

Viróides e Virusóides: Relíquias do Mundo de RNA

Marcelo Eiras¹, Jose Antonio Daròs², Ricardo Flores² & Elliot W. Kitajima³

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: eiras@biologico.sp.gov.br; ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, CSIC, Av. de los Naranjos, Valencia 46022, España; ³Núcleo de Microscopia Eletrônica, ESALQ, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil

(Aceito para a publicação em 10/05/2006)

Autor para correspondência: Marcelo Eiras

EIRAS, M., DARÓS, J.A., FLORES, R. & KITAJIMA, E.W. Viróides e virusóides: relíquias do mundo de RNA. *Fitopatologia Brasileira* 31:229-246. 2006.

RESUMO

Até meados do século XX, os vírus eram considerados os representantes mais simples da escala biológica. A descoberta dos RNAs satélites e dos viróides por volta de 1970 foi surpreendente, pois comprovou-se a existência de uma nova classe de moléculas auto-replicativas ainda mais simples, denominada agentes sub-virais. Há indícios de que os viróides e virusóides (que formam uma classe de RNAs satélites), teriam feito parte do “Mundo de RNA” (que precedeu o mundo atual baseado no DNA e proteínas), podendo ser considerados fósseis moleculares dessa era antiga. A simplicidade desses agentes sub-virais e o fato de que a molécula de RNA deve interagir diretamente com fatores do hospedeiro para o desenvolvimento do seu ciclo infeccioso colocam esses patógenos como um modelo para o estudo de processos metabólicos celulares. Nos últimos anos, tem-se observado um volume grande de publicações visando elucidar aspectos da interação viróide/hospedeiro, como os mecanismos da patogênese, movimento dos viróides nas plantas hospedeiras, silenciamento gênico e atividades das ribozimas. Mudanças recentes ocorridas na taxonomia desses patógenos com a criação de famílias, gêneros e espécies, além da descoberta de novos viróides, também têm sido verificadas. A presente revisão visa atualizar o leitor quanto aos recentes avanços nas pesquisas com viróides, principalmente na taxonomia, filogenia e em vários aspectos moleculares da interação viróide/hospedeiro. Estão incluídas também algumas características dos virusóides e sua relação evolutiva com os viróides.

Palavras-chave adicionais: Interação patógeno/hospedeiro, silenciamento gênico, evolução, ribozima, RNA satélite, patogênese, taxonomia, *quasispecies*.

ABSTRACT

Viroids and virusoids: relics of the RNA world

By the middle of the last century, viruses were considered as the simplest biological entities. The discovery of satellite RNAs and viroids by 1970 was surprising because it revealed the existence of a novel class of self-replicating molecules even simpler, named subviral agents. There are evidences that viroids and virusoids (a class of satellite RNAs) were part of the so-called “RNA world” (that preceded our present world based on DNA and proteins) and for this reason they can be considered as molecular fossils of this ancient period. The simplicity of these subviral agents and the fact that the RNA molecule must interact directly with host factors for completing their infective cycle make these pathogens a model for the study of cellular processes. In the last years, a large number of publications have widened our knowledge of the viroid-host interactions, including pathogenesis mechanisms, movement through the host, gene silencing and ribozyme activity. Recent changes have been introduced in the taxonomy of these pathogens, with the creation of families, genera and species, and new viroids have also been found. The purpose of this review is to present the reader with these recent advances in viroid research, mainly on taxonomy, phylogeny and in molecular aspects of the viroid-host interaction. Some characteristics of virusoids and their evolutionary relationship with viroids are also included.

Additional keywords: plant pathogen interaction, gene silencing, evolution, ribozyme, satellite RNA, taxonomy, *quasispecies*.

INTRODUÇÃO

Mais de 30 anos se passaram desde a descoberta dos viróides como agentes fitopatogênicos (Diener, 1971). Desde então, uma série de livros, capítulos de livro e revisões foram publicados (Diener, 1979, 2001; Flores *et al.*,

2000; Flores, 2001; Hull, 2002; Hadidi *et al.*, 2003; Tabler & Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2005a, b) abordando os mais diversos aspectos desses patógenos. No Brasil, Fonseca & Boiteux (1997) publicaram uma minuciosa revisão sobre viróides em que relacionaram aspectos da biologia, história, métodos de detecção e purificação, origem, sintomas, vias

de transmissão e estratégias de controle. Posteriormente, porém, pouco se avançou nas pesquisas com viróides no Brasil. Bartolini & Salazar (2003) destacam que os viróides ainda não receberam a atenção devida nos países da América do Sul. Ao contrário, na literatura mundial tem se observado nos últimos anos um volume grande de publicações, principalmente visando elucidar aspectos da interação viróide/hospedeiro como os mecanismos da replicação, patogênese, movimento, silenciamento gênico e ação de ribozimas (contidas em alguns deles) *in vivo* e *in vitro*. Com a taxonomia moderna, os viróides são classificados em famílias, gêneros e espécies, de acordo com características biológicas e moleculares (Flores *et al.*, 2005b). Além disso, viróides têm sido descritos e identificados em novos países e regiões do Mundo (Singh *et al.*, 2003b).

Esta revisão visa atualizar o leitor nestes aspectos. Estão incluídas também algumas características dos virusóides, RNAs satélites circulares do tipo viróide (*viroid-like satellite RNAs*, VL-satRNAs) que são encapsidados por um vírus auxiliar. Apresentam algumas características comuns aos viróides, porém diferem na seqüência, função e biologia (Symons & Randles, 1999; Mayo *et al.*, 2000). Aspectos relacionados à origem, evolução, biologia, classificação e características em comum aos viróides são também apresentados e discutidos.

CLASSIFICAÇÃO ATUAL DOS VIRÓIDES

A taxonomia moderna dos viróides (Flores *et al.*, 2005b) divide estes patógenos em duas famílias: *Avsunviroidae*, que contempla os viróides auto-catalíticos, com dois gêneros: *Avsunviroid* (espécie-tipo *Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) e *Pelamoviroid* (espécie-tipo *Peach latent mosaic viroid*, PLMVd); e *Pospiviroidae*, com os gêneros *Pospiviroid* (espécie-tipo *Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), *Hostuviroid* (espécie-tipo *Hop stunt viroid*, HSVd), *Cocadviroid* (espécie-tipo *Coconut cadang-cadang viroid*, CCCVd), *Apescaviroid* (espécie-tipo *Apple scar skin viroid*, ASSVd) e *Coleviroid* (espécie-tipo *Coleus blumei viroid*, CbVd). Os nomes dos gêneros derivam da espécie tipo (*Pospiviroid* de *Potato spindle tuber viroid*) e o das famílias do gênero-tipo. Os gêneros distinguem-se, na família *Pospiviroidae*, de acordo com o tipo de região central conservada (central conserved region, CCR) e a presença de “motivos” (“*motifs*”) denominados região terminal conservada (terminal conserved region, TCR) e forquilha terminal conservada (terminal conserved hairpin, TCH). Os dois gêneros da família *Avsunviroidae* distinguem-se em função da composição de bases, estrutura secundária (bastonete ou ramificada) e morfologia da estrutura ribozimática de cabeça-de-martelo (*hammerhead*). Atualmente são aceitas 28 espécies e 8 possíveis novos viróides ainda não classificados dentro dos 7 gêneros citados acima (Tabela 1). Os critérios para a discriminação das espécies de viróides consideram a similaridade de seqüência menor que 90%, que caracterizam viróides distintos. Quando

a similaridade de seqüência de nucleotídeos é superior a 90%, consideram-se **variantes** de um mesmo viróide (Flores *et al.*, 2005b). Além disso, pelo menos uma propriedade biológica diferencial deve ser considerada, como círculo de hospedeiros, modo de transmissão e o fenômeno de proteção cruzada. Ressalte-se que, das 28 espécies de viróides aceitas pelo “Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus” (ICTV), 25 pertencem à família *Pospiviroidae*. Estas apresentam em comum a CCR, estrutura secundária em forma de bastonete ou quase-bastonete e a ausência de estruturas ribozimáticas de cabeça-de-martelo, além de replicarem-se no núcleo seguindo um mecanismo de círculo rolante assimétrico. Os três membros da família *Avsunviroidae* apresentam como característica principal os elementos estruturais típicos das ribozimas cabeça-de-martelo, não possuem CCR e se replicam nos cloroplastos seguindo um mecanismo de círculo rolante simétrico (Flores *et al.*, 2005b). Recentemente, a espécie *Eggplant latent viroid* (ELVd) foi proposta como candidata a espécie-tipo de um novo gênero, *Elaviroid*, da família *Avsunviroidae* (Fadda *et al.*, 2003a). Uma compilação das seqüências de viróides incluindo as variantes e seus respectivos números de acesso estão disponíveis em banco de dados (Pelchat *et al.*, 2003).

PROPRIEDADES DOS VIRÓIDES

Características gerais

Os viróides constituem os menores e mais simples fitopatógenos conhecidos. Diener (1991) cita os viróides como parasitas moleculares no limiar da vida, pois consistem de uma molécula de RNA fita simples, circular, com forte estrutura secundária e desprovidos de proteínas. Estes patógenos apresentam genomas com tamanho que varia entre 246 e 401 nucleotídeos e não codificam proteínas, sendo totalmente dependentes da célula hospedeira para sua replicação (Diener, 1996). A molécula de RNA dos viróides da família *Pospiviroidae* apresenta cinco domínios (Figura 1) denominados: **Domínio C** – que contém a CCR; **Domínio P** – Relacionado à patogenicidade e expressão dos sintomas em alguns viróides, além de conter uma região rica em purinas; **Domínio V** – Com maior variabilidade entre viróides que apresentam elevada similaridade; **Domínios TL** (que contém os “motivos” TCR ou TCH) e **TR** – Localizados nas extremidades esquerda e direita da molécula, respectivamente, e provavelmente relacionados com recombinação e replicação dos viróides (Keese & Symons, 1985; Sano & Ishiguro, 1998; Steger & Riesner, 2003).

O primeiro viróide (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) foi identificado e caracterizado por Diener (1971) e seqüenciado por Gross *et al.* (1978). Desde então, diversos viróides têm sido relatados em diversas espécies de plantas cultivadas, como o viróide da exocorte dos citros (*Citrus exocortis viroid*, CEVd), do nanismo do crisântemo (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), do “cadang-cadang” do coqueiro (CCCVd), do nanismo do lúpulo (HSVd), do

TABELA 1 – Classificação dos viróides em famílias, gêneros e espécies e os respectivos acrônimos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Flores *et al.*, 2005b). As espécies-tipo de cada gênero estão sublinhadas

Família	Gênero	Espécie	Acrônimo	Tamanho (nt)		
<i>Pospiviroidae</i>	<i>Pospiviroid</i>	<u>Potato spindle tuber viroid</u>	PSTVd	356, 359-360		
		<u>Chrysanthemum stunt viroid</u>	CSVd	354, 356		
		<u>Citrus exocortis viroid</u>	CEVd	368-374		
		<u>Columnnea latent viroid</u>	CLVd	370-375		
		<u>Iresine viroid 1</u>	IrVd-1	370		
		<u>Mexican papita viroid</u>	MPVd	359-360		
		<u>Tomato apical stunt viroid</u>	TASVd	360-363		
		<u>Tomato chlorotic dwarf viroid</u>	TCDVd	360		
		<u>Tomato planta macho viroid</u>	TPMVd	360		
		<i>Hostuviroid</i>	<u>Hop stunt viroid</u>	HSVd	295-303	
			<i>Cocadviroid</i>	<u>Coconut cadang-cadang viroid</u>	CCCVd	246-301
				<u>Citrus viroid IV</u>	CVd-IV	284
		<i>Apscaviroid</i>	<i>Coleuviroid</i>	<u>Coconut tinangaja viroid</u>	CTiVd	254
	<u>Hop latent viroid</u>			HLVd	256	
	<u>Apple scar skin viroid</u>			ASSVd	329-330	
	<u>Apple dimple fruit viroid</u>		ADFVd	306-307		
	<u>Australian grapevine viroid</u>		AGVd	369		
	<u>Citrus viroid III</u>		CVd-III	294, 297		
	<u>Citrus bent leaf viroid</u>		CBLVd	318		
	<u>Grapevine yellow speckle viroid 1</u>		GYSVd-1	366-368		
	<u>Grapevine yellow speckle viroid 2</u>		GYSVd-2	363		
	<u>Pear blister canker viroid</u>		PBCVd	315-316		
	<u>Coleus blumei viroid 1</u>		CbVd-1	248, 250-251		
	<u>Coleus blumei viroid 2</u>		CbVd-2	301-302		
	<u>Coleus blumei viroid 3</u>	CbVd-3	361-362, 364			
	<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	<u>Avocado sunblotch viroid</u>	ASBVd	246-250	
		<i>Pelamoviroid</i>	<u>Peach latent mosaic viroid</u>	PLMVd	335-338	
			<u>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</u>	CChMVd	398-401	
		<i>Elaviroid</i> ¹	<u>Eggplant latent viroid</u> ¹	ELVd	332-335	

¹Gênero e espécie-tipo candidatos dentro da família *Avsunviroidae* (Fadda *et al.*, 2003a).

mosaico latente do pessegueiro (PLMVd), entre outros.

No Brasil já foram identificados e caracterizados o CSVd, o CEVd e o CbVd, ocorrendo naturalmente em plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) S. Kitamura, *Citrus sp.* e *Coleus* [*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd] respectivamente, além do *Hop latent viroid* (HLVd) e do PSTVd, ambos detectados em material isolado em quarentena (Batista *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 1990, 1993). Barbosa *et al.* (2000) e Rodrigues *et al.* (1999) detectaram o CEVd em pomares de lima ‘Tahiti’ (*Citrus aurantifolia* Swingle) na Bahia e viróides associados a exocorte em laranjeiras (*Citrus sinensis* Osbeck) no Estado de Sergipe, respectivamente. Targon *et al.* (2003) detectaram por meio de sondas não-radioativas o CEVd, o *Citrus viroid II* (CVd-II) (variante do HSVd) e o *Citrus viroid III* (CVd-III) em pomares de citros no Estado de São Paulo. CEVd e HSVd também foram detectados em videiras (*Vitis vinifera* L.) provenientes do Rio Grande do Sul por meio de eletroforese em gel de poliácridamida e hibridização “dot-blot” (Fonseca & Kuhn, 1994), e recentemente identificados via RT-PCR e seqüenciados (Eiras *et al.*, 2004). A distribuição mundial

dos viróides está representada na Tabela 2, incluindo os viróides que já foram detectados no Brasil, tanto ocorrendo naturalmente como interceptados no sistema de quarentena (Singh *et al.*, 2003a; Bartolini & Salazar, 2003).

Os sintomas induzidos pelos viróides nas plantas hospedeiras são semelhantes aos induzidos pelos fitovírus, o que dificulta o diagnóstico. De fato, para uma série de doenças inicialmente consideradas de etiologia viral, comprovou-se posteriormente que o agente causal era um viróide e não vírus. Os sintomas foliares incluem malformações, epinastia, rugosidade e manchas necróticas e/ou cloróticas. Causam no caule de plantas lenhosas o encurtamento dos entrenós, descolorações, caneluras e necrose. Finalmente, nos frutos e órgãos de reserva causam deformações, descolorações e necrose (Hadidi *et al.*, 2003). Plantas de citros infectadas com um complexo de viróides exibiram sintomas similares a exocorte na ausência do CEVd, o que evidencia a importância da caracterização prévia do(s) patógeno(s) implicado(s) no desenvolvimento da doença (Ito *et al.*, 2002).

Como no caso dos vírus, o estudo dos viróides progrediu intensamente, quando foram descobertos

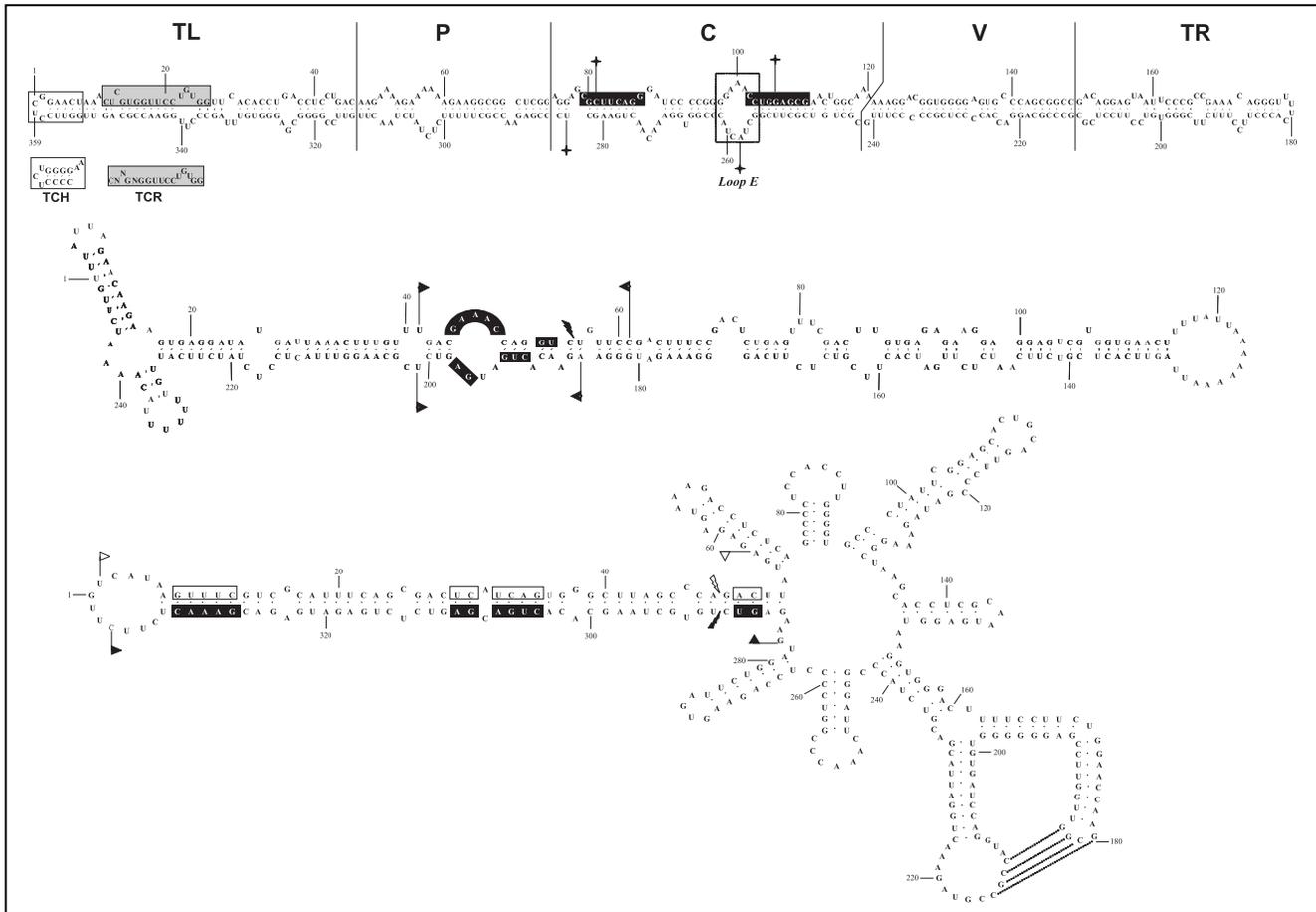


FIG. 1 – A. Estrutura do PSTVd, membro tipo da família *Pospiviroidae*, apresentando os cinco domínios denominados: Domínio C – que contém a Região Central Conservada (CCR, “central conserved region”), delimitada por estrelas; neste domínio também se destaca a presença do “loop E”, elemento de estrutura terciária caracterizado em PSTVd que apresenta homologia com rRNA 5S de eucariontes. Nas caixas negras, estão representados os nucleotídeos das seqüências invertidas responsáveis pela formação do grampo (“hairpin”) I; Domínio P – relacionado à patogenicidade; Domínio V – onde se localiza a maior variabilidade entre viróides que apresentam elevada similaridade; Domínios TL e TR – localizados nas extremidades esquerda e direita da molécula, respectivamente. Estão indicadas também as seqüências TCH (“terminal conserved hairpin”), presente nos gêneros *Hostuviroid* e *Cocadviroid* e TCR (“terminal conserved region”), presente em *Pospiviroid*, *Apscaviroid* e em dois membros do gênero *Coleviroid*. **B.** Estrutura secundária do ASBVd, membro tipo da família *Avsunviroidae*, apresentando conformação de (quase) bastonete; **C.** Estrutura secundária ramificada do PLMVd, espécie tipo do gênero *Pelamoviroid*, família *Avsunviroidae*. Nas estruturas secundárias do ASBVd e PLMVd destacam-se em caixas os resíduos conservados na maioria das ribozimas cabeça-de-martelo descritas na natureza (caixas cheias e vazias para as polaridades positiva e negativa, respectivamente). As bandeiras delimitam a região da estrutura das ribozimas de cabeça-de-martelo e as flechas apontam para os sítios de auto-corte das moléculas. As linhas descontínuas correspondem à interação do tipo “kissing-loop”.

hospedeiros herbáceos, a exemplo do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para o PSTVd e de *Gynura aurantiaca* DC. para o CEVd, que são fáceis de cultivar, desenvolvem sintomas específicos em pouco tempo e propiciam elevada concentração do patógeno. Contudo, nem sempre têm sido encontrados tais hospedeiros experimentais, e é possível que não existam para alguns viróides, com os quais não há alternativa senão trabalhar com o hospedeiro natural, ainda que seja uma planta lenhosa. Em alguns patossistemas naturais, como o abacateiro (*Persea americana* Mill.) – ASBVd, o viróide pode se acumular em níveis elevados, o que permite empregá-lo em estudos de replicação (Flores et al., 2000).

A via principal de difusão de alguns viróides, sobretudo aqueles que afetam plantas lenhosas de interesse econômico, tem sido o intercâmbio internacional de material propagativo infectado. Os viróides são facilmente transmitidos mecanicamente, podendo raramente ser transmitidos por pólen (PSTVd) e por sementes (PSTVd, CbVd, ASBVd e CSVd). A transmissão eficiente de viróides por afídeos somente foi relatada para o *Tomato planta macho viroid* (TPMVd). Os viróides também podem ser transmitidos por instrumentos de poda (Hadidi et al., 1997).

Replicação

Os viróides se propagam nas plantas hospedeiras

TABELA 2 – Anos de descoberta e atual distribuição geográfica mundial dos viróides¹

Espécie	Ano	Distribuição geográfica atual
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	1971	Austrália, Brasil ² , Canadá, Chile, China, Costa Rica, Escócia ² , Índia ² , Nova Zelândia ² , Rússia, USA
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	1973	Brasil , Holanda, Itália, Japão, Reino Unido, USA
<i>Citrus exocortis viroid</i>	1972	Austrália, Brasil , Chipre, Espanha, Israel, Japão, Nova Zelândia, Peru, USA
<i>Columnnea latent viroid</i>	1989	Alemanha, Canadá, USA
<i>Iresine viroid 1</i>	1996	Alemanha
<i>Mexican papita viroid</i>	1996	México
<i>Tomato apical stunt viroid</i>	1981	Alemanha, Costa do Marfim, Indonésia
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	1999	Canadá, Holanda
<i>Tomato planta macho viroid</i>	1982	México
<i>Hop stunt viroid</i>	1977	Alemanha, Austrália, Áustria, Brasil , Coréia, França, Hungria, Israel, Japão, Taiwan, USA
<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	1975	Filipinas
<i>Citrus viroid IV</i>	1988	Austrália, USA
<i>Coconut tinangaja viroid</i>	1988	Guam
<i>Hop latent viroid</i>	1988	África do Sul, Ásia, Brasil ² , Europa, Reino Unido
<i>Apple scar skin viroid</i>	1982	Canadá, China, Grécia, Japão
<i>Apple dimpl e fruit viroid</i>	1996	Itália
<i>Australian grapevine viroid</i>	1988	Austrália
<i>Citrus viroid III</i>	1986	Austrália, Espanha, USA
<i>Citrus bent leaf viroid</i>	1988	Israel
<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i>	1988	Alemanha, Austrália, USA
<i>Grapevine yellow speckle viroid 2</i>	1988	Alemanha, Austrália, USA
<i>Pear blister canker viroid</i>	1991	Espanha, França, Grécia, Itália, USA
<i>Coleus blumei viroid 1</i>	1989	Alemanha, Brasil , Canadá, Costa Rica, Índia, Japão, USA
<i>Coleus blumei viroid 2</i>	1989	Alemanha, Canadá, Costa Rica, Índia, Japão, USA
<i>Coleus blumei viroid 3</i>	1989	Alemanha, Canadá, Costa Rica, Índia, Japão, USA
<i>Avocado sunblotch viroid</i>	1979	África do Sul, Austrália, Espanha, Israel, Peru, USA
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	1988	Canadá, China, Espanha, França, Grécia, Itália, Iugoslávia, Japão, Nepal, Paquistão, Romênia, USA
<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	1975	Dinamarca, França, Índia, USA

¹Dados obtidos e modificados de Singh *et al.* (2003a) e Bartolini & Salazar (2003).

²Detectado em material quarentenário.

como populações de seqüências de RNAs similares mas não idênticas (quase-espécie, “*quasispecies*”), derivadas de mutações devido à ausência de mecanismos de correção nas RNA polimerases (Diener, 1996). Certos domínios presentes nas moléculas de RNA dos viróides são responsáveis pela interação direta com fatores do hospedeiro e influenciam a replicação (Baumstark *et al.*, 1997; Schröder & Riesner, 2002). Além disso, a estrutura secundária em determinados domínios pode ser fundamental tanto para o sucesso na replicação como na proteção contra ação de RNAses celulares (Dingley *et al.*, 2003). A replicação dos viróides, ao contrário do que os primeiros experimentos sugeriam, se dá exclusivamente por meio de intermediários de RNA (Grill & Semancik, 1978). Pela estrutura circular dos viróides, sugeriu-se que poderiam seguir em sua replicação o modelo do círculo rolante proposto anteriormente para a replicação de alguns vírus. O RNA circular infeccioso mais abundante, ao qual se atribui arbitrariamente a polaridade (+), é reconhecido por uma RNA polimerase celular (ativada, mas não codificada pelo genoma viroidal), que

transcreve repetidamente o molde circular dando origem a oligômeros lineares (-), que são processados em tamanhos unitários e fechados por uma RNase e uma RNA ligase, respectivamente. O RNA monomérico circular (-) inicia então a segunda metade do ciclo que é simétrica à primeira, razão da denominação simétrica a esta variante do modelo do círculo rolante.

Na variante alternativa, a assimétrica, os oligômeros lineares (-) servem diretamente de molde de transcrição para a síntese de oligômeros lineares (+), que são clivados e ligados para gerar o produto final, o RNA monomérico circular (+). Assim, este modelo prediz a existência de intermediários oligoméricos, de uma ou ambas polaridades. A identificação de RNAs desta classe em tecidos infectados por vários viróides é uma prova a favor deste modelo (Branch & Robertson, 1984). Os dados disponíveis indicam que membros da família *Pospiviroidae* seguem a variante assimétrica (Hutchins *et al.*, 1985; Branch *et al.*, 1988), enquanto que os da família *Avsunviroidae* a simétrica (Daròs *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 2005b). O mecanismo de

replicação pode gerar duplicações em regiões da molécula de RNA, as quais são responsáveis pelo aumento do tamanho das moléculas de determinados viróides conforme tem sido observado para o CCCVd (Haseloff *et al.*, 1982) e o CEVd (Semancik *et al.*, 1994; Fadda *et al.*, 2003b). As interações com fatores do hospedeiro e a pressão de seleção determinarão o sucesso ou não dessas moléculas maiores (Fadda *et al.*, 2003b). Daròs & Flores (2004), estudando a interação de viróides em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* L. transformadas com construções diméricas de cDNAs de CEVd, HSVd, CCCVd, ASSVd e ASBVd, mostraram que esta planta, apesar de não ser hospedeira de viróides, apresenta o aparato enzimático necessário para a replicação de viróides representativos da família *Pospiviroidae*. Os autores sugerem que os fatores limitantes para que um viróide colonize plantas de *Arabidopsis* sejam a deficiência no movimento ou a baixa taxa de replicação.

Dispõe-se também de dados sobre outras duas atividades enzimáticas requeridas na replicação dos viróides. Experimentos de inibição com α -amanitina sugerem que no PSTVd e outros viróides relacionados a RNA polimerase implicada é a II nuclear (Mühlbach & Sanger, 1979; Flores & Semancik, 1982; Schindler & Mühlbach, 1992). Experimentos paralelos com tagetitoxina sugerem no caso do ASBVd a participação de uma RNA polimerase cloroplástica codificada no núcleo (Navarro & Flores, 2000). Em ambos os casos trata-se de RNA polimerases que em condições fisiológicas normais atuam sobre moldes de DNA e que os viróides são capazes de subverter em benefício próprio. Quanto à atividade da RNA ligase, há poucas informações disponíveis, mas provavelmente se trata de enzimas distintas, nuclear e cloroplástica nos viróides das famílias *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*, respectivamente (Flores *et al.*, 2005a). Liu & Symons (1998) descreveram transcritos de CCCVd (membro da família *Pospiviroidae*) capazes de auto-clivagem *in vitro*, com o “motivo” de corte posicionado em uma estrutura conservada em todos os membros desta família, sugerindo que estes viróides podem também se auto-clivar por um ou mais novos tipos de ribozimas distintas das do tipo cabeça-de-martelo.

Ribozimas: RNAs auto-catalíticos

Inicialmente, acreditava-se que as três atividades enzimáticas requeridas eram provenientes da célula hospedeira, pois já havia indicações de que os viróides careciam de capacidade codificante. Foi surpreendente descobrir que no ASBVd (Hutchins *et al.*, 1986; Forster & Symons, 1987), e mais tarde em três outras espécies da família *Avsunviroidae* (Hernández & Flores, 1992; Navarro & Flores, 1997; Fadda *et al.*, 2003a), o processamento dos oligômeros de ambas polaridades aos monômeros lineares correspondentes era mediado por ribozimas (RNAs capazes de catalisar uma reação na ausência total de proteínas) da classe denominada estruturas de cabeça-de-martelo. Este nome deriva da conformação bidimensional proposta para estas ribozimas, que se assemelha à dita ferramenta e que

é constituída por um núcleo central de 11 nucleotídeos conservados, flanqueados por três ramos de nucleotídeos não conservados que formam duplas hélices. Estudos envolvendo cristalografia de raio X (Scott *et al.*, 1995) demonstraram que a conformação tridimensional das estruturas em cabeça-de-martelo é mais próxima do tipo γ , com a hélice III formando a base, e a I e II, os dois ramos superiores (Figura 2). Existem provas sólidas de que estas ribozimas são operativas não só *in vitro*, mas também *in vivo* (Flores *et al.*, 2000). Além disto, as ribozimas manipuladas convenientemente têm se mostrado poderosas ferramentas biotecnológicas para degradação de RNAs específicos em plantas transgênicas e outros sistemas (Yang *et al.*, 1997). A presença das ribozimas em alguns viróides tem também importantes implicações evolutivas. Além dos viróides, estas ribozimas têm sido descritas em outros pequenos RNAs (Prody *et al.*, 1986; Diener, 1991; Symons, 1997). Recentemente, Khovorova *et al.* (2003) e De la Peña *et al.* (2003) demonstraram que modificações na periferia das estruturas de cabeça-de-martelo promovem uma redução de 100 vezes na capacidade de auto-clivagem da ribozima. Esses dados indicam que regiões externas ao núcleo central da cabeça-de-martelo desempenham papel chave na catálise e sugerem a existência de interações entre estas regiões periféricas. Outros trabalhos têm sido realizados visando à compreensão dos aspectos que influenciam a eficiência e ação das ribozimas do tipo cabeça-de-martelo, tanto naturais como artificiais, às possíveis interações com proteínas do hospedeiro, às seqüências específicas de nucleotídeos

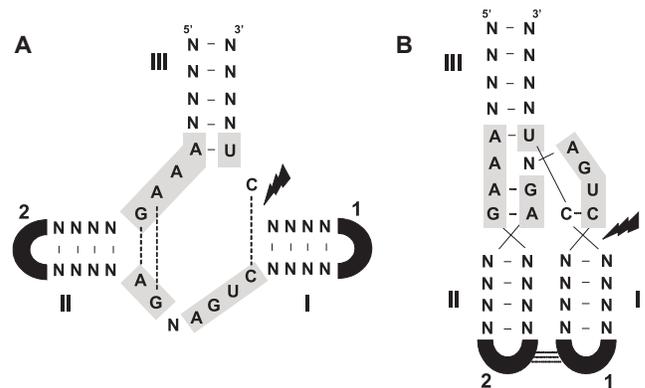


FIG. 2 – A. Estrutura secundária consenso da ribozima do tipo cabeça-de-martelo, onde se destacam os onze nucleotídeos conservados presentes na maioria dessas ribozimas encontradas na natureza. Esta estrutura está formada por três hélices (I, II e III) que flanqueiam um “loop” central conservado. Na maioria das ribozimas naturais as hélices I e II estão fechadas por dois pequenos “loops” 1 e 2, respectivamente. A flecha aponta para o ponto de auto-clivagem da molécula; N indica qualquer nucleotídeo possível e linhas contínuas e descontínuas correspondem aos pareamentos Watson-Crick e não-canônicos, respectivamente; B. Modelo derivado de cristalografia de raio-X de uma ribozima artificial onde nota-se que os “loops” 1 e 2 estão fisicamente próximos (interação representada pelas linhas descontínuas).

envolvidos em maior ou menor eficiência de corte, à ação do pH e a concentração de magnésio (Daròs & Flores, 2002; para uma revisão ver Flores *et al.*, 2005a).

Interação viróide/hospedeiro

Como efeito da ausência de proteínas codificadas pelos viróides, parece evidente que estes aparentemente simples RNAs devam interagir com proteínas celulares utilizando-as para mediar diferentes passos no seu ciclo infeccioso (Gozmanova *et al.*, 2003; Qi & Ding, 2003a). Apesar de haver alguns dados sobre o envolvimento da RNA polimerase de plantas hospedeiras na replicação de membros da família *Pospiviroidae* (Mühlbach & Sanger, 1979; Flores & Semancik, 1982; Schindler & Muhlbach, 1992; Warrilow & Symons, 1999) e da participação de uma proteína de floema no movimento de viróides desta família (Gomez & Pallas, 2001; Owens *et al.*, 2001), pouco se sabe sobre outras interaoes biologicamente relevantes com proteínas. Martínez de Alba *et al.* (2003) identificaram uma proteína (Virp1) de tomateiro capaz de se unir especificamente ao PSTVd. Para membros da família *Avsunviroidae* ha somente informaoes sobre a natureza da RNA polimerase do cloroplasto que provavelmente catalisa a replicação do ASBVd (Navarro *et al.*, 2000) e do PLMVd (Pelchat *et al.*, 2001). Daròs & Flores (2002) relataram o primeiro caso de uma proteína do hospedeiro (no caso o abacateiro) fisicamente associada ao RNA viroidal, que media a clivagem de uma ribozima cabeça-de-martelo *in vitro* e presumivelmente *in vivo*, possivelmente favorecendo o processo de replicação do viróide (ASBVd). Os autores sugerem também que esta família de proteínas, envolvidas no processamento e estabilidade dos transcritos do cloroplasto, esteja relacionada com a preservação da integridade do RNA viroidal, atuando como uma “capa protéica”. Além disso, estas proteínas poderiam facilitar o transporte do viróide para os cloroplastos (Daròs & Flores, 2002).

No que se refere a localização subcelular, experimentos de hibridização *in situ* combinada com microscopia confocal mostraram que membros representativos da família *Pospiviroidae* acumulam-se no núcleo e alguns deles especificamente no nucléolo (Harders *et al.*, 1989). Isto sugere que deve haver sinais que os dirigem aos ditos compartimentos celulares de forma análoga a alguns pequenos RNAs nucleares da célula. Por outro lado, pelo menos dois dos três membros da família *Avsunviroidae*, ASBVd e PLMVd, acumulam-se nos cloroplastos (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994; Bussiere *et al.*, 1999), o que ressalta, uma vez mais, as diferenas entre estas duas famílias. Observou-se também no caso do PSTVd que, além da forma circular mais abundante, os RNAs viroidais de polaridade complementar (que atuam como intermediários no ciclo replicativo) também se localizam no núcleo, o que indica que estes viróides não são se acumulam como também se replicam nesta organela. De forma paralela, o ASBVd se replica e se acumula nos cloroplastos (Flores *et al.*, 2000). Recentemente, Qi & Ding (2003b), em um elegante trabalho

envolvendo hibridização *in situ*, propuseram um modelo para a replicação e transporte do PSTVd no interior do núcleo da célula: (i) após a passagem do viróide do citoplasma para o núcleo, ocorre a síntese das moléculas de ambas polaridades no nucleoplasma; (ii) as moléculas de polaridade negativa (complementar) permanecem no nucleoplasma; (iii) as moléculas de polaridade positiva são transportadas seletivamente para o nucléolo; (iv) após a circularização, as novas moléculas (positivas) retornam ao nucleoplasma e em seguida passam ao citoplasma para serem transportadas célula-a-célula. Assim, como ja demonstrado para outros RNAs (Lewis & Tollervey, 2000), o nucléolo deve ser o sítio de processamento dos membros da família *Pospiviroidae*, os quais devem conter “motivos” para a localização e transporte para esta organela (Qi & Ding, 2003a).

Movimento na planta

Os viróides, apesar de seu tamanho mínimo, atuam visando completar seu ciclo infeccioso nas plantas hospedeiras, que além da replicação inclui movimento intracelular (transporte para o núcleo no caso dos *Pospiviroidae*, e para o cloroplasto para os *Avsunviroidae*), intercelular (célula-a-célula) e a longa distância (via floema) (Palukaitis, 1987; Woo *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Ao contrário dos vírus, que codificam suas proprias proteínas de movimento, os viróides devem interagir com fatores do hospedeiro para que possam ser transportados por toda planta. De acordo com Zhu *et al.* (2001), os viróides que se replicam no núcleo devem apresentar as seguintes fases em seu ciclo infeccioso: (i) importação para o núcleo através dos poros nucleares, antes da replicação; (ii) exportação do núcleo para o citoplasma, após a replicação; (iii) movimento célula-a-célula via plasmodesmas; (iv) movimento a longa distância (sistmico) via floema.

Com relação ao movimento intracelular, Woo *et al.* (1999), empregando protoplastos permeabilizados, demonstraram que monmeros de PSTVd são transportados do núcleo para o nucléolo, sendo este transporte mediado pela seqncia-dependente de estrutura específica da molécula de RNA viroidal e independente da interação com o citoesqueleto. Qi & Ding (2003b) demonstraram que moléculas de PSTVd de diferentes polaridades são transportadas e acumulam-se diferencialmente no núcleo e nucléolo, o que indica que fatores da célula hospedeira devem estar implicados no reconhecimento de “motivos” específicos do RNA viroidal.

Após a replicação e transporte intracelular e acúmulo nas primeiras células, o sucesso da colonização das plantas pelos viróides dependera da capacidade que estes tenham de se mover célula-a-célula. Este movimento foi estudado, no caso do PSTVd, mediante microinjeoes de RNA viroidal em células e protoplastos de mesofilo de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e tomateiro. Os resultados indicaram que o viróide se move célula-a-célula através dos plasmodesmas e que este movimento é determinado por elementos estruturais específicos do RNA viroidal (Ding *et al.*, 1997). Além disso,

um sofisticado modelo de transporte de RNAs célula-a-célula foi recentemente proposto por Ding *et al.* (2005). Os autores sugerem que “motivos” distintos de estrutura secundária do RNA viroidal devem interagir com fatores específicos do hospedeiro e que esta interação deve regular o transporte em fases distintas do desenvolvimento da planta.

O movimento célula-a-célula culmina com a chegada do viróide ao sistema vascular, de onde será distribuído via floema para toda a planta. Experimentos com o patossistema PSTVd/tomateiro revelaram que o viróide se transloca via floema junto com os produtos da fotossíntese (Palukaitis, 1987), seguindo a mesma via da maioria dos vírus de plantas (Maule *et al.*, 2002). Hammond (1994) havia indicado que a estrutura e/ou a estabilidade do domínio TR era essencial para o movimento do PSTVd célula-a-célula e a longa distância, e Palukaitis (1987) sugeriu que para ambos tipos de movimento os viróides deveriam se associar a proteínas da planta hospedeira. Maniataki *et al.* (2003) descreveram a interação da proteína Virp1 de tomateiro com uma região de 71 nucleotídeos localizada no domínio TR do PSTVd, e Gozmanova *et al.* (2003) demonstraram a importância do “motivo” RY (denominado assim por sua composição de bases), dentro do mesmo domínio TR, na interação com a proteína Virp1 de tomateiro para o movimento sistêmico do PSTVd. Com experimentos de hibridização *in situ*, Zhu *et al.* (2001) demonstraram que o PSTVd, além de se mover a longa distância, também se replica ativamente no floema. Sugeriram também que o movimento do PSTVd via floema pode ser governado por parâmetros celulares relacionados ao desenvolvimento. O PSTVd foi detectado em tomateiro e *Nicotiana benthamiana* Domin., em células do parênquima floemático, no mesófilo e na epiderme, não tendo sido detectado nos meristemas apical caulinar e laterais. Nos órgãos florais, foi detectado somente nas pétalas, não sendo encontrado nas sépalas, estames e carpelos. No caule, foi detectado em praticamente todos os tecidos como epiderme, córtex, floema e xilema. Os autores observaram também que o PSTVd tem seu movimento direcionado para as folhas jovens (drenos) e não para as folhas fonte (responsáveis pela fotossíntese) durante o desenvolvimento, sugerindo que o viróide segue o padrão de transporte dos fotoassimilados (Zhu *et al.*, 2001). O movimento sistêmico de sinais para mecanismos de silenciamento gênico segue o mesmo padrão (Voinnet *et al.*, 1998). Zhu *et al.* (2002), analisando plantas transgênicas transformadas com o PSTVd sob o controle do promotor constitutivo 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), observaram que o PSTVd é capaz de se replicar em todos os órgãos florais. O fato do PSTVd não ter sido detectado em alguns órgãos florais de plantas não transformadas inoculadas mecanicamente indica que o movimento de RNAs nos vasos não segue simplesmente um fluxo direcionado da fonte para o dreno, ao contrário, é controlado por mecanismos que envolvem a interação de “motivos” do RNA viroidal com fatores do hospedeiro. Portanto, os viróides podem ser considerados como RNAs exógenos que desenvolveram “motivos” estruturais que

mimetizam “motivos” de RNAs endógenos de plantas, de maneira que são reconhecidos por fatores celulares que facilitam seu movimento (Zhu *et al.*, 2002). Neste contexto, Qi *et al.* (2004) identificaram um “motivo” presente na molécula do PSTVd que media seu transporte unidirecional das células da bainha do floema para o mesófilo. Além disso, os autores demonstraram, com ensaios de hibridização *in situ*, que o transporte é regulado por fatores relacionados ao desenvolvimento.

Recentemente, Gómez & Pallás (2004), utilizando ensaios de imunoprecipitação, demonstraram que uma proteína de floema de espécies de *Cucurbita* interage com o HSVd *in vivo* formando um complexo ribonucleoprotéico (RNP), que deve permitir que o RNA do HSVd possa se mover via floema. Os autores também caracterizaram a proteína (denominada CsPP2), a qual apresenta um domínio estrutural com propriedades para ligação a RNA. O seu possível envolvimento no transporte de um RNP sugere que essa proteína atue como uma chaperona (Gómez & Pallás, 2004). Não há dados disponíveis sobre o movimento dos viróides da família *Avsunviroidae*.

Silenciamento gênico

A ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro do tipo silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) tem sido relatada para viróides (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002). Em muitos casos, esses mecanismos são insuficientes para impedir a indução de efeito patogênico (Diener, 1999). O PTGS, mecanismo que regula a expressão gênica em eucariontes, resulta em degradação de RNAs de fita simples (ssRNAs) e é ativado por RNAs de fita dupla (dsRNAs) derivados em muitos casos de ssRNAs, que alcançam níveis anormais na célula e servem como molde para a RNA polimerase dependente de RNA. Esses dsRNAs são subsequentemente processados em fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos, denominados pequenos RNAs interferentes (siRNAs) (Vance & Vaucheret, 2001; Baulcombe, 2002), que são considerados marcadores desse fenômeno por estarem sempre associados a sistemas exibindo PTGS. Recentemente, siRNAs homólogos às fitas positiva e negativa do PSTVd foram detectados em plantas infectadas por este viróide, indicando que o PSTVd induz PTGS (Itaya *et al.*, 2001; Papaefthimiou *et al.*, 2001). Martínez de Alba *et al.* (2002) observaram também, para dois viróides da família *Avsunviroidae*, a presença de siRNAs indicando que o PLMVd e o *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) (Navarro & Flores, 1997) são indutores de PTGS. Porém o mesmo não se verificou para o ASBVd, que se acumula em níveis elevados no tecido da hospedeira, enquanto o PLMVd e o CChMVd apresentam baixas concentrações. Esta correlação inversa entre acúmulo do viróide e a presença ou ausência dos siRNAs é consistente com o envolvimento dos últimos em uma resposta de defesa do tipo PTGS do hospedeiro que atenuaria o efeito dos viróides reduzindo seu título. Markarian *et al.* (2004) demonstraram que o ASBVd também é alvo de PTGS, particularmente em

áreas sintomáticas, observando uma correlação direta entre a concentração de siRNAs e do viróide. Os mesmos autores analisaram também plantas de *Gynura* infectadas com dois variantes de CEVd, que causam sintomas severos e fracos, e verificaram que os níveis de acúmulo de siRNAs, e não com o título do viróide, estão relacionados com a severidade dos sintomas.

Wang *et al.* (2004) sugerem que o silenciamento de RNA em plantas desempenha importante papel nos mecanismos de patogenicidade de viróides e VL-satRNAs e também na evolução de suas estruturas secundárias. De acordo com esta hipótese, viróides e VL-satRNAs causariam sintomas pela atuação de seus siRNAs como microRNAs (uma classe de pequenos RNAs endógenos implicados na regulação do desenvolvimento em plantas e outros organismos) que silenciariam mRNAs fisiologicamente importantes do hospedeiro. Em acordo com esta proposição, Denti *et al.* (2004), estudando o silenciamento no patossistema PSTVd-tomateiro, encontraram siRNAs predominantemente no citoplasma. Por outro lado, os viróides e VL-satRNAs, por não codificarem proteínas próprias, supressoras de silenciamento, devem garantir sua existência e seu sucesso ao longo da evolução, utilizando exclusivamente uma estratégia baseada em sua seqüência e estrutura secundária, o que os tornam significativamente resistentes à degradação mediada pelo silenciamento de RNA (Wang *et al.*, 2004).

Patogênese

Os viróides induzem doenças em culturas de importância econômica de plantas tanto herbáceas como lenhosas. Em alguns casos, seus efeitos podem ser devastadores como sucedeu com o CCCVd que matou mais de vinte milhões de coqueiros (*Cocos nucifera* L.) no sudoeste asiático. Em outros casos, a infecção transcorre de forma latente, sem sintomas perceptíveis no hospedeiro natural, como é o caso do CLVd. Alguns viróides apresentam círculo de hospedeiros restrito, como na família *Avsunviroidae*, cujo membro tipo, o ASBVd, só infecta abacateiro e cinamomo (*Melia azedarach* L.) (família Lauraceae). Certos membros da família *Pospiviroidae* também apresentam poucos hospedeiros, como o ASSVd, que infecta apenas macieira (*Pyrus malus* L.) e pereira (*Pyrus communis* L.), e o CCCVd que infecta palmáceas. Já o PSTVd, HSVd, CSVd e o CEVd apresentam amplo círculo de hospedeiros, podendo no caso do PSTVd infectar mais de 160 espécies em 13 famílias botânicas (Singh *et al.*, 2003b).

Trabalhos recentes, envolvendo padrão de expressão de genes em hospedeiros infectados, têm sido realizados por meio de análise de “macroarrays” para viróides (Itaya *et al.*, 2002). Entretanto, mesmo com a utilização de técnicas sofisticadas de análise de expressão gênica e hibridização comparativa, é difícil associar interações moleculares com expressão de sintomas. A expressão dos sintomas e os níveis de severidade observados em um determinado hospedeiro são, muitas vezes, determinados por diferenças mínimas de

seqüências de nucleotídeos entre as variantes de um viróide (Gross *et al.*, 1981; Schnölzer *et al.*, 1985; Visvader & Simons, 1986; Skoric *et al.*, 2001). Essas diferenças, porém, podem resultar em mudanças na estrutura secundária da molécula com conseqüente influência na ligação a fatores do hospedeiro e expressão dos sintomas (Schmitz & Riesner, 1998). Alguns estudos têm demonstrado que elementos não codificantes de genomas de RNA podem controlar o desenvolvimento de sintomas via interação entre estruturas do RNA e fatores do hospedeiro. Porém, parece evidente que essas interações devem ter um papel na patogênese e ao mesmo tempo promover o sucesso dos viróides, vírus e RNAs satélites na colonização dos tecidos vegetais (Maule *et al.*, 2002). Qi & Ding (2003b) demonstraram que a infecção do PSTVd em tomateiro causa restrição na expansão celular mas não altera divisão e diferenciação, o que leva ao encurtamento dos entrenós e diminuição do tamanho das folhas. Por outro lado, uma série de evidências sugere que mecanismos de fosforilação de proteínas desempenham um importante papel na patogenicidade dos viróides (Hiddinga *et al.*, 1988), e neste contexto Hammond & Zhao (2000) caracterizaram uma proteína quinase de tomateiro que tem sua transcrição ativada pelo PSTVd. Qi & Ding (2003b), analisando o patossistema PSTVd/tomateiro, demonstraram que a modificação de um nucleotídeo no “loop E” da região central conservada confere uma condição letal aos tomateiros infectados, além de promover a inibição do crescimento celular e do desenvolvimento da parte aérea. Os mesmos autores, em estudos prévios, analisaram substituições nesse mesmo “loop E”, e embora não tenham ocorrido alterações na estrutura do RNA, houve aumento dos níveis de transcrição em até 100 vezes em células de fumo (Qi & Ding, 2002). Isso indica que o “motivo” supra citado do PSTVd deve atuar no processamento, transcrição e patogenicidade (Qi & Ding, 2003b). Um papel patogênico, similar ao desempenhado pelo “loop E” do PSTVd, seria desempenhado por um “tetraloop” no CChMVd; uma simples mutação no “tetraloop” pode converter variante sintomática em assintomática (De la Peña *et al.*, 1999, De la Peña & Flores, 2002).

Após a introdução do viróide na planta hospedeira, o primeiro evento relacionado à patogênese envolve a interação entre o RNA viroidal e fatores do hospedeiro de natureza desconhecida. Estudos relacionando seqüências ou estruturas determinantes de patogenicidade têm sido realizados, principalmente com o PSTVd e outros membros da família *Pospiviroidae*, pela facilidade de condução de ensaios biológicos e por possuírem hospedeiros herbáceos (Gross *et al.*, 1981; Schnölzer *et al.*, 1985; Visvader & Symons, 1986; Sano *et al.*, 1992; Schmitz & Riesner, 1998; Reanwarakorn & Semancik, 1998). Trabalhos dessa natureza para membros da família *Avsunviroidae* têm sido limitados pela dificuldade de realização de ensaios biológicos, pelo limitado número de hospedeiros e pelo normalmente longo período de tempo após a inoculação necessário para o aparecimento de sintomas (Semancik &

Szychowski, 1994; Ambrós *et al.*, 1998; Malfitano *et al.*, 2003; De la Peña *et al.*, 1999). Outro fator que dificulta os estudos de aspectos ligados à patogenicidade do PLMVd é a elevada variabilidade deste viróide (Ambrós *et al.*, 1998). Já o CChMVd, quando inoculado em plantas de crisântemo, exibe sintomas entre 8 e 10 dias (Navarro & Flores, 1997). Além disso, a ocorrência de estirpes severas e latentes deste viróide permitiu a identificação via mutagênese sítio-dirigida de “motivos” específicos, possibilitando estudos experimentais de proteção cruzada e de evolução destes patógenos *in vivo* (De la Peña & Flores, 2002).

A construção de quimeras contendo seqüências derivadas de variantes de um simples viróide (Góra *et al.*, 1996; Visvader & Symons, 1986), de viróides relacionados (Sano *et al.*, 1992) e de viróides de diferentes gêneros (Sano & Ishiguro, 1998), tem possibilitado verificar que a patogênese é controlada por determinantes distribuídos em uma ou mais regiões da molécula. Mutações de ponto na região central conservada podem alterar o círculo de hospedeiros e a eficiência de replicação do PSTVd (Wassenegger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2002). Em membros da família *Pospiviroidae*, mutações têm sido associadas a domínios específicos similares para o PSTVd e CEVd, com importantes efeitos na patogenicidade (Visvader & Symons, 1986; Sano *et al.*, 1992). Mutações que geram alterações na conformação de regiões associadas à patogenicidade e presumivelmente nas interações RNA-proteína têm sido relatadas para alguns viróides (Owens *et al.*, 1996; Schmitz & Riesner, 1998). O “motivo” da estrutura secundária RY localizado no domínio TR do PSTVd também parece determinar o círculo de hospedeiros (Gozmanova *et al.*, 2003). Owens *et al.* (2003), ao compararem as propriedades estruturais das quimeras PSTVd/CLVd (construídas artificialmente), sugeriram que interações entre nucleotídeos no domínio de patogenicidade e no “loop” do domínio terminal direito (TR) desempenham papel crítico na replicação e movimento do CLVd. Além disso, resultados de bioensaios indicaram que mudanças na porção direita do domínio de patogenicidade tiveram efeito acentuado na infectividade do CLVd.

Para o CChMVd, conforme já comentado, uma alteração no “*tetraloop*” da conformação ramificada foi implicada como determinante da patogenicidade (De la Peña & Flores, 2002). Malfitano *et al.* (2003), analisando variantes de PLMVd em pessegueiros com sintomas de forte clorose nas folhas, talos e frutos conhecidos como “*peach calico*”, estabeleceram uma relação causal entre esses sintomas e uma inserção de 12 a 13 nucleotídeos na molécula do RNA viroidal. Este caso difere do comumente observado para viróides, em que substituições ou inserções/deleções de um pequeno número de nucleotídeos estão associadas com patogenicidade. A associação dos sintomas causados pelas variantes de PLMVd em pessegueiro e por variantes de ASBVd em abacateiro, viróides com propriedades biológicas e estruturais distintas, indica que efeitos fenotípicos similares podem ser causados por diferentes interações moleculares (Malfitano *et al.*, 2003).

Em nível citológico, têm sido observadas diversas

alterações que afetam a parede celular e a membrana plasmática em plantas infectadas com o CEVd, e malformações dos cloroplastos em plantas infectadas pelo ASBVd. Isto ocorre provavelmente em consequência da localização do ASBVd nesta organela. Em tecidos com sintomas induzidos pelo CEVd tem-se detectado o acúmulo de uma série de proteínas denominadas PR (“*pathogenesis related*”), que incluem enzimas hidrolíticas do tipo proteases, glucanases e quitinases, ou de óxido-redução como peroxidases, além de modificações nos níveis de certos hormônios como o etileno. É possível que estas alterações formem parte da cadeia de transdução do sinal que conecta o efeito patogênico primário com os sintomas macroscópicos. Desconhece-se, contudo, o fator da célula hospedeira que interage inicialmente com o RNA viroidal, determinando o efeito patogênico primário (Semancik, 2003).

VIRUSÓIDES: PEQUENOS RNAs SATÉLITES CIRCULARES

Os satélites são agentes sub-virais que, diferentemente dos viróides, não se replicam de forma autônoma; a sua replicação depende da co-infecção de uma célula hospedeira com um vírus auxiliar. Os ácidos nucleicos dos satélites caracterizam-se por seqüências que são substancialmente distintas das de seus vírus auxiliares e de seus hospedeiros e nisto se diferenciam dos “RNAs defectivos interferentes” (DI) e dos “RNAs defectivos”, derivados em sua totalidade do genoma do vírus auxiliar (Rubino *et al.*, 2003). Entretanto, os ácidos nucleicos de satélites e do vírus auxiliar correspondente podem compartilhar seqüências curtas, normalmente nas extremidades da molécula; um *replicon* quimérico com seqüências que provêm de um RNA satélite (satRNA) e de seu vírus auxiliar foi descrito por Simon & Howell (1986). A presença de um satélite também pode afetar o nível de acúmulo do vírus auxiliar. Por todas as características anteriores, considera-se os satélites como parasitas moleculares de seus vírus auxiliares.

Normalmente, a relação vírus auxiliar/satélite é específica, uma vez que a replicação de um satélite particular só é mantida por uma espécie de vírus ou por um grupo de espécies relacionadas. Porém, não há correlação entre a taxonomia dos satélites e a de seus vírus auxiliares, sendo que um determinado vírus pode ter satélites taxonomicamente distintos. Isto sugere que o “satelitismo” evoluiu independentemente uma série de vezes (Vogt & Jackson, 1999). A epidemiologia dos satélites está condicionada por características do vírus auxiliar (Vogt & Jackson, 1999). Diferentemente, a disseminação dos viróides, por não dependerem de um vírus auxiliar e por não apresentarem envolvimento com vetores, é efetuada pelas práticas agrícolas (Diener, 2001). Do mesmo modo, o controle das doenças associadas aos satélites é semelhante ao das causadas pelo vírus auxiliar.

Os satélites não formam uma unidade taxonômica, já que constituem um grupo muito mais heterogêneo que os

viróides. Há satélites que codificam e expressam proteínas *in vivo* e satélites que são ácidos nucleicos não codificantes. Quando a proteína codificada pelo satélite é estrutural, este é referido como **vírus satélites**, e é encontrado como componente nucleoprotéico diferenciado nas preparações purificadas do vírus auxiliar. Os satélites que não codificam proteínas estruturais são denominados **ácidos nucleicos satélites**. Os vírus ou ácidos nucleicos satélites não são necessários para a multiplicação dos vírus auxiliares, porém foram descritas moléculas de RNA com características de satélite que não são necessárias para que o vírus auxiliar infecte em condições experimentais, mas que podem ser necessárias para que complete seu ciclo em condições naturais. Também foram descritos **agentes sub-virais do tipo satélite** que dependem de um vírus auxiliar para serem encapsidados, mas não para sua replicação (Symons, 1997; Hull, 2002; Rubino *et al.*, 2003).

O termo satélite foi cunhado por Kassanis (1962) para denominar as partículas de 17 nm de diâmetro associadas com o *Tobacco necrosis virus* (TNV) e dependentes deste para acumular-se. A partir daí, o termo satélite se estendeu para incluir ácidos nucleicos satélites. A maioria dos satélites descritos são RNAs de fita simples que se associam a vírus de RNA, mas também existem satélites de DNA de fita simples e RNA de fita dupla. Além dos satélites que se associam a vírus de plantas, há também os associados a vírus de insetos, de protozoários e de fungos (Mayo *et al.*, 2000). Os satélites têm sido considerados modelos apropriados para o estudo de aspectos fundamentais na virologia, como os processos de replicação, encapsidação, patogênese, recombinação e variabilidade genética. As relações, geralmente complexas, entre satélites e vírus auxiliar suscitam questões interessantes de biologia evolutiva sobre os satélites (Collmer & Howell, 1992; Vogt & Jackson, 1999). Apesar dos avanços recentes da biologia molecular, o conhecimento é ainda escasso em questões fundamentais tais como: (i) de que maneira a maquinaria de replicação do vírus auxiliar replica os satélites? (ii) como os satélites alteram o acúmulo e a patogênese do vírus auxiliar? (iii) qual a origem dos satélites e como eles influenciam as populações do vírus auxiliar?

Os **VL-satRNAs**, também denominados **virusóides**, são subdivididos em: (i) membros dependentes de um vírus auxiliar do gênero *Sobemovirus*, os quais são encapsidados como moléculas circulares com forte estrutura secundária; (ii) membros dependentes de um vírus auxiliar dos gêneros *Nepovirus* e *Polerovirus*, os quais são encapsidados na forma linear (Mayo *et al.*, 2000; Rubino *et al.*, 2003). Juntamente com os viróides, os **virusóides** são os menores agentes infecciosos conhecidos. Apresentam características físicas de viróides, porém diferem na seqüência, função e biologia (Symons & Randles, 1999). Foram primeiramente relatados como satélites do *Velvet tobacco mottle virus* (VTMoV). Posteriormente, demonstrou-se que um isolado de VTMoV livre de satélite poderia encapsidar o PSTVd (Francki *et al.*, 1986), o que sugere a possibilidade de viróides serem RNAs satélites que escaparam, e que inicialmente eram auxiliados

em sua replicação e transmissão por um vírus auxiliar.

Em alguns casos (p.ex., os VL-satRNAs do *Tobacco ringspot virus*, TRSV, e do *Barley yellow dwarf virus*, BYDV), o VL-satRNA atenua os sintomas do vírus auxiliar e reduz seu acúmulo. Nos outros (p.ex., VTMoV) os VL-satRNAs agravam consideravelmente os sintomas do vírus auxiliar (Rubino *et al.*, 2003). Os VL-satRNAs compõem-se de 220 a 457 nt. Em tecidos infectados são encontrados em suas formas circular e linear, mas o vírus auxiliar encapsida preferencialmente as formas lineares (*Polerovirus* e *Nepovirus*) ou circulares (*Sobemovirus*). Os VL-satRNAs não têm atividade de RNA mensageiro, ainda que alguns possuam ORFs potenciais. Todos os VL-satRNAs dos sobemovírus e dos polerovírus, caracterizados até o momento que apresentam domínios com atividade de ribozima, são do tipo cabeça-de-martelo e aparecem, em sua maioria, nas cadeias de polaridade positiva: RNAs satélites do *Solanum nodiflorum mottle virus* (SNMoV), do *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV), do VTMoV e do *Rice yellow mottle virus* (RYMV). No caso dos RNAs satélites do *Lucerne transient streak virus* (LTSV, *Sobemovirus*) e do BYDV (*Polerovirus*) as ribozimas são encontradas em ambas polaridades. Os VL-satRNAs dos nepovírus (*Tobacco ringspot virus*, TRSV, *Chicory yellow mottle virus*, CYMV e *Arabis mosaic virus*, ArMV) têm ribozimas com estrutura de cabeça-de-martelo na cadeia positiva e estrutura em forquilha (“hairpin”) na cadeia negativa (Mayo *et al.*, 2000; Rubino *et al.*, 2003).

A replicação dos VL-satRNAs ocorre por meio de um mecanismo de círculo rolante conforme descrito para os viróides (e por isto são também chamados de satRNAs do tipo viróide). Para alguns foi demonstrada a auto-clivagem das cadeias multiméricas lineares mediada por ribozimas para gerar as formas monoméricas. As ribozimas que apresentam estrutura de cabeça-de-martelo promovem auto-clivagem do RNA, enquanto que as que possuem estrutura do tipo forquilha catalisam tanto a clivagem como a ligação do RNA (Buzayan *et al.*, 1986; Prody *et al.*, 1986; Forster & Symons, 1987). Deve-se destacar que, pelo menos para um RNA com estas características, foi encontrada uma contrapartida de DNA, formando um elemento do tipo “retroviróide” (Daròs & Flores, 1995). Vera *et al.* (2000) obtiveram evidências do possível envolvimento de uma transcriptase reversa do *Carnation etch ring virus* (CERV) na origem desse retroviróide. Em animais também foram relatados RNAs similares aos viróides. O RNA do *Hepatitis delta virus* (HDV) depende para sua encapsidação do *Hepatitis B virus* (HBV), e apresenta características estruturais e mecanismo de replicação comuns aos viróides e VL-satRNAs, como molécula circular com forte estrutura secundária e ribozimas específicas presentes nas duas polaridades (Taylor, 1999; Harris & Elder, 2000).

ORIGEM E EVOLUÇÃO DOS VIRÓIDES E VIRUSÓIDES: UMA VIAGEM AO MUNDO DE RNA

Diener (1996) aponta os viróides como os patógenos que apresentam os processos evolucionários mais dinâmicos

entre os sistemas biológicos conhecidos. A presença de estruturas periódicas com repetições de nucleotídeos, o tamanho reduzido do genoma e a atividade auto-catalítica caracterizam os viróides como moléculas muito antigas que podem ser considerados “fósseis vivos” (Diener, 1989, 2001). Há outras hipóteses sobre a possível origem dos viróides. A primeira delas sugere que os viróides poderiam ter se originado a partir de elementos genéticos transponíveis ou de retrovírus, pois há certas semelhanças de sequência entre a CCR de alguns viróides e os extremos de uma região polipurínica que também está presente em retrovírus (Kiefer *et al.*, 1983). Numa segunda hipótese, os viróides seriam “introns fugitivos”, pois foram observadas certas semelhanças de sequência entre viróides e introns do grupo I. Além disso, viróides e introns do grupo I têm tamanhos similares e alguns deles são capazes de auto-processamento (clivagem e circularização) (Hadidi, 1986; Cech, 1990). Entretanto, análises mais detalhadas demonstraram que o mecanismo auto-catalítico é muito diferente em ambos os casos e, além disso, apesar de repetidos esforços não foi encontrada em viróides uma contrapartida de DNA homólogo como ocorre com os introns.

Comparações entre seqüências de nucleotídeos de viróides e RNAs satélites indicam que estes constituem um grupo monofilético, apresentando como ancestrais os viróides auto-catalíticos (Elena *et al.*, 1991) (Figura 3). Outros resultados sugerem uma origem quimérica do RNA do HDV, a partir de um RNA do tipo viróide que capturou um RNA mensageiro codificando uma proteína que favoreceria sua replicação (Brazas & Ganem, 1996). A descoberta da atividade catalítica em alguns RNAs viroidais reforçou a idéia de que previamente ao mundo celular atual, baseado em DNA e proteínas, existiu provavelmente um “Mundo de RNA” em que tanto as macromoléculas que armazenavam como as que expressavam a informação genética eram de RNA (Gilbert, 1986). Os viróides e os VL-satRNAs poderiam ser relíquias evolutivas dessa era antiga (Diener, 1989). A estrutura dos

RNAs do tipo viróide, e em particular seu pequeno tamanho e alto conteúdo de G+C, teriam permitido superar a baixa fidelidade de cópia dos sistemas replicativos primitivos e, por outro lado, sua estrutura circular teria dispensado os sinais de início e término da replicação. Porém, o argumento que mais reforça esta hipótese é a presença nos viróides da família *Avsunviroidae* e em todos os VL-satRNAs de ribozimas estruturalmente muito simples que poderiam ter catalisado a replicação durante as etapas iniciais da evolução da vida na Terra (Diener, 1989; Landweber *et al.*, 1998). Posteriormente, os viróides teriam adquirido dependência de uma célula hospedeira (e os VL-satRNAs, de um vírus auxiliar), convertendo-se assim em parasitas intracelulares. A atividade ribozimática presente em alguns RNAs do tipo viróide seria um vestígio de seu passado evolutivo (Diener, 1996, 2001; Elena *et al.*, 1991, 2001).

Há também fortes evidências que sustentam a hipótese de que cloroplastos são organelas que evoluíram de cianobactérias por simbiose (Margulis, 1993; Martin, 1999), sugerindo que estes procariontes de vida livre poderiam ter hospedado viróides, principalmente os ancestrais da família *Avsunviroidae*, anteriormente à colonização das plantas superiores. Isso implica que os membros da família *Avsunviroidae* sejam os viróides mais antigos (Lima *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 2000). Análises filogenéticas são consistentes com essas suposições e também sugerem que viróides possam estar presentes atualmente em cianobactérias (Elena *et al.*, 1991; Flores *et al.*, 2000).

A análise detalhada das seqüências dos viróides mostra que alguns deles parecem ter surgido como quimeras resultantes da recombinação de duas ou mais seqüências parentais co-infetando a mesma hospedeira (Keese & Symons, 1985). Portanto, a história evolutiva dos viróides pode ter sido moldada por fenômenos de recombinação similares aos que têm sido descritos para vírus. O exemplo mais representativo de recombinação entre viróides é o caso do CLVd, que é formado por um mosaico de seqüências

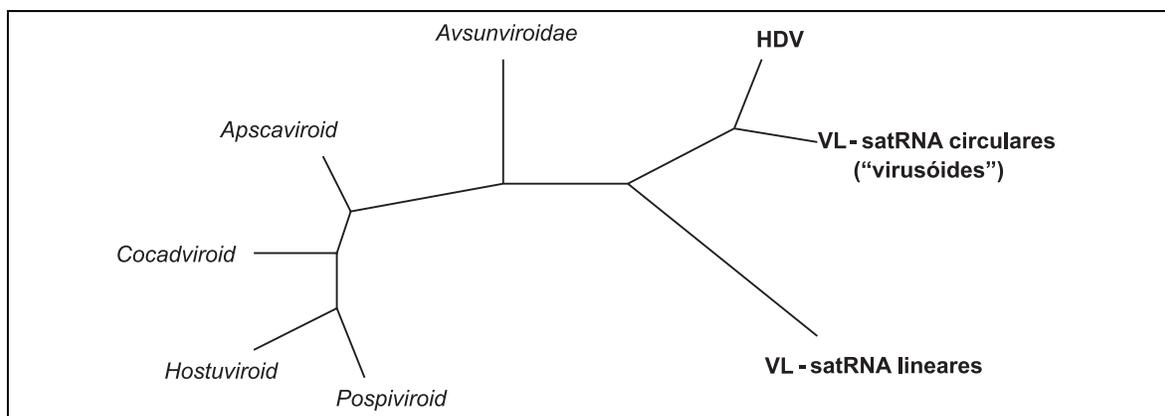


FIG. 3 – Árvore filogenética obtida pelo alinhamento das seqüências de RNAs de viróides, VL-satRNAs e o domínio viroidal do RNA do *Hepatitis delta virus* (HDV). A distribuição indica uma origem monofilética para estes agentes sub-virais, sendo os membros da família *Avsunviroidae* os prováveis ancestrais tanto dos *Pospiviroidae* (à esquerda) como dos satélites (à direita). Modificado de Elena *et al.* (1991). Ver texto para maiores detalhes.

provenientes do PSTVd, TPMVd, HSVd e TASVd (Hammond *et al.*, 1989). Esta natureza quimérica em nível estrutural manifesta-se também em suas propriedades biológicas, pois o CLVd compartilha a gama de hospedeiros de dois de seus parentais presumíveis, o PSTVd e o HSVd (Hammond, 2003).

Há outra fonte de variabilidade genética que merece destaque. Há algum tempo sabe-se que os genomas de RNA são capazes de variar e evoluir muito mais rapidamente que os de DNA (Joyce, 1989). A diferença principal entre ambos os sistemas reside na existência de tamanhos populacionais muito grandes nos genomas de RNA e em baixa fidelidade de replicação em comparação com os de DNA. Isto se deve à ausência de uma atividade corretora de erros nas polimerases de RNA, assim como de mecanismos pós-replicativos de reparação que operam em sistemas baseados no DNA. O resultado final é que os vírus de RNA e os viróides se propagam em seus hospedeiros como um conjunto de seqüências estreitamente relacionadas, mas não idênticas, que formam o que se denomina uma quase-espécie viral ou viroidal (Domingo & Holland, 1994). Esta estrutura em quase-espécie, flutuante no espaço e no tempo, confere aos vírus de RNA e aos viróides sua grande plasticidade e, como consequência, a capacidade de evadir de pressões evolutivas adversas. Deve-se ressaltar, contudo, que esta plasticidade tem restrições que impedem a fixação de mutações em regiões da molécula determinantes de algumas funções-chave. É o caso dos nucleotídeos que formam o núcleo central das estruturas em cabeça-de-martelo, onde não se observa variabilidade (Ambrós *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2001).

Os satélites constituem grupo altamente heterogêneo, e por não haver correlação entre sua taxonomia e a de seus vírus auxiliares, provavelmente apresentam origens distintas. Uma origem comum para as ribozimas cabeça-de-martelo e *hairpin* foi recentemente proposta por Harris & Elder (2000). Elena *et al.* (2001) sugerem que as ribozimas do tipo cabeça-de-martelo possam ser o elo evolucionário de ligação entre viróides e VL-satRNAs, que teriam origem filogenética comum. Seqüências do tipo cabeça-de-martelo não ativas foram recentemente relatadas para variantes do HSVd, membro da família *Pospiviroidae*, cujos membros carecem de ribozimas (Amari *et al.*, 2001). Viróides e VL-satRNAs contêm seqüências e estruturas na molécula que atuam como sinais necessários na interação com fatores e enzimas da célula hospedeira e, conseqüentemente, requeridas para completar seu ciclo infeccioso. Alguns destes sinais têm sido identificados em viróides, como o sítio de início da transcrição e possíveis seqüências promotoras para o ASBVd (Navarro & Flores, 2000). Para o PSTVd os dados, até hoje obtidos, são contraditórios (Tabler & Tsagris, 2004). Pouco se conhece sobre sinais presentes nas moléculas de VL-satRNAs. Contudo, possíveis sinais de reconhecimento devem estar presentes, considerando que os vírus auxiliares sustentam grande número desses satélites (Sehgal *et al.*, 1993). Conforme mencionado, viróides e VL-

satRNAs poderiam derivar de moléculas auto-replicativas anteriores ao mundo celular baseado no DNA e que teriam passado a depender, para sua replicação, de um hospedeiro (os viróides) ou de um vírus auxiliar (VL-satRNAs). Esta hipótese ligaria os VL-satRNAs e viróides em um processo evolutivo no qual teria ocorrido perda de autonomia replicativa (Rubino *et al.*, 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS: PERSPECTIVAS FUTURAS PARA MOLÉCULAS DO PASSADO

Até meados do século XX, os vírus eram considerados os representantes mais simples da escala biológica (Hull, 2002). A descoberta dos satélites e dos viróides (Kassanis 1962; Diener, 1971) foi surpreendente, pois a partir de então se comprovou a existência de uma nova classe de parasitas intracelulares ainda mais simples, denominados agentes sub-virais, que inspiraram diferentes linhas de pesquisa, visando à sua caracterização e entendimento. Atualmente, os viróides e os VL-satRNAs são considerados o nível mais baixo da escala biológica e com origem evolutiva independente dos vírus (Elena *et al.*, 1991, 2001). A simplicidade dos viróides e dos VL-satRNAs, e o fato de que a molécula de RNA deve interagir diretamente com componentes celulares do hospedeiro para o desenvolvimento do seu ciclo infeccioso, sugerem esses agentes como modelos interessantes para o estudo dos processos biológicos e moleculares envolvendo aspectos da interação patógeno/hospedeiro (Diener, 2001; Rubino *et al.*, 2003). Avanços nos estudos dos mecanismos da interação viróide/hospedeiro deverão auxiliar no entendimento dos processos de regulação da expressão gênica mediados por RNAs e permitir o desenvolvimento de “motivos” artificiais de RNA como ferramentas moleculares para o estudo de processos biológicos específicos (Qi & Ding, 2003b).

Ainda é escasso o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas diversas interações dos viróides e VL-satRNAs com fatores do hospedeiro, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos. A compreensão de como RNAs patogênicos que não codificam proteínas próprias desenvolveram a capacidade de completar seu ciclo infeccioso nas plantas hospedeiras, os mecanismos moleculares das interações RNA-RNA e RNA-proteína, a ativação e repressão de processos que regulam a expressão gênica, a regulação da expressão de sintomas e o recrutamento de fatores da célula para a replicação e movimento na planta apresentam questionamentos para pesquisas futuras.

Outras aplicações para moléculas de RNA e “motivos” como ribozimas cabeça-de-martelo têm sido intensamente estudadas. Nas últimas décadas, diversas empresas farmacêuticas têm investido no desenvolvimento de ribozimas artificiais para utilização em *trans* visando o controle de vírus humanos como o da *Hepatitis C virus* (HCV) e o *Human immunodeficiency virus* (HIV) (Persidis, 1997). Outras aplicações para as ribozimas em estudos de

evolução *in vitro* (Tsang & Joyce, 1996), no controle de viróides via plantas transgênicas (Yang *et al.*, 1997) e em estudos de interação de moléculas de RNA com fatores do hospedeiro (Daròs & Flores, 2002) foram recentemente relatadas, e provavelmente continuarão sendo alvo de estudos e discussões sobre o potencial biotecnológico das ribozimas, abrindo um futuro promissor para o uso destas moléculas do passado.

Com origens distintas e incertas e com relações evolutivas pouco conhecidas, os agentes sub-virais apresentam um contínuo de relações complexas com outros agentes patogênicos e com suas plantas hospedeiras, que tornam o seu estudo intrigante e ao mesmo tempo fascinante. Nos últimos 30 anos, desde a descoberta dos RNAs auto-catalíticos, houve uma profunda reviravolta no pensamento evolutivo, pois acreditava-se que essa propriedade fosse exclusiva das proteínas. Assim, juntamente com outras evidências, postulou-se a existência de um mundo baseado exclusivamente em moléculas de RNA.

Apesar de talvez serem relíquias de um passado longínquo, os viróides parecem ter emergido como patógenos somente no século XX, e provavelmente causaram doenças pela sua introdução acidental em plantas cultivadas a partir de plantas selvagens (Diener, 1996). Uma possibilidade que complementaria a anterior postula que os problemas causados por viróides se deram principalmente quando a agricultura se tornou mais intensiva e quando plantas sensíveis a estes patógenos foram introduzidas em regiões geográficas nas quais já havia plantas cultivadas tolerantes aos viróides, tendo estes “saltado”, via práticas agrícolas, para as plantas suscetíveis (Diener, 1979).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARI, K., GÓMEZ, G., MYRTA, A., DI TERLIZZI, B. & PALLÁS, V. The molecular characterization of 16 new sequence variants of Hop stunt viroid reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *Journal of General Virology* 82:953-962. 2001.
- AMBRÓS, S. & FLORES, R. In vitro and in vivo self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. *Nucleic Acids Research* 26:1877-1883. 1998.
- AMBRÓS, S., HERNÁNDEZ, C., DESVIGNES, J.C. & 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. *Journal of Virology* 72:7397-7406. 1998.
- BARBOSA, C.J., COELHO, Y.S. & SANTOS FILHO, H.P. Pomar de limeira ácida ‘Tahiti’, clone quebra galho, severamente afetado pela exocorte na Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 25:348. 2000. (Resumo)
- BARTOLINI, I. & SALAZAR, L.F. Viroids in South America. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003. pp. 265-267.
- BATISTA, M.F., MARINHO, V.L. & FONSECA, M.E.N. Detection methods for pests in plant germplasm introduced into Brazil for research purposes. *EPPO Bulletin* 25:411-417. 1995.
- BAULCOMBE, D.C. RNA silencing. *Current Biology* 12:R82-R84. 2002.
- BAUMSTARK, T., SCHRÖDER, A.R.W. & RIESNER, D. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO Journal* 16:599-610. 1997.
- BONFIGLIOLI, R.G., McFADDEN, G.I. & SYMONS, R.H. *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *The Plant Journal* 6:99-103. 1994.
- BRANCH, A.D. & ROBERTSON, H.D. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* 223:450-454. 1984.
- BRANCH, A.D., BENENFELD, B.J. & ROBERTSON, H.D. Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85:9128-9132. 1988.
- BRAZAS, R. & GANEM, D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 275:90-94. 1996.
- BUSSIÈRE, F., LEHOUX, J., THOMPSON, D.A., SKIZECZKOWSKI, L.J. & PERREAULT, J. Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *Journal of Virology* 73:6353-6360. 1999.
- BUZAYAN, J.M., GERLACH, W.L. & BRUENING, G. Nonenzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature* 323:349-353. 1986.
- CECH, T.R. Self-splicing of group I introns. *Annual Review of Biochemistry* 59:543-568. 1990.
- COLLMER, C.W. & HOWELL, S.H. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 30:419-442. 1992.
- DARÒS, J.A. & FLORES, R. Identification of a retroviroid-like element from plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92:6856-6860. 1995.
- DARÒS, J.A. & FLORES, R. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO Journal* 21:749-759. 2002.
- DARÒS, J.A. & FLORES, R. *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:6792-6797. 2004.
- DARÒS, J.A., MARCOS, J.F., HERNÁNDEZ, C. & FLORES, R. Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:12813-12817. 1994.
- DE LA PEÑA, M. & FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *Journal of Molecular Biology* 321:411-421. 2002.
- DE LA PEÑA, M., GAGO, S. & FLORES, R. Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage

activity. *EMBO Journal* 22:5561-5570. 2003.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96:9960-9965. 1999.

DENTI, M.A., BOUTLA, A., TSAGRIS, M. & TABLER, M. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *The Plant Journal* 37:762-769. 2004.

DIENER, T.O. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exit in extracts or *in situ*. *Virology* 43:75-89. 1971.

DIENER, T.O. *Viroids and Viroid diseases*. New York. John Wiley & Sons. 1979.

DIENER, T.O. Circular RNAs: Relics of precellular evolution? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86:9370-9374. 1989.

DIENER, T.O. The frontier of life: the viroids and viroid-like satellite RNAs. In: Maramorosch, K. (Ed.) *Viroids and Satellites: Molecular Parasites at the Frontier of Life*. London. CRC Press. 1991. pp. 1-20.

DIENER, T.O. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. *Virus Genes* 11:119-131. 1996.

DIENER, T.O. Viroids and the nature of viroid disease. *Archives of Virology* 15 (Suppl.):203-220. 1999.

DIENER, T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? *Advances in Virus Research* 57:137-184. 2001.

DING, B., ITAYA, A. & ZHONG, X. Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Current Opinion in Plant Biology* 8:1-7. 2005.

DING, B., KWON, M.O., HAMMOND, R. & OWENS, R. Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant Journal* 12:931-936. 1997.

DINGLEY, A.J., 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. *Journal of Molecular Biology* 334:751-767. 2003.

DOMINGO, E. & HOLLAND, J.J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: Morse, S.S. (Ed.) *Evolutionary Biology of Viruses*. New York. Raven Press. 1994. pp. 171-180.

EIRAS, M., TARGON, M.L.P.N., FAJARDO, T.V.M., FLORES, R. & KITAJIMA, E.W. RT-PCR detection and sequencing of *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid* isolates from grapevine in Brazil. *Virus: Reviews and Research* 9:245-246. 2004. (Abstract)

ELENA, S.F., DOPAZO, J., FLORES, R., DIENER, T.O. & MOYA, A. Phylogeny of viroids, viroid-like satellite RNAs and viroid-like domain of hepatitis delta virus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88:5631-5634. 1991.

ELENA, S.F., DOPAZO, J., DE LA PEÑA, M., FLORES, R., DIENER, T.O. & MOYA, A. Phylogenetic analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. *Journal of Molecular Evolution* 53:155-159. 2001.

FADDA, Z., DARÒS, J.A., FAGOAGA, C., FLORES, R. &

DURAN-VILA, N. Eggplant latent viroid (ELVd): candidate type species for a new genus within family *Avsunviroidae* (hammerhead viroids). *Journal of Virology* 77:6528-6532. 2003a.

FADDA, Z., DARÒS, J.A., FLORES, R. & DURAN-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 Research* 97:145-149. 2003b.

FLORES, R. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de la vie, Paris, Life Sciences* 324:1-10. 2001.

FLORES, R. & SEMANCIK, J.S. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 79:6285-6288. 1982.

FLORES, R., DARÒS, J.A. & HERNÁNDEZ, C. The *Avsunviroidae* family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research* 55:271-323. 2000.

FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., DE LA PEÑA, M., VERA, A. & DARÒS, J.A. Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. *Methods in Enzymology* 341:540-552. 2001.

FLORES, R., HERNÁNDEZ, C., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., DARÒS, J.A. & DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:117-139. 2005a.

FLORES, R., RANGLES, J.W., OWENS, R.A., BAR-JOSEPH, M. & DIENER, T.O. *Viroidae*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger U. & Ball, A.L. (Eds.) *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London. Elsevier Academic Press. 2005b.

FONSECA, M.E.N. & BOITEUX, L.S. Viróides: minúsculos RNAs parasitas de plantas vasculares dotados de características e estruturas únicas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 5:387-425. 1997.

FONSECA, M.E.N., BOITEUX, L.S., SINGH, R.P. & KITAJIMA, E.W. A viroid from *Coleus* species in Brazil. *Plant Disease* 74:80. 1990.

FONSECA, M.E.N., MARINHO, V.L.A., NAGATA, T. & KITAJIMA, E.W. Hop latent viroid in hop germ plasm introduced into Brazil from the United States. *Plant Disease* 77:952. 1993.

FONSECA, M.E.N. & KUHN, G. Natural infection of grapevine by *Citrus exocortis viroid* and *Hop stunt viroid* in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 19:285-286. 1994. (Resumo)

FORSTER, A.C. & SYMONS, R.H. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active site. *Cell* 49:211. 1987.

FRANCKI, R.I.B., ZAITLIN, M. & PALUKAITIS, P. *In vivo* encapsulation of potato spindle tuber viroid by velvet tobacco mottle virus particles. *Virology* 155:469-473. 1986.

GILBERT, W. The RNA world. *Nature* 319:618. 1986.

GÓMEZ, G. & PALLÁS, V. Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:910-913. 2001.

GÓMEZ, G. & PALLÁS, V. A long-distance translocable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex *in vivo* with *Hop stunt viroid* RNA. *Journal of Virology* 78:10104-10110. 2004.

- GÓRA, A., CANDRESSE, T. & ZAGÓRSKI, W. Use of intramolecular chimeras to map molecular determinants of symptom severity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Archives of Virology* 141:2045-2055. 1996.
- GOZMANOVA, M., DENTI, M.A., MINKOV, I.N., 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 Research* 31:5534-5543. 2003.
- GRILL, L.K. & SEMANCIK, J.S. RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75:896-900. 1978.
- GROSS, H.J., DOMDEY, H., LOSSOW, C., JANK, P., RABA, M., ALBERTY, H. & SÄNGER, H.L. Nucleotide sequence and secondary structural of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273:203-208. 1978.
- GROSS, H.J., LIEBL, U., ALBERTY, H., KRUPP, G., DOMDEY, H., RAMM, K. & SÄNGER, H.L. A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Bioscience Reports* 1:235-241. 1981.
- HADIDI, A. Relationship of viroids and certain other plant pathogenic nucleic acids to group I and II introns. *Plant Molecular Biology* 7:129-142. 1986.
- HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W. & SEMANCIK, J.S. *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003.
- HADIDI, A., GIUNCHEDI, L., SHAMLOUL, A.M., POGGI-POLLINI, C. & AMER, M.A. Occurrence of *Peach latent mosaic viroid* in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Disease* 81:154-158. 1997.
- HAMMOND, R.W. Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology* 201:36-45. 1994.
- HAMMOND, R.W. *Columnea latent viroid*. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003. pp. 265-267.
- HAMMOND, R.W. & ZHAO, Y. Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by Potato spindle tuber viroid. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13:903-910. 2000.
- HAMMOND, R.W., SMITH, D.R. & DIENER, T.O. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea latent viroid*: a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17:10083-10094. 1989.
- HARDERS, J., LUCKAS, N., ROBERT-NICOUD, M., JOVIN, J.M. & RIESNER, D. Imaging of viroids in the nuclei of tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO Journal* 8:3941-3949. 1989.
- HARRIS, R.J. & ELDER, D. Ribozyme relationships: the hammerhead, hepatitis delta and hairpin ribozymes have a common origin. *Journal of Molecular Evolution* 51:182-184. 2000.
- HASELOFF, J., MOHAMED N.A. & SYMONS, R.H. Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* 229:316-321. 1982.
- HERNÁNDEZ, C. & FLORES, R. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:3711-3715. 1992.
- HIDDINGA, H.J., CRUM, C.J. & ROTH, D.A. Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. *Science* 241:451-453. 1988.
- HULL, R. *Matthews' Plant Virology*. New York. Academic Press. 2002.
- HUTCHINS, C.J., KEESE, P., VISVADER, J.E., RATHJEN, P.D., MCINNES, J.L. & SYMONS, R.H. Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Molecular Biology* 4:293-304. 1985.
- HUTCHINS, C.J., RATHJEN, P.D., FORSTER, A.C. & SYMONS, R.H. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Research* 14:3627. 1986.
- ITAYA, A., FOLIMOV, A., MATSUDA, Y., NELSON, R.S. & DING, B. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 14:1332-1334. 2001.
- ITAYA, A., MATSUDA, Y., GONZALES, R.A., NELSON, R.S. & DING, B. Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15:990-999. 2002.
- ITO, T., IEKI, H., OZAKI, K., IWANAMI, T., NAKAHARA, K., HATAYA, T., ITO, T., ISAKA, M. & KANO, T. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92:542-547. 2002.
- JOYCE, G.F. RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338:217-224. 1989.
- KASSANIS, B. Properties and behavior of a virus depending for its multiplication on another. *Journal General Microbiology* 27:477-488. 1962.
- KEESE, P. & SYMONS, R.H. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82:4582. 1985.
- KHOVOROVA, A., LESCOUTE, A., WESTHOF, E. & JAYASENA, S.D. Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nature Structural Biology* 10:708-712. 2003.
- KIEFER, M.C., OWENS, R.A. & DIENER, T.O. Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 80:6234-6238. 1983.
- LANDWEBER, L.F., SIMON, P.J. & WAGNER, T.A. Ribozyme engineer and early evolution. *Bioscience* 48:2-103. 1998.
- LEWIS, J.D. & TOLLERVEY, D. Like attracts like: Getting RNA processing together in the nucleous. *Science* 288:1385-1389. 2000.
- LIMA, M.I., FONSECA, M.E.N., FLORES, R. & KITAJIMA, E.W. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Archives of Virology* 138:385-390. 1994.
- LIU, Y. & SYMONS, R.H. Specific RNA self-cleavage in coconut cadang-cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* 4:418-429. 1998.
- MALFITANO, M., DI SERIO, F., COVELLI, L., RAGOZZINO, A., HERNÁNDEZ, C. & FLORES, R. *Peach latent mosaic viroid* variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a

- characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* 313:492-501. 2003.
- MANIATAKI, E., MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., SÄGESSER, R., TABLER, M. & TSAGRIS, M. Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein Virp1. *RNA* 9:346-354. 2003.
- MARGULIS, L. *Symbiosis in Cell Evolution*. 2nd ed. New York. W.H. Freeman and Co. 1993.
- MARKARIAN, N., LI, H.W., DING, S.W. & SEMANCIK, J.S. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology* 149:397-406. 2004.
- MARTIN, W. A briefly argued case that mitochondria and plastids are descendants of endosymbionts, but that the nuclear compartment is not. *Proceedings Royal Society London* 266:1387-1395. 1999.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., FLORES, R. & HERNÁNDEZ, C. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76:13094-13096. 2002.
- MARTÍNEZ DE ALBA, A.E., SÄGESSER, R., TABLER, M. & TSAGRIS, M. A bromodomain-containing protein from tomato binds specifically potato spindle tuber viroid RNA *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Virology* 77:9685-9694. 2003.
- MAULE, A., LEH, V. & LEDERER, C. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 5:279-386. 2002.
- MAYO, M.A., FRITSCH, C., LEIBOWITZ, M.J., PALUKAITIS, P., SCHOLTHOF, K.B.G., SIMONS, A.E. & TALIANSKY, M. Subviral Agents, Satellites. In: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.B. (Eds.) *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego CA. Academic Press. 2000. pp. 1025-1032.
- MÜHLBACH, H.P. & SÄNGER, H.L. Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature* 278:185-188. 1979.
- NAVARRO, B. & FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94:11262-11267. 1997.
- NAVARRO, B. & FLORES, R. Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structural. *EMBO Journal* 19:2662-2670. 2000.
- NAVARRO, B., VERA, A. & FLORES, R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* 268:218-225. 2000.
- OWENS, R.A., STEGER, G., HU, Y., FELS, A., HAMMOND, R.W. & RIESNER, D. RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* 222:144-158. 1996.
- OWENS, R.A., BLACKBURN, M. & DING, B. Possible involvement of phloem protein 2 in long-distance viroid movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:905-909. 2001.
- OWENS, R.A., SANO, T., FELDSTEIN, P.A., HU, Y. & STEGER, G. Identification of a novel structural interaction in *Columnea latent viroid*. *Virology* 313:604-614. 2003.
- PALUKAITIS, P. Potato spindle tuber viroid: Investigation of long-distance intra-plant transport route. *Virology* 158:239-241. 1987.
- PAPAEFTHIMIOU, I., HAMILTON, A.J., DENTI, M.A., BAULCOMBE, D.C., TSAGRIS, M. & TABLER, M. Replicating potato spindle tuber viroid is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Research* 29:2395-2400. 2001.
- PELCHAT, M., CÔTÉ, F. & PERREAULT, J.P. Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Archives of Virology* 146:1753-1763. 2001.
- PELCHAT, M., ROCHELEAU, L., PERREAULT, J. & PERREAULT, J.P. Subviral RNA: a database of the smallest known auto-replicable RNA species. *Nucleic Acids Research* 31:444-445. 2003.
- PERSIDIS, A. Ribozyme therapeutics. *Nature Biotechnology* 15:921-922. 1997.
- PRODY, G.A., BAKOS, J.T., BUZAYAN, J.M., SCHNEIDER, I.R. & BRUENING, G. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231:1577-1580. 1986.
- QI, Y. & DING, B. Replication of potato spindle tuber viroid in cultured cells of tobacco and *Nicotiana benthamiana*: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. *Virology* 302:445-456. 2002.
- QI, Y. & DING, B. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *The Plant Cell* 15:2566-2577. 2003a.
- QI, Y. & DING, B. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *The Plant Cell* 15:1360-1374. 2003b.
- 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. *The Plant Cell* 16:1741-1752. 2004.
- REANWARAKORN, K. & SEMANCIK, J.S. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *Journal of General Virology* 79:3163-3171. 1998.
- RODRIGUES, M.I.S., BARBOSA, C.J., SANTOS FILHO, H.P., VILARINHOS, A.D. & MEISSNER FILHO, P.E. Caracterização biológica e molecular de viróides associados a exocorte de citros. *Fitopatologia Brasileira* 24:528-533. 1999.
- RUBINO, L., DI SERIO, F. & MARTELLI, G.P. Viroid-Like Satellite RNAs. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003. pp. 76-84.
- SANO, T., CANDRESSE, T., HAMMOND, R.W., DIENER, T.O. & OWENS, R.A. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89:10104-10108. 1992.
- SANO, T. & ISHIGURO, A. Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* 240:238-244. 1998.
- SCHINDLER, I.M. & MÜHLBACH, H.P. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Science* 84:221-229. 1992.
- SCHMITZ, A. & RIESNER, D. Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA* 4:1295-1303. 1998.

- SCHNÖLZER, M., HAAS, B., RAMM, K., HOFMANN, H. & SÄNGER, H.L. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. *EMBO Journal* 4:2181-2190. 1985.
- SCHRÖDER, A.R.W. & RIESNER, D. Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. *Nucleic Acids Research* 30:3349-3359. 2002.
- SCOTT, W.G. FINCH, J.T. & KLUG, A. The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalysis cleavage. *Cell* 81:991-1002. 1995.
- SEHGAL, O.P., SINHA, R.C., GALLATLY, D.L., IVANOV, I. & ABOUHAIDAR, M.G. Replication and encapsidation of the viroid-like satellite RNA of Lucerne transient streak virus are supported in divergent hosts by cocksfoot mottle virus and turnip rosette virus. *Journal of General Virology* 74:785-788. 1993.
- SEMANCIK, J.S. Pathogenesis. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003. pp. 61-66.
- SEMANCIK, J.S. & SZYCHOWSKI, J.A. Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75:1543-1549. 1994.
- SEMANCIK, J.S., SZYCHOWSKI, J.A., RAKOWSKI, A.G. & SYMONS, R.H. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *Journal of General Virology* 75:727-732. 1994.
- SIMON, A.E. & HOWELL, S. The virulent satellite RNA of turnip crinkle virus has a major domain homologous to the 3' end of the helper virus genome. *EMBO Journal* 5:3423-3428. 1986.
- SINGH, R.P., READY, K.F.M. & HADIDI, A. Viroids in North America and global distribution of viroid diseases. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003a. pp. 255-264.
- SINGH, R.P., READY, K.F.M. & NIE, X. Biology. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003b. pp. 30-48.
- SKORIC, D., CONERLY, M., SZYCHOWSKI, J.A. & SEMANCIK, J.S. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitive reaction. *Virology* 280:115-123. 2001.
- STEGE, G. & RIESNER, D. Molecular characteristics. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S. (Eds.) *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing, Australia. 2003. pp. 15-29.
- SYMONS, R.H. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Research* 20:2683-2689. 1997.
- SYMONS, R.H. & RANGLES, J.W. Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs (virusoids) of plants. In: Vogt, P.K. & Jackson, A.O. (Eds.) *Satellites and Defective RNAs*. Berlin. Springer. 1999. pp. 81-75.
- TABLER, M. & TSAGRIS, M. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends in Plant Science* 9:339-348. 2004.
- TARGON, M.L.P.N., MULLER, G.W., CARVALHO, S.A., DE SOUZA, J.M. & MACHADO, M.A. Detecção de viróides em citros através de hibridização de impressões de tecidos. *Summa Phytopathologica* 29:60. 2003. (Resumo)
- TAYLOR, J.M. Hepatitis delta virus. *Intervirology* 42:173-178. 1999.
- TSANG, J. & JOYCE, G.F. In vitro evolution of randomized ribozymes. *Methods in Enzymology* 267:410-426. 1996.
- VANCE, V. & VAUCHERET, H. RNA silencing in plant-defense and counterdefense. *Science* 292:2277-2280. 2001.
- VERA, A., DARÒS, J.A., FLORES, R. & HERNÁNDEZ, C. The DNA of a plant retroviroid-like element is fused to different sites in the genome of a plant pararetrovirus and shows multiple forms with sequence deletions. *Journal of Virology* 74:10390-10400. 2000.
- VISVADER, J.E. & SYMONS, R.H. Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. *EMBO Journal* 5:2051-2055. 1986.
- VOGT, P.K. & JACKSON, A.O. *Satellites and defective viral RNAs*. Berlin. Springer. 1999.
- VOINNET, O., VAIN, P., ANGELL, S. & BAULCOMBE, D.C. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is inhibited by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95:177-187. 1998.
- WANG, M.B., BIAN, X.Y., WU, L.M., LIU, L.X., SMITH, N.A., ISENEGGER, D., WU, R.M., MASUTA, C., VANCE, V., WATSON, J.M., REZAIAN, A., DENNIS, E.S. & WATERHOUSE, P.M. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:3275-3280. 2004.
- WARRILOW, D. & SYMONS, R.H. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Archives of Virology* 144:2367-2375. 1999.
- WASSENEGGER, M., SPIEKER, R.L., THALMEIR, S., GAST, F. U., RIEDEL, L. & SÄNGER, H.L. A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid from noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 226:191-197. 1996.
- WOO, Y., ITAYA, A., OWENS, R.A., TANG, L., HAMMONS, R.W., CHOU, H.C., LAI, M.M.C. & DING, B. Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *The Plant Journal* 17:627-635. 1999.
- YANG, X., YIE, Y., ZHU, F., KANG, L., WANG, X. & TIEN, P. Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94:4861-4865. 1997.
- ZHAO, Y., OWENS, R.A. & HAMMOND, R.W. Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of potato spindle tuber viroid. *Journal of General Virology* 82:1491-1497. 2001.
- ZHU, Y., GREEN, L., WOO, Y., OWENS, R.A. & DING, B. Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279:69-77. 2001.
- ZHU, Y., QI, Y., XUN, Y., OWENS, R.A. & DING, B. Movement

ERRATA

Por um erro na composição da revista, as letras A, B e C da Figura 1 do Artigo “EIRAS, M., DARÒS, J.A., FLORES, R. & KITAJIMA, E.W. Viróides e virusóides: relíquias do mundo do RNA. *Fitopatologia Brasileira* 31:229-246. 2006.” do Volume 31(3) não foram reproduzidas. Segue, abaixo, a Figura 1 correta.

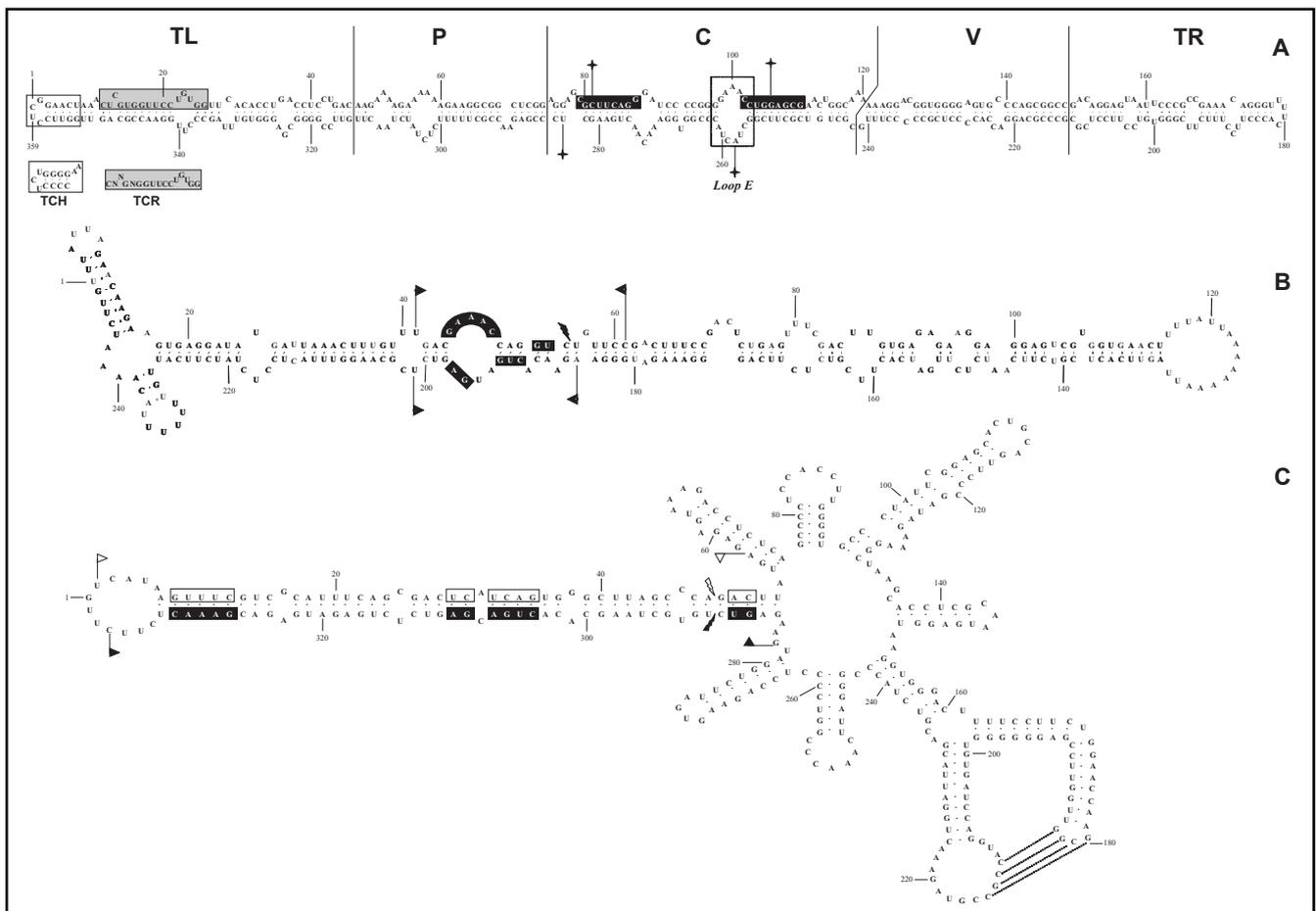


FIG. 1 – A. Estrutura do PSTVd, membro tipo da família *Pospiviroidae*, apresentando os cinco domínios denominados: Domínio C – que contém a Região Central Conservada (CCR, “central conserved region”), delimitada por estrelas; neste domínio também se destaca a presença do “loop E”, elemento de estrutura terciária caracterizado em PSTVd que apresenta homologia com rRNA 5S de eucariontes. Nas caixas negras, estão representados os nucleotídeos das seqüências invertidas responsáveis pela formação do grampo (“hairpin”) I; Domínio P – relacionado à patogenicidade; Domínio V – onde se localiza a maior variabilidade entre viróides que apresentam elevada similaridade; Domínios TL e TR – localizados nas extremidades esquerda e direita da molécula, respectivamente. Estão indicadas também as seqüências TCH (“terminal conserved hairpin”), presente nos gêneros *Hostuviroid* e *Cocadviroid* e TCR (“terminal conserved region”), presente em *Pospiviroid*, *Apscaviroid* e em dois membros do gênero *Coleoviroid*. B. Estrutura secundária do ASBVd, membro tipo da família *Avsunviroidae*, apresentando conformação de (quase) bastonete; C. Estrutura secundária ramificada do PLMVd, espécie tipo do gênero *Pelamoviroid*, família *Avsunviroidae*. Nas estruturas secundárias do ASBVd e PLMVd destacam-se em caixas os resíduos conservados na maioria das ribozimas cabeça-de-martelo descritas na natureza (caixas cheias e vazias para as polaridades positiva e negativa, respectivamente). As bandeiras delimitam a região da estrutura das ribozimas de cabeça-de-martelo e as flechas apontam para os sítios de auto-corte das moléculas. As linhas descontínuas correspondem à interação do tipo “kissing-loop”.

O arquivo disponível sofreu correções conforme ERRATA publicada no Volume 31 Número 4 da revista.