**RESUMEN**

El virus de la tristeza de los cítricos(CTV) es el agente causal de la virosis más destructiva de los cítricos a nivel mundial. Es un closterovirus con un RNA genómico (gRNA) de ssRNA(+) y ~20 Kb organizado en 12 pautas de lectura abierta (ORFs) que codifican al menos 17 proteínas, algunas de función desconocida. Las proteínas p25 (CP mayoritaria) y p27 (CP minoritaria) forman parte de un grupo de genes implicados en el ensamblaje del virión, y se ha demostrado que p25 junto con p20 y p23 son supresores de silenciamiento génico en algunas especies de *Nicotiana*, y la última es también un determinante de patogénesis. CTV tiene una gama de huéspedes muy restringida y de forma natural sólo infecta el floema de algunas especies de cítricos. La complejidad biológica y molecular de este virus y sus huéspedes naturales dificulta el estudio de los determinantes patogénicos y/o los mecanismos responsables de los síndromes económicamente más importantes. Por ello, para trabajar con este patosistema virus-huésped, se requiere un huésped experimental adecuado y un sistema genético eficiente de CTV. Durante los últimos años hemos desarrollado un sistema genético de CTV basado en la agroinfección sistémica de *Nicotiana benthamiana*, una especie no-natural de este virus, con clones infecciosos del genotipo T36. Dicha infección va acompañada de síntomas característicos, algunos de los cuales son similares a los que el virus induce en cítricos. Por ello, en el presente trabajo hemos utilizado este patosistema como base para abordar dos objetivos principales: i) el análisis preliminar de las interacciones virus-huésped, realizando diversas aproximaciones a la función de algunas proteínas de CTV y ii) un estudio de evolución y adaptación del virus a este nuevo huésped herbáceo.

La interacción CTV-*N. benthamiana* es muy variable y genotipo-dependiente, sólo algunos aislados se replican en esta especie y únicamente T36 la infecta sistémicamente. La respuesta diferencial de los genotipos de CTV en esta especie permitiría analizar los factores de la interacción virus-huésped como paso previo a su estudio en cítricos. En este trabajo, abordamos la función de las proteínas p20 y p25 de tres aislados de CTV que difieren en sus características patogénicas. La expresión transitoria de las p20 y p25 fusionadas a proteínas fluorescentes y su observación al microscopía confocal, reveló su idéntica localización subcelular en *N. benthamiana* y cítricos. La proteína p20 de los aislados T36, T318A y T385 se localizó en el citosol y el núcleo celular en agregados amorfos asociados a regiones perinucleares e inclusiones nucleares puntuales. Su co-expresión con el marcador nucleolar de fibrilarina mostró su potencial interacción con ésta y su re-distribución a regiones asociadas a membrana. Esta localización sería importante para su acción patogénica y supresora.

En cambio, la expresión transitoria, y también estable en el contexto de una infección viral, de la p25 de T36, T318A y T385 de CTV reveló una localización diferencial. Mientras la de T36 y T385 fue nuclear, la de T318A fue citosólica. Un análisis detallado de las regiones implicadas en dicha localización, reveló la existencia de una señal de exportación nuclear NES rica en leucinas en la región Nt de la proteína, en la que el aminoácido 31, una leucina en los aislados agresivos como T318A y una valina en T36 y T385, es esencial para la exportación nuclear. Un clon infeccioso de T36 con este único cambio en su p25 fue incapaz de infección sistémica en *N. benthamiana*. Otros residuos de la región Nt proximal y un motivo rico en aminoácidos hidrofóbicos en la región 64 a 74, también regularían la localización celular de p25.

Un análisis de la capacidad patogénica de p20 y p25 en *N. benthamiana* en un contexto de infección viral heterólogo a través de PVX, mostró que p25 no es un determinante de patogenicidad en esta especie, pero p20 sí. Su expresión acentúa los síntomas y la necrosis inducida por PVX de forma similar a p23. Se determinó que la p20 de T36 tiene un mayor efecto patogénico. Hemos determinado que la capacidad supresora del silenciamiento génico a larga distancia de p25 en el huésped *N. benthamiana* es débil, y que la p25 de T36 suprime mejor que la de los otros aislados.

Por otra parte, hemos obtenido el interactoma de las proteínas p25 de T36 y T318A con proteínas del huésped *N. benthamiana* mediante su expresión transitoria fusionadas a una etiqueta Strep-*tag* II, posterior purificación de los complejos proteína-proteína y análisis proteómico. El interactoma de la p25-T36 resultó mucho más complejo y diverso que el de la p25-T318A, interviniendo potencialmente en mayor número de procesos metabólicos de fotosíntesis, actividad redox, homeóstasis y transporte celular, biosíntesis y degradación de proteínas, unión a proteínas de los plastidios y ácidos nucleicos o de respuesta a estrés (biótico y oxidativo) o defensa mediada por la ruta del jasmónico, del ciclo de metilación, señalización por ROS y proteínas HSP. Las interacciones mayoritarias de la p25-T318A se relacionaron con transporte/localización y respuesta a estrés, principalmente con interactores implicados en procesos de apoptosis, patogénenis y proteínas HSP, de unión a calcio o redoxinas. Ambas p25 tendrían como interactores principales gran número de componentes de los fostositemas I y II y de la estructura del citoesqueleto implicadas en la citocinesis y organización celular, como actinas y tubulinas, diferentes co-chaperonas y el factor de elongación eEF1. La p25-T36 mostró interactores potenciales diferenciales con factores de despolimerización de actina, de elongación de la traducción, determinadas subunidades de las ATP sintasas de orgánulos, acuaporinas de membrana y transporte intracelular y vacuolar, proteínas nucleares de regulación de la transcripción o del proteasoma. Muchos de estos interactores del huésped se han descrito en otros virus como necesarios en interacciones/infecciones virales susceptibles y podrían determinar en parte la respuesta diferencial de los aislados T36 y T318A en esta especie.

Con respecto al segundo objetivo, hemos conseguido la evolución experimental de CTV por pases seriados en *N. benthamiana* mediante injertos y pre-tratamiento de las plantas. Dicha evolución conlleva un conjunto de características adaptativas significativas como: el aumento del prendimiento de injertos, de la tasa neta de infectividad, del título viral y del adelanto de los síntomas causados en esta especie herbácea con el aumento de los pases. La mayor eficacia biológica de los virus evolucionados en este nuevo huésped permitió su capacidad de infectar directamente *N. benthamiana* por inoculación mecánica sin un tratamiento previo, con las tasas de infectividad sistémica más elevadas para los virus más evolucionados. Su adaptación al huésped quedó reflejada también en una mayor acumulación de siRNAs derivados de CTV .a lo largo de los pases evolutivos, y un perfil enriquecido en siRNAs de menor tamaño, similar al de cítricos infectados de forma natural por CTV.

Las características adaptativas también se reflejaron a nivel molecular en la variabilidad genética y estructura de las poblaciones de los virus evolucionados en dos linajes independientes. Ambos linajes mostraron convergencias evolutivas a nivel molecular. A lo largo de los pases evolutivos se acumularon numerosas mutaciones concentradas en una región de la poliproteína y en el gen *p23*. La mayoría aparecieron a partir de P6 y se fijaron en las poblaciones de ambos linajes de forma convergente, tres en la poliproteína, y cinco en el gen *p23*, sugiriendo su naturaleza adaptativa. En las poblaciones más evolucionadas también se detectaron sustituciones *de novo* que afectaban a los genes *RdRp*, *p33*, *p61*, *p18* y *p20*, y los extremos del virus.

Las filogenias de las poblaciones virales evolucionadas en *N. benthamiana* reflejaron su historia evolutiva y los sucesos de convergencia. La estructura de las cuasiespecies virales de p23 reveló que éstas siguen el concepto de “memoria de cuasiespecies”, con la variante ancestral de T36 salvaje retenida en la población como un genoma minoritario. Se detectaron dos posiciones en la poliproteína y tres en p23 sometidas a selección negativa, mientras que el resto de sustituciones seguían procesos de selección purificadora.

Virus evolucionados de CTV-NB resultaron menos infecciosos inicialmente por inoculación mecánica de regreso a cítricos, y se acumularon menos que el virus parental durante el primer año. Los virus de P11 se re-adaptaron más rápidamente a su regreso a cítricos recuperando antes su capacidad infecciosa y título viral durante los dos años posteriores. Dicha re-adaptación de los virus evolucionados CTV-NB a cítricos, se reflejó a nivel molecular en la pérdida progresiva de las mutaciones adquiridas en el huésped herbáceo a lo largo de los años de evolución en cítricos. De hecho, después de tres años la secuencia consenso de las poblaciones virales había revertido por completo a la del virus salvaje T36 de cítricos, que representaría la más eficaz biológicamente en el huésped natural.

Con respecto a las características biológicas de los virus evolucionados en *N. benthamiana* de regreso a su huésped natural, se comprobó que los de P5 infectaron peor los huéspedes CM, LM y AM, mientras que los de P11 fueron menos patogénicos en los huéspedes resistentes AM y POM e indujeron síntomas más suaves de SY y enanismo. Ello indicaba que la evolución y adaptación al huésped de CTV habría tenido un cierto coste en la pérdida de la capacidad infecciosa del virus en determinados de sus huéspedes cítricos y en la inducción de patogénesis.