



Relación entre el silenciamiento de RNA y la  
patogénesis inducida por un viroide con replicación  
nuclear

Memoria presentada por  
GERMÁN EUGENIO MARTÍNEZ ARIAS

para optar al grado de  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Directores  
Profesor VICENTE PALLÁS BENET  
Doctor GUSTAVO GERMÁN GÓMEZ

Julio 2011





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Don Vicente Pallás Benet, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia.

Don Gustavo Germán Gómez, Doctor en Genética, Investigador Postdoctoral en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia.

CERTIFICAN: que Don Germán Eugenio Martínez Arias, Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con título “Relación entre el silenciamiento de RNA y la patogénesis inducida por un viroide con replicación nuclear” presenta para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que así conste y produzca los efectos oportunos donde proceda, firman el presente certificado en Valencia, a de Julio de 2011.

Firmado: Vicente Pallás Benet

Firmado: Gustavo Germán Gómez

[ibmcp@ibmcp.upv.es](mailto:ibmcp@ibmcp.upv.es)

CPI- EDIF. 8E  
INGENIERO FAUSTO ELÍO, S/N  
46011-VALENCIA  
TEL : 96 387 78 56  
FAX : 96 387 78 59



## *Agradecimientos*

Se atribuye a Cervantes el refrán: “de bien nacido es ser agradecido”. Como pretendo ser un bien nacido, me siento en la obligación de agradecer la participación en esta tesis doctoral de un gran número (relativo) de personas.

En primer lugar tengo que, y quiero, agradecer a Vicente Pallás y a Gustavo Gómez el darme la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en su laboratorio. La tesis no es un camino fácil, ni muchas veces es el trabajo con el mejor horario o sueldo, pero es un camino por cuyo tránsito creo que he aprendido algunas cosas y gran parte de la culpa la tienen ellos.

Una parte de estos agradecimientos tan importante como para Vicente y Gustavo va para mis compañeros de laboratorio. Desde los postdoctorales Fede, Jesus, Toni y Mari Carmen, pasando por los predoctorales Ainhoa (ya post), Ana y Marta, hasta los técnicos de laboratorio Lorena Corachan y Lorena Latorre, todos han sido una parte muy importante de este trabajo. Hemos pasado más buenos que malos momentos juntos, (además de muchas horas... la mayor parte de estos 5 años) dentro y fuera del laboratorio. Voy a echar de menos todos esos momentos en cuanto cruce el charco.

No menos importante es la participación en esta tesis doctoral de Cesar Llave y de Livia Donaire. Gracias a ellos se han podido llevar a cabo los capítulos III, IV y V de la presente tesis. Solo esto sirve como ejemplo de la importante colaboración que hemos mantenido. Pero seguramente, estos capítulos son la parte menos importante de la colaboración dado que conocerles, valorar la tremenda humildad de los dos y poder ampliar mi mente como proyecto de investigador en su laboratorio ha sido una experiencia invaluable. La estancia en su laboratorio del CIB en Madrid ha sido una de los mejores momentos de esta tesis. Además al resto de integrantes del grupo: Fran, Fátima, Alberto, Meme, Anita, Gema y Lluçia, así como a Paco Tenllado, les tengo un gran aprecio por el maravilloso tiempo que pasé con ellos.

La otra gran parte de los agradecimientos va para los “sufridores en silencio”, esto es, mi familia. Sin mis padres que me han enseñado el incalculable valor del esfuerzo y el trabajo y que siempre me han apoyado y animado en este periodo doctoral, estoy seguro de que esta tesis habría sido mucho más costosa de terminar. Mis hermanas Elena y Clara, a las que he visto encauzar sus caminos (al menos educativos) durante este tiempo, son también una parte muy importante de los agradecimientos. Es reconfortante llegar a casa creyéndose uno un investigador (creyendo que le salen rayos de las orejas, como decía Jaime Sabines) y encontrarse con que uno solo es un peatón ... y gracias.

También parte del agradecimiento de ese descenso a lo mundano se lo debo a mis amigos. A Vicente, al cual conozco desde hace 27 años (¿tanto?), a Carol, Javi, Isidro, Eva, Sttef, Fernando, Israel, Daniel y Marco, os debo mucho más de lo que podéis creer (y no solo económicamente).

A medio camino entre los amigos y los compañeros de trabajo se encuentran mis compañeros del IBMCP a los cuales les debo (seguro que también dinero) pero además un gran agradecimiento. En ellos he encontrado además de similares motivaciones, las mismas ganas e ilusión por aprender, la mirada del naufrago como decía Ortega y Gasset: Javi, Ricardo, Jorge, Mari Ángeles y Patricia.

A la gente de los laboratorios de Ricardo Flores: Selma, Emilio, Alberto, Marcos y Sonia; de Santiago Elena: Nico y Jasna y de José Antonio Daros: Jorge y Fernando. A todos ellos, y en especial al propio Ricardo Flores les debo muchos consejos y momentos. Ricardo ha sido un ejemplo para mi personal y científicamente durante todo este tiempo. Me siento muy orgulloso de que además me haya escrito una carta de referencia para mi futuro postdoctoral.

Debo agradecer también a todos mis compañeros de la primera promoción del Master en Biotecnología Celular y Molecular de Plantas: Paz, Bernardo, Ana Cristina, Gaetano, Javi, Carol y Eva. Pasamos un montón de tardes juntos, que he echado de menos en muchos momentos.

A la gente del Centro de Genómica del IVIA con los que empecé esta carrera científica: Paco Legaz, Manolo Talón, Chema Colmenero, Kiko Tadeo, Javier Brumós, Javier Agustí, Fernando Andrés, Miguel Ángel Naranjo y Ángel Boix. Es un placer mantener vuestra amistad durante tanto tiempo e incluso ahora, que la mayoría están lejos de Valencia.

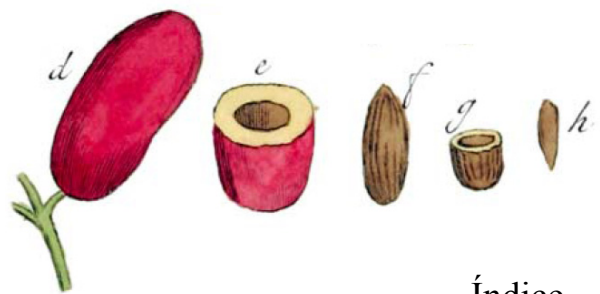
También debo agradecer a Jaime Cebolla, Jaime Prohens y Alejandro Atarés la rapidez con la que se pudo solucionar el problema con respecto a los problemas administrativos previos a la lectura de esta tesis. Así mismo agradezco al personal de administración de la Universidad Politécnica de Valencia, y en especial al jefe de la unidad administrativa de doctorado Miguel Granell León, la rápida solución que dieron a los problemas que había generado mi matrícula.

Estoy seguro de que se me olvida un montón de gente a la que agradecer en esta tesis. Les pido disculpas a todos lo que olvido. No es intencionado, es solo mala memoria.









Índice



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Viroides.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Características generales.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Localización subcelular y replicación de los viroides.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Patogénesis.....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Patogénesis mediada por el RNA viroidal <i>per se</i>	
1.3.2. Patogénesis mediada por silenciamiento de RNA	
1.3.3. El viroide del enanismo del lúpulo (HSVd)	
<b>2. Silenciamiento de RNA.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Características básicas del silenciamiento de RNA en plantas.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 Componentes principales de la maquinaria de silenciamiento.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Dicer-Like	
2.2.2 Argonauta	
2.2.3 RDRs	
<b>2.3. Las distintas rutas del silenciamiento de RNA en plantas.....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Micro RNAs (miRNAs)	
2.3.2 trans-acting siRNAs	
2.3.3 <i>siRNAs</i> asociados a transcritos naturales antisentido (nat-siRNAs)	
2.3.4 siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs)	
<b>2.4. El movimiento sistémico de la señal de silenciamiento de RNA.....</b>	<b>44</b>
<b>3. Interrelación entre patogénesis y silenciamiento de RNA.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. El silenciamiento de RNA y la patogénesis inducida por agentes infecciosos no viroidales.....</b>	<b>47</b>
3.1.1 Acumulación de sRNAs derivados del patógeno	
3.1.2 sRNAs endógenos con expresión alterada por patógenos	
<b>3.2 La relación entre silenciamiento de RNA y la patogénesis inducida por viroides.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Los viroides inducen la acumulación de sRNAs derivados de su genoma	
3.2.2 Características y biogénesis de los vd-sRNAs	

3.2.3 Efecto de los vd-sRNAs sobre las moléculas viroidales

3.2.4 Los vd-sRNAs y su relación con la patogénesis

**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....59**

**CAPÍTULOS.....63**

**Capítulo I:** Analysis of symptoms developed in *Nicotiana benthamiana* plants expressing dimeric forms of *Hop stunt viroid*.....65

**Capítulo II:** Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity.....77

**Capítulo III:** High-throughput sequencing of *Hop stunt viroid*-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem .....105

**Capítulo IV:** High-throughput sequencing, characterization and detection of novel and conserved cucumber miRNAs.....135

**Capítulo V:** miRNA-mediated regulatory networks affected by *Hop stunt viroid* infection and prediction of endogenous targets for viroid-derived sRNAs.....161

**DISCUSIÓN GENERAL.....189**

**CONCLUSIONES.....217**

**BIBLIOGRAFÍA.....221**