

SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS: MECANISMOS MOLECULARES DEL ARN DE INTERFERENCIA Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

PLANT GENE SILENCING: MOLECULAR MECHANISMS OF RNA INTERFERENCE AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Jorge Ricaño-Rodríguez^{1, 2*}, Ernesto A. Zavala-González¹ y Mario Ramírez-Lepe²

¹Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Ciencias del Mar y Biología Aplicada, Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio (IMEM) Ramón Margalef, Universidad de Alicante. Ap. 99. 03080, Alicante, España. Tel. 00 (34) 96 590 3400 Ext. 3280. ²Laboratorio de Genética, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz. Av. Miguel Ángel de Quevedo No. 2779, Colonia Formando Hogar. 91897, Veracruz, Ver.

Autor para correspondencia (jorgericano@gmail.com)

RESUMEN

Las moléculas de ácido ribonucleico de cadena corta, que forman parte del mecanismo de ARN de interferencia (RNAi), son secuencias de ribonucleótidos que regulan la expresión a nivel traduccional de genes eucariontes. El silenciamiento génico mediado por RNAi, se refiere al proceso que permite, mediante complementariedad entre una molécula de ARN de interferencia y un ARN transcrito, promover la degradación de este último así como la reducción de sus niveles de traducción. Existen dos clases principales de moléculas ARN reguladoras que llevan a cabo dicho fenómeno: ARN de interferencia corto (siRNA) y microARN (miRNA). Ambas son generadas a partir del rompimiento de monómeros de ARN de doble cadena por una enzima ribonucleasa denominada DICER perteneciente a la familia de las ARNasas III, que genera fragmentos entre 17-25 nucleótidos. A nivel transcripcional, el ARN de interferencia promueve un complejo proceso de metilación de ADN (adición de un grupo metilo a la molécula), el cual conduce a una transformación de la eucromatina en heterocromatina en una posición fija del cromosoma (*locus*). A nivel post-transcripcional, el fenómeno de silenciamiento se origina mediante la intervención de una molécula de RNAi. El complejo de silenciamiento ARN-inducido (RISC) resultante permite la vinculación al ARN mensajero (mRNA) diana. En plantas, las secuencias RNAi reguladoras en posición *cis* se encuentran involucradas en mecanismos de defensa contra organismos antagonistas y transposones, mientras que aquellas en posición *trans*, interceden en la expresión de genes relacionados con su crecimiento. De igual manera, algunas respuestas adaptativas a estrés se regulan por el miRNA. La presente revisión recopila de forma detallada algunos de los avances más importantes en el conocimiento del RNAi, e incluye antecedentes sobre su relación con el metabolismo de las plantas. Asimismo, se discuten progresos recientes en el entendimiento de su mecanismo molecular al igual que algunas aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: ARN bicatenario, ARN de interferencia, complejo RISC, microRNA, organismos fitopatógenos, silenciamiento génico en plantas.

SUMMARY

Short chain ribonucleic acid molecules, known as interference RNA (RNAi), are ribonucleotide sequences that regulate eukaryotic gene expression. RNAi-mediated gene silencing refers to a process that allows promoting RNA transcripts degradation through complementarity between an RNA molecule and an RNAi transcript, and therefore reducing its translation levels. There are two classes of RNA regulator

molecules: small interference RNA (siRNA) and microRNA (miRNA). Both molecules are generated from the cleavage of double stranded self-complementary RNA hairpins by a DICER-like enzyme that belongs to the RNase III family, generating 17-25 nucleotide fragments. At the transcriptional level, interference RNA performs a complex process of DNA methylation (addition of a methyl group to the molecule), which leads from euchromatin to heterochromatin transformation in a specific region of the chromosome (*locus*). Post-transcriptionally, the phenomenon is caused by the intervention of an RNAi molecule. The resulting RNA-induced silencing complex allows the attachment to the mRNA target. In plants, RNAi cis-regulatory sequences are involved in defense mechanisms against antagonist organisms and transposition events, while trans-regulatory sequences participate in the expression of growth-related genes. Similarly, some adaptive responses to stress may be regulated by miRNA. This review collects and analyzes in detail advances in RNAi, including information about its relationship with plant metabolism. It also discusses recent progress in the understanding of its molecular mechanism and current biotechnological applications.

Index words: double stranded RNA, interfering RNA, RISC complex, microRNA, phytopathogenic organisms, plant gene silencing.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se sabe que una fracción considerable del genoma expresado en las células eucariontes en etapas del desarrollo específicas (transcriptoma), comprende secuencias cortas de ARN que regulan rutas metabólicas a lo largo del proceso. Con base en su biogénesis y tamaño, dichas secuencias se clasifican en diversos tipos de microARNs (miRNA) que incluyen al ARN de interferencia corto (siRNA) (Staiger *et al.*, 2013).

Los miRNAs son generados a partir de genes transcritos por una ARN polimerasa II. Los transcritos de ARN forman horquillas originadas por la complementariedad de nucleótidos entre sí en la secuencia, que son procesados hasta el miRNA maduro. Los miRNAs regulan múltiples fases de desarrollo en plantas, como la etapa de transición de floración, así como algunas respuestas a estrés (Voinnet, 2009). En plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, estas

horquillas son convertidas en precursores de miRNAs (pre-miRNAs) mediante la catálisis de una enzima ribonucleasa tipo DICER de la clase I, la cual es una de las cuatro enzimas de esta naturaleza conocidas hasta la fecha en plantas.

Los pre-miRNAs son procesados en fragmentos de 17 a 25 nucleótidos bicatenarios, que sufren metilación en sus extremos mediada por una enzima metiltransferasa que contribuye a la estabilización de las secuencias de ARN, para evitar que éstas se degraden (Ren *et al.*, 2012). Posteriormente, una cadena del miRNA bicatenario se selecciona por un complejo enzimático de silenciamiento ARN-inducido denominado RISC (RNA-induced silencing complex), donde el miRNA se asocia con la proteína Argonauta (AGO1) que dirige el proceso de degradación del ARN mensajero (mRNA). La familia de genes AGO se ha estudiado en diversas especies de plantas, como *Salvia miltiorrhiza* considerada ancestralmente medicinal (Shao y Lu, 2013). En algunos casos (*e.g.*, familia de genes AGO de *Oryza sativa*), para su estudio se ha recurrido a la combinación de herramientas biotecnológicas como microarreglos y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) (Yang *et al.*, 2013).

La interacción entre el miRNA y el mRNA tiene como resultado un corte en las secuencias que es ejecutado por la actividad del complejo AGO1, o bien a través de una inhibición traduccional (Brodersen *et al.*, 2008). La señal de RNAi puede ser amplificada por la actividad de una enzima ARN polimerasa dependiente de ARN, sobre las secuencias producidas de cortes de transcritos de RNAm/miRNA.

Dado que los virus tienden a generar ARN bicatenario que es sustrato de las enzimas DICER y Argonauta, el RNAi de las plantas es responsable de gran parte del control de la expresión de sus genes y, por consiguiente, podría jugar un papel importante en sus respuestas de inmunidad a corto y largo plazo, que incluyen mecanismos de resistencia contra la replicación viral (Mlotshwa *et al.*, 2002; Dunoyer *et al.*, 2005). Otro papel importante que juega esta molécula es la protección del genoma de la planta frente a elementos genéticos que puedan moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del mismo (transposones), ya que su ADN se metila y lo inactiva (Matzke *et al.*, 2007). Asimismo, interviene en la regulación génica autónoma, por lo cual se considera que el RNAi se involucra en el desarrollo de patrones tanto fisiológicos como morfológicos de estos organismos (Carrington y Ambros, 2003; Kidner y Martienssen, 2005).

En este trabajo se revisan los principales mecanismos moleculares del RNAi y las respuestas que podría originar en el metabolismo de las plantas. Igualmente se discuten algunas de sus aplicaciones en biotecnología agrarícola.

NATURALEZA Y PAPEL DE LAS ENZIMAS DICER EN EL PROCESAMIENTO DE RNAi

Actualmente se conocen tres vías distintas que dan origen al RNAi que comparten un mismo mecanismo molecular: miRNA, siRNA y ARN asociado a Piwi (RNAi que impide la movilidad de transposones en el genoma), aunque este último sólo se ha encontrado en animales (Shabalina y Koonin, 2008). Se considera que el silenciamiento es parte de un complejo que utiliza miRNA o siRNA como template y patrón de reconocimiento, para señalar a la secuencia indicada como lista para degradación. El complejo RISC es el resultado del acoplamiento de enzimas que se involucran en el mecanismo de RNAi, el cual media el silenciamiento del mRNA diana a través de su degradación o inhibición traduccional. Comúnmente la producción del miRNA ocurre en el núcleo de la célula a partir de un pre-miRNA transcrito, cuya longitud de secuencia es de al menos 1000 nucleótidos, que conforman horquillas complementarias ya sea sencillas o dobles, y complementan secuencias simples (dirección 5' - 3') (Saini *et al.*, 2007).

En el citoplasma, el mecanismo de RNAi converge tanto para los miRNA endógenos como para los siRNA exógenos. Ambos precursores de RNAi sufren un corte para formar moléculas de ARN bicatenario de un tamaño apropiado para poder ser vinculados a una proteína efectora. Dicho fenómeno es mediado por una enzima endoribonucleasa clase III denominada DICER que posee diversos dominios estructurales, aunque los más importantes son aquellos denominados PAZ y helicasa (*i.e.* secuencia específica de aminoácidos encargada de desempaquetar genes).

Después de una intensa búsqueda de los mecanismos enzimáticos que rigen el silenciamiento génico, las enzimas DICER fueron identificadas por vez primera como las responsables de procesar el ARN bicatenario a siRNA en *Drosophila* (Bernstein *et al.*, 2001). Estas enzimas contienen un dominio helicasa así como un par de dominios ARNasa dimerizados y un dominio PAZ, aunque dicha composición puede variar entre organismos (Shabalina y Koonin, 2008). Los dominios helicasa son los encargados de procesar los precursores de RNAi, los cuales son más grandes y se alinean perfectamente con el ARN bicatenario y, por otra parte, metabolizan el ATP para traslocar la enzima respecto al mismo, y permitir así la generación de un gran número de secuencias (Cenik *et al.*, 2011).

En géneros como *Arabidopsis*, las proteínas DICER DCL1 (DICER-Like1) actúan por ejemplo sobre los pre-miRNAs para sintetizar secuencialmente horquillas y, de manera posterior, ARN bicatenario de 21nucleótidos de longitud (Pattanayak *et al.*, 2013). Actualmente se sabe que las proteínas DCL1 de las plantas son indispensables para su

correcto desarrollo embrionario. A través de la alteración parcial de secuencias de dominios helicasa de ARN originada por mutaciones puntuales, se ha podido observar que en *Arabidopsis* ocurre un fenómeno de reducción de la cantidad de secuencias de miRNA maduro (Kasschau *et al.*, 2003).

En las proteínas DICER los dominios PAZ también han sido extensamente estudiados. Estructuralmente, estos dominios tienen similitud con las estructuras de enlace oligonucleótido-oligosacárido y, en teoría, los dominios PAZ reconocen el extremo 3' del ARN sustrato (Doyle *et al.*, 2012). Estudios recientes sobre proteínas DICER en humanos, demuestran que los dominios PAZ no sólo se anclan a los extremos 3' del sustrato sino también a su extremo 5' fosforilado cuya posición de corte es reconocida a una distancia de 22 nucleótidos de éste (Park *et al.*, 2011). En el modelo convencional del RNAi, las enzimas DICER interactúan en el citoplasma celular para romper sus sustratos antes de que sean acopladas al complejo RISC, a través del cual se produce el silenciamiento génico. En la Figura 1 se muestran algunas de las enzimas DICER más representativas en diversas especies, con la ubicación de los principales dominios y motivos que las conforman.

PROTEÍNAS ARGONAUTAS COMO EFECTORES GÉNICOS COMUNES

Las enzimas DICER, al ser intermediarias de las rutas metabólicas del siRNA y miRNA, generan moléculas de ARN bicatenario, sustrato de una proteína denominada Argonauta que se considera un efector génico común, ya que forma un complejo ribonucleoproteínico que dirige el proceso de degradación de mRNA, además de que se encuentra vinculada a una secuencia simple de ARN de 20 a 30 nucleótidos complementarios con el gen diana (Wilson y Doudna, 2013). Las proteínas Argonautas contienen cuatro dominios: terminal-N, PAZ (Piwi, Argonaut and Zwiille), medio (MID) y Piwi terminal-C, este último característico de dicho tipo de complejos (Tolia y Joshua-Tor, 2007).

Muchos organismos expresan múltiples miembros de esta superfamilia de proteínas. Por ejemplo: humanos, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *A. thaliana* pueden llegar a expresar hasta 8, 5, 27 y 10 péptidos respectivamente. De manera general, los miembros individuales de cada familia están altamente especializados en llevar a cabo el proceso de silenciamiento génico (Doyle *et al.*, 2012). Uno de los papeles más prominentes de dicha clase es su relación con la síntesis de ARN pre-ribosómico (Nicholson, 1999).

Dentro de las células durante el proceso de formación de miRNA, las proteínas HASTY (proteínas exportadoras de

miRNA) traslocan al precursor de miRNA al citoplasma. Posteriormente, el precursor bicatenario es disociado y la secuencia miRNA guía se incorpora a un complejo de varias proteínas que contienen por lo general a AGO1, para formar un complejo RISC específico (miRISC) (Voinnet, 2009). De esta manera, el dominio PAZ del complejo AGO1 se une al miRNA y ayuda en la incorporación al miRISC. Así, el complejo miRISC-miRNA evita la expresión de genes diana, ya sea mediante la escisión del mRNA (Meng *et al.*, 2011) o mediante la inhibición de su traducción.

En el procesamiento de miRNA, los intrones que se encuentran entre las secuencias pre-miRNA son removidos a través del corte y empalme del ARN (RNA splicing), cuyo proceso permite de manera post-transcripcional la maduración de ARN del que se eliminan ciertos fragmentos de secuencias. En la Figura 2 se esquematiza un proceso generalizado de la biogénesis de miRNA en plantas.

Recientemente se ha descubierto que existen estructuras de ribonucleótidos en la fase intermedia del complejo metabólico que permiten la síntesis de moléculas conocidas como ARN no codificante (non-coding RNA), los cuales son moléculas ARN reguladoras que no se traducen a proteínas y cuya longitud no excede los 200 nucleótidos (Perkel, 2013). Éstas son intermediarias de la degradación de mRNA diana que es identificado por el complejo RISC, cuyas funciones son definidas por interacciones proteicas (Wilson y Doudna, 2013).

miRNAs COMO REGULADORES DE INMUNIDAD Y ADAPTACIÓN AL ESTRÉS EN PLANTAS

Las células eucariontes son capaces de modular la estabilidad de sus miRNAs como respuesta a estímulos endógenos o ambientales, para controlar los niveles de transcripción de mRNA. Dichas alteraciones en la reducción de niveles de mRNA son mediadas por RNAi *cis* regulador, así como por proteínas de enlace a ARN (Staiger *et al.*, 2013). La maquinaria encargada de llevar a cabo dicho mecanismo es conocida como spliceosoma o complejo de corte y empalme, la cual contiene fragmentos cortos de ARN y numerosas proteínas de enlace (Streitner *et al.*, 2013). El uso combinado de diversos sitios de corte dentro del pre-mRNA, genera formas alternativas del mismo que incrementan la versatilidad de mRNAs maduros para la generación de variantes de proteínas con diversa disposición de dominios (Reddy y Ali, 2011).

Navarro *et al.* (2008) y Li *et al.* (2010) han implicado al miRNA en procesos de inmunidad de plantas, ya que líneas transgénicas mutantes con deleciones en los genes *dcl1-9*, *ago1-25* y *ago1-27* impiden la biogénesis de miRNA involucrado en mecanismos de respuesta de inmunidad inducida.

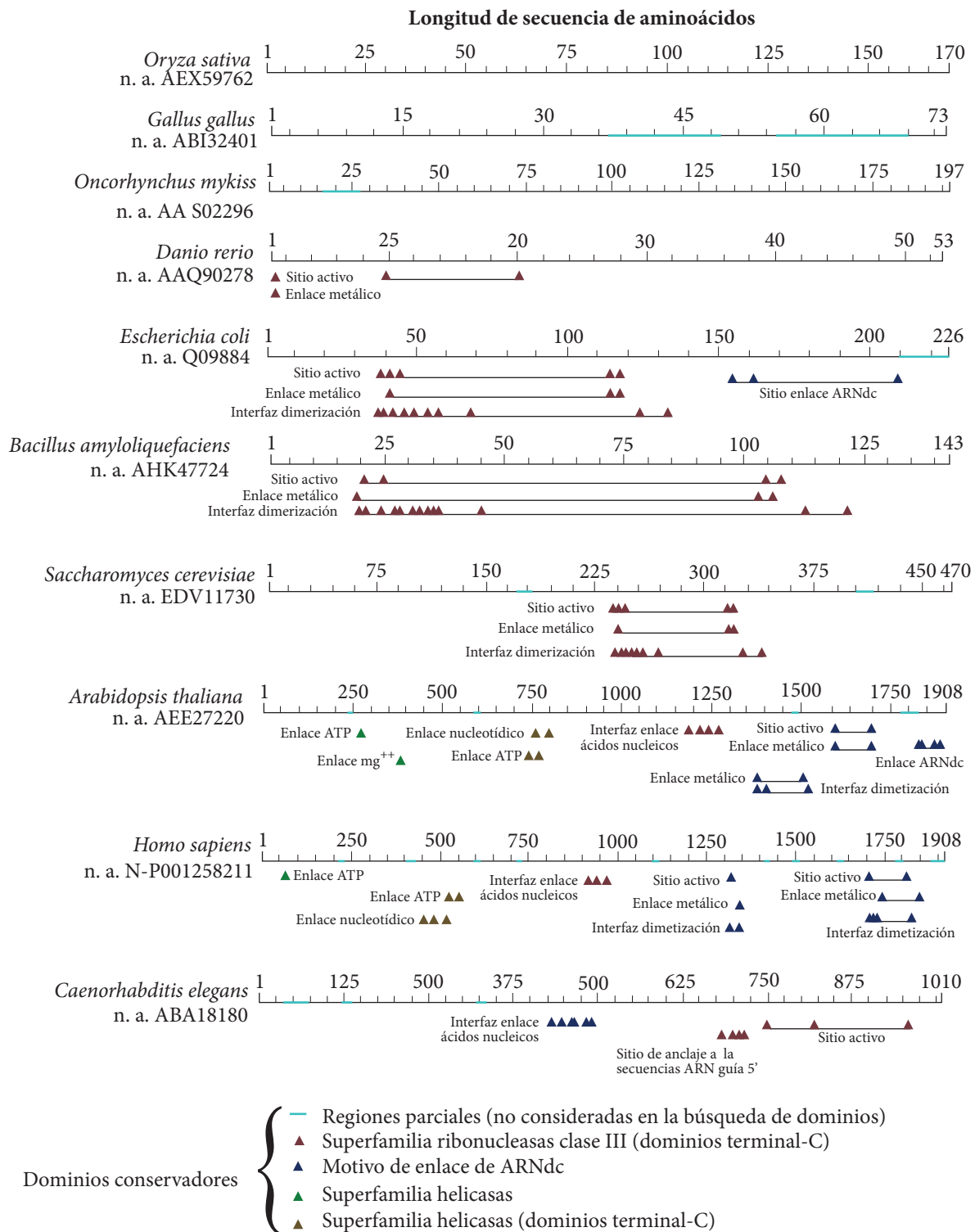
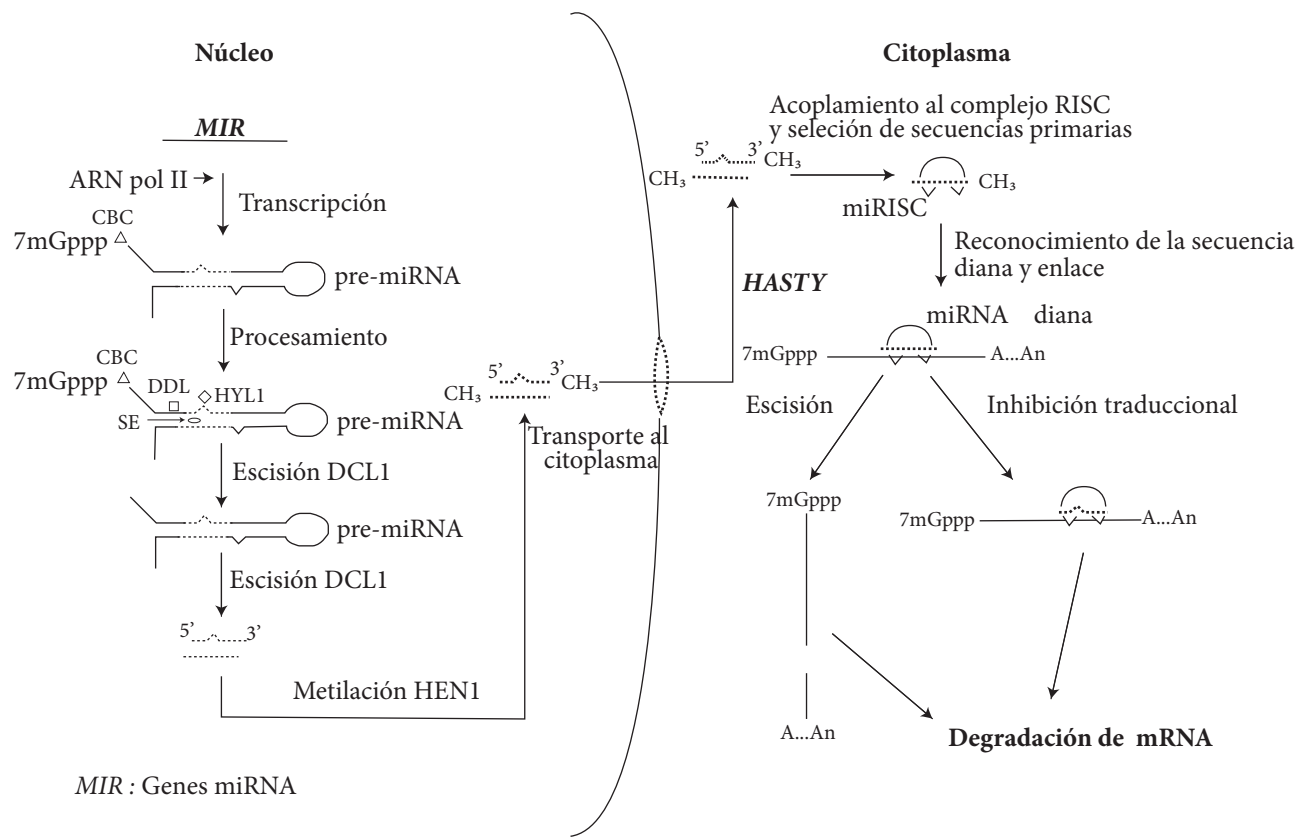


Figura 1. Representación sistemática de diversas enzimas DICER donde se muestra la organización de sus principales motivos y dominios conservados (n. a. = número de acceso). La determinación de su arquitectura estructural se realizó a partir de secuencias de aminoácidos alojadas en el servidor electrónico del Centro Nacional de Biotecnología e Informática (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).



MIR : Genes miRNA

7mGppp : 5' N/- metilguanósina-trifosfato

CBC : Cap Binding Protein Complex (precursor de nucleótido alterado en extremo 5' de mRNA)

DDL :DAWDLE (secuencia que codifica dominios de reconocimiento de fosfopéptidos)

HYL1: Proteína involucrada en respuestas hiponásticas

HEN1: Hua enhancer 1 (ARN2' - O - metiltransferada)

HASTY: Ortólogo de Exp5 intermediario de biogénesis de miRNAs y tRNA

Figura 2. Esquema representativo de la biogénesis de miRNA en plantas y su respectiva función. La ARN polimerasa II es la mediadora de la transcripción de genes miRNA (*MIR*) que genera los precursores primarios de ARN denominados pre-miRNA. El procesamiento del pre-miRNA por la enzima DICER (*DCL1*) se lleva a cabo en el núcleo a través de la interacción de las enzimas intermediarias CBC (Cap Binding Complex), DDL (DAWDLE), HYL1 (Double-stranded RNA-binding protein hypnotastic leaves1) y HEN1 (Hua enhancer1). El ortólogo HASTY transporta el miRNA metilado al citoplasma que se acopla al complejo miRISC. Finalmente, el miRNA guía al complejo miRISC para silenciar el mRNA diana ya sea por escisión o inhibición traduccional (adaptado de Pattanayak *et al.*, 2013).

Las secuencias de miRNA a menudo se encuentran relacionadas con la regulación de varios procesos biológicos como la mitigación del estrés (Sunkar *et al.*, 2012). El género *Arabidopsis* contiene dos genes *MIR* (393a y 393b) que son procesados de manera casi idéntica al madurar y transformarse en secuencias miR393. Este miRNA fue considerado en un principio como una secuencia no-funcional derivada de la biogénesis de miRNA (Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios posteriores demostraron la implicación de estas moléculas en la inmunidad de plantas ya que dicho miRNA fue identificado en pequeñas poblaciones al estar interactuando con complejos de proteínas AGO durante si-

tuaciones de defensa contra infecciones bacterianas (Zhang *et al.*, 2011). La secuencia tiene como diana el gen *MEMB12* que codifica una proteína estructural del aparato del Golgi implicada en procesos de secreción vesicular.

Las plantas responden al estrés ambiental de tipo biótico y abiótico, mediante una expresión diferencial de genes y secuencias de miRNA. Por ejemplo, en diversas especies se ha observado un incremento de miR160, miR167 y miR393 (reguladores de la embriogénesis y posterior desarrollo) durante condiciones de sequía. Se sabe que mientras miR393 bloquea la expresión del gen

que codifica receptores de auxinas, miR167 y miR160 evitan la expresión de algunos genes relacionados con diversos factores de respuesta a dicho estrés (Sunkar y Zhu, 2004).

Las plantas requieren de al menos 14 minerales esenciales para su correcto desarrollo que provienen del suelo y, en este sentido, el RNAi se involucra tanto en la regulación como en la homeostasis de nutrimentos (Kruszka *et al.*, 2012). Vale la pena mencionar que las construcciones de genotecas de secuencias de RNAi resultarían ser muy valiosas para el estudio de miRNAs relacionados con estos procesos metabólicos (Wang *et al.*, 2013). Es así que las aplicaciones biotecnológicas de miRNAs derivadas de los antecedentes mencionados podrían radicar en la manipulación de microsecuencias que jueguen un papel importante en las respuestas al estrés hídrico, térmico, salino, biótico y radiación UV, así como al estrés mediado por regulación hormonal y homeostasis de nutrimentos, para de esta manera permitir la creación de líneas transgénicas más resistentes a condiciones ambientales adversas.

POTENCIAL DEL RNAi EN LA PROTECCIÓN DE CULTIVOS FRENTE A PLAGAS DE INSECTOS

Una de las primeras investigaciones que demostraron que el RNAi podía degradar secuencias específicas de mRNA y bloquear la expresión de genes de insectos, se llevó a cabo en *C. elegans*, una especie de nematodo rhabditido de la familia *Rhabditidae* (Fire *et al.*, 1998). Los investigadores estadounidenses responsables de dicho proyecto recibieron el premio Nobel de medicina en 2006 por lo que llamaron: “un mecanismo fundamental para controlar el flujo de la información genética”. Por otra parte, Kennerdell y Carthew (1998) utilizaron RNAi para estudiar genes de *D. melanogaster*.

Hasta la fecha, el RNAi ha sido utilizado para el estudio de la genómica funcional de más de 30 especies de insectos de diversos órdenes como Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Isóptera, Ortóptera, Himenóptera y Hemíptera (Burand y Hunter, 2013). Aunque la mayoría de estas investigaciones son realizadas en la Unión Europea, Japón y Estados Unidos de América, por mencionar algunos ejemplos, también es posible encontrar antecedentes de su aplicación en América latina aunque en menor cantidad (Aguilera *et al.*, 2011). La aproximación funcional de esta herramienta ha sido exitosa en la caracterización de genes relacionados con diversos procesos fisiológicos, que incluyen: desarrollo, reproducción, comportamiento y sistemas de inmunidad (Belles, 2010). Evidentemente, la aplicación de RNAi es una estrategia biotecnológica que permite la identificación de genes mediante el bloqueo de su expresión y posterior inhibición de la síntesis de proteínas, un proceso de suma importancia en la defensa contra infecciones antagonistas

(Roether y Meister, 2011).

Investigaciones recientes en insectos han permitido conocer los efectos de la aplicación *in vitro* de secuencias sintéticas bicatenarias en embriones, a través de procesos de microinyección celular (Gu y Knipple, 2013). Si bien este método de recombinación genética constituye una herramienta para investigar la función de los genes, la microinyección de ácidos ribonucleicos no resultaría factible para el control de plagas debido a su alto costo. Hoy en día se considera que para que una estrategia de control biológico de insectos basada en la aplicación de RNAi sea viable, ésta debe tener como diana un gen que sea necesario para un proceso fisiológico vital del hospedero, además de ser imprescindible el empleo de una metodología adecuada para realizar su vinculación con el organismo.

El potencial del RNAi como una posible herramienta biotecnológica para el control de poblaciones de insectos fue demostrado por vez primera por Araujo *et al.* (2006), quienes lograron introducir ARN bicatenario en este tipo de organismos mediante su administración oral. En dicho estudio se utilizaron larvas de *Rhodnius prolixus*, una especie de heteróptero triatómimo, que se alimentaron con el transcrito que codificaba una proteína anticoagulante denominada nitroporina 2, y se observó una disminución significativa en los niveles de actividad anticoagulante en las glándulas salivales de los insectos. En el mismo año, Turner *et al.* (2006) llevaron a cabo una investigación con *Epiplatys postvittana*, una polilla perteneciente a la familia de los lepidópteros que por su naturaleza herbívora es capaz de atacar hasta 123 especies de dicotiledóneas distintas. La introducción oral de transcritos diana de ARN bicatenario de genes que codifican una enzima intestinal de larvas, y una proteína intermediaria en la síntesis de feromonas en las antenas de adultos disminuyó los niveles de ambos transcritos en los tejidos.

Asimismo, un trabajo involucrado con *Aedes aegypti* demostró que el RNAi puede ser inducido en insectos a través de su aplicación tópica (Pridgeon *et al.*, 2008). En este estudio, la aplicación cutánea de ARN de doble cadena diluido en acetona causó que la transcripción del gen *AaeIAP1* que codifica una proteína inhibidora de muerte celular programada (apoptosis) en hembras adultas quedara bloqueada y, por ende, el incremento significativo de la mortalidad de los insectos.

De manera posterior, la aplicación tópica de este tipo de moléculas en larvas de la polilla barrenadora *Ostrinia furnacalis* mostró también tener efecto (Wang *et al.*, 2011), ya que en este caso el RNAi fue introducido en las larvas mediante la aspersión directa de una solución acuosa que contenía los ribonucleótidos, y se observó tanto un retraso en

el crecimiento de las mismas como una muerte temprana. Es importante mencionar que el RNAi es susceptible a la degradación por ARNasas, cuya severidad depende de las propiedades alostéricas de la secuencia. Por otra parte, se observó una disminución significativa de la capacidad de eclosión de los huevecillos respecto a los testigos de control, además de que moléculas marcadas con fluorescencia persistieron en los estadios larvarios hasta llegar al intestino, hemocitos y capullos.

Como se mencionó anteriormente, la obtención de RNAi *in vitro* tiene un alto costo. Una alternativa que pudiera ser viable en términos económicos para su inducción, es la expresión de ARN bicatenario *in vivo* mediante la construcción de vectores génicos que alberguen segmentos de secuencias diana. Diversas investigaciones recientes han permitido obtener vectores de silenciamiento en bacterias (Li *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011), plantas hospederas (Zha *et al.*, 2011) y virus de plantas (Kumar *et al.*, 2012), los cuales han sido implementados con éxito para estudiar la expresión de genes específicos en insectos.

Algunas investigaciones relacionadas con los mecanismos moleculares que rigen las respuestas de defensa de las plantas, sugieren que también puede ser posible la aplicación de RNAi como una estrategia para el control de plagas de nematodos. De manera regular, dichos organismos son controlados con pesticidas químicos que a largo plazo tienen repercusiones tanto económicas como de salud y ambientales y, por consiguiente, la aplicación de esta estrategia podría proveer de beneficios considerables para la agricultura.

Una forma de generar plantas modificadas genéticamente resistentes a nematodos, es produciendo copias (repetidas e invertidas) de secuencias de genes diana de tales organismos bajo promotores fuertes, con la finalidad de que los gusanos se alimenten de la materia vegetal que contenga el ARN bicatenario y se induzca de dicha manera el RNAi a su genoma. De esta forma se obtendría un bloqueo de la expresión de genes involucrados en su desarrollo, lo que resultaría en la disminución de la reproducción o crecimiento de los mismos (Fairbairn *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Steeves *et al.*, 2006).

SILENCIAMIENTO GÉNICO COMO MEDIADOR DE PATOGENICIDAD VIRAL

Aunque existen antecedentes sobre el potencial del RNAi frente a diversos tipos de virus capaces de infectar células animales (*e.g.*, virus del dengue y *Drosophila*) (Kakumani *et al.*, 2013; Karlikow *et al.*, 2014), algunos estudios sugieren la participación de éste principalmente en la patogenicidad viral en plantas. Los supresores virales de silenciamiento

afectan tanto la acumulación como función de los siRNAs, que incluyen el proceso de silenciamiento génico post-transcripcional mediado por RNAi corto en *trans* que fue descubierto recientemente (tasiRNA; trans-acting siRNA). Como consecuencia, se desencadena un desarrollo anormal del organismo hospedero (Kasschau *et al.*, 2003; Shivasprasad *et al.*, 2008).

La participación de tales inhibidores de expresión en el desarrollo de enfermedades de este tipo, resulta ser consistente con el hecho de que a menudo suelen ser factores determinantes de patogenicidad (Li *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2002). No obstante, la interacción del RNAi en las vías metabólicas del hospedero podría no ser la causa principal de los síntomas de infección, ya que en principio no todos los supresores virales afectan el metabolismo de estas moléculas en plantas (Chen *et al.*, 2004).

En los modelos convencionales de patogenicidad mediada por RNAi, las secuencias cortas de ribonucleótidos derivan de virus infectantes, mientras que el ARN subviral induce el silenciamiento de genes del hospedero a través de complementariedad de secuencias fortuitas. Este modelo fue sugerido por vez primera por Wang *et al.* (2004), quienes demostraron que la expresión de un gen que transcribe horquillas de ARN autocomplementario (self-complementary hairpin RNA) que codifica una secuencia de un viroide del tubérculo fusiforme de la papa (*Solanum tuberosum* L.) denominado PSTVd (Potato Spindle Tuber Viroid), es capaz de inducir síntomas del mismo tipo en tomate (*Solanum lycopersicon* L.).

Por otra parte, Wang *et al.* (2004) demostraron que el efecto de pardeamiento causado por el virusoide o ARN satélite (molécula patógena de ARN) del mosaico del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Virus del Mosaico del Tabaco; TMV-Tobacco Mosaic Virus) se encuentra fuertemente inhibido por un supresor de silenciamiento denominado P1/HC-Pro. En este sentido, se ha confirmado que dichos síntomas de marchitez son debidos al silenciamiento directo del gen biosintético de la clorofila (*CHLI*) del hospedero (Smith *et al.*, 2011; Shimura *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, el silenciamiento por inducción viral de genes del hospedero a través de RNAi podría considerarse un mecanismo general para la patogenicidad de ARN subviral, ya que dichas moléculas infectantes pueden silenciar genes de diversas formas. El siRNA que tiene un alto grado de identidad de secuencia con las regiones promotoras de los genes del hospedero, puede inducir la metilación de la citosina del promotor a través de la metilación de ADN dirigida por ARN denominada vía RdDm (RNA-directed DNA methylation), lo cual conlleva a una inactivación de la transcripción de los genes del hospedero.

RESISTENCIA DE LAS PLANTAS FRENTE A PATÓGENOS FÚNGICOS MEDIANTE SILENCIAMIENTO GÉNICO

A diferencia de los patógenos víricos que se replican y propagan dentro de las células de las plantas infectadas, las interacciones entre algunos hongos patógenos y la planta ocurren a través de células altamente especializadas conocidas como haustorios. Estos últimos son los extremos de las hifas rodeados por una matriz externa bordeada, por cada lado, por las membranas celulares del hongo y su hospedero (Cheng-Guo *et al.*, 2012). Dicha situación podría representar una interfase para el intercambio de señales entre ambos organismos, así como la asimilación de nutrimentos (Panstruga, 2003). A su vez, tal interacción podría facilitar la movilidad de ARN bicatenario (secuencia específica complementaria a genes del antagonista) proveniente de las células de la planta hospedera hacia el patógeno fúngico, para crear un factor de resistencia mediado por RNAi.

El concepto de silenciamiento génico en hongos inducido por sus hospederos se ha generado a partir de *Blumeria graminis*, un hongo patógeno biotrófico que parasita a la mayoría de las gramíneas para nutrirse y que se identifica mediante la presencia de manchas polvorientas en las hojas de las mismas (Nowara *et al.*, 2010). A través de silenciamiento artificial, la expresión directa de RNAi dirigida frente a transcritos diana de *B. graminis* en cebada (*Hordeum vulgare* L.) redujo significativamente los síntomas de la enfermedad en la planta, mientras que la cepa del hongo modificada genéticamente utilizada como control negativo pero que carecía de la secuencia de RNAi (control de transformación), fue tan susceptible al mismo patógeno como la cepa nativa de ésta.

A pesar de que existen pocos estudios que relacionen el fenómeno de silenciamiento génico en hongos en comparación con los realizados en plantas, la mayoría de ellos comprueban la existencia de un gran número de variaciones dentro del mismo proceso. Por ejemplo, el descubrimiento del mecanismo que origina puntos de mutación repetidos (RIP) en el genoma de *Neurospora crassa* a través de silenciamiento, es el primero reportado como un fenómeno inducido artificialmente por la introducción de ADN en dicha especie (Selker, 1990). *Neurospora crassa* y *Ascobolus immersus* son ejemplos de hongos capaces de producir homólogos de secuencias repetidas, e inactivarlas en una determinada fase de su ciclo de vida (Cogoni y Macino, 1999). Igualmente, existen datos sobre la presencia de moléculas de ARN de doble cadena en aislados de *Sclerotium cepivorum*, aunque su existencia no se encuentre directamente relacionada con su patogenicidad o variabilidad morfológica (Reyes-Pérez *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

El conocimiento de las bases moleculares que permitan implementar en plantas mecanismos de defensa frente a enfermedades causadas por agentes biológicos o por condiciones abióticas extremas, es de vital importancia para la agricultura sostenible. En décadas pasadas se han logrado importantes avances en el campo de las interacciones planta-microorganismo, las cuales, demostraron el papel que juegan los patrones de receptores de reconocimiento en la resistencia a enfermedades. Además, se ha comprobado la existencia de diversos factores de virulencia causados por fitopatógenos que se encontraban relacionados con el bloqueo de los patrones de reconocimiento, así como la señalización de la respuesta inmune. No obstante, a pesar de conocerse el resultado de dichos procesos fisiológicos, no se tenía del todo claro cuáles podrían ser los mecanismos moleculares que los regían. Es así que hasta hace apenas unos años se descubrió el fenómeno de silenciamiento génico causado por el RNAi, a través del cual es posible regular la expresión de genes de un organismo eucariote que se encuentre ante situaciones y etapas fisiológicas diversas.

Si bien es cierto que las rutas metabólicas que regulan la expresión génica a través del fenómeno de silenciamiento en plantas se manifiestan de distintas formas a través de siRNA, miRNA o tasiRNA, todas estas moléculas comparten elementos en su biogénesis y características estructurales similares, así como mecanismos de acción que son compartidos por componentes celulares comunes. No obstante, a pesar de que los miRNAs y tasiRNAs posean cierto grado de conservación, éstos se regulan de manera diferente entre diversas especies.

Mediante el descubrimiento a fondo de las bases moleculares del silenciamiento génico, se podría vislumbrar en un futuro la posibilidad de utilizar líneas transgénicas de plantas como bio-productoras de RNAi con propósitos de investigación, así como para uso terapéutico. En años pasados ya se había demostrado la efectividad de plantas como fábricas productoras de RNAi frente al virus de la influenza de mamíferos (Zhou *et al.*, 2004), así como para la producción de anticuerpos, vacunas y diversos fármacos (Daniell *et al.*, 2001). En este sentido, cada vez es mayor el número de genomas de plantas disponibles que suponen una inmensa cantidad de información de secuencias que se encuentran a la espera de ser caracterizadas funcionalmente. Por otra parte, el silenciamiento génico mediado por RNAi y la metilación de ADN dirigida por ARN, han permitido realizar aproximaciones al campo de la genética reversa para determinar la función de genes de interés.

A pesar de existir similitud entre el miRNA y el siRNA

que media el silenciamiento génico de manera post-transcripcional, se sabe que ambos se expresan de manera distinta entre especies. Lo anterior podría ser debido a que la diversificación funcional del RNAi que desencadena el silenciamiento, incurra en procesos adaptativos que cambian a lo largo de la evolución. No obstante, dicha relación aún se encuentra pendiente por ser establecida. Hasta la fecha se sabe que existen únicamente cinco clados eucariontes que poseen miRNAs, pero cada uno de ellos posee su propio repertorio de secuencias. Al observarse que cada clado posee su propio complemento único de miRNAs, se puede inferir la existencia de un claro ejemplo de expansión molecular (Tarver *et al.*, 2012).

Aunque el descubrimiento de los miRNAs ha permitido profundizar en el papel que éstos juegan en la regulación génica de las plantas, a su vez surgen más preguntas sobre su función *in vivo*, por ejemplo: ¿por qué se observa multiplicidad en dichas moléculas? dado que los distintos miRNAs pueden regular cooperativamente secuencias de genes diana individuales, a pesar de que la expresión de los mismos difiere entre diversos tipos de células así como condiciones (Voinnet, 2009). Otra pregunta que surge del entendimiento de la función del miRNA es la siguiente: ¿cuál es la causa por la cual en ocasiones las interacciones con secuencias diana muestran un efecto de protección para la estabilidad de las moléculas, y en otras, su finalidad es la degradación?

El progreso reciente sobre el entendimiento y naturaleza del RNAi, permite elucidar poco a poco la estructura y función de estas moléculas. Por lo anterior, resulta imprescindible realizar aproximaciones genómicas mediante una combinación de estrategias biotecnológicas múltiples en los campos de la biología molecular, genética, bioquímica y biología celular entre otras.

PERSPECTIVAS

El descubrimiento reciente de algunos de los principales mecanismos moleculares del RNAi, permite debatir acerca de sus futuras aplicaciones en la biotecnología agrícola. Es importante mencionar que la seguridad alimentaria derivada de la aplicación de dicha herramienta debe ser imperativa. A consecuencia de los escasos estudios existentes hasta la fecha sobre los efectos en seres humanos del consumo de alimentos vegetales con altos niveles de microsecuencias interferentes en su genoma, surgen importantes incógnitas que deberán ser develadas en el futuro. Una de ellas es el efecto que tienen estas microsecuencias sobre el metabolismo de quienes las consuman de manera directa.

Jensen *et al.* (2013) sugieren que a pesar de que las células eucariontes vegetales pueden contener un gran número

de secuencias de ARN de doble cadena con cierto grado de complementariedad hipotética frente a genes humanos, el consumo de alimentos como lechuga (*Lactuca sativa* L.), tomate, maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max* L.) y arroz, no representan riesgo dietario alguno. Lo anterior podría ser debido a la rápida degradación de los ácidos nucleicos en el tracto digestivo. No obstante, el escaso número de antecedentes de este tipo sugiere la realización de investigaciones futuras que permitan la obtención de conclusiones fehacientes.

Las herramientas biotecnológicas, además de fundamentarse en complejas bases teóricas, deben contar también con un enfoque e interés industrial que permita su aplicación fuera del laboratorio, y aportar de esta manera beneficios a la humanidad. Por mencionar algunos ejemplos importantes, el maíz, al ser un cultivo altamente susceptible al estrés hídrico, podría verse beneficiado al estudiarse a fondo algunos de sus genes *MIR*. Así, se incrementarían los resultados en pruebas multi-ambientales que ayuden a la optimización de cultivos bajo condiciones de sequía (Campos *et al.*, 2004).

Igualmente, a través de la aplicación de dichas técnicas ha sido posible estudiar otras rutas metabólicas relacionadas con el estrés hídrico en otros cultivos además del maíz (*e. g.*, algodón (*Gossypium* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.), cebada, tomate y arroz), como osmorregulación, detoxificación y síntesis de ácido abscísico (Deikman *et al.*, 2012). Mediante la combinación de técnicas de biología molecular y buenas prácticas de cultivo sería posible la creación de especímenes capaces de crecer en diversas regiones geográficas.

Actualmente es posible realizar aproximaciones más exactas sobre la localización de genes diana en organismos de interés agrícola (*i.e.*, cultivos e insectos) a través de la generación de microRNAs artificiales (amiRNA) (Li *et al.*, 2013). Dichas proyecciones podrían mejorar la investigación en plantas e ingeniería de cultivos mediante el desarrollo de secuencias artificiales más predecibles y genéticamente manipulables. Finalmente, la aplicación de RNAi en plantas podría también incrementar sustancialmente soluciones sofisticadas que involucren la regulación de señales de transducción en mecanismos de defensa, por ejemplo contra diversos virus, hongos y bacterias (Collinge *et al.*, 2010).

Aún a pesar de que existe un largo camino por recorrer para conocer por completo el fundamento del bloqueo de la transcripción génica, en la presente revisión se han recopilado algunos de los progresos más importantes hasta la fecha en el entendimiento de los mecanismos moleculares que rigen el fenómeno de silenciamiento génico en plantas,

que incluyen la importante participación de las enzimas DICER y proteínas Argonautas. Asimismo se discutieron algunas aplicaciones representativas del RNAi en la biotecnología agrícola.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Hermosa Prieto de la Universidad de Salamanca, por sus aportaciones que ayudaron a mejorar el contenido y forma del manuscrito. Al Laboratorio de Fito patología de la Universidad de Alicante y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar una beca posdoctoral a Jorge Ricaño.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilerag C., B. E. Padillah, C. P. Flórez, J. D. Rubiog y J. R. Acuña (2011) ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae). *Revista Colombiana de Entomología* 37:167-172.
- Araujo R. N., A. Santos, F. S. Pinto, N. F. Gontijo, M. J. Lehane and M. H. Pereira (2006) RNA interference of the salivary gland nitrophenol 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36:683-693.
- Belles X. (2010) Beyond *Drosophila*: RNAi *in vivo* and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology* 55:111-128.
- Bernstein E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Brodersen P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y. Y. Yamamoto, L. Sieburth and O. Voinnet (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185-1190.
- Burand J. P. and W. B. Hunter (2013) RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology* 112:568-574.
- Campos H., M. Cooper, J. E. Habben, G. O. Edmeades and J. R. Schussler (2004) Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research* 90:19-24.
- Carrington J. C. and V. Ambros (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336-338.
- Cenik E. S., R. Fukunaga, G. Lu, R. Dutcher and Y. Wang (2011) Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease. *Molecular Cell* 42:172-184.
- Chen J., W. X. Li, D. Xie, J. R. Peng and S. W. Ding (2004) Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but up-regulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 16:1302-1313.
- Cheng-Guo D., W. Chun-Han and G. Hui-Shan (2012) Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence* 3:1-8.
- Cogoni C. and G. Macino (1999) Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations of the same theme. *Current Opinion in Microbiology* 2:657-662.
- Collinge D. B., H. J. Jørgensen, O. S. Lund and M. F. Lyngkjær (2010) Engineering pathogen resistance in crop plants. *Current Trends and Future Prospects. Annual Review of Phytopathology* 48:269-291.
- Daniell H., S. J. Streatfield and K. Wycoff (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plants Sciences* 6:219-226.
- Deikman J., M. Petracek and J. E. Heard (2012) Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Current Opinion in Biotechnology* 23:243-250.
- Doyle M., L. Jaskiewicz and W. Filipowicz (2012) Dicer proteins and their role in gene silencing pathways. *The Enzymes* 32:1-229.
- Dunoyer P., C. Himber and O. Voinnet (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* 37:1356-1360.
- Fairbairn D. J., A. S. Cavallaro, M. Bernard, J. Mahalinga-Iyer, M. W. Graham and J. R. Botella (2007) Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta* 226:1525-1533.
- Fire A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Gu L. and D. C. Knipple (2013) Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection* 45:36-40.
- Huang G., R. Allen, E. L. Davis, T. J. Baum and R. S. Hussay (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:14302-14306.
- Jensen P. D., Y. Zhang, B. E. Wiggins, J. S. Petrick, J. Zhu, R. A. Kersetter, G. R. Heck and S. I. Ivashuta (2013) Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 4:90-97.
- Jones-Rhoades M. W., D. P. Bartel and B. Bartel (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57:19-53.
- Kakumani P. K., S. S. Ponia, K. S. Rajgokul, M. Chinnappan, A. C. Banerjee, G. R. Medigeshi, P. Malhotra, S. K. Mukherjee and R. K. Bhatnagar (2013) Role of RNAi in dengue viral replication and identification of NS4B as a RNAi suppressor. *Journal of Virology* 87:8870-8883.
- Karlikow M., B. Goic and M. C. Saleh (2014) RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: Setting up a systemic immune response. *Developmental and Comparative Immunology* 42:85-92.
- Kasschau K. D., Z. Xie, E. Allen, C. Llave, E. J. Chapman, K. A. Krizan and J. C. Carrington (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4:205-217.
- Kennerdell J. R. and R. W. Carthew (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95:1017-1026.
- Kidner C. A. and R. A. Martienssen (2005) The developmental role of microRNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8:38-44.
- Kruszka K., M. Pieczynski, D. Windels, D. Bielewicz, A. Jarmolowski, Z. Szwejkowska-Kulinska and F. Vazquez (2012) Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *Journal of Plant Physiology* 169:1664-1672.
- Kumar P., S. S. Pandit and I. T. Baldwin (2012) Tobacco rattle virus vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. *PLoS ONE* 7:e31347.
- Li H. W., A. P. Lucy, H. S. Guo, W. X. Li, L. H. Ji, S. M. Wong and S. W. Ding (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *The European Molecular Biology Organization Journal* 18:2683-2691.
- Li J. F., H. S. Chung, Y. Niu, J. Bush, M. McCormack and J. Sheen (2013) Comprehensive Protein-Based Artificial MicroRNA Screens for Effective Gene Silencing in Plants. *The Plant Cell* 25:1507-1522.
- Li X., K. Zhuo, M. Luo, L. Sun and J. Liao (2011) Molecular cloning and characterization of a calreticulin cDNA from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Experimental Parasitology* 128:121-126.
- Li Y., Q. Zhang, J. Zhang, L. Wu, Y. Qi and J. M. Zhou (2010) Identification of microRNAs involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered plant innate immunity. *Plant Physiology* 152:2222-2231.
- Matzke M., T. Kanno, B. Huettel, L. Daxinger and A. J. Matzke (2007) Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology* 10:512-519.
- Meng Y., C. Shao, H. Wang and M. Chen (2011) The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant Physiology* 157:1583-1595.
- Mlotshwa S., O. Voinnet, M. F. Mette, M. Matzke, H. Vaucheret and S. W. Ding (2002) RNA silencing and the mobile silencing signal.

- The Plant Cell* 14:289-301.
- Navarro L., F. Jay, K. Nomura, S. Y. He and O. Voinnet (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321:964-967.
- Nicholson A. W. (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiology Reviews* 23:371-390.
- Nowara D., A. Gay, C. Lacomme, J. Shaw, C. Ridout, D. Douchkov, G. Hensel, J. Kumlehn and P. Schweizer (2010) HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* 22:3130-3141.
- Panstruga R. (2003) Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 6:320-326.
- Park J. E., I. Heo, Y. Tian, D. K. Simanshu, H. Chang, D. Jee, D. J. Patel and V. N. Kim (2011) Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475:201-205.
- Pattanayak D., A. U. Solanke and P. A. Kumar (2013) Plant RNA interference pathways: Diversity in function, similarity in action. *Plant Molecular Biology Reporter* 31:493-506.
- Perkel J M (2013) Visiting "noncodarnia". *Biotechniques* 6:301-304.
- Pridgeon J. W., L. Zhao, J. J. Becnel, D. A. Strickman, G. G. Clark and K. J. Linthicum (2008) Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology* 45:414-420.
- Qiu W., J. W. Park and H. B. Scholthof (2002) Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:269-280.
- Reddy A. S. and G. S. Ali (2011) Plant serine/arginine-rich proteins: roles in precursor messenger RNA splicing, plant development, and stress responses. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2:875-889.
- Ren G., X. Chen and B. Yu (2012) Uridylation of miRNAs by HEN1/SUPPRESSOR1 in *Arabidopsis*. *Current Biology* 22:695-700.
- Reyes-Pérez N., N. Marbán-Mendoza, F. Delgadillo-Sánchez y R. de-la-Torre-Almaráz (2003) Variabilidad en aislamientos de *Sclerotium cepivorum* Berk y su relación con ARN de doble cadena. *Agrociencia* 37:495-502.
- Roether S. and G. Meister (2011) Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* 93:1905-1915.
- Saini H. K., S. Griffiths-Jones and A. J. Enright (2007) Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19-24.
- Selker E. U. (1990) Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annual Review of Genetics* 24:579-613.
- Shabalina S. A. and E. V. Koonin (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology and Evolution* 23:578-587.
- Shao F. and S. Lu (2013) Genome-wide identification, molecular cloning, expression profiling and posttranscriptional regulation analysis of the Argonaute gene family in *Salvia miltiorrhiza*, an emerging model medicinal plant. *BMC Genomics* 14:512.
- Shimura H., V. Pantaleo, T. Ishihara, N. Myojo, J. Inaba, K. Sueda, J. Burguán and C. Masuta (2011) A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathogens* 7:1002021.
- Shivaprasad P. V., R. Rajeswaran, T. Blevins, J. Schoelz, F. Meins, T. Hohn and M. M. Pooggin (2008) The CaMV transactivator/viropasmin interferes with RDR6-dependent trans-acting and secondary siRNA pathways in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 36:5896-5909.
- Smith N. A., A. L. Eamens and M. B. Wang (2011) Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathogens* 7:e1002022.
- Staiger D., C. Korneli, M. Lummer and L. Navarro (2013) Emergin role for RNA-based regulation in plant immunity. *New Phytologists* 197:394-404.
- Steeves R. M., R. de Bruin, S. Kenter, R. van der Hoorn and R. van Blokland (2006) Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. *Functional Plant Biology* 33:991-999.
- Streitner C., C. G. Simpson, P. Shaw, S. Danisman, J. W. S. Brown and D. Staiger (2013) Small changes in ambient temperature affect alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior* 8:e24638.1-e24638.7.
- Sunkar R., Y. F. Li and G. Jagadeeswaran (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Science* 17:196-203.
- Sunkar R. and J. K. Zhu (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2001-2019.
- Tarver J. E., P. C. J. Donoghue and K. J. Peterson (2012) Do miRNAs have a deep evolutionary history? *Bioessays* 34:857-866.
- Tolia N. H. and L. Joshua-Tor (2007) Slicer and the argonauts. *Nature Chemical Biology* 3:36-46.
- Turner C. T., M. W. Davy, R. M. MacDiarmid, K. M. Plummer and N. P. Birch (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology* 15:383-391.
- Voinnet O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669-687.
- Wang L., J. Zheng, Y. Luo, T. Xu, Q. Zhang, L. Zhang, M. Xu, J. Wan, M. B. Wang, C. Zhang and Y. Fan (2013) Construction of a genomewide RNAi mutant library in rice. *Plant Biotechnology Journal* 11:997-1005.
- Wang M. B., X. Y. Bian, L. M. Wu, L. X. Liu, N. A. Smith and D. Isenberger (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3275-3280.
- Wang Y., H. Zhang, H. Li and X. Miao (2011) Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS ONE* 6:e18644.
- Wilson R. C. and J. A. Doudna (2013) Molecular Mechanism of RNA Interference. *Annual Review of Biophysics* 42:217-239.
- Yadav B. C., K. Veluthami and K. Subramaniam (2006) Host-generated double-stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemical Parasitology* 148:219-222.
- Yang Y., J. Zhong, Y. D. Ouyang and J. Yao (2013) The integrative expression and co-expression analysis of the AGO gene family in rice. *Gene* 528:221-235.
- Zha W., X. Peng, R. Chen, B. Du, L. Zhu and G. He (2011) Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE* 6:e20504.
- Zhang X., H. Zhao, S. Gao, W. C. Wang, S. Katiyar-Agarwal, H. D. Huang, N. Raikhel and H. Jin (2011) *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393-mediated silencing of a Golgi localized SNARE gene, MEMB12. *Molecular Cell* 42:356-366.
- Zhou Y., J. H. Chan, A. Y. Chan, R. K. Chak, E. Y. Wong, M. L. Chye, J. S. Peiris, L. L. Poon and E. Lam (2004) Transgenic plant-derived siRNAs can suppress propagation of influenza virus in mammalian cells. *FEBS Letters* 577:345-350.
- Zhu F., J. Xu, R. Palli, J. Ferguson and S. R. Palli (2011) Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science* 67:175-182.