

# Ingeniería genética vegetal para resistencia viral y vectores virales en genética reversa

## Plant genetic engineering for viral resistance and viral vectors in reverse genetics

Giovanni Chaves-Bedoya<sup>1\*</sup>, Luz Y. Ortiz-Rojas<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Licenciado en Biología, PhD, <sup>2</sup>Licenciada en Química, MSc

\*Grupo de Investigación Bioqfismol, Facultad de Ciencias Básicas e Ingenierías.  
Universidad de los Llanos. Email: gchavesbe@gmail.com

*Recibido: Febrero 17 de 2011. Aceptado: Agosto 11 de 2011*

### RESUMEN

El mecanismo natural de defensa de las plantas conocido como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), es mediado por pequeñas moléculas de ARN que participan en una interacción de manera específica de secuencia para inhibir la expresión génica por medio del silenciamiento del ARN. El principio de este mecanismo ha mostrado ser una excelente estrategia en el control de enfermedades de plantas causadas por virus y su importancia radica en que en la actualidad no existen métodos efectivos y amigables al ambiente para controlar muchos de los virus de plantas. La naturaleza misma del PTGS permite además conocer la función de genes a través de la genética reversa mediante el empleo del silenciamiento inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés) o por ARN de interferencia (ARNi). VIGS es especialmente útil para el estudio de genes en especies de cultivo. En este escrito se presenta brevemente la manera cómo actúa el sistema de silenciamiento genético mediado por ARN y las posibles aplicaciones que puede tener en el diseño de estrategias de control viral.

**Palabras claves:** ARN de interferencia, VIGS, virus vegetal.

### ABSTRACT

Plants' natural defence mechanism, known as post-transcriptional gene silencing (PTGS), is mediated by small RNA molecules involved in a sequence-specific interaction to inhibit gene expression through RNA silencing. The principle of this mechanism has proven to be an excellent strategy for controlling plant diseases caused by viruses, its importance lying in the fact that currently there are no effective and environmentally-friendly methods for controlling many plant viruses. The nature of PTGS allows ascertaining gene function through reverse genetics by using virus-induced gene silencing (VIGS,) or by RNA interference (iRNA). VIGS is particularly useful for studying genes in crop species. This paper briefly presents how RNA-mediated gene silencing works and its possible applications in designing viral control strategies.

**Key words:** Interference RNA, VIGS, plant virus.

## INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta el principio del silenciamiento de genes inducido por ácido ribonucleico (ARN) y su aplicación a la biotecnología de plantas a través de la ingeniería y la transformación genética, tenemos que reconocer que los resultados obtenidos con el silenciamiento de genes por ARN, manifestados entre otros como una variación en fenotipos visibles, han contribuido de manera significativa en el entendimiento de este fenómeno biológico. Con los diferentes eventos de silenciamiento logrados por los varios métodos existentes y establecidos en varias especies, en el presente y hacia el futuro sería posible inducir silenciamiento de genes de manera rutinaria. Sin embargo, aún faltan muchos estudios que permitan establecer una metodología confiable para la biotecnología de plantas (Small, 2007). Entonces la pregunta sería, qué se requiere abordar en el proceso de investigación que nos lleve a implementar una tecnología de silenciamiento de genes en plantas que permita asociarla a productos biotecnológicos?. Un aspecto a considerar es evitar el silenciamiento de aquellos genes que no son el objetivo del silenciamiento mismo, como se ha reportado en diferentes estudios tanto en animales como en plantas (Echeverri et al., 2006; Kulkarni et al., 2006). La principal dificultad en este sentido es la especificidad de los pequeños ARN interferentes (siRNA), ya que tan solo una complementariedad de siete nucleótidos entre los siARNs y el ARN mensajero (mARN) puede desencadenar la inhibición de la expresión (Small, 2007). Aspectos similares pueden ocurrir por la vía del silenciamiento transitivo de genes en el que un ARN interferente (iARN) dirigido contra una secuencia génica específica se propaga a regiones génicas vecinas de ARN mensajeros (mARNs) relacionados, los cuales también pueden ser silenciados de manera indirecta (Bleys et al., 2006a; Bleys et al., 2006b).

Suponiendo que la tecnología se logre aplicar con herramientas de silenciamiento estables y usar de manera repetible y rutinaria en biotecnología de plantas, una aplicación importante directa y de gran beneficio, es la eliminación de características

de susceptibilidad a un gran rango de virus de importancia económica. Por ejemplo, el silenciamiento de genes en la planta cuyo producto proteico las hacen compatibles con los virus que las infectan originándose la enfermedad, o el silenciamiento mismo de genes virales que codifican proteínas de importancia para el virus cuyo silenciamiento evitaría la replicación e infección viral. Con los grandes avances en la identificación de perfiles de expresión de muchos genes en uno o pocos experimentos, no será una sorpresa que en muy poco tiempo se descubran las respuestas pertinentes para mejorar la eficiencia de la metodología del silenciamiento de genes por ARN para la aplicación en la biotecnología mediante la obtención de fenotipos visibles y estables de interés comercial. El concepto de obtener resistencia a los virus por transformación con genes derivados del genoma del patógeno vegetal es un proceso altamente efectivo para combatir los virus como agentes causales de enfermedades en plantas. Uno de los objetivos importantes de la investigación actual es desarrollar nuevos métodos biotecnológicos para la protección de plantas contra las enfermedades de virus basados en el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés). El PTGS involucra la degradación de ARN específico de secuencia en el citoplasma y es mediado por siARNs. El primer ejemplo reportado en la literatura acerca del PTGS, se remonta a experimentos realizados con petunia (*Petunia hybrida*) (Napoli et al., 1990) en el que la sobre expresión del gen *chalcone synthase-A* (CHS-A) originó la producción de flores blancas o con sectores blancos en petunias transformadas, debido a que la producción del pigmento se había inhibido porque la CHS realiza un paso esencial en la biosíntesis de antocianinas responsables de la coloración.

La intención de este escrito es presentar brevemente la manera como actúa el sistema de silenciamiento genético mediado por ARN en plantas y las posibles aplicaciones que puede tener en el diseño de estrategias de control viral en sistemas vegetales.

## Ingeniería genética como estrategia para generar resistencia a virus en plantas

Los virus están entre los grupos de patógenos vegetales más importantes y biológicamente intrigantes. Las enfermedades vegetales originadas por virus causan pérdidas económicas serias en muchos cultivos importantes, reduciendo la producción y calidad de los mismos. A pesar de que los virus son entidades genéticas relativamente simples, se desconoce acerca de los mecanismos por los cuales muchos síntomas de la enfermedad son generados (Kang *et al.*, 2005). Los virus pueden infectar organismos que van desde bacterias hasta animales y plantas superiores. Las bacterias contrarrestan la infección con endonucleasas que cortan al ADN viral, los mamíferos contrarrestan la infección mediante anticuerpos y linfocitos que están adaptados a ciertos antígenos virales, pero ninguno de estos mecanismos de defensa existe en plantas (Waterhouse and Fusaro, 2006). En términos generales, es menos conocido que las plantas también pueden protegerse de ataques virales por medio de la denominada protección cruzada, reportada por primera vez a comienzos de los años veinte. En este mecanismo, la planta que ha sido inoculada con una cepa viral no tan severa puede protegerse posteriormente de una cepa viral más agresiva. Esta fue probablemente la primera observación del mecanismo intrínseco de defensa de la planta contra los virus, la cual, 75 años después apenas comenzó a ser elucidada desde un punto de vista molecular (Waterhouse *et al.*, 2001).

El conocimiento de los mecanismos moleculares de la protección cruzada, junto a la primera indicación de que las plantas podían ser transformadas con construcciones génicas (un transgen), trajo consigo la promesa de una nueva era de protección vegetal. El descubrimiento que un transgen puede también afectar la infección de virus de ARN si el transgen y el virus comparten homología significativa de secuencia conllevó a un modelo de degradación del ARN mediado por la planta como mecanismo de defensa (Dougherty *et al.*, 1994). Sin embargo, a nivel molecular el transgen no es requerido para desencadenar un

ruta de defensa de la planta ya que plantas no transgénicas se recuperan luego de infecciones virales de manera similar a lo observado en el silenciamiento de ARN en plantas transgénicas (Al-Kaff *et al.*, 1998). La naturaleza de la recuperación se entendió una vez que la respuesta se asoció con una señal de silenciamiento que se podía difundir en la planta, es decir, que la señal podía moverse de manera sistémica en la planta, ir desde un punto de origen de la señal y “moverse” a toda la planta, a lo que se le denominó silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés). El PTGS es básicamente un fenómeno epigenético que resulta en la degradación de secuencias específicas de ARNs mensajeros (pos transcripción) endógenos, y puede ser inducido por virus, transgenes o genes endógenos. Fue descrito primero en plantas y referido como cosupresión (Napoli *et al.*, 1990), después fue identificado en hongos y se denominó “quelling” y en animales se denominó ARN de interferencia (Fire *et al.*, 1998). El PTGS se caracteriza por la ausencia de acumulación de transcritos de un gen endógeno o de un transgen cuando se introduce una secuencia que comparte homología a ese gen o transgen (Burch-Smith *et al.*, 2004). Una vez que se ha desencadenado el PTGS, el ARN con homología al inductor es degradado de una manera altamente específica. Para ejemplificar el mecanismo de silenciamiento sistémico del ARN mencionado, se presenta en la figura 1, adaptada de (Voinnet, 2005), un experimento en plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus sigla en Inglés), inoculadas con una construcción GFP.

### ARN de interferencia (iARN)

El ARN desempeña diferentes tareas que van desde la regulación de la expresión génica hasta actividades catalíticas. En plantas existen diferentes clases de siARNs que se derivan de ARNs de doble cadena más largos, de manera similar como ocurre en la replicación de virus con genomas de ARN, los cuales son sintetizados por ARN polimerasas (Zheng *et al.*, 2010). La esencia del iARN, es la liberación de ARNs de doble cadena como activadores potenciales del silenciamiento

de ARN en un organismo o célula con el propósito de desencadenar una degradación específica de secuencia de ARNs homólogos (Tenllado *et al.*, 2004). En el caso del ARN mensajero (ARNm), el ARNm de doble cadena no puede ser reconocido por la maquinaria de síntesis de proteínas (los ribosomas), y de esta manera la expresión del mensajero es suprimida. Adicionalmente, el ARNm de doble cadena es muy inestable y se degrada rápidamente. La técnica de iARN se está empleando para diferentes aplicaciones a nivel biotecnológico entre ellas la resistencia en plantas de cultivo de importancia económica a diferentes virus comunes (Chiang *et al.*, 2001; Zadeh and Foster, 2004; Fahim *et al.*, 2010).

El iARN es un mecanismo de silenciamiento génico mediado por ARNs pequeños y es ampliamente distribuido a través de la mayoría de eucariotas. El ARN de doble cadena puede llegar a la planta por medio de la transformación estable con transgenes que expresan un ARN auto complementario (Tenllado *et al.*, 2004).

Durante los últimos años ha habido una considerable investigación acerca de la resistencia a virus vegetales mediada por transgenes, silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), supresión antisentido o sentido y PTGS (Waterhouse *et al.*, 2001; Sels *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Constantin *et al.*, 2008; Lacomme and Chapman, 2008; Liu and Page, 2008; Velasquez *et al.*, 2009). Todo parece indicar que cada una de estas estrategias ha adaptado un sistema de degradación de ARN, similar al mediado por el iARN en animales (Waterhouse and Fusaro, 2006). El silenciamiento de los genes es logrado por el procesamiento de ARNs de doble cadena en pequeños ARNs interferentes mediado por la enzima DICER (Jaskiewicz and Filipowicz, 2008). Este proceso fue descubierto como una consecuencia inesperada de la transgénesis en plantas (Lecellier and Voinnet, 2004). La primera indicación de un papel biológico para el iARN en plantas fue proporcionada cuando los virólogos intentaban sobre expresar ciertos genes vegetales en vectores virales recombinantes e inesperadamente sucedió la degradación antes que la sobre expresión del ARN mensajero en estudio (Dunoyer *et al.*, 2006).

El iARN es usado de manera amplia para silenciar genes en plantas y animales y ahora se sabe que la molécula que desencadena el iARN es un ARN de doble cadena. En el caso de la infección viral en plantas, el ARN de doble cadena está asociado con la fase replicativa del ciclo de vida de los virus de ARN. Para el caso de transgenes, el ARN de doble cadena puede ser generado por la acción de ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRp). Los transgenes que se insertan para formar repetidos en tandem invertidos también pueden producir ARNs de doble cadena después de la transcripción (Burch-Smith *et al.*, 2004). El ARN de doble cadena (dsARN) en un desencadenador efectivo del silenciamiento del ARN en vertebrados, invertebrados y en plantas. Este silenciamiento opera por la degradación de ARN específico de secuencia. En plantas, un método particularmente efectivo de silenciamiento de un gen endógeno o de un gen viral, es la transformación de la planta con un vector que codifique para un ARN hairpin (hpARN) el cual consiste de una repetición invertida de una porción de la secuencia génica que es el objetivo del silenciamiento, separada por un segmento de material espaciador, generalmente un intrón, el cual incrementa la frecuencia de obtener el silenciamiento (Eamens and Waterhouse, 2011).

El silenciamiento de ARN se ha adoptado para desarrollar plantas resistentes a los virus a través de la expresión de hpARNs derivados de ARNs. Debido a la alta especificidad de secuencia del silenciamiento de ARN, esta tecnología se ha aplicado efectivamente contra virus. Los ARN de doble cadena del tipo hpARN (horquilla) auto complementarios (figura 2), producidos durante los pasos intermedios de la replicación del genoma, son los principales desencadenadores de los mecanismos de silenciamiento de ARN (Vazquez Rovere *et al.*, 2002). En los últimos años se está aplicando la tecnología del silenciamiento de ARN mediada por hpARN para obtener plantas resistentes a virus (Di Nicola-Negri *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007), reportándose en todos los casos que estas construcciones pueden inducir silenciamiento génico postranscripcional con casi un 100 por

ciento de eficiencia cuando están dirigidas contra virus o genes endógenos (Smith *et al.*, 2000). La transformación de plantas con construcciones ARN hairpin además ha sido usada para descubrir o validar la función de los genes (Fusaro *et al.*, 2006), pero también son valiosas en genética reversa, genómica e ingeniería de rutas metabólicas (Smith *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Sliva and Schnierle, 2010). Estas construcciones génicas que contienen casetes de expresión de repetidos invertidos son mucho más eficientes que el silenciamiento mediado por construcciones sentido o antisentido (Hu *et al.*, 2011).

En el mecanismo del iARN, la enzima DICER, del tipo RNasa-III, procesa el ARN de doble cadena exógeno en piezas de pequeños ARNs interferentes (siRNA) (figura 2). Durante el proceso, una cadena de cada duplexo del ARN de doble cadena se incorpora dentro de un gran complejo ribonucleoprotéico denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), el cual guiado por los siARN asociados, reconoce y destruye los ARNs virales (Waterhouse *et al.*, 2001; Waterhouse and Helliwell, 2003; Dunoyer *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; Waterhouse and Fusaro, 2006). La caracterización bioquímica del complejo RISC aislado en *Drosophila*, reveló que contiene varias proteínas, entre las cuales está la Argonauta2 (Ago2), una proteína homóloga del factor del inicio de la transcripción eIF2C. Ago2 contiene además un dominio PAZ (PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE), cuya función es mediar la interacción DICER-RISC. Se piensa que con esta interacción, los ARNs pequeños interferentes generados por DICER son incorporados dentro del complejo RISC y luego guiados a la degradación de secuencias de ARN mensajero de manera específica de secuencia (Salomon *et al.*, 2010). Al parecer un siARN de 21-24 nucleótidos es suficiente para guiar el corte de los ARNs homólogos al complejo RISC (Dunoyer *et al.*, 2005). Los ARNs de 21-24 nt de longitud en la orientación sentido se pueden encontrar en igual abundancia tanto en plantas como en animales. En la figura 3 se representa como actúa el mecanismo de defensa vegetal antiviral mediado por DICER.

Al contrario de los animales que poseen solamente un gen DICER (DCL), en plantas como *Arabidopsis*, modelo de estudio por excelencia, o arroz, se presentan cuatro y cinco enzimas DCL respectivamente. En *Arabidopsis*, DCL1 produce micro ARNs (Park *et al.*, 2002), DCL2 genera transcritos de ARNs interferentes antisentido naturales relacionados con el estrés (Borsani *et al.*, 2005) y siARNs contra virus (Akbergenov *et al.*, 2006), DCL3 produce siARNs de aproximadamente 24 nucleótidos que están involucrados en la metilación de la heterocromatina (Xie *et al.*, 2005) y DCL4 genera siARN, involucrados en el iARN (Dunoyer *et al.*, 2005; Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005). En general, los pequeños ARNs silenciadores en plantas y animales, incluyen los microARNs (miARNs) y los pequeños ARNs interferentes (siARNs), los cuales desempeñan funciones importantes en el desarrollo y la respuesta a patógenos y estrés. Los miARNs son fundamentalmente elementos regulatorios específicos de secuencia de los genomas eucariotas. Tanto los miARNs como los siARNs parecen estar íntimamente relacionados en términos de sus orígenes y modos de operación a través de proteínas efectoras relacionadas o idénticas (Voinnet, 2009). Los siARNs endógenos (endo-siARNs) son similares a los miARNs en su dependencia de DICER para la biogénesis, y en los efectos reguladores postranscripcionales, pero a diferencia de los miARNs, los siARNs se originan de largos precursores de ARN de doble cadena (dsARNs). Los siARNs son abundantes en eucariotas inferiores y en plantas, mientras que en mamíferos, se encuentran restringidos a ciertos tejidos como el ovario (Young-Kook *et al.*, 2010).

### **iARN y vectores de silenciamiento viral**

El descubrimiento del mecanismo de iARN se ha convertido paulatinamente en la principal herramienta que utiliza la ingeniería genética para desarrollar vectores con la información necesaria, que permite expresar alguna proteína de origen viral en plantas genéticamente modificadas, con el propósito de contrarrestar el ataque de plagas o enfermedades causadas por virus (Palukaitis and Zaitlin, 1997; Chiang *et al.*, 2001; Germundsson

and Valkonen, 2006). En la mayoría de los casos, para gran parte de virus vegetales, la expresión de la secuencia de la proteína de la cubierta (CP) es la más utilizada para este propósito (Farinelli and Malnoe, 1993; Reimann-Philipp and Beachy, 1993; Hackland *et al.*, 1994; Chowrira *et al.*, 1998; Beachy, 1999; Han *et al.*, 1999; Savenkov and Valkonen, 2001). En algunos casos, la expresión de la proteína ha sido la responsable de la resistencia (Powell *et al.*, 1990), pero en otros se ha demostrado que la resistencia ocurre a nivel de ARN (Lindbo and Dougherty, 1992; Baulcombe, 1996), lo cual se relaciona con el PTGS, ya que la degradación de ARNs virales se desencadena en el momento de formarse duplexos de ARN. Los ARN de doble cadena que se forman como intermediarios de la replicación viral deben ser procesados de tal manera que los ARNs pequeños interferentes en la célula infectada corresponderán a las partes del genoma viral, incluyendo cualquier inserto no viral. De esta manera, si el inserto es de un gen del hospedante, el ARN pequeño interferente llevará el complejo ARNasa al ARN mensajero correspondiente del hospedante y los síntomas en la planta infectada reflejarán la pérdida de función de la proteína codificada (Lu *et al.*, 2003).

La investigación en el mecanismo de PTGS y la resistencia natural vegetal a los virus, comenzó a convergir en estudios del mecanismo de recuperación en plantas transgénicas infectadas con virus. Este fenómeno fue descubierto en el curso de experimentos en plantas de tabaco que llevaban un transgen codificando la proteína de la cubierta del virus del jaspeado del tabaco (TEV). Cuando estas líneas transgénicas fueron infectadas con TEV, los síntomas inicialmente fueron aparentes en las hojas inoculadas, pero progresivamente iban desapareciendo en las nuevas hojas, las cuales además eran específicamente resistentes a nuevas inoculaciones con TEV. En los nuevos tejidos emergentes, el ARN mensajero del transgen de la proteína de la cubierta era degradado a un nivel postranscripcional, confiriendo resistencia al virus inductor. Posteriormente se mostró que los virus recombinantes podían desencadenar el silenciamiento de ARN mensajeros endógenos en plantas no transgénicas, en un proceso actualmente

referido como silenciamiento génico inducido por virus VIGS. VIGS se ha desarrollado como una tecnología que explota el mecanismo de defensa antiviral mediada por ARN. En plantas infectadas con virus no modificados, el mecanismo es específicamente desencadenado contra el genoma viral. Sin embargo, con virus vectores que llevan insertos derivados de genes del hospedante el proceso puede ser adicionalmente desencadenado contra el correspondiente ARN mensajero. VIGS ha sido usado ampliamente en plantas para el análisis de la función génica (Lu *et al.*, 2003).

Hasta ahora la mayoría de las aplicaciones de VIGS han sido estudiadas en plantas de tabaco (*N. Benthamiana*). Por razones que no son completamente entendidas, *N. benthamiana* es susceptible a un inusual rango de virus, y los síntomas de la infección son generalmente mucho más pronunciados y más persistentes que en otras plantas, incluyendo *N. tabacum*. Sin embargo VIGS puede ser aplicado a otras especies. Hay que tener presente que el vector viral para VIGS debe cumplir un equilibrio, no ser tan infectivo para que no produzca síntomas en la planta, pero no tan atenuado, de tal manera que se alcance a replicar. VIGS ha sido usado para silenciar una amplia variedad de genes en plantas. Hay reportes en los que se ha combinado VIGS con análisis bioquímicos y genéticos para determinar la función de un gen y ha sido especialmente poderoso para establecer los componentes de señalización en la resistencia a enfermedades (Robertson, 2004).

Diferentes virus de ARN y ADN han sido modificados para servir como vectores para la expresión génica. El virus del mosaico del tabaco (TMV) fue el primer vector viral usado para desencadenar con éxito VIGS de un gen endógeno en una especie vegetal (Kumagai *et al.*, 1995). El virus X de la papa, PVX, fue el siguiente vector viral usado para llevar un gen dentro de la célula vegetal y desencadenar silenciamiento vía VIGS (Ruiz *et al.*, 1998). Posteriormente se reportó al virus del cascabeleo del tabaco (TRV) como inductor de VIGS en diferentes sistemas (Dalmay *et al.*, 2000; Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002). El uso de vectores virales para silenciar genes vegetales endógenos, requiere

la clonación de fragmentos génicos homólogos dentro del virus sin comprometer la replicación y movimiento viral. La mayoría de virus son de ARN de cadena positiva, pero otros como son de ADN como el virus del mosaico dorado del tomate (TGMV). Aunque los virus de ARN se replican en el citoplasma, los virus de ADN se replican en el núcleo vegetal usando la maquinaria de replicación del ADN del hospedante y ambos tipos de virus inducen silenciamiento de genes endógenos.

Desafortunadamente hay complicaciones para la aplicación de VIGS porque involucra el uso de patógenos vegetales genéticamente modificados y deben ser manejados con estricto control. Sin embargo, hay varias ventajas de VIGS sobre otras tecnologías de silenciamiento génico que involucran plantas transgénicas con repeticiones inversas de gen. Primero, las construcciones pueden ser ensambladas por clonación directa en el virus vector y no involucra el ensamble de repeticiones invertidas que pueden ser inestables durante la propagación en bacterias. Segundo, el procedimiento es rápido, ya que las construcciones de vectores virales pueden ensamblarse en pocos días y el fenotipo VIGS desarrollarse en una o dos semanas y tercero su condición natural.

El silenciamiento de genes es la estrategia mas frecuentemente usada en genética reversa para inferir acerca de la función de un gen empezando por su secuencia y VIGS puede ser muy útil para este propósito (Benedito *et al.*, 2004). En genética reversa, un gen se interrumpe de tal manera que el efecto de su perdida (si lo hay) en un organismo puede ser observado (Waterhouse and Helliwell, 2003). Una ventaja del uso de virus para la genética reversa es que aun los cultivos mas difíciles de transformar son susceptibles a los virus, los cuales a su vez pueden ser potenciales vectores de silenciamiento. Las técnicas de silenciamiento génico tradicionales usan la transformación como un sistema de entrega, lo que generalmente requiere cultivo de tejidos para regenerar las mutantes silenciadas. El sistema VIGS facilita y acelera el análisis de la función génica sin los requerimientos de los procedimientos de transformación y cultivo de tejidos, ya que puede ser aplicado *ex vitro* en plantas apagando genes de

manera específica y eficiente permitiendo un monitoreo rápido (Benedito *et al.*, 2004). Una vez el sistema VIGS esta identificado y optimizado, se pueden probar genes ortólogos de sistemas modelo de conservación de la función porque es posible que genes similares produzcan proteínas que adquieren diferentes funciones en diferentes plantas (Robertson, 2004).

### **Los virus codifican proteínas silenciadoras del PTGS**

De manera natural las plantas que son deficientes o mutantes para los genes *sgs2/sde1* (codifican para una ARN polimerasa dependiente de ARN), *sgs3* (gen de arabidopsis que codifica para una proteína sin similitud significativa a otra proteína conocida), *sde3* (gen que codifica para una ARN helicasa) y *ago1* (gen que controla el desarrollo), son híper susceptibles a la infección por virus como el virus del mosaico del pepino (CMV), lo que conlleva a una híper acumulación de su ARN en la planta. Sin embargo, el ARN de virus como potyvirus, tobamovirus o tobavirus se acumula en el mismo nivel en las plantas tipo silvestre, es decir, plantas que no presentan deficiencias o que no son mutantes para los genes mencionados (Vaucheret *et al.*, 2001).

Los virus son tanto los inductores como el blanco del PTGS, pero los virus no son pasivos frente a estas defensas vegetales, y han evolucionado proteínas que pueden actuar como supresores del PTGS. Se sabe que la mayoría de virus que infectan plantas tienen genomas de ARN, los cuales son fácilmente reconocidos por la maquinaria de silenciamiento de ARN de la planta. En consecuencia, los virus vegetales han sido forzados a desarrollar respuestas contra el silenciamiento de ARN con el propósito de sobrevivir y replicarse en el hospedero. El mecanismo de contra ataque se da con proteínas específicas codificadas por el virus con funciones alternas, como por ejemplo la proteína del componente ayudador (HC-Pro) de potyvirus, que interfieren con el sistema de defensa de la planta en los diferentes pasos de la ruta del PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 2000). De manera colectiva, estas proteínas se conocen como supresoras del silenciamiento porque pueden interferir de manera efectiva con el ARN silenciador (Giner *et al.*, 2010).

La primera indicación de que los virus codifican supresores del silenciamiento, se derivó de observaciones experimentales encaminadas al entendimiento del fenómeno de sinergismo. El sinergismo es la acentuación de síntomas de un virus causada por la coinfección de un segundo virus no relacionado. Por ejemplo, las infecciones entre el virus X de la papa (PVX), un potexvirus y el virus Y de la papa (PVY), un potyvirus, resultan en síntomas mucho más severos que aquellos producidos por cada virus de manera individual. Los análisis moleculares indicaban que en los tejidos coinfectados, los niveles de PVX, pero no de PVY habían sido incrementados (Vance *et al.*, 1995). Estos descubrimientos sugerían que un factor producido por PVY era el responsable del incremento de los niveles de PVX y la acentuación de los síntomas de la enfermedad.

Varios virus que infectan plantas codifican proteínas supresoras del silenciamiento entre las que se encuentran la proteína 2b de cucumovirus (Li and Ding, 2006), la proteína NS1 en la familia *Orthomyxoviridae* (Li *et al.*, 2004), la proteína B2 en la familia *Nodaviridae* (Fenner *et al.*, 2006), las proteínas P19 y P14 de los

géneros tombusvirus y aureusvirus en la familia *Tombusviridae* (Voinnet *et al.*, 1999; Merai *et al.*, 2005), la proteína AC2 y sus homólogas en la familia *Geminiviridae* (Bisaro, 2006), y las proteínas ricas en cisteínas de los furovirus, hordeiviruses, pecluviruses y tobnavirus (Li and Ding, 2006)

A modo de ejemplo se presenta en la figura 4 el mecanismo de acción de supresión del silenciamiento que se ha propuesto para la proteína HC-Pro de potyvirus. Estas proteínas supresoras no se producen hasta después que el virus ha comenzado a replicarse en las células infectadas, así que no causan supresión completa del mecanismo de defensa basado en ARN. Sin embargo, estas proteínas influirán en la concentración de la acumulación final del virus. Las proteínas supresoras fuertes permitirán que la acumulación viral sea prolongada y en un alto nivel; por el contrario, si un virus las acumula en niveles bajos puede ser debido a la débil actividad del supresor (Lu *et al.*, 2003). Al parecer la planta como respuesta a las proteínas supresoras del silenciamiento viral presentan rutas alternas para el procesamiento de ARNs de doble cadena (Mette *et al.*, 2001).

## CONCLUSIÓN

Históricamente el control de las enfermedades virales en plantas ha involucrado numerosas estrategias incluyendo el control de la población de los vectores usando insecticidas, el uso de material vegetal propagado libre de virus, prácticas culturales apropiadas y el uso de cultivares resistentes. A menudo, estas técnicas han sido combinadas para proporcionar una resistencia efectiva en campo. Recientemente los avances que se han tenido en la virología molecular vegetal han potenciado el entendimiento de la organización genómica viral y la función génica. Este conocimiento, y la ingeniería genética, se han combinado y permitido al hombre crear estrategias adicionales bastante efectivas en

el control de las enfermedades virales mediante el empleo de plantas transgénicas. El control eficiente de los virus que afectan especies de cultivo económicamente importantes representa uno de los principales desafíos en el desarrollo de medidas efectivas y sostenibles en sanidad vegetal. Como un complemento necesario a los métodos tradicionales de control viral, las tecnologías emergentes deben basarse en el mejor entendimiento de los mecanismos de defensa naturales de las plantas hospedantes y las estrategias que tienen los diferentes virus para contrarrestar estos mecanismos de defensa.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a los revisores anónimos por su lectura y valiosas recomendaciones a este escrito.

**REFERENCIAS**

- Akbergenov R, Si-Ammour A, Blevins T, Amin I, Kutter C, Vanderschuren H, Zhang P, Gruissem W, Meins F Jr, Hohn T, Pooggin MM. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:462-471.
- Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998;279: 2113-2115.
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM, Jr, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 2000;290: 142-144.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:13079-13084.
- Baulcombe DC. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell* 1996;8:1833-1844.
- Beachy RN. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354: 659-664.
- Benedito VA, Visser PB, Angenent GC, Krens FA. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet Mol Res* 2004;3: 323-341.
- Bisaro DM. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 2006;344:158-1168.
- Bleys A, Van Houdt H, Depicker A. Down-regulation of endogenes mediated by a transitive silencing signal. *Rna* 2006;12:1633-1639.
- Bleys A, Vermeersch L, Van Houdt H, Depicker A. The frequency and efficiency of endogene suppression by transitive silencing signals is influenced by the length of sequence homology. *Plant Physiol* 2006; 142:788-796.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 2005;123:1279-1291.
- Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J* 2004;39:734-746.
- Chen SM, Tao ZZ, Hua QQ, Liu D, Chi HM, Cai Q. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase in hep-2 cells using short hairpin RNA expression vectors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;132: 200-205.
- Chiang CH, Wang JJ, Jan FJ, Yeh SD, Gonsalves D. Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *J Gen Virol* 2001;82: 2827-2836.
- Chowrira GM, Cavileer TD, Gupta SK, Lurquin PF, Berger PH. Coat protein-mediated resistance to pea enation mosaic virus in transgenic *Pisum sativum* L. *Transgenic Res* 1998;7: 265-271.
- Constantin GD, Gronlund M, Johansen IE, Stougaard J, Lund OS. Virus-induced gene silencing (VIGS) as a reverse genetic tool to study development of symbiotic root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 2008;21: 720-727.
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000;101: 543-553.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 2006;313:68-71.

- Di Nicola-Negri E, Brunetti A, Tavazza M, Ilardi V. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res* 2005;14: 989-994.
- Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S, Proebsting WM. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 1994; 7: 544-552.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. 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. *Nat Genet* 2005;37: 1356-1360.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat Genet* 2006;38: 258-263.
- Eamens AL, Waterhouse PM. Vectors and methods for hairpin RNA and artificial microRNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Mol Biol* 2011;701: 179-197.
- Echeverri CJ, Beachy PA, Baum B, Boutros M, Buchholz F, Chanda SK, Downward J, Ellenberg J, Fraser AG, Hacohen N, Hahn WC, Jackson AL, Kiger A, Linsley PS, Lum L, Ma Y, Mathey-Prevot B, Root DE, Sabatini DM, Taipale J, Perrimon N, Bernards R. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods* 2006;3:777-779.
- Fahim M, Ayala-Navarrete L, Millar AA, Larkin PJ. Hairpin RNA derived from viral NIa gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. *Plant Biotechnol J* 2010;8:821-834.
- Farinelli L, Malnoe P. Coat protein gene-mediated resistance to potato virus Y in tobacco: examination of the resistance mechanisms—is the transgenic coat protein required for protection? *Mol Plant Microbe Interact* 1993;6: 284-292.
- Fenner BJ, Thiagarajan R, Chua HK, Kwang J. Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *J Virol* 2006;80: 85-94.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391: 806-811.
- Fuentes A, Ramos PL, Fiallo E, Callard D, Sanchez Y, Peral R, Rodriguez R, Pujol M. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 2006;15: 291-304.
- Fusaro AF, Matthew L, Smith NA, Curtin SJ, Dedic-Hagan J, Ellacott GA, Watson JM, Wang MB, Brosnan C, Carroll BJ, Waterhouse PM. RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep* 2006;7: 1168-1175.
- Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H. Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 2005;15:1494-1500.
- Germundsson A, Valkonen JP. P1- and VPg-transgenic plants show similar resistance to Potato virus A and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance. *Virus Res* 2006;116: 208-213.
- Giner A, Lopez-Moya JJ, Lakatos L. RNA silencing in plants and the role of viral suppressors. In: Martinez MA. (Ed.), *ARN interference and viruses. Current innovations and future trends*. Caister Academic press, Norfolk, UK, 2010; pp 25 - 47.
- Hackland AF, Rybicki EP, Thomson JA. Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. *Arch Virol* 1994;139:1-22.
- Han SJ, Cho HS, You JS, Nam YW, Park EK, Shin JS, Park YI, Park WM, Paek KH. Gene silencing-mediated resistance in transgenic tobacco plants carrying potato virus Y coat protein gene. *Mol Cells* 1999;9: 376-383.
- Hu Q, Niu Y, Zhang K, Liu Y, Zhou X. Virus-derived transgenes expressing hairpin RNA give immunity to Tobacco mosaic virus and Cucumber mosaic virus. *Virol J* 2011;8: 41.

- Jaskiewicz L, Filipowicz W. Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;320: 77-97.
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM. Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43: 581-621.
- Kulkarni MM, Booker M, Silver SJ, Friedman A, Hong P, Perrimon N, Mathey-Prevot B. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat Methods* 2006;3: 833-838.
- Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 1679-1983.
- Lacomme C, Chapman S. Use of potato virus X (PVX)-based vectors for gene expression and virus-induced gene silencing (VIGS). *Curr Protoc Microbiol* Chapter 16 (2008) Unit 16I 1.
- Lecellier CH, Voinnet O. RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol Rev* 2004;198:285-303.
- Li F, Ding SW. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 2006;60: 503-531.
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, Garcia-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 1350-1355.
- Lindbo JA, Dougherty WG. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 1992;189: 725-733.
- Liu E, Page JE. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. *Plant Methods* 2008;4:5.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 2002;31: 777-786.
- Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 2003;30: 296-303.
- Merai Z, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Valoczi A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyan J, Silhavy D. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol* 2005;79: 7217-7226.
- Mette MF, Matzke AJ, Matzke MA. Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing. *Curr Biol* 2001;11: 1119-1123.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990;2:279-289.
- Palukaitis P, Zaitlin M. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Adv Virus Res* 1997;48: 349-377.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 2002;12: 1484-1495.
- Powell PA, Sanders PR, Turner N, Fraley RT, Beachy RN. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 1990;175: 124-130.
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 2001; 25: 237-245.
- Reimann-Philipp, U. and Beachy, R.N.: Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters. *Mol Plant Microbe Interact* 1993;6: 323-330.
- Robertson D. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol* 2004;55: 495-519.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 1998;10: 937-946.
- Salomon W, Bullock K, Lapierre J, Pavco P, Woolf T, Kamens J. Modified dsRNAs that are not processed

- by Dicer maintain potency and are incorporated into the RISC. *Nucleic Acids Res* 2010;38: 3771-3779.
- Savenkov EI, Valkonen JP. Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J Gen Virol* 2001;82: 2275-2278.
- Sels J, Delaure SL, Aerts AM, Proost P, Cammue BP, De Bolle MF. Use of a PTGS-MAR expression system for efficient in planta production of bioactive *Arabidopsis thaliana* plant defensins. *Transgenic Res* 2007;16: 531-538.
- Sliva K, Schnierle BS. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virol J* 2010;7: 248.
- Small I. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18: 148-153.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 2000;407: 319-320.
- Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz JR. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Res* 2004;102: 85-96.
- Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM. 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 1995;206: 583-590.
- Vaucheret H, Beclin C, Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* 2001;114: 3083-3091.
- Vazquez Rovere C, del Vas M, Hopp HE. RNA-mediated virus resistance. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13: 167-72.
- Velásquez AC, Chakravarthy S, Martin GB. Virus-induced Gene Silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and Tomato. *J. Vis. Exp.* (28), e1292, DOI: 10.3791/1292 (2009).
- Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 2005;6: 206-220.
- Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 2009;136: 669-687.
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1999; 96: 14147-14152.
- Waterhouse PM, Fusaro AF. Plant science. Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Science* 2006; 313: 54-55.
- Waterhouse PM, Helliwell CA. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 2003;4: 29-38.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001;411: 834-842.
- Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2005;102: 12984-12989.
- Yan F, Zhang WW, Xiao H, Li SF, Cheng ZM. [Transgenic wheat expressing virus-derived hairpin RNA is resistant to Barley yellow dwarf virus]. *Yi Chuan* 2007;29: 97-102.
- Young-Kook K, Inha H, V Narry K. Modifications of Small RNAs and Their Associated Proteins. *Cell* 2010;143:703-709.
- Yu Y, Fan J, Hui Y, Rouzer CA, Marnett LJ, Klein-Szanto AJ, FitzGerald GA, Funk CD. Targeted cyclooxygenase gene (ptgs) exchange reveals discriminant isoform functionality. *J Biol Chem* 2007;282: 1498-506.
- Zadeh AH, Foster GD. Transgenic resistance to tobacco ringspot virus. *Acta Virol* 2004;48:145-152.
- Zheng Q, Ryvkin P, Li F, Dragomir I, Valladares O, Yang J, Cao K, Wang LS, Gregory BD. PLoS Genet. 2010 September; 6(9): e1001141. Published online 2010 September 30. doi: 10.1371/journal.pgen.1001141.