

VIROIDI KOT INOVATIVNO BIOTEHNOLOŠKO ORODJE: KRATEK PREGLED IN ZGODNJI OBETI

Helena VOLK¹ in Jernej JAKŠE²

Pregledni članek / Review article

Prispelo / Arrived: 10. 10. 2024

Sprejeto / Accepted: 21. 10. 2024

Izvleček

Viroidi, najmanjši rastlinski patogeni, so v hmeljarstvu znani predvsem zaradi gospodarske škode, ki jo povzročata viroida zaknelosti hmelja (HSVd) in viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd). Poleg tega, da povzročajo resne rastlinske bolezni, so viroidi pomembno vplivali na razvoj številnih biotehnoloških metod in orodij, ki jih še danes uporabljamo v biotehnologiji. V tej pregledni objavi povzemamo najnovejše raziskave, ki viroide na inovativne načine izkoriščajo za razvoj biotehnoloških metod: i) za proizvodnjo krožnih RNA molekul in njihovo aplikativno uporabo za zatiranje škodljivcev; ii) kot orodje za transport RNA z namenom izražanja proteinov v rastlinskih organelih; iii) kot ribocime, ki omogočajo razgradnjo ciljanih RNA sekvenc v rastlinah; iv) za napovedovanje resnosti simptomov in preprečevanje širjenja visokosimptomatskih viroidnih variant in za v utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (VdIGS), ki ima potencial za široko uporabo v funkcionalnih študijah genov pri kmetijski pomembnih rastlinah. S temi napredki raziskave viroidov postavljajo temelje za nove biotehnološke aplikacije, ki bodo pomembno prispevale k razvoju izboljšanih pridelkov, boljši odpornosti rastlin na bolezni in novim metodam nadzora nad škodljivci.

Ključne besede: viroid, ELVd, krožna RNA, transport RNA, ribocimi, VdIGS biotehnologija

VIROIDS AS AN INNOVATIVE BIOTECHNOLOGICAL TOOL: A BRIEF OVERVIEW AND EARLY PROSPECTS

Abstract

Viroids, the smallest plant pathogens, are primarily known in hop growing for the economic damage caused by hop latent viroid (HSVd) and citrus bark cracking viroid (CBCVd). In addition to causing serious plant diseases, viroids have significantly influenced the development of numerous biotechnological methods and tools that are still widely used in biotechnology today. This review summarizes the latest research that innovatively exploits viroids for the development of

¹ Dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (BF), Oddelek za agronomijo, e-naslov: helena.volk@bf.uni-lj.si

² Dr., BF, e-naslov: jerne.jakse@bf.uni-lj.si

biotechnological methods: i) for the production of circular RNA molecules and their application in pest control; ii) as a tool for RNA transport to express proteins in plant organelles; iii) as ribozymes, which enable the degradation of targeted RNA sequences in plants; iv) for predicting symptom severity and preventing the spread of highly symptomatic viroid variants; and v) for gene silencing through viroid-induced gene silencing vectors (VdIGS), which holds potential for broad use in functional gene studies in agriculturally important plants. With these advancements, viroid research is laying the foundation for new biotechnological applications that will contribute significantly to crop improvement, enhanced plant disease resistance, and new methods for pest control.

Key words: viroid, ELVd, circular RNA, RNA transport, ribozymes, VdIGS, biotechnology

1 O VIROIDIH KOT RASTLINSKIH PATOGENIH

Viroidi so najmanjši znani infektivni agensi, ki smo jih do nedavnega opisovali kot izključno rastlinske patogene. Te majhne, enoverižne krožne molekule RNA, velikosti od 246 do 401 nukleotidov, ki ne kodirajo proteinov, uspešno podvajajo svoje genome v celicah gostiteljske rastline. Novejše raziskave, ki so se oprle na moderne tehnike sekvenciranja naslednje generacije in moč bioinformatike nakazujejo na do nedavnega še nepoznano širino njihovih gostiteljev. Dokazali so, da se viroidi oz. viroidom podobne krožne RNA molekule nahajajo tudi v gostiteljih izven rastlinskega kraljestva, npr. pri glivah (Sun in Hadidi, 2022; Dong in sod. 2023; Forgia in sod., 2023), mnogih bakterijah in enoceličnih evkariontih (Lee in sod., 2023) ter celo pri bakterijah, ki so del humanega mikrobioma (Zheludev in sod., 2024). Na tem mestu lahko izpostavimo tudi že dlje časa poznane viroidom podobne riboziviruse. Mednje npr. spada humani hepatitis delta virus (HDV), ki je genetsko bolj soroden (rastlinskim) viroidom, kot virusom (Palukaitis in sod., 2008).

Navkljub fascinantnosti teh odkritij, se sedaj osredotočimo le na viroide v klasičnem pomenu besede, torej tiste krožne RNA molekule, ki so se sposobne podvajevati znotraj rastlin. To so gole RNA molekule, torej so brez proteinskega plašča, ki je sicer značilen za viruse (Daros, 2016), a so kljub temu zelo obstojne, tako v, kot tudi izven gostitelja (Volk, 2023). Obstojnost jim omogočajo enoverižne in dvoverižne regije, ki tvorijo stabilno lasnično strukturo te patogene RNA molekule (Daros, 2016).

Viroide taksonomsko razvrščamo v dve družini: Pospiviroidae in Avsunviroidae. Družina Pospiviroidae, kamor sodijo rodovi Pospiviroid, Hostuviroid, Cocadviroid, Apscaviroid in Coleviroid, vključuje viroide, ki se razmnožujejo v jedru rastlinskih celic po asimetričnem načinu in imajo značilno konservativno centralno regijo ter paličasto strukturo. Viroidi iz družine Avsunviroidae, ki vključuje rodove Avsunviroid, Pelamoviroid in Elaviroid, se razmnožujejo v kloroplastih po simetrični metodi in imajo razvejano strukturo (Hammond in Owens, 2006).

Za slovensko hmeljarstvo so pomembni predvsem trije viroidi iz družine Pospiviroidae: hmeljev latentni viroid (HLVd, angl. hop latent viroid) (Puchta in sod.,

1988), viroid zakrnelosti hmelja (HSVd, angl. hop stunt viroid) (Sasaki in Shikata, 1977; Radišek in sod., 2022) in viroid razpokanosti skorje agrumov (CBCVd, angl. citrus bark cracking viroid) (Jakše in sod., 2015). Slednja, HSVd in CBCVd, pri hmelju povzročata resne bolezenske simptome in hudo gospodarsko škodo, kar zahteva natančno spremljanje in ustrezne ukrepe za preprečevanje širjenja okužb. Predvidene sekundarne strukture za Slovenijo pomembnih viroidov so prikazane na spodnji sliki (slika 1).

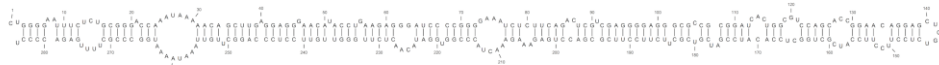
HLVd NC_003611



HSVd NC_001351



CBCVd KM211546.1



Slika 1: Predvidene sekundarne strukture viroidov HLVd (GeneBank NC_003611), HSVd (GeneBank NC_001351) in CBCVd (GenBank KM211546.1). Pripravljene so bile z orodjem "Predict Secondary Structure", ki je del CLC Genomics Workbench.

2 ZGODOVINSKI VPLIV RAZISKAV VIROIDOV NA RAZVOJ SODOBNIH BIOTEHNOLOŠKIH METOD IN SPOZNANJ

Od odkritja prvega viroida, viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd), leta 1971 (Diener, 1971) do danes, ko jim poznamo že 44 (Ma in sod., 2023), je bilo na področju raziskav viroidov objavljenih veliko publikacij. Samo v bazi PubMed jih lahko naštejemo preko 1400!

Nekatere izmed teh raziskav so neposredno vplivale na razvoj biotehnoloških metod in orodij, ki jih v biotehnologiji uporabljamo še danes. Tako so za potrebe strukturnih študij viroidov razvili metodo njihove izolacije s silicijevimi delci (Colpan in sod., 1983), ki so jo kasneje nadgradili in uporabili za izolacijo superzvite plazmidne DNA in danes predstavlja temelj delovanja komercialnih kompletov za izolacijo plazmidov (Steger in Riesner, 2018; Wang in sod., 2020). Poleg napredka v tehnikah čiščenja nukleinskih kislin je strukturna analiza viroidov v istem obdobju privedla do spoznanja o obstoju suboptimalnih struktur pri katerih določeni nukleotidni pari niso ustrezali strukturi z minimalno prosto energijo (Siger in sod., 1984). Ta koncept je postal ključna komponenta v računalniških programih za in silico napovedovanje sekundarnih struktur RNA, kar je bistveno povečalo zmogljivost in natančnost teh analiz (Wang in sod., 2020).

Posredno so raziskave viroidov vplivale tudi na razumevanje funkcije krožnih RNA molekul in njihovega potenciala za uravnavanje genskega izražanja (Wilusz, 2018), vplivale so tudi na razumevanje delovanja prionov in podprle hipoteze evolucijske teorije, ki povezujejo stopnjo mutacij z velikostjo genoma (Steger in Riesner, 2018). Raziskave viroidov so pomembno prispevale tudi k razvoju številnih najnovejših

raziskovalnih področij kot sta epigenetika in postranslacijsko utišanje genov (Wang in sod., 2020). V naslednjih poglavjih so opisana nova odkritja na področju raziskav viroidov, ki, kljub temu, da so viroidi najmanjše entitete življenja, prinašajo obetavna biotehnološka orodja prihodnosti in bodo lahko neposredno pripomogla k iskanju odgovorov na temeljna biološka vprašanja.

3 VIROIDI KOT INOVATIVNO BIOTEHNOLOŠKO ORODJE PRIHODNOSTI

Viroidi, najmanjši znani infektivni agensi, so v zadnjih letih pritegnili veliko pozornosti, ne samo zaradi njihove sposobnosti povzročanja bolezni pri rastlinah, temveč tudi zaradi izjemnega potenciala v biotehnologiji. Kot je prikazano v spodnji preglednici (preglednica 1), so različne viroide, še posebej viroid latentnosti jajčevca (ELVd, angl. eggplant latent viroid), uporabili za številne in predvsem zelo različne namene. V naslednjih poglavjih bomo te inovativne biotehnološke aplikacije viroidov podrobneje obravnavali. Predstavili bomo kako lahko viroide uporabimo za proizvodnjo krožnih RNA molekul, njihovo vlogo kot orodje za prenos RNA v celične organele, potencial viroidov kot ribocimov ter njihovo sposobnost utišanja genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (VdIGS). Poleg tega bomo nakazali, kako lahko viroidne različice uporabimo za preprečevanje širjenja bolj simptomatskih viroidnih sevov, kar dodatno poudarja njihovo vsestranskost in pomembnost tako v bazičnih raziskavah kot tudi njihov aplikativni potencial za uporabo v kmetijstvu.

Preglednica 1: Seznam viroidov, ki so jih do sedaj uporabili kot biotehnološko orodje

Viroid	Namen	Referenca
ELVd	Utišanje genov	Marquez-Molins in sod., 2022
ELVd	Proizvodnja krožnih RNA molekul	Daròs in sod., 2018; Consejo Superior De Investigaciones Científicas & Universitat Politècnica De València, 2015
ELVd	Vnos mRNA v kloroplaste	Gómez in Pallás 2010, 2012a, 2012b
ELVd	Ribocimska aktivnost	Carbonell in sod., 2006
PLMVd	Ribocimska aktivnost	Carbonell in sod., 2011
PSTVd	Napovedovanje simptomov	Sun in Matsushita, 2024

3.1 Uporaba viroidov za proizvodnjo krožnih RNA molekul

Daròs in sod. so razvili metodo proizvodnje rekombinantnih RNA z uporabo viroida ELVd, kot latentnega agensa jajčevca. V svojih raziskavah so preučevali interakcijo med viroidom ELVd in tRNA ligazo iz jajčevca, pri čemer so obe molekuli sočasno izrazili v bakteriji *Escherichia coli*. Opazili so, da so se ELVd RNA v transformiranih bakterijah kopičile v višjih količinah od ribosomalne RNA bakterije *E. coli*, hkrati pa so ugotovili, da do kopičenja ni prišlo na račun pomnoževanja viroida v celicah. Na

podlagi te ugotovitve so (Daròs in sod. 2018; Cordero in sod., 2018; Ortolá in Daròs, 2022) razvili in patentirali (Consejo Superior De Investigaciones Científicas & Universitat Politècnica De València, 2015) sistem za proizvodnjo rekombinantnih RNA v impresivnih koncentracijah: dosežejo lahko do več deset miligramov rekombinantne RNA na liter bakterijske kulture. Ta sistem so nato uporabili za proizvodnjo RNA, kot so: Spinach - RNA aptamer, ki posnema fluorescentne proteine; lasnične RNA, ki učinkovito inducirajo utišanje RNA; prekursorje CRISPR RNA (crRNA), ki usmerjajo nukleazo Cpf1 za urejanje genomov. V naslednjih letih so metodo razvijali naprej in usmerili v še bolj aplikativno smer ter pokazali, da lahko tako proizvedene dsRNA molekule preko mehanizma RNA interference delujejo insekticidno. Konkretnije, s pomočjo viroida proizvedeno RNA so v laboratorijih uspešno zatirali ličinke koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Ortolá in sod., 2020) in sadne muhe (*Ceratitis capitata*) (Ortolá in sod., 2023). V novejši pregledni objavi sta Ortolá in Daròs (2024) navedla, da lahko s proizvodnjo RNA molekul preko ELVd ali s sorodnimi sistemi ekspresije RNA v bakterijah dosežejo ceno 1 \$ na gram proizvedene RNA, ter ob tem izpostavila ekonomsko upravičenost uporabe RNAi za zatiranje škodljivcev v kmetijstvu.

3.2 Viroidi kot orodje za transport RNA

ELVd spada v družino viroidov Avsunviroidae za katere je značilno, da se razmnožujejo v kloroplastih svojega gostitelja (Hammond in Owens, 2006). Gómez in Pallás (2010, 2012a, 2012b) sta podrobneje preučila znotrajcelično lokalizacijo in znotrajcelični transport viroida ELVd in pokazala sta, da ob vstopu v citoplazmo viroid najprej potuje v celično jedro, nato pa v kloroplaste. Z manipulacijo sekvenčnega zaporedja ELVd sta mu uspela pripojiti mRNA molekulo proteina GFP in ga izraziti v kloroplastih tobaka (*Nicotiana benthamiana*). Njihova odkritja je med drugimi izpostavil tudi Daròs (2016), ki je prepoznal potencial ELVd za transport RNA v jedra in kloroplaste ter s tem tudi proizvodnjo zelenih proteinov v rastlinskih organelih.

3.3 Viroidi kot ribocimi

Za viroide iz družine Avsunviroidae, torej tudi za ELVd, je značilna ribocimska aktivnost, ki se kaže v njihovi sposobnosti samo-cepljenja (Fadda in sod., 2003). Ta lastnost se še bolj manifestira, če je ELVd minimalno sekvenčno spremenjen (mesto AUA je nadomeščeno z AUC ali GUC) (Carbonell in sod., 2006). Z ribocimi, ki izvirajo iz ELVd in PLMVd (Peach latent mosaic viroid, prav tako uvrščen v družino Avsunviroidae) so uspešno cepili viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd) na krajše RNA fragmente tako in vitro, kot tudi in vivo v modelni rastlini tobaka (*N. benthamiana*) (Carbonell in sod., 2011).

3.4 Uporaba manj patogenih variant viroidov za preprečevanje širjenja visokosimptomatskih variant

Že dlje časa je na primerih viroidov PSTVd, CChMVd (angl. chrysanthemum chlorotic mottle viroid) in PLMVd (angl. peach latent mosaic viroid) znano dejstvo,

da lahko okužba z manj patogeno varianto gostiteljski rastlini nudi zaščito pred bolj patogeno varianto istega viroida (Wu in Bisaro, 2024).

Nedavno sta Sun in Matsushita (2024) s pomočjo strojnega učenja z viroidom PSTVd razvila orodje s katerim lahko iz sekvenčnega zaporedja kateregakoli viroida napovejo resnost simptomov, ki jih bo povzročil pri neki gostiteljski rastlini. Poleg sekvenčnega zaporedja viroida, pa je potrebno upoštevati, da na njegovo infektivnost nezanemarljivo vpliva tudi njegova sekundarna struktura. Nie in sod. (2024) so s pomočjo in vitro proizvedenih transkriptov PSTVd preučili vpliv sekundarnih struktur na njegovo infektivnost. Ugotovili so da je, poleg pravilnega sekvenčnega zaporedja, tudi oblikovanje pravilne paličaste oblike PSTVd ključno za uspešno infekcijo modelne rastline *N. benthamiana*.

Predpostavljamo, da bi lahko strojno učenje uporabili za napovedovanje zaporedja viroida, ki v določeni rastlini, na primer pri hmelju, povzroča manj patogene simptome – kot je manj patogena varianta CBCVd. Pripravili bi in vitro transkripte, pri čemer bi upoštevali tudi, da se nastali transkripti oblikujejo v čim bolj naravno sekundarno strukturo. Eksperimentalno bi določili tako viroidno varianto, ki ne bi povzročala vidnih simptomov, vendar se še vedno učinkovito podvaja v rastlini. S tako izbrano varianto viroida bi poskusili pri gostiteljski rastlini (npr. hmelju) inducirati imunost na divji tip viroida.

3.5 Utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev

Utišanje genov s pomočjo virusnih ekspresijskih vektorjev (VIGS, angl. virus induced gene silencing) je metoda, ki je bistveno prispevala k funkcionalnim študijam genov pri številnih kmetijsko pomembnih rastlinah (Wang in sod. 2022). Ta tehnika temelji na manipulaciji virusnih genomov z deli DNA iz gostiteljskih genov, kar sproži utišanje komplementarnih genov gostiteljske rastline. Slabost te metode je, da virusni genomi vsebujejo zapise za več proteinov, ki lahko z vmešavanjem v endogene celične mehanizme motijo homeostazo rastline. Ta neželeni učinek omejuje funkcionalnost VIGS in spodbuja raziskovalce k iskanju alternativnih metod, ki bi bile manj invazivne (Marquez-Molins in sod., 2022).

V iskanju učinkovitejše metode utišanja genov so leta 2022 Marquez-Molins in sod. razvili novo tehniko utišanja genov, ki temelji na viroidih – najmanjših znanih avtonomno infektivnih nukleinskih kislinah, ki ne kodirajo proteinov. Viroidi zato s svojo majhnostjo in preprostostjo predstavljajo obetavno alternativo virusnim vektorjem.

V okviru te raziskave so Marquez-Molins in sod. (2022) uporabili genom viroida ELVd, ki je asimptomatičen viroid jajčevcev. Z namenom induciranja ciljnega utišanja specifičnih tarčnih genov v jajčevcu so v ELVd vstavili različne segmente RNA, dolge od 21 do 42 nukleotidov. Rezultati so pokazali, da lahko viroidi prenesejo tudi večje segmente zaporedij (42 nukleotidov), vendar je za stabilnost viroidnega genoma ključno ohranjanje njegove sekundarne strukture. Pokazali so, da so tako modificirane ELVd molekule sposobne povzročiti sistemsko okužbo in učinkovito utišati tarčne gene v jajčevcu, med drugim tudi gen PST, indikatorski gen za VIGS, ki ob utišanju povzroči značilen fenotip razbarvanja. Navdih za razvoj tega

pristopa so črpali iz zasnove umetnih mikroRNA (amiRNA, angl. artificial miRNA), kar je omogočilo razvoj enostavnega in standardiziranega postopka za vstavljanje stabilnih sekvenc v genom ELVd, ki so sposobne utišati specifične tarčne gene. Metodo so po vzoru VIGS poimenovali VdIGS: utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (angl. viroid induced gene silencing).

S to raziskavo se odpira novo poglavje v področju utišanja genov, ki temelji na viroidnih ekspresijskih vektorjih. Ortolá in Daròs v pregledni objavi iz leta 2023 priznavata VdIGS kot ključno orodje za razumevanje funkcij genov pri jajčevcu. Da je to področje resnično na začetku razvoja, priča tudi dejstvo, da do nastanka te pregledne objave v nam dostopni strokovni literaturi še nismo zasledili podobnih raziskav, ki bi temeljile na uporabi VdIGS za manipulacijo rastlin ali drugih organizmov. Menimo, da se lahko VdIGS v prihodnjih letih razvije v inovativno biotehnoško orodje za preučevanje funkcije genov in manipulacijo genov pri rastlinah in pripomore k izboljšanju našega razumevanja delovanja rastlin na nivoju celičnih in molekularnih mehanizmov. Potencial te metode sega daleč onkraj trenutnih aplikacij, saj lahko v prihodnosti prispeva k razvoju novih pridelkov z izboljšanimi lastnostmi, odpornostjo na bolezni ter prilagoditvijo na različne okoljske pogoje.

4 ZAKLJUČEK

Raziskave viroidov, ki so se začele z odkritjem viroida vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd) leta 1971, so prinesle izjemen napredek na področju raziskav viroidov in biotehnologije. Skozi desetletja so raziskave viroidov vplivale na razumevanje molekularnih mehanizmov in spodbudile razvoj biotehnoloških orodij, kot so izolacija nukleinskih kislin, napovedovanje sekundarnih struktur RNA in raziskovanje krožnih RNA molekul. Poleg tega današnje, sodobne raziskave viroidov prispevajo k razvoju inovativnih in modernih biotehnoloških pristopov, kot je proizvodnja rekombinantnih RNA in utišanje genov s pomočjo viroidnih ekspresijskih vektorjev (VdIGS).

Razvoj teh metod je šele na začetku, vendar že obljublja prebojna odkritja, ki bodo pripomogla k boljšemu razumevanju celičnih in molekularnih procesov ter prinesla pomembne prednosti tudi za prihodnje aplikativne raziskave in uporabo v kmetijstvu, biotehnologiji ter pri izboljšanju pridelkov in odpornosti na bolezni.

5 VIRI

- Beltrán, O. B., Urbaneja, A., Eiras, M., Pérez-Hedo, M., & Daròs, J. A. (2023). [RNAi-mediated silencing of Mediterranean fruit fly \(*Ceratitis capitata*\) endogenous genes using orally-supplied double-stranded RNAs produced in *Escherichia coli*](https://doi.org/10.1002/ps.7839). Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.7839>
- Carbonell, A., De la Peña, M., Flores, R., & Gago, S. (2006). [Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: Differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads](https://doi.org/10.1093/nar/gkl717). Nucleic Acids Research, 34(19), 5613-5622. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl717>

- Carbonell, A., Flores, R., & Gago, S. (2011). [Trans-cleaving hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs: In vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA](#). *Nucleic Acids Research*, 39(6), 2432-2444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1051>
- Colpan, M., Schumacher, J., Brüggemann, W., Sanger, H. L., & Riesner, D. (1983). Large-scale purification of viroid RNA using Cs2SO4 gradient centrifugation and high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 131, 257–265.
- Consejo Superior De Investigaciones Científicas, & Universitat Politècnica De València. (2015). [Recombinant RNA production \(Patent No. WO2015177100A1\)](#). World Intellectual Property Organization. <https://patents.google.com/patent/WO2015177100A1/en>
- Cordero, T., Aragonés, V., & Darós, J. A. (2018). [Large-scale production of recombinant RNAs on a circular scaffold using a viroid-derived system in Escherichia coli](#). *Journal of Visualized Experiments* (141), e58472. <https://doi.org/10.3791/58472>
- Darós, J. A. (2016). [Eggplant latent viroid: A friendly experimental system in the family Avsunviroidae](#). *Molecular Plant Pathology*, 17(8), 1170-1177. <https://doi.org/10.1111/mpp.12358>
- Darós, J. A. (2016). [Viroids: Small noncoding infectious RNAs with the remarkable ability of autonomous replication](#). In A. Wang & X. Zhou (Eds.), *Current research topics in plant virology* (pp. 295–322). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2_13
- Darós, J. A., Aragonés, V., & Cordero, T. (2018). [A viroid-derived system to produce large amounts of recombinant RNA in Escherichia coli](#). *Scientific Reports*, 8(1), 1904. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20314-3>
- Diener, T. O. (1971). [Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA](#). *Virology*, 45(2), 11. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)
- Dong, K., Xu, C., Kotta-Loizou, I., Jiang, J., Lv, R., Kong, L., Li, S., Hong, N., Wang, G., Coutts, R. H. A., & Xu, W. (2023). [Novel viroid-like RNAs naturally infect a filamentous fungus](#). *Advanced Science*, 10(3), e2204308. <https://doi.org/10.1002/adv.202204308>
- Forgia, M., Navarro, B., Daghighi, S., Cervera, A., Gisel, A., Perotto, S., Aghayeva, D. N., Akinyuwa, M. F., Gobbi, E., Zheludev, I. N., Edgar, R. C., Chikhi, R., Turina, M., Babaian, A., Di Serio, F., & de la Peña, M. (2023). [Hybrids of RNA viruses and viroid-like elements replicate in fungi](#). *Nature Communications*, 14(1), 2591. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38301-2>
- Gómez, G., & Pallás, V. (2010). [Noncoding RNA mediated traffic of foreign mRNA into chloroplasts reveals a novel signaling mechanism in plants](#). *PLoS One*, 5(8), e12269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012269>
- Gómez, G., & Pallás, V. (2012a). [A pathogenic noncoding RNA that replicates and accumulates in chloroplasts traffics to this organelle through a nuclear-dependent step](#). *Plant Signaling & Behavior*, 7(7), 882-884. <https://doi.org/10.4161/psb.20463>
- Gómez, G., & Pallás, V. (2012b). [Studies on subcellular compartmentalization of plant pathogenic noncoding RNAs give new insights into the intracellular RNA-traffic mechanisms](#). *Plant Physiology*, 159(2), 558-564. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195214>
- Hammond, R. W., & Owens, R. A. (2006). [Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops](#). *APSnet Features*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>
- Jakšec, J., Radišek, S., Pokorn, T., Matousek, J., & Javornik, B. (2015). [Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid \(CBCVd\) as a highly aggressive pathogen on hop](#). *Plant Pathology*, 64(1), 831–842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>
- Ma, J., Dissanayaka Mudiyansele, S. D., Hao, J., & Wang, Y. (2023). [Cellular roadmaps of viroid infection](#). *Trends in Microbiology*, 31(11), 1179-1191. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.05.014>
- Nie, Y., Zhang, Y., & Wu, J. (2023). [The secondary structure of potato spindle tuber viroid determines its infectivity in Nicotiana benthamiana](#). *Viruses*, 15(12), 2307. <https://doi.org/10.3390/v15122307>

- Ortolá, B., & Daròs, J. A. (2022). [Production of recombinant RNA in Escherichia coli using eggplant latent viroid as a scaffold](#). In A. L. N. Rao, I. Lavagi-Craddock, & G. Vidalakis (Eds.), *Viroids* (pp. 291-305). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1464-8_25
- Ortolá, B., Cordero, T., Hu, X., & Daròs, J. A. (2021). [Intron-assisted, viroid-based production of insecticidal circular double-stranded RNA in Escherichia coli](#). *RNA Biology*, 18(11), 1846–1857. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1872962>
- Palukaitis, P., Rezaian, A., & García-Arenal, F. (2008). [Satellite nucleic acids and viruses](#). In B. W. J. Mahy & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of virology* (3rd ed., pp. 526-535). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00500-8>
- Puchta, H., Ramm, K., & Sanger, H. L. (1988). [The molecular structure of hop latent viroid \(HLV\), a new viroid occurring worldwide in hops](#). *Nucleic Acids Research*, 16(10), 4197–4216. <https://doi.org/10.1093/nar/16.10.4197>
- Radišek, S., Majer, A., Jakše, J., Javornik, B., & Matousek, J. (2012). [First report of hop stunt viroid infecting hop in Slovenia](#). *Plant Disease*, 96(4), 592. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0640-PDN>
- Sasaki, M., & Shikata, E. (1977). [Studies on the host range of hop stunt disease in Japan](#). *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*, 53(3), 103–108. <https://doi.org/10.2183/pjab.53.103>
- Steger, G., & Riesner, D. (2018). [Viroid research and its significance for RNA technology and basic biochemistry](#). *Nucleic Acids Research*, 46(20), 10563-10576. <https://doi.org/10.1093/nar/gky903>
- Sun, J., & Matsushita, Y. (2024). [Predicting symptom severity in PSTVd-infected tomato plants using the PSTVd genome sequence](#). *Molecular Plant Pathology*, 25(7), e13469. <https://doi.org/10.1111/mpp.13469>
- Sun, L., & Hadidi, A. (2022). [Mycoviroids: Fungi as hosts and vectors of viroids](#). *Cells*, 11(8), 1335. <https://doi.org/10.3390/cells11081335>
- Volk, H. (2023). Ocena stabilnosti in dekontaminacije hmeljevih viroidov v laboratorijskih pogojih. *Hmeljarski bilten*, 30, 40-53.
- Wilusz, J. E. (2018). [A 360 degrees view of circular RNAs: From biogenesis to functions](#). *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(4), e1478. <https://doi.org/10.1002/wrna.1478>
- Wu, J., & Bisaro, D. M. (2024). [Potato spindle tuber viroid \(PSTVd\) loop 27 mutants promote cell-to-cell movement and phloem unloading of the wild type: Insights into RNA-based viroid interactions](#). *Virology*, 597, 110137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110137>
- Zheludev, I. N., Edgar, R. C., Lopez-Galiano, M. J., de la Peña, M., Babaian, A., Bhatt, A. S., & Fire, A. Z. (2024). [Viroid-like colonists of human microbiomes](#). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.01.20.576352>