INDICE

1. Introducción

1.1. Los viroides: aspectos generales 1

1.2. Propiedades estructurales de los viroides 3

1.2.1. Estructura primaria y clasificación 3

1.2.2. Estructura secundaria 5

1.2.3. Dominios estructurales y motivos de secuencia 7

1.2.4. Estructuras secundarias alternativas 8

1.3. Localización subcelular de los viroides 10

1.4. Replicación de los viroides 11

1.4.1. Mecanismo del circulo rodante 11

1.4.2. ARN polimerasas implicadas en la síntesis de los ARNs viroidales 13

1.4.3. Otras actividades enzimáticas y ribozimáticas que participan en la replicación de los viroides 14

1.5. Expresión de viroides y virus vegetales en modelos heterólogos unicelulares 15

2. Objetivos

2.1. Objetivo general 18

2.2. Objetivos especificos 18

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas y plásmidos 19

3.2. Medios de cultivo 20

3.3. Inducción de la expresión de CEVd en *E. coli* 20

3.4. Extracción de ARN total de *E. coli* 21

3.5. Geles de poliacrilamida secuenciales y bidimensionales 22

3.6. Northern blots, marcado de ribosonda y detección no radioactiva 23

3.7. Extracción de ARN de geles de poliacrilamida 23

3.8. Tinción ràpida de geles de poliacrilamida con nitrato de plata 24

3.9. RT-PCR , PCR, clonado, secuenciación y análisis de secuencias de ADN 25

3.10. Estudio del mantenimiento de CEVd en *E.coli* 26

3.10.1. Subcultivos sucesivos en condiciones de represión del promotor P_{BAD} 26

3.10.2. Curado del plásmido pSJ1 luego de inducir/reprimir el promotor P_{BAD} 26

4. Resultados

4.1. Inducción de la expresión de un transcripto dimérico de CEVd en *E. coli* 27

4.2. Búsqueda de formas circulares de CEVd generadas *in vivo* en *E. coli* 29

4.2. Estudio del mantenimiento de las formas circulares de CEVd en *E. coli* 31

4.3.1. Subcultivos sucesivos en condiciones de represión del promotor P_{Bad} 31

4.3.2. Curado del plásmido pSJ1 luego de inducir/reprimir el promotor P_{BAD} 33

4.4. Caracterización molecular de formas circulares de CEVd-coli. 34

4.5. Caracterización de CEVd-coli mediante electroforesis en

4.6. mini-geles secuenciales 39

4.6. Caracterización de CEVd-coli mediante electroforesis en geles de mayor poder de resolución 41

4.7. Efecto del tipo de gel y temperatura sobre la estabilidad estructural de CEVd-coli 44

5. Discusión 47

6. Referencias bibliográficas 54