

La agricultura es un soporte importante de la economía española, siendo la citricultura la principal actividad agraria de la Comunidad Valenciana. La tristeza es la enfermedad viral más grave de este cultivo y su agente causal es el virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Tan solo en España, esta enfermedad ha provocado la muerte de más de 50 millones de árboles cítricos. El tipo e intensidad de los daños provocados por la tristeza en campo depende de la especie o combinación variedad-patrón infectadas, la cepa de CTV y las condiciones ambientales. CTV induce uno o más de los siguientes síndromes: I) decaimiento y muerte de los naranjos dulces (ND), pomelos y mandarinos injertados sobre el patrón naranjo amargo (NA), síndrome conocido como “tristeza”, II) enanismo, acanaladuras en la madera y fruta de pequeño calibre (*stem pitting*, SP), y III) enanismo y amarillamiento de plantas de semilla de limonero, pomelo y NA (*seedling yellows*, SY). Actualmente, el síndrome de tristeza se controla utilizando patrones tolerantes al virus y el único síndrome importante a nivel mundial es el de SP inducido por los aislados más agresivos y difíciles de controlar. Su control requiere un conocimiento preciso de los determinantes patogénicos inductores del mismo, aún no disponible.

La gama de huéspedes de CTV es muy restringida y hasta hace poco no se conocía ningún huésped herbáceo experimental. Actualmente, se sabe que la agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*, una especie considerada no-huésped de CTV, con clones de DNA complementario (cDNA) del aislado T36 de CTV produce la infección sistémica de la planta, acompañada de síntomas similares a los inducidos en cítricos, si bien la infección no queda limitada al floema. El aislado T36 induce SY y SP de lima Mejicana (LM), pero no en otros huéspedes como pomelo o ND, por lo que el estudio de los determinantes genéticos responsables de la inducción del síndrome de SP requería desarrollar un sistema genético basado en clones agroinfectiosos de un aislado inductor de estos síntomas, como el aislado español T318A. Para ello, se partió de clones de cDNA de longitud completa de T318A previamente desarrollados en el laboratorio, capaces de replicarse en hojas de *N. benthamiana* pero incapaces de inducir infección sistémica y que presentaban varias mutaciones en su proteína de cápsida minoritaria p27. La corrección de dichas mutaciones y la construcción de nuevos clones de longitud completa de T318A marcados con el gen *gfp*, mostraron una correcta replicación en hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana*, pero nuevamente resultaron incapaces de inducir infección sistémica en este huésped experimental.

La respuesta diferencial de *N. benthamiana* frente a distintas cepas de CTV permite estudiar los posibles factores implicados en la interacción virus-huésped, como paso preliminar para su estudio en cítricos que es más difícil de abordar. Con este fin se analizó la interacción de las proteínas virales p20 y p25 de los aislados T36 y T318A con proteínas de *N. benthamiana*

utilizando un abordaje proteómico consistente en: i) la expresión transitoria de p20/p25 marcadas con una etiqueta Strep-Tag en hojas de *N. benthamiana*, ii) purificación de los complejos proteína CTV-proteína huésped y análisis interactómico de los datos, y iii) estudio de la interacción directa entre p20/p25 y proteínas seleccionadas del huésped mediante análisis del doble híbrido en levadura y complementación bimolecular de fluorescencia (BIFC). Este abordaje proteómico mostró claras diferencias entre aislados que pueden explicar, en parte, el comportamiento diferencial de los aislados T36 y T318A en dicho huésped experimental.

La inducción del síndrome de decaimiento por parte de CTV en cítricos y la subsiguiente muerte de árboles de diferentes variedades injertadas sobre el patrón NA, ha obligado a desarrollar una nueva citricultura basada en el uso de patrones tolerantes al decaimiento. Sin embargo, dichos patrones son agronómicamente menos adecuados para las condiciones ambientales españolas y su uso ha conllevado la aparición de nuevos problemas patológicos. Las plantas de cítricos propagadas sobre NA e infectadas por CTV muestran necrosis en los tubos cribosos y disminución del floema funcional, lo que impide la apropiada translocación de fotoasimilados a las raíces. Estos síntomas son debidos a una incompatibilidad entre el virus y el NA, lo que sugiere la existencia de cierta resistencia a CTV en NA. Esta resistencia puede ser consecuencia de la activación de rutas de defensa de la planta como la reacción de hipersensibilidad (*hypersensitive reaction*, HR), desencadenada por la ruta del ácido salicílico (AS), o el silenciamiento génico mediado por RNA (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS). Aunque estas rutas son diferentes, la relación entre ambas ha sido descrita en numerosos trabajos y es de gran interés conocer la implicación de cada una de ellas en el fenómeno de decaimiento de las variedades propagadas sobre NA. Con el objetivo de analizar la implicación de dichas rutas en la defensa del NA frente a la infección por CTV, se estudió el papel de diferentes genes implicados en las rutas del AS o del PTGS silenciando genes de la planta mediante el uso de un vector viral (*virus-induced gene silencing*, VIGS) basado en el genoma del virus del manchado foliar de los cítricos (*citrus leaf blotch virus*, CLBV). El silenciamiento génico de las rutas del AS o del PTGS en plantas NA de semilla o propagadas sobre limonero rugoso y la posterior inoculación de tres aislados de CTV patogénicamente diferentes (T36, T318A y T385) mostró la implicación de ambas rutas en la defensa del NA frente a CTV con distinta intensidad según los aislados y los tejidos de la planta. El análisis de las proteínas p20, p23 y p25 como posibles supresores de la ruta del AS mostró el carácter multifuncional de estas proteínas virales e indicó que los aislados más virulentos de CTV poseen supresores más potentes.