RESUMEN

El virus del arabesco del *Pelargonium* (PLPV) es uno de los agentes virales más frecuentes en geranio. Se trata de un virus icosaédrico, con un genoma monopartito de RNA de simple cadena y de polaridad positiva que carece de estructura cap en su extremo 5´ y de cola poli(A) en su extremo 3´. Su RNA genómico (gRNA) contiene 5 genes que codifican dos proteínas implicadas en replicación, dos proteínas implicadas en movimiento, (MP1 y MP2), y una proteína de cubierta (CP) que funciona además como supresor del silenciamiento por RNA. Las dos primeras se traducen a partir del gRNA y las tres restantes lo hacen a partir de un único RNA subgenómico (sgRNA) que el virus produce en el curso de la infección. El PLPV pertenece a la familia *Tombusviridae* y presenta características peculiares como son: a) la generación de un solo sgRNA estructural y funcionalmente tricistrónico, b) la presencia de un codón de iniciación no canónico (CUG o GUG) en el gen de la MP2, c) la ausencia de codones AUG en cualquier pauta de lectura entre los codones de inicio AUG de los genes MP1 y CP, y d) la agrupación filogenética en un clado separado de otros miembros de la familia *Tombusviridae*.

En esta tesis se ha pretendido, por una parte, profundizar en el estudio de las estrategias de regulación de la expresión

génica del PLPV y, por otra, recabar información sobre los procesos de degradación a los que se encuentra sometido su genoma, particularmente sobre aquellos relacionados con el mecanismo de silenciamiento por RNA.

El primer objetivo abordado en este trabajo ha sido determinar el mecanismo y los elementos del RNA viral implicados en la generación del sgRNA del PLPV. Se ha identificado una interacción entre segmentos alejados del gRNA de polaridad positiva, que actúa en *cis* y que media la producción de la cadena negativa del sgRNA, un tipo de molécula fácilmente detectable en tejido infectado. Estos resultados junto con la posibilidad de desacoplar la síntesis de cadenas negativas y positivas del sgRNA y con la observación de similitud de secuencia entre el extremo 5´ del gRNA y del sgRNA (con una función promotora en las cadenas complementarias), sugieren que el PLPV sigue un modelo de terminación prematura para la formación de su único sgRNA.

El segundo objetivo de este trabajo ha sido identificar los elementos del genoma viral que están implicados en su traducción a través de un mecanismo independiente de cap. Mediante trasfección de protoplastos de *N. benthamiana* con construcciones delatoras, se ha corroborado la presencia de un estimulador traduccional (CITE) tanto en el contexto del gRNA

como del sgRNA. Adicionalmente, se ha constatado que este elemento establece una interacción RNA-RNA a larga distancia con la región 5´ del RNA correspondiente que es esencial para su actividad. Asimismo, se han obtenido datos que apoyan la relevancia del CITE durante el ciclo infeccioso del virus. Por último, para intentar recabar información sobre el papel del PLPV como inductor y diana de mecanismos de silenciamiento por RNA disparados por la planta como defensa frente al virus, se han caracterizado los pequeños RNAs virales (vsRNAs) presentes en plantas de *N. benthamiana* infectadas. Mediante secuenciación masiva, análisis computacionales e hibridación molecular, se ha podido determinar que: a) los vsRNAs del PLPV se acumulan en proporciones extraordinariamente elevadas en tejido infectado, b) los vsRNAs de 21 y 22 nt son los mayoritarios, c) los vsRNAs de polaridad positiva y negativa están en proporciones similares, y d) existe variabilidad en el nucleótido 5´-proximal de los vsRNAs. Estos resultados han permitido obtener pistas acerca de las moléculas virales que deben actuar cómo sustratos para la formación de los vsRNAs y, también, acerca de los componentes de la maquinaria de silenciamiento del huésped que deben participar en la respuesta del mismo frente al virus.