

RNAi y agricultura: los retos modernos

Julien Assali & Pamela Pennington

Centro de Estudios en Biotecnología, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala

jpyves@uvg.edu.gt; pamelap@uvg.edu.gt

RESUMEN: La interferencia de ARN (RNAi por sus siglas en inglés) es un mecanismo de regulación de la expresión de genes que se descubrió hace menos de 20 años. Este proceso se encuentra en varias especies eucariotas, con excepción de las más primitivas y se puede usar para mejorar plantas. Esta revisión se enfoca sobre los usos y el mecanismo de la RNAi, y considera también algunos retos de la aplicación de este mecanismo.

PALABRAS CLAVE: interferencia por ARN, biotecnología, transformación de planta.

ABSTRACT: RNA interference (RNAi) is a mechanism for the regulation of gene expression that was discovered less than 20 years ago. This process is found in most of eukaryotes species except for the most primitive ones and can be used to improve crop species. This review focuses on the uses and the molecular pathway of RNAi. We also consider some challenges in the application of RNAi in crop species.

KEY WORDS: RNA interference, biotechnology, plant transformation.

Introducción

La interferencia de ARN fue observada accidentalmente en 1990 luego de experimentos diseñados para incrementar la producción de antocianina en petunias. Se esperaba que la sobreexpresión del gen de la sintasa de calcona resultara en flores más oscuras. Sin embargo, el fenotipo opuesto fue observado cuando la expresión del gen se redujo. A esto se le denominó una "co-supresión" del gen introducido artificialmente y del gen del hospedero.

El misterio detrás de la RNAi se logró comprender luego del trabajo de Fire et al en 1998. En dicho estudio, *Caenorhabditis elegans*, un nematodo modelo, fue expuesto a ARN de una hebra o dos hebras (ssRNA y dsRNA, por sus siglas en inglés,

respectivamente), para estudiar su efecto en la expresión génica. Ambas moléculas redujeron la expresión génica, pero el dsRNA fue más efectivo, resultando en silenciamiento completo.

Las vías de RNAi son complejas pero ofrecen gran potencial para el control artificial de la expresión génica. El silenciamiento génico puede ser usado en varias rutas y aplicado mediante diferentes técnicas de transformación. La agricultura es uno de los campos que se ha beneficiado de la RNAi de varias formas. El cuadro uno resume el mecanismo de la RNAi.

Existen varias técnicas para transformar plantas

Las plantas pueden ser transformadas de forma estable para presentar rasgos deseables. Una técnica común para transformación estable es el uso de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con un plásmido Ti modificado, conteniendo la secuencia de ADN de interés. (revisado por Anami et al, 2013). *Agrobacterium* es una bacteria que infecta e induce tumores en plantas. La bacteria transfiere el ADN dentro de su plásmido al genoma de la planta para inducir la producción de nutrientes por la célula vegetal. Esta técnica ha sido aplicada para transformar tomate, arroz, maíz y otras especies como el algodón.

En la planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, se ha desarrollado la transformación sumergiendo las flores en un cultivo de la bacteria según Clough and Bent en 1998. Sin embargo, la técnica es de baja eficiencia y, a excepción del trigo, no ha sido aplicada en la mayoría de especies agrícolas, las cuales producen menos semillas.

Agrobacterium tumefaciens permite la transformación de una gran gama de especies, pero requiere de tiempo y no está adaptada para expresión temporal de transgenes. Para resolver el problema, Klein y colegas exitosamente usaron bombardeo de partículas, conocido como biolística, para transformar maíz (Klein et al, 1988). Esta técnica usa partículas de tungsteno u oro recubiertas de ADN que es insertado mecánicamente en las células de las plantas por medio de proyección de partículas a alta velocidad. Esta técnica permite la selección de un tejido de plantas para su transformación (e.g. hojas), y toma solo unos segundos para transferir el ADN dentro de las células.

Agrobacterium rhizogenes es otra especie que afecta las raíces y no induce tumores en los tallos. Se ha usado en la investigación para generar plantas compuestas que tienen tallos no transformados pero generan algunas raíces transformadas. El amplio rango de hospederos de esta bacteria le hace un instrumento útil para inducir expresión génica no estable o silenciamiento. La transformación de raíces no requiere cultivo de tejidos previo a la infección.

Tenllado y colegas desarrollaron una técnica de transformación temporal que induce resistencia a virus en el tabaco a partir de extractos bacterianos. Los autores usaron una cepa de *Escherichia coli* con mutación en ARNasa III para inducir producción biológica de dsRNA contra dos virus de plantas, *Pepper mild mottle virus* y *Plum pox virus*. Utilizando un método sencillo de aspersión de lisados bacterianos, se indujo resistencia a los virus. Sin embargo, esta técnica está limitada en el tiempo, ya que la resistencia se perdió luego de siete días (Tenllado et al, 2003). Ver Cuadro 1.

Usos de RNAi en agricultura

La RNAi se ha aplicado en varias especies agrícolas para investigar funciones de genes y como un instrumento para mejorar la calidad y producción. Se han evaluado diversos diseños de RNAi. El silenciamiento mejoró en una gran gama de especies al insertar un intrón en medio de secuencias sentido y anti-sentido.

Uno de los principales usos de RNAi es la introducción de resistencia a patógenos en especies agrícolas. La RNAi se ha utilizado para silenciar el moho polvoriento *Blumeria graminis* e inducir resistencia en trigo. Se propuso que las moléculas de dsRNA fueran transferidas al hongo de las células vegetales para inducir silenciamiento. Sin embargo, esta estrategia puede no ser aplicable a todos los hongos dado que algunos no cuentan con mecanismos de RNAi. Un estudio por Rodríguez-Negrete y colegas en 2009 mostró que plantas infectadas con el geminivirus de ADN, *Pepper golden mosaic virus*, se recuperan usando dos mecanismos de silenciamiento de forma natural. Este mecanismo podría ser usado en especies que muestran alta susceptibilidad a virus. Bucher y colegas en 2006 indujeron silenciamiento contra cuatro *Tospovirus* fusionando las secuencias homólogas de la misma región para producir un dsRNA de 600 nucleótidos. Hasta el 81% de las plantas evaluadas resistieron los cuatro virus de forma individual o simultánea.

La producción de dsRNA por plantas puede ser usada para el control de insectos. Baum y colegas han producido variedades de maíz transgénico que expresan dsRNA contra genes de la plaga *Diabrotica virgifera*. La micro-inyección de dsRNA produce silenciamiento que lleva a muerte o efectos en desarrollo en muchas especies de insectos y se puede utilizar para tamizar posibles blancos para su control (Baum et al, 2007). Por ejemplo, el silenciamiento del gen hemolina resultó en malformaciones de embriones y reducción de poblaciones de *Hyalophora cecropia*.

La RNAi se ha usado exitosamente para control de nematodos que afectan raíces. Al transformar plantas para producir dsRNA contra el gen 16D10, se inhibió la producción de nódulos de raíz que mantienen el crecimiento de los nematodos. Dada la conservación del gen, esta estrategia permitió resistencia contra

varias especies de nematodos en *Arabidopsis thaliana* (Huang et al, 2006).

Otro uso prometedor de la RNAi en agricultura es el silenciamiento de genes involucrados en metabolismo de antinutrientes en especies poco cultivadas. Estas especies no son usadas porque poseen propiedades no deseadas, como altas dosis de uno o varios antinutrientes. Sin embargo, tienen alto potencial nutricional y podrían representar fuentes nutricionales alternativas en países en donde las especies tradicionales no son fácilmente cultivadas. El arroz se usa no solo para humanos sino también para alimento de animales. Sin embargo, la mayoría de estos no pueden absorber los nutrientes presentes en el arroz dada la alta concentración de ácido fítico (InsP6) presente en la semilla antes de germinar. El ácido fítico quela los nutrientes formando fitato, el cual atrapa los nutrientes y es degradado solo con la fitasa, ausente en animales monogástricos. Por ello, se ha evaluado la reducción de su concentración para incrementar la biodisponibilidad de los nutrientes a los animales.

La RNAi ha generado arroz bajo en fitato. Sin embargo, este mostró niveles bajos de mio-inositol, resultando en una mayor sensibilidad al ácido abscísico y reducción de ácido ascórbico (vitamina C). Sin embargo, un arroz bajo en fitatos fue producido al silenciar el gen IPK1, involucrado en la última etapa de biosíntesis de ácido fítico (Ali et al, 2013). En el fruto del tomate, Davuluri y colegas lograron incrementar los contenidos de flavonoides y carotenoides luego de silenciar el gen DET1 (Davuluri et al, 2005). Al usar promotores que se expresan solo en el fruto, lograron dirigir la expresión de las secuencias de dsRNA sin afectar las plantas. En *Brassica napus*, una estrategia similar se usó para incrementar el contenido carotenoides. Al silenciar el gen ϵ -CYC, se modificó la ruta de síntesis de carotenoides a la ruta β -caroteno, incrementando la producción de β -caroteno, zeaxantina, y violaxantina (Yu et al, 2008).

Efectos indeseables y problemas del uso de RNAi

Las aplicaciones de RNAi muestran eficiencia variable y no siempre producen el resultado deseado. Varios puntos son críticos para obtener un silenciamiento eficiente en el campo. Notablemente, la similitud de la secuencia de dsRNA al blanco es crucial para el silenciamiento eficiente. Por ejemplo, varios tratamientos no han logrado producir letalidad en plagas, como el caso de la plaga del arroz, *Nilaparvata lugens* (Mao and Zeng, 2012). La resistencia a virus basada en micro ARN no ha sido duradera dada la alta tasa de mutación de los virus. Para resolver el problema, dos estrategias se han desarrollado. Se puede inducir miRNA contra dos loci virales diferentes en la misma planta, o se puede silenciar un locus altamente conservado por la selección purificadora en poblaciones de virus (Lafforgue et al, 2013). Por último, la inserción de la secuencia de ADN codificando el dsRNA puede ser localizada en varias regiones del genoma de la planta. Regulación al nivel epigenético puede prevenir la expresión de la secuencia insertada y resultar en la ausencia de silenciamiento. Este aspecto de la transformación de plantas no puede ser controlada, lo cual explica la necesidad de regenerar varias líneas de plantas transformadas y medir la expresión génica en cada una.

Conclusión

La posibilidad de inducir silenciamiento génico estable es una propiedad atractiva de las aplicaciones basadas en RNAi, tanto para investigación como para mejora de cultivos. Sin embargo, los riesgos de contaminación ambiental afectan el interés en el uso de estas tecnologías. El desarrollo de técnicas de RNAi no-transmisibles representaría una solución ecológica y económica que sería de gran aporte en el futuro. La RNAi representa un instrumento interesante para el desarrollo de nuevos y mejores productos agrícolas.

Bibliografía

- Akbergenov R, Si-Ammour A, Blevins T, Amin I, Kutter C, Vanderschuren H, Zhang P, Gruissem W, Meins F Jr, Hohn T, Pooggin MM (2006) Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species *Nucleic Acids Res* **34** (2):462-71
- Ali N, Paul S, Gayen D, Sarkar SN, Datta K, Datta SK (2013) Development of low phytate rice by RNAi mediated seed-specific silencing of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase gene (*IPK1*) *PLoS One* **8** (7):e68161
- Anami S, Njuguna E, Coussens G, Aesaert S, Van Lijsebettens M (2013) Higher plant transformation: principles and molecular tools *Int J Dev Biol* **57** (6-8):483-94
- Baum JA1, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference *Nat Biotechnol* **25** (11):1322-6
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference *Nature* **409** (6818):363-6
- Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazarians D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins F Jr, Hohn T, Pooggin MM (2006) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing *Nucleic Acids Res* **34** (21):6233-46.
- Bucher E, Lohuis D, van Poppel PM, Geerts-Dimitriadou C, Goldbach R, Prins M (2006) Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct *J Gen Virol* **87** (Pt 12):3697-701
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* *Plant J* **16** (6):735-43
- Covarrubias AA1, Reyes JL (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs *Plant Cell Environ* **33** (4):481-9
- Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Polys J, Uhlig J, Bramley PM, Pennings HM, Bowler C (2005) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DET1* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes *Nat Biotechnol* **23**: 890-895
- Duarte GT, Maitelli CC, Pant BD, Schlereth A, Scheible WR, Stitt M, Vicentini R, Vincenz M (2013) Involvement of microRNA-related regulatory pathways in the glucose-mediated control of *Arabidopsis* early seedling development *J Exp Bot* **64** (14):4301-12
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (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 *Nat Genet* **37** (12):1356-60.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* *Nature* **391** (6669):806-11
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants *Science* **286** (5441):950-2
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells *Nature* **404** (6775):293-6
- Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (39):14302-6
- Katiyar-Agarwal S, Jin H (2010) Role of small RNAs in host-microbe interactions *Annu Rev Phytopathol* **48**:225-46
- Khraiweh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants *Biochim Biophys Acta* **1819** (2):137-48
- Klein TM, Fromm M, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, Sletten M, Sanford JC (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (12):4305-9
- Lafforgue G, Martínez F, Niu QW, Chua NH, Daròs JA, Elena SF (2013) Improving the effectiveness of artificial microRNA (amiR)-mediated resistance against Turnip mosaic virus by combining two amiRs or by targeting highly conserved viral genomic regions *J Virol* **87** (14):8254-6
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana* *RNA* **14** (5):836-43
- Mao J, Zeng F (2012) Feeding-based RNA interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* *PLoS One* **7** (11):e48718 doi: 10.1371/journal.pone.0048718
- Maitelli CC, Tomaz JP, Duarte GT, Prado FM, Del Bem LE, Silveira AB, Gauer L, Corrêa LG, Drummond RD, Viana AJ, Di Mascio P, Meyer C, Vincenz M (2011) The *Arabidopsis* bZIP gene *AtbZIP63* is a sensitive integrator of transient abscisic acid and glucose signals *Plant Physiol* **157** (2):692-705
- Matzke MA, Matzke AJ (2004) Planting the seeds of a new paradigm *PLoS Biol* **2** (5):E133
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling *Science* **312** (5772):436-9
- Parent JS, Martínez de Alba AE, Vaucheret H (2012) The origin and effect of small RNA signaling in plants *Front Plant Science* **3**:179
- Rodríguez-Negrete EA, Carrillo-Tripp J, Rivera-Bustamante RF (2009) RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery *J Virol* **83** (3):1332-40
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002) *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development *Trends Plant Sci* **7** (11):487-91
- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* *Plant Cell* **16** (8):2001-19
- Tenllado F, Martínez-García B, Vargas M, Díaz-Ruiz JR (2003) Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections *BMC Biotechnol* **3**:3
- Vaucheret H, Vazquez F, Crété P, Bartel DP (2004) The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development *Genes Dev* **18** (10):1187-97
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis* *J Biol Chem* **282** (22):16369-78
- Yu B, Lydiate DJ, Young LW, Schäfer UA, Hannoufa A (2008) Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase *Transgenic Res* **17**: 573-85
- Zhou X, Wang G, Zhang W (2007) UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana* *Mol Syst Biol* **3**:103
- Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa* *J Exp Bot* **61** (15):4157-68

Cuadro 1. El triángulo de las Bermudas y el ARNm.

La RNAi necesita la presencia de moléculas de ARN de doble hebras (dsRNA por su sigla en inglés) de 21, 22 o 24 nucleótidos (Hamilton and Baulcombe, 1999; Bernstein et al, 2001; Matzke and Matzke in 2004).

El complejo proteico DICER produce esas dsRNAs desde moléculas dsRNAs más largas (Parent et al, 2012). Después, la proteína ENHANCER 1 metila la molécula dsRNA para protegerla de la degradación por enzimas del núcleo. Finalmente, la dsRNA se traslada al citoplasma.

En el citoplasma, una proteína de tipo ARGONAUT se une a la dsRNA para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC por su sigla en inglés, Hammond et al, 2000). La proteína ARGONAUT separa las dos hebras de la dsARN y usa una hebra para reconocer un ARN maduro y degradarlo, o impedir la traducción. La otra hebra está degradada por enzimas de la célula. El RISC también puede inducir metilación del ADN o de histonas para impedir la transcripción.

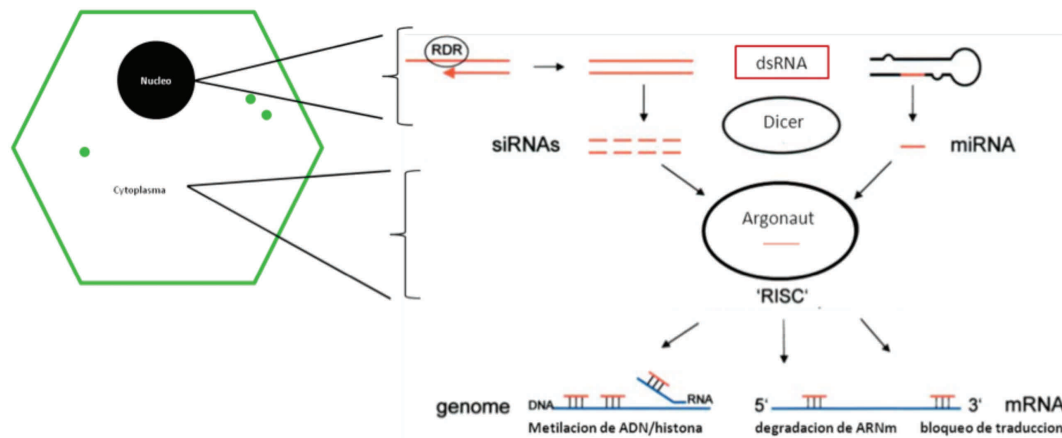


Figura 1. Mecanismo de interferencia por ARN. Ácido nucleico blanco en azul, ARN cortos en rojo, complejos proteicos en ovalo. (Adaptado de Matzke and Matzke, 2004).

Genes de la célula pueden producir ARN con estructura en U, o de horquilla que sirven de base a la producción de dsRNA de tipo micro RNA (miRNA). Esos miRNA tienen usualmente papeles de regulación de genes de la planta en contextos varios como el desarrollo de la planta, la maduración de la fruta, ciclos metabólicos o de la semilla, y la regulación de la respuesta a patógenos y estreses abióticos (Schauer et al, 2002; Vaucheret et al, 2004; Matioli et al, 2011; Duarte et al, 2013; Covarrubias and Reyes, 2010; Khraiweh et al, 2012; Liu et al, 2008; Zhou et al, 2010; Navarro et al, 2006; Zhou et al, 2007; Sunkar and Zhu, 2004; Katiyar-Agarwal and Jin, 2010; Yamasaki et al, 2007)

Polimerasas de ARN a partir de ARN (RDR por su sigla en inglés) pueden también sintetizar una hebra complementaria para producir una dsRNA perfectamente complementaria que sirve de base a la producción de dsRNA de tipo ARN corto interferente (siRNA por su sigla en inglés). Los siRNAs sirven usualmente para degradar el ARN de patógenos, como vía de defensa contra virus y bacterias (Bouché et al, 2006; Blevins et al, 2006; Akbergenov et al, 2006). Los siRNAs pueden viajar para inducir resistencia en la mayoría de los órganos de la planta (Dunoyer et al, 2005)