

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
RESUMEN	V
SUMMARY	VII
RESUM.....	IX
INTRODUCCIÓN	3
1. Los viroides.....	3
1.1. Características generales.....	3
1.1.1. Los viroides y su descubrimiento.....	3
1.1.2. Clasificación y estructura.....	3
1.1.3. Biología.....	7
1.1.3.1. Gama de huéspedes.....	7
1.1.3.2. Síntomas y alteraciones citológicas y bioquímicas.....	8
1.1.3.3. Protección cruzada	9
1.1.3.4. Movimiento	10
1.1.3.4.1. Movimiento intracelular.....	10
1.1.3.4.2. Movimiento intercelular y a larga distancia.....	10
1.1.4. Difusión e impacto económico de las enfermedades viroidales	10
1.1.5. Localización subcelular	11
1.1.6. Replicación.....	12
1.1.6.1. Mecanismo de círculo rodante y sus variantes.....	12
1.1.6.2. Transcripción, corte y ligación del RNA	14
1.1.6.2.1. Transcripción.....	14
1.1.6.2.2. Corte	16
1.1.6.2.3. Ligación.....	18
1.2. Viroides objeto de estudio.	19
1.2.1. El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd).	19
1.2.2. El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd).....	21
1.2.3. El viroide del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd).	23
1.2.4. El viroide latente de la berenjena (ELVd).....	24
2. Las ribozimas.....	26
2.1. Las ribozimas y su descubrimiento en los RNAs viroidales.....	26
2.2. Las ribozimas de cabeza de martillo	27
2.2.1. Variantes naturales con actividad en <i>cis</i>	27
2.2.1.1. Características generales.....	27
2.2.1.2. El papel clave de los bucles periféricos en la actividad catalítica	29
2.2.1.3. Estructuras de cabeza de martillo presentes en los RNAs viroidales ...	31
2.2.2. Ribozimas de cabeza de martillo artificiales con actividad en <i>trans</i>	33
2.2.2.1. Primeros diseños <i>in vitro</i>	33
2.2.2.2. Aplicaciones para el control de enfermedades producidas por virus de plantas	34
2.2.2.3. Una nueva generación de ribozimas más eficientes	36

2.2.2.4. Otros requisitos que idealmente deberían cumplir las ribozimas de cabeza de martillo como herramienta biotecnológica.....	38
3. El silenciamiento génico mediado por RNA	42
3.1. Aspectos generales	42
3.1.1. Indicios iniciales de su existencia.....	42
3.1.2. Funciones biológicas y etapas clave.	42
3.2. El silenciamiento génico mediado por RNA en plantas	44
3.2.1. sRNAs y enzimas.	44
3.2.2. Rutas.....	46
3.2.3. Aplicaciones del silenciamiento génico mediado por RNA para generar resistencia frente a virus	47
3.3. Los viroides y el silenciamiento génico mediado por RNA.....	49
3.3.1. Distintos sRNAs de origen viroidal se acumulan en infecciones naturales	50
3.3.2. Los vd-sRNAs.....	50
3.3.2.1. Características y biogénesis	50
3.3.2.2. Función de los vd-sRNAs	51
3.3.2.2.1. Regulación del título viroidal.....	51
3.3.2.2.2. Papel de los vd-sRNAs en la patogénesis.....	53
3.3.3. Los viroides y la supresión del PTGS.....	55
4. Control de enfermedades de plantas causadas por viroides.	56
OBJETIVOS.....	61
CAPÍTULO I: <i>Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of AUC in most natural hammerheads.</i>	65
CAPÍTULO II: <i>In vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA of trans-acting hammerhead ribozymes with tertiary stabilizing motifs.</i>	91
CAPÍTULO III: <i>Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families.</i>	117
DISCUSIÓN.....	145
1. Resistencia a viroides: antecedentes..	145
2. Las ribozimas de cabeza de martillo de polaridad (+) del ELVd: estudios previos en <i>cis</i>	146
2.1. Características especiales de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd.....	146
2.2. Las ribozimas de polaridad (+) del ELVd con trinucleótidos GUC y AUC precediendo al sitio de autocorte son las catalíticamente más activas en condiciones postranscripcionales.....	147
2.3. El autocorte <i>in vivo</i> de las ribozimas de polaridad (+) del ELVd debe ocurrir durante la síntesis del RNA viroidal.....	148
3. Resistencia al PSTVd inducida por ribozimas de cabeza de martillo con motivos de estabilización terciaria.....	150
3.1. Ribozimas con distinto formato <i>trans</i> son activas <i>in vitro</i> a baja concentración de Mg ²⁺ frente a un RNA del PSTVd de polaridad (-) altamente estructurado..	151

3.2. La ribozima extendida derivada del PLMVd es activa <i>in vivo</i> y retrasa la infección del PSTVd.....	154
4. Resistencia a viroides mediante RNAs interferentes.....	155
4.1. ds- e ihpRNAs específicos retrasan o bloquean las infecciones causadas por ciertos viroides.....	155
4.2. Los RNAs viroidales son sustratos de RISC en ciertas condiciones	157
5. Ribozimas de cabeza de martillo <i>versus</i> RNAs interferentes.	160
CONCLUSIONES.	165
BIBLIOGRAFÍA.	169
AGRADECIMIENTOS.	191