

RESUM

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

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

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

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

gels de poliacrilamida natus. Els resultats *in vitro* per a l'ELVd (-) RNA són menys consistents amb les dades obtingudes *in silico* i *in vivo*.

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