. Esta estructura, si bien

similar, no es idéntica a la del ELVd (-) RNA, ya que su conformación presenta un motivo cruciforme central (confirmado *in vivo* por la presencia de covariaciones en el mismo) y, además, ambos RNAs muestran movilidades electroforéticas distintas en geles de poliacrilamida nativos. Los resultados *in vitro* para el ELVd (-) RNA fueron menos consistentes con los obtenidos *in silico* e *in vivo*.

Por otra parte, la alta acumulación de las formas monoméricas circulares (*mc*) positivas de los viroides del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) y del manchado solar del aguacate (ASBVd) en *Nicotiana benthamiana* y aguacate, respectivamente, ha permitido aplicar una modificación de la metodología SHAPE para determinar la estructura *in vivo* de ambos RNAs, facilitando su comparación directa con las estructuras previamente derivadas *in vitro* mediante la misma técnica, y las predichas *in silico*. Las estructuras *in planta* de los *mc* PSTVd (+) y *mc* ASBVd (+) RNAs son muy similares (pero no idénticas) a las observadas *in silico* y mediante SHAPE *in vitro*. Estos resultados aportan las primeras pruebas directas de que los RNAs circulares de dos viroides, uno nuclear y el otro cloroplástico, se encuentran en su contexto fisiológico mayoritariamente desnudos y no fuertemente asociados a proteínas del huésped. Sin embargo, hemos observado que la región central conservada del *mc* PSTVd (+) RNA, particularmente el bucle E implicado en replicación y otras funciones, muestra una menor reactividad SHAPE *in vivo* posiblemente debida a la interacción con una o más proteínas que medien dichas funciones o a cambios estructurales motivados por otros factores del hábitat natural. Dada la baja concentración en su huésped del *mc* ASBVd (-) RNA, su estructura únicamente se ha estudiado *in silico* y por SHAPE *in vitro*, conduciendo a una conformación de tipo varilla parecida a, pero no la misma que la del *mc* ASBVd (+) RNA, ya que la movilidad electroforética de los dos RNAs en geles nativos de poliacrilamida es ligeramente diferente.

SUMMARY

Viroids, small circular RNAs (246-401 nt) with a high content in secondary structure that until recently have been detected only in higher plants, are the simplest infectious agents in the biological scale and do not encode any protein. Therefore, they depend on their genomic sequence and structural motifs to use (and even modulate) the transcription, processing, and trafficking machinery of their hosts in order to be replicated and invade them systemically, overcoming the defense barriers they mount and leading eventually to economically important diseases.

The secondary structure of nuclear viroids (family *Pospiviroidae*) is generally rod-like, while in some chloroplastic viroids (family *Avsunviroidae*) it is multi-branched. These conformations are supported by data: i) *in silico*, resulting from algorithms that predict the secondary structure with minimal free energy; ii) *in vitro*, using biophysical methods such as the analysis of electrophoretic mobility, electron microscopy and nuclear magnetic resonance; or biochemical approaches such as analysis in solution with RNases, bisulfite and dimethyl sulfate, and more recently, the acylation of the 2'-hydroxyl groups analysed by primer extension (SHAPE); and iii) *in vivo*, derived from the high genetic diversity of some viroids, site-directed mutagenesis of specific motifs, or UV irradiation.

The assumption that the conformation of the viroid RNAs *in vitro* is similar or even identical to that adopted *in vivo* is questionable due, among other reasons, to the different ionic conditions used in *in vitro* analyses with respect to those existing *in planta*, as well as to a number of interactions with the proteins or other factors in the host. Therefore, in the present Doctoral Thesis, the *in vivo* structures of three viroids have been studied, applying different approaches.

In the eggplant latent viroid (ELVd), taking advantage of its high genetic variability, co-variations and compensatory mutations have been screened in natural variants in order to confirm or refine *in vivo* the structures predicted *in silico* for both viroid strands and those obtained through *in vitro* SHAPE. The results of the three methodologies are consistent for ELVd (+) RNA and lead to a quasi-rod-like conformation with a bifurcation at each terminal domain. This structure, although similar, is not identical to that of ELVd (-) RNA, because its conformation has a central cruciform motif (confirmed *in vivo* by the presence of covariations therein) and because,

in addition, both RNAs show different electrophoretic mobilities in native polyacrylamide gels. The *in vitro* results for ELVd (-) RNA were less consistent with those obtained *in silico* and *in vivo*.

On the other hand, the high accumulation of the monomeric circular (*mc*) positive RNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and avocado sunblotch viroid (ASBVd) in *Nicotiana benthamiana*, and avocado respectively, allowed the determination of the *in vivo* structure of both RNAs by SHAPE, enabling their direct comparison with the conformations derived previously *in vitro* using the same technique, and those predicted *in silico*. The structures determined *in vivo* for *mc* PSTVd (+) and *mc* ASBVd (+) RNAs are very similar (but not identical) to those observed *in silico* and by *in vitro* SHAPE. These results provide the first direct evidence that, in their physiological context, the circular RNAs of two viroids, one nuclear and other chloroplastic, are essentially naked and not strongly associated with host proteins. However, we have observed that the conserved central region of *mc* PSTVd (+) RNA, particularly the loop-E involved in replication and other functions, shows a lower SHAPE reactivity *in vivo*, possibly due to interactions with one or more proteins mediating these functions or to structural changes induced by other factors of their natural habitat. The low accumulation of *mc* ASBVd (-) RNA in its host, only allowed for the examination of its structure *in silico* and by *in vitro* SHAPE, leading to a rod-like conformation similar to, but not identical, that of *mc* ASBVd (+) RNA, since the electrophoretic mobility of both RNAs in native polyacrylamide gels is slightly different.

RESUM

Els viroides, menuts RNAs circulars (246-401 nt) amb un elevat contingut en estructura secundària que fins ara només han estat detectats en plantes superiors, són els agents infecciosos més simples de l'escala biològica, i no codifiquen proteïnes. Per tant, depenen de motius de seqüència i estructura del seu genoma per tal d'utilitzar (i fins i tot modular) la maquinària de transcripció, processament i tràfic dels seus hostes amb la finalitat de ser replicats i envair-los sistèmicament, superant les barreres de defensa que interposen i arribant a produir malalties d'importància econòmica.

L'estructura secundària dels viroides nuclears (família *Pospiviroidae*) és en general de tipus vareta, i presenta múltiples ramificacions en alguns viroides cloroplàstics (família *Avsunviroidae*). Aquestes conformacions estan sostingudes per dades: i) *in silico*, mitjançant algorismes que prediuen l'estructura secundària amb menor energia lliure; ii) *in vitro*, amb mètodes biofísics, com l'anàlisi de la mobilitat electroforètica, la microscòpia electrònica i la ressonància magnètica nuclear; o bioquímics, com l'anàlisi en solució amb RNases, bisulfit i dimetil sulfat, i, més recentment, per acilació dels grups 2'-hidroxil analitzada per extensió del cebador (SHAPE); i iii) *in vivo*, derivats de l'alta diversitat genètica d'alguns viroides, d'estudis de mutagènesi dirigida de motius concrets, i d'irradiació amb llum UV.

L'assumpció que la conformació dels RNAs viroidals *in vitro* és similar, o fins i tot idèntica, a aquella que adopten *in vivo* és qüestionable a causa de, entre altres raons, les diferents condicions iòniques utilitzades en les anàlisis *in vitro* pel que fa a les existents *in planta*, així com a les interaccions amb proteïnes o altres factors de l'hoste. Per això, en la present Tesi Doctoral s'han estudiat les estructures *in vivo* de tres viroides aplicant diferents metodologies.

En el viroide latent de l'albergínia (ELVd), aprofitant la seua gran variabilitat genètica, s'han rastrejat covariacions i mutacions compensatòries en variants naturals que confirmen o afinen *in vivo* les estructures de les dues cadenes del viroide predites *in silico* i aquelles obtingudes *in vitro* mitjançant SHAPE. Els resultats de les tres metodologies són consistents entre si per a l'ELVd (+) RNA, i condueixen a una conformació en vareta amb una bifurcació a cada extrem. Aquesta estructura, si bé similar, no és idèntica a aquella de l'ELVd (-) RNA, ja que la seua conformació presenta un motiu cruciforme central (confirmat *in vivo* per la presència de covariacions

en el mateix) i, a més, tots dos RNAs mostren mobilitats electroforètiques diferents en gels de poliacrilamida natius. Els resultats *in vitro* per a l'ELVd (-) RNA són menys consistents amb les dades obtingudes *in silico* i *in vivo*.

D'altra banda, l'alta acumulació de les formes monomèriques circulars (*mc*) positives dels viroides del tubercle fusiforme de la creïlla (PSTVd) i del tacat solar de l'alvocat (ASBVd) en *Nicotiana benthamiana* i alvocat respectivament, ha permès aplicar una modificació de la metodologia SHAPE per a determinar l'estructura *in vivo* de tots dos RNAs, possibilitant la comparació directa amb l'estructura prèviament derivada *in vitro* amb la mateixa tècnica, i la conformació predita *in silico*. Les estructures de tipus vareta obtingudes per als *mc* PSTVd (+) i *mc* ASBVd (+) RNAs és molt similar (però no idèntica) a les observades *in silico* i mitjançant SHAPE *in vitro*. Aquests resultats aporten les primeres proves directes que, en el seu context fisiològic, els RNAs circulars dels viroides nuclears i cloroplàstics es troben majoritàriament nus i no fortament recoberts per proteïnes de l'hoste. No obstant això, hem observat una menor reactivitat SHAPE *in vivo* de la regió central conservada del PSTVd, particularment del bucle E implicat en replicació i en altres funcions, possiblement a causa de la interacció amb una o més proteïnes que intervenen aquestes funcions o a canvis estructurals motivats per altres factors de l'hàbitat natural. Atesa la baixa concentració del *mc* ASBVd (-) RNA en el seu hoste, la seua estructura únicament s'ha estudiat *in silico* i amb SHAPE *in vitro*, conduint a una conformació de tipus vareta semblant a, tot i que no la mateixa, aquella del *mc* ASBVd (+) RNA, ja que la mobilitat electroforètica de tots dos RNAs en gels de poliacrilamida natius és lleugerament diferent.

Introducción

1. Viroides

1.1 Descripción

Los viroides son los agentes infecciosos más pequeños de la escala biológica (Diener, 1971a). Poseen un genoma circular de RNA de cadena simple de entre 246 y 401 nucleótidos, cuyo alto grado de autocomplementariedad conduce a la formación de estructuras compactas. Pese a que son capaces de replicarse autónomamente, los viroides no codifican proteínas. Por tanto, dependen únicamente de su secuencia y estructura para interactuar directamente con factores del huésped, modificando las maquinarias de transcripción, procesamiento y tráfico del mismo para replicarse, moverse sistémicamente y completar su ciclo infeccioso, frecuentemente asociado a la aparición de enfermedades en las plantas que infectan. Dichas plantas son tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, algunas de gran importancia económica (Diener, 2001; Flores *et al.*, 2005; Ding, 2009).

El descubrimiento de los viroides por Theodor D. Diener estuvo ligado a la identificación del agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) (Diener y Raymer, 1967). Diener comprobó que las características físico-químicas del patógeno no eran las propias de los virus conocidos, sino de una molécula de RNA simple de baja masa molecular a la que llamó “viroide” (Diener, 1971a y 1971b). Años más tarde se observó que algunos de estos RNAs infecciosos no codificantes tienen capacidad autocatalítica, mediada por ribozimas de cabeza de martillo claves para su replicación (Hutchins *et al.* 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster y Symons, 1987; Flores *et al.*, 2001). Esta observación condujo a la idea de que los viroides tendrían un origen evolutivo muy antiguo, pudiendo considerárseles fósiles moleculares del “mundo de RNA” que posiblemente precedió al actual mundo basado en el DNA y las proteínas (Diener, 1989; Flores *et al.*, 2014).

1.2 Clasificación y características generales

El “International Committee on Taxonomy of Viruses” en su última actualización (Owens *et al.*, 2012), reconoce 32 especies de viroides caracterizadas biológica y molecularmente (Figura 1). Existe una base de datos (Rocheleau y Pelchat, 2006) que contiene las secuencias y estructuras secundarias predichas para variantes representativas (<http://subviral.med.uottawa.ca>).

POSPIVIROIDAE	POSPIVIROID	PSTVd	Viroide del tubérculo fusiforme de la patata	359 nt	Gross <i>et al.</i> , 1978	
		CEVd	Viroide de la exocortis de los cítricos	371 nt	Gross <i>et al.</i> , 1982	
		CLVd	Viroide latente de columnnea	370 nt	Hammond <i>et al.</i> , 1989	
		CSVd	Viroide del enanismo del crisantemo	356 nt	Haseloff y Symons, 1981	
		IrVd 1	Viroide 1 de iredine	370 nt	Spieker, 1996a	
		PCFVd	Viroide del fruto pequeño del pimiento	348 nt	Verhoeven <i>et al.</i> , 2009	
		TASVd	Viroide del enanismo apical del tomate	360 nt	Kiefer <i>et al.</i> , 1983	
		TCDVd	Viroide del enanismo clorótico del tomate	360 nt	Singh <i>et al.</i> , 1999	
		TPMVd	Viroide de la planta macho del tomate	360 nt	Kiefer <i>et al.</i> , 1983	
		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
			CTIVd	Viroide del tinangaja del cocotero	254 nt	Keese <i>et al.</i> , 1988
			CVd-IV	Viroide de la corteza agrietada de los cítricos	284 nt	Puchta <i>et al.</i> , 1991
			HLVd	Viroide latente del lúpulo	256 nt	Puchta <i>et al.</i> , 1988
		APSCAVIROID	ASSVd	Viroide de la piel cicatrizada de la manzana	329 nt	Hashimoto y Kogawaza, 1987
			ADFVd	Viroide del fruto picado del manzano	306 nt	Di Serio <i>et al.</i> , 1996
			AGVd	Viroide australiano de la vid	369 nt	Rezaian, 1990
			CBLVd	Viroide de la hoja curvada de los cítricos	318 nt	Ashulin <i>et al.</i> , 1991
			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
			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
			PBCVd	Viroide de los chancros pustulosos del peral	315 nt	Hernández <i>et al.</i> , 1992
		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> , 1996
AVSUNVIROIDAE	AVSUNVIROID	ASBVd	Viroide del manchado solar del aguacate	247 nt	Symon, 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> , 2003a	

Figura 1. Clasificación de los viroides (Di Serio *et al.*, 2014), con modificaciones respecto a la última actualización del “International Committee on Taxonomy of Viruses” (Owens *et al.*, 2012). Estos agentes 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 con fondo coloreado. Para cada viroide 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.

Los viroides se clasifican en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, según sus características estructurales y biológicas. El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) es el miembro tipo de la familia *Pospiviroidae*, que engloba 28 especies en total. Los miembros de esta familia se caracterizan por adoptar una estructura secundaria en varilla, por presentar una región central conservada (“central conserved region”, CCR), y por su replicación y localización nuclear. La familia *Avsunviroidae*, sin embargo, está formada por sólo cuatro especies. El miembro tipo de esta familia, el viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd), y los otros que la componen, se caracterizan por su variabilidad estructural, su capacidad autocatalítica mediada por

ribozimas de cabeza de martillo, y por su replicación y acumulación en plastidios (fundamentalmente cloroplastos) (Owens *et al.*, 2012; Di Serio *et al.*, 2014).

1.3 Estructura

Los viroides, según diversos estudios *in silico* e *in vitro*, adoptan estructuras muy compactas en las que segmentos de nucleótidos apareados están flanqueados por otros aparentemente desapareados que forman bucles. Estas conformaciones se ven facilitadas por la alta autocomplementariedad del RNA genómico viroidal, así como por su configuración circular. La particular estructura de los viroides, si también existe *in vivo*, les proporcionaría resistencia frente a las exonucleasas que reconocieran los extremos de la molécula, y en buena medida, también frente a las endonucleasas que actúan preferentemente sobre regiones de cadena simple (Flores *et al.*, 2012). Esta podría ser en parte la razón de que los viroides carezcan de la cápsida que necesitan los virus para subsistir y acumularse en las células del huésped.

La conformación en varilla propuesta para el PSTVd (familia *Pospiviroidae*), se basa en cálculos termodinámicos *in silico* que determinan las estructuras con menor energía libre, y en estudios *in vitro* tanto bioquímicos (tratamientos con RNAsas, bisulfito y dimetil sulfato), como biofísicos (microscopía electrónica y resonancia magnética nuclear, RMN) (Sogo *et al.*, 1973; Sängner *et al.*, 1976; Gross *et al.*, 1978; Riesner *et al.*, 1979; Gast *et al.*, 1996; Dingley *et al.*, 2003). Más tarde se realizaron estudios similares de la estructura de otros miembros de la misma familia, el viroide del enanismo del crisantemo (CSVd) y el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) (Haseloff and Symons, 1981; Gross *et al.*, 1982), que condujeron a una conformación parecida (Figura 2).

Aplicando metodologías similares se observó que la estructura es mucho más variada en los miembros de la familia *Avsunviroidae* desde una varilla o cuasi-varilla del ASBVd (Symons, 1981; Navarro y Flores, 2000), hasta conformaciones mucho más ramificadas en los viroides del mosaico latente del melocotonero (PLMVd) (Hernández y Flores, 1992) y del moteado clorótico del crisantemo (CChhMVd) (Navarro y Flores, 1997) (ver apartado 1.3.2).

Las predicciones termodinámicas de estructuras secundarias de RNA son tanto menos precisas cuanto mayor es la molécula, y resultan especialmente complejas si ésta presenta interacciones de orden superior (Mathews and Turner, 2006). El tratamiento

con RNAsas, bisulfito y dimetil sulfato *in vitro* se ha considerado hasta hace poco una de las mejores opciones para comprobar la fiabilidad de estas predicciones *in silico*. Sin embargo, en los últimos años, se ha desarrollado una técnica conocida como SHAPE (“selective-2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension”) que examina la flexibilidad local del esqueleto del RNA en solución a nivel de nucleótido (Wilkinson *et al.*, 2006; Mortimer and Weeks, 2009), y permite acoplar estos datos a la predicción termodinámica de la estructura de forma que ésta es bastante más precisa (Deigan *et al.*, 2009; Mathews *et al.*, 2010; Hajdin *et al.*, 2013). Esta técnica aplicada *in vitro* a los viroides de las dos familias ha confirmado, a grandes rasgos, las estructuras predichas anteriormente por las otras metodologías mencionadas (Dubé *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012; Giguère *et al.*, 2014a y 2014b; Delan-Forino *et al.*, 2014; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015). No obstante, todavía no se ha aplicado ni ésta, ni ninguna técnica similar para determinar la conformación que adquieren los viroides *in vivo*, donde pueden interaccionar con proteínas u otros factores del huésped y donde, adicionalmente, las condiciones iónicas son diferentes a las que se utilizan normalmente en los estudios *in vitro* (Flores *et al.*, 2012; Steger y Perreault, 2016).

Además de la estructura termodinámicamente más estable, los viroides de ambas familias pueden formar otras conformaciones termodinámicamente subóptimas atrapadas cinéticamente en estados metaestables, como ocurre tras una desnaturalización térmica y enfriamiento rápido *in vitro* (Henco *et al.*, 1979; Riesner *et al.*, 1979), situación que también podría ocurrir durante la replicación *in vivo* al desplegarse la molécula (Riesner, 1991). Sin embargo, hasta ahora, estas estructuras metaestables no han sido detectadas por SHAPE a pesar de la desnaturalización térmica que suele realizarse previamente a la aplicación de la técnica, posiblemente porque dichas estructuras metaestables se forman solo en parte de las moléculas de manera más o menos transitoria.

En cualquier caso, la mayor parte de los motivos o dominios que constituyen las estructuras alternativas a la más estable tienen funciones biológicas. Por ejemplo, las secuencias de las ribozimas de cabeza de martillo en los miembros de la familia *Avsunviroidae* forman parte de la estructura en varilla del viroide donde son inactivas, adquiriendo la conformación funcional en intermediarios replicativos más largos de la longitud unitaria (oligómeros). Del mismo modo, en los miembros de la familia

Pospiviroidae, se forman estructuras metaestables durante la replicación que desempeñan un papel crucial en la misma (Flores *et al.*, 2012; Steger y Perreault, 2016).

1.3.1 Estructura de los miembros de la familia *Pospiviroidae*

La estructura en varilla de los miembros de la familia *Pospiviroidae* presenta cinco dominios: el central (C), en el que se encuentra la CCR, está flanqueado por los dominios patogénico (P) a la izquierda y variable (V) a la derecha. En el dominio terminal izquierdo (TL) se halla la región terminal conservada (“terminal conserved región”, TCR) o la horquilla terminal conservada (“terminal conserved hairpin”, TCH). Por último, existe un dominio terminal derecho (TR) (Figura 2). Las diferencias en secuencia de la CCR, así como la presencia de la TCR o TCH, que parecen mutuamente excluyentes (Koltunow and Rezaian, 1988; Puchta *et al.*, 1988; Flores *et al.*, 1997), permiten clasificar a los viroides de esta familia en los cinco géneros mencionados (Figura 1).

Aunque en un principio se asignó una función a cada dominio (por ejemplo, el P se asoció con los efectos patogénicos en el PSTVd y otros viroides estrechamente relacionados con éste, y el C se implicó en replicación), la situación es más compleja, ya que ciertas funciones como la inducción de síntomas parecen estar controladas por determinantes discretos situados en más de un dominio (Sano *et al.*, 1992; Reanwarakorn y Semancik, 1998; Qi y Ding, 2003a).

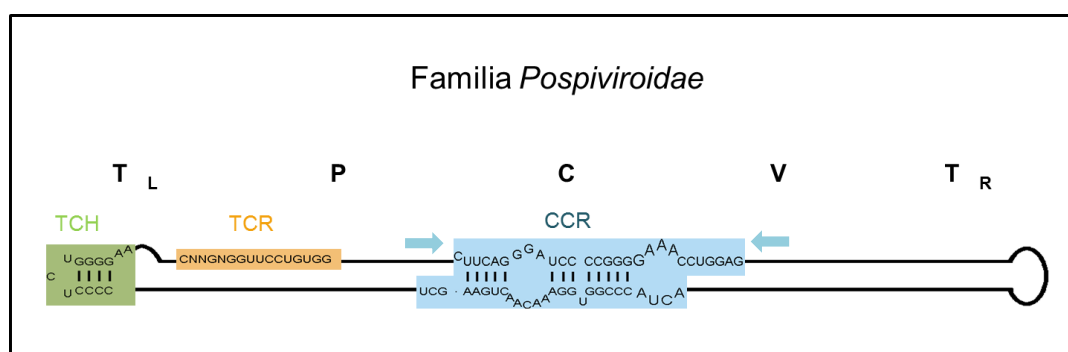


Figura 2. Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para los miembros del género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae*. La localización aproximada de los cinco dominios se indica en la parte superior de la figura: C (central), P (patogénico), V (variable) 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.

La CCR está formada por dos segmentos nucleotídicos conservados en la hebra superior (“upper central conserved región”, UCCR) y en la inferior (“lower central conserved región”, LCCR), que se encuentran flanqueados por repeticiones invertidas imperfectas en la UCCR. Estas repeticiones permiten la formación de un motivo metaestable conocido como Hairpin I (HPI) cuya estructura se mantiene preservada en todos los miembros de la familia *Pospiviroidae* (Riesner *et al.*, 1979; Visvader *et al.*, 1985; Polivka *et al.*, 1996), sustentando la hipótesis de que tiene una importante función. Más específicamente, el HPI desempeña un papel clave en la replicación de los viroides de esta familia (ver apartado 1.4.3) (Daròs and Flores, 2004; Gas *et al.*, 2007) y también en el movimiento del RNA genómico al núcleo (Zhao *et al.*, 2001; Abraitene *et al.*, 2008). Este motivo está constituido por un tetrabucle terminal palindrómico con los dos residuos centrales filogenéticamente conservados, seguido de un pequeño tallo de 3 pares de bases (pb) donde el par central también está conservado, y de un bucle interno simétrico de 1-3 nt en cada hebra presumiblemente estabilizado por interacciones no canónicas (Gast *et al.*, 1998). En la parte inferior presenta un tallo de 9-10 pb interrumpido ocasionalmente por un bucle simétrico o asimétrico de 1 nt (Figura 3) (Visvader *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 1997).

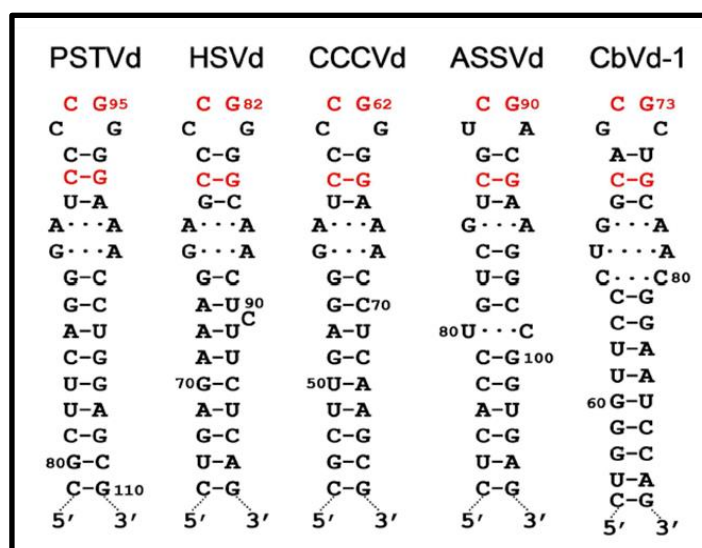


Figura 3. Estructura del HPI de cinco miembros de la familia *Pospiviroidae*. Este elemento de estructura secundaria está formado por la UCCR y las repeticiones invertidas flanqueantes. En rojo se representan los nucleótidos conservados en posiciones similares en la conformación. Las líneas continuas y discontinuas indican pares Watson-Crick y no canónicos respectivamente. Se observa que la variabilidad preserva, en general, la estructura del HPI, incluyendo el tetrabucle palindrómico terminal, los 3 pb adyacentes y el tallo largo inferior. Figura modificada de Gas *et al.*, 2007.

Además del HPI, otros motivos que aparecen en las conformaciones metaestables que adquieren los viroides nucleares mediante desnaturalización térmica son el Hairpin II (HPII), el Hairpin III (HPIII) y el Hairpin IV (HPIV). El HPII está formado por la hebra inferior de los dominios V y TL y también está altamente conservado. Presenta un bucle terminal seguido de un tallo de 10-12 pb rico en G+C. Este motivo se forma tras desnaturalizar los intermediarios replicativos viroidales de polaridad negativa, siendo esencial para la síntesis de la cadena de polaridad positiva (Qu *et al.*, 1995; Schroder and Riesner, 2002). El HPIII se ha detectado en el PSTVd (Riesner *et al.*, 1979) y el HPIV en el viroide latente de columnnea (CLVd) Owens *et al.*, 2003), pero se desconoce la función de ambos (Flores *et al.*, 2012). En el viroide del cadang-cadang de la palmera cocotera (CCCVd) sólo se ha detectado el HPI (Steger y Perreault, 2016).

Por otro lado, en la parte derecha de la CCR de algunos viroides de la familia *Pospiviroidae*, entre los que se encuentra el PSTVd, se ha observado la presencia de un bucle interno muy particular que recuerda al bucle E del 5S rRNA de eucariotas (Branch *et al.*, 1985; Gast *et al.*, 1996) cuya estructura se ha estudiado por RMN (Wimbetly *et al.*, 1993). Este bucle está formado por diversas interacciones no canónicas (Figuras 4 y 5) entre las que destaca un triple apareamiento en el que la A99 se aparea con la U260 mediante un enlace *trans* Hoogsteen/Watson-Crick, y esta última a su vez se aparea con la C o la U259 (según la variante del PSTVd) mediante un enlace *cis* Hoogsteen/azúcar, sobresaliendo este nucleótido de la hélice (Wimberly *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 2006). También se ha observado que la irradiación con luz UV de hojas de tomate infectadas con el PSTVd produce un entrecruzamiento *in vivo* entre los nucleótidos G98 y U260 del bucle E (Eiras *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007), recapitulando observaciones previas *in vitro* (Branch *et al.*, 1985; Gast *et al.*, 1996). Además, este bucle está conservado en otros miembros del género *Pospiviroid* y, mediante estudios de mutagénesis dirigida y con matrices de isostericidad se ha comprobado que la integridad estructural del mismo es crucial para la replicación (Zhong *et al.*, 2006), especialmente durante la ligación (Gas *et al.*, 2007). El bucle E también está implicado en la especificidad de huésped, ya que el cambio de un simple nucleótido (U→C259) en este bucle incapacita al PSTVd para infectar tabaco pero no tomate (Wassenegger *et al.*, 1996), en patogénesis (Qi and Ding, 2003a) y en acumulación (Zhong *et al.*, 2006). Por último, al igual que en el 5S rRNA, el bucle E del PSTVd parece ser un sitio de unión y reclutamiento de proteínas posiblemente implicadas en replicación y transporte intracelular, como se ha observado al

estudiar su afinidad *in vitro* por un factor de transcripción (TFIIIA) de *A. thaliana* (Eiras *et al.*, 2011). Sin embargo, este bucle no está conservado en todos los viroides nucleares, por lo que deben existir otros elementos de estructura terciaria funcionalmente equivalentes al mismo en otros miembros de esta familia (Flores *et al.*, 2012).

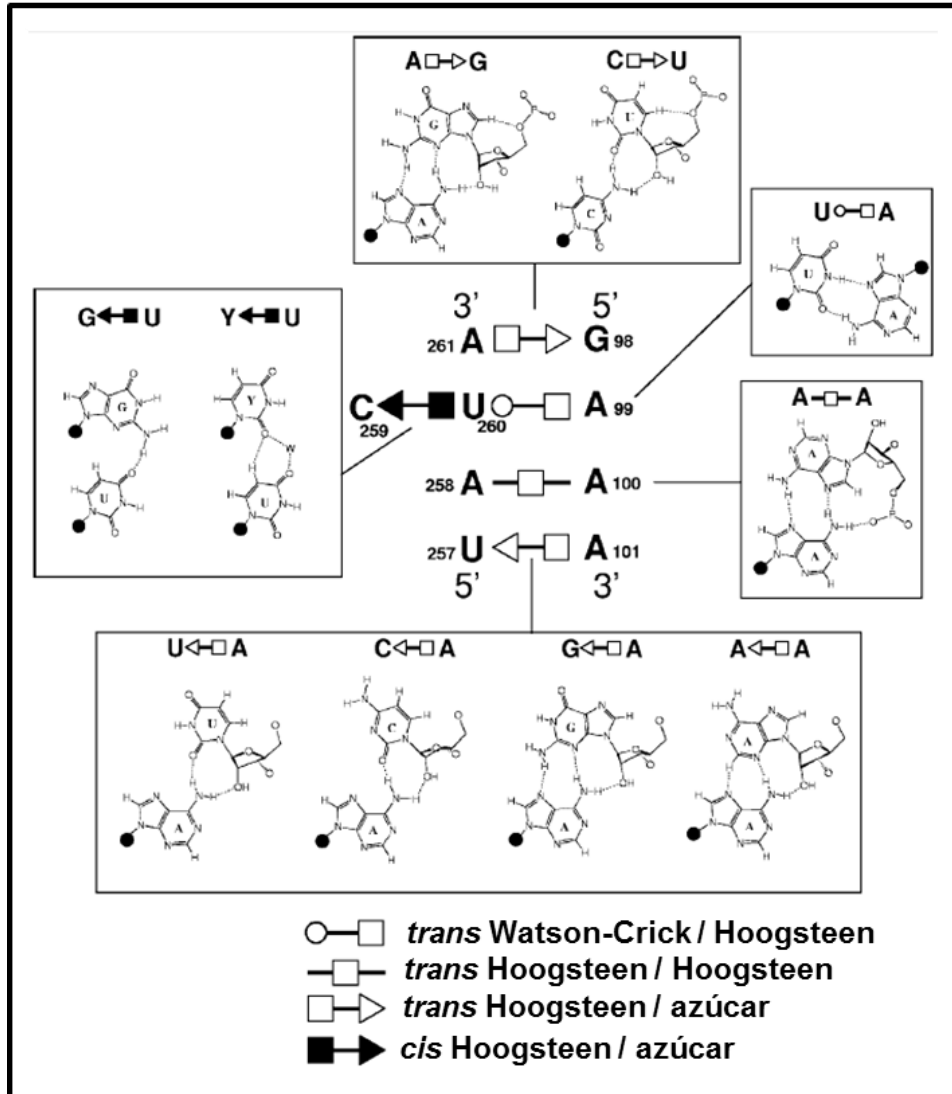


Figura 4. Los cinco pares de bases no canónicos que forman el núcleo del bucle E del PSTVd. Asimismo se muestran ejemplos de variantes naturales o mutantes creados experimentalmente que forman pares de bases isostéricos. Y: pirimidina (U o C); W: molécula de agua. La ribosa se representa con un círculo negro, excepto cuando está implicada en puentes de hidrógeno. Figura modificada de Zhong *et al.*, 2006.

Además del bucle E, otros bucles del PSTVd que contienen interacciones no canónicas desempeñan un papel clave en la infección (Figura 5). Por ejemplo, el bucle 7 está constituido por un par U/C que forma un enlace *cis* Watson-Crick/Watson-Crick con inserción de una molécula de agua, cuyo modelo tridimensional se ha basado en la comparación con motivos similares en estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X en combinación con mutagénesis y análisis de covariaciones. Este bucle parece imprescindible en la entrada del PSTVd en el floema para ser transportado a partes distales de la planta (Zhong *et al.*, 2007). Por otra parte, el bucle 6 implicado en el transporte intercelular del PSTVd, también presenta interacciones no canónicas y su estructura tridimensional se ha derivado de la comparación isostérica con motivos similares estudiados por cristalografía de rayos X (Takeda *et al.*, 2011). También se ha observado que existe un motivo bipartido —que comprende los nucleótidos U47, U309 y A313 (localizados alrededor de los bucles 7 y 8) y la U201 del bucle 24— imprescindible para el tráfico de la vaina del haz al mesófilo en hojas jóvenes de tabaco (Qi *et al.*, 2004).

Así pues, parece cada vez más evidente que muchos de los pequeños bucles aparentemente desestructurados de los viroides presentan apareamientos de bases alternativos, en los que cada nucleótido puede formar enlaces con otro nucleótido por cualquiera de los tres distintos bordes (Watson-Crick, Hoogsteen o azúcar) (Figuras 4 y 5), estando el enlace glicosídico orientado en *cis* o en *trans* (Leontis and Westhof, 2001; Sweeney *et al.*, 2015). Las relaciones isostéricas entre cada tipo de apareamiento están recogidas en matrices de isostericidad, que explican los cambios de secuencia que mantienen la conformación de estos motivos y que sirven para validar modelos tridimensionales inferidos de RMN o cristalografía de rayos X de estructuras similares. Estos modelos también pueden ser comprobados funcionalmente *in vitro* o *in vivo* mediante estudios de mutagénesis que en el segundo caso permiten evaluar la importancia de la integridad de estos elementos en la infección viroidal (Flores *et al.*, 2012).

Con este objetivo se ha realizado un análisis mutacional a lo largo de todo el genoma del PSTVd en el que se han identificado algunos motivos importantes en su replicación y tráfico sistémico (Zhong *et al.*, 2008), abriendo así las puertas a un estudio más completo de estos motivos (Figura 5).

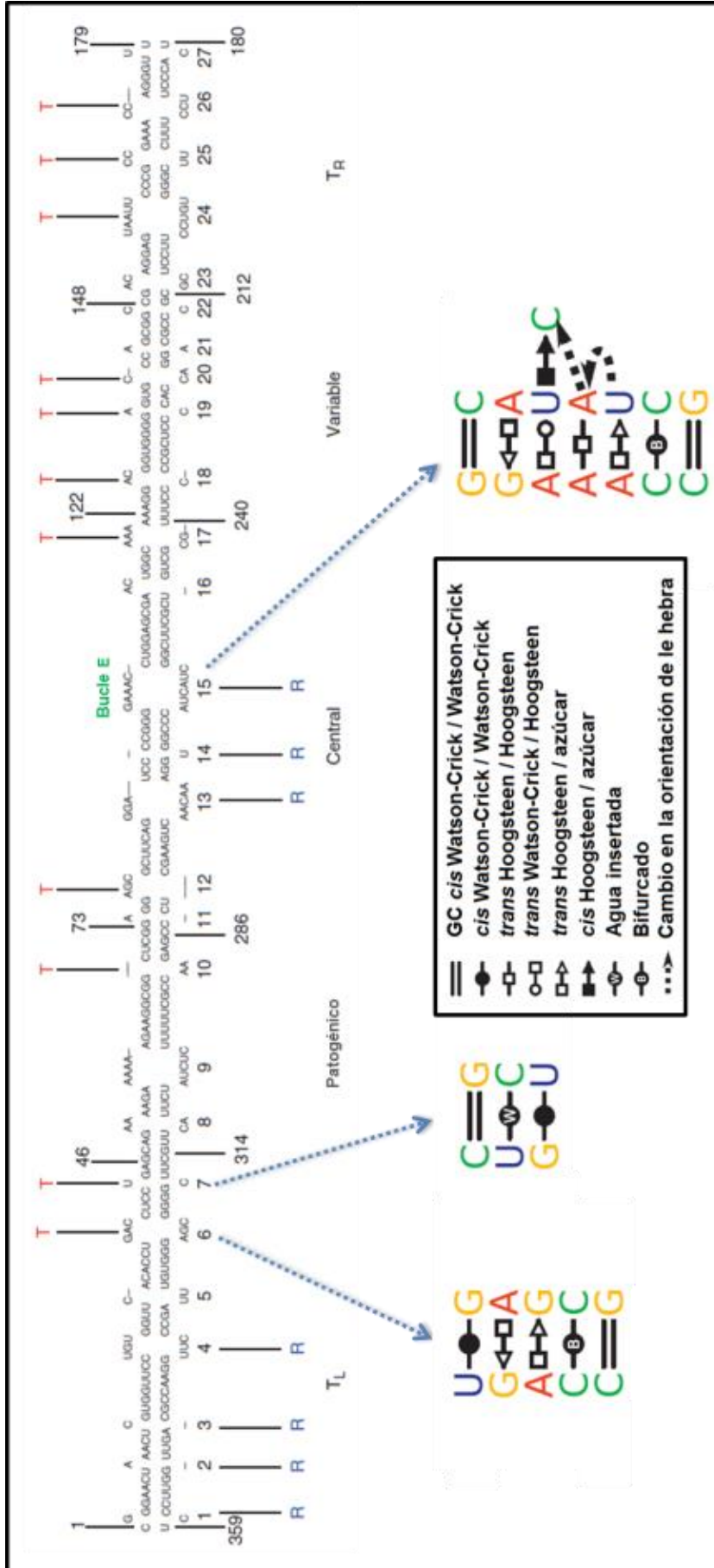


Figura 5. Mapa completo del genoma del PSTVd con los motivos implicados en el tráfico sistémico (T) en la planta o en la replicación del viroide (R) en células de *Nicotiana Benthamiana*. Se indican además los apareamientos no canónicos en el bucle E en el dominio C y en los bucles 6 y 7 en el dominio TL, así como la anotación de los mismos. Figura modificada de Ding *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2012 y Steger y Perrault, 2016.

El dominio TL, además de contener los mencionados bucles 6, 7 y 8, presenta otros motivos destacables en algunos miembros de los géneros *Pospiviroide* y *Apscaviroide*. El primero de ellos es una repetición imperfecta invertida, tanto en la hebra superior como en la inferior, que puede adoptar la típica estructura en varilla (Figura 5) o una estructura en forma de Y con una bifurcación terminal. Sin embargo, la estructura en varilla es más favorable termodinámicamente en el PSTVd (Dingley *et al.*, 2003). Además, en el bucle 1 terminal del dominio TL se encuentra el sitio de inicio de la transcripción de las cadenas de polaridad negativa de este viroide, habiéndose descrito que otros bucles de este dominio se asocian con dos proteínas claves en la replicación (ver apartado 1.4.2) (Kolonko *et al.*, 2006; Bojić *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016).

En el dominio P destaca una región de oligopurinas en la hebra superior, opuesta a otra de oligopirimidinas en la inferior, que se caracteriza por su baja estabilidad termodinámica y se conoce como “premelting región” (Steger *et al.*, 1984). El dominio V se caracteriza por su gran variabilidad de secuencia, incluso entre viroides filogenéticamente cercanos (Keese and Symons, 1985). Por último, en viroides como el CCCVd (Haseloff *et al.*, 1982) y el CEVd (Semancik *et al.*, 1994; Fadda *et al.*, 2003b) se han detectado variantes naturales de mayor tamaño que la más común de longitud unitaria debidas a la presencia de repeticiones en el dominio TR que preservan la estructura en varilla (Steger y Perreault, 2016). También en este dominio existen dos repeticiones de un motivo RY cuya interacción con la proteína de tomate Virp1 (“viroid RNA binding protein”) está asociada al transporte en el huésped de algunos miembros de la familia *Pospiviridae* (Gozmanova *et al.*, 2003; Maniataki *et al.*, 2003; Kalantidis *et al.*, 2007).

1.3.2 Estructura de los miembros de la familia *Avsunviridae*

Los cuatro miembros de la familia *Avsunviridae* adoptan estructuras mucho más diversas que los viroides nucleares. El miembro tipo, ASBVd, posee como característica única un contenido en G+C de apenas el 38% frente al más del 50% que presenta el resto de los viroides. Además su estructura de varilla/cuasi-varilla es similar a la típica de la familia *Pospiviridae*, exceptuando una ramificación en el extremo izquierdo predicha por cálculos termodinámicos (Navarro and Flores 2000). Sin embargo, cálculos similares con el PLMVd (Hernández and Flores, 1992) y el CChMVd (Navarro

and Flores 1997), predicen conformaciones muy ramificadas en la parte derecha de la estructura y algo menos en la izquierda, que son consistentes con los resultados de SHAPE *in vitro* (Giguère *et al.*, 2014a) y con las covariaciones observadas *in vivo* (Ambrós *et al.*, 1998; Ambrós *et al.*, 1999; De la Peña *et al.*, 1999). Esta particular estructura probablemente les otorga la inusual propiedad de ser insolubles en 2M LiCl (Navarro and Flores 1997). Además ambos viroides contienen elementos de estructura terciaria, interacciones entre bucles denominadas “kissing-loops”, que estabilizan su plegamiento (Bussière *et al.*, 2000; Gago *et al.*, 2005). Por último, el viroide latente de la berenjena (ELVd) adopta una estructura intermedia con dos bifurcaciones en ambos extremos de la molécula (Figura 6) (Fadda *et al.*, 2003a).

Existen diferencias estructurales entre las cadenas de ambas polaridades de algunos viroides de esta familia. Por ejemplo, la conformación de las cadenas de polaridad negativa de los CChMVd y ELVd es más ramificada que la de las positivas según los últimos estudios de SHAPE *in vitro* (Giguère *et al.*, 2014a). Esta característica también se ha observado en estudios de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) no desnaturizantes que han mostrado pequeñas diferencias en la migración de las dos cadenas de los PLMVd (Dubé *et al.*, 2010) y ASBVd (Delan-Forino *et al.*, 2014). Se desconoce si estas diferencias entre ambas polaridades tienen importancia en las distintas etapas de su ciclo replicativo, o si aportan alguna ventaja a la cadena de polaridad positiva que es la más abundante.

Los miembros de la familia *Avsunviroidae* no presentan motivos conservados a excepción de los que participan en la formación de las estructuras ribozimáticas de cabeza de martillo. No obstante, en el ASBVd se han caracterizado unos motivos de secuencia, adyacentes a los sitios de inicio de la transcripción en ambas polaridades, que presentan una cierta similitud con promotores de genes cloroplásticos (Navarro y Flores, 2000).

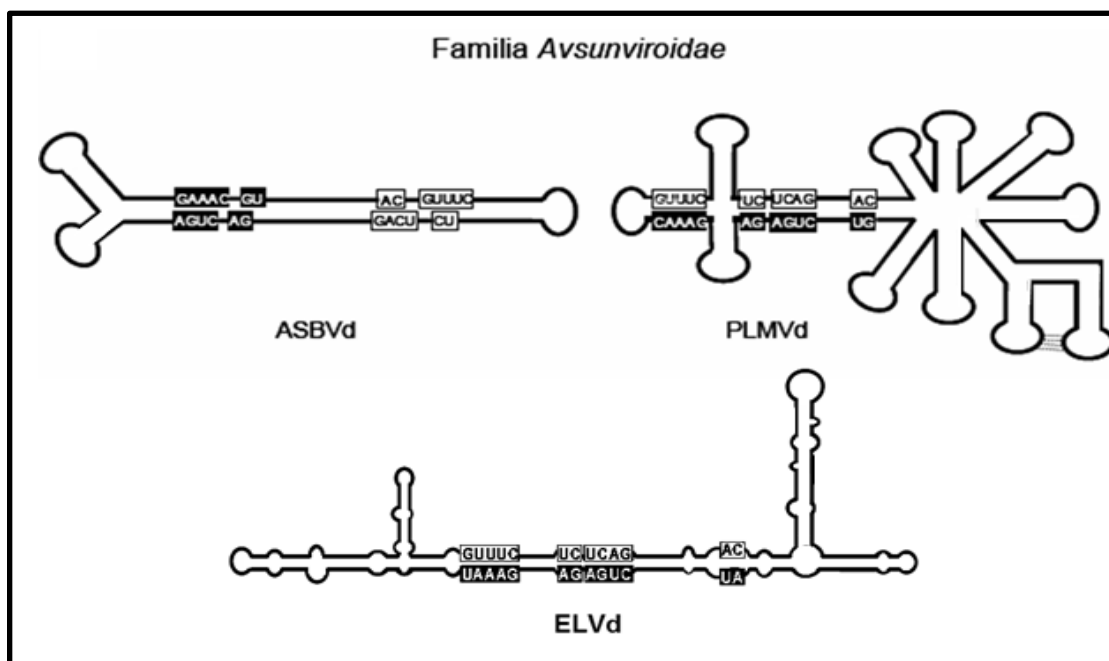


Figura 6. Representación esquemática de las estructuras secundarias de tipo cuasi-varilla, intermedia y ramificada de los ASBVd, ELVd y PLMVd, respectivamente, de la familia *Avsunviroidae*. Los nucleótidos estricta o altamente conservados en las ribozimas de cabeza de martillo naturales aparecen en recuadros con fondo negro y blanco para las polaridades positiva y negativa respectivamente. Una interacción terciaria del tipo “kissing-loops” entre dos bucles apicales del PLMVd se representa con líneas discontinuas.

Se ha observado una alta heterogeneidad de secuencia en el PLMVd (Ambrós *et al.*, 1998 y 1999; Pelchat *et al.*, 2000; Malfitano *et al.*, 2003; Rodio *et al.*, 2006; Fekih Hassen *et al.*, 2007; Yazarlou *et al.*, 2012; Glouzon *et al.*, 2014) y el CChMVd (Navarro y Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999; De la Peña y Flores, 2002), siendo la tasa de mutación del CChMVd la mayor descrita para una entidad biológica (Gago *et al.*, 2009). Esta propiedad posiblemente se debe a que la replicación de estos viroides es en parte catalizada por una RNA polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo (“nuclear encoded polymerase”, NEP) que no presenta actividad correctora de errores (Navarro *et al.*, 2000; Rodio *et al.*, 2007).

La alta variabilidad de secuencia de estos viroides cloroplásticos ha sido aprovechada para confirmar *in vivo* la predicción de sus conformaciones *in silico* e *in vitro*. Se ha observado que la mayoría de los cambios de secuencia ocurren en los bucles o, cuando afectan a las regiones apareadas, son covariaciones o sustituciones de pares Watson-Crick por pares G-U (“wobble”) y vice-versa, que mantienen su estructura secundaria y elementos de la terciaria. Sin embargo, la baja variabilidad de secuencia de

los viroides nucleares (Góra *et al.*, 1994) es insuficiente para confirmar la estructura secundaria de los miembros de esa familia (Flores *et al.*, 2012).

El examen de la variabilidad natural del CChMVd condujo a detectar en la cadena de polaridad positiva una interacción terciaria del tipo “kissing-loops” entre los bucles apicales de dos horquillas de la parte derecha de su estructura (Gago *et al.*, 2005), que recuerda a la propuesta a partir de ensayos *in vitro* para la cadena de polaridad positiva del PLMVd (Figura 6) (Bussière *et al.*, 2000). Estudios de mutagénesis dirigida seguidos de bioensayos y análisis de las progenies resultantes mostraron que si se perturba esta interacción entre bucles del CChMVd su infectividad se reduce o anula, recuperándose al restaurar la misma en un doble mutante. Además, cuando se introducen mutaciones en posiciones adyacentes a este elemento de estructura terciaria se observan reordenamientos que, o bien lo mantienen o que revierten al genotipo silvestre. Por último, un mutante en el que se intercambiaron los ocho nucleótidos que forman dicho elemento (los cuatro de un bucle por los cuatro del otro, manteniéndose la interacción entre ellos) resultó viable, no ocurriendo así con los dos cuádruples mutantes por separado (Gago *et al.*, 2005). De modo paralelo, estudios sobre la importancia de esta interacción terciaria en el PLMVd mostraron que si bien mutantes en los que se interrumpió la misma fueron infecciosos, el genotipo recuperado en la progenie fue el silvestre (Dubé *et al.*, 2010).

Mediante PAGE en condiciones nativas y desnaturalizantes se ha observado que ambos viroides presentan la interacción terciaria entre bucles únicamente en su polaridad positiva (Figura 6) (Gago *et al.*, 2005; Dubé *et al.*, 2010). Por otra parte, el análisis SHAPE *in vitro* sostiene la existencia de esta interacción en el PLMVd, siendo los resultados menos claros en el CChMVd (Dubé *et al.*, 2011; Giguère *et al.*, 2014a). En este contexto conviene indicar que los experimentos de SHAPE *in vitro* van acoplados a predicciones computacionales de las estructuras secundarias, y que la predicción de elementos de estructura terciaria por estos algoritmos es muy compleja y debe ser verificada experimentalmente (Steger y Perreault, 2016). En todo caso, la conservación de dicha interacción en dos viroides de secuencia muy distinta sugiere que tiene un papel fisiológico relevante en estabilizar su conformación tridimensional (Gago *et al.*, 2005), aunque se desconocen los detalles de este papel (Flores *et al.*, 2012).

Utilizando la técnica SHAPE *in vitro* se ha detectado otra interacción terciaria (también del tipo “kissing-loops”) entre el bucle terminal izquierdo de la cadena de

polaridad positiva del PLMVd y el bucle apical de una horquilla de la parte derecha de la estructura del viroide (Dubé *et al.*, 2011; Giguère *et al.*, 2014a), que ya se propuso a partir de las covariaciones presentes en el mismo (Ambrós *et al.*, 1998 y 1999). Además, mediante irradiación con UV, PAGE desnaturalizante, e hibridación northern-blot se ha observado en la cadena de la polaridad positiva del PLMVd otra interacción terciaria entre dos nucleótidos conservados, aunque alejados, en la estructura primaria. Esta interacción también se observa al irradiar con luz UV hojas infectadas con el viroide, indicando que la misma ocurre *in planta* (Hernández *et al.*, 2006). Su papel funcional es desconocido (Hernández *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2012).

Por último, al estudiar la estructura de ASBVd mediante SHAPE *in vitro* algunos autores han predicho una interacción “kissing-loops” entre bucles cercanos a los dos dominios terminales de la cadena de polaridad negativa del mismo (Delan-Forino *et al.* 2014). No obstante, otros autores no han podido confirmar estos resultados empleando la misma metodología (Giguère *et al.*, 2014a).

Las conformaciones del PLMVd y del CChMVd presentan en su parte izquierda un largo tallo (o un motivo cruciforme), con zonas apareadas alternadas con pequeños bucles, donde se encuentran los nucleótidos que forman las ribozimas en cabeza de martillo características de los miembros de la familia *Avsunviroidae* (Figura 6) y, en el caso del PLMVd, los sitios de inicio de la transcripción (ver apartados 1.4.2 y 1.4.3). La estructura secundaria termodinámicamente más estable de algunas variantes del PLMVd presenta en dicho tallo un motivo cruciforme cuya existencia está sostenida *in vitro* por experimentos de SHAPE (Dubé *et al.*, 2011; Giguère *et al.*, 2014a) e *in vivo* por la presencia de covariaciones (Navarro and Flores, 1997; Ambrós *et al.*, 1998, 1999; De la Peña *et al.*, 1999). El CChMVd presenta una A extra-helicoidal que induce una deformación en el motivo cruciforme y que forma parte de la ribozima de polaridad positiva. Esta deformación es relevante para la interacción con otras regiones del RNA o con factores del huésped, ya que la A extra-helicoidal es indispensable para la infectividad del viroide (De la Peña y Flores, 2001).

Las ribozimas de cabeza de martillo de los miembros de la familia *Avsunviroidae*, que tienen un papel imprescindible en su replicación (ver apartado 1.4.3), están formadas por un pequeño motivo de RNA con los nucleótidos centrales conservados y flanqueados por tres segmentos (I, II y III) de doble cadena con bajos requerimientos de secuencia y cerrados por bucles (1, 2 y 3) (Figura 7A). La forma real de las mismas,

según experimentos de cristalografía de rayos X y RMN, es similar a una “Y” deformada y no a una cabeza de martillo como se representan comúnmente (Martick y Scott, 2006; Chi *et al.*, 2008). En esta estructura existen complejos apareamientos no canónicos entre los nucleótidos conservados centrales así como una interacción terciaria entre los bucles de las hélices I y II (Figuras 7B y 7C). Se ha comprobado de forma detallada que esta interacción está mediada por el apareamiento de la pirimidina en 5’ del bucle 1 y la purina en 3’ del bucle 2 (Dufour *et al.*, 2009). Estos elementos tienen un papel importante en el plegamiento y la actividad catalítica de las ribozimas, facilitando la adopción de las conformaciones activas a las bajas concentraciones de Mg^{2+} que existen *in vivo* (De la Peña *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003; Dufour *et al.*, 2009). Por otra parte, cambios en los nucleótidos que componen el núcleo central de las ribozimas no son tolerados muy posiblemente porque afectan a su actividad catalítica y en última instancia a la viabilidad de los viroides. Como ejemplo ilustrativo a este respecto, en un estudio de secuenciación masiva en el que se analizaron en torno a 4000 variantes del PLMVd, no se observó variabilidad alguna en esta parte de las ribozimas (Glouzon *et al.*, 2014).

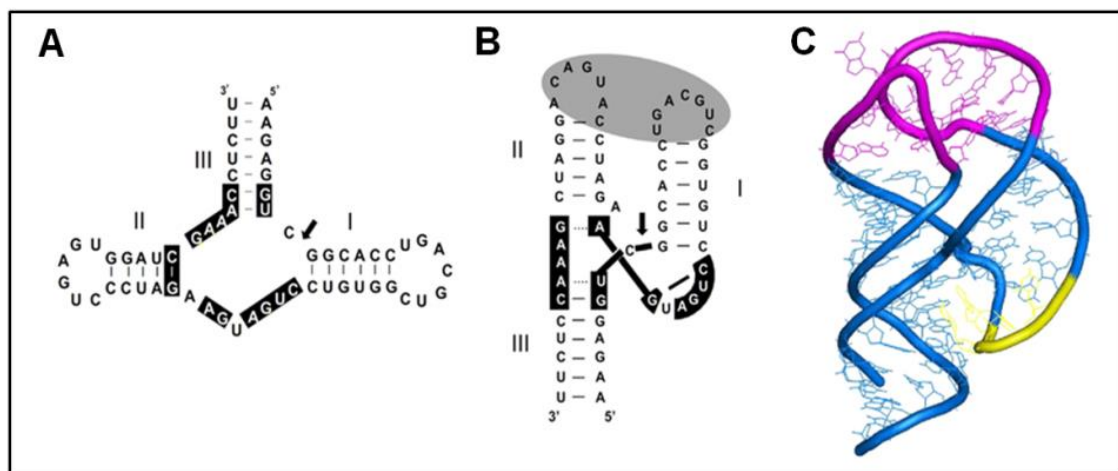


Figura 7. Estructura secundaria y modelo tridimensional propuesto para la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo naturales. (A) Representación esquemática de una estructura típica de cabeza de martillo (la de polaridad positiva del PLMVd) según se formuló originalmente. Los residuos estrictamente o altamente conservados en la mayoría de las ribozimas de cabeza de martillo están representados sobre fondo negro. La flecha marca el sitio de corte y los guiones indican apareamientos de tipo Watson-Crick y G-U (“wobble”). (B) Representación esquemática de la misma estructura de cabeza de martillo de acuerdo con los datos de cristalografía de rayos X y RMN. La interacción terciaria propuesta entre los bucles 1 y 2 que facilita la actividad catalítica *in vivo* se denota con un óvalo gris. Los guiones indican apareamientos de tipo Watson-Crick y G-U (“wobble”), y los puntos interacciones no

canónicas. (C) Modelo detallado 3D de esta estructura de cabeza de martillo que muestra las interacciones entre los bucles 1 y 2 (en magenta). Los nucleótidos con color amarillo forman un elemento local de estructura superior (el giro de uridina). Figura modificada de Flores *et al.*, 2012.

Por último cabe destacar un motivo adicional en el bucle apical izquierdo que se ha observado en algunas variantes del PLMVd. Este motivo consiste en una horquilla terminal extra de 12 -13 nt que acaba con un tetrabucle rico en Us. Su presencia causa la aparición de una clorosis extrema, denominada calico (Malfitano *et al.*, 2003; Rodio *et al.*, 2006 y 2007), por un mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA (Navarro *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2015).

1.4 Replicación

1.4.1 Mecanismo del círculo rodante

La replicación de los viroides mediante un mecanismo de círculo rodante RNA-RNA (Branch and Robertson, 1984; Branch *et al.*, 1988; Feldstein *et al.*, 1998; Daròs *et al.*, 1994; Hutchins *et al.*, 1985; Flores *et al.*, 2011) está basada en la naturaleza circular de su RNA genómico junto a la presencia, en tejidos infectados por miembros de las dos familias, de intermediarios oligoméricos de RNA (Grill y Semancik, 1978), que no de DNA (Branch y Dickson, 1980; Zaitlin *et al.*, 1980).

En el modelo propuesto, el RNA circular monomérico más abundante, al que se le asigna arbitrariamente la polaridad positiva, es reconocido por una RNA polimerasa que genera oligómeros de polaridad negativa tras varios ciclos reiterativos de elongación. Estos oligómeros pueden seguir dos caminos: servir de molde para la síntesis de oligómeros de polaridad positiva, que serán procesados a monómeros lineales y por último a moléculas circulares (variante asimétrica del modelo), o ser cortados y ligados a formas monoméricas circulares que actuarán como molde para la síntesis de oligómeros de polaridad positiva en un segundo círculo rodante (variante simétrica del modelo) (Figura 8). En resumen, la presencia de monómero circular de polaridad negativa indica que la replicación sigue la variante simétrica del modelo de círculo rodante.

Dado que no se ha detectado el RNA monomérico circular de polaridad negativa en plantas infectadas por el PSTVd y otros viroides relacionados, se concluyó que los

miembros de la familia *Pospiviroidae* se replican por la variante asimétrica del modelo (Branch and Robertson, 1984; Branch *et al.*, 1988). Por el contrario, sí se han detectado monómeros circulares negativos en plantas infectadas por miembros de la familia *Avsunviroidae* (Hutchins *et al.*, 1985; Daròs *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 1997; Bussière *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2005). Además, las cadenas de ambas polaridades de los viroides de esta segunda familia poseen ribozimas de cabeza de martillo que catalizan el autocorte de los RNAs oligoméricos a formas de longitud unitaria (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández y Flores, 1992; Navarro y Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a). Estos datos condujeron a concluir que la variante simétrica del modelo es la que opera en la replicación los miembros de la familia *Avsunviroidae*.

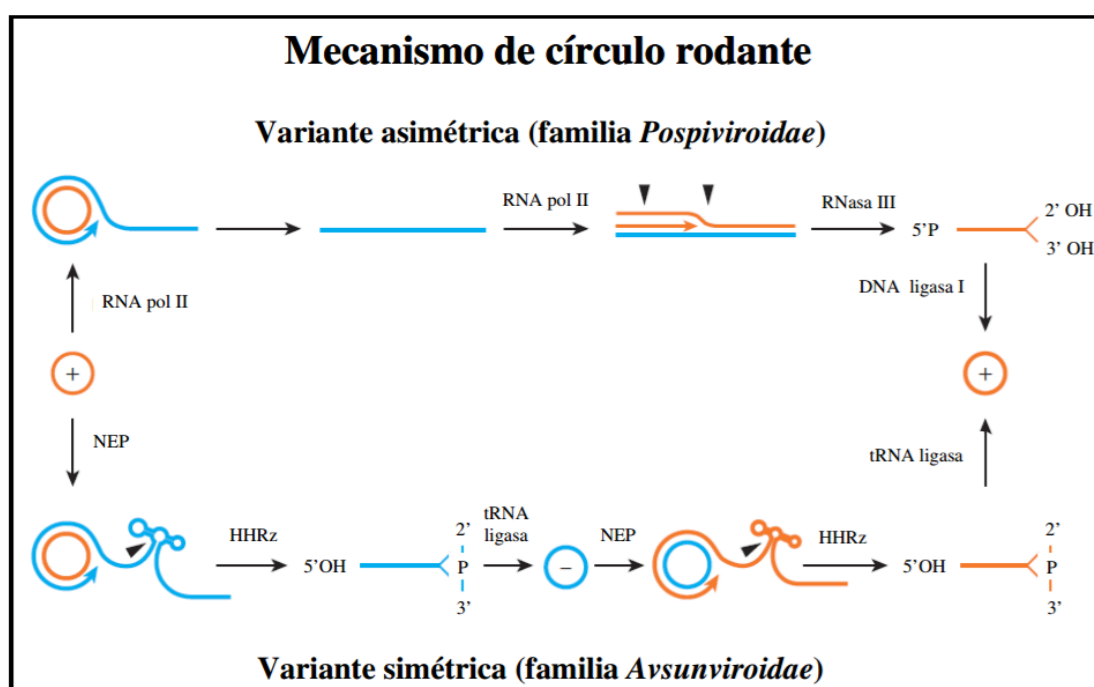


Figura 8. Variantes asimétrica y simétrica del mecanismo del círculo rodante propuesto para la replicación de los miembros de las familias *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, respectivamente. Los colores naranja y azul se refieren a la polaridad positiva y negativa, respectivamente, con los sitios de corte indicados con puntas de flecha. 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 sustratos de RNA. Abreviaturas: HHRz, ribozima de cabeza de martillo (“hammerhead ribozyme”); NEP, RNA polimerasa cloroplástica codificada en el núcleo (“nuclear encoded polymerase”). Figura modificada de Flores *et al.*, 2014.

1.4.2 Transcripción: enzimas y sitios de inicio

La localización subcelular de los viroides, en el núcleo en la familia *Pospiviroidae* y en plastidios (fundamentalmente cloroplastos) en la familia *Avsunviroidae*, condiciona su interacción con factores del huésped y de forma más específica con las enzimas que utilizan para replicarse.

Empleando el inhibidor α -amanitina, varios estudios han concluido que la enzima implicada en la transcripción del PSTVd (Mülbach y Sängner, 1979; Schindler y Mülbach, 1992), el CEVd (Flores y Semancik, 1982; Flores, 1989; Rivera-Bustamante y Semancik, 1989) y el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) (Yoshikawa y Takahashi, 1986), es la RNA polimerasa II (RNA Pol II), a pesar de que en condiciones fisiológicas normales utiliza DNA como molde. Además, se ha observado por inmunoprecipitación que dicha enzima interacciona *in vivo* con las cadenas de ambas polaridades del CEVd (Warrilow and Symons, 1999) y con la de polaridad positiva del PSTVd, particularmente con el dominio TL (Bojić *et al.*, 2012). Recientemente se ha detectado que el factor de transcripción IIIA-7 dedos de zinc (TFIIIA-7ZF), localizado en el nucleoplasma y el nucleolo de *N. benthamiana*, interacciona *in vivo* con la forma monomérica circular de polaridad positiva del PSTVd, y que lo hace *in vitro* con la forma lineal de la misma polaridad en el dominio TL. Además la supresión del TFIIIA-7ZF *in planta* reduce la acumulación del PSTVd y la sobreexpresión la aumenta (Wang *et al.*, 2016). Por otra parte, la proteína Virp1 también se asocia con dos regiones denominadas RY del dominio TR de algunos miembros de la familia *Pospiviroidae* (Gozmanova *et al.*, 2003; Maniataki *et al.*, 2003; Martínez de Alba *et al.*, 2003). Cuando su expresión se suprime en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* tanto el PSTVd como el CEVd son incapaces de infectarlas. Asimismo, el PSTVd no puede replicarse en protoplastos de estas mismas plantas, aunque no se sabe si debido a que la proteína está implicada en la propia replicación o en el movimiento del viroide del citoplasma al núcleo (Kalantidis *et al.*, 2007). Por último, mediante mutagénesis dirigida, se ha observado que la formación del HPII (ver apartado 1.3.1) en los intermediarios de polaridad negativa del PSTVd parece crítica para la síntesis de la cadena de polaridad positiva (Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1995; Schroder and Riesner, 2002).

Dada la naturaleza circular de los viroides y su mecanismo de replicación, cabe pensar que ésta pueda comenzar en distintos sitios de la molécula. Sin embargo, algunos

estudios *in vitro* sugieren que se inicia en sitios específicos. Concretamente, se ha cartografiado el sitio de inicio de la transcripción de las cadenas de polaridad negativa del PSTVd entre los nucleótidos U359 y C1 (Figura 5), localizadas en el bucle terminal izquierdo (bucle 1) de la estructura en varilla (Kolonko *et al.*, 2006). Además, experimentos de mutagénesis dirigida sobre este bucle y los adyacentes sostienen indirectamente esta hipótesis al inhibir la replicación del PSTVd (Zhong *et al.*, 2008). De este modo, la RNA Pol II y el TFIIIA-7ZF se unirían al dominio TL de la forma circular de polaridad positiva del PSTVd iniciando ahí la síntesis de las cadenas de polaridad negativa (Kolonko *et al.*, 2006; Bojić *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). Se desconoce el sitio de inicio de las cadenas de polaridad positiva.

Con respecto a la familia *Avsunviroidae*, tras descartarse la posibilidad de que las RNA Pol II o III nucleares estuvieran implicadas en la replicación (Marcos y Flores, 1992), y conociendo la localización cloroplástica de estos viroides, se consideró que la NEP (ver más arriba) y la RNA polimerasa codificada en el genoma plástido (“plastid encoded polymerase” PEP) eran buenas candidatas para catalizar la transcripción, concluyéndose finalmente que la primera es la enzima responsable de la misma en el ASBVd (Navarro *et al.*, 2000) y el PLMVd (Rodio *et al.*, 2007). También se ha observado que el factor de elongación 1-alpha (eEF1A), implicado en la transcripción y traducción de algunos RNAs virales (Komoda *et al.*, 2014), interacciona con el PLMVd *in vitro*, aunque siendo citoplasmática la localización de este factor, su papel en la replicación es dudoso (Dubé *et al.*, 2009).

En lo que se refiere a los sitios de inicio de la transcripción en los miembros de la familia *Avsunviroidae*, la combinación de experimentos de adición de caperuza *in vitro* con ensayos de protección con ribonucleasas ha permitido cartografiar dichos sitios en las cadenas lineales de ASBVd de polaridad positiva (U121) y negativa (U119) aisladas de tejido infectado (Navarro y Flores, 2000). Ambos sitios están localizados en regiones ricas en A+U, concretamente en el bucle terminal derecho de ambas polaridades del viroide. Además, como ya se ha comentado, en el ASBVd se han caracterizado unos motivos de secuencia adyacentes a los sitios de iniciación de la transcripción de ambas polaridades que presentan una cierta similitud con promotores de genes cloroplásticos (Navarro y Flores, 2000).

También se han cartografiado *in vivo* los sitios de inicio de la transcripción del PLMVd en la C51 y la A286 para las cadenas de polaridad positiva y negativa

respectivamente (Delgado *et al.*, 2005; Motard *et al.*, 2008). Estos sitios de inicio están localizados en la base del largo tallo que forma la parte izquierda de la estructura, justo antes de las ramificaciones en la conformación de la parte derecha. Ambos sitios se encuentran en regiones prácticamente simétricas en las cadenas de ambas polaridades, y muy cercanos a los sitios de autocorte y ligación.

1.4.3 Corte: enzimas y ribozimas

La segunda actividad enzimática requerida en el proceso replicativo de los viroides es una RNasa que catalice el corte de los intermediarios oligoméricos para generar las formas monoméricas lineales.

Aunque se llegó a proponer que los miembros de la familia *Pospiviroidae* podrían tener ribozimas que mediaran esta reacción (Liu y Symons, 1998), estudios sobre procesamiento *in vivo* de dímeros de CEVd han mostrado que la misma está muy probablemente mediada por una RNasa III celular (Daròs y Flores., 2004; Gas *et al.*, 2007). También se concluyó que el HPI (ver apartado 1.3.1) desempeña un papel muy importante en este contexto. Concretamente, en los oligómeros de polaridad positiva del PSTVd, los HPI de dos monómeros consecutivos establecen una interacción de tipo “kissing-loops” entre sus tetrabucles apicales palindrómicos que se propaga generando una estructura imperfecta de doble cadena que es el sustrato genuino para el corte entre las posiciones G95 y G96 de las dos hebras que la forman. Tras el corte, los monómeros resultantes adquirirían la estructura en varilla termodinámicamente más estable que en algunos miembros de la familia *Pospiviroidae* contiene el bucle E (Figura 9). Esta estructura en varilla constituye el sustrato para la ligación (Gas *et al.*, 2007).

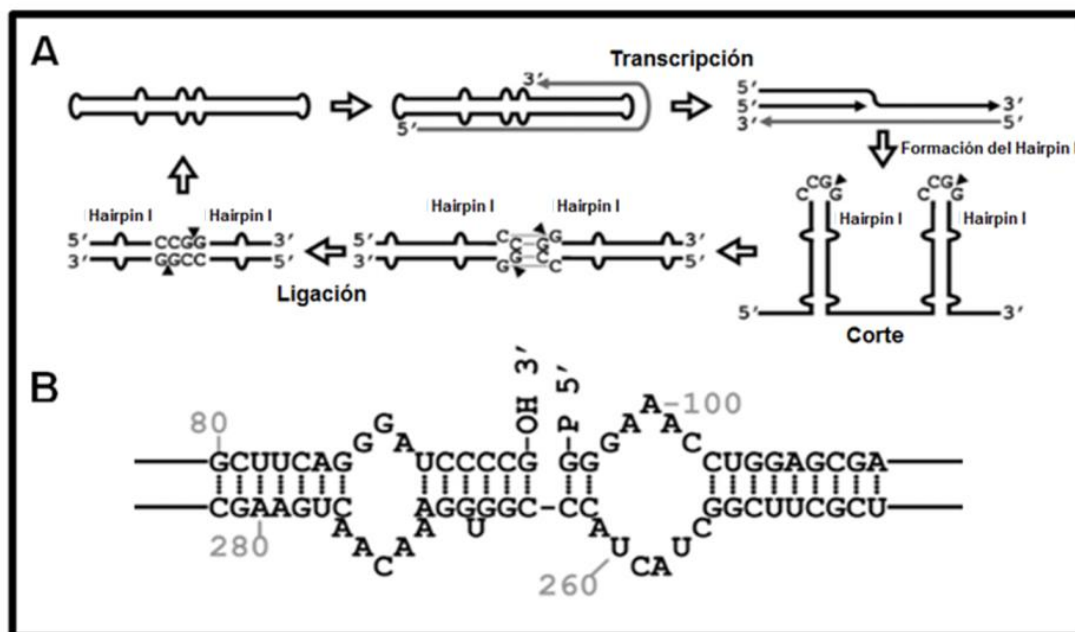


Figura 9. Mecanismo de replicación y procesamiento del PSTVd. (A) Esquema del modelo asimétrico de círculo rodante, incluyendo el mecanismo de procesamiento de los oligómeros de RNA propuesto (Gas *et al.*, 2007 y 2008). Las líneas negras y grises representan las cadenas de polaridad positiva y negativa del PSTVd, respectivamente. Las puntas de flechas negras de los HPI señalan los puntos de corte. (B) Esquema de la CCR del monómero lineal del PSTVd abierto por la RNasa III entre las posiciones G95 y G96, que deja extremos 5' fosfomonoéster y 3' hidroxilo. Figura modificada de Nohales *et al.*, 2012.

Durante la replicación viroidal la actividad de las ribozimas se regula por dos mecanismos para compatibilizar el corte de los oligómeros con la acumulación de los RNA monoméricos circulares, parte de las cuales servirán de molde en sucesivas rondas de replicación. Algunas ribozimas de cabeza de martillo como las del ASBVd son termodinámicamente inestables e ineficientes para mediar el autocorte de los RNAs monoméricos. No sucede así en los oligómeros, donde el autocorte ocurre más eficientemente al formarse una estructura de doble cabeza de martillo (Forster *et al.*, 1988). Por otra parte, los RNAs monoméricos de los PLMVd, CChMVd y ELVd sí que podrían autocortarse eficientemente, por lo que se ha propuesto un segundo mecanismo en el que el plegamiento de las estructuras de cabeza de martillo se vería dificultado porque las secuencias que las forman adoptan otra conformación más estable que impide el autocorte. Así pues, ambos mecanismos proponen dos conformaciones alternativas, la estable que bloquea el autocorte y favorece la ligación de los RNAs monoméricos lineales, y la activa que favorece dicho autocorte (Forster y Symons, 1987; Hernández and Flores, 1992; Flores *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2012). Además,

estudios comparados de los efectos de mutaciones sobre el autocorte durante y después de la transcripción han mostrado que las ribozimas operan tan pronto el RNA naciente adopta su conformación activa, y no una vez se ha completado la síntesis del mismo, siendo éste también un mecanismo regulador (Carbonell *et al.*, 2006).

Por último, las proteínas PARBP33 y PARBP35 de aguacate, están probablemente implicadas en este paso de la replicación del ASBVd. Dichas proteínas pertenecen a una familia cuyos miembros participan en la estabilización, maduración y edición de transcritos cloroplásticos. La primera de ellas, PARBP33, se une *in vivo* al RNA monomérico circular de polaridad positiva del ASBVd y además, *in vitro* y posiblemente *in vivo*, favorece el autocorte ribozimático de transcritos diméricos del ASBVd de la misma polaridad, comportándose así como una chaperona de RNA (Daròs y Flores, 2002).

1.4.4 Ligación: RNA y DNA ligasas

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.

Dado que en la familia *Pospiviroidae* la RNasa III deja extremos 5' fosfomonoéster y 3' hidroxilo al procesar los oligómeros (Figura 9), la enzima responsable de la circularización debería ser capaz de reconocer estos extremos. Experimentos de ligación *in vitro* de RNAs monoméricos lineales de PSTVd con fracciones cromatográficas de proteínas de tomate y de espectrometría de masas de las mismas revelaron que la proteína responsable de la circularización es la DNA ligasa I (Nohales *et al.*, 2012). Por lo tanto, los miembros de esta familia utilizan enzimas del huésped en todos los pasos de su replicación, siendo de destacar su capacidad de modificar la especificidad de molde de la RNA polimerasa II y de sustrato de la DNA ligasa I.

En los miembros de la familia *Avsunviroidae* también son mayoritarios los datos a favor de que la ligación es catalizada por una enzima del huésped (Reid y Lazinski, 2000; Delgado *et al.*, 2005; Rodio *et al.*, 2007). Ensayos de ligación *in vitro* han concluido que una tRNA ligasa de berenjena con un péptido de tránsito que la dirige al cloroplasto, reconoce los extremos 5'-hidroxilo y 2',3'-fosfodiéster cíclico de los RNAs monoméricos lineales de ambas polaridades procedentes de autocorte y cataliza su

circularización (Nohales *et al.*, 2012). Así pues los RNAs oligoméricos generados en la replicación de los miembros de la familia *Avsunviroidae*, si bien se autocortan por ribozimas contenidas en sus cadenas, dependen de enzimas del huésped en los otros dos pasos de la replicación.

1.5 Biología de los viroides: aspectos generales

Los viroides infectan plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, tanto herbáceas como leñosas, algunas de ellas de gran valor económico. La gama de huéspedes de los miembros de la familia *Pospiviroidae* es en general relativamente amplia, mientras que la de los miembros de la familia *Avsunviroidae* se limita esencialmente a los huéspedes naturales en los que fueron descritos inicialmente (Flores *et al.*, 2005). Entre los síntomas asociados a infecciones viroidales destacan el enanismo de la planta, epinastia, distorsiones, clorosis y necrosis de las hojas, necrosis, malformaciones y decoloraciones de los frutos, agrietamientos de corteza y tallo, alteraciones en el color de los pétalos de las flores, y malformaciones en las semillas y órganos de reserva.

La transmisión de los viroides se produce a corta distancia de forma mecánica en la mayoría de los huéspedes (Wah y Symons, 1999; Timmermann *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2005), y a larga distancia por propagación de material infectado y para algunos viroides como el ASBVd (Wallace Drake, 1962), y en menor medida el PSTVd (Singh *et al.*, 1991), por semilla y polen.

Una vez han penetrado en las primeras células del huésped, los viroides deben translocarse al orgánulo correspondiente para su replicación volviendo su progenie al citoplasma para moverse a las células vecinas, invadir el tejido vascular y alcanzar sistémicamente partes distales de la planta.

El sitio de localización subcelular de los miembros de la familia *Pospiviroidae* se estudió inicialmente mediante centrifugación diferencial, observándose la acumulación del PSTVd y viroides similares fundamentalmente en el núcleo (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 detectaron la polaridad positiva del PSTVd en el nucleolo y el nucleoplasma, y la negativa s3lo en el nucleoplasma (Harders *et al.*, 1989; Qi y Ding, 2003b). Los miembros de la familia *Avsunviroidae* se acumulan en el cloroplasto de células infectadas, como se deriva de estudios con el ASBVd (Mohamed y Thomas, 1980;

Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1999) y el PLMVd (Bussière *et al.*, 1999).

El PSTVd es capaz de transportar un RNA fusionado del citoplasma al núcleo (Zhao *et al.*, 2001), lo que sugiere que tiene una señal de transporte nuclear todavía sin identificar. El mecanismo por el cual los miembros de la familia *Avsunviroidae* alcanzan el cloroplasto se desconoce, aunque se ha propuesto un mecanismo selectivo de transporte del ELVd a dicho orgánulo a través de una etapa previa en el núcleo (Gómez y Pall s, 2012). Por otro lado, el movimiento de los viroides célula a célula se produce, muy probablemente, a través de los plasmodesmos (Ding *et al.*, 1997; Di Serio y Flores, 2008). Estudios de mutagénesis han permitido cartografiar hasta 11 bucles en la estructura del PSTVd con un papel crítico en el tráfico sistémico en plantas de *N. benthamiana*, siendo el bucle 6 el que parece más importante en el transporte del mesófilo en empalizada al esponjoso (Figura 5) (Zhong *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2011). También se ha mostrado que existe un motivo bipartido, que comprende algunos nucleótidos localizados alrededor de los bucles 7 y 8, y uno del bucle 24, necesario para el transporte del PSTVd de la vaina del haz al mesófilo en hojas de tabaco (Qi *et al.*, 2004). El movimiento sistémico de los viroides parece ocurrir a través del floema, por donde viajan junto a los fotoasimilados hasta diferentes tejidos u órganos sumideros (Palukaitis, 1987; Zhu *et al.*, 2001). Se ha observado que el bucle 7 del PSTVd est  directamente implicado en su entrada al floema desde el tejido no vascular (Zhong *et al.*, 2007). Por último, es probable que proteínas del huésped regulen el tráfico viroidal en forma de complejos ribonucleoproteicos (Gómez y Pall s 2001; Owens *et al.*, 2001; Gómez y Pallas 2004). Como ya se ha mencionado, la proteína Virp1 parece implicada en el movimiento del PSTVd (Gozmanova *et al.*, 2003; Maniataki *et al.*, 2003; Martínez de Alba *et al.*, 2003; Kalantidis *et al.*, 2007).

2. Viroides objeto de estudio

2.1 El viroide latente de la berenjena (ELVd)

Este viroide fue descubierto en plantas de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. ‘Sonja’) durante una prospección para detectar pequeños RNAs infecciosos en cultivos del este de España (Fagoaga *et al.*, 1994). Cuando se inocula el ELVd en plantas de berenjena, éste se replica pero no produce síntomas (Fadda *et al.*, 2003a). Seguramente debido a esta falta de síntomas no ha sido descrito en otras áreas del mundo. Tampoco se ha logrado infectar otras especies con este viroide (Fagoaga *et al.*, 1994), mostrando por tanto una gama de huéspedes muy restringida como parece suceder con los otros viroides cloroplásticos (Flores *et al.*, 2000).

El ELVd es la especie tipo del género *Elaviroid* (Fadda *et al.*, 2003a) dentro de la familia *Avsunviroidae*. Su secuencia de referencia es la de la variante 2 de 333 nt, existiendo en las bases de datos (hasta el inicio de este trabajo) otras nueve variantes de 332 a 335 nt con cambios puntuales de secuencia (Fadda *et al.*, 2003a; Daròs, 2016). El ELVd adopta una estructura secundaria de tipo cuasi-varilla con bifurcaciones en los extremos (Figura 10), presenta una gran variabilidad nucleotídica compatible con esta estructura, y puede formar ribozimas de cabeza de martillo en las cadenas de ambas polaridades (Fadda *et al.*, 2003a).



Figura 10. Estructura secundaria de mínima energía libre propuesta para la variante de referencia ELVd-2 (Fadda *et al.*, 2003a). Los banderines delimitan las estructuras de cabeza de martillo de ambas polaridades, los nucleótidos conservados en la mayoría de las ribozimas naturales de esta clase se destacan mediante cajas, y los sitios de autocorte se indican con flechas. Los símbolos con fondo negro y blanco denotan la polaridad positiva y negativa, respectivamente.

2.2 El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd)

A pesar de que la enfermedad del tubérculo fusiforme de la patata fue inicialmente descrita en Estados Unidos por Martin (1922), no fue hasta casi cincuenta años más tarde cuando se obtuvieron los primeros indicios sobre la naturaleza atípica de su agente causal (Diener y Raymer, 1967).

Esta enfermedad se ha detectado en muchas partes del mundo, aunque 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). Dichas medidas han conducido a que Estados Unidos y la Unión Europea hayan sido declaradas libres de este viroide (Owens, 2007).

El PSTVd produce sensibles pérdidas económicas (Randles, 2003) y su gama de huéspedes naturales es amplia, ya que infecta varias especies de la familia *Solanaceae* que incluyen patata y tomate, pepino (*Cucurbitaceae*), aguacate (*Lauraceae*) y algunas ornamentales (en éstas últimas sin síntomas), así como especies de la familia *Convolvulaceae*. Experimentalmente también infecta especies de las familias *Compositae*, *Boraginaceae*, *Campanulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Convolvulaceae*, *Dipsacaceae*, *Sapindaceae*, *Scrophulariaceae* y *Valerianaceae* (Singh *et al.*, 2003b). El síntoma más característico en patata es la deformación de los tubérculos, que adoptan una apariencia ahusada (Figura 11A) y además presentan ojos prominentes (Diener, 1979).

Como huéspedes experimentales se utilizan tomate, *N. benthamiana*, tabaco y berenjena, donde el PSTVd provoca retardos en el crecimiento y epinastia de las hojas (Figuras 11B, 11C y 11D). El segundo de estos huéspedes es muy útil para experimentos de expresión transitoria de secuencias viroidales mediante agroinfiltración.

Con un genoma de predominantemente 359 nt, el PSTVd 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 es de tipo varilla (Figura 5) y existen más de 300 variantes de secuencia de distintos aislados depositadas en las bases de datos, algunas de las cuales se han caracterizado biológicamente (Gross *et al.*, 1978; Hammond y Owens, 1987; Lakshman y Tavantzis, 1993; Gruner *et al.*, 1995; Kastal'eva *et al.*, 2013; Vachev *et al.*, 2014; Tsushima *et al.*, 2016). En el presente trabajo se ha utilizado la variante PSTVd-NB,

que se acumula a niveles altos en plantas de *N. benthamiana* y de tabaco (Qi *et al.*, 2004).

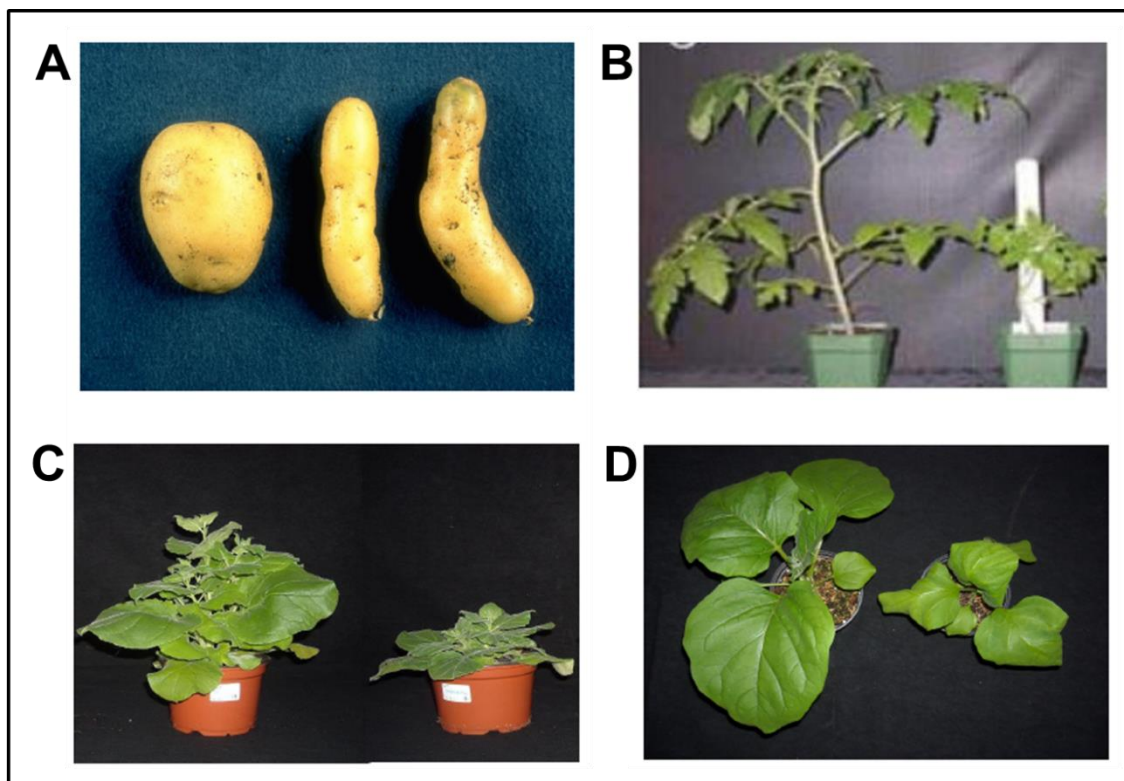


Figura 11. Sintomatología del viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd). (A) Tubérculos deformados (derecha) y control sano (izquierda). (B, C y D) Tomate cv. 'Rutgers', *N. benthamiana* y berenjena cv. 'Black beauty', respectivamente, en los que se observa enanismo y epinastia de las hojas (derecha) comparados con los controles sanos (izquierda).

2.3 El viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd)

El manchado solar del aguacate fue inicialmente descrito por Coit (1928), pero su agente causal se descubrió bastante más tarde por Palukaitis *et al.* (1979). Es una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas y que se ha detectado en países de todo el mundo (Saucedo-Carabez *et al.*, 2014). El único hospedante natural del ASBVd es el aguacate, aunque ha sido transmitido experimentalmente a alguna otra especie de la familia *Lauraceae* a la que éste pertenece (Da Graça y Van Vuuren, 1980).

Los síntomas causados por el ASBVd se expresan en diferentes órganos y están asociados a distintas variantes de mismo. Incluyen deformaciones y alteraciones cloróticas en las hojas, estrías en el tallo, y frutos con depresiones crateriformes

amarillentas (Figura 12A) o rosadas que pueden cubrir la mayor parte de su superficie (Semancik, y Szychowski, 1994), disminuyendo así su valor comercial.

El ASBVd está compuesto por 247 nucleótidos (Symons, 1981) que forman una estructura secundaria en forma de varilla o de cuasi-varilla con una posible bifurcación en un extremo (Figura 12B). Es uno de los dos viroides de menor tamaño y el único con una composición de bases predominante en A+U. Sus cadenas de ambas polaridades pueden formar ribozimas de cabeza de martillo (Hutchins *et al.*, 1986) que desempeñan un papel clave en la replicación (Daròs *et al.*, 1994; Navarro y Flores, 2000). Actualmente hay más de 100 variantes de secuencia depositadas en las bases de datos. En el presente trabajo se ha utilizado una variante que alcanza *in planta* concentraciones similares a la del 5S rRNA y que difiere de la variante de referencia (Symons, 1981) en tan solo una sustitución (C213>U).

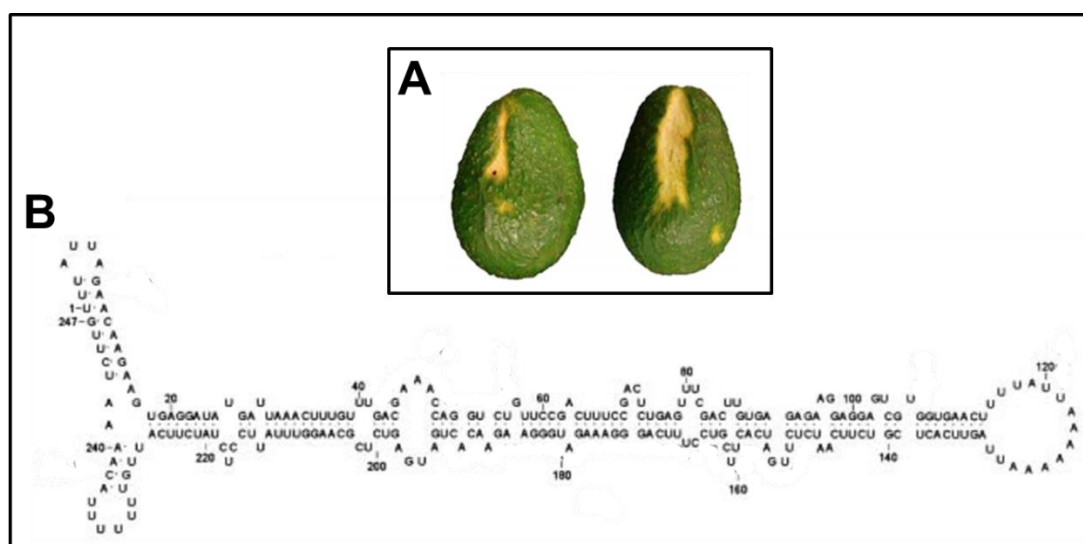


Figura 12. Viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd). (A) Sintomatología inducida en frutos de aguacate: depresiones crateriformes amarillentas. Figura modificada de Saucedo-Carabez *et al.*, 2014. (B) Estructura secundaria de mínima energía libre predicha para el ASBVd. Figura modificada de Navarro y Flores, 2000.

Objetivos

En contraste con los numerosos trabajos sobre la estructura secundaria de los viroides *in silico* e *in vitro*, son muy pocos los que han examinado (y tan solo de manera parcial) la conformación que adquieren estos RNAs en su hábitat natural, donde pueden interaccionar con proteínas u otros factores del huésped.

Para rellenar esta laguna, en la presente Tesis Doctoral se han planteado los objetivos específicos siguientes:

1. Estudiar la estructura de las formas monoméricas de los ELVd RNAs de ambas polaridades mediante tres metodologías: *in silico* realizando predicciones de la estructura secundaria con menor energía libre, *in vitro* aplicando la técnica SHAPE y PAGE no desnaturalizante, e *in vivo* analizando variantes naturales de secuencia que preserven su conformación
2. Diseccionar la estructura de las formas monoméricas circulares (*mc*) de polaridad positiva de los PSTVd y ASBVd RNAs de tres maneras: *in silico* e *in vitro* utilizando las mismas metodologías que en el caso anterior, e *in vivo* aplicando la técnica SHAPE sobre tejido vegetal infectado
3. Extender los análisis *in silico* e *in vitro* al *mc* de polaridad negativa del ASBVd RNA
4. Analizar e interpretar las diferencias entre las conformaciones que adquieren *in silico*, *in vitro* e *in vivo* los RNAs viroidales estudiados

Capítulo I

The transcription initiation sites of eggplant latent viroid strands map within distinct motifs in their *in vivo* RNA conformations

Amparo López-Carrasco^a, Selma Gago-Zachert^b, Giuseppe Miletì^a, Sofia Minoia^a, Ricardo Flores^a, and Sonia Delgado^a

^aInstituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain;

^bDepartment of Molecular Signal Processing, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle (Saale), Germany

RNA Biology 2016; 13(1): 83-97.

doi: 10.1080/15476286.2015.1119365.

Nota: Los experimentos correspondientes a las dos últimas secciones de Resultados fueron realizados por otro miembro del laboratorio

ABSTRACT

Eggplant latent viroid (ELVd), like other members of family *Avsunviroidae*, replicates in plastids through a symmetric rolling-circle mechanism in which elongation of RNA strands is most likely catalyzed by a nuclear-encoded polymerase (NEP) translocated to plastids. Here we have addressed where NEP initiates transcription of viroid strands. Because this step is presumably directed by sequence/structural motifs, we have previously determined the conformation of the monomeric linear (+) and (-) RNAs of ELVd resulting from hammerhead-mediated self-cleavage. *In silico* predictions with 3 softwares led to similar bifurcated conformations for both ELVd strands. *In vitro* examination by non-denaturing PAGE showed that they migrate as prominent single bands, with the ELVd (+) RNA displaying a more compact conformation as revealed by its faster electrophoretic mobility. *In vitro* SHAPE analysis corroborated the ELVd conformations derived from thermodynamics-based predictions *in silico*. Moreover, sequence analysis of 94 full-length natural ELVd variants disclosed co-variations, and mutations converting canonical into wobble pairs or vice versa, which confirmed *in vivo* most of the stems predicted *in silico* and *in vitro*, and additionally helped to introduce minor structural refinements. Therefore, results from the 3 experimental approaches were essentially consistent among themselves. Application to RNA preparations from ELVd-infected tissue of RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends, combined with pretreatments to modify the 5' ends of viroid strands, mapped the transcription initiation sites of ELVd (+) and (-) strands *in vivo* at different sequence/structural motifs, in contrast with the situation previously observed in 2 other members of the family *Avsunviroidae*.

ABBREVIATIONS

ASBVd, avocado sunblotch viroid; PLMVd, peach latent mosaic viroid; CChMVd, chrysanthemum chlorotic mottle viroid; ELVd, eggplant latent viroid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SHAPE, selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension

INTRODUCTION

Having just a circular RNA genome of minimal size (ca. 250–400 nt) without protein coding ability, viroids rely exclusively on sequence and structural motifs for being recognized, replicated and spread in their host plants, as well as for circumventing the defensive response they mount.¹⁻⁶ These sequence and structural motifs are embedded in compact secondary structures —adopted by viroid genomes as a consequence of their extensive self-complementarity— in which double-stranded segments are flanked by seemingly disordered loops.^{7,8} Therefore, determining the structure of viroid genomic RNAs is important for getting insights into how they may determine function. This aim was pursued since the very beginning with potato spindle tuber viroid (PSTVd), the first viroid discovered⁹ and sequenced (by direct RNA sequencing).¹⁰ Searching the conformation with maximal base-pairing, and *in vitro* probing with RNases and bisulphite resulted in a rod-like secondary structure for PSTVd RNA,^{10,11} in consonance with thermodynamics based predictions^{12,13} and electron microscopy observations.^{12,14} The rod-like secondary structure proposed for PSTVd appears characteristic, although with some exception,^{15,16} of members of the family *Pospiviroidae*, which as additional features show replication in the nucleus through an asymmetric rolling-circle mechanism without hammerhead ribozymes.¹⁷ However, the rod-like structure is the exception rather than the rule in the family *Avsunviroidae*, which clusters viroids replicating in plastids through a symmetric rolling-circle mechanism mediated by hammerhead ribozymes.¹⁸ Particularly notorious are peach latent mosaic viroid (PLMVd)¹⁹ and chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd),²⁰ for which multibranched most-stable conformations were predicted, and eggplant latent viroid (ELVd), with a predicted secondary structure containing 2 bifurcations.²¹

Examination of viroid RNA structure can be tackled essentially with 3 approaches. First, *in silico*, with algorithms searching for the secondary structures of minimal free energy,²²⁻²⁵ a relatively simple methodology that provides a first candidate structure(s). Second, *in vitro*, by probing in solution with RNases and bisulphite^{10,26} and, more recently, by selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE), which interrogates local backbone RNA flexibility at single-nucleotide resolution²⁷⁻²⁹ and facilitates coupling the data to computer-assisted prediction.³⁰ And, third, *in vivo*, by looking for sequence heterogeneity in natural variants of the same or

homologous RNAs, particularly for co-variations that preserve double-stranded stems,^{21,31-34} or substitutions that do not alter the shape of loops according to isostericity matrices that predict recurrent 3-dimensional motifs more conserved in structure (the spatial arrangement their nucleotides adopt) than in sequence.^{35,36} When sufficient natural variability is available —as it happens in the family *Avsunviroidae* due to an extremely high mutation rate—³⁷ the *in vivo* approaches are amenable and serve to validate or refine candidate structures obtained by the other 2 approaches, or even to propose new ones. For instance, PLMVd variability supports the existence of 2 alternative structures involving nucleotides from the so-called hammerhead arm of the (+) strand, one extended and the other cruciform;^{33,38} and subsequent SHAPE probing is consistent with these structures.³⁹ On the other hand, co-variations between sequence variants of the same viroid⁴⁰ and between different viroids support the conservation of the metastable motifs hairpin I within the family *Pospiviroidae*,^{41,42} and hairpin II within the genus *Pospiviroid*.⁴³ These 2 motifs, initially described in thermal denaturation analyses,¹³ have been associated with important functional roles.^{43,44-46}

One aspect on which viroid structure most likely plays a critical role is in transcription. This first replication step is catalyzed in the family *Avsunviroidae* by a nuclear-encoded RNA polymerase (NEP) translocated into chloroplasts.^{47,48} There is evidence for 2 members of this family indicating that NEP starts transcription at specific sites located in: i) (A+U)-rich terminal loops in the rod-like secondary structure adopted by both polarity strands of avocado sunblotch viroid (ASBVd),⁴⁹ and ii) short double-stranded RNA stems in both polarity strands of PLMVd that also include the hammerhead self-cleavage sites.^{50,51} These results exemplify that 2 distinct sequence/structural motifs may have similar functional roles, as well as that one single motif may act in more than one function (initiation and self-cleavage of PLMVd RNAs). Moreover, because RNA folding occurs during transcription,⁵² the initiation sites of nascent viroid strands may affect the adoption of transient, albeit functionally relevant metastable structures, like the hammerhead structures,⁵⁰ hairpins I and II¹³ and tertiary loop-loop interactions.^{26,53} There is evidence indicating that, at least *in vitro*, this is indeed the case with some of these metastable structures.⁵⁴

Here we have determined the initiation sites of the ELVd (+) RNA (by convention the strand accumulating to higher levels in infected tissue) and of its complementary (-) counterpart. Examination of where these sites map in the secondary structure of ELVd

(+) and (-) RNAs obtained by a combination of *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches, has revealed that they are neither within nor flanked by conserved sequence/structural motifs, thus showing the versatility of eggplant NEP (or some associated transcription factor) in template binding and subsequent transcription initiation.

RESULTS

***In silico* predictions lead predominantly to similar bifurcated conformations for ELVd (+) and (-) strands**

In the first report on the molecular properties of ELVd, application of the *Mfold* software for RNA folding²² to the (+) strand of 4 representative variants of this viroid generated a quasi-rod-like conformation with 68–70% of the residues paired — including those corresponding to the hammerhead ribozymes of both polarities that appear faced each other in the central domain— and bifurcations at both terminal domains.²¹ Moreover, within a 10% interval of minimal free energy, none of the predicted secondary structures were of the rod-like class typical of the family *Pospiviroidae*.²¹ Re-examination of this question with a more recent version of the software²³ resulted in the same conformation (Figure 1A, structure 1+), plus 3 other less stable structures with slightly different right terminal bifurcations, while 2 alternative softwares, *RNAfold*²⁴ and *RNAstructure*,²⁵ produced the most stable structure of *Mfold* or/and 2 other conformations with minor modifications also affecting the right terminal bifurcation (Figure 1A, structures 2+ and 3+). Regarding the ELVd (-) strand, the 3 softwares predicted a bifurcated conformation for the reference variant ELVd-2²¹ mimicking that of the (+) strand (Figure 1B, structure 2-), with *RNAstructure* additionally predicting a slightly more stable conformation with a small cruciform motif in the central domain (Figure 1B, structure 1-). Besides these 2 most stable structures, *Mfold* and *RNAstructure* generated variations thereof with small differences.

In summary, thermodynamics-based predictions were consistent among the 3 approaches, leading to similar bifurcated conformations (or variations thereof) for both ELVd strands.

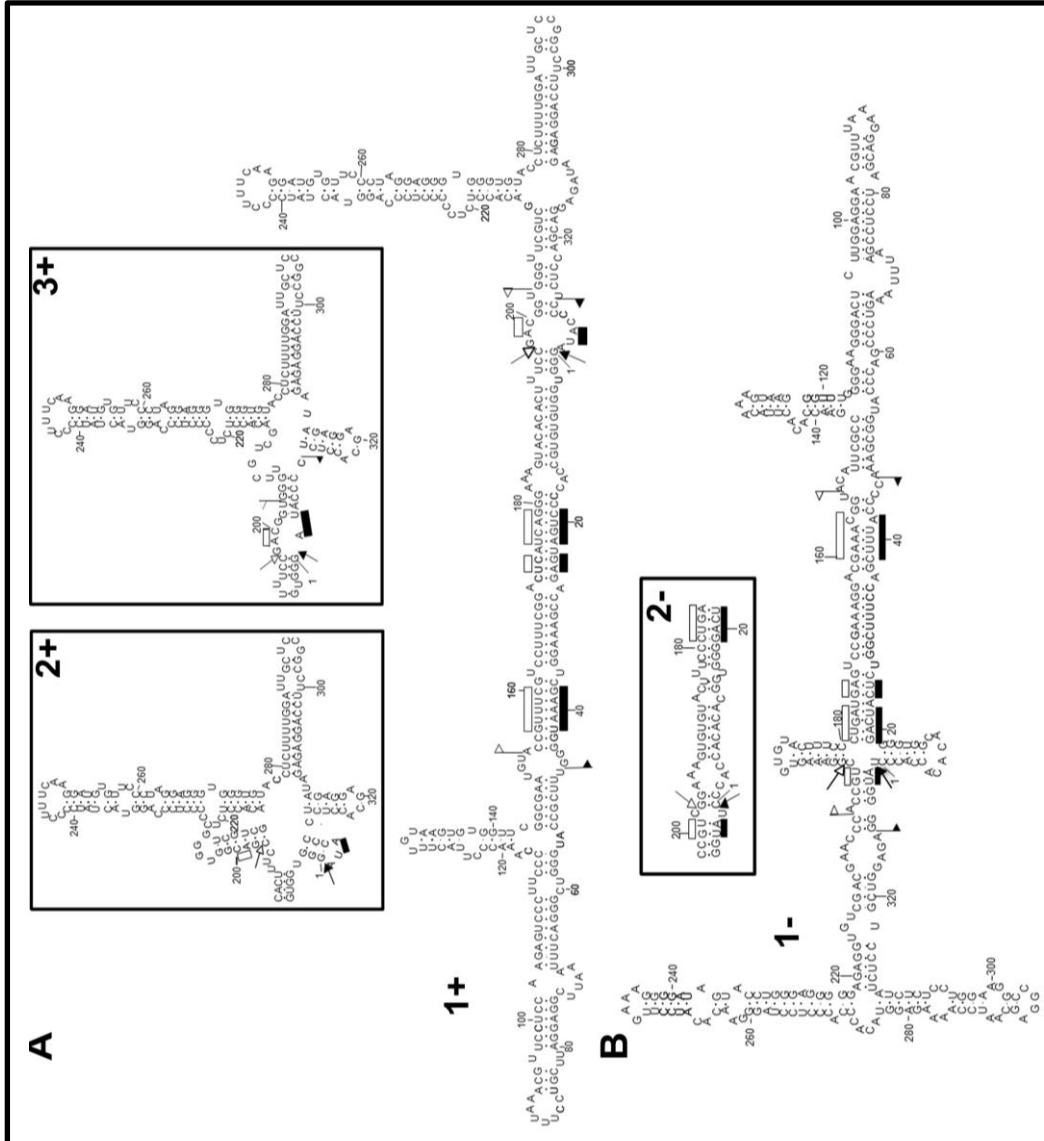


Figure 1. Conformations of minimum free energy predicted for both strands of ELVd (reference variant). (A) Structure 1+ generated for ELVd (+) RNA by the *Mfold* and *RNAstructure* softwares for RNA folding. *RNAstructure* and *RNAfold* additionally produced structures 2+ and 3+ with minor modifications affecting the right terminal bifurcation (insets). (B) Structure 2- generated for ELVd (-) RNA by the 3 softwares. *RNAstructure* additionally produced structure 1- with a small cruciform motif in the central domain. Sequences forming the hammerhead structures are delimited by flags, motifs conserved in natural hammerhead structures are denoted by bars, and self-cleavage sites are marked by arrows. Solid and open symbols refer to plus and minus polarities, respectively. The same numbers are used for both polarities.

Non-denaturing PAGE shows differences between the secondary structures adopted *in vitro* by ELVd (+) and (-) RNAs

Next we examined if, despite the close similarity of the bifurcated conformations predicted *in silico* for both ELVd strands, a physical distinction between them could be established *in vitro*. To this end, the monomeric linear (+) and (-) forms of ELVd resulting from hammerhead-mediated self-cleavage *in vitro* of their corresponding dimeric transcripts were analyzed by non-denaturing PAGE. Prior to electrophoresis, 2 aliquots of each gel-eluted RNAs were heated at 98°C for 2 min and either snap-cooled on ice or gradually-cooled at 25°C along 15 min, with a third aliquot remaining untreated serving as control. Three other aliquots of the 2 gel-eluted RNAs were treated similarly, but in the presence of 5 mM Mg²⁺. The treatments did not affect the electrophoretic mobility of ELVd RNAs, although the presence of Mg²⁺ led to an attenuation of the signal of those samples heated at 98°C, most likely resulting from RNA degradation catalyzed by this cation (Figure 2A). Two additional observations are worthy of note: i) both ELVd strands migrated as prominent single bands accompanied by close satellite bands of much lower intensity, and ii) compared with the size markers, the ELVd (+) RNA displayed faster mobility than its (-) counterpart. This latter observation was confirmed by co-electrophoresis of mixed aliquots applied to the same well in the presence and absence of Mg²⁺ (Figure 2B).

Altogether these results indicated that each ELVd strand adopts one dominant conformation (or a set of closely-related conformations not separable individually by PAGE), with that of the (+) strand being comparatively more compact. The lack of detectable Mg²⁺ effects does not support the existence of tertiary interactions like the kissing-loops present in PLMVd and CChMVd (see below). Moreover, in contrast with these 2 viroid RNAs that are insoluble in 2 M LiCl as a likely consequence of their multibranching conformations,²⁰ ELVd (+) and (-) RNAs were soluble under these high-salt conditions (data not shown), thus suggesting that they fold into less complex structures.

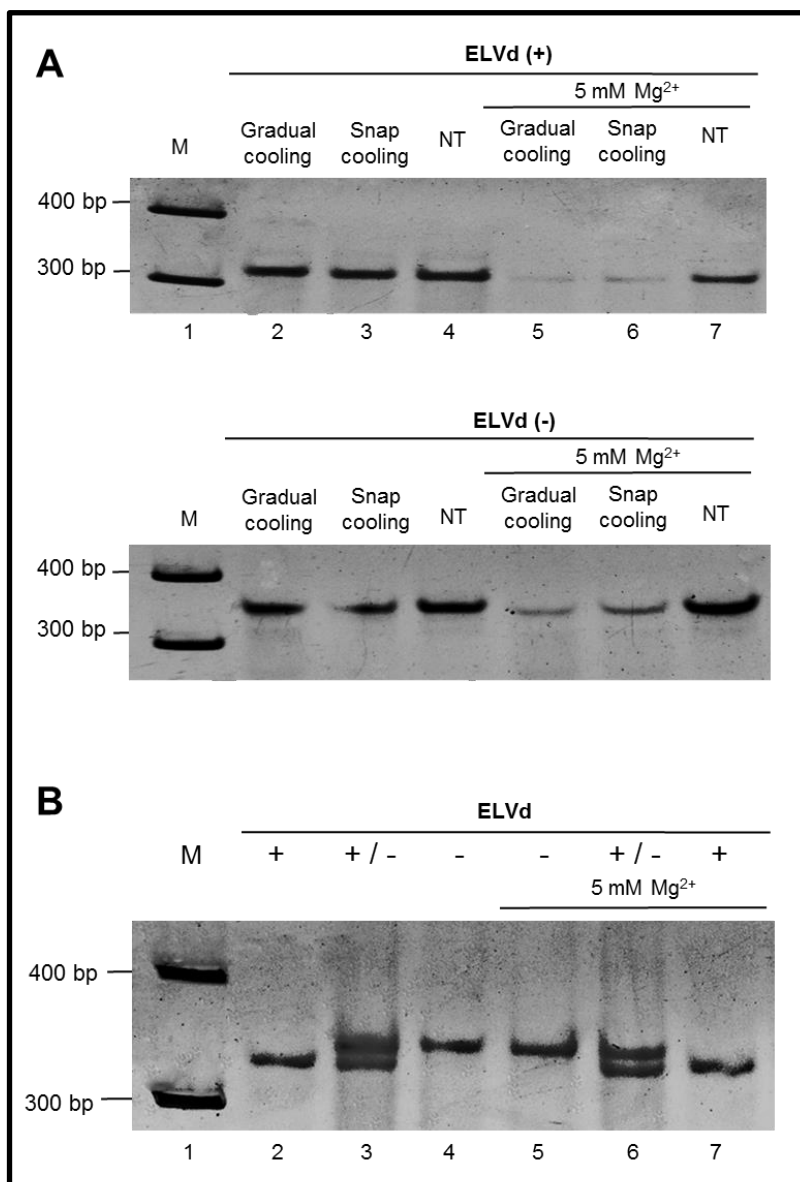


Figure 2. The monomeric linear (+) and (-) RNAs of ELVd display a different mobility in non-denaturing PAGE. (A) Before electrophoresis, aliquots of the gel-eluted ELVd (+) and (-) forms (upper and lower panels, respectively) were heated at 98°C for 2 min and gradually-cooled at 25°C along 15 min (lane 2), snap-cooled on ice (lane 3), or applied directly with no thermal treatment (NT) (lane 4). Three other aliquots of the same RNAs were processed similarly, but in the presence of 5 mM Mg²⁺ (lanes 5, 6 and 7, respectively). (B) Aliquots of untreated ELVd (+) and (-) RNAs were applied individually (lanes 2 and 4, respectively) or concurrently (lane 3). Three other aliquots of the same RNAs were processed similarly, but in the presence of 5 mM Mg²⁺ (lanes 5, 6 and 7, respectively). M refers to DNA markers with their size (in base pairs) indicated on the left (lanes 1). Gels were stained with ethidium bromide and are shown in the inverted option to facilitate visualization.

SHAPE analysis coupled to computer-assisted prediction corroborates the ELVd conformations derived from *in silico* approaches

The finding that each ELVd strand folds *in vitro* into dominant conformations made feasible their finer dissection at the nucleotide level with SHAPE (using NMIA) coupled to computer-assisted prediction.³⁰ The obtained resolution allowed determination of SHAPE reactivity of most positions (Figure S1). The conformation of minimal free energy derived *in vitro* for the ELVd (+) RNA was consistent, with minor rearrangements, with that predicted *in silico* initially²¹ and in the present work (Figure 1A, structure 1+): a central domain, resulting from base-pairing of the residues forming the hammerhead ribozymes of both polarities, flanked by bifurcations at both terminal domains (Figure 3A). On the other hand, the conformations obtained *in vitro* for the ELVd (-) RNA were also consistent to a very good extent with those predicted *in silico* (Figure 1B, structure 1- and 2-): a secondary structure resembling that of the (+) strand but with a small cruciform motif in the central domain (only partially supported because some positions correspond to the primer binding site), and a rearranged left terminal domain for accommodating the high SHAPE reactivity detected for nucleotides around position 280 (Figure 3B, structure 3-). When this reactivity was not computed considering the compensatory mutations detected *in vivo* (see below), the conformation adopted was that with a simple left terminal bifurcation (Figure 3B, structure 1-). Again, no elements of tertiary structure were apparent.

The natural variability found in ELVd supports that both strands adopt *in vivo* conformations very similar to those proposed by *in silico* and *in vitro* approaches

There are several reasons explaining why *in vitro*-derived RNA conformations may not reflect the situation existing *in vivo*, chief among which is that RNAs interact with proteins in their natural habitat (see Discussion). To overcome this limitation, we examined the natural variability of 100 ELVd full-length progeny variants from the parental variant ELVd-2²¹ obtained by RT-PCR amplification (50 with a pair of adjacent primers and 50 with another pair in order to cover the complete molecule), cloning and sequencing (Table 1). First, we search for co-variations or compensatory mutations (converting canonical into wobble pairs or vice versa) preserving the stems predicted by the *in silico* and *in vitro* approaches. Regarding the ELVd (+) strand, the conformation with a central domain flanked by 2 bifurcations at both terminal domains (Figures 1A and 3A, structure 1+), is strongly supported because of the presence of co-variations and compensatory mutations in most of the stems that do not disrupt their base-pairing (Figure 4A) (Table S1). The variability found in the 10 original variants²¹ supports also the same conformation. Thus, this is a good example of coherence among results generated by the 3 experimental approaches.

What about the ELVd (-) strand for which 2 structures were derived from *in silico* and *in vitro* analyses (Figure 1B and Figure 3B)? On the one hand the conformation with the small cruciform motif in the central domain appears favored, because the upper hairpin stem of this motif is supported by the co-variation A-U>C-G (positions 183 and 194) in 35 variants, and by the substitution A>G (position 186) converting a canonical into a wobble pair in 6 variants (Figure 4B) (Table S2). On the other hand the bifurcated (structure 1-), rather than the multibranching conformation (structure 3-) of the left terminal domain, is supported by: i) 3 consecutive substitutions C>U (positions 204, 205 and 206) in 35, 20 and 35 variants, respectively, converting canonical into wobble pairs, and ii) 2 substitutions U>C and A>G (positions 311 and 312) in 2 of the original variants,²¹ converting a wobble into a canonical pair and vice versa, respectively (Figure 4B) (Table S2). Overall, these results bolster the adoption by ELVd (+) and (-) strands of slightly different foldings *in vivo*, which could also be adopted *in vitro*, thus explaining the different mobility displayed by both RNAs in non-denaturing PAGE (Figure 2). The *in vivo* conformations of ELVd (+) and (-) strands are those favouring ligation, and not self-cleavage, because the nucleotides potentially forming the

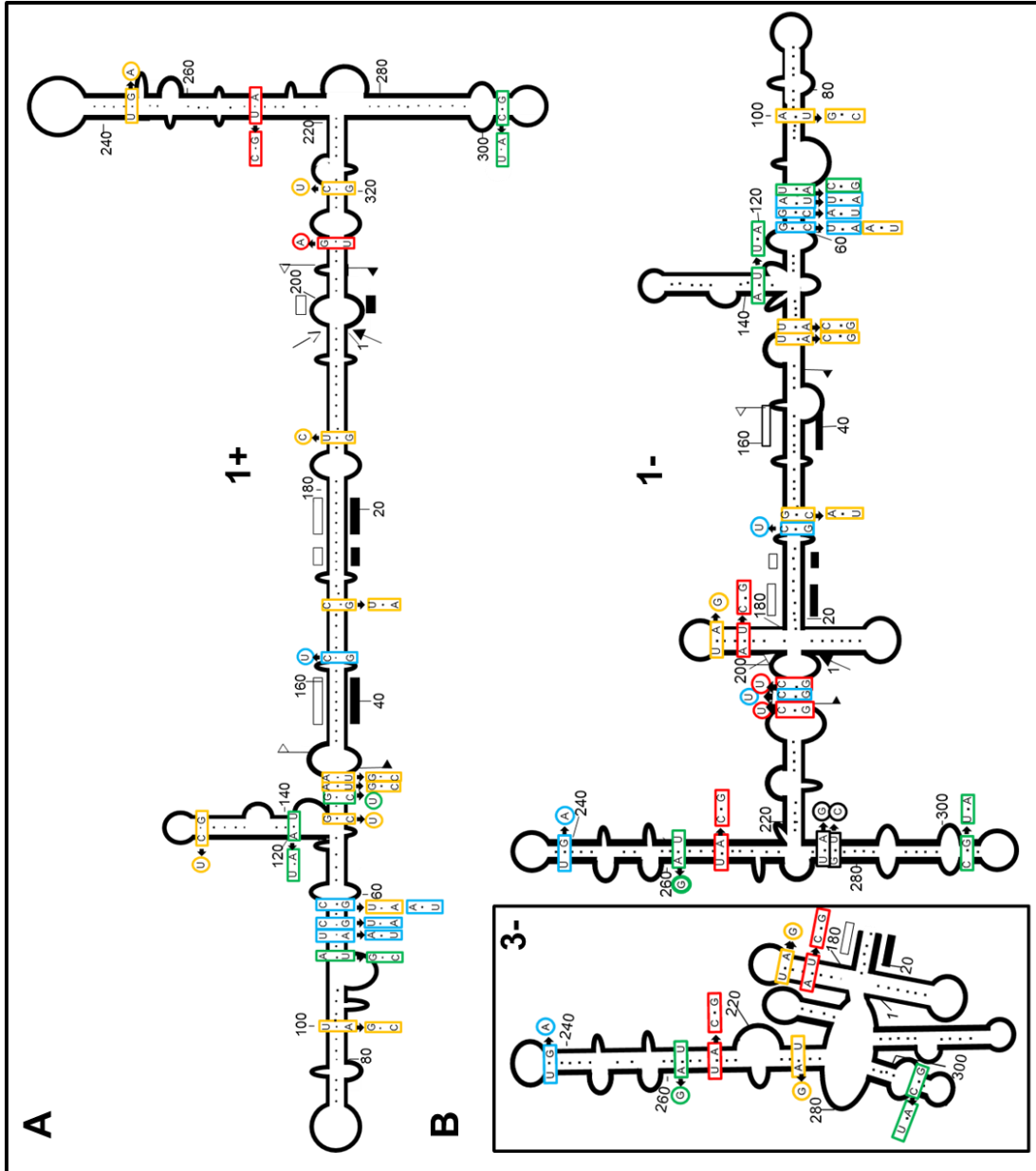


Figure 4. The natural sequence heterogeneity is consistent with the conformations adopted by ELVd strands *in vivo* being very similar to those proposed *in silico* and *in vitro*. (A) Co-variations and mutations resulting in conversion of canonical into wobble pairs or vice versa do not disrupt base-pairing in most of the stems of ELVd (+) RNA folding. (B) For similar reasons, the conformation with the cruciform motif in the central domain and an unbranched lower arm in the terminal left bifurcation appears favored in ELVd (-) RNA folding. Mutation frequencies detected in the ELVd variants sequenced are denoted with different color: red (in more than 30 variants), blue (in 20–30 variants), green (in 10–20 variants), yellow (in 5–10 variants) and black (in 2 of the original variants).²¹ The schemes representing ELVd (+) and (-) conformations are derived from those obtained by SHAPE analyses. Other details as in the legend to Figure 1.

hammerhead structures are involved in alternative catalytically-inactive foldings.^{55,56} As expected, the nucleotides forming the catalytic core of the hammerhead structures are conserved as well as the base-pairing of the flanking stems (Figure S2).

The transcription initiation site of ELVd (+) strands maps at an internal loop of a hairpin

Once reliably determined the *in vivo* conformations of the 2 ELVd strands, we then moved to map their transcription initiation sites. We first began with that of (+) strands, the most abundant *in vivo*, using the approach developed previously to address a similar issue in PLMVd.⁵⁰ In brief, this RLM-RACE approach is a derivation of a previous one set up for mapping the genuine 5' termini of eukaryotic mRNAs, which are capped.^{57,58} Because, there is evidence indicating that ELVd accumulates⁵⁹ (our unpublished *in situ* hybridization data) and most likely replicates in chloroplasts, wherein capping does not occur, we assumed that the primary ELVd transcripts, like other chloroplastic RNA transcripts, should be characteristically tagged by a 5' triphosphorylated group. Only RNAs with such a group are specifically capped *in vitro* with guanylyltransferase and GTP, while other RNAs with 5'-monophosphorylated or -hydroxylated groups are not.^{60,61} After *in vitro* capping, ensuing treatment with calf intestinal phosphatase (CIP) removes the 5'-monophosphorylated groups, thus hindering ligation of these RNAs to an RNA adaptor. Subsequent digestion with tobacco acid pyrophosphatase (TAP) removes the cap structure of the genuine 5' termini, leaving a free 5'-monophosphorylated group suitable for ligation to the RNA adaptor with T4-RNA ligase. Following reverse transcription of the resulting product with a viroid-specific primer, the cDNA obtained was amplified by nested PCR (with primers specific for the viroid and the RNA adaptor), cloned, and sequenced (Figure 5A).

This methodology led to consistent results. First of all, when applied to an artificial mixture —made up of 10 ng of an *in vitro* ELVd (+) transcript with a known 5'-triphosphorylated end, combined with an excess of a nucleic acid preparation from mock-inoculated eggplants— cloning and sequencing of the resulting RT-PCR product of about 114 bp corroborated the expected terminus (Figure 5B, lane 2). Two control reaction mixtures, wherein the treatments with guanylyltransferase or the addition of the RNA adaptor were omitted, failed to generate the same RT-PCR product (Figure 5B,

lanes 3 and 4, respectively), as also failed a third control in which the RNA template was omitted (Figure 5B, lane 7). Application of this approach to RNA preparations from mock-inoculated and ELVd-infected eggplants produced a prominent RT-PCR amplicon of approximately 200 bp only in the last case (Figure 5B, compare lanes 5 and 6). Cloning and sequencing of the amplified product characteristic of the ELVd-infected preparations identified position U138 as the transcription initiation site of ELVd (+) strands, located in an asymmetric loop forming part of a hairpin (Figure 5D). This result was further confirmed using, instead of RNA preparations from ELVd-infected leaves, the ELVd monomeric linear forms and an ELVd subgenomic RNA of approximately 200 nt purified from these preparations. Application of RLM-RACE, cloning and sequencing resulted in the same site, and primer extension experiments revealed a population of molecules with their 5'-end mapping at position U138 (data not shown). However, the substitutions U138>A or U138>C were detected in some of the full-length sequenced variants and the first one also in some RLM-RACE clones, thus indicating that the nucleotide at this position is not strictly conserved.

The transcription initiation site of ELVd (-) strands maps at a structural motif different from that of their (+) counterparts

Next we extended the same RLM-RACE methodology to the ELVd (-) strands but the results obtained were erratic, possibly due to the lower accumulation of these strands. Therefore, we modified the methodology substituting the *in vitro* capping and subsequent treatments with CIP and TAP, by 2 consecutive digestions with: i) TerminatorTM exonuclease, which degrades RNAs with a 5'-monophosphorylated group, and ii) PolyphosphataseTM, which transforms a 5'-triphosphorylated group into a 5'-monophosphorylated group (Figure 5A). When first tested with an artificial control—consisting of 10 ng of an *in vitro* ELVd (-) transcript with a known 5'-triphosphorylated end mixed with an excess of a nucleic acid preparation from mock-inoculated eggplants—this approach resulted in an amplification product of about 115 bp, the cloning and sequencing of which confirmed the expected terminus (Figure 5C, lane 2). Two control reaction mixtures, in which the order of treatments with TerminatorTM and PolyphosphataseTM was reversed, or the addition of the RNA adaptor was omitted, failed to produce the same RT-PCR amplicon (Figure 5C, lanes 3 and 4, respectively), as also failed a third control in which the RNA template was omitted

(Figure 5C, lane 7). Subsequent application of this approach to RNA preparations from mock-inoculated and ELVd-infected eggplants produced an RT-PCR amplicon of approximately 70 bp present only in the last case (Figure 5C, compare lanes 5 and 6). The same RT-PCR product was observed when the RNA preparation from ELVd-infected eggplant was replaced by ELVd monomeric linear forms purified from this preparation (data not shown). Cloning and sequencing of the amplification product, only generated when using RNA preparations from ELVd-infected material, mapped the transcription initiation site of ELVd (-) strands at position A48 (Figure 5D). However, some of the full-length sequenced variants presented the substitution A48>G indicating that, like in the ELVd (+) strands, the nucleotide at this position is not strictly conserved. The transcription initiation site of ELVd (-) strands does not map at the hairpin equivalent to that containing the initiation site of ELVd (+) strands, but at the end of a proximal double-stranded segment adjacent to an internal asymmetric loop (Figure 5D). Moreover, no sequence conservation between the regions flanking both transcription initiation sites was observed (Figure 5D).

DISCUSSION

Initial thermodynamics-based analyses suggested the presence of terminal bifurcations in the secondary structure predicted for ELVd (+) RNA,²¹ a conformation lying between the rod-like structure proposed for ASBVd strands^{62,63} and the clearly branched structures —stabilized by a kissing-loop interaction— proposed for PLMVd^{19,26,33} and CChMVd RNAs.^{20,26,53} Because the predicted secondary structure of ELVd (+) RNA²¹ does not contain the same sequence/structural motifs where the initiation sites of ASBVd and PLMVd RNAs have been previously mapped,⁴⁹⁻⁵¹ we assumed the existence of novel ELVd-specific motifs recruiting the NEP or some associated transcription factor. Before mapping these sites, we decided to obtain firmer evidence on the secondary structures proposed for both ELVd RNAs.

First we assessed the structures of minimal free energy predicted by *Mfold* with an updated version thereof and with 2 additional softwares, which corroborated the conformation proposed initially for the ELVd (+) strand²¹ and suggested a similar conformation for the complementary strand.

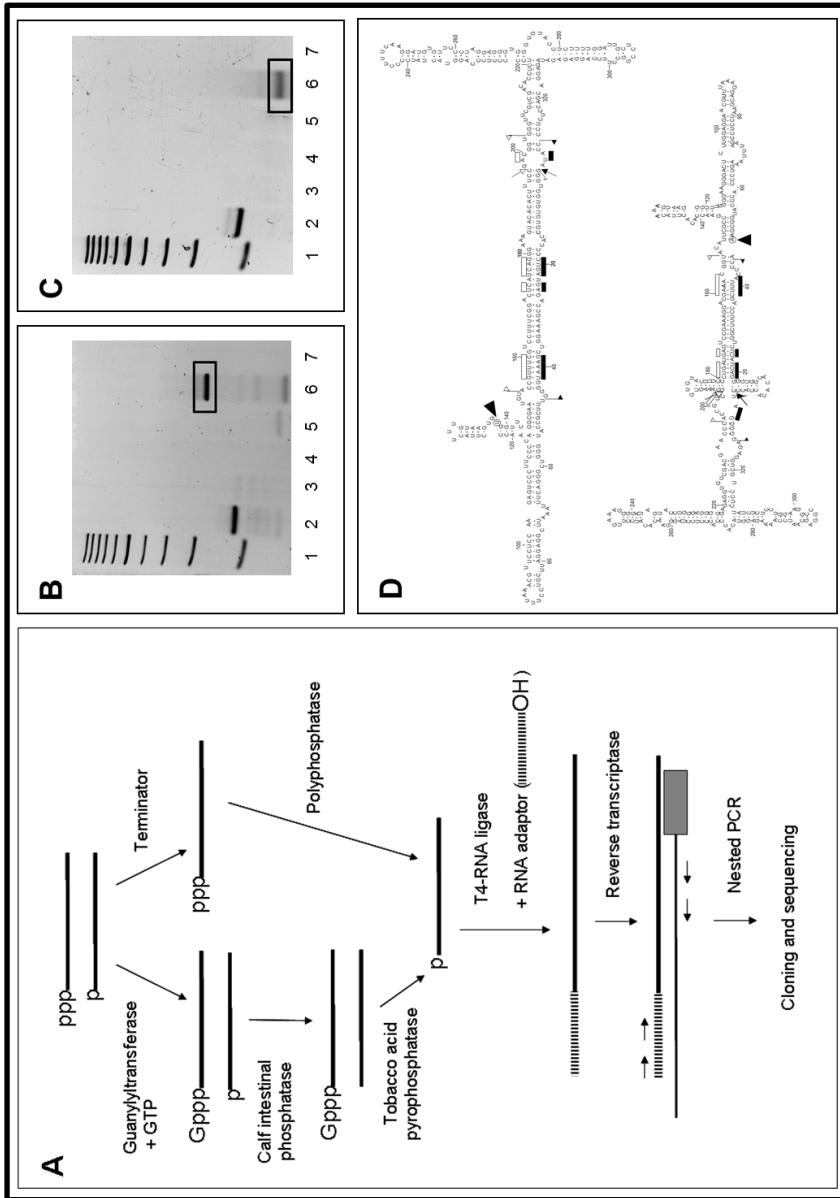


Figure 5. Identification of the transcription initiation sites of ELVd strands. (A) Scheme of the 2 RLM-RACE approaches used to exclusively amplify RNAs with a 5'-triphosphorylated end. (B) Non-denaturing PAGE of the RT-PCR products resulting from applying *in vitro* capping and RLM-RACE to ELVd (+) strands. Lane 1, ladder of 100-bp DNA multimers. Lane 2, artificial reaction mixture containing an *in vitro* ELVd (+) transcript starting at position 210 combined with excesses of a CF11-fractionated RNA preparation from mock-inoculated eggplant. Lanes 3 and 4, reaction mixtures in which *in vitro* capping and addition of the RNA adaptor were omitted, respectively. Lanes 5 and 6, RNA preparations from mock-inoculated and ELVd-infected eggplant, respectively. Lane 7, reaction mixture in which the RNA template was omitted. Gel was stained with ethidium bromide. (D) Arrowheads indicate the transcription initiation sites in the proposed *in vivo* conformations of ELVd (+) and (-) RNAs (upper and lower panels, respectively). Other details as in the legends to Figures 1 and 2.

Moreover, analyses by non-denaturing PAGE revealed, irrespective of the denaturing/renaturing treatments, a predominant band for each polarity strand, consistent with the adoption of a single major conformation in each case. Coupling SHAPE data to computer-assisted prediction resulted in conformations to a good extent in agreement with those generated by *Mfold* and *RNAstructure*, and to that proposed for the ELVd (+) RNA by a recent SHAPE analysis⁶³ (with some differences in the hairpins delimited by positions 119–141 and 259–310). However, with respect to this latter analysis,⁶³ we detected a cruciform motif in the central domain of ELVd (-) structure. These differences could result from the use in the 2 SHAPE analyses of distinct ELVd variants (89% sequence similarity), acylating agents (NMIA and benzoyl cyanide) and folding conditions. Most importantly, the existence of our SHAPE-predicted structures *in vivo* was validated by the presence in natural ELVd sequence variants of co-variations and conversions of canonical into wobble base-pairs or vice versa, thus preserving the internal pairing of most double-stranded stems. The more frequently occurrence of covariations than the corresponding single mutations, which are more likely to appear from a statistical viewpoint, strongly supports the role of selection in purging variants non-viable *in vivo* because of their destabilized stems. The *in vivo* conformation is the one that really matters because, being viroids non-protein-coding RNAs, they must rely on RNA sequence and structural motifs for specific interactions with the host proteins involved in their replication, movement, pathogenesis and overcoming of the host defensive response.⁸

This good concordance between the *in silico*, *in vitro* and *in vivo* structures of ELVd strands, however, should not be taken for granted *a priori*. While free-energy minimization analyses predict correctly the structure of most small RNA motifs, they become less precise as the RNA size increases due to the lack of accurate thermodynamic parameters for some motifs and higher-order interactions.⁶⁴ On the other hand, leaving aside that SHAPE analysis interrogates local backbone RNA flexibility in a protein-free solution —with an ionic composition that in some cases includes high concentration of Mg^{2+} not reflecting the physiological habitat— this approach, despite representing a great step forward in the analysis of RNA structure *in vitro*, has intrinsic limitations partly resulting from the initial thermal denaturation/renaturation applied to RNA.²⁷ As pointed out before,³² a good deal of RNA biochemistry has been (and still is) done with renatured RNA, but how likely is

that an RNA will renature into a unique conformation and how likely is it that this conformation will be the biologically relevant species remains unknown in most instances. Because of the high folding free energy of even small RNA hairpins, non-native states of RNA are often quite stable and pose a serious kinetic folding problem for RNA that has been denatured. Even non-denatured *in vitro* transcripts, frequently used because they are affordable and easy to prepare, may not fold into the physiological conformation. Moreover, certain RNAs may need a specific binding protein to maintain its active conformation, which may differ when this protein is removed. Therefore, it is critical to have independent genetic or phylogenetic evidence supporting the biochemical data.^{32,65}

Several non-exhaustive examples illustrate the limitations of *in vitro* approaches for viroids. First, early studies revealed that, after thermal denaturation, the PSTVd RNA did not recover its initial conformation even following slow cooling.⁹ Although more refined folding conditions were subsequently developed,¹³ full reversibility to the original “native” structure cannot be always guaranteed. Second, when applied by independent groups, SHAPE predicted for ASBVd strands different conformations, rod-like or branched, and with or without a kissing-loop interaction in that of (-) polarity.^{63,66} And third, the SHAPE-derived structure for the CChMVd (+) RNA⁶³ does not agree with that supported by numerous data obtained with natural and artificial mutants combined with bioassays and progeny analysis, particularly in the region proximal to one of the loops involved in a kissing-loop interaction critical for *in vitro* folding and *in vivo* viability.⁵³ A similar kissing-loop interaction in the PLMVd (+) RNA has been detected by *in vitro* analyses (nuclease probing and SHAPE).^{26,63} However, the secondary structure proposed for the (+) strand of a viroid-like RNA from grapevine, which appears also stabilized by a similar kissing-loop interaction,⁶⁷ is not present in the SHAPE-predicted structure.⁶³

A well-supported secondary structure, as that reported here for both ELVd strands, is crucial for searching RNA sequence or structural motifs that could direct initiation of transcription, which as indicated above, may influence the structure of nascent viroid RNAs that start folding co-transcriptionally. Indeed, the co- and post-transcriptional self-cleavage of both ELVd hammerheads differs *in vitro* and possibly *in vivo*.⁶⁸ Because the transcription initiation sites of the (+) and (-) strands of 2 members of the family *Avsunviroidae* map at sites similar in sequence and structure —those of

ASBVd at (A+U)-rich terminal loops in the rod-like secondary structure,⁴⁹ and those of PLMVd at short double-stranded RNA stems containing also the hammerhead self-cleavage sites—^{50,51} we anticipated a sort of similar situation for ELVd (+) and (-) initiations sites. However, our data indicate that this is not the case. After checking with appropriate controls the consistency of the RLM-RACE approaches adapted to eggplant tissues, we identified position U138 (mapping at an asymmetric loop forming part of a hairpin) as the transcription initiation site of ELVd (+) strands, and position A48 (mapping at a double-stranded segment adjacent to an internal asymmetric loop) as the transcription initiation site of ELVd (-) strands. Because no sequence conservation was found in the regions flanking the 2 sites, the possibility that initiation of transcription could be determined by a sequence rather than by structural motifs appears unlikely. Therefore, we need to conclude that the eggplant NEP involved (or some auxiliary transcription factor), is recruited to initiate transcription of both ELVd strands at sites unrelated in sequence but sharing some common structural feature (e.g. mapping at, or adjacent to, asymmetric internal loops).

MATERIALS AND METHODS

Extraction, fractionation, and analysis of RNA

Total nucleic acids of young leaves from mock-inoculated and ELVd-infected eggplants (*Solanum melongena* cv. 'Redonda morada') were extracted either with phenol-saturated buffer⁶⁹ or with a method avoiding organic solvents,⁷⁰ and then partitioned on non-ionic cellulose (CF11; Whatman) with STE (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing 35% ethanol. The preparations were further clarified by removing polysaccharides with methoxyethanol.⁷¹ RNAs were examined by non-denaturing PAGE in 5% gels with 1X TAE (Tris-acetate-EDTA), and by denaturing PAGE in 5% gels with 0.25X TBE (Trisborate- EDTA) and 8 M urea.⁷² For preparative purposes, following double electrophoresis first in non-denaturing and then in denaturing conditions,⁶⁹ the second gel was stained with ethidium bromide and the bands of interest, identified with appropriate markers, were excised and the corresponding RNAs eluted.

Computer-assisted prediction of RNA structure

The structures of minimal free energy for the linear (+) and (-) forms of ELVd were searched with 3 softwares: *Mfold* version 3.5,²³ using the circular version and default parameters, and *RNAfold* version 2.1.9²⁴ and *RNAstructure* version 5.7^{25, 30} using the default parameters.

SHAPE analysis

The substrates for this analysis were the unit-length self-cleavage products resulting from *in vitro* transcription driven by the T7 or T3 promoters,⁷² of a recombinant plasmids containing a dimeric head-to-tail ELVd-cDNA insert of the reference variant ELVd-2 (GenBank AJ536613). The resulting monomeric linear (+) and (-) forms of ELVd were purified by denaturing PAGE and subsequent elution. SHAPE was performed with N-methylisatoic anhydride (NMIA) essentially as reported.²⁷ Briefly, the RNA (3 pmol) was denatured at 95°C for 3 min, transferred to ice for 15 min, and renatured at 37°C for 5 min in the folding buffer (100 mM HEPES pH 8.0, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl₂). 2'-acylation was initiated by adding NMIA (6 mM in dimethyl-sulfoxide), while only dimethyl-sulfoxide was incorporated to the control. Reactions proceeded for 15 min at 37°C and formation of 2'-O-adducts was stopped by adding 3 volumes of ethanol. RNA was recovered by centrifugation, washed 3 times with 70% ethanol, and subjected to primer extension.

Fluorescently-labeled DNA oligonucleotides (Applied Biosystems) were purified by denaturing PAGE in 20% gels. After adding 4 pmol of the appropriate primer (Table 1) tagged with the VIC fluorophore, the RNAs corresponding to the (+) and (-) NMIA reactions were heated to 95°C for 3 min and snap-cooled on ice for 15 min. Extensions were performed at 52°C for 45 min (in a 20 µl reaction volume) with 100 U SuperScript III RT (Invitrogen) and 0.5 mM dNTPs in the buffer recommended by the supplier. Sequencing reactions used to identify the peaks were prepared similarly but adding 10 mM ddGTP to the primer extension mix and using the appropriate primer (Table 1) tagged with the NED fluorophore and non-modified RNA. The resulting cDNAs were ethanol-precipitated, collected by centrifugation, resuspended in deionized formamide and resolved by capillary electrophoresis in an ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) as previously described.²⁸ Electropherograms were analyzed using the QuShape software,⁷³ which also normalized the reactivity data. Between 4 to 6

replicas were performed for each sample, and the mean and standard deviation of the reactivity of each nucleotide was calculated.

Cloning and sequencing

ELVd circular forms purified from infected tissue were reverse transcribed with SuperScript II RT (Invitrogen) and primer RF-677 complementary to positions 85 to 68 of the ELVd reference sequence, and PCR-amplified with Pfu DNA polymerase (Agilent) and primers RF-677 and RF-676 homologous to positions 86 to 105 of the same sequence.²¹ To cover the complete ELVd sequence a second amplification was performed using for RT primer RF-1299 homologous to positions 314 to 333 of the ELVd reference sequence, and for PCR primers RF-1299 and RF-1298 complementary to positions 313 to 294 of the same sequence (Table 1). The resulting products were separated by non-denaturing PAGE in 5% gels and the ELVd DNAs of the expected full-length were eluted and cloned into the EcoRV restriction site of plasmid pBS II KS (+) (Stratagene). Fifty plasmid inserts from each amplification were sequenced automatically by capillary electrophoresis (see above) using a Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The nucleotide sequences obtained in this study have been deposited in GenBank (accession numbers KT901835 to KT901928 corresponding to 94 of the 100 plasmid inserts sequenced; the other 6 were incomplete or presented cloning artefacts).

***In vitro* capping**

After adding N-terminal histidine tags to the 2 subunits of the vaccinia virus guanylyltransferase (mRNA-capping enzyme) they were co-expressed in bacteria and purified by affinity chromatography in Ni-agarose columns.⁷⁴ RNA preparations (3 µg) from mock-inoculated and ELVd-infected eggplant leaves and, when indicated, from individual RNAs eluted from denaturing gels were subjected to capping *in vitro* in reaction mixtures (30 µl final volume) containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1.25 mM MgCl₂, 6 mM KCl, 2.5 mM DTT, 10 U of human placental RNase inhibitor (HPRI) (Roche Applied Science), 0.3 mM GTP, and 2.5 µl of a purified guanylyltransferase preparation, which in previous experiments was sufficient to efficiently label with [α -³²P]GTP 200 ng of a synthetic transcript. Following incubation at 37°C for 45 min, addition of the same amount of fresh enzyme and incubation for another 45 min at 37°C,

the RNAs were extracted with phenol-chloroform, recovered by ethanol precipitation, and resuspended in sterile distilled water.⁵⁰

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

After *in vitro* capping, the RNAs were sequentially treated with calf intestinal phosphatase (CIP) (Roche Applied Science), tobacco acid pyrophosphatase (TAP) (Epicenter Technologies), and ligated to an RNA adaptor using T4-RNA ligase (Roche Applied Science).⁵⁰ Reverse transcription of the resulting products and nested PCR using the Expand High Fidelity DNA polymerase (Roche Applied Science) and appropriate primers (Table 1) were also as reported previously.⁵⁰ Alternatively to *in vitro* capping, eggplant RNA preparations (3 µg in 20 µl final volume) were treated for 1 h at 60°C with 1 U of TerminatorTM exonuclease (Epicentre) in the buffer recommended by the supplier complemented with 10 U of HPRI and, subsequently, with 20 U of RNA 5'-PolyphosphataseTM (Epicentre Technologies) for 30 min at 37°C (in 20 µl final volume) containing 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 and 10 U of HPRI. Ligation, reverse transcription and PCR amplification were performed as described above.

Table 1. Primers for RT-PCR amplification, SHAPE and RLM-RACE.

ELVd-specific primers (and polarity ^a)	Sequence (5' → 3')	Positions ^b	Purpose
RF-1024 (c)	TATGGGGAGAGGTCGTC	333-317	SHAPE (+) & 5'-RACE (RT)
RF-701 (c)	AGAGGTCGTCCTCTATCTCTCCTGGAAGG	326-298	5'-RACE (+) (PCR)
RF-1070 (c)	GAGCAATCCTTTTGAGGTACACCC	294-271	5'-RACE (+) (nested PCR)
RF-975 (h)	GGGTGGGTGTACCTCTTTTGGATTGCT	267-293	SHAPE (-) & 5'-RACE (RT)
RF-1071 (h)	CCTTCCAGGAGAGATAGAGGACGACCTCT	298-326	5'-RACE (-) (PCR)
RF-1313 (h)	GGGTGGTGTGTGCCACCCCT	1-20	5'-RACE (-) (nested PCR)
RF-1331 (h)	GACGGTGGGTTCGTCGACACC	198-218	SHAPE (-)
RF-677 (c)	WCGAATCCTCCGAATTTA	85-68	RT-PCR (+) (Progeny)
RF-676 (h)	CCTTAAWCGTTCCTCCAAG	86-105	PCR (-) (Progeny)
RF-1299 (h)	GAGGACGACCTCTCCCCATA	314-333	RT-PCR (-) (Progeny)
RF-1298 (c)	TATCTCTCCTGGAAGRCCGG	313-294	PCR (+) (Progeny)
Adaptors and adaptor-specific primers	Sequence (5' → 3')	Positions ^b	Purpose
Adaptor A	CGACU GGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUG AAGGAGUAGAAA		
RF-553 (h)	TGGAGCACGAGGACACTGACATG	5-27	5'-RACE (+) (PCR)
RF-554 (h)	GACACTGACATGGACTGAAGGAGTAG	16-41	5'-RACE (+) (nested PCR)
Adaptor B	CUCAAAAGUUUCGCCGU AUCUCAACGGCUCAU CAGUGGGCUUAGCCCAGACUUUUGAGAGAAGU GGCG		
RF-37 (h)	CGGCCTCATCAGTGGGCTTAG	25-44	5'-RACE (-) (PCR)
RF-1086 (h)	CCCAGACTTTTGAGAGAAG	45-63	5'-RACE (-) (nested PCR)

^ah, homologous; c, complementary

^bNumbering refers to plus polarity

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. S. Shuman for kindly providing the recombinant plasmid for co-expression of the 2 subunits of the vaccinia virus mRNA capping enzyme, to Dr. C. Romero and Dr. A. Barroso for their help in initial SHAPE experiments, and to A. Ahuir for excellent technical assistance.

FUNDING

This work was supported by grants BFU2011-28443 and BFU2014-56812-P (to R.F.) from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) of Spain. A.L.C. and

S.M. were recipients of predoctoral fellowships from MINECO and SD of a postdoctoral contract from the same organism.

REFERENCES

1. Diener TO. Discovering viroids—a personal perspective. *Nature Rev Microbiol* 2003; 1:75-80
2. Flores R, Hernández C, Martínez de Alba E, Daròs JA, Di Serio F. Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 2005; 43:117-39
3. Tsagris EM, Martínez de Alba AE, Gozmanova M, Kalantidis K. Viroids. *Cell Microbiol* 2008; 10:2168-79
4. Ding B. The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 2009; 47:105-31
5. Kovalskaya N, Hammond RW. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci* 2014; 228:48-60
6. Palukaitis P. What has been happening with viroids? *Virus Genes* 2014; 49:175-84
7. Ding B. Viroids: self-replicating, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1:362-75
8. Flores R, Serra P, Minoia S, Di Serio F, Navarro B. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front Microbiol* 2012; 3:217
9. Diener TO. Potato spindle tuber viroid VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology* 1972; 50:606-9
10. Gross HJ, Domdey H, Lossow C, Jank P, Raba M, Alberty H, Sängner HL. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 1978; 273:203-8
11. Gast FU, Kempe D, Spieker RL, Sängner HL. Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J Mol Biol* 1996; 262:652-70
12. Sängner HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt A. Viroids are single-stranded covalently-closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:3852-6
13. Riesner D, Henco K, Rokohl U, Klotz G, Kleinschmidt AK, Domdey H, Jank P, Gross HJ, Sängner HL. Structure and structure formation of viroids. *J Mol Biol* 1979; 133:85-115
14. Sogo JM, Koller T, Diener TO. Potato spindle tuber viroid X. Visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* 1973; 55:70-80
15. Hernández C, Elena SF, Moya A, Flores R. Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin viroid subgroup (apscaviroids) and also has sequence homologies with viroids from other subgroups. *J Gen Virol* 1992; 73:2503-7
16. Giguère T, Raj Adkar-Purushothama C, Perreault J-P. Comprehensive secondary structure elucidation of four genera of the family *Pospiviroidae*. *PLoS ONE* 2014; 9:e98655
17. Flores R, Gago-Zachert S, Serra P, Sanjuán R, Elena SF. Viroids: survivors from the RNA world? *Annu Rev Microbiol* 2014; 68:395-414

18. Flores R, Daròs JA, Hernández C. The *Avsunviroidae* family: viroids with hammerhead ribozymes. *Adv Virus Res* 2000; 55:271–323
19. Hernández C, Flores R. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:3711-5
20. Navarro B, Flores R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammerhead ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:11262-7
21. Fadda Z, Daròs JA, Fagoaga C, Flores R, Duran-Vila N. Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). *J Virol* 2003; 77:6528-32
22. Zuker M, Mathews DH, Turner DH. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology NATO ASI Series (Barciszewski J. & Clark BFC., eds), p. 11-43, *Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass.* 1999
23. Zuker M. *Mfold* web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3406-15
24. Lorenz R, Bernhart SH, Hoener zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. ViennaRNA Package 2.0 *Algorith Mol Biol* 2011; 6:26
25. Reuter JS, Mathews DH. *RNAstructure*: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinform* 2010; 11:129
26. Bussière F, Ouellet J, Côté F, Lévesque D, Perreault J-P. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J Virol* 2000; 74:2647-54
27. Merino EJ, Wilkinson KA, Coughlan JL, Weeks KM. RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J Am Chem Soc* 2005; 127:4223-31
28. Mortimer SA, Weeks KM. Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one second snapshots and at single nucleotide resolution. *Nature Protoc* 2009; 4:1413-21
29. Weeks KM, Mauger DM. Exploring RNA structural codes with SHAPE chemistry. *Acc Chem Res* 2011; 44:1280-91
30. Hajdin CE, Bellaousov S, Huggins W, Leonard CW, Mathews DH, Weeks KM. Accurate SHAPE-directed RNA secondary structure modeling, including pseudoknots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:5498-503
31. Gutell RR, Larsen N, Woese CR. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* 1994; 58:10-26
32. Uhlenbeck OC. Keeping RNA happy. *RNA* 1995; 1:4-6
33. Ambrós S, Hernández C, Desvignes JC, Flores R. 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* 1998; 72:7397-06
34. De la Peña M, Navarro B, Flores R. Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9960-5

35. Leontis NB, Stombaugh J, Westhof, E. Motif prediction in ribosomal RNAs: lessons and prospects for automated motif prediction in homologous RNA molecules. *Biochimie* 2002; 84:961-73
36. Zhong X, Leontis N, Qiang S, Itaya A, Qi Y, Boris-Lawrie K, Ding B. Tertiary structural and functional analysis of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J Virol* 2006; 80:8566-81
37. Gago S, Elena SF, Flores R, Sanjuán R. Extremely high variability of a hammerhead viroid. *Science* 2009; 323:1308
38. Ambrós S, Hernández C, Flores R. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *J Gen Virol* 1999; 80:2239-52
39. Dubé A, Bolduc F, Bisaillon M, Perreault JP. Mapping studies of the peach latent mosaic viroid reveal novel structural features. *Mol Plant Pathol* 2011; 12:688-701
40. Polivka H, Staub U, Gross HJ. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I. *J Gen Virol* 1996; 77:155-61
41. Visvader JE, Forster AC, Symons RH. Infectivity and *in vitro* mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicates the site of processing of viroid precursors. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 5843-56
42. Flores R, Di Serio F, Hernández C. Viroids: the noncoding genomes. *Semin Virol* 1997; 8:65-73
43. Loss P, Schmitz M, Steger G, Riesner D. Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO J* 1991; 10:719-27
44. Qu F, Heinrich C, Loss P, Steger G, Tien P, Riesner D. Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural domains. *EMBO J* 1995; 12:2129-39
45. Candresse T, Góra-Sochackab A, Zagórski W. Restoration of secondary hairpin II is associated with restoration of infectivity of a non-viable recombinant viroid. *Virus Res* 2001; 75:29-34
46. Gas ME, Hernández C, Flores R, Daròs JA. Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog* 2007; 3:1813-26.
47. Navarro JA, Vera A, Flores R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* 2000; 268:218-25
48. Rodio ME, Delgado S, De Stradis AE, Gómez MD, Flores R, Di Serio F. A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* 2007; 19:3610-26
49. Navarro JA, Flores R. Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J* 2000; 19:2662-70
50. Delgado S, Martínez de Alba E, Hernández C, Flores R. 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* 2005; 79:12934-43
51. Motard J, Bolduc F, Thompson D, Perreault JP. The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology* 2008; 373:362-75

52. Lai D, Proctor JR, Meyer IM. On the importance of cotranscriptional RNA structure formation. *RNA* 2013; 19:1461-73
53. Gago S, De la Peña, M, Flores R. A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its *in vitro* folding and *in vivo* viability. *RNA* 2005; 11:1073-83
54. Repsilber D, Wiese S, Rachen M, Schröder AW, Riesner D, Steger G. Formation of metastable RNA structures by sequential folding during transcription: time-resolved structural analysis of potato spindle tuber viroid (-)-stranded RNA by temperature-gradient gel electrophoresis. *RNA* 1999; 5:574-84
55. Martínez F, Marqués J, Salvador ML, Daròs JA. Mutational analysis of eggplant latent viroid RNA processing in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J Gen Virol* 2009; 90:3057-65
56. Nohales MA, Molina-Serrano D, Flores R, Daròs JA. Involvement of the chloroplastic isoform of tRNA ligase in the replication of the viroids belonging to the family *Avsunviroidae*. *J Virol* 2012; 86:8269-76
57. Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 1994; 138:171-4.
58. Schaefer BC. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* 1995; 227:255-73.
59. Gómez G, Pallás V. A pathogenic non coding RNA that replicates and accumulates in chloroplasts traffics to this organelle through a nuclear-dependent step. *Plant Signal Behav* 2012; 7:882-4.
60. Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 26:457-91
61. Mishra NC. Nucleases: molecular biology and applications. *John Wiley and Sons, Chichester, UK.* 2002
62. Symons RH. Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res* 1981; 9:6527-37
63. Giguère T, Adkar-Purushothama CR, Bolduc, F, Perreault JP. Elucidation of the structures of all members of the *Avsunviroidae* family. *Mol Plant Pathol* 2014; 15:767-779
64. Mathews DH, Turner DH. Prediction of RNA secondary structure by free energy minimization. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16:270-8
65. Cech TR. RNA World research-still evolving. *RNA* 2015; 21:474-5
66. Delan-Forino C, Deforges J, Benard L, Sargueil B, Maurel MC, Torchet C. Structural analyses of avocado sunblotch viroid reveal differences in the folding of plus and minus RNA strands. *Viruses* 2014; 6:489-506
67. Wu Q, Wang Y, Cao M, Pantaleo V, Burgyan J, Li W-X, Ding S-W. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:3938-43
68. Carbonell A, De la Peña M, Flores R, Gago S. Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:5613-22

69. Pallás V, Navarro A, Flores R. Isolation of a viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid. *J Gen Virol* 1987; 68:3201-5
70. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1983; 1:19-21
71. Bellamy AR, Ralph RK. Recovery and purification of nucleic acids by means of cetyltrimethylammonium bromide. *Methods Enzymol* 1968; XII:156-60
72. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1989.
73. Karabiber F, McGinnis JL, Favorov OV, Weeks KM. QuShape: Rapid, accurate, and best-practices quantification of nucleic acid probing information, resolved by capillary electrophoresis. *RNA* 2013; 19:63-73
74. Luo Y, Mao X, Deng L, Cong P, Shuman S. The D1 and D12 subunits are both essential for the transcription termination factor activity of vaccinia virus capping enzyme. *J Virol* 1995; 69:3852-6

SUPPLEMENTARY MATERIAL

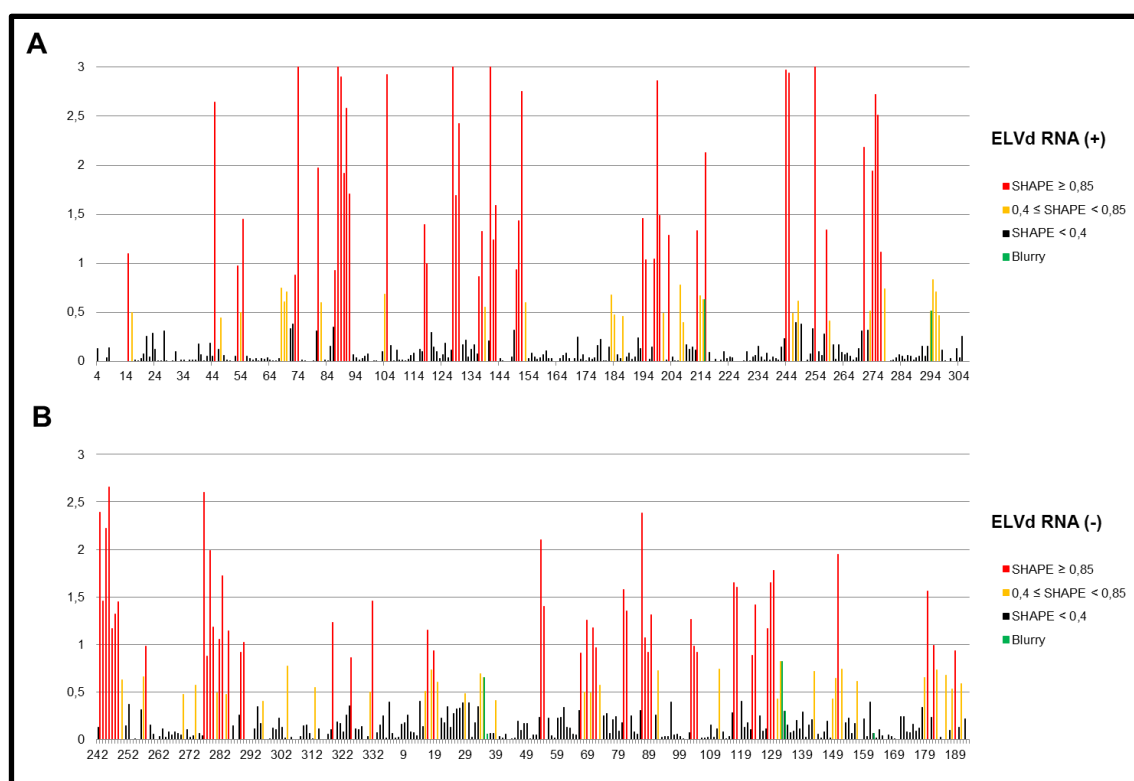


Figure S1. SHAPE reactivity of ELVd strands as a function of the nucleotide position averaged from at least four independent assays. For additional data see Figure 3.

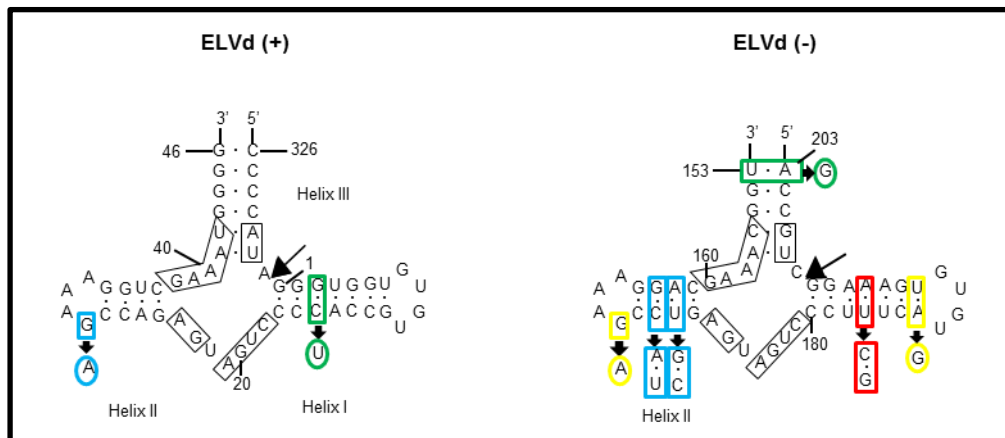


Figure S2. ELVd plus and minus hammerhead structures. Mutations found in progeny variants with respect to the parental reference variant (ELVd-2). Mutation frequencies are denoted with different color: red (in more than 30 variants), blue (in 20-30 variants), green (in 10-20 variants) and yellow (in 5-10 variants). The thermodynamic stability of the helices is preserved in all cases. The 13 nucleotide residues conserved in most natural hammerhead structures are boxed. The same numbering is used for (+) and (-) polarities.

Table S1. Sequence heterogeneity found in ELVd full-length variants supporting structure of plus polarity RNA^a

Covariations	Clon identification number	Number of clones	Number of clones with the covariations
U277C	1,5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,22,23,24,26,27,29,31,33,35,37,39,40,42,46,52,54,58,63,65,66,67,70,78,79,81,82,84,85,86,87,88,90,91,92,93,94	49 ^c	
A266G	1,5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,22,23,24,26,27,29,31,33,35,37,39,40,42,46,52,54,58,63,65,66,67,70,74,77,79,81,82,84,85,86,87,88,90,91,92,93,94	49 ^d	46
A64U	6,7,9,11,12,13,17,19,20,21,25,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,55,56,60,63,68,71,84,85,87,93	31 ^c	
U108A	6,7,9,11,12,15,17,19,20,21,25,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,55,56,63,71,85,87,93	28 ^c	27
G61U	6,8,12,13,14,15,17,19,20,21,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,63,81,84,85,87,93	26 ^c	
C111A	6,7,9,12,13,17,19,20,21,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,63,85,87,93	23 ^c	21
G63A	5,8,13,18,23,31,45,49,50,51,52,59,62,65,68,74,75,77,78,86,88,90,91,94	24 ^c	
C109U	8,13,18,23,31,46,49,50,51,52,58,59,62,65,68,74,75,77,78,86,88,91,94	23 ^d	21
G291A	6,7,9,12,14,15,17,19,20,21,26,27,37,39,40,42,46,54,63,79,81,85,87,92,93,94	26 ^c	
C298U	5,6,7,9,11,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,31,33,35,36,37,39,40,42,45,46,52,63,65,78,84,87,88	37 ^d	18
U66C	5,14,16,23,33,49,52,57,58,67,69,75,78,79,81,82,88,91	18 ^c	
A106G	5,11,14,16,23,24,25,33,49,52,53,55,57,58,66,67,70,71,75,78,79,81,82,84,88,90,91	27 ^d	17
A120U	5,11,49,52,55,57,58,60,66,67,70,71	12 ^c	
U141A	5,11,14,16,23,25,33,55,57,58,60,66,67,70,71,75,78,79,81,82,84,88,90,91,92,94	26 ^c	10
U49C	14,24,53,56,57,58,67,79,81,82	10 ^c	
A148G	14,24,53,57,58,67,79,81,82	9 ^d	9
A77G	14,49,52,58,70,75,78,88,91	9 ^d	
U100C	49,52,58,70,75,78,88	7	7
U48C	5,11,16,25,29,55,60,71	8	
A149G	5,11,16,25,33,55,57,60,71,84,90	11 ^d	7
G61A	5,16,57,58,66,67,79	7 ^c	
C111U	5,14,16,33,57,66,67,72,79,81,82,84,90	13 ^d	
G30A	6,7,12,15,17,19,20,21,26,27,29,35,37,39,40,42,45,46,51,54,63,69,74,84,85,87,93	27 ^c	6
C168U	6,9,12,13,17,54,59,63	8 ^d	
Compensatory mutations^b	Clon identification number	Number of clones	
G206A	5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,26,27,29,33,35,37,39,40,42,46,54,63,65,67,78,79,81,82,84,85,87,90,92,93	35	
C163U	6,7,9,12,13,17,19,20,21,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,63,85,87,93	23	
C50U	11,14,24,36,53,55,56,57,58,60,66,67,71,79,81,82	16	
C212U	11,24,25,36,53,55,60,71	8	
C127U	85,86,87,89,93,94	6	
U186C	24,36,53,60,62,89	6	
C53U	52,75,78,88,91	5	

^aIn at least five variants

^bMutations converting a canonical into a wobble pair or vice versa

^cVariants with only one of the mutations that do not maintain the base-pair interactions

^dVariants with only one of the mutations that maintain the interaction due to conversion of a canonical into a wobble pair or vice versa

Table S2. Sequence heterogeneity found in ELVd full-length variants supporting structure of minus polarity RNA^a

Covariations	Clon identification number	Number of clones	Number of clones with the covariations
A27G	1,5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,31,33,35,37,39,40,42,46,52,54,55,63,65,66,67,70,73,79,81,82,84,85,86,87,88,90,91,92,93,94	49 ^c	
U266C	1,5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,22,23,24,25,27,29,31,33,35,37,39,40,42,46,52,54,55,63,65,66,67,70,74,77,79,81,82,84,85,86,87,88,90,91,92,93,94	49 ^d	46
U183G	5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,23,25,27,29,33,35,37,39,40,42,46,54,57,63,66,67,79,81,82,84,85,87,90,93,94	37 ^d	
A194C	5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,23,25,27,29,33,35,37,39,40,42,46,54,55,63,66,67,79,81,82,84,85,87,90,92,93	36 ^d	35
A64A	6,7,9,11,12,13,17,19,20,21,25,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,55,56,60,63,68,71,84,85,87,93	31 ^d	
A108U	6,7,9,11,12,15,17,19,20,21,25,26,27,29,35,37,39,40,42,46,54,55,56,63,68,71,85,87,93	28 ^d	27
G61A	6,8,12,13,14,15,17,19,20,21,25,27,29,35,37,39,40,42,46,54,63,81,84,85,87,93	26 ^d	
G111U	6,7,9,12,13,17,19,20,21,25,27,29,35,37,39,40,42,46,54,63,85,87,93	23 ^d	21
C63U	5,8,13,18,23,31,45,48,50,51,52,59,62,65,66,74,75,77,78,86,88,90,91,94	24 ^c	
G109A	8,13,18,23,31,46,49,50,51,52,58,59,62,65,68,74,75,77,78,86,88,91,94	23 ^d	21
C291U	6,7,9,12,14,15,17,19,20,21,25,27,37,39,40,42,46,54,65,79,81,85,87,92,93,94	26 ^c	
G298A	5,6,7,9,11,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,31,33,35,36,37,38,40,42,45,46,53,63,65,78,84,87,88	37 ^d	18
A66G	5,14,15,23,33,49,52,57,58,67,69,75,78,79,81,82,88,91	18 ^c	
U106C	5,11,14,16,23,24,25,33,49,52,53,55,57,58,66,67,70,71,75,78,79,81,82,84,88,90,91	27 ^d	17
A120U	5,11,49,52,55,57,58,60,66,67,70,71	12 ^d	
U141A	5,11,14,16,23,25,33,55,57,58,60,66,67,70,71,75,78,79,81,82,84,88,90,91,92,94	26 ^d	10
U49C	14,24,33,56,57,58,67,72,81,82	10 ^d	
A148G	14,24,33,57,58,67,72,81,82	9 ^c	9
U77C	14,49,52,58,70,75,78,88,91	9 ^d	
A100G	49,52,58,70,75,78,88	7	7
U48C	5,11,15,25,29,35,60,71	8	
A149G	5,11,15,25,33,35,57,60,71,84,90	11 ^c	7
C61U	5,16,57,58,66,67,79	7 ^c	
G111A	5,14,16,33,57,66,67,72,79,81,82,84,90	13 ^d	6
C30U	6,7,12,15,17,19,20,21,25,27,29,35,37,39,40,42,45,46,51,54,63,69,74,84,85,87,93	27 ^c	
G168A	6,9,12,13,17,54,59,63	8 ^d	5
Compensatory mutations^b	Clon identification number	Number of clones	
C206U	5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,26,27,29,33,35,37,39,40,42,45,54,63,67,78,79,81,82,84,85,87,90,92,93	35	
C204U	5,6,7,9,12,14,15,16,17,19,20,21,26,27,29,33,35,37,39,40,42,45,54,63,67,78,79,81,82,84,85,87,90,92,93	35	
G242A	5,7,9,12,13,15,17,18,19,20,21,24,26,27,29,33,35,40,42,46,66,67,77,85,87,89,92,93,94	29	
C170U	5,7,9,12,13,17,19,20,21,26,27,29,35,37,39,40,42,45,54,63,85,87,93	23	
C205U	1,10,22,23,31,49,52,57,58,64,65,66,69,70,80,83,86,88,89,91	20	
A262G	5,12,17,20,21,26,27,35,37,63,72,93	12	
A196G	24,36,53,60,62,89	6	
A274G	11,25,55,56,60,71	6	

^aIn at least five variants

^bMutations converting a canonical into a wobble pair or vice versa

^cVariants with only one of the mutations maintain the interaction due to conversion of a canonical into a wobble pair or vice versa

^dVariants with only one of the mutations do not maintain the base pair interactions

Capítulo II

Dissecting the secondary structure of the circular RNA of a nuclear viroid *in vivo*: A “naked” rod-like conformation similar but not identical to that observed *in vitro*

Amparo López-Carrasco and Ricardo Flores

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain

RNA Biology 2016; 1-9. [Epub ahead of print]

doi: 10.1080/15476286.2016.1223005

ABSTRACT

With a minimal (250–400 nt), non-protein-coding, circular RNA genome, viroids rely on sequence/structural motifs for replication and colonization of their host plants. These motifs are embedded in a compact secondary structure whose elucidation is crucial to understand how they function. Viroid RNA structure has been tackled *in silico* with algorithms searching for the conformation of minimal free energy, and *in vitro* by probing in solution with RNases, dimethyl sulphate and bisulphite, and with selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE), which interrogates the RNA backbone at single-nucleotide resolution. However, *in vivo* approaches at that resolution have not been assayed. Here, after confirming by 3 thermodynamics-based predictions and by *in vitro* SHAPE that the secondary structure adopted by the infectious monomeric circular (+) RNA of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is a rod-like conformation with double-stranded segments flanked by loops, we have probed it *in vivo* with a SHAPE modification. We provide direct evidence that a similar, but not identical, rod-like conformation exists in PSTVd-infected leaves of *Nicotiana benthamiana*, verifying the long-standing view that this RNA accumulates *in planta* as a “naked” form rather than tightly associated with protecting host proteins. However, certain nucleotides of the central conserved region, including some of the loop E involved in key functions such as replication, are more SHAPE-reactive *in vitro* than *in vivo*. This difference is most likely due to interactions with proteins mediating some of these functions, or to structural changes promoted by other factors of the *in vivo* habitat.

ABBREVIATIONS

mc and *ml*, monomeric circular and linear PSTVd RNA, respectively; PAGE polyacrylamide gel electrophoresis PSTVd, potato spindle tuber viroid; SHAPE, selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension

INTRODUCTION

In contrast to viruses that encode some of the proteins they need to facilitate their infectious cycle, viroids are just composed by a non-protein-coding, small (250–400 nt), circular RNA.¹⁻⁶ Consequently, these minimal genomes are extremely and specifically dependent on sequence/structural motifs for hijacking components of the transcription, processing and trafficking machineries of their host plants in order to be replicated and invade them systemically, overcoming the defensive barriers they raise.⁷⁻¹¹ Some of such motifs have an intrinsically associated catalytic role, as illustrated by the hammerhead ribozymes,¹²⁻¹³ adopted transiently by the strands of both polarities of plastid-replicating viroids (family *Avsunviroidae*) to mediate self-cleavage of the oligomeric RNAs generated during replication through a symmetric rolling-circle mechanism.⁶ Yet, certain host proteins enhance the catalytic efficiency of these ribozymes.¹⁴

Most other motifs are less complex, seem involved in replication/trafficking, and are embedded in a rod-like secondary structure proposed as an almost universal feature of nuclear replicating viroids (family *Pospiviroidae*, type member potato spindle tuber viroid, PSTVd).¹⁵⁻¹⁷ An example is the RY motif—located close to the terminal right hairpin loop of the rod-like secondary structure of the monomeric circular (*mc*) PSTVd (+) RNA—which is responsible for the specific interaction of this RNA *in vitro* and *in vivo* with the tomato viroid RNA binding protein 1 (Virp1).¹⁸⁻²⁰ The evidence for the rod-like conformation of the *mc* PSTVd (+) RNA is strong *in silico*, with algorithms that retrieve the secondary structure of minimal free energy,²¹⁻²³ and *in vitro*, by biochemical approaches that include probing in solution with RNases, bisulphite and dimethyl sulphate,^{17,24} and more lately by selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE),²⁵⁻²⁷ which provides data on local backbone RNA flexibility at the single-nucleotide level.²⁸⁻³⁰ Additionally, electron microscopy^{31,32} and several biophysical approaches in solution,³³⁻³⁵ also support the aforementioned rod-like secondary structure.

However, direct extrapolation of the existence of a similar structure *in planta* is questionable for reasons discussed previously,^{9,36} prominent among which are the initial thermal denaturation/renaturation applied to RNA for SHAPE analysis *in vitro*, the ionic composition that differs from that of the physiological context, and the interaction of the RNA with different host proteins that may impact significantly on its structure.

Nevertheless, there is evidence, albeit indirect and fragmentary, for such a structure *in vivo*. In brief: i) duplications and deletions observed in natural and artificial variants of several members of the family *Pospiviroidae* preserve the rod-like structure,³⁷⁻⁴⁰ and ii) replication and directional PSTVd trafficking through specific cell boundaries is regulated by RNA motifs, particularly loops, of the rod-like secondary structure (see below). The high genetic variability observed in members of the family *Avsunviroidae*, a likely consequence of their high mutation rate,⁴¹ makes it feasible to validate the *in silico* and *in vitro* conformations by the presence in natural sequence variants of co-variations and conversions of canonical into wobble base-pairs, or vice versa, that preserve the pairing of most double-stranded stems and even tertiary interactions.^{36,42,43} Unfortunately, the lower genetic variability of members of the family *Pospiviroidae* precludes a similar analysis and leaves open an important issue.

Because novel reagents have been recently developed to extend SHAPE methodology to *in vivo* conditions,⁴⁴⁻⁴⁵ we decided to apply such approach to dissect the conformation of the *mc* PSTVd (+) RNA in infected leaves of the experimental host *Nicotiana benthamiana*. Our results confirm the existence of a rod-like “naked” conformation *in vivo* showing minor, but significant, changes with that obtained *in silico* and *in vitro*. Intriguingly, some of the differences map at nucleotides of the lower strand of the central conserved region (CCR),⁴⁶ particularly at loop E with a crucial role in replication.⁴⁷⁻⁴⁹ Such differences most likely result from interactions with host proteins or with other factors present in the *in vivo* habitat.

RESULTS

***In silico* predictions lead to a rod-like conformations for the *mc* PSTVd (+) strand**

Although other PSTVd variants, particularly the so-called intermediate strain from potato (GenBank accession number NC_002030),^{15,17} have been subjected to multiple thermodynamics- and kinetics-based predictions,^{33-35,50} this is neither the case for the NB variant (GenBank accession number AJ634596.1)^{51,52} used in the present study, nor for the dahlia variant (GenBank accession number AB623143.1)⁵³ used in SHAPE *in vitro*.²⁶ Moreover, we were specifically interested in the secondary structure of the *mc* PSTVd (+) RNA, which predominates in infected tissue and is the most relevant viroid form for priming the asymmetric rolling-circle replication and for trafficking *in vivo*.^{48,54-59} As in a recent report dealing with another viroid,³⁶ we tackled this issue with

3 independent softwares: *Mfold*,²¹ *RNAfold*²² and *RNAstructure*,^{23,60} the first 2 with the version for circular RNAs not available for the third one. The three softwares generated essentially the same rod-like conformation of minimal free energy for the NB variant, except 2 alternative motifs predicted by *RNAfold* and one small alternative motif predicted by *Mfold* (in the 3 instances with a relatively low probability) (Figure 1), thus indicating a high degree of coherence between them.

When the conformation of the NB variant *in silico* was compared with those of the intermediate and dahlia variants, in all cases obtained using *RNAstructure* that is the software usually implemented in SHAPE *in vitro* and *in vivo*,⁶⁰ additional alternative motifs were observed in the rod-like structure, particularly with the dahlia variant (Figure S1). Such differences most likely result from changes in the nucleotide sequence: 6 substitutions between the NB and the intermediate variants, and 9 substitutions plus 3 indels between the NB and dahlia variants (Figure S1).

Non-denaturing PAGE shows that the *mc* PSTVd (+) RNA adopts a predominant secondary structure *in vitro*

Then we moved to analyze if, according to *in silico* predictions, the *mc* PSTVd (+) form folds into a major conformation in solution. For such purpose, this RNA was isolated and purified from infected tissue and then examined by non-denaturing PAGE. Before electrophoresis, 2 aliquots of the purified RNA resuspended in water were heated at 95°C for 2 min and either gradually-cooled at 25°C along 15 min or snap-cooled on ice, serving as control a third non-treated aliquot. The samples were then incubated at 37 °C for 5 min in the folding buffer.²⁹ Three additional aliquots were similarly processed, but the folding buffer was supplemented with 6 mM Mg²⁺. The mobility of the *mc* PSTVd (+) RNA was unaffected by the treatments (Figure 2), as also occurred when the Mg²⁺ was added before heating at 95°C for 2 min, although in this latter case the band intensity became attenuated as a likely consequence of the RNA hydrolysis promoted by this metal (data not shown). Importantly, a prominent single band was observed in all instances, consistent with the view that the *mc* PSTVd (+) form adopts *in vitro* a single secondary structure, without excluding the presence of others with minor modifications indiscernible by non-denaturing PAGE.

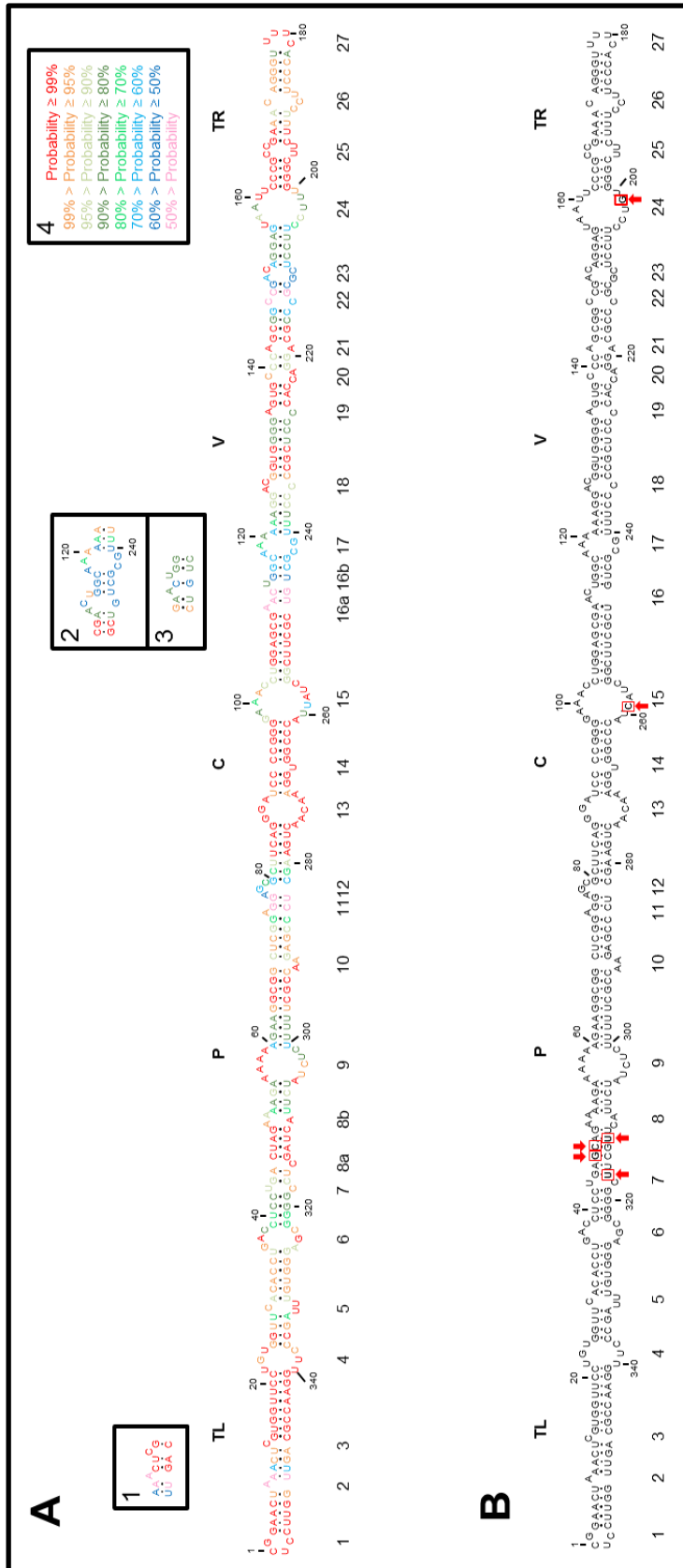


Figure 1. (A) Rod-like secondary structure of minimum free energy predicted by *RNAstructure* for the *mc* PSTVd (+) RNA of the NB variant. Insets (1) and (2), alternative motifs predicted by *RNAfold* and inset (3), alternative motif predicted by *Mfold*. Colors denote the probability (see inset 4) of a nucleotide being double- or single-stranded as predicted by *RNAstructure*. (B) Rod-like secondary structure of minimum free energy proposed for the *mc* PSTVd (+) RNA of the intermediate variant,⁸² which differs from NB in 6 substitutions: C46>G, U47>C, U201>G, U259>C, A313>U, and C317>U (within squares and marked with arrows). The structure of the intermediate variant, which is presented here for comparative purposes and as a reference for loop numbering,⁴⁸ has been edited to remove a non-existing extra G-C base-pair adjacent to the terminal left loop.⁴⁸ Loops 8 and 16 in the intermediate variant are split in the NB variant into 8a and 8b, and 16a and 16b, respectively. TL (terminal left), P (pathogenicity), C (central), V (variable) and TR (terminal right) are structural domains defined previously.⁸²

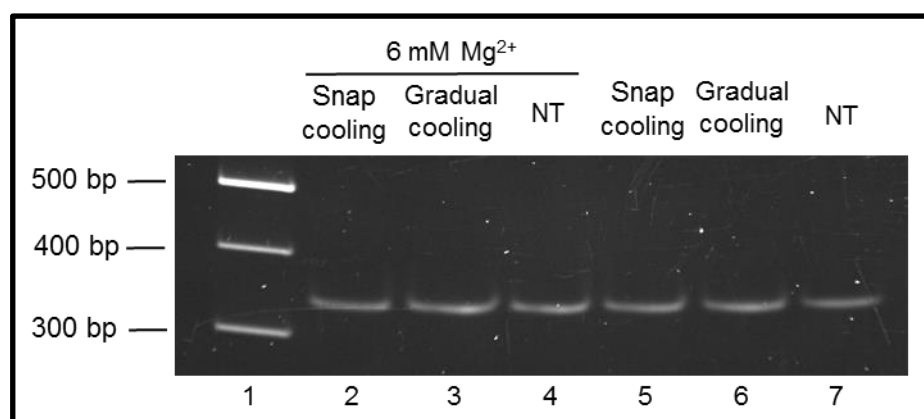


Figure 2. The mobility of the *mc* PSTVd (+) RNA in non-denaturing 5% PAGE remains unaffected after different thermal treatments. Before electrophoresis, aliquots of the gel-eluted RNA were heated at 95°C for 2 min and snap-cooled on ice (lane 2 and 5), gradually-cooled at 25°C along 15 min (lane 3 and 6), or left without thermal treatment (NT) (lane 4 and 7). The RNAs were subsequently renatured at 37 °C for 5 min in the folding buffer (with or without 6 mM Mg²⁺). M refers to DNA markers with their size (in base pairs) indicated on the left (lane 1). The gel was stained with ethidium bromide.

***In vitro* SHAPE with N-methylisatoic anhydride (NMIA) confirms the rod-like conformation inferred *in silico* for the *mc* PSTVd (+) RNA**

The observation that the *mc* PSTVd (+) RNA adopts *in vitro* a main conformation, made it possible to probe such secondary structure at single-nucleotide resolution with SHAPE *in vitro* using NMIA²⁹ coupled to computer-assisted prediction using *RNAstructure*.⁶⁰ In order to cover entirely the whole molecule, 2 independent primers were used. The analysis with these 2 primers led to consistent results that were also in good agreement with those predicted *in silico*: the overall conformation adopted *in vitro* by the *mc* PSTVd (+) RNA is a rod-like secondary structure with, excepting minor rearrangements, similar double-stranded segments interspersed with small loops (Figure 3A).

Importantly, of the motifs for which the physical and/or biological evidence supporting their existence and involvement in replication/trafficking is strongest — loops 6, 7, 15 (loop E) and 24 (numbering according to;⁴⁸ see below for a more detailed account of their functions)— all except loop 24 were preserved. We do not know the cause for such discrepancy but the evidence sustaining this loop is only biological and not structural.⁵¹ Other motifs, including loops 13 and 14 (located in the CCR and,

therefore, most likely relevant from a functional perspective), and loops 23 and 26 (the internal and external RY motifs involved in binding VirP1),¹⁸ were also preserved.

It is worth noting that this is the first SHAPE analysis *in vitro* performed with the *mc* PSTVd (+) RNA, which apart from being the form that triggers infection and mediates trafficking *in vivo* (see above), should adopt its intra-molecular cooperative folding more easily than the monomeric linear (*ml*) counterparts used in previous SHAPE studies *in vitro*.^{26,27}

***In vitro* SHAPE with 2-methylnicotinic acid imidazolide (NAI) further supports the rod-like conformation predicted for the *mc* PSTVd (+) RNA**

Because we were planning to use NAI as the acylating reagent for SHAPE *in vivo*,^{44,45} we first examined with the same 2 primers used before how consistent was the NAI-derived conformation *in vitro* for the *mc* PSTVd (+) RNA with that determined with NMIA. In both instances a similar rod-like secondary structure was obtained, and what is even more significant, with essentially the same loops (Figures 3A and B).

Altogether, the excellent concordance of *in vitro* SHAPE results with NMIA and NAI provided us with the confidence to take the next step and analyze the conformation of the *mc* PSTVd (+) RNA *in planta* with the latter reagent, which due to its higher $t_{1/2}$ hydrolysis,⁴⁵ is more appropriate for SHAPE studies *in vivo*.

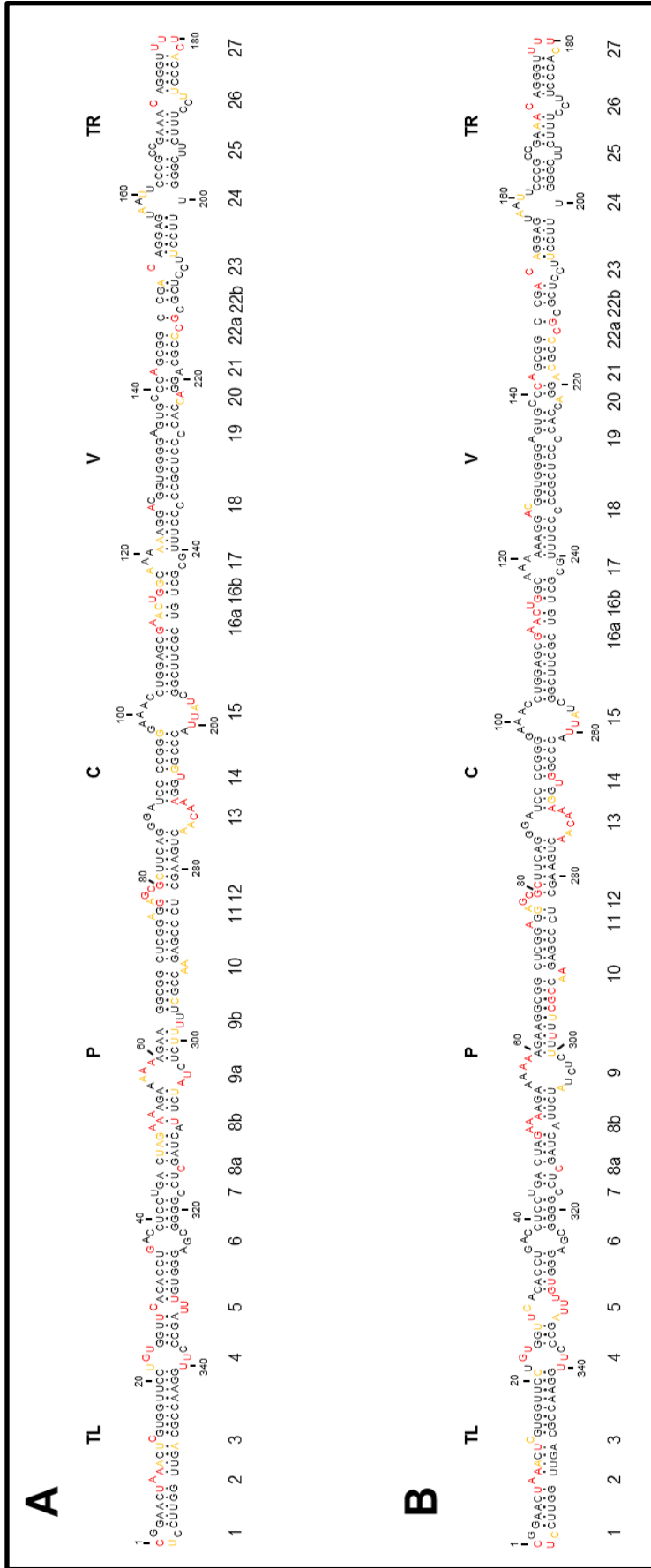


Figure 3. *In vitro* SHAPE analysis supports a rod-like conformation for the *mc* PSTVd (+) RNA. (A) and (B) Results obtained with N-methylisatoic anhydride (NMIA) and 2-methylisatoic acid imidazolide (NAI), respectively, coupled to computer-assisted prediction using *RNAstructure*. Nucleotides in red, yellow and black displayed high (more than 0.85), intermediate (0.85–0.40) and low (less than 0.40) SHAPE-reactivity. Other details regarding domains and loops as in the legend to Figure 1.

SHAPE analysis of the *mc* PSTVd (+) RNA in infected leaves of *Nicotiana benthamiana* reveals a “naked” rod-like conformation with minor but significant differences with that observed *in vitro*

We essentially followed a NAI-based procedure described previously replacing radioactive by fluorescent labeling.⁴⁴ The other most significant modification was that, following NAI infiltration of PSTVd-infected leaves and RNA extraction and clarification, the *mc* PSTVd (+) RNA was purified according to a double PAGE approach (see Materials and Methods).³⁶ Such modification ensured that the stops observed during reverse transcription occurred in the *mc* PSTVd (+) RNA. Moreover, to confirm that acylation of this RNA took place *in planta* and not during the ensuing isolation, we performed an additional control:⁴⁴ a preparation of *ml* forms of eggplant latent viroid (+) RNA obtained by *in vitro* transcription³⁶ was incorporated immediately after homogenization of the PSTVd-infected tissue infiltrated with NAI. Subsequent SHAPE analysis of this externally-added RNA control failed to reveal the reactivity observed previously *in vitro*³⁶ (data not shown). We also discarded that the grinding procedure might influence the final outcome because homogenization of NAI-infiltrated PSTVd-infected tissue, with either a mechanical device or with liquid nitrogen, led essentially to the same results (data not shown).

Examination of the data obtained showed that this RNA indeed adopts a rod-like conformation *in vivo* —an observation relevant per se because it indicates that this RNA accumulates *in planta* essentially as a “naked” form rather than in tight association with protecting host proteins— in which, as a general trend, loops were more reactive than double-stranded segments. A closer inspection, however, revealed minor but significant differences when this conformation *in vivo* was compared with that derived from SHAPE *in vitro* using NAI and the same 2 primers (Figure 4). The most significant differences are as follows. First, the structure of loop 6 [CGA(36–38)/GAC(323–325) flanked by *cis* Watson-Crick G/C and G/U wobble base-pairs] mediating trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll,⁵⁹ and of loop 7 (U43/C318) critical for systemic trafficking,⁵⁸ remained essentially unchanged *in vitro* and *in vivo*. Notably, except A325 and G326, the corresponding nucleotides displayed no SHAPE reactivity, thus indicating that these 2 loops fold into compact structures not accessible to the acylating reagent. Second, some nucleotides of the lower strand of loop 13 [AACAA(270–275)] forming part of the CCR, were more reactive *in vitro* than *in vivo*,

consistent with the idea that they are somewhat protected under the latter conditions. Third, on the basis of UV cross-linking studies *in vitro*⁶¹ and *in vivo*,^{62,63} nuclease and chemical mapping in solution,²⁴ and sequence comparison, isostericity matrices and mutagenic analyses,⁵⁷ it has been inferred that a loop E (sarcin/ricin) motif exists in PSTVd (loop 15). This loop, which also forms part of the CCR and encompasses 5 core non-Watson-Crick base-pairs⁵⁷ and a bulged nucleotide (U259 in variant NB),^{57,64} has been involved in transcription/accumulation,⁵⁷ ligation,^{47,65} host specificity⁶⁴ and pathogenesis,⁶⁶ with some of these functions being possibly interdependent. Some nucleotides of the lower strand of loop E were more reactive *in vitro* than *in vivo*, resembling the situation observed in loop 13 and leading to a similar inference. However, no difference was detected in the intervening loop 14 (U267), with this bulged nucleotide showing similar SHAPE reactivity *in vitro* and *in vivo*. Fourth, loop 24 containing U201 as predicted *in silico* (Figure 1A), is proposed to form part of a bipartite RNA motif mediating trafficking from the bundle sheath to mesophyll in young tobacco leaves;⁵¹ this loop is reorganized according to *in vitro* and *in vivo* SHAPE (Figure 3 and 4), with the critical U201⁵¹ now found in an adjacent and basically non-reactive double-stranded segment. And fifth, some nucleotides of the lower strand of loop 23 [C150/UCC(206–208)] and loop 26 [C172/UCC(187–189)], forming part of the VirP1-binding RY-motifs,¹⁸ displayed lower SHAPE reactivity *in vitro* than *in vivo*, which might indicate some sort of rearrangement in the physiological context.

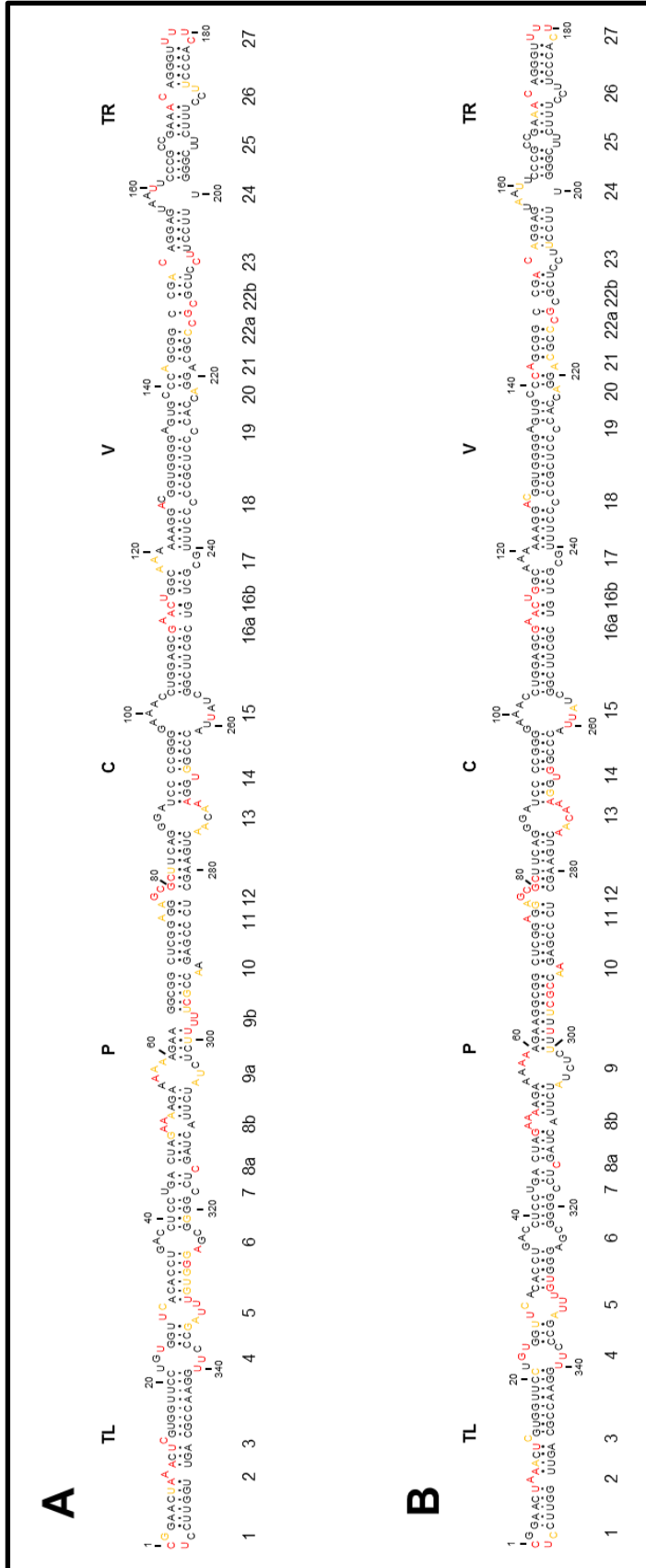


Figure 4. *In vivo* SHAPE analysis corroborates a rod-like conformation for the *mc* PSTVd (+) RNA. (A) Results obtained with NAI *in vivo* coupled to computer-assisted prediction using *RNAstructure*. (B) Results obtained with the same acylating agent *in vitro* (see Figure 3B) are included here to facilitate a direct comparison. Other details as in the legends to Figures 1 and 3.

DISCUSSION

Recent work has shown that SHAPE chemistry (with NAI) permits structural probing of RNAs of *Arabidopsis thaliana*,⁴⁴ extending to the plant kingdom previous studies in bacteria, yeast, fly and mammalian cells.⁴⁵ Moreover, among the RNAs of *A. thaliana* examined is the U12 small nuclear RNA,⁴⁴ indicating that NAI can gain access not only to the cytoplasm but also to organelles—like the nucleus—surrounded by a membrane. This finding is important for the present study because most viroids, including PSTVd, have a nuclear replication and accumulation.

Due to their peculiar properties, viroids must express their associated phenotype without resorting to protein intermediation, mostly relying on sequence/structural motifs embedded in the genomic RNA. Therefore, to dissect finely the conformation of this RNA *in vivo* is of crucial importance but, unfortunately, no viroid has been reported to infect *A. thaliana*.⁵⁶ To address such issue we have selected the system PSTVd/*N. benthamiana* because this viroid was the first identified and sequenced,¹⁵⁻¹⁷ and because the available data about its physical and biological properties exceeds by far those on any other viroid. And *N. benthamiana* because it is an experimental host in which PSTVd accumulates to a relatively high titer,^{51,52} and because this virological model plant is very convenient for infiltration studies, particularly with *Agrobacterium tumefaciens*;⁶⁷ hence, we presumed an easy and quick penetration of NAI, the acylating reagent commonly used for *in vivo* SHAPE.

But first we re-examined the structure of minimal free energy predicted for the *mc* PSTVd (+) RNA (NB variant) by 3 softwares, which generated an almost identical rod-like conformation similar to that proposed previously for this^{51,52} and other PSTVd variants including the intermediate and that from dahlia.^{17,48,53} On the other hand, non-denaturing PAGE of the *mc* PSTVd (+) RNA from NB variant showed a predominant band consistent with a single major folding amenable to *in vitro* SHAPE, which indeed provided a well-resolved and essentially coincidental structure with 2 acylating reagents (NMIA and NAI). Moreover, this conformation is similar to that obtained previously for the PSTVd intermediate and dahlia variants by *in vitro* SHAPE with benzoyl cyanide (BzCN) (Figure S2).^{26,27} The small differences observed could arise from using in the *in vitro* SHAPE analyses distinct PSTVd variants and forms (*mc* and *ml*), acylating agents (NMIA and NAI on the one side, and BzCN on the other) and folding conditions. In any case, a key point in the present study is the use of the same acylating reagent (NAI) for

the *in vitro* and *in vivo* SHAPE of the same variant (NB), making the corresponding results directly comparable.

Globally, the rod-like conformation adopted by the *mc* PSTVd (+) RNA *in vivo* resembles that predicted *in silico* and inferred *in vitro* in a protein-free milieu, thus showing that it is not covered by tightly-associated host protein(s) mimicking the protecting role of coat proteins in viruses (although we cannot exclude the existence of loose RNA-protein interactions or of proteins interacting with double-stranded RNA motifs, which may be undetectable by SHAPE). In other words, our finding affords the first direct evidence supporting the long-held tenet^{15,68} that such RNA is essentially “naked” in its major subcellular habitat, the nucleolus,^{69,70} wherein a significant fraction of the accumulating *mc* PSTVd (+) RNA may function as a reservoir or storage molecule.^{11,71} During replication, synthesis of (+) and (-) strands of PSTVd and closely-related viroids occurs in the nucleoplasm,⁶⁹ catalyzed by RNA polymerase II⁷²⁻⁷⁵ in association with transcription factor IIIA.^{76,77} Subsequent processing of oligomeric (+) strands most likely takes place in the nucleolus:^{56,69} cleavage directed by the upper CCR strand and catalyzed by a class III RNase, and ligation directed by both CCR strands — particularly by loop E (loop 15) possibly assisted by proximal loops 13 and 14— and catalyzed by DNA ligase 1.^{47,49} Loop E, conserved in the rod-like conformation of all members of the genus *Pospiviroid* to which PSTVd belongs, positions the termini to be joined in close proximity and proper orientation.^{47,78} Being ligation the last step of the replication cycle, DNA ligase 1 —or some auxiliary factor— might remain attached to its substrate, thus accounting for the differences observed in loop 13 and loop E between *in vitro* and *in vivo* SHAPE; other explanations, however, cannot be ruled out.

In summary, we provide direct evidence at single-nucleotide resolution that the *mc* PSTVd (+) RNA indeed adopts a rod-like conformation *in vivo*. However, within this peculiar conformation, some nucleotides forming part of key functional motifs, e.g. loop E, are more SHAPE-reactive *in vitro* than *in vivo*, suggesting that they may locally interact with host proteins and through them exert their physiological role. On the other hand, being a “naked” RNA, the *mc* PSTVd (+) RNA must have evolved to become resistant to degradation through an RNA-based rather than through a protein-based strategy: the lack of free termini in the rod-like conformation makes it resistant against exonucleases, while its compact folding —to a large extent stabilized by double-stranded segments— plays a similar role against endonucleases acting upon either

single-stranded regions (like most RNases), or double-stranded segments above a certain length (like the Dicer-like enzymes involved in RNA silencing). The loops, besides limiting that length and providing additional stability, would mediate several key roles including replication and trafficking. Consistent with the intrinsic resistance of the *mc* PSTVd (+) RNA, the subgenomic viroid RNAs characterized in some PSTVd-infected hosts do not seem to result from cleavage of this form but of replication intermediates.⁷¹ It will be interesting to extend the approach developed here to additional viroid/host combinations, although limitations posed by the low viroid accumulation and/or penetration of the acylating reagent will have to be previously overcome.

MATERIALS AND METHODS

Extraction, purification and analysis of the *mc* PSTVd (+) RNA

Total nucleic acids from young leaves of PSTVd-infected *N. benthamiana* were extracted with phenol-saturated buffer⁷⁹ and then fractionated on non-ionic cellulose (CF11; Whatman) with STE (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing 35% ethanol. The viroid-enriched preparations were treated with methoxyethanol for removing polysaccharides.⁸⁰ Following PAGE in a 5% gel under non-denaturing conditions with 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA), a segment delimited by the DNA markers of 300 and 400 bp was cut, applied on top of a single-well 5% polyacrylamide gel, and electrophoresed under denaturing conditions with 0.25X TBE (Tris-Borate-EDTA) and 8 M urea. The second gel was stained with ethidium bromide and the band of interest, identified with appropriate markers, was excised and the corresponding *mc* PSTVd (+) RNA eluted overnight with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 1 mM EDTA and 0.1% SDS, and recovered by ethanol precipitation. This RNA, after being treated as indicated in Results, was examined by non-denaturing PAGE.

Thermodynamics-based prediction of RNA structure

The structures of minimal free energy for the *mc* PSTVd (+) RNA were determined with 3 softwares: *Mfold* version 4.7²¹ and *RNAfold* included in the ViennaRNA package version 2.2.5²² using the circular version and default parameters,

and *RNAstructure* version 5.8 (*Shapeknots*),^{23,60} using the default parameters and beginning the sequence of the linear RNA at position 1.

***In vitro* SHAPE**

The substrate for this analysis was the *mc* PSTVd (+) RNA purified from infected *N. benthamiana*. SHAPE *in vitro* with N-methylisatoic anhydride (NMIA) was performed essentially as reported.²⁹ The RNA (3 pmol) was heated at 95°C for 2 min, put on ice for 15 min, and renatured at 37°C for 5 min in the folding buffer (100 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl₂). Acylation started by adding NMIA (6 mM in dimethyl-sulfoxide), while only dimethyl-sulfoxide was incorporated to the control reaction. To generate the 2'-O-adducts, reaction mixtures were incubated at 37°C for 15 min and ended by adding 3 volumes of ethanol. The RNA was recovered by centrifugation, washed 3 times with 70% ethanol, and subjected to primer extension. SHAPE *in vitro* with 2-methylnicotinic acid imidazolide (NAI, 50 mM in dimethyl-sulfoxide) was performed similarly, with NAI being synthesized as reported previously.⁴⁵ The data obtained were coupled to computer-assisted prediction.⁶⁰ VIC-labeled fluorescent DNA primers (Applied Biosystems) RF-1242 (5'-AAACCCTGTTTCGGCGGGAATTAC-3') and RF-1367 (5'-GGAGGTCAGGTGTGAACCACAGG-3'), complementary to positions 156–179 and 20–42, respectively, were purified by denaturing PAGE in 20% gels. After adding 4 pmol of the primer, the RNAs with and without the acylating reagent were heated to 95°C for 2 min and snap-cooled on ice for 15 min. Extensions were performed at 52°C for 1 h (in a 20 µl reaction volume) with 100 U SuperScript III RT (Invitrogen) and 0.5 mM dNTPs in the buffer recommended by the supplier.

Sequencing reactions used to identify the peaks were prepared in a similar way but adding 10 mM of ddGTP to the primer extension mix and using the same primers, tagged with the NED fluorophore, and non-modified RNA. The resulting cDNAs were ethanol-precipitated, recovered by centrifugation, washed 3 times with 70% ethanol, resuspended in deionized formamide and resolved by capillary electrophoresis in an ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) as previously described.³⁰ Electropherograms were analyzed using the QuShape software,⁸¹ which also normalized the reactivity data. At least 4 *in vitro* SHAPE replicas were performed with each primer

and acylating reagent, and the mean and standard deviation of the reactivity of each nucleotide was calculated.

***In vivo* SHAPE**

Young leaves (15 g) of PSTVd-infected *N. benthamiana* were mixed with 200 ml of the reaction buffer (40 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂) and gently shaken for 5 min. *In planta* acylation was performed by adding NAI (100 mM in dimethyl-sulfoxide and just dimethyl-sulfoxide to the control reaction) and shaking the mixture at room temperature for 15 min. After adding β-mercaptoethanol (500 mM) and shaking for another 10 min to stop the reaction, the leaves were drained and washed 4 times with water (250 ml). Extraction, purification, and primer-extension of the *mc* PSTVd (+) RNA was as with *in vitro* SHAPE. At least 3 *in vivo* SHAPE replicas were performed with each primer, and the mean and standard deviation of the reactivity of each nucleotide was calculated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Cristina Romero and Alicia Barroso for their valuable help with the initial SHAPE experiments, Drs. Sonia Delgado and Pedro Serra for helpful advise, and A. Ahuir for excellent technical assistance.

FUNDING

This work was supported by grant BFU2014-56812-P (to R.F.) from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain. A.L.C. was the recipient of a predoctoral fellowship from the same organism.

REFERENCES

1. Diener TO. Discovering viroids—a personal perspective. *Nature Rev Microbiol* 2003; 1:75-80
2. Flores R, Hernández C, Martínez de Alba E, Daròs JA, Di Serio F. Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 2005; 43:117-39
3. Tsagris EM, Martínez de Alba AE, Gozmanova M, Kalantidis K. Viroids. *Cell Microbiol* 2008; 10:2168-79
4. Kovalskaya N, Hammond RW. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci* 2014; 228:48-60
5. Palukaitis P. What has been happening with viroids? *Virus Genes* 2014; 49:175-84

6. Flores R, Minoia S, Carbonell A, Gisel A, Delgado S, López-Carrasco A, Navarro B, Di Serio F. Viroids, the simplest RNA replicons: how they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Res* 2015; 209:136-45
7. Ding B. The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 2009; 47:105-31
8. Ding B. Viroids: self-replicating, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1:362-75
9. Flores R, Serra P, Minoia S, Di Serio F, Navarro B. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front Microbiol* 2012; 3:217
10. Rao AL, Kalantidis K. Virus-associated small satellite RNAs and viroids display similarities in their replication strategies. *Virology* 2015; 479-480:627-36
11. Steger G, Perreault JP. Structure and associated biological functions of viroids. *Adv Virus Res* 2016; 94:141-72
12. Hutchins C, Rathjen PD, Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:3627-40
13. Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 1986; 231:1577-80
14. Daròs JA, Flores R. A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J* 2002; 21:749-59
15. Diener TO. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 1971; 45:411-28
16. Diener TO. Potato spindle tuber viroid VIII. Correlation of infectivity with a UV-absorbing component and thermal denaturation properties of the RNA. *Virology* 1972; 50:606-9
17. Gross HJ, Domdey H, Lossow C, Jank P, Raba M, Alberty H, Sängler HL. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 1978; 273:203-8
18. Gozmanova M, Denti MA, Minkov IN, Tsagris M, Tabler M. Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5534-43
19. Martínez de Alba AE, Sägesser R, Tabler M, Tsagris M. A bromodomain-containing protein from tomato binds specifically potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 2003; 77:9685-94
20. Kalantidis K, Denti MA, Tzortzakaki S, Marinou E, Tabler M, Tsagris M. Virp1 is a host protein with a major role in potato spindle tuber viroid infection in *Nicotiana* plants. *J Virol* 2007; 81:12872-80
21. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3406-15
22. Lorenz R, Bernhart SH, Hoener zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. ViennaRNA Package 2.0 *Algorith Mol Biol* 2011; 6:26
23. Reuter JS, Mathews DH. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinform* 2010; 11:129

24. Gast FU, Kempe D, Spieker RL, Sänger HL. Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J Mol Biol* 1996; 262:652-70
25. Xu W, Bolduc F, Hong N, Perreault JP. The use of a combination of computer-assisted structure prediction and SHAPE probing to elucidate the secondary structures of five viroids. *Mol Plant Pathol* 2012; 13:666-76
26. Giguère T, Raj Adkar-Purushothama C, Perreault J-P. Comprehensive secondary structure elucidation of four genera of the family *Pospiviroidae*. *PLoS ONE* 2014; 9:e98655
27. Adkar-Purushothama CR, Brosseau C, Giguère T, Sano T, Moffett P, Perreault JP. Small RNA derived from the virulence modulating region of the potato spindle tuber viroid silences callose synthase genes of tomato plants. *Plant Cell* 2015; 27:2178-94
28. Merino EJ, Wilkinson KA, Coughlan JL, Weeks KM. RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J Am Chem Soc* 2005; 127:4223-31
29. Wilkinson KA, Merino EJ, Weeks KM. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nature Protoc* 2006; 1:1610-6
30. Mortimer SA, Weeks, KM. Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one second snapshots and at single nucleotide resolution. *Nature Protoc* 2009; 4:1413-21
31. Sogo JM, Koller T, Diener TO. Potato spindle tuber viroid X. Visualization and size determination by electron microscopy. *Virology* 1973; 55:70-80
32. Sänger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt A. Viroids are single-stranded covalently-closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73:3852-6
33. Riesner D, Henco K, Rokohl U, Klotz G, Kleinschmidt AK, Domdey H, Jank P, Gross HJ, Sänger HL. Structure and structure formation of viroids. *J Mol Biol* 1979; 133:85-115
34. Riesner, D. Kaper, JM, Randles JW. Stiffness of viroids and viroid-like RNA in solution. *Nucleic Acids Res* 1982; 10:5587-98
35. Dingley AJ, Steger G, Esters, B, Riesner D, Grzesiek S. Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis. *J Mol Biol* 2003; 334:751-67
36. López-Carrasco A, Gago-Zachert S, Mileti G, Minoia S, Flores R, Delgado S. The transcription initiation sites of eggplant latent viroid strands map within distinct motifs in their *in vivo* RNA conformations. *RNA Biol* 2016; 13:83-97
37. Haseloff J, Mohamed NA, Symons RH. Viroid RNAs of the cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* 1982; 229:316-21
38. Semancik JS, Szychowski JA, Rakowski AG, Symons RH. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J Gen Virol* 1994; 75:727-32

39. Wassenegger M, Heimes S, Sänger HL. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO J* 1994; 13:6172-7
40. Fadda Z, Daros JA, Flores R, Durán-Vila N. 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* 2003; 97:145-9
41. Gago S, Elena SF, Flores R, Sanjuán R. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science* 2009; 323:1308
42. Ambrós S, Hernández C, Desvignes JC, Flores R. 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* 1998; 72:7397-06
43. Gago S, De la Peña, M, Flores R. A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its *in vitro* folding and *in vivo* viability. *RNA* 2005; 11:1073-83
44. Kwok CK, Ding Y, Tang Y, Assmann SM, Bevilacqua PC. Determination of *in vivo* RNA structure in low-abundance transcripts. *Nat Commun* 2013; 4:2971
45. Spitale RC, Crisalli P, Flynn RA, Torre EA, Kool ET, Chang HY. RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat Chem Biol.* 2013; 9:18-20
46. McInnes, JL, and Symons, RH. Comparative structure of viroids and their rapid detection using radioactive and nonradioactive nucleic acid probes. In *Viroids and Satellites: Molecular Parasites at the Frontier of Life* (Maramorosch K. ed.) p. 21-58, *CRC Press, Boca Raton, Fl.* 1991
47. Gas ME, Hernández C, Flores R, Daros JA. Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog* 2007; 3:1813-26
48. Zhong X, Archual AJ, Amin AA, Ding B. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell* 2008; 20:35-47
49. Nohales MA, Flores R, Daros JA. A viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:13805-10
50. Repsilber D, Wiese S, Rachen M, Schröder AW, Riesner D, Steger G. Formation of metastable RNA structures by sequential folding during transcription: time-resolved structural analysis of potato spindle tuber viroid (-)-stranded RNA by temperature-gradient gel electrophoresis. *RNA* 1999; 5:574-84
51. Qi Y, Pelissier T, Itaya A, Hunt E, Wassenegger M, Ding B. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell* 2004; 16:1741-52
52. Di Serio F, Martínez de Alba AE, Navarro B, Gisel A, Flores R. RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a nuclear-replicating viroid. *J Virol* 2010; 84:2477-89
53. Tsushima T, Murakami S, Ito H, He Y-H, Raj APC, Sano, T. Molecular characterization of potato spindle tuber viroid in dahlia. *J Gen Plant Pathol* 2011; 77:253-6
54. Branch AD, Benenfeld BJ, Robertson HD. Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9128-32

55. Feldstein PA, Hu Y, Owens RA. Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6560-65
56. Daròs JA, Flores R. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family *Pospiviroidae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:6792-97
57. Zhong X, Leontis N, Qiang S, Itaya A, Qi Y, Boris-Lawrie K, Ding B. Tertiary structural and functional analysis of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J Virol* 2006; 80:8566-81
58. Zhong X, Tao X, Stombaugh J, Leontis N, Ding B. Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.* 2007; 26:3836-46
59. Takeda R, Petrov AI, Leontis NB, Ding B. A three-dimensional RNA motif in potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 2011; 23:258-72
60. Hajdin CE, Bellaousov S, Huggins W, Leonard CW, Mathews DH, Weeks KM. Accurate SHAPE-directed RNA secondary structure modeling, including pseudoknots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:5498-503
61. Branch, AD, Benenfeld BJ, Robertson HD. Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:6590-4
62. Eiras M, Kitajima EW, Flores R, Daròs JA. Existence *in vivo* of the loop E motif in potato spindle tuber viroid RNA. *Arch Virol* 2007; 152:1389-93
63. Wang Y, Zhong X, Itaya A, Ding B. Evidence for the existence of the loop E motif of potato spindle tuber viroid *in vivo*. *J Virol* 2007; 81:2074-7
64. Wassenegger M, Spieker RL, Thalmeir S, Gast FU, Riedel L, Sänger, HL. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 1996; 226:191-7
65. Gas ME, Molina-Serrano D, Hernández C, Flores R, Daròs JA. 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* 2008; 82:10321-5
66. Qi Y, Ding B. Qi Y, Ding B. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* 2003; 15:1360-74
67. Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; 2:1015-26
68. Diener TO. 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 exist in extracts or *in situ*. *Virology* 1971; 43:75-98
69. Qi Y, Ding B. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* 2003; 15:2566-77

70. Harders J, Lukacs N, Robert-Nicoud M, Jovin JM, Riesner D. Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J* 1989; 8:3941-49
71. Minoia S, Navarro B, Delgado S, Di Serio F, Flores R. 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*. *Nucleic Acids Res* 2015; 43:2313-25
72. Mühlbach H, Sängler HL. Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature* 1979; 278:185-8
73. Flores R, Semancik JS. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79:6285-8
74. Schindler IM, Mühlbach HP. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* 1992; 84:221-9
75. Warrilow D, Symons RH. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch Virol* 1999; 144:2367-75
76. Eiras M, Nohales MA, Kitajima EW, Flores R, Daròs JA. Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind *in vitro* specifically potato spindle tuber viroid RNA. *Arch Virol* 2011; 156:529-33
77. Wang Y, Qu J, Ji S, Wallace AJ, Wu J, Li Y, Gopalan V, Ding B. A land plant-specific transcription factor directly enhances transcription of a pathogenic noncoding RNA template by DNA-dependent RNA polymerase II. *Plant Cell* 2016; 28:1094-107
78. Baumstark T, Schröder AR, Riesner D. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J* 1997; 16:599-610
79. Pallás V, Navarro A, Flores R. Isolation of a viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid. *J Gen Virol* 1987; 68:3201-5
80. Bellamy AR, Ralph RK. Recovery and purification of nucleic acids by means of cetyltrimethylammonium bromide. *Methods Enzymol* 1968; XII:156-60
81. Karabiber F, McGinnis JL, Favorov OV, Weeks KM. QuShape: Rapid, accurate, and best-practices quantification of nucleic acid probing information, resolved by capillary electrophoresis. *RNA* 2013; 19:63-73
82. Keese P, Symons RH. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:4582-8

SUPPLEMENTARY MATERIAL

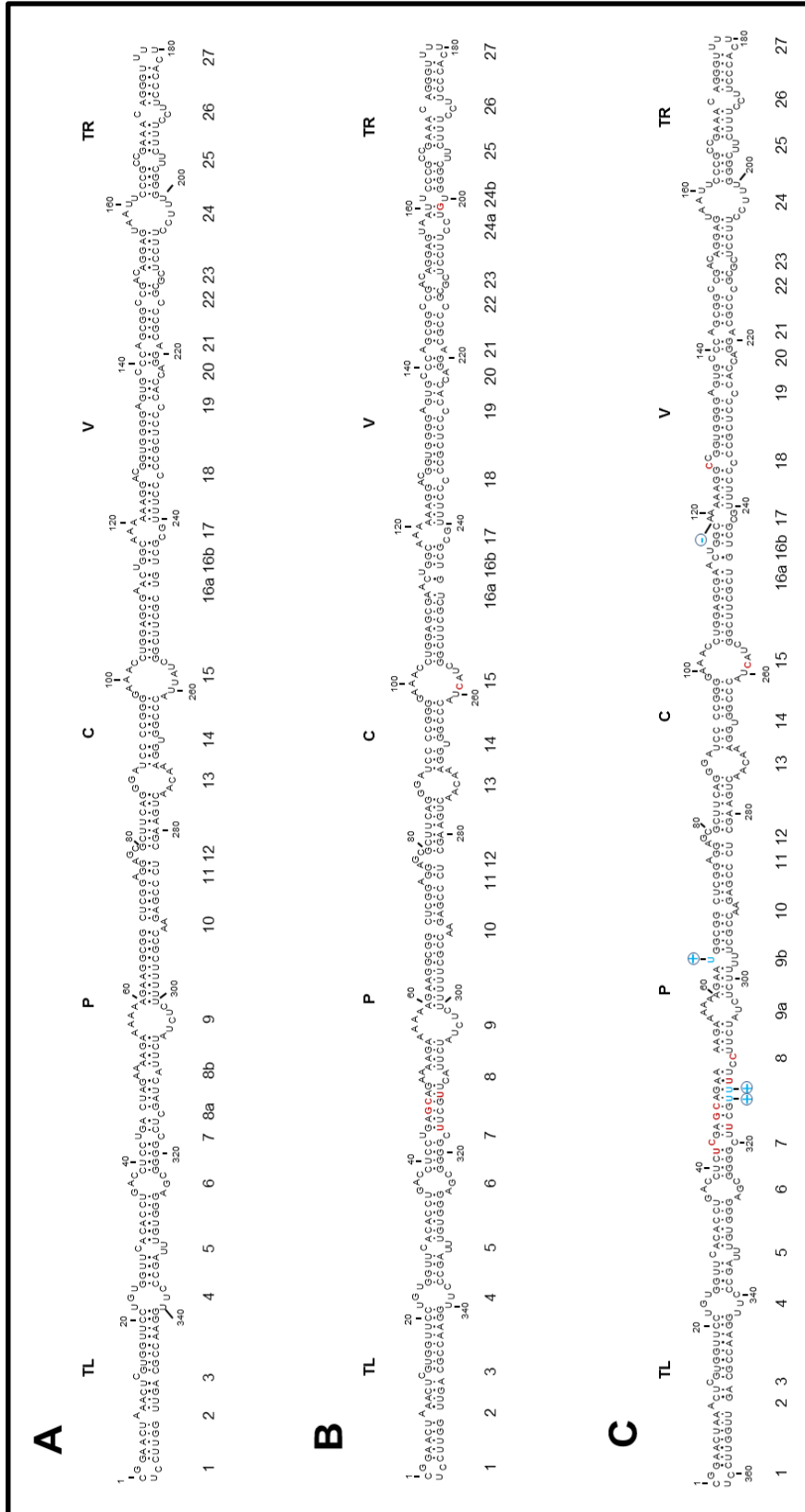


Figure S1. Rod-like secondary structures of minimum free energy predicted *in silico* by RNAstructure for the mc PSTVd (+) RNA of the NB, intermediate and dahlia variants (A), (B) and (C), respectively. Substitutions with respect to the NB variant are denoted in red, and indels in blue, with insertions and deletions being indicated with encircled + and – symbols.

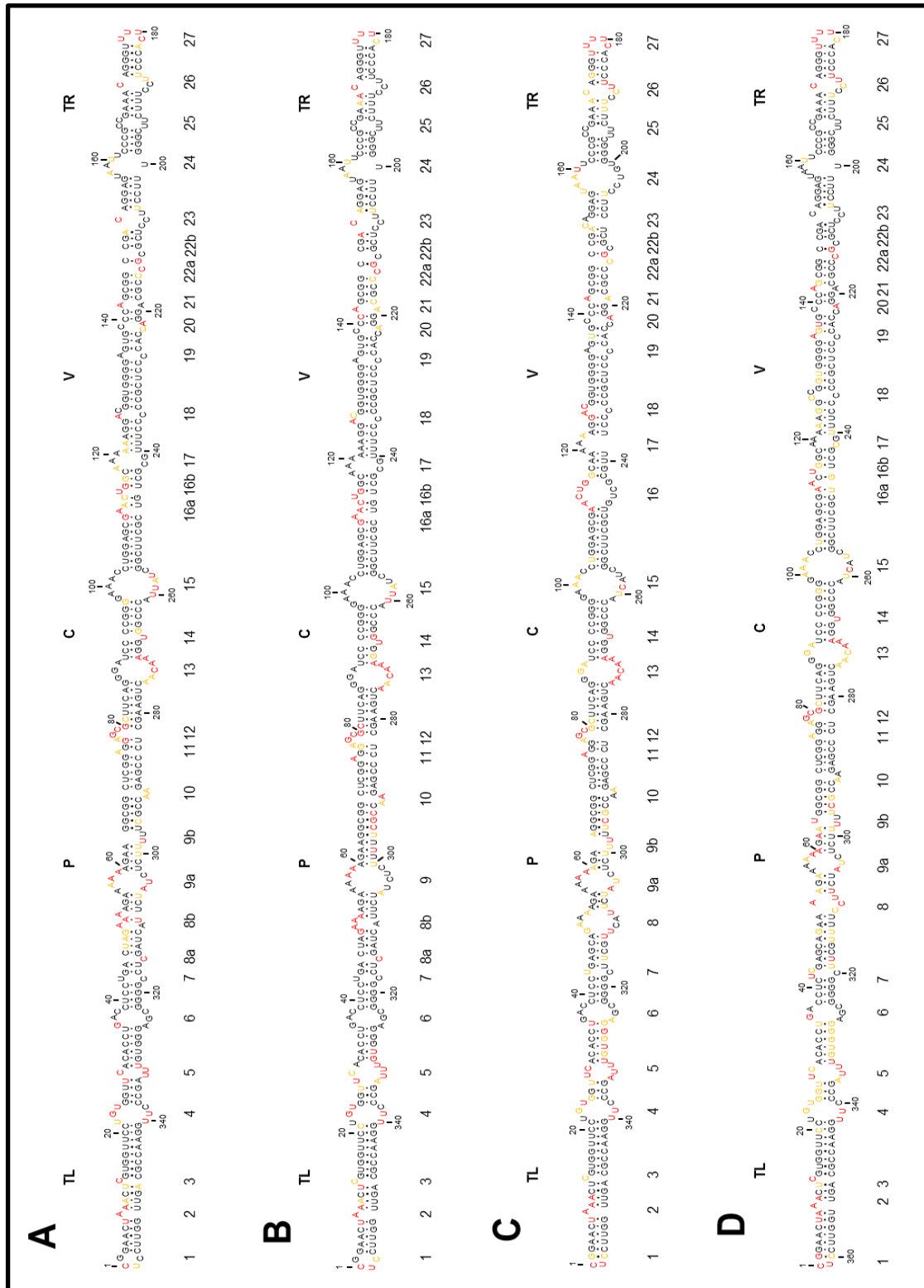


Figure S2. *In vitro* SHAPE analysis supports a rod-like conformation for the *mc* PSTVd (+) RNA from three different PSTVd variants and three acylating reagents. (A) and (B) Results obtained for variant NB with NMIA and NAI, respectively (this work). (C) and (D) Results obtained with benzoyl cyanide (BzCN) for variants intermediate and dahlia, respectively.^{26,27} Other details as in the legends to Figures 1 and 3.

Capítulo III

**The predominant circular form of avocado sunblotch viroid
accumulates *in planta* as a free RNA adopting a rod-shaped
secondary structure unprotected by tightly bound host proteins**

Amparo López-Carrasco and Ricardo Flores

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain

Journal of General Virology (Revised version pending of final acceptance)

ABSTRACT

Avocado sunblotch viroid (ASBVd), the type member of the family *Avsunviroidae*, replicates and accumulates in chloroplasts. Whether this minimal non-protein-coding, circular RNA of 246-250 nt exists *in vivo* as a free nucleic acid or closely associated with host proteins remains unknown. To tackle this issue, the secondary structures of the monomeric circular (*mc*) (+) and (-) strands of ASBVd have been examined *in silico* by searching those of minimal free energy, and *in vitro* at single-nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE). Both approaches resulted in predominant rod-like secondary structures without tertiary interactions, with the *mc* (+) RNA being more compact than its (-) counterpart as revealed by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Moreover, *in vivo* SHAPE showed that the *mc* ASBVd (+) form accumulates in avocado leaves as a free RNA adopting a similar rod-shaped conformation unprotected by tightly bound host proteins. Hence, the *mc* ASBVd (+) RNA behaves *in planta* like the previously studied *mc* (+) RNA of potato spindle tuber viroid, the type member of nuclear viroids (family *Pospiviroidae*), indicating that two different viroids replicating and accumulating in distinct subcellular compartments, have converged into a common structural solution. Circularity and compact secondary structures confer to these RNAs, and probably to all viroids, the intrinsic stability needed to survive in their natural habitats. However, *in vivo* SHAPE has not revealed the (possibly transient or loose) interactions of the *mc* ASBVd (+) RNA with two host proteins observed previously by UV irradiation of infected avocado leaves.

ABBREVIATIONS

mc and *ml*, monomeric circular and linear ASBVd RNA, respectively; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; ASBVd, avocado sunblotch viroid; SHAPE, selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension

INTRODUCTION

Within viroids, small non-protein-coding circular RNAs capable of infecting and frequently inciting disease in certain higher plants [1-7], avocado sunblotch viroid (ASBVd) [8] displays two singular features: the smallest genomic size (246-250 nt) and an A+U content (62%) well above that of any other viroid (40-47%) [9-11]. ASBVd, the type member of the family *Avsunviroidae*, replicates in plastids (mostly chloroplasts) through a symmetric rolling-circle mechanism [12-15]. Reiterative transcription of the infecting (+) monomeric circular (*mc*) RNA by a nuclear-encoded polymerase (NEP) translocated into chloroplasts [16] results in oligomeric head-to-tail (-) RNA intermediates, which after self-cleaving into monomeric linear (*ml*) forms via *cis*-acting hammerhead ribozymes [17] most likely acting co-transcriptionally [18], are circularized subsequently by a chloroplastic tRNA ligase [19]. The second half of the replication cycle, triggered by the *mc* (-) RNA, is the symmetric version of the first one (hence the name for this variant of the rolling-circle mechanism). Therefore, the two *mc* ASBVd (+) and (-) strands are physiologically relevant and the conformation they adopt *in vivo* are of particular interest because, lacking protein-coding ability, they should contain structural motifs crucial for different functions like replication and intra, intercellular and long-distance trafficking including invasion of reproductive tissues.

The secondary structure of the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs has been analyzed *in silico* by searching those of minimal free energy [11, 17, 20-22]. While this thermodynamics-based methodology predicts rod-like or quasi-rod-like conformations for both strands, examination *in vitro* of the *ml* ASBVd (+) and (-) RNAs by selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE), complemented by gel electrophoresis and other physical approaches [23-25], has led to secondary structures exhibiting significant differences. Prominent among them is the presence [23] or absence [24] of a kissing-loop interaction stabilizing the *ml* (-) RNA.

In the present work, besides re-assessing this discrepancy *in vitro*—but using the *mc* (+) and (-) forms instead of their *ml* counterparts—we have applied *in vivo* SHAPE to address an intriguing conundrum: whether the predominant *mc* ASBVd (+) RNA exists *in planta* as a free nucleic acid or associated with host proteins that might provide some protection effect. Our results indicate that, resembling the situation reported recently for the *mc* (+) form of potato spindle tuber viroid (PSTVd), the type member of the family *Pospiviroidae* clustering the nuclear-replicating viroids [26], the *mc* ASBVd (+) form accumulates in its main subcellular habitat, the chloroplast [15, 27-29], essentially as a “naked” RNA. This finding

has significant implications for the replication and survival strategy of ASBVd and other viroids in general.

RESULTS

The *mc* ASBVd (+) and (-) strands fold into rod- or quasi-rod-like conformations according to *in silico* predictions

Throughout the present study we have focused our attention on the *mc* ASBVd RNAs of both polarities because they are the forms that prime the two rolling-circles that operate in the symmetric replication of ASBVd. Moreover, in infected avocado, the *mc* ASBVd (+) form is by far the most abundant viroid RNA [12-14, 21], thus facilitating its analysis *in vivo* and its isolation and purification. The *mc* ASBVd (-) strand, although considerably less prevalent than its (+) counterpart, still reaches *in planta* a titer high enough to obtain the amount needed for dissection *in vitro* with several approaches. Previous thermodynamics-based predictions of the secondary structures of the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs, usually performed with the *Mfold* software program [30], have led to rod-like conformations that in some cases include a short bifurcation in one of the terminal domains [11, 17, 20, 21, 31]. Here we have reassessed this issue with recent versions of the same software program, and of two others, considering that the high A+U content of the *mc* ASBVd (+) and (-) forms should result in secondary structures of minimal free energy less stable and more difficult to predict than those typical of other viroids.

Concerning the *mc* ASBVd (+) RNA, the three software programs, *Mfold* [30], *RNAfold* [32] and *RNAstructure* [33-34], the first two equipped with a version for circular RNAs, produced similar rod-shape secondary structures of minimal free energy for our variant, which differs in just one substitution (C213→U) from the reference variant (GenBank accession number J02020) [11]. However, the conformations resulting from *Mfold* and *RNAstructure* presented in the left terminal domain a short bifurcation with two hairpins, one of them replaced by a large internal asymmetric loop in the conformation generated by *RNAfold* (Figure 1a, inset 3). In addition, *Mfold* predicted two slightly different motifs (Figure 1a, insets 1 and 2), the first one predicted also by *RNAfold* together with another one (Figure 1a, insets 1 and 4). The difference in free energy between the alternative conformations, however, was very low. The probability profile created by *RNAstructure* differed along the rod-like structure, being higher in the terminal domains (particularly in the left one) than in the central domain (Figure 1a).

With regard to the *mc* ASBVd (-) RNA, the three software programs produced the same rod-like conformation, thus providing strong support for it (Figure 1b). As with the *mc* ASBVd (+) RNA, the probability pattern created by *RNAstructure* differed along the rod-like shaped conformation. A point worth of note is that the three software programs predicted a more stable conformation for the *mc* ASBVd (+) RNA (ΔG° at 37 °C between -73.8 and -69.3 kcal/mol) than for the *mc* ASBVd (-) RNA (ΔG° at 37 °C between -56.9 and -50.0 kcal/mol).

The *mc* ASBVd (+) and (-) forms adopt predominant secondary structures *in vitro* that can be discriminated by non-denaturing PAGE

We next tried to validate the *in silico* predictions and, particularly, whether the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs adopted a predominant conformation in solution and, in such a case, whether a physical distinction could be made between them. The *mc* ASBVd (+) form was directly isolated by denaturing PAGE from viroid-enriched RNA preparations from infected tissue; we assumed that the minor contamination with its co-migrating *mc* (-) counterpart, probably less than 10% [13], should not interfere with the subsequent analysis. The *mc* ASBVd (-) form was prepared by circularization with a wheat germ extract of the *ml* ASBVd (-) RNA resulting from *in vitro* self-cleavage of a dimeric head-to-tail transcript.

Preliminary attempts to compare the structures in solution of the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs by non-denaturing PAGE in 5% gels failed to disclose a well-defined difference between their corresponding mobilities (data not shown). Although the *ml* (+) and (-) RNAs of eggplant latent viroid (ELVd, 333 nt) [35] are clearly discriminated by electrophoresis in gels of this porosity [36], they might not have sufficient power to resolve RNAs of smaller size like those of ASBVd. Therefore, we performed our experiments in 8% gels in which, according to earlier data, *ml* ASBVd (+) and (-) RNAs migrate differentially [23]. Considering that the *in vitro* SHAPE analysis to be carried out subsequently entails a thermal denaturation/renaturation, we also tested whether such treatment had any effect on the electrophoretic mobilities of *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs with the same approach used before with two other viroids [26, 36].

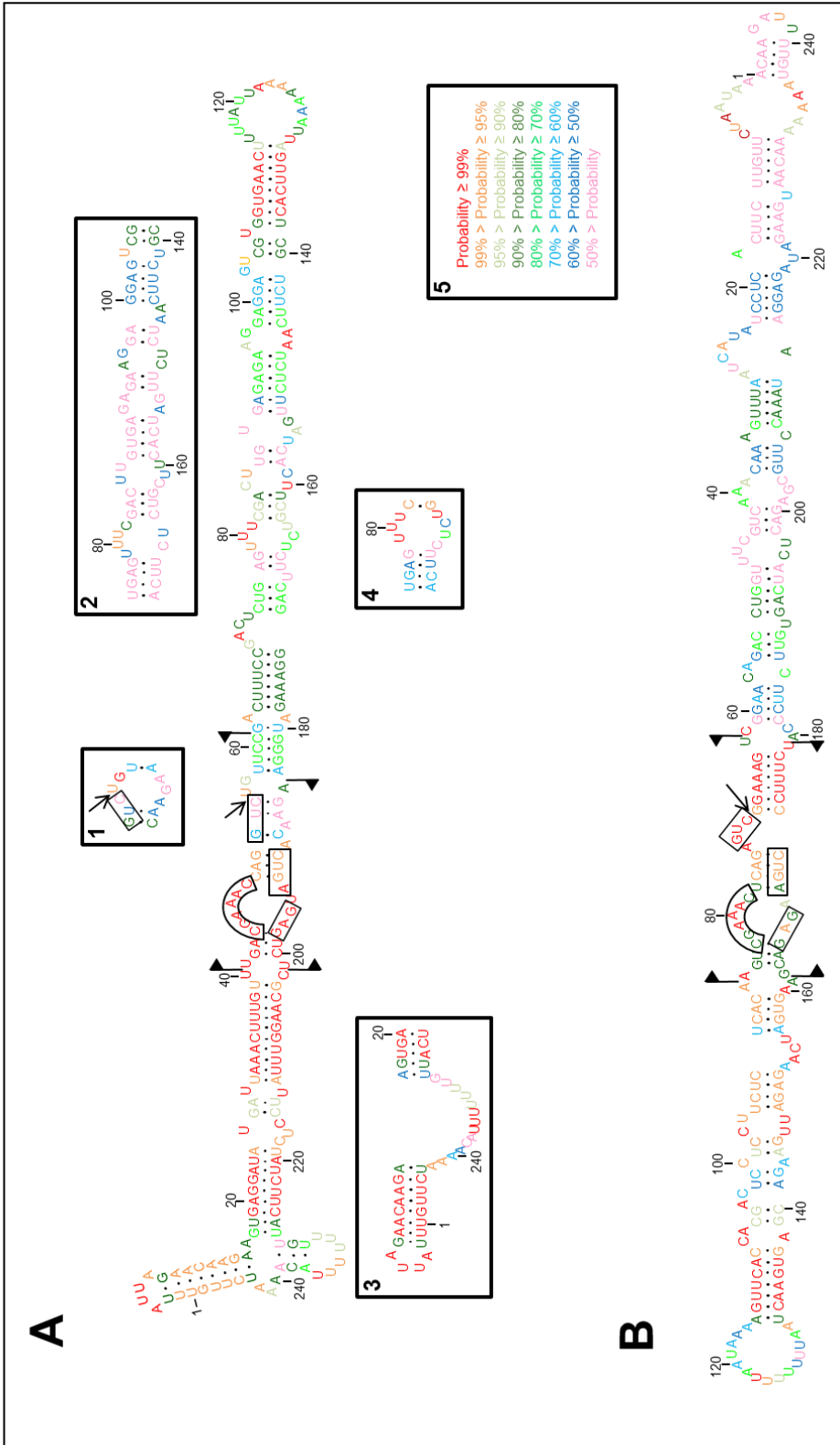


Figure 1. Conformations of minimum free energy predicted for both strands of ASBVd (reference variant GenBank accession number J02020 with the substitution C213→U). (A) Quasi-rod-like secondary structure for the *mc* ASBVd (+) RNA predicted by *RNAstructure*. Insets (1) and (2), alternative motifs predicted by *Mfold*, and insets (3) and (4) alternative motifs predicted by *RNAfold*. (B) Common rod-like secondary structure for the *mc* ASBVd (-) RNA predicted by *RNAstructure*, *RNAfold* and *Mfold*. In both panels the sequences forming the core of the hammerhead structures are delimited by flags, motifs conserved in natural hammerhead structures are within boxes, and self-cleavage sites are marked by arrows. The same numbers are used for both polarities. Colors in inset (5) denote the probability of nucleotides being double- or single-stranded as predicted by *RNAstructure*. The conformations serving as reference are those generated by *RNAstructure* because this is the software program implemented in SHAPE.

In brief, prior to electrophoresis, two aliquots of each of the two RNAs under examination, re-suspended in water, were heated at 95 °C for 2 min and either snap-cooled on ice or slowly-cooled at 25 °C along 15 min, using a third pair of non-treated aliquot as control. Three aliquots were then brought to 37 °C for 5 min in the folding buffer [37], with the three others being similarly treated but with the folding buffer supplemented with 6 mM Mg^{2+} . In all instances the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs migrated as sharp bands, supporting their adoption of a predominant conformation *in vitro* (Figure 2a), without dismissing the co-existence of others with minor changes undetectable by non-denaturing PAGE. The lack of noticeable Mg^{2+} effects did not favor the presence of tertiary interactions like the kissing loops reported in PLMVd and CChMVd [38-39].

Interestingly, compared with the size markers, the *mc* ASBVd (+) RNA migrated faster than its complementary *mc* (-) form, suggesting a more compact secondary structure for the former (Figure 2b), a result that was confirmed by co-electrophoresis of mixed aliquots of the two RNAs (Figure 2b). As indicated above, such observation is consistent with others made previously in gels of similar porosity, but using *ml* ASBVd (+) and (-) RNAs [23], and with the more stable conformation predicted for the *mc* ASBVd (+) RNA by the three software programs (see above). However, we found that while the *ml* ASBVd (-) RNA resulting from self-cleavage migrated in 8% gels as a sharp band, the *ml* ASBVd (+) RNA also from self-cleavage migrated as a blurred band (data not shown), thus hinting at the co-existence of different conformations in the latter. In contrast, the *mc* ASBVd (+) form adopted a predominant conformation as inferred from its defined electrophoretic mobility (Figure 2). This observation shows that the circular structure provides enhanced stability, at least to the (+) strand, and reinforces the advantage of performing the analyses with the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs rather than with their *ml* counterparts, which may not display a similar behavior.

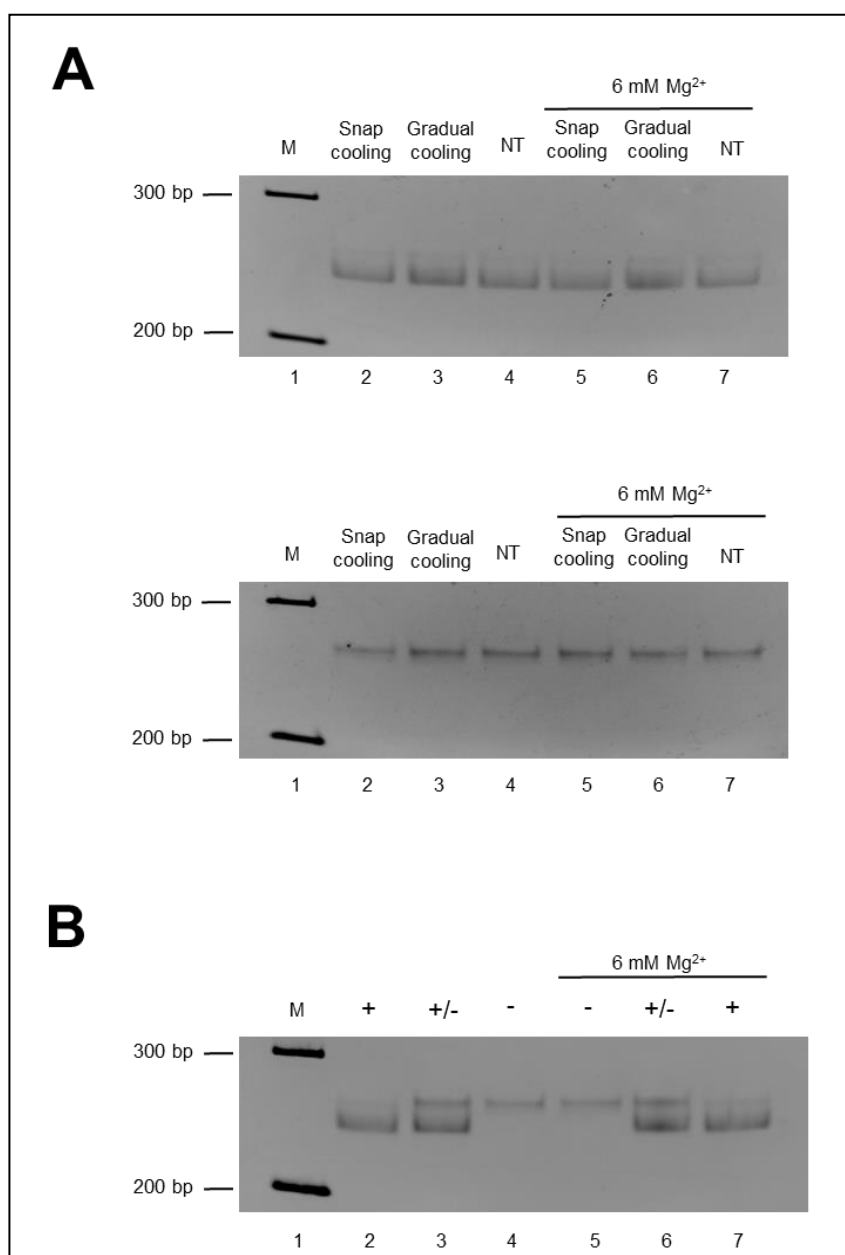


Figure 2. The *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs show different mobilities in non-denaturing PAGE. (A) Before electrophoresis, aliquots of ASBVd (+) and (-) forms (upper and lower panels, respectively) were heated at 95 °C for 2 min and snap-cooled on ice (lane 2), gradually-cooled at 25 °C along 15 min (lane 3), or applied directly with no thermal treatment (NT) (lane 4). Three other aliquots of the same RNAs were processed similarly, but in the presence of 6 mM MgCl₂ (lanes 5, 6 and 7, respectively). (B) Aliquots of untreated ASBVd (+) and (-) RNAs were loaded separately (lanes 2 and 4, respectively) or mixed together (lane 3). Three other aliquots of the same RNAs were processed similarly, but in the presence of 6 mM MgCl₂ (lanes 5, 6 and 7, respectively). M refers to DNA markers with their size (in base pairs) indicated on the left (lanes 1). Gels were stained with ethidium bromide and are shown in the inverted option to facilitate visualization.

In vitro* SHAPE with N-methylisatoic anhydride (NMIA) and 2-methylnicotinic acid imidazolide (NAI) corroborates the rod-like conformations predicted for the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs *in silico

Migration of the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs as essentially single bands in non-denaturing PAGE was consistent with the existence in solution of predominant conformers for both polarity strands. To provide additional support for this idea at single-nucleotide resolution, we applied SHAPE *in vitro* with NMIA [37] to the *mc* ASBVd RNAs purified from infected tissue by denaturing PAGE. We first used two individual primers in order to dissect the entire *mc* ASBVd (+) RNA, with the information gained serving to generate computer-assisted predictions with *RNAstructure* [33]. Both primers produced mutually consistent data leading to a rod-shaped conformation very similar to that predicted *in silico* with *RNAfold* (Figure 1a), thus containing in the left terminal domain a large internal asymmetric loop instead of the short bifurcation predicted by *RNAstructure* and *Mfold* (Figure 3a). Importantly, essentially the same conformation was obtained when NMIA was replaced by NAI, the alternative acylating reagent used for *in vivo* SHAPE [26, 40, 41] (Figure 3b).

Subsequent application of *in vitro* SHAPE to the *mc* ASBVd (-) form, again with two separate primers to examine the whole RNA, resulted in basically the same rod-like secondary structure with NMIA and NAI (Figures 4a and b), which additionally also coincided with that predicted by the three software programs *in silico* (Figure 1b). On the other hand, the SHAPE reactivity of some nucleotides forming the lower strand of the left terminal loop (positions 123-128) did not support their involvement in a kissing-loop interaction with the lower strand of a right terminal loop (positions 231-236) (Figures 4a and b), as proposed previously for a *ml* ASBVd (-) form [23].

The remarkable agreement between the *in silico* and *in vitro* approaches paved the way for addressing the next issue: whether the structure of the *mc* ASBVd (+) RNA *in planta* is also the same or different. For this aim we used NAI, which for SHAPE analyses *in vivo* is preferable to NMIA because of the higher $t_{1/2}$ hydrolysis of the former [41].

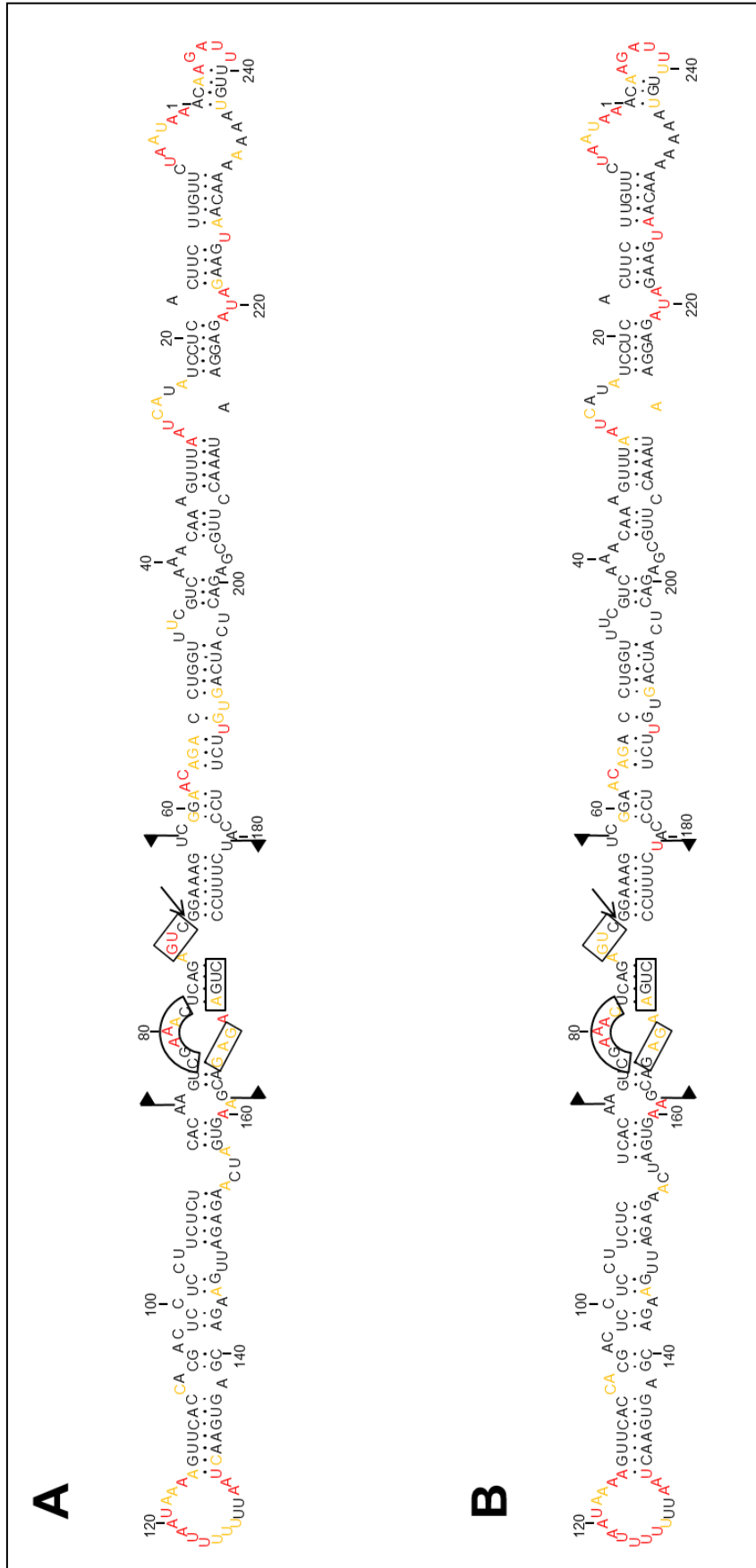


Figure 4. *In vitro* SHAPE with NMA (A) and NAI (B) also predicts the same rod-like secondary structure for the *mc* ASBVd (-) RNA. This conformation additionally coincides with that predicted by the three software programs *in silico*. Other details as in the legends to Figures 1 and 3.

SHAPE *in planta* shows that the *mc* ASBVd (+) form accumulates as a free RNA adopting a rod-shaped secondary structure without tightly bound host proteins

As indicated above we employed a NAI-based procedure [26], derived from a previous one [41], substituting 5' primer labeling with radioactivity by a fluorophore. Moreover, as in our recent report with PSTVd [26], following NAI infiltration and incubation of ASBVd-infected leaves, and subsequent RNA extraction and clarification, the *mc* ASBVd RNAs were purified by denaturing PAGE. This step guaranteed that the observed SHAPE signals corresponded to stops taking place during reverse transcription of the *mc* ASBVd (+) RNA; the high amount of tissue (and NAI) needed made to extend this analysis *in planta* to the *mc* ASBVd (-) RNA impractical.

Because we assumed that a limiting factor could be the penetrability of the acylating reagent, we started our studies with expanding ASBVd-infected avocado leaves (8-10 cm in length), the cuticle of which was removed with ethylic ether before their infiltration with the NAI solution. However, the resulting signals produced by the *mc* ASBVd (+) RNA were very weak and difficult to reproduce. We next moved to flowers, which according to a previous report [42] and our own observations (data not shown), accumulate high levels of ASBVd. The SHAPE signals improved but were still unsatisfactory and, besides, this plant material was only available for a short period of time. Considering these results we returned to leaves, but of a very small size (2-3 cm in length), assuming that the NAI solution would penetrate more easily than in those of bigger size. That was indeed the case, with the SHAPE signals becoming clear and reproducible (Figure 5). Finally, we carried out an additional control in which a preparation of *mc* PSTVd (+) RNA obtained from infected tissue was added immediately after homogenization of the ASBVd-infected tissue infiltrated with NAI. The ensuing SHAPE analysis of this external RNA control failed to reveal the reactivity observed previously *in vitro* [26] (data not shown), thus corroborating that acylation of the *mc* ASBVd (+) RNA occurred *in planta* and not *in vitro* during the subsequent manipulations.

Comparative analyses of the *in vitro* and *in vivo* data with NAI revealed that they were essentially identical, thus supporting the notion that the *mc* ASBVd (+) RNA behaves in its physiological habitat as a free RNA folding into a rod-shaped conformation unprotected by tightly bound host proteins. In this conformation, wherein loops were generally more reactive than their flanking double-stranded helices, only two minor differences were detected: i) the upper strand of the asymmetric loop of the left terminal domain is formed by one single (A16) and by two nucleotides (A16 and G17) in the *in vitro* and *in vivo* structures, respectively, and

ii) a small region delimited by C85 and A91 in the upper strand, and U152 and U160 in the lower strand, was slightly re-organized (Figures 4 and 5).

DISCUSSION

For reasons explained elsewhere [2, 26, 36], viroid RNA conformations predicted *in silico* with algorithms minimizing the free-energy content, or determined *in vitro* with different biochemical and biophysical approaches, may not recapitulate the conformation existing *in vivo*, primarily because these approaches neglect the effect that RNA-binding host proteins may have on the conformation of a viroid RNA in its physiological context. In addition, RNA secondary structure is constrained by transcription, steric crowding and interacting ions [43]. Indeed, recent data indicate that the secondary structure of the *mc* (+) strand of a nuclear viroid (PSTVd) obtained by *in vivo* SHAPE, even if similar, is not identical to that observed by *in vitro* SHAPE, with the differences having been attributed to interactions with host proteins or to other factors present in the *in vivo* habitat [26].

Once the global conformation *in vivo* of the *mc* (+) form of PSTVd, the type member of the family *Pospiviroidae*, was resolved [26], application of the same methodology to a member of the family *Avsunviroidae* appeared the natural next step in order to test whether a general behavior exist. Considering that conventional SHAPE *in vivo* demands relatively high viroid titers in infected tissues, we discarded peach latent mosaic viroid (PLMVd) [44] and chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) [45] due to their poor accumulation in *planta*. Between the remaining two members of the *Avsunviroidae*, eggplant latent viroid (ELVd) [35] and ASBVd [11], we chose the latter because despite being its natural host a woody plant, the isolate of this viroid with which we have been working along the years (GenBank accession number J02020 with the substitution C213→U) accumulates *in vivo* to levels comparable to the 5S ribosomal RNA [12, 21], much higher than those reached by ELVd in eggplant. There are modifications more sensitive than conventional SHAPE (Kwok et al., 2013; Smola et al., 2015) [40, 46], but some entail additional steps, particularly single-stranded adapter ligation, that limit the reliability of the results. These approaches, however, particularly SHAPE-MaP (Smola et al., 2015) [46], may become indispensable with viroids reaching low titers *in vivo*.

Re-assessment of the most stable secondary structure predicted for the *mc* ASBVd (+) RNA by three software programs resulted in a similar rod-like conformation with minor deviations. This conformation, however, differed significantly in the distribution and size of

some loops and double-stranded segments when compared with others reported previously [11, 17, 20, 21]. For the *mc* ASBVd (-) RNA the agreement was even better, with the three software programs predicting the same rod-shaped secondary structure. *In vitro* SHAPE of *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs generated well-resolved structures that were almost identical with the two acylating reagents used (NMIA and NAI), in line with the adoption of predominant conformations by both RNAs *in vitro* as inferred from their migration as single bands in non-denaturing PAGE. These structures also agree with: i) those predicted *in silico*, particularly with the *RNAfold* software program and, ii) those derived previously from *in vitro* SHAPE [24], while differing somewhat from others obtained with the same *in vitro* approach [23]. Furthermore, the rod-like conformations proposed *in vitro* for the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs are also consistent with the solubility in 2 M LiCl of the *mc* ASBVd RNAs extracted from infected tissue, mainly formed by the (+) strand [45], and of the *ml* ELVd (+) and (-) RNAs resulting from *in vitro* self-cleavage that adopt quasi-rod-like secondary structures [36]. Conversely, PLMVd and CChMVd RNAs, which fold into complex multi-branched conformations stabilized by a kissing-loop interaction, are insoluble under the same saline conditions [45]. In this same context, our *in vitro* SHAPE results do not support the existence in the *mc* ASBVd (-) RNA of the kissing-loop interaction proposed to stabilize a *ml* ASBVd (-) form, which has neither been inferred by *in vitro* SHAPE for another *ml* ASBVd (-) form [23, 24]. Moreover, we have not detected by native PAGE any Mg^{2+} -induced difference in the mobility of the *mc* ASBVd (-) RNA, while we have observed for it a slower mobility than for its (+) counterpart that neither is influenced by Mg^{2+} . This latter result, particularly, argues against the existence of a kissing-loop interaction in the *mc* ASBVd (-) RNA because an interaction of this kind in CChMVd causes a faster mobility consistent with a more compact folding [39], in contrast with the results observed in the co-electrophoresis of the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs (Figure 2b).

After some preliminary assays, we found that flowers, and particularly very small expanding leaves, were the most appropriate material for *in vivo* SHAPE, probably because they are easily penetrated by NAI. Moreover, this reagent has been previously applied to determine the structure *in planta* of a chloroplast mRNA of *Arabidopsis thaliana* [40], thus indicating that NAI can traverse the membrane of this organelle. *In vivo* SHAPE of the *mc* ASBVd (+) form showed that it accumulates in chloroplasts as a free RNA uncovered by tightly bound host protein(s) which, like viral coat proteins, might exert a protecting role. However, as indicated before [26], the existence of loose or transient RNA-protein

interactions, or of proteins interacting with double-stranded RNA motifs—in principle undetectable by SHAPE—cannot be dismissed, leaving apart that chemical approaches like SHAPE infer base pairing indirectly from the absence of reactivity [43]. Pertinent to this context is the previous finding that UV irradiation of ASBVd-infected avocado leaves generates covalent adducts between the *mc* ASBVd (+) RNAs and host proteins, the most abundant of which, as revealed by tandem-mass spectrometry, are two chloroplast RNA-binding proteins (PARBP33 and PARBP35) of a family involved in stabilization, maturation and editing of chloroplasts transcripts. Moreover, PARBP33 behaves as an RNA chaperone that facilitates *in vitro*, and possibly *in vivo*, the self-cleavage of the oligomeric ASBVd intermediates resulting from rolling-circle replication [47]. UV light is a ‘zero-length’ cross-linking agent that promotes formation of covalent bonds between nucleic acids and proteins at their contact points, thus freezing the interaction existing *in situ* even if transient [48, 49]. Such cross-links, which demand close proximity and proper orientation between the reacting groups, may go unnoticed for *in vivo* SHAPE, highlighting the limitations of this latter approach and the need to combine physical and chemical strategies for proper dissection of host proteins interacting with viroid RNAs. In this regard, interactions of *mc* ASBVd RNAs with the host enzymes catalyzing replication may be also transient.

In summary, like the *mc* PSTVd (+) RNA [26], the *mc* ASBVd (+) RNA exists *in vivo* as free or “naked” RNA that folds into a rod-like conformation without strong association with host proteins. This finding attests to the common solution evolved by two different viroids that replicate and accumulate in two different subcellular compartments, the nucleus and chloroplast. The intrinsic stability resulting from circularity and compact secondary structures promoted by double-stranded segments confer to these RNAs, and possibly to viroids in general, resistance to exonucleases and endonucleases, while some loops would play major functional roles as illustrated by the terminal A+U rich loops wherein the initiation sites of the ASBVd (+) and (-) strands have been mapped [21]. Relevant also to this framework is that there are more RNA sequences that fold into a circular than into a linear structure of the same length, implying the higher mutational robustness (i.e. resistance to mutation) of circular structures [50].

MATERIALS AND METHODS

Extraction, clarification and examination of the *mc* ASBVd RNAs

These steps were performed as reported recently [26]. In brief, total nucleic acid preparations from asymptomatic leaves from ASBVd-infected avocado plants (*Persea americana* Miller, cv. Fuerte) grown in a greenhouse (25-18 °C with supplementary lighting during the winter), were obtained with water-saturated phenol and subsequently clarified using non-ionic cellulose and methoxyethanol. The *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs were purified by double PAGE first in a non-denaturing 5% gel (acrylamide:bis-acrylamide ratio 39:1) run in 1X TAE at 4 °C, with the segment demarcated by the DNA markers of 200 and 300 bp being excised and applied on top of a single-well 5% denaturing gel of the same porosity that was run in 0.25X TBE (final gel temperature around 50 °C). The band of interest was cut and its RNAs gel-eluted overnight and examined by non-denaturing PAGE in 5% or 8% gels, the later with an acrylamide:bis-acrylamide ratio 19:1, run in 1X TAE at 4 °C. The *mc* ASBVd (-) RNA was prepared by incubation at 25 °C for 2 h of gel-purified *ml* ASBVd (-) RNA (5 µg), resulting from *in vitro* self-cleavage of a dimeric head-to-tail transcript, in a final volume of 50 µl containing 25 µl of a wheat germ extract (Promega) and 40 U of the ribonuclease inhibitor from porcine liver (Takara).

Prediction of RNA structure *in silico*

Three software programs were applied to retrieve the structures of minimal free energy of the *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs: *Mfold* version 4.7 [30] and *RNAfold* included in the ViennaRNA package version 2.3.1 [32] using the circular versions and default parameters, and *RNAstructure* version 5.8 (Shapeknots) [33-34] using the default parameters and beginning the numbering from the self-cleavage sites.

In vitro SHAPE

The mixture of *mc* ASBVd (+) and (-) RNAs purified from infected avocado leaves were subjected to *in vitro* SHAPE with N-methylisatoic anhydride (NMIA, 13 mM in dimethyl-sulfoxide) essentially as described previously [26, 37]; when analyzing the (+) and (-) forms, 3 and 30 pmol of the RNA mixture were used, respectively. SHAPE *in vitro* with 2-methylnicotinic acid imidazolid (NAI, 50 mM in dimethyl-sulfoxide) was carried out similarly, being NAI prepared as reported before [41]. The resulting data were coupled to computer-assisted prediction [33]. VIC-labeled fluorescent DNA primers (Applied

Biosystems) RF-1370 (5'-CAGACCTGGTTTCGTC-3') and RF-1378 (5'-CCCTGAAAGGACGAAGTGATCAAGAG-3'), complementary to positions 57–42 and 174–149, respectively, and RF-1387 (5'-CTCTGAGTTTCGACTTGTGAGAGAAGG-3') and RF-1388 (5'-GATGGGAAGAACACTGATGAGTCTCGC-3') homologous to positions 72-98 and 178-204 respectively, were purified by denaturing PAGE in 20% gels. Extensions, sequencing reactions to identify the peaks, and resolution of the cDNAs by capillary electrophoresis were as detailed previously [26, 51]. Electrophoregrams were examined with the QuShape software program [52], which also normalized the reactivity data. At least three replicas were analyzed with each primer and acylating reagent, and the mean and standard deviation of the reactivity of each nucleotide was calculated.

***In vivo* SHAPE**

Young leaves (3 g) of different size (see Results) of ASBVd-infected avocado, pre-treated with ethylic ether to remove the cuticle, were mixed with 50 ml of buffer (40 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂) and gently shaken for 5 min. *In planta* acylation was performed by incorporating NAI (100 mM in dimethylsulfoxide and just dimethylsulfoxide to the control reaction) and shaking the mixture at room temperature for 40 min. Following addition of β -mercaptoethanol (500 mM) and shaking for another 10 min to stop the reaction, the leaves were drained and washed four times with water (100 ml). Extraction, clarification, purification and primer-extension of the *mc* ASBVd (+) RNA was as with *in vitro* SHAPE. Six replicas were performed with each primer, and the mean and standard deviation of the reactivity of each nucleotide was estimated.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by grant BFU2014-56812-P (to R.F.) from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain. A.L.C. was the recipient of a predoctoral fellowship from the same organism.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Cristina Romero and Alicia Barroso for their valuable help with the initial SHAPE experiments, Drs. Sonia Delgado and Pedro Serra for helpful advise, and A. Ahuir and M. Pedrote for excellent technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Diener TO. Discovering viroids—a personal perspective. *Nature Rev Microbiol* 2003;1:75-80.
2. Flores R, Serra P, Minoia S, Di Serio F, Navarro B. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. *Front Microbiol* 2012;3:217.
3. Flores R, Minoia S, Carbonell A, Gisel A, Delgado S, López-Carrasco A, Navarro B, Di Serio F. Viroids, the simplest RNA replicons: how they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Res* 2015;209:136-145.
4. Katsarou K, Rao AL, Tsagris M, Kalantidis K. Infectious long non-coding RNAs. *Biochimie* 2015;117:37-47.
5. Kovalskaya N, Hammond RW. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Sci* 2014;228:48-60.
6. Palukaitis P. What has been happening with viroids? *Virus Genes* 2014;49:175-184.
7. Steger G, Perreault JP. Structure and associated biological functions of viroids. *Adv Virus Res* 2016;94:141-172.
8. Palukaitis P, Hatta T, Alexander DM, Symons RH. Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 1979; 99:145-151.
9. Flores, R, Hernández C, Martínez de Alba E, Daròs JA, Di Serio F. Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43:117-139.
10. Owens RA, Flores R, Di Serio F, Li SF, Pallás V, Randles JW, Sano T, Vidalakis G. Viroids. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. (editors). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier/Academic Press; 2012. pp. 1221-1234.
11. Symons RH. Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res* 1981;9:6527-6537.
12. Bruening G, Gould AR, Murphy PJ, Symons RH. Oligomers of avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves. *FEBS Lett* 1982;148:71-78.
13. Daròs JA, Marcos JF, Hernández C, Flores R. Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12813-12817.
14. Hutchins CJ, Keese P, Visvader JE, Rathjen PD, McInnes JL, Symons, RH. Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Mol Biol* 1985;4:293-304.
15. Navarro JA, Daròs JA, Flores R. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* 1999;253:77-85.
16. Navarro JA, Vera A, Flores R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* 2000;268:218-225.

17. Hutchins C, Rathjen PD, Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res* 1986;14:3627-3640.
18. Carbonell A, De la Peña M, Flores R, Gago S. Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res* 2006;34:5613-5622.
19. Nohales MA, Molina-Serrano D, Flores R, Daròs JA. Involvement of the chloroplastic isoform of tRNA ligase in the replication of viroids belonging to the family *Avsunviroidae*. *J Virol* 2012;86:8269-8276.
20. Gast FU, Kempe D, Spieker RL, Sänger HL. Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J Mol Biol* 1996;262:652-670.
21. Navarro JA, Flores R. Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J* 2000;19:2662-2670.
22. Steger G, Hofmann H, Fortsch J, Gross HJ, Randles JW, Sänger HL, Riesner D. Conformational transitions in viroids and virusoids: comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *J Biomol Struct Dyn* 1984;2:543-571.
23. Delan-Forino C, Deforges J, Benard L, Sargueil B, Maurel MC, Torchet C. Structural analyses of avocado sunblotch viroid reveal differences in the folding of plus and minus RNA strands. *Viruses* 2014;6:489-506.
24. Giguère T, Adkar-Purushothama CR, Bolduc F, Perreault JP. Elucidation of the structures of all members of the *Avsunviroidae* family. *Mol Plant Pathol* 2014;15:767-779.
25. Hui-Bon-Hoa G, Kaddour H, Vergne J, Kruglik SG, Maurel MC. Raman characterization of Avocado Sunblotch viroid and its response to external perturbations and self-cleavage. *BMC Biophys* 2014;7:2.
26. López-Carrasco A, Flores R. Dissecting the secondary structure of the circular RNA of a nuclear viroid *in vivo*: a “naked” rod-like conformation similar but not identical to that observed *in vitro*. *RNA Biol* 2017 (in press, doi: 10.1080/15476286.2016.1223005).
27. Bonfiglioli RG, McFadden GI, Symons RH. In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang-cadang viroid in the nucleus. *Plant J* 1994;6:99-103.
28. Lima MI, Fonseca MEN, Flores R, Kitajima EW. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch Virol* 1994;138:385-390.
29. Mohamed NA, Thomas W. Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados. *J Gen Virol* 1980;46:157-167.
30. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3406-3415.
31. Riesner D, Steger G. Viroid and viroid-like RNA. In: Saenger W (editor). *Landolt-Börnstein, New Series in Biophysics – Nucleic Acids*. Berlin: Springer-Verlag; 1990. vol. VII/1d. pp. 194-243.
32. Lorenz R, Bernhart SH, Hoener zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. ViennaRNA Package 2.0. *Algorith Mol Biol* 2011;6:26.
33. Hajdin CE, Bellaousov S, Huggins W, Leonard CW, Mathews DH, Weeks KM. Accurate SHAPE-directed RNA secondary structure modeling, including pseudoknots. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:5498-5503.
34. Reuter JS, Mathews DH. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinform* 2010;11:129.

35. Fadda Z, Daròs JA, Fagoaga C, Flores R, Duran-Vila N. Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). *J Virol* 2003;77:6528-6532.
36. López-Carrasco A, Gago-Zachert S, Mileti G, Minoia S, Flores R, Delgado S. The transcription initiation sites of eggplant latent viroid strands map within distinct motifs in their *in vivo* RNA conformations. *RNA Biol* 2016;13:83-97.
37. Wilkinson KA, Merino EJ, Weeks KM. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nature Protoc* 2006;1:1610-1616.
38. Bussière F, Ouellet J, Côté F, Lévesque D, Perreault JP. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J Virol* 2000;74:2647-2654.
39. Gago S, De la Peña M, Flores R. A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its *in vitro* folding and *in vivo* viability. *RNA* 2005;11:1073-1083.
40. Kwok CK, Ding Y, Tang Y, Assmann SM, Bevilacqua PC. Determination of *in vivo* RNA structure in low-abundance transcripts. *Nat Commun* 2013;4:2971.
41. Spitale RC, Crisalli P, Flynn RA, Torre EA, Kool ET, Chang HY. RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat Chem Biol* 2013;9:18-20.
42. Da Graça JV, Mason TE. Detection of avocado sunblotch viroid in flower buds by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Phytopathol Z-J Phytopathol* 1983;108:262-266.
43. Vandivier LE, Anderson SJ, Foley SW, Gregory BD. The conservation and function of RNA secondary structure in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2016;67:463-488.
44. Hernández C, Flores R. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3711-3715.
45. Navarro B, Flores R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammerhead ribozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11262-11267.
46. Smola MJ, Rice GM, Busan S, Siegfried NA, & Weeks KM. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE-MaP) for direct, versatile and accurate RNA structure analysis. *Nat Protoc* 2015;10:1643-1669.
47. Daròs JA, Flores R. A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J* 2002;21:749-759.
48. Hockensmith JW, Kubasek WL, Vorachek WR, Evertsz EM, von Hippel PH. Laser cross-linking of protein-nucleic acid complexes. *Methods Enzymol* 1991;208:211-236.
49. Pashev IG, Dimitrov SI, Angelov D. Crosslinking proteins to nucleic acids by ultraviolet laser irradiation. *TIBS* 1991;16:323-326.
50. Cuesta JA, Manrubia S. Enumerating secondary structures and structural moieties for circular RNAs. *J Theor Biol* 2017;419:375-382.
51. Mortimer SA, Weeks KM. Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one second snapshots and at single nucleotide resolution. *Nature Protoc* 2009;4:1413-1421.
52. Karabiber F, McGinnis JL, Favorov OV, Weeks KM. QuShape: rapid, accurate, and best-practices quantification of nucleic acid probing information, resolved by capillary electrophoresis. *RNA* 2013;19:63-73.

Discusión

A pesar de su aparente baja complejidad estructural los viroides son capaces de infectar muchas especies vegetales y frecuentemente causar enfermedad. Además de su gran interés agroeconómico, estos agentes infecciosos constituyen el modelo más simple para estudiar las interacciones, incluidas las patogénicas, entre un RNA y su huésped (Ding y Itaya, 2007). Al carecer de capacidad codificante, los viroides contienen toda la información necesaria para su replicación, movimiento y patogénesis en el propio RNA viroidal o en alguno de sus intermediarios replicativos o productos de degradación, debiendo residir dicha información en elementos de secuencia o estructura.

Los primeros estudios dirigidos a establecer las relaciones estructura-función en los miembros de la familia *Pospiviroidae* condujeron a definir cinco dominios estructurales y relacionarlos con distintas funciones (Keese y Symons, 1985), aunque posteriormente se observó que son interacciones entre distintos dominios las que modulan una o más funciones (Sano *et al.*, 1992; Reanwarakorn y Semancick, 1998). Con el paso de los años se ha podido asociar pequeños motivos estructurales a etapas específicas de la replicación (Gas *et al.*, 2007) o el movimiento de los viroides en sus huéspedes (Zhong *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2008), habiéndose examinado la conformación de algunos de estos motivos mediante técnicas biofísicas finas (Riesner *et al.*, 1979; Dingley *et al.*, 2003). Los estudios de estructura-función son mucho más limitados en la familia *Avsunviroidae*, a causa del bajo número de sus miembros y de su restringida gama de huéspedes. Sin embargo, se ha identificado la función de unos pocos motivos estructurales claves, como las ribozimas de cabeza de martillo que median el autocorte de los intermediarios replicativos oligoméricos (Hutchins *et al.*, 1986), y los sitios de inicio de la transcripción que han sido cartografiados en la estructura primaria y secundaria de algunos de estos RNAs (Navarro y Flores, 2000; Delgado *et al.*, 2005; Motard *et al.*, 2008).

Dado el reducido tamaño de los viroides y su nula capacidad codificante, cabe presumir que la mayoría de sus motivos estructurales debe tener algún papel biológico en el ciclo infeccioso. Para establecer asociaciones estructura-función es necesario disponer de buenos modelos de la conformación de los RNAs viroidales que hayan sido confirmados *in vivo*, ya que ésta puede diferir considerablemente de la predicha *in silico* con algoritmos que calculan el plegamiento con menor energía libre, y de la determinada *in vitro* mediante diversas técnicas de análisis estructural. Las condiciones de ensayo que se utilizan normalmente en los estudios *in vitro*, en medios libres de proteínas y otros factores celulares que pueden ser esenciales para estabilizar la

estructura del RNA, conducen a resultados que no deben transponerse directamente al contexto fisiológico. Sólo una buena caracterización de los motivos estructurales *in vivo* permite establecer relaciones estructura-función fiables.

En este trabajo se han realizado experimentos dirigidos al estudio estructural comparado *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de tres viroides representativos de las dos familias, obteniéndose datos directos acerca de cuáles son las conformaciones que adoptan en su hábitat natural, de hasta qué punto las mismas difieren de las obtenidas previamente *in silico* e *in vitro*, y de si estos RNAs se acumulan *in vivo* como RNAs “desnudos”.

1. Estructura secundaria de los RNAs de polaridad positiva y negativa del ELVd

La secuenciación del ELVd, un viroide asintomático perteneciente a la familia *Avsunviroidae*, permitió efectuar las primeras predicciones termodinámicas de su estructura secundaria. Estos análisis condujeron a una conformación de cuasi-varilla con dos bifurcaciones en los extremos, intermedia entre la del ASBVd con una estructura en varilla o cuasi-varilla, y las de los PLMVd y CChMVd considerablemente más ramificadas (Fadda *et al.*, 2003a). Sin embargo, sólo existe un estudio posterior encaminado a la obtención de más datos sobre la estructura del ELVd *in vitro* (Giguère *et al.*, 2014a), pero ninguno en el que se haya tratado de resolverla *in vivo*.

Dado el bajo título que alcanza el ELVd en su huésped natural (y experimental), en este trabajo hemos abordado el análisis de la estructura de los transcritos lineales sintetizados *in vitro* de ambas polaridades de la variante de referencia del ELVd que además se sabe que es infecciosa (Fadda *et al.*, 2003a; Daròs, 2016). Con este fin realizamos en primer lugar un análisis *in silico* de las estructuras con menor energía libre predichas por tres programas. Posteriormente las predicciones bioinformáticas fueron complementadas *in vitro* mediante ensayos PAGE y SHAPE. Por último, estas conformaciones se refinaron *in vivo* mediante la búsqueda en variantes naturales del viroide de covariaciones o mutaciones compensatorias que las preservaran.

El análisis bioinformático de los RNAs de ambas polaridades del ELVd se llevó a cabo con versiones actualizadas de los programas *Mfold* (Zuker, 2003), *RNAfold* (Lorenz *et al.*, 2011) y *RNAstructure* (Reuter and Mathews, 2010; Hajdin *et al.*, 2013). Los tres algoritmos predijeron para el ELVd (+) RNA una estructura de cuasi-varilla con dos bifurcaciones en los extremos, muy similar a la descrita inicialmente (Fadda *et al.*, 2003a), si bien discreparon al predecir el dominio terminal derecho que presenta

dos, tres o cinco ramificaciones según el programa utilizado. Estas conformaciones difieren muy poco en su energía libre y según *RNAstructure* (Mathews, 2006) muestran una probabilidad de apareamiento relativamente baja en dicho dominio terminal. Los plegamientos obtenidos para el ELVd (-) RNA fueron consistentes salvo en un pequeño motivo central que adopta una estructura en varilla o cruciforme (con dos ramificaciones) según el algoritmo aplicado. Sin embargo, la diferencia en energía libre entre los dos es muy pequeña.

Los programas basados en la minimización de energía libre suelen predecir fiablemente alrededor del 70% de la estructura secundaria de un RNA. Saber si un determinado nucleótido se encuentra formando un par de bases o en un bucle reduce mucho el espacio de conformaciones posibles. Para discriminar los nucleótidos que están desapareados o en regiones flexibles, de los que por el contrario están apareados, se emplean técnicas *in vitro* de modificación química de las bases nitrogenadas (con bisulfito o dimetil sulfato entre otros) o del azúcar (SHAPE), y de análisis físico como RMN (Mathews *et al.*, 2010). La información que proporciona la modificación química mediante SHAPE incrementa notablemente la fiabilidad de la predicción termodinámica, teniendo en cuenta que la reactividad estimada es (en primera aproximación) inversamente proporcional a la probabilidad de que un determinado nucleótido esté apareado. Esta metodología combinada genera modelos de estructura secundaria de alta calidad que todavía mejoran si el programa utilizado predice elementos de estructura terciaria (pseudonudos) como en el caso del algoritmo *ShapeKnots* incluido en el paquete *RNAstructure* (Hajdin *et al.*, 2013).

En el análisis de la estructura de los monómeros lineales (*ml*) del ELVd (+) RNA, el acoplamiento de los datos de SHAPE a la predicción asistida por *RNAstructure* (*ShapeKnots*) resultó en una estructura secundaria en muy buena medida de acuerdo con la generada previamente *in silico* por este mismo programa y por *Mfold*: una conformación de cuasi-varilla con dos bifurcaciones en los extremos. Esta estructura también coincide, con pequeñas diferencias, con la propuesta anteriormente *in silico* (Fadda *et al.*, 2003a) y con la obtenida tras un análisis SHAPE *in vitro* posterior (Giguère *et al.*, 2014a). Por otro lado, en la estructura del *ml* ELVd (-) RNA, hemos detectado por SHAPE *in vitro* un motivo cruciforme en el dominio central, que también aparece en la conformación predicha *in silico* por *RNAstructure*, no descrito anteriormente (Fadda *et al.*, 2003a; Giguère *et al.*, 2014a). El dominio terminal izquierdo muestra diferencias con respecto al predicho *in silico*, apareciendo más

ramificado, posiblemente a causa de la reactividad detectada en los nucleótidos 277-285 y a la falta de datos sobre las posiciones de unión al cebador y adyacentes (193-241). La presencia de estas ramificaciones no es consistente con las mutaciones compensatorias detectadas en variantes naturales de secuencia en este trabajo (ver más adelante) y en otro anterior (Fadda *et al.*, 2003a). En consecuencia, dando más credibilidad a los datos que sustentan la estructura *in vivo*, decidimos realizar una predicción de la estructura de SHAPE *in vitro* considerando los nucleótidos 277-285 como no reactivos, apareciendo entonces dicho dominio cerrado y acomodando las mutaciones. El estudio anterior del ELVd (-) RNA realizado mediante SHAPE *in vitro* (Giguère *et al.*, 2014a) también predijo algunas ramificaciones, aunque distintas de las obtenidas en nuestro trabajo. Tanto estas discrepancias, como las detectadas en el ELVd (+) RNA, podrían resultar de la utilización en los dos trabajos de diferentes variantes del ELVd (con solo un 89% de identidad de secuencia) y de distintos agentes acilantes (anhídrido N-metilatoico, NMIA, y cianuro de benzoilo, BzCN) y condiciones experimentales.

Las conformaciones de los *ml* ELVd RNAs de ambas polaridades predichas en nuestro trabajo con datos de SHAPE *in vitro* son consistentes con su movilidad electroforética en geles nativos de poliacrilamida: la forma positiva migra más rápida que la negativa, sugiriendo una estructura algo más compacta para la primera. Por otro lado, en contraste con dos viroides que adoptan conformaciones muy ramificadas y con interacciones de tipo “kissing-loops” como el PLMVd y el CChMVd que son insolubles en 2 M LiCl, ambos *ml* ELVd RNAs son solubles en estas condiciones iónicas, sugiriendo una estructura menos ramificada y sin elementos de estructura terciaria para estos últimos. Además, en las condiciones de electroforesis utilizadas, los *ml* ELVd RNAs de ambas polaridades mostraron una banda predominante consistente con la adopción de una estructura secundaria mayoritaria.

A diferencia de otros trabajos en los que se ha predicho la estructura secundaria de algunos viroides basada únicamente en los resultados obtenidos con técnicas *in vitro* (Bussière *et al.*, 2000; Delan-Forino *et al.*, 2014; Giguère *et al.*, 2014a y 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015), nosotros decidimos corroborar dichas predicciones con datos obtenidos *in vivo*. Concretamente, aprovechamos la alta variabilidad de secuencia que presenta de forma natural el ELVd en su huésped para detectar covariaciones y conversiones de pares de bases canónicos en no canónicos (G:U o “wobble”) o viceversa, que preservan el apareamiento interno de la mayoría de las regiones de doble cadena en los monómeros circulares (*mc*) de los ELVd (+) y (-) RNAs. En la mayoría de

los casos detectamos una mayor frecuencia de las covariaciones que de las correspondientes mutaciones individuales, a pesar de que estas últimas son más probables estadísticamente. Esta observación sostiene firmemente el papel de la selección en purgar variantes no viables *in vivo* debido a la desestabilización de las regiones apareadas, y por lo tanto asocia la conformación de los RNAs viroidales con su viabilidad. Además, encontramos con una frecuencia relativamente alta mutaciones que preservan las dos bifurcaciones de los extremos de los ELVd (+) y (-) RNAs y el motivo cruciforme del ELVd (-) RNA, pero no las otras ramificaciones detectadas por SHAPE *in vitro* en la región terminal izquierda de este último. La variabilidad encontrada en las 10 variantes de secuencia originales (Fadda *et al.*, 2003a) tampoco mantienen esta estructura ramificada para el ELVd (-) RNA, sino la conformación más cerrada que se obtiene al considerar los nucleótidos 277-285 no reactivos (Fadda *et al.*, 2003a). Teniendo en cuenta estos resultados, la estructura poco ramificada con el motivo cruciforme es la que posiblemente adquiere el ELVd (-) RNA *in vivo* de forma mayoritaria, aunque podría coexistir con la ramificada obtenida por SHAPE *in vitro* a pesar de que no hayamos detectado las dos bandas en los estudios de movilidad electroforética. La presencia de ambos plegamientos pudiera deberse a que la región conflictiva muestre una alta dinámica estructural (Gherghe *et al.*, 2008a; Steen *et al.*, 2012), que incluso tuviera una función reguladora desconocida. Aunque parece improbable, tampoco puede descartarse que las posiciones 277-285 sean reactivas por presentar algunas de ellas una conformación no canónica poco común (Gherghe *et al.*, 2008b; Steen *et al.*, 2012; McGinnis *et al.*, 2012). Estas consideraciones explicarían la existencia de mutaciones compensatorias que mantengan la estructura secundaria de las formas circulares en esa zona, aún siendo reactiva en las lineales. Por último, y como se indica a continuación, lo más probable es que la conformación abierta del *ml* ELVd (-) RNA detectada *in vitro* difiera de la cerrada del *mc* ELVd (-) *in planta* debido a interacciones con factores del huésped, y/o a las condiciones empleadas en los ensayos *in vitro* distintas de las existentes *in vivo*.

La buena concordancia entre las estructuras *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de las dos cadenas del ELVd, no debe darse por sentada a priori, pues mientras que los análisis de minimización de la energía libre predicen correctamente la estructura de la mayoría de los pequeños motivos de RNA, son menos fiables a medida que aumenta el tamaño de la molécula debido a la falta de parámetros termodinámicos precisos para algunos motivos e interacciones de orden superior (Mathews y Turner, 2006; Hajdin *et al.*,

2013). Por otro lado, el análisis SHAPE *in vitro* examina la flexibilidad local del esqueleto de RNA en una solución libre de proteínas y otros factores celulares, y con una composición iónica que en algunos casos incluye una alta concentración de Mg^{+2} que no refleja la del hábitat fisiológico. Además, la estructura *in vitro* tiene limitaciones intrínsecas que resultan de la desnaturalización térmica y subsiguiente renaturalización que se aplica inicialmente al RNA (Merino *et al.*, 2005). Una buena parte de la bioquímica del RNA se ha realizado (y todavía se realiza) con moléculas renaturalizadas, sin que se sepa cuán probable es que un RNA se renaturalice adoptando un plegamiento único que además sea el biológicamente relevante (Uhlenbeck, 1995). Incluso los transcritos *in vitro* frecuentemente usados porque son asequibles y fáciles de preparar, pueden no adquirir la conformación fisiológica del correspondiente RNA. Por otro lado, la estructura secundaria de los RNAs *in vivo* está limitada por la transcripción, el impedimento estérico y los iones con los que interactúan (Vandivier *et al.*, 2016). Además, ciertos RNAs pueden necesitar una proteína específica de tipo chaperona para adoptar su conformación activa, y pueden desestructurarse cuando dicha proteína se elimina. De modo similar algunos RNAs pueden alterar temporalmente su conformación, por ejemplo al interactuar con un ligando, para cumplir ciertas funciones. Por todas estas razones, la estructura obtenida *in vitro* para un RNA mediante SHAPE puede diferir significativamente de la presente en su hábitat natural, como parece ocurrir en nuestro caso para el ELVd (-) RNA.

La detección de interacciones terciarias mediante SHAPE *in vitro* es compleja y en ocasiones contradictoria. Por ejemplo, la estructura con menor energía libre obtenida *in vitro* mediante esta técnica para el *ml* CChMVd (+) RNA (Giguère *et al.*, 2014a) no concuerda con la derivada a partir de los datos obtenidos con mutantes naturales y artificiales combinados con bioensayos y análisis de progenies (Navarro y Flores, 1997; De la Peña *et al.*, 1999; Gago *et al.*, 2005), especialmente en la región proximal a uno de los bucles implicados en una interacción de tipo “kissing-loops” crítica para el plegamiento y la viabilidad *in vivo*. Algo similar ocurre con la forma *ml* (+) de un RNA viroidal de vid, donde tampoco ha podido detectarse de manera clara la interacción “kissing-loops” previamente predicha (Wu *et al.*, 2012). Sin embargo, el análisis de la reactividad SHAPE *in vitro* con y sin Mg^{2+} sí ha permitido la detección de una interacción de esta clase en el *ml* PLMVd (+) RNA (Dubé *et al.*, 2011; Giguère *et al.*, 2014a). En el caso de los ELVd RNAs, ni en el presente trabajo ni en otro previo

(Giguère *et al.*, 2014a), se han obtenido pruebas a favor de la existencia de elementos de estructura terciaria.

En resumen, a pesar de la gran utilidad de los ensayos realizados *in vitro* para inferir estructuras secundarias con datos experimentales que mejoren las predicciones *in silico*, es fundamental contar con datos obtenidos *in vivo* y con pruebas genéticas o filogenéticas independientes que sustenten tanto la estructura secundaria como los posibles elementos de estructura terciaria detectados *in vitro* (Uhlenbeck, 1995; Cech *et al.*, 2015).

Una estructura secundaria bien fundamentada como la descrita aquí para ambas cadenas del ELVd, es crucial para rastrear motivos de secuencia o estructura que pudieran determinar el sitio de inicio de la transcripción, el cual, a su vez, influye en la estructura del RNAs viroidal naciente que comienza a plegarse co-transcripcionalmente (Carbonell *et al.*, 2006). Debido a que los sitios de inicio de la transcripción de las cadenas (+) y (-) de dos de los miembros de la familia *Avsunviroidae* se localizan en sitios similares en secuencia y estructura —los del ASBVd en bucles terminales de la estructura en varilla ricos en A+U, y los del PLMVd en pequeños segmentos de doble cadena que también contienen el sitio de corte de la ribozima de cabeza de martillo (Navarro y Flores, 2000; Delgado *et al.*, 2005; Motard *et al.*, 2008)— presumimos una situación similar para los sitios de inicio de los ELVd (+) y (-) RNAs. Sin embargo, los datos indican que éste no es el caso. Después de verificar con los controles apropiados la consistencia de la técnica RLM-RACE (“RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends”) adaptada a preparaciones de RNA de berenjena, identificamos la posición U138 (cartografiada en un bucle asimétrico que forma parte de una horquilla) como el sitio de inicio de la transcripción del ELVd (+) RNA, y la posición A48 (cartografiada en un segmento de doble cadena adyacente a un bucle asimétrico interno) como el sitio de inicio de la transcripción del ELVd (-) RNA. Debido a que no se observaron secuencias conservadas en las regiones que flanquean los dos sitios, la posibilidad de que el inicio de la transcripción venga determinado por motivos de secuencia más bien que de estructura parece improbable. Por lo tanto, debemos concluir que la NEP de berenjena implicada (o algún factor de transcripción auxiliar), inicia la transcripción de ambas cadenas del ELVd en sitios que comparten una característica estructural común (adyacentes a bucles internos asimétricos).

2. Estructura secundaria del RNA circular de polaridad positiva del PSTVd

El PSTVd, miembro tipo de la familia *Pospiviroidae*, fue el primer viroide descubierto y por tanto el primer agente infeccioso descrito como un pequeño RNA circular no codificante (Diener 1971a), lo que junto a las pérdidas económicas que ocasiona (Randles, 2003) y a la disponibilidad de huéspedes experimentales apropiados, ha conducido a que sea el viroide modelo para muchos estudios de distinta naturaleza (Branch *et al.*, 1988; Harders *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1991; Qi and Ding, 2003a y 2003b; Zhong *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2008; Bojić *et al.*, 2012; Nohales *et al.*, 2012; Minoia *et al.*, 2015). Los datos existentes sostienen que el *mc* PSTVd (+) RNA adopta una conformación en varilla: tanto predicciones *in silico*, utilizando algoritmos que determinan la estructura con menor energía libre (Gross *et al.*, 1978; Qi *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2008; Di Serio *et al.*, 2010; Tsushima *et al.*, 2011), como ensayos *in vitro* con RNasas, bisulfito y dimetil sulfato (Gross *et al.*, 1978; Gast *et al.*, 1996), y más recientemente por SHAPE (Giguère *et al.*, 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015), sostienen esta hipótesis. La observación directa por microscopía electrónica (Sogo *et al.*, 1973; Sanger *et al.*, 1976), así como diversos ensayos biofísicos *in vitro* (Riesner *et al.*, 1979; Riesner *et al.*, 1982; Dingley *et al.*, 2003) también conducen a la misma estructura. Por último, la existencia de duplicaciones y deleciones en variantes naturales y artificiales, que en el PSTVd y varios miembros de la familia *Pospiviroidae* mantienen la conformación en varilla (Haseloff *et al.*, 1982; Semancik *et al.*, 1994; Wassenegger *et al.*, 1994; Fadda *et al.*, 2003b), y que la replicación y el tráfico del PSTVd aparezcan mediados por motivos de dicha estructura (Zhong *et al.*, 2008), sostienen indirectamente que la misma también sea la adoptada *in vivo*.

En el presente trabajo hemos reexaminado esta cuestión realizando análisis *in silico* mediante predicciones termodinámicas, e *in vitro* con la técnica SHAPE, de forma similar a como lo hicimos con los ELVd (+) y (-) RNAs. Sin embargo, la baja variabilidad de secuencia del PSTVd nos impidió confirmar su estructura secundaria *in vivo* mediante análisis de las covariaciones y mutaciones compensatorias presentes en variantes naturales. Aprovechando que un nuevo reactivo de SHAPE, el imidazoluro del ácido 2-metilnicotinico (NAI), es capaz de penetrar los orgánulos de *Arabidopsis thaliana* y acilar sus RNAs nucleares y cloroplásticos *in situ* (Kwok *et al.*, 2013), decidimos emplearlo para examinar la estructura del *mc* PSTVd (+) RNA (que alcanza una alta concentración en su huésped experimental *N. benthamiana*). La replicación del

PSTVd y la del resto de los viroides nucleares transcurre por la variante asimétrica del mecanismo del círculo rodante (Branch *et al.*, 1988), de manera que durante la misma sólo se generan formas circulares de polaridad positiva, que son las que hemos estudiado. No ocurre así con el ELVd, ni con el ASBVd (ver más adelante), que al ser viroides cloroplásticos se replican por la variante simétrica del mecanismo del círculo rodante generando formas monoméricas circulares de ambas polaridades (Daròs *et al.*, 1994).

Aunque la estructura secundaria de la variante de referencia de PSTVd, la intermedia de patata, ha sido objeto de múltiples predicciones termodinámicas (Gross *et al.*, 1978; Zhong *et al.*, 2008), la variante de dalia (Tsushima *et al.*, 2011) examinada recientemente mediante SHAPE *in vitro* (Giguère *et al.*, 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015) o la variante NB empleada por nosotros y otros autores (Qi *et al.*, 2004; Di Serio *et al.*, 2010), no han sido tan estudiadas. Por ello, como con los RNAs del ELVd, realizamos una predicción de la estructura secundaria del *mc* PSTVd (+) RNA (NB) con menor energía libre mediante tres programas: *Mfold* (Zuker, 2003), *RNAfold* (Lorenz *et al.*, 2011) y *RNAstructure (Shapeknots)* (Reuter and Mathews, 2010; Hajdin *et al.*, 2013). Los tres generaron estructuras muy similares, mostrando así un alto grado de coherencia, con diferencias en sólo dos pequeños motivos predichos con baja probabilidad. Además esta estructura resultó muy parecida, aunque no idéntica, a la predicha anteriormente en otros trabajos (Qi *et al.*, 2004; Di Serio *et al.*, 2010). Con fines comparativos también realizamos la predicción con el programa *RNAstructure* de las estructuras secundarias de las variantes intermedia y de dalia, en las que se observaron algunos motivos alternativos a los de la variante NB, particularmente en la segunda, que podrían deberse mayoritariamente a las diferencias en su secuencia: seis sustituciones en la variante intermedia y nueve sustituciones y tres inserciones/deleciones en la de dalia.

El análisis de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida nativos del *mc* PSTVd (+) RNA, tras someterlo a desnaturalización/renaturalización en presencia o ausencia de Mg^{2+} , mostró la misma banda predominante en todos los casos consistente en una conformación mayoritaria. Este resultado hizo factible la aplicación de la metodología SHAPE al estudio estructural *in vitro* de las formas circulares del PSTVd aisladas directamente de tejido infectado, en lugar de utilizar transcritos sintetizados *in vitro* como en análisis anteriores (Giguère *et al.*, 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015). Dichos RNAs circulares, que inician la infección y luego se mueven

sistémicamente, además de ser las formas mayoritarias *in planta*, deben adoptar su conformación intramolecular más fácilmente que los correspondiente RNAs lineales utilizados en estudios previos de SHAPE *in vitro* (Giguère *et al.*, 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015).

La estructura secundaria del *mc* PSTVd (+) RNA fue analizada en nuestro trabajo mediante SHAPE *in vitro* con dos cebadores (para cubrir la totalidad de la molécula) y dos agentes acilantes distintos, NMIA y NAI. El primero es el que empleamos para examinar la estructura de los *ml* ELVd RNAs y es uno de los más utilizados en estudios de SHAPE *in vitro*. Sin embargo, no puede traspasar membranas y modificar el RNA *in cellula*, posiblemente debido a su corta vida media y baja solubilidad en soluciones acuosas y a su alto grado de reactividad cruzada con otros nucleófilos (Spitale *et al.*, 2013). Por tanto, no pudimos utilizar este reactivo *in planta* sino únicamente *in vitro*. El segundo reactivo, NAI, con una vida media mayor, atraviesa membranas y paredes de distintos tipos celulares (Spitale *et al.*, 2013), e incluso accede a orgánulos de plántulas etioladas de *A. thaliana* (Kwok *et al.*, 2013). Así pues, para cumplir con nuestro objetivo, utilizamos el reactivo NAI tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las estructuras obtenidas *in vitro* con ambos cebadores y reactivos fueron muy consistentes entre sí, con reactividades similares en la mayoría de los nucleótidos y apenas algunos reordenamientos en unos pocos bucles. Estas estructuras también fueron coherentes con la predicha previamente *in silico*: una varilla en la que segmentos apareados se alternan con pequeños bucles aparentemente desorganizados. Además, dicha conformación es similar a las determinadas previamente por SHAPE *in vitro* para las variantes del PSTVd intermedia y de dalia (Giguère *et al.*, 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015). Las pequeñas diferencias observadas pueden atribuirse a los cambios de secuencia entre las variantes, a que se utilizaron transcritos lineales sintetizados *in vitro* y no formas circulares como en nuestro caso, a que se empleó otro agente acilante (BzCN) y, por último, a diferencias menores en las condiciones experimentales de los ensayos.

Una vez analizada la estructura secundaria del PSTVd mediante SHAPE *in vitro*, abordamos el análisis *in vivo* de la misma variante NB con uno de los dos reactivos empleados previamente *in vitro*, NAI, para que los resultados fueran directamente comparables. Desafortunadamente, no se ha descrito ningún viroide capaz de infectar *A. thaliana* (Daròs y Flores, 2004), la planta en la que se hicieron los primeros ensayos *in vivo* con NAI (Kwok *et al.*, 2013). Para solventar este problema seleccionamos el

sistema PSTVd/*N. benthamiana* porque este viroide fue el primero en secuenciarse (Diener, 1971a y 1971b; Gross *et al.*, 1978) y porque existen más datos sobre sus propiedades físicas y biológicas que sobre cualquier otro. Y *N. benthamiana* porque es un huésped experimental en el que el PSTVd-NB se acumula con un título relativamente alto (Qi *et al.*, 2004; Di Serio *et al.*, 2010) y porque es una planta modelo muy utilizada en virología para estudios de infiltración, particularmente con *Agrobacterium tumefaciens* (Goodin *et al.*, 2008), lo que nos condujo a presumir una fácil y rápida penetración del NAI en hojas jóvenes. Para asegurarnos de que la reacción acilante se producía *in planta* y no *in vitro* durante la extracción, antes de esta última bloqueamos la actividad del NAI añadiendo una concentración cinco veces superior de β -mercaptoetanol. Después de lavar las hojas varias veces con agua, procedimos a una extracción fenólica de los ácidos nucleicos (Spitale *et al.*, 2013). Además, introdujimos un control adicional en el que, inmediatamente después de la homogeneización del tejido infectado con PSTVd e infiltrado con NAI, añadimos *ml* ELVd (+) RNA obtenido mediante transcripción *in vitro* y comprobamos que no presentaba reactividad, al contrario que el *mc* PSTVd (+) RNA que sí fue modificado *in planta*. Por último, descartamos que la homogeneización mediante un triturador mecánico o mediante nitrógeno líquido pudiera influir en los resultados, que fueron similares con ambos métodos. Tras la extracción, las formas circulares del PSTVd fueron aisladas del resto del RNA mediante una doble-PAGE (primero en condiciones nativas y luego desnaturalizantes), de modo que los datos de reactividad obtenidos provinieran de este RNA y no de productos de su replicación ni de derivados subgenómicos del mismo.

Globalmente, los resultados mostraron que el *mc* PSTVd (+) RNA adopta *in vivo* una conformación de varilla en la que de modo general los bucles son más reactivos que los segmentos de doble cadena, y que esta conformación es muy similar a la predicha *in silico* y a la inferida *in vitro* en ausencia de proteínas. No se observaron regiones de la molécula protegidas por una presumible asociación con proteínas, como ocurre con las proteínas de la cubierta de los virus (Wilkinson *et al.*, 2008; Archer *et al.*, 2013), aunque no podemos excluir la existencia de interacciones RNA-proteínas que no se detecten porque son débiles o transitorias (como posiblemente sucede con las enzimas del huésped que catalizan la replicación), o porque ocurren en regiones de doble cadena que de por sí no son reactivas (Smola *et al.*, 2015). Del mismo modo, la detección de estas asociaciones puede verse impedida si sólo se producen en una pequeña fracción de los RNAs viroidales que puedan encontrarse en un determinado tipo celular. Nuestros

resultados aportan las primeras pruebas directas que sustentan la idea (Diener, 1971a y 1971b) de que el RNA viroidal se encuentra desnudo en su hábitat subcelular mayoritario, el núcleo (Harders *et al.*, 1989; Qi y Ding, 2003b), donde una fracción significativa del *mc* PSTVd (+) RNA que allí se acumula podría funcionar como un reservorio (Minoia *et al.*, 2015; Steger y Perreault, 2016).

La reactividad del *mc* PSTVd (+) RNA frente a NAI *in vivo* fue muy similar a la obtenida *in vitro* con el mismo reactivo, y a la predicha *in silico*, no obstante se observaron unas pequeñas diferencias. En primer lugar la estructura con apareamientos no canónicos de los bucles 6 [CGA(36-38)/GAC(323-325) flanqueado por pares *cis* Watson-Crick G/C y G/U] que media el tráfico de este RNA del mesófilo en empalizada al esponjiforme (Takeda *et al.*, 2011), y 7 (U43/C318) crítico para el tráfico sistémico (Zhong *et al.*, 2007), permaneció inalterada *in vitro* e *in vivo*, excepto por los nucleótidos A325-G328 (entre los bucles 5 y 6, y el propio bucle 6) que muestran más reactividad *in vivo* aunque su estructura se mantiene apareada. Estos datos indican que ambos bucles forman una estructura compacta no accesible al agente acilante. Aunque desconocemos la causa de los cambios en la reactividad de los nucleótidos A325-G328, quizás se deba a la dinámica de los mismos o a que adopten conformaciones poco comunes (Gherghe *et al.*, 2008a y 2008b; Steen *et al.*, 2012; McGinnis *et al.*, 2012). Se ha observado que la RNA polimerasa II, responsable de la transcripción del PSTVd interacciona *in vitro* con dicho viroide en el dominio terminal izquierdo, donde se encuentran las posiciones A325-G328 (Bojic *et al.*, 2012). Además, en un trabajo publicado recientemente se ha mostrado que el PSTVd se asocia *in vitro* con el factor de transcripción TFIIIA-7ZF a través de los nucleótidos 331-347 (Wang *et al.*, 2016). Si bien nosotros no hemos observado cambios importantes en esas posiciones, es posible que el incremento de reactividad detectado *in vivo* en los nucleótidos cercanos A325-G328 se deba a esta asociación espacialmente próxima. Sin embargo, dicha alta reactividad se ha observado *in vitro* en trabajos previos (Giguère *et al.*, 2014b; Adkar-Purushothama *et al.*, 2015), lo que descartaría la hipótesis de la unión a proteína. En segundo lugar en el bucle 24 se encuentra el nucleótido U201, que forma parte de un motivo bipartito que media el tráfico del PSTVd de la vaina del haz al mesófilo en hojas jóvenes de tabaco (Qi *et al.*, 2004). Este bucle se encuentra reorganizado *in vitro* e *in vivo* de manera distinta a la descrita *in silico* en nuestro trabajo y en otros anteriores (Qi *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2008), estando el nucleótido U201 apareado. En tercer lugar algunos nucleótidos de la hebra inferior de los bucles 23 [C150/UCC(206-208)] y 26

[C172/UCC(187-189)], a los que se une la proteína VirP1 (Gozmanova *et al.*, 2003), fueron más reactivos *in vivo* que *in vitro*, indicando algún reordenamiento en su contexto fisiológico. Por último algunos nucleótidos de la hebra inferior del bucle 13 [AACAA (270-275)] y el bucle 15 [CUAUUA (256-261)] que forman parte de la CCR, mostraron una reactividad menor *in vivo* que *in vitro*, lo que sugiere que están protegidos *in planta*. Sin embargo, no se apreciaron diferencias en el bucle 14 (U267), también en la CCR, cuya alta reactividad *in vitro* permaneció inalterada *in vivo*.

Estudios previos de irradiación con luz UV (Branch *et al.*, 1985; Eiras *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) y de cartografía química con nucleasas en solución (Gast *et al.*, 1996), así como de comparación de secuencias, matrices de isostericidad y análisis de mutantes (Zhong *et al.*, 2007), indican que el bucle 15 del PSTVd es un bucle de tipo E. Este motivo sarcina/ricina compuesto por cinco pares de bases centrales no canónicos y un nucleótido protuberante (U259 en la variante NB del PSTVd) (Zhong *et al.*, 2007; Wassenegger *et al.*, 1996), está implicado en la transcripción/acumulación (Zhong *et al.*, 2007), ligación (Gas *et al.*, 2007; Gas *et al.*, 2008), especificidad de huésped (Wassenegger *et al.*, 1996) y patogénesis (Qi y Ding, 2003a) de este viroide. La síntesis de las cadenas oligoméricas del PSTVd y otros viroides relacionados ocurre en el nucleoplasma (Qi y Ding, 2003b) y está catalizada por la RNA polimerasa II (Mühlbach y Sängler, 1979; Flores y Semancik, 1982; Schindler y Mühlbach, 1992; Warrilow y Symons, 1999), posiblemente en asociación con el factor de transcripción TFIIA (Eiras *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016). El procesamiento de los oligómeros de polaridad (+), mediado por los nucleótidos que forman la hebra superior de la CCR, ocurre en el nucleólo (Daròs y Flores, 2004; Qi y Ding, 2003b) gracias a una RNasa de tipo III (Gas *et al.*, 2007). Por último, la ligación dirigida por las dos hebras de la CCR, particularmente por el bucle E (es decir el bucle 15) posiblemente ayudado por los bucles 13 y 14 (Gas *et al.*, 2007), está catalizada por la DNA ligasa I actuando como RNA ligasa (Nohales *et al.*, 2012). El bucle E, conservado en la conformación en varilla de todos los miembros del género *Pospiviroid* al que pertenece el PSTVd, posiciona los extremos para que se encuentren próximos en el espacio y en la orientación correcta (Gas *et al.*, 2007; Baumstark *et al.*, 1997). Siendo la ligación la última etapa del ciclo replicativo, la DNA ligasa I, o algún factor auxiliar, podría permanecer unida a su sustrato, explicando las diferencias observadas en el bucle 13 y el bucle E entre los datos de SHAPE *in vitro* e *in vivo*. La posible unión de la DNA ligasa I a la CCR podría examinarse *in planta* en futuros trabajos mediante la irradiación con UV de hojas

infectadas, seguida de SHAPE *in vivo* e inmunoprecipitación y análisis del complejo. No pueden descartarse explicaciones alternativas a la disminución de la reactividad *in vivo* de esta región con el bucle E, como la unión de otros factores del huésped (RNAs u proteínas) o pequeños cambios estructurales derivados de las distintas condiciones existentes *in vivo* e *in vitro*.

En cualquier caso, debido a sus propiedades peculiares, los viroides, y en particular el PSTVd, deben expresar su fenotipo sin recurrir a la intermediación de proteínas, dependiendo principalmente de motivos de secuencia/estructura presentes en su RNA genómico. Nuestros datos permiten concluir que el *mc* PSTVd (+) RNA adopta *in vitro* e *in vivo* una conformación en varilla similar gracias a la utilización del mismo reactivo acilante (NAI) en ambos casos. Dentro de esta conformación peculiar, algunos nucleótidos que forman parte de motivos funcionales clave como el bucle E son más reactivos *in vitro* que *in vivo*, lo que sugiere que pueden interactuar localmente con proteínas del huésped, y a través de ellas, ejercer su función fisiológica. Por otro lado, el *mc* PSTVd (+) RNA, al acumularse mayoritariamente "desnudo", debe haber evolucionado su resistencia a la degradación mediante una estrategia basada en el propio RNA en vez de por asociación a proteínas. La ausencia de extremos libres en la conformación de varilla le conferiría resistencia a las exonucleasas, mientras que su plegamiento compacto, en gran medida estabilizado por segmentos bicatenarios, desempeñaría un papel similar frente a la mayoría de las RNAsas endonucleolíticas que actúan preferentemente sobre las regiones monocatenarias o sobre segmentos bicatenarios por encima de una cierta longitud (como las proteínas "Dicer-like" involucradas en el silenciamiento mediado por RNA). Los bucles, además de limitar esa longitud y proporcionar una estabilidad adicional, mediarían varios papeles clave, incluyendo la replicación y el tráfico (Zhong *et al.*, 2008). En concordancia con la resistencia intrínseca del *mc* PSTVd (+) RNA, los RNAs viroidales subgenómicos caracterizados en algunos huéspedes infectados con PSTVd no parecen resultar de la escisión de esta forma circular sino de intermediarios replicativos (Minoia *et al.*, 2015).

3. Estructura secundaria de los RNAs circulares de polaridad positiva y negativa del ASBVd

El viroide del manchado solar del aguacate (ASBVd) (Palukaitis *et al.*, 1979) es el miembro tipo de la familia *Avsunviroidae*. Se replica en plastidios (principalmente cloroplastos) mediante la variante simétrica del mecanismo de círculo rodante en la que

se sintetizan los *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs (Bruening *et al.*, 1982; Hutchins *et al.*, 1985; Daròs *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1999). El ASBVd tiene dos características peculiares con respecto al resto de los viroides: su pequeño tamaño, ya que con 246-250 nt es el de menor genoma, y su contenido en A+U (62%) mayor que el de los otros viroides (40-47%) (Symons, 1981; Flores *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2012). De acuerdo con las predicciones *in silico* y los resultados de análisis bioquímicos o biofísicos *in vitro*, la estructura secundaria en varilla o cuasi-varilla del ASBVd, con una bifurcación en un extremo, difiere notablemente de la más ramificada que adoptan los otros miembros de la familia *Avsunviroidae* (Symons, 1981; Hutchins *et al.*, 1986; Navarro and Flores, 2000; Delan-Forino *et al.*, 2014; Giguère *et al.*, 2014a; Hui-Bon-Hoa *et al.*, 2014). Algunos de estos estudios han concluido, de forma contradictoria, la presencia (Delan-Forino *et al.*, 2014) o ausencia (Giguère *et al.*, 2014a) de interacciones terciarias de tipo “kissing-loops” en la cadena de polaridad negativa del ASBVd, como ocurre en algunos otros viroides esta familia. Sin embargo, una vez más, no se ha realizado ningún estudio encaminado a confirmar la estructura secundaria y la presencia de elementos de estructura terciaria en este viroide *in vivo*.

Una vez resuelta la conformación global que adquiere *in planta* el *mc* PSTVd (+) RNA, el miembro tipo de la familia *Pospiviroidae*, abordamos la disección de la estructura del *mc* ASBVd (+) RNA siguiendo una metodología muy similar. Considerando que la aplicación de la metodología SHAPE *in vivo* (sin amplificación del cDNA) requiere un título viroidal relativamente alto, descartamos otros miembros de la familia *Avsunviroidae* por su baja acumulación en sus huéspedes (Hernández and Flores, 1992; Navarro and Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a) y elegimos la variante del ASBVd utilizada en nuestro laboratorio durante años (número de acceso GenBank J02020 con la sustitución C213>U) por alcanzar una concentración *in planta* similar a la del 5S rRNA (Bruening *et al.*, 1982; Navarro and Flores, 2000).

Como con el ELVd y el PSTVd, comenzamos realizando una disección de la estructura secundaria de los *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs *in silico* con tres programas distintos, e *in vitro* analizando su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida y aplicando la técnica SHAPE. Posteriormente, estudiamos la estructura *in planta* del *mc* ASBVd (+) RNA, para comprobar si difiere de la obtenida mediante las otras dos metodologías a causa de factores presentes en su hábitat natural, en particular proteínas con las que pudiera asociarse, y de si presenta en su polaridad complementaria alguna interacción terciaria como se ha descrito previamente (Delan-Forino *et al.*, 2014).

El análisis de la estructura secundaria más estable del *mc* ASBVd (+) RNA mediante tres programas —*Mfold* (Zuker, 2003), *RNAfold* (Lorenz *et al.*, 2011) y *RNAstructure (Shapeknots)* (Reuter and Mathews, 2010; Hajdin *et al.*, 2013)— resultó en conformaciones difiriendo en la región terminal izquierda (con dos ramificaciones o un gran bucle asimétrico), y en algunos reordenamientos menores en bucles centrales. Estas discrepancias se detectaron en regiones predichas con una baja probabilidad de apareamiento. Además, observamos diferencias significativas en la distribución y el tamaño de algunos bucles en comparación con las predicciones realizadas previamente (Symons, 1981; Hutchins *et al.*, 1986; Navarro and Flores, 2000). En el *mc* ASBVd (-) RNA, sin embargo, los tres programas condujeron a la misma conformación en varilla, aunque también con algunas discrepancias con respecto a la estructura bifurcada descrita en un trabajo anterior (Navarro and Flores, 2000).

La aplicación de la técnica SHAPE *in vitro* a los *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs purificados de tejido infectado con dos reactivos (NMIA, que se utiliza comúnmente en los estudios de SHAPE *in vitro*, y NAI, que además puede aplicarse *in vivo* (Spitale *et al.*, 2013) y con dos cebadores en cada caso (para cubrir la molécula entera), condujo a estructuras en varilla en las que, como cabía esperar, los bucles fueron generalmente más reactivos que las regiones apareadas. Estas conformaciones fueron similares a las obtenidas previamente *in silico*, aunque cabe destacar que para el *mc* ASBVd (+) RNA observamos un gran bucle asimétrico en la región terminal izquierda muy similar al predicho por *RNAfold* pero no por los otros dos programas. En ambos *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs además observamos reordenamientos menores en algunos bucles centrales predichos *in silico* con baja probabilidad. Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos mediante SHAPE *in vitro* en un trabajo previo (Giguère *et al.*, 2014a), aunque difirieron considerablemente de los de otro (Delan-Forino *et al.*, 2014), especialmente en el caso del *mc* ASBVd (+) RNA. Las estructuras en varilla que detectamos también son coherentes con la solubilidad en 2 M LiCl del *mc* ASBVd (+) RNA (Navarro and Flores, 1997), y de los *ml* ELVd (+) y (-) RNAs con dos bifurcaciones (este trabajo), pero no así de los PLMVd y CChMVd RNAs, que son insolubles en estas condiciones iónicas probablemente a causa de sus estructuras mucho más ramificadas estabilizadas con elementos de estructura terciaria del tipo “kissing-loops” (Navarro and Flores, 1997).

Por lo tanto, los datos obtenidos en el presente trabajo con el *mc* ASBVd (-) RNA no sostienen la presencia de la interacción “kissing-loops” propuesta previamente

(Delan-Forino *et al.*, 2014), ya que uno de los bucles implicados en la misma muestra reactividad en algunos de sus nucleótidos (U124-U128). Además, en nuestros análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes no detectamos diferencias de movilidad inducidas por Mg^{2+} en los *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs, como debería ocurrir si existiera un elemento estabilizador “kissing-loops”. En estos estudios el *mc* ASBVd (-) RNA migró más lentamente que el *mc* ASBVd (+) RNA, en contra de lo esperado si el primero contuviera una interacción “kissing-loops” y adquiriera una estructura más estable y compacta, como ocurre con el *ml* CChMVd (+) RNA, que migra más rápido que un mutante donde la interacción de esta clase se encuentra impedida (Gago *et al.*, 2005). Además, una estructura algo más estable y compacta del *ml* ASBVd (+) RNA frente a su contraparte de polaridad complementaria se ha observado previamente utilizando técnicas biofísicas (Hui-Bon-Hoa *et al.*, 2014). Cabe mencionar por último que, en nuestros estudios de movilidad electroforética con los *ml* ASBVd (+) y (-) RNAs generados mediante autocorte de transcritos diméricos sintetizados *in vitro*, el primero migró de manera poco definida posiblemente debido a que la estructura de las formas *ml* es menos estable que la del RNA genómico purificado de tejido infectado (fundamentalmente formas *mc*) que utilizamos en el presente trabajo. Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las formas viroidales *mc* son las que producen la infección y median el movimiento. Debido a su circularidad, los *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs adoptan su conformación intramolecular más fácilmente que sus correspondientes *ml* RNAs empleados en estudios anteriores (Delan-Forino *et al.*, 2014; Giguère *et al.*, 2014a).

Aprovechando la observación previa de que el agente acilante NAI es capaz de penetrar tejidos foliares y modificar *in planta* mRNAs cloroplásticos de *A. thaliana* (Kwok *et al.*, 2013), decidimos aplicar la técnica SHAPE para examinar *in vivo* la estructura del *mc* ASBVd (+) RNA como hicimos con el *mc* PSTVd (+) RNA. No pudimos analizar la conformación del *mc* ASBVd (-) RNA debido al título significativamente menor que alcanza en su huésped natural.

Puesto que el ASBVd sólo infecta aguacate y alguna otra especie de la familia *Lauraceae* a la que éste pertenece (Da Graça y Van Vuuren, 1980), presumimos una penetración limitada del reactivo NAI, pues en comparación con *N. benthamiana*, empleada en el estudio de SHAPE *in vivo* del PSTVd, o con *A. thaliana*, utilizada previamente (Kwok *et al.*, 2013), las hojas adultas de aguacate son coriáceas. En consecuencia, comenzamos el estudio con hojas jóvenes (8-10 cm de longitud) a las que

eliminamos la cutícula mediante un lavado con éter etílico. Aún así, el reactivo no penetró bien pues la señal detectada fue débil y poco reproducible, tanto realizando la infiltración de NAI en las hojas aplicando vacío, como manteniéndolas en agitación con el reactivo. Posteriormente infiltramos flores, que también acumulan el ASBVd a altas concentraciones (Da Graça and Mason, 1983); la señal mejoró, pero los resultados mostraron falta de reproducibilidad y, además, las flores solo están disponibles durante un período de tiempo limitado. Por último, probamos con hojas jóvenes muy pequeñas (2-3 cm), observando que el reactivo sí las penetraba, tanto mediante agitación como aplicando vacío, conduciendo a resultados reproducibles.

Del mismo modo que en el apartado anterior, aplicamos una serie de controles encaminados a verificar que la señal detectada era fruto de la penetración del NAI *in planta* y no de la reacción *in vitro* durante la extracción. Con este fin, tras la infiltración con NAI añadimos β -mercaptoetanol en exceso para inactivar el reactivo sobrante, lavamos repetidamente las hojas con agua e inmediatamente después de triturarlas con nitrógeno líquido añadimos una preparación de *mc* PSTVd (+) RNA, comprobando que no mostraba reactividad, al contrario del *mc* ASBVd (+) RNA que sí fue acilado *in planta*. Además, tras triturar el tejido, la extracción del RNA con fenol permitió eliminar las trazas que pudieran quedar de reactivo al acumularse éste a la fase orgánica y no en la acuosa como el RNA (Spitale *et al.*, 2013). Por último, los *mc* ASBVd RNAs se purificaron mediante una doble-PAGE antes de llevar a cabo la reacción de extensión del cebador, para asegurarnos que los cDNAs examinados por SHAPE no procedían de subproductos de la replicación o la degradación del RNA viroidal.

Los resultados mostraron que el *mc* ASBVd (+) RNA se acumula *in planta* esencialmente desnudo y no fuertemente asociado a proteínas. Estos resultados concuerdan con los discutidos en el apartado anterior con el *mc* PSTVd (+) RNA. No obstante, como ya se señaló entonces, no pueden descartarse interacciones débiles o transitorias del *mc* ASBVd (+) RNA con proteínas (como las enzimas del huésped que catalizan la replicación), o que dichas interacciones ocurran en regiones de doble cadena (Smola *et al.*, 2015), o bien que afecten a un número muy reducido de moléculas, ya que en tales casos las asociaciones no serían detectables por SHAPE. En este contexto, un estudio anterior en el que se irradiaron con luz UV hojas de aguacate infectadas con el ASBVd reveló que el *mc* ASBVd (+) RNA interacciona con dos proteínas cloroplásticas de unión a RNA (PARBP33 y PARBP35) implicadas en estabilización, maduración y edición de transcritos cloroplásticos. Además, la PARBP33 actúa como

una chaperona de RNA facilitando el autocorte de oligómeros viroidales *in vitro* y posiblemente *in vivo* (Daròs and Flores, 2002). La luz UV promueve la formación de puentes covalentes entre los ácidos nucleicos y las proteínas en sus puntos de contacto, congelando las interacciones *in situ* aunque sean transitorias (Hockensmith *et al.*, 1991; Pashev *et al.*, 1991). Sin embargo, este entrecruzamiento requiere además de proximidad una orientación apropiada de los grupos implicados en las asociaciones RNA-proteína. En futuros experimentos sería interesante irradiar con luz UV las hojas, acilar el RNA *in planta* con NAI, e inmunoprecipitar y analizar el complejo para discernir dónde se produce la asociación de la proteína con el RNA.

La reactividad similar mostrada *in vitro* e *in vivo* por el *mc* ASBVd (+) RNA en la mayoría de sus nucleótidos sostiene la gran estabilidad de este RNA en ambientes desproteinizados, bajo condiciones iónicas diferentes de las presentes *in planta*, y tras haber sufrido un proceso de desnaturalización/renaturalización. Estos datos concuerdan con los estudios de movilidad electroforética en geles de poliacrilamida nativos, en los que la estructura de los *mc* ASBVd (+) y (-) RNAs no se altera tras la desnaturalización/renaturalización en distintos medios iónicos (con y sin Mg^{2+}). Únicamente se detectaron diferencias en un par de bases, que es más reactivo *in vivo* y se encuentra desapareado formando parte del gran bucle asimétrico de la región terminal izquierda (G17-U233), y en una pequeña región delimitada por los nucleótidos C85 y A91 en la hebra superior, y por U152 y U160 en la inferior, que se encuentra reorganizada *in vivo* siendo más similar a la de la estructura predicha *in silico* con el mismo programa (*RNAstructure*, *ShapeKnots*) que a la obtenida mediante *SHAPE in vitro*. Se desconoce la función biológica de ambas regiones así como si interactúan o no con factores celulares, por lo que creemos que estas discrepancias con la conformación *in vivo* pueden deberse a las condiciones peculiares del hábitat natural y a la baja probabilidad con la que fueron predichas las estructuras.

En resumen, como ocurre con el *mc* PSTVd (+) RNA, el *mc* ASBVd (+) RNA se encuentra *in vivo* como un RNA libre o desnudo, es decir sin mostrar asociaciones fuertes con proteínas, que adopta una conformación en varilla. Este hallazgo, común a dos viroides que se acumulan en compartimentos subcelulares diferentes (núcleo y cloroplasto), sugiere que la no asociación a proteínas es una característica general de los viroides. La estabilidad intrínseca derivada de su circularidad y su compacta estructura secundaria rica en segmentos de doble cadena confiere a estos dos RNAs, y posiblemente al resto de los viroides, resistencia frente a exonucleasas y endonucleasas.

En este contexto es de notar que hay más secuencias de RNA que se pliegan en una estructura circular que en una estructura lineal de la misma longitud, lo que implica que la solidez (“robustness”) mutacional de las estructuras circulares es mayor (Cuesta y Marubia, 2017). Los bucles tendrían un importante papel funcional como ilustra que los sitios de inicio de la transcripción de ambas cadenas del ASBVd se encuentren en bucles terminales ricos en A+U (Navarro and Flores, 2000), o que la mayoría de los bucles internos sean imprescindibles para el tráfico o la replicación del PSTVd (Zhong *et al.*, 2008). La puesta a punto de la metodología SHAPE para en última instancia aplicarla al estudio de la estructura *in vivo* de dos viroides en dos huéspedes distintos, abre un amplio abanico de posibilidades para extenderla, sola o en combinación con otras, al análisis conformacional de los viroides en su contexto natural y al establecimiento de relaciones estructura-función.

Conclusiones

1. Las estructuras del ELVd (+) RNA obtenidas *in silico*, *in vitro* e *in vivo* son consistentes entre sí y conducen a una conformación en varilla con dos ramificaciones en los extremos.
2. Las estructuras del ELVd (-) RNA obtenidas *in silico* e *in vivo* son similares y conducen a un plegamiento en varilla con dos bifurcaciones en los extremos y un motivo cruciforme en el centro, pero difieren ligeramente de la obtenida *in vitro*, que presenta más ramificaciones en un extremo.
3. La distinta movilidad electroforética en geles de poliacrilamida nativos de los *ml* ELVd (+) y (-) RNAs es consistente con las diferencias conformacionales observadas mediante las otras metodologías. La migración más rápida del ELVd (+) RNA sugiere que presenta una estructura más compacta que el *ml* ELVd (-) RNA.
4. La conformación del *mc* PSTVd (+) RNA *in vivo* es muy similar, pero no idéntica, a la obtenida *in silico* e *in vitro*: una estructura en varilla con segmentos apareados y bucles aparentemente desorganizados.
5. La reactividad SHAPE de la CCR del *mc* PSTVd (+) RNA *in vivo* es inferior a la observada *in vitro*, posiblemente debido a interacciones con proteínas o a otros factores del hábitat celular.
6. La conformación del *mc* ASBVd (+) RNA *in vivo* es muy parecida a la obtenida *in silico* e *in vitro*. Este RNA también adopta una estructura en varilla con segmentos apareados flanqueados por bucles.
7. No se observan diferencias en la reactividad SHAPE *in vitro* e *in vivo* atribuibles a la asociación del *mc* ASBVd (+) RNA con proteínas en el segundo caso.
8. La conformación en varilla del *mc* ASBVd (-) RNA obtenida *in vitro*, que es parecida a la predicha *in silico*, muestra pequeñas diferencias con la del *mc* ASBVd (+) RNA como se observa al analizar sus movilidades electroforéticas.
9. No se han detectado interacciones terciarias en ninguno de los viroides estudiados.
10. La buena consistencia observada entre las conformaciones *in silico*, *in vitro* e *in vivo* sugiere su gran estabilidad en distintos ambientes.
11. Nuestros resultados aportan las primeras pruebas directas de que los viroides se acumulan *in planta* mayoritariamente desnudos: su circularidad y alta autocomplementariedad los protege frente a RNAsas.

Bibliografía

- ABRAITIENE, A., ZHAO, Y., HAMMOND, R. (2008). Nuclear targeting by fragmentation of the potato spindle tuber viroid genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 470–475.
- ADKAR-PURUSHOTHAMA, C.R., BROSSEAU, C., GIGUÈRE, T., SANO, T., MOFFETT, P., PERREAULT, J.P. (2015). Small RNA derived from the virulence modulating region of the potato spindle tuber viroid silences callose synthase genes of tomato plants. *Plant Cell* **27**, 2178-2194.
- 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.
- ARCHER, E.J., SIMPSON, M.A., WATTS, N.J., O'KANE, R., WANG, B., ERIE, D.A., MCPHERSON, A., WEEKS, K.M. (2013). Long-range architecture in a viral RNA genome. *Biochemistry* **52**, 3182-3190.
- 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.
- BAUMSTARK, T., SCHRÖDER, A.R., 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.
- BOJIĆ, 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.
- 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.
- BRANCH, A.O., DICKSON, E. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by Southern hybridization. *Virology* **104**, 10-26.

- BRANCH, A.D., ROBERTSON, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-454.
- BRANCH, A.D., BENENFELD, B.J., ROBERTSON, H.D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5SRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6590–6594.
- 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.
- BRUENING, G., GOULD, A.R., MURPHY, P.J., SYMONS, R.H. (1982). Oligomers of avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves. *FEBS Lett.* **148**, 71-78.
- 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.
- BUSSIÈRE, F., OUELLET, J., CÔTÉ, F., LÉVESQUE, D., PERREAULT, J.P. (2000). Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.* **74**, 2647–2654.
- CARBONELL, A., DE LA PEÑA, M., FLORES, R. GAGO, S. (2006). Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of AUC in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5613-5622.
- CECH, T.R. (2015). RNA World research-still evolving. *RNA* **21**, 474-475.
- CHI, Y.I., MARTICK, M., LARES, M., KIM, R., SCOTT, W.G., KIM, S.H. (2008). Capturing hammerhead ribozyme structures in action by modulating general base catalysis. *PLoS Biol.* **6**, 2060-2068
- COIT, J.E. (1928). Sunblotch of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, **20**, 27–32.
- CUESTA, J. A., MANRUBIA, S. (2017). Enumerating secondary structures and structural moieties for circular RNAs. *J. Theor. Biol.* (in press).

- DA GRAÇA, J.V., VAN VUUREN, S.P., (1980). Transmission of avocado sunblotch disease to cinnamon. *Plant Dis.* **64**, 475.
- DA GRAÇA, J.V., MASON, T.E. (1983). Field indexing for avocado sunblotch disease. *S. Afr. Avocado Growers Ass. Yrbk.* **6**, 83-85.
- DARÒS, J.A. (2016). Eggplant latent viroid: a friendly experimental system in the family *Avsunviroidae*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1170-1177.
- DARÒS, J.A., FLORES, R. (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J.* **21**, 749-759.
- 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., 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.
- DE LA PEÑA, M., FLORES, R. (2001). An extranucleotide in the consensus catalytic core of a viroid hammerhead ribozyme: implications for the design of more efficient ribozymes. *J. Biol. Chem.* **276**, 34586–34593.
- DE LA PEÑA, M., FLORES, R. (2002) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *J. Mol. Biol.* **321**, 411-421.
- DE LA PEÑA, M., NAVARRO, B., FLORES, R. (1999). Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: a tetraloop within the *in vivo* branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9960–9965.
- DE LA PEÑA, M., GAGO, S., FLORES, R. (2003). Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.* **22**, 5561–5570.
- DEIGAN, K.E., LI, T.W., MATHEWS, D.H., WEEKS, K.M. (2009). Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 97-102.
- DELAN-FORINO, C., DEFORGES, J., BENARD, L., SARGUEIL, B., MAUREL, M., TORCHET, C. (2014). Structural analyses of avocado sunblotch viroid reveal differences in the folding of plus and minus RNA strands. *Viruses* **6**, 489–506.

- DELGADO, S., MARTÍNEZ DE ALBA, E., HERNÁNDEZ, C., 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.
- 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. (1979). Viroids and Viroid Diseases. *Wiley Interscience, New York* 252 pp.
- DIENER, T.O. (1989). Circular RNAs: relics of precellular evolution?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 9370–9374.
- DIENER, T.O. (2001). The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? *Adv Virus Res.* **57**, 137-84.
- DIENER, T.O., RAYMER, W.B. (1967). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* **158**, 378-381.
- DING, B. (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 105-131.
- DING B. (2010). Viroids: self-replicating, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **1**, 362-375.
- 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., KWON, M.O., HAMMOND, R., OWENS, R.A. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.* **12**, 931-936.
- DINGLEY, A.J., STEGER, G., ESTERS, B., RIESNER, D., GRZESIEK, S. (2003). Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis. *J. Mol. Biol.* **334**, 751–767.
- DI SERIO, F., FLORES, R. (2008). Viroids: molecular implements for dissecting RNA trafficking in plants. *RNA Biol.* **5**, 128-131.

- 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., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., NAVARRO, B., GISEL, A., FLORES, R. (2010). RNAdependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a nuclear-replicating viroid. *J. Virol.* **84**, 2477-2489.
- DI SERIO, F., FLORES, R., VERHOEVEN, J.T., LI, S.F., PALLÁS, V., RANGLES, J.W., SANO, T., VIDALAKIS, G., OWENS, R.A. (2014). Current status of viroid taxonomy. *Arch. Virol.* **159**, 3467-3478.
- DUBÉ, A., BISAILLON, M., PERREAULT, J. (2009). Identification of proteins from *Prunus persica* that interact with peach latent mosaic viroid. *J. Virol.*, **83**, 12057–12067.
- DUBÉ, A., BAUMSTARK, T., BISAILLON, M., PERREAULT, J.P. (2010). The RNA strands of the plus and minus polarities of peach latent mosaic viroid fold into different structures. *RNA* **16**, 463–473.
- DUBÈ, A., BOLDUC, F., BISAILLON, M., PERREAULT, J. (2011). Mapping studies of the peach latent mosaic viroid reveal novel structural features. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 688–701.
- DUFOUR, D., DE LA PEÑA, M., GAGO, S., FLORES, R., GALLEGU, J. (2009). Structure-function analysis of the ribozymes of chrysanthemum chlorotic mottle viroid: a loop-loop interaction motif conserved in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res.* **37**, 368–381.
- EIRAS, M., KITAJIMA, E.W., FLORES, R., DARÒS, J.A. (2007). Existence *in vivo* of the loop E motif in potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* **152**, 1389–1393.
- EIRAS, M., NOHALES, M.A., KITAJIMA, E. W., FLORES, R., DARÒS, J.A. (2011). Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind *in vitro* specifically potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* **156**, 529–533.
- 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., 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.
- FAGOAGA, C., PINA, J. A., DURÁN-VILA, N. (1994). Occurrence of small RNAs in severely diseased vegetable crops. *Plant. Dis.* **78**, 749-753.
- FEKIH HASSEN, I., MASSART, S., MOTARD, J., ROUSSEL, S., PARISI, O., KUMMERT, J., FAKHFAKH, H., MARRAKCHI, M., PERREAULT, J.P., JIJAKLI, M.H. (2007). Molecular features of new peach latent mosaic viroid variants suggest that recombination may have contributed to the evolution of this infectious RNA. *Virology* **360**, 50–57.
- 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.
- 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., 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., DI SERIO, F., HERNÁNDEZ, C. (1997). Viroids: the noncoding genomes. *Sem. Virol.* **8**, 65-73.
- FLORES, R., DARÒS, J. A., HERNÁNDEZ, C. (2000). *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv. Virus Res.* **55**, 271-323.
- FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., DE LA PEÑA, M., VERA, A., DARÒS, J.A. (2001). Hammerhead ribozyme structure and function in plant replication. *Meth. 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., GRUBB, D., ELLEUCH, A., NOHALES, M. A., DELGADO, S., GAGO, S. (2011). Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme. *RNA Biol.* **8**, 200–206.

- 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.
- FLORES, R., MINOIA, S., CARBONELL, A., GISEL, A., DELGADO, S., LÓPEZ-CARRASCO, A., NAVARRO, B., DI SERIO, F. (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Res.* **2**, 136-145
- 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.
- FORSTER, A. C., DAVIES, C., SHELDON, C., JEFFRIES, A. C., SYMONS, R. H. (1988). Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimmers. *Nature* **334**, 265-267.
- GAGO, S., DE LA PEÑA, M., FLORES, R. (2005). A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its *in vitro* folding and *in vivo* viability. *RNA* **11**, 1073–1083.
- GAGO, S., ELENA, S.F., FLORES, R., SANJUÁN, R. (2009). Extremely high variability of a hammerhead viroid. *Science* **323**, 1308.
- GAS, M.E., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R., DARÒS, J.A. (2007). Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog.* **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.
- GAST, F.U., KEMPE, D., SPIEKER, R.L., SÄNGER, H.L. (1996). Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J. Mol. Biol.* **262**, 652–670.

- GAST, F.U., KEMPE, D., SÄNGER, H.L. (1998). The dimerization domain of potato spindle tuber viroid, a possible hallmark for infectious RNA. *Biochemistry* **37**, 14098–14107.
- GHERGHE, C.M., SHAJANI, Z., WILKINSON, K.A., VARANI, G., WEEKS, K.M. (2008a). Strong correlation between SHAPE chemistry and the generalized NMR order parameter (S2) in RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12244-12255.
- GHERGHE, C.M., MORTIMER, S.A., KRAHN, J.M., THOMPSON, N.L., WEEKS, K.M. (2008b) Slow conformational dynamics at C2'-endo nucleotides in RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8884-8885.
- GIGUÈRE, T., ADKAR-PURUSHOTHAMA, C., BOLDUC, F., PERREAULT, J. (2014a). Elucidation of the structures of all members of the *Avsunviroidae* family. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 767–779.
- GIGUÈRE, T., ADKAR-PURUSHOTHAMA, C., PERREAULT, J. (2014b). Comprehensive secondary structure elucidation of four genera of the family *Pospiviroidae*. *PLoS One* **9**, 1-10
- GLOUZON, J., BOLDUC, F., WANG, S., NAJMANOVICH, R., PERREAULT, J.P. (2014). Deep sequencing of the peach latent mosaic viroid reveals new aspects of population heterogeneity. *PLoS One* **9**, 1-15
- 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. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with Hop stunt viroid RNA. *J. Virol.* **78**, 10104-10110.
- 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.
- GOODIN, M.M., ZAITLIN, D., NAIDU, R.A., LOMMEL, S.A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**, 1015-1026.
- GÓRA, A., CANDRESSE, T., ZAGÓRSKI, W. (1994). An analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates. *Arch. Virol.* **138**, 233–245.

- GOZMANOVA, M., DENTI, M., MINKOV, I., TSAGRIS, M., TABLER, M. (2003). Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5534–5543.
- GRILL, L.K. SEMANCIK, J.S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 896-900.
- 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., FELLS, A., QU, F., ZIMMAT, R., STEGER, G., RIESNER, D. (1995). Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology* **209**, 60-69.
- HAJDIN, C.E., BELLAOUSOV, S., HUGGINS, W., LEONARD, C.W., MATHEWS, D.H., WEEKS, K.M. (2013). Accurate SHAPE-directed RNA secondary structure modeling, including pseudoknots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 5498-503.
- 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 columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10083-10094.
- 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.
- 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.
- HENCO, K., SÄNGER, H.L., RIESNER, D. (1979). Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods. *Nucleic Acids Res.* **6**, 3041–3059.
- 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.
- HERNÁNDEZ, C., ELENA, S. F., MOYA, A., FLORES, R. (1992). Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and has also sequence homologies with viroids from other subgroups. *J. Gen. Virol.* **73**, 2503-2507.
- HERNÁNDEZ, C., DI SERIO, F., AMBRÓS, S., DARÒS, J.A., FLORES, R. (2006). An element of tertiary structure of peach latent mosaic viroid RNA revealed by UV irradiation. *J. Virol.* **80**, 9336–9340.
- HOCKENSMITH, J.W., KUBASEK, W.L., VORACHEK, W.R., EVERTSZ, E.M., VON HIPPEL, P.H. (1991). Laser cross-linking of protein-nucleic acid complexes. *Methods Enzymol.* **208**, 211-236.
- HUI-BON-HOA, G., KADDOUR, H., VERGNE J., KRUGLIK, S.G., MAUREL, M.C., (2014). Raman characterization of avocado sunblotch viroid and its response to external perturbations and self-cleavage. *BMC Biophys.* **7**, 2.
- HUPPERTZ I., ATTIG, J., D'AMBROGIO, A., EASTON, L.E., SIBLEY, C.R., SUGIMOTO, Y., TAJNIK, M., KÖNIG, J., ULE, J. (2014). iCLIP: protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods* **65**, 274-287.
- HUTCHINS, C.J., KEESE, P., VISVADER, J.E., RATHJEN, P.D., MCINNIS, J.L., SYMONS, R.H. (1985). Comparison of multimeric 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 Acids Res.* **14**, 3627-3640.
- 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.

- KALANTIDIS, K., DENTI, M., TZORTZAKAKI, S., MARINO, E., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2007). Virp1 is a host protein with a major role in potato spindle tuber viroid infection in Nicotiana plants. *J. Virol.* **81**, 12872–12880.
- KASTAL'eva, T.B., GIRSOVA, N.V., MOZHAeva, K.A., LEE, I.M., OWENS, R.A. (2013) Molecular properties of potato spindle tuber viroid (PSTVd) isolates from the collection of the Russian Research Institute of Phytopathology. *Mol. Biol. (Mosk.)* **47**, 94-106.
- KEESE, P., SYMONS, R. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangement 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.
- KHVOROVA, A., LESCOUTE, A., WESTHOF, E., JAYASENA, S.D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 708–712.
- 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.
- KOLONKO, N., BANNACH, O., ASCHERMANN, K., HU, K.H., MOORS, M., SCHMITZ, M., STEGER, G., RIESNER, D. (2006). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology* **347**, 392–404.
- KOLTUNOW, A.M., REZAIAN, M.A. (1988). Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* **16**, 849-864.
- 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.
- KOMODA, K., ISHIBASHI, K., KAWAMURA-NAGAYA, K., ISHIKAWA, M. (2014). Possible involvement of eEF1A in Tomato spotted wilt virus RNA synthesis. *Virology* **468**, 81-87.

- KWOK, C.K., DING, Y., TANG, Y., ASSMANN, S.M., BEVILACQUA, P.C. (2013). Determination of *in vivo* RNA structure in low-abundance transcripts. *Nat. Commun.* **4**, 2971.
- KWOK, C.K., TANG, Y., ASSMANN, S.M., BEVILACQUA, P.C., (2015). The RNA structurome: transcriptome-wide structure probing with next-generation sequencing. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 221-232.
- 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.
- LEONTIS, N.B., WESTHOF, E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA* **7**, 499–512.
- 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.
- 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.
- LORENZ, R., BERNHART, S.H., HÖNER ZU SIEDERDISSEN, C., TAFER, H., FLAMM, C., STADLER, P.F., HOFACKER, I.L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **6**, 26.
- LOSS, P., SCHMITZ, M., STEGER, G., RIESNER, D. (1991). Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO J.* **10**, 719–727.
- MALFITANO, M., DISERIO, 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.
- MANIATAKI, E., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2003). Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* **9**, 346–354.
- MARCOS, J. F. y FLORES, R. (1992). Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* **186**, 481-488.
- MARTICK, M., SCOTT, W.G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **126**, 309–320.

- MARTIN, W.H. (1922). "Spindle tuber," a new potato trouble. *Hints to Potato Growers, N.J. State Potato Assoc.* **3**, 4 pp.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A. E., SÄGESSER, R., TABLER, M., TSAGRIS, M. (2003). A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **77**, 9685-9694.
- MATHEWS, D.H. (2006). RNA secondary structure analysis using RNAstructure. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **12**.
- MATHEWS, D.H., TURNER, D. H. (2006). Prediction of RNA secondary structure by free energy minimization. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 270–278.
- MATHEWS, D.H., MOSS, W.N., TURNER, D.H. (2010). Folding and finding RNA secondary structure. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1-16.
- MCGINNIS, J.L., DUNKLE, J.A., CATE, J.H., WEEKS, K.M. (2012). The mechanisms of RNA SHAPE chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 6617-24.
- MERINO, E.J., WILKINSON, K.A., COUGHLAN, J.L., WEEKS, K.M. (2005). RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4223-4231
- MINOIA, S., NAVARRO, B., DELGADO, S., DI SERIO, F., FLORES, R. (2015). 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*. *Nucleic Acids Res.* **43**, 2313-2325.
- 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.
- MORTIMER, S.A., WEEKS, K.M. (2009) Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one second snapshots and at single nucleotide resolution. *Nature Protoc.* **4**, 1413-1421
- MOTARD, J., BOLDUC, F., THOMPSON, D., PERREAULT, J.P. (2008). The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology* **373**, 362–375.
- MÜLBACH, H.P., SÄNGER, H.L.(1979). Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature* **278**,185–188.
- 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., GISEL, A., RODIO, M., 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.
- NAVARRO, J.A., FLORES, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* **19**, 2662–2670.
- 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.
- NOHALES, M.A., FLORES, R., DARÓS, J.A. (2012). Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 13805-13811.
- OHNO, T., TAKAMATSU, N., MESHII, T., OKADA, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6185-6187.
- OWENS, R. A. (2007). Potato spindle tuber viroid: the simplicity paradox resolved? *Mol. Plant Pathol.* **8**, 549-560.
- 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., FELDSTEIN, P.A., HU, Y., STEGER, G. (2003). Identification of a novel structural interaction in columnnea latent viroid. *Virology* **313**, 604–614.
- OWENS, R.A., FLORES, R., DI SERIO, F., LI, S.F., PALLÁS, V., RANGLES, J.W., SANO, T., VIDALAKIS, G. (2012) Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier/Academic. Press.* 1221–1234
- PALUKAITIS, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* **158**, 239-241.

- PALUKAITIS, P., HATTA, T., ALEXANDER, D., SYMONS, R. (1979). Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* **99**, 145–151.
- PASHEV, I.G., DIMITROV, S.I., ANGELOV, D. (1991). Crosslinking proteins to nucleic acids by ultraviolet laser irradiation. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 323–326.
- 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.
- PRODY, G. A., BAKOS, J. T., BUZAYAN, J. M., SCHENEIDER, I. R., BRUENING, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580.
- POLIVKA, H., STAUB, U., GROSS, H.J. (1996). Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine, yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I. *J. Gen. Virol.* **77**, 155–161.
- 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., 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). Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* **15**, 1360-1374.
- QI, Y., DING, B. (2003b). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* **15**, 2566-2577.
- QI, Y., PÉLISSIER, 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.

- QU, F., HEINRICH, C., LOSS, P., STEGER, G., TIEN, P., RIESNER, D. (1995). Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural domains. *EMBO J.* **12**, 2129–2139.
- 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.
- REANWARAKORN, K., SEMANCIK, J. S. (1998). Regulation of pathogenicity of Hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.* **79**, 3163-3171.
- 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.
- REUTER JS, MATHEWS DH. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 129.
- REZAIAN, M.A. (1990). Australian grapevine viroid: evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1813-1818.
- RIESNER, D. (1991). Viroids: from thermodynamics to cellular structure and function. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 122–131.
- RIESNER, D., HENCO, K., ROKOHL, U., KLOTZ, G., KLEINSCHMIDT, A. K., DOMDEY, H., JANK, P., GROSS, H.J., SÄNGER, H.L. (1979). Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.* **133**, 85–115.
- RIESNER, D, KAPER, J.M., RANDLES, J.W. (1982). Stiffness of viroids and viroid-like RNA in solution. *Nucleic Acids Res.* **10**, 5587-5598.
- 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., DI SERIO, 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.E., GÓMEZ, M.D., FLORES, R., DI SERIO, F. (2007). A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell* **19**, 3610–3626.
- 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., 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.
- SAUCEDO-CARABEZ, J.R., TÉLIZ-ORTIZ, D., OCHOA-ASCENCIO, S., OCHOA-MARTÍNEZ, D., VALLEJO-PÉREZ, M.R., BELTRÁN-PEÑA, H. (2014). Effect of avocado sunblotch viroid (ASBVd) on avocado yield in Michoacan, Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* **138**, 799-805
- SCHINDLER, I.M., MÜHLBACH, H.P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a re-evaluation. *Plant Sci.* **84**, 221-229.
- SCHRODER, A.R.W., RIESNER, D. (2002). Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3349–3359.
- 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.
- SEMANCIK, J.S., SZYCHOWSKI, J.A. (1994). Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.* **75**, 1543-1549.
- 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., SZYCHOWSKI, J., RAKOWSKI, A., SYMONS, R. (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.
- 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., NIE, X. (2003a). Biology. In *Viroids* (A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles, J.S. Semancik, Eds.) pp 30-48. CSIRO Publ: Collingwood, Aust.
- SINGH, R. P., READY, K. F. M., HADIDI, A. (2003b). Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. In: ‘Viroids’ (A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles, J.S. Semancik, Eds.) pp 255-264. CSIRO Publ.: Collingwood, Aust.
- SMOLA, M.J., CALABRESE, J.M., WEEKS, K.M. (2015). Detection of RNA-protein interactions in living cells with SHAPE. *Biochemistry* **54**, 6867-6875.
- 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.
- 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.
- 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.

- SPITALE, R.C., CRISALLI, P., FLYNN, R.A., TORRE, E.A., KOOL, E.T., CHANG, H.Y. (2013). RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 18-20.
- STEEN, K.A., RICE, G.M., WEEKS, K.M. (2012). Fingerprinting noncanonical and tertiary RNA structures by differential SHAPE reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13160-13163.
- STEGER, G., PERREAULT, J.P. (2016). Structure and associated biological functions of viroids. *Adv. Virus Res.* **94**, 141-172.
- STEGER, G., HOFMANN, H., FÖRTSCH, J., GROSS, H., RANGLES, J., SÄNGER, H., RIESNER, D. (1984). Conformational transitions in viroids and virusoids: Comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 543-571.
- SWEENEY, B.A., ROY, P., LEONTIS N.B. (2015). An introduction to recurrent nucleotide interactions in RNA. *WIREs RNA* **6**, 17-45.
- SYMONS, R.H. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary structure and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527-6537.
- TAKAHASHI, T., DIENER, T.O. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology* **64**, 106-114.
- TAKEDA, R., PETROV, A., LEONTIS, N., 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.
- TIMMERMANN, C., MÜHLBACH, H.P., BANDTE, M., BUTTNER, C. (2001). Control of mechanical viroid transmission by the disinfection of tables and tools. *Biol. Wet.* **66**, 151-156.
- TSUSHIMA, T., MURAKAMI, S., ITO, H., HE, Y.H., RAJ, A.P.C., SANO, T. (2011). Molecular characterization of potato spindle tuber viroid in dahlia. *J. Gen. Plant Pathol.* **77**, 253-256.
- TSUSHIMA, D., TSUSHIMA, T., SANO, T. (2016). Molecular dissection of a dahlia isolate of potato spindle tuber viroid inciting a mild symptoms in tomato. *Virus Res.* **214**, 11-18.
- UHLENBECK, O.C. (1995). Keeping RNA happy. *RNA* **1**, 4-6.
- VACHEV, T., IVANOVA, D., YAHUBYAN, G., NAIMOV, S., MINKOV, I., GOZMANOVA, M. (2014). Detection of Potato spindle tuber viroid sequence

- variants derived from PSTVd-infected *Phelipanche ramosa* in flower organs of tomato plants. *Biotechnol. Equip.* **28**, 402-407.
- VANDIVIER, L. E., ANDERSON, S. J., FOLEY, S. W., GREGORY, B. D. (2016). The conservation and function of RNA secondary structure in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**, 463-488.
- 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.
- VISVADER, J.E., FORSTER, A.C., SYMONS, R.H. (1985). Infectivity and *in vitro* mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicates the site of processing of viroid precursors. *Nucleic Acids Res.* **13**, 5843-5856.
- 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 sunblotch virus from symptomless trees and the origin of such trees. *Phytopathology* **5**, 237- 241.
- WANG, Y., ZHONG, X., ITAYA, A., DING, B. (2007). Evidence for the existence of the loop E motif of potato spindle tuber viroid *in vivo*. *J. Virol.* **81**, 2074-2077.
- WANG, Y., QU, J., JI, S., WALLACE, A.J., WU, J., LI, Y., GOPALAN, V., DING, B. (2016). A land plant-specific transcription factor directly enhances transcription of a pathogenic noncoding RNA template by DNA-dependent RNA polymerase II. *Plant Cell* **28**, 1094-1107.
- 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., SPIEKER, R.L., THALMEIR, S., GAST, F.U., RIEDEL, L., SÄNGER, H.L. (1996). A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a non infectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* **226**, 191–197.
- WILKINSON, K.A., MERINO, E.J., WEEKS, K.M. (2006). Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nature Protoc.* **1**, 1610-1616.
- WILKINSON, K.A., GORELICK, R.J., VASA, S.M., GUEX, N., REIN, A., MATHEWS, D.H., GIDDINGS, M.C., WEEKS, K.M. (2008). High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biol.* **6**, e96.
- WIMBERLY, B., VARANI, G., TINOCO, I., JR. (1993). The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA. *Biochemistry*, **32**, 1078–1087.
- WU, Q., WANG, Y., CAO, M., PANTALEO, V., BURGYAN, J., LI, W.X., DING, S.W. (2012). Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 3938-3943.
- 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.
- YAZARLOU, A., JAFARPOUR, B., TARIGHI, S., HABILI, N., RANGLES, J.W. (2012). New Iranian and Australian peach latent mosaic viroid variants and evidence for rapid sequence evolution. *Arch. Virol.* **157**, 343–347.
- YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, T. (1986). Inhibition of hop stunt viroid replication by α -amanitin. *J. Plant Dis. Prot.* **93**, 62-71.
- ZAITLIN, M., NIBLETT, C. L., DICKSON, E. GOLDBERG, R. B. (1980). Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization. *Virology* **104**, 1-9.
- 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.

- ZHONG, X., LEONTIS, N., QIANG, S., ITAYA, A., QI, Y., BORIS-LAWRIE, K., DING, B. (2006). Tertiary structural and functional analysis of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J. Virol.* **80**, 8566–8581.
- 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, 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.

Agradecimientos

A Ricardo por la confianza que ha depositado en mí, por el tiempo que me ha dedicado, por todo lo que me ha enseñado y por sus buenos consejos sobre la ciencia y la vida.

A mis compañeros del 1.04 que se han convertido en mi segunda familia. A Sonia que ha sido mi gran apoyo dentro del laboratorio y me ha salvado la vida en momentos de desesperación, igual que se la salvé yo a ella en la inmensidad del Mediterráneo. A Sofia por entenderme mejor que nadie, por esas tardes de helado y de GAP para compensar. A Neus por nuestras conversaciones de buceo en el laboratorio y nuestras charlas de laboratorio al ir a bucear, porque la Tesis sólo ha sido nuestro intervalo en superficie. A Amelia, Susana, Pedro y Marcos por sus consejos, su apoyo y su ayuda. A Amparo porque es una de las mejores profesionales que he conocido, por asumir el papel de madre en el 1.04 y cuidarnos de la mejor manera posible. A María porque ha cogido el relevo de Amparo y se ha convertido en una gran Técnico y una buena amiga. A Lynne por sus consejos y su ayuda burocrática.

A mis amigas de siempre (Aurora, Belén, Carla, Jéssica S. y Jéssica B.), al resto del grupo y a nuestra sobrina común, Laia, por su ánimo y apoyo, por regalarme tantos momentos únicos y tantas risas cuando más lo necesitaba, por hacer de la vida una experiencia realmente divertida. A Cris porque siempre está ahí.

¡A toda mi familia! A mis padres por haberme regalado la vida y por todo lo que han hecho y seguirán haciendo por mí. Por su apoyo incondicional, por entenderme, darme los mejores consejos y conseguir que sea lo que soy hoy. A mi hermano por mostrarme una gran actitud ante la vida y por el bomboncito. A mis abuelos: a los que ya se fueron, a mi yaya Araceli por animarme y a mi yaya Mamen por ser el mejor ejemplo de valentía, fortaleza y lucha diaria. A mis primos, con los que formo el clan de los cinco. A mis tíos. A Tatiana e Ion porque ya los considero parte de mi familia.

Por último, quería agradecer a Catalin su imprescindible ayuda bioinformática y su esfuerzo por animarme cada día durante estos años sin darse cuenta de que lo hacía simplemente estando mi lado. Por ser mi paz y mi Sol. Por todo su amor y su cariño. Porque hemos terminado esta etapa juntos y en breve comenzaremos la más importante: nuestro proyecto de vida común. Sé que juntos podremos con todo.

A todos los que he nombrado y a los que me he dejado, GRACIAS.

