

## RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*; CTV) es el agente causal de unas de las enfermedades virales de los árboles cítricos más devastadoras en el mundo. CTV está restringido al floema en su huésped cítrico natural, y ha desarrollado tres proteínas supresoras de silenciamiento que actúan a nivel intra-(p23 y p20) e intercelular (p20 y p25) para superar la fuerte defensa antiviral del huésped. La interferencia de RNA, una aproximación basada en el uso de dsRNA para desencadenar el silenciamiento de RNA, ha sido utilizada ampliamente para generar plantas transgénicas resistentes a virus. Considerando el importante papel de p23, p20 y p25 en la patogénesis de CTV, hemos transformado plantas de lima Mexicana con un vector intrón-horquilla que porta la secuencia completa en versión no traducible de los genes *p25*, *p20*, *p23* y el extremo 3'-UTR de la cepa T36 de CTV, para intentar silenciar su expresión en células infectadas.

Se ha observado resistencia completa a la infección viral en tres líneas transgénicas, manteniéndose todas sus propagaciones asintomáticas y libres de virus tras ser inoculadas mediante injerto con CTV-T36, tanto en el portainjertos no transgénico como directamente sobre la variedad transgénica. La acumulación de siRNA derivados del transgén fue necesaria pero no suficiente para lograr resistencia frente a CTV en las plantas. Al inocular propagaciones de las líneas transgénicas inmunes con una cepa de CTV divergente, la resistencia fue parcialmente superada, destacando la importancia de la identidad de secuencia en el mecanismo subyacente a la interferencia de RNA. Este trabajo es el primero en que se consigue resistencia completa a CTV en un huésped cítrico muy sensible, actuando simultáneamente sobre los tres supresores virales de silenciamiento mediante interferencia de RNA. La proteína p23 codificada por el virus es además un importante factor de patogenicidad. La expresión ectópica de p23 en plantas de cítricos induce aberraciones fenológicas semejantes a síntomas de CTV. Para estudiar en más detalle el papel de p23 en la patogénesis de CTV, se ha sobre-expresado en lima Mexicana el gen *p23* de CTV T36 y tres versiones truncadas del mismo bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*). Solo la versión truncada, que expresa los aminoácidos del 1 al 157 (p23-Δ157) indujo síntomas similares a los producidos por CTV, aunque más suaves que los inducidos por la expresión de la proteína p23 entera (209 aminoácidos), permitiendo delimitar la región responsable de la patogénesis de p23 en cítricos a un fragmento de 157 aminoácidos que incluye el dedo de zinc y los motivos básicos flanqueantes de la proteína. La actividad de p23 como supresor de silenciamiento de RNA en *N. benthamiana* se perdía en todos los mutantes de p23 probados, lo cual indica que la supresión de silenciamiento implica a la mayoría de las regiones de la proteína. Para profundizar más en el papel de p23 en la patogénesis, en un siguiente paso hemos restringido la expresión de transgenes derivados de p23 a células asociadas al floema de lima Mexicana mediante el uso del promotor específico de floema del virus del moteado amarillo de la comelina (*Commelina yellow mottle virus*, CoYMV). Se transformó lima Mexicana con construcciones que portaban el gen *p23* completo, ya sea de la cepa agresiva de CTV T36 o de la suave T317, o con un fragmento que comprende el dedo de zinc y los motivos básicos flanqueantes de la primera, todas ellas bajo el control bien del promotor de CoYMV o bien del promotor constitutivo 35S. La expresión de estas construcciones en el floema dio lugar a aberraciones semejantes a los síntomas específicos de CTV, pero no a los síntomas inespecíficos observados cuando se expresaba p23 de forma constitutiva. Por otra parte, la apariencia e intensidad de las aberraciones fenotípicas más notorias similares a síntomas inducidos por CTV generadas por la expresión específica en floema del gen *p23* se relacionó positivamente con la agresividad de la cepa origen utilizada. Además, la expresión en tejidos floemáticos del fragmento de p23 que comprende el dominio de dedo de zinc y los motivos básicos flanqueantes fue suficiente para inducir síntomas semejantes a los producidos por la infección con CTV, confirmando así que la región N-terminal delimitada por los aminoácidos 1 y 157 podría determinar, al menos en parte, la patogénesis de CTV en lima Mexicana.