

Los viroides son los patógenos con replicación autónoma más simples y sólo se han encontrado de forma natural infectando plantas superiores. Desde que se descubrieron en los años setenta, se ha adquirido un conocimiento considerable sobre su naturaleza y mecanismos de replicación en las plantas huésped. Sin embargo, aún quedan por descubrir muchos aspectos de la biología de los viroides. Por lo tanto, un conocimiento más profundo de la naturaleza y el modo de acción de los viroides han sido los objetivos principales que engloban esta tesis. Para ello, es esencial contar con procedimientos sencillos y eficientes para la obtención de clones de ADNc infecciosos. Se desarrolló un nuevo método eficiente para construir clones de viroides infecciosos y se probó con un viroide de cada familia: El viroide latente de la berenjena (ELVd, *Avsunviroidae*) y el viroide del lúpulo (HSVd, *Pospiviroidae*). Esta aproximación se basó en enzimas de restricción de tipo IIS que cortan fuera del sitio de reconocimiento y supone un procedimiento universal para obtener clones infecciosos de un viroide independientemente de su secuencia, con una alta eficiencia.

A pesar de que los viroides han sido considerados como ARN no codificantes desde su descubrimiento, nuestro análisis computacional predijo pequeños marcos de lectura abiertos en cada uno de los genomas de HSVd y ELVd. No se encontraron similitudes significativas con las proteínas de la base de datos de plantas superiores, pero algunos de estos péptidos predichos estaban altamente conservados entre todas las variantes de HSVd y ELVd. Curiosamente, la fusión de estas secuencias conservadas con una proteína fluorescente reveló una localización subcelular específica en el correspondiente orgánulo donde tiene lugar la replicación/acumulación para cada viroide: nucleolo y cloroplasto para HSVd y ELVd, respectivamente. Las mutaciones que truncan el dominio nucleolar de HSVd fueron perjudiciales para el viroide, mientras que el truncamiento de cualquiera de los dos ORF de ELVd que contiene una señal de localización al cloroplasto también disminuyó (pero en menor medida) la eficiencia biológica del viroide, tal vez debido a la redundancia funcional. Se encontraron formas circulares de los ARN de HSVd y ELVd en fracciones polisómicas, lo que revela su interacción física con la maquinaria de traducción de la célula vegetal. En conjunto, estas observaciones experimentales indican que no se puede descartar la capacidad de codificación de los viroides, aunque la prueba definitiva (la detección de los péptidos codificados por los circRNAs) es un reto tecnológico que deberá abordarse en futuras líneas de investigación.

Finalmente, para estudiar qué cambios se producen en el huésped durante la infección con un viroide sintomático, se realizó un análisis integrador de las alteraciones genómicas de plantas de pepino infectadas con HSVd. Se integraron los transcriptomas, el sRNAnomas y el metilomas para determinar la respuesta temporal a la infección por el viroide. Nuestros resultados apoyan que el HSVd promueve el rediseño de las vías reguladoras del pepino afectando predominantemente a capas reguladoras específicas en diferentes fases de la infección. La respuesta inicial se caracterizó por una reconfiguración del transcriptoma del hospedador mediante el uso diferencial de exones, seguido de una predominante regulación a la baja de la actividad transcripcional modulada por los cambios epigenéticos del hospedador asociados a la infección y caracterizada por un aumento de la hipermetilación. Las alteraciones en el metabolismo de los ARN pequeños y microARNs del huésped fueron marginales y se produjeron principalmente en la fase tardía. En general, estos datos constituyen el primer mapa exhaustivo de las respuestas de la planta a la infección de un viroide.