

Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants

Mecanismos, aplicaciones y perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas

Hernan Garcia-Ruiz¹, Mayra Teresa Garcia Ruiz², Sergio Manuel Gabriel Peralta¹, Cristina Betzabeth Miravel Gabriel¹ and Kautar El-Mounadi³. ¹Department of Plant Pathology, Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68583 USA. ²Universidad Autónoma Chapingo, México, CP 56230. ³Department of Biology, Kutztown University of Pennsylvania, Kutztown, PA 19530 USA. Autor de correspondencia: H. Garcia-Ruiz: hgarcia Ruiz2@unl.edu

Recibido: 30 de Junio, 2016

Aceptado: 01 de Septiembre, 2016.

García-Ruiz H, García-Ruiz MT, Gabriel-Peralta SM, Miravel-Gabriel CB and El-Maunadi K. 2016. Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 286-307.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1606-8](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-8)

Primera publicación DOI: 02 de septiembre, 2016.

First DOI published: September 2nd, 2016.

RESUMEN

Las enfermedades virales en plantas causan pérdidas económicas importantes al reducir la calidad y rendimiento de los cultivos, lo que amenaza la seguridad alimentaria en algunos países. Dada la escasez de recursos naturales, plantas con resistencia genética a virus han sido desarrolladas con éxito por ingeniería genética. Un buen entendimiento de los mecanismos básicos que controlan las interacciones entre virus y plantas, incluido el silenciamiento génico de virus por ácido ribonucleico

ABSTRACT

Viral diseases of plants cause important economic losses due to reduction in crop quality and quantity to the point of threatening food security in some countries. Given the reduced availability of natural sources, genetic resistance to viruses has been successfully engineered for some plant-virus combinations. A sound understanding of the basic mechanisms governing plant-virus interactions, including antiviral RNA silencing, is the foundation to design better management strategies and biotechnological approaches to engineer and implement antiviral resistance in plants. In this review, we present current molecular models to explain antiviral RNA silencing and its application in basic plant research, biotechnology and genetic engineering.

Key words: Plant viruses, gene silencing, antiviral defense, transgenic plants, genetic engineering of virus resistance.

(ARN) de interferencia, es necesario para diseñar mejores estrategias de manejo y métodos biotecnológicos que servirán para desarrollar e implementar resistencia antiviral en plantas. En esta revisión, presentamos modelos moleculares vigentes para explicar el silenciamiento génico de virus por ARN de interferencia y sus aplicaciones en biotecnología e ingeniería genética de plantas.

Palabras clave: Virus de plantas, silenciamiento génico, ARN de interferencia, defensa antiviral, plantas transgénicas, ingeniería genética de resistencia a virus.

El silenciamiento génico por ácido ribonucleico (ARN) es un sistema de inactivación de genes mediado por moléculas pequeñas de ARN interferentes (RNAi) que guían el corte endonucleolítico y la degradación o represión de la traducción de ARN mensajeros, o bloquean la transcripción (Cuperus *et al.*, 2010). El silenciamiento génico tiene funciones esenciales en el desarrollo, la respuesta al estrés y en la expresión y el mantenimiento del genoma (Ding and Voinnet, 2007). Las funciones y las actividades del silenciamiento génico están conservadas en eucariotas. En plantas, nematodos e insectos, el silenciamiento génico es un componente esencial de la inmunidad antiviral (Ding and Voinnet, 2007).

Las plantas usan el silenciamiento génico para regular la expresión de genes en una manera temporal y específica en órganos y tejidos (Chitwood *et al.*, 2009). Además, las plantas usan el sistema de silenciamiento génico para prevenir, restringir y eliminar infecciones virales (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). En interacciones plantas-virus, el establecimiento de enfermedad o resistencia depende en gran parte del balance entre el silenciamiento génico del virus

RNA silencing is a sequence-specific gene inactivation system mediated by small interfering RNAs (siRNA) guiding endonucleolytic cleavage or translational repression of mRNAs, or by preventing transcription (Cuperus *et al.*, 2010). RNA silencing has essential roles in development, stress response, and genome expression and maintenance (Ding and Voinnet, 2007). The roles and mechanistic activities of RNA silencing are highly conserved in eukaryotes. In plants, nematodes, and insects, RNA silencing is an essential component of antiviral immunity (Ding and Voinnet, 2007).

Plants naturally use RNA silencing to regulate gene expression in a temporal and tissue-specific manner (Chitwood *et al.*, 2009). Virus-infected plants deploy antiviral RNA silencing to prevent, restrict, and clear virus infections (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). In plant-virus interactions, the outcome of disease or resistance is largely dependent on the balance between antiviral RNA silencing versus virus evasion or active suppression of antiviral defense (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). Endogenous and antiviral RNA silencing have conserved and overlapping pathways. Most of the genes that participate in endogenous RNA silencing are also part of antiviral RNA silencing (Ding and Voinnet, 2007).

In eukaryotes, including plants, RNA silencing regulates gene expression at the transcriptional or post-transcriptional levels (Figure 1). Transcriptional gene silencing inhibits transcription, resulting in a reduction of mRNA, by methylating DNA in chromosomes, plasmids or viral minichromosomes (Raja *et al.*, 2008; Cenicerós-Ojeda *et al.*, 2016). Transcriptional gene silencing is directed by siRNAs guiding enzymatic DNA methylation (Ding and Voinnet, 2007). Post-transcriptional gene silencing is the nucleolytic

por parte de la planta y la evasión o supresión de la defensa antiviral por parte del virus (García-Ruiz *et al.*, 2010; García-Ruiz *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). El silenciamiento génico contra virus y contra ARN celular tienen varias componentes en común. La mayoría de los genes que participan en el silenciamiento de genes celulares forman parte del silenciamiento de virus (Ding and Voinnet, 2007).

En eucariotas, incluyendo plantas, el silenciamiento génico regula la expresión de genes a nivel transcripcional y post-transcripcional (Figura 1). El silenciamiento génico a nivel transcripcional inhibe la transcripción causando una reducción en

cleavage and degradation or translational repression of mRNA (Cuperus *et al.*, 2010) (Figure 1). All viruses use RNA to express their genes, replicate, or both. That RNA is potentially perceived by the cell and activates antiviral defense responses, including RNA silencing (Ivanov *et al.*, 2014). Transcriptional and post-transcriptional gene silencing has been demonstrated for DNA viruses, RNA viruses, viroids and satellite RNAs (Table 1).

Viral infection of plants occurs in two phases. After entering the cell, viruses replicate and subsequently move to other cells and systemically through the vascular system to distal plant tissues

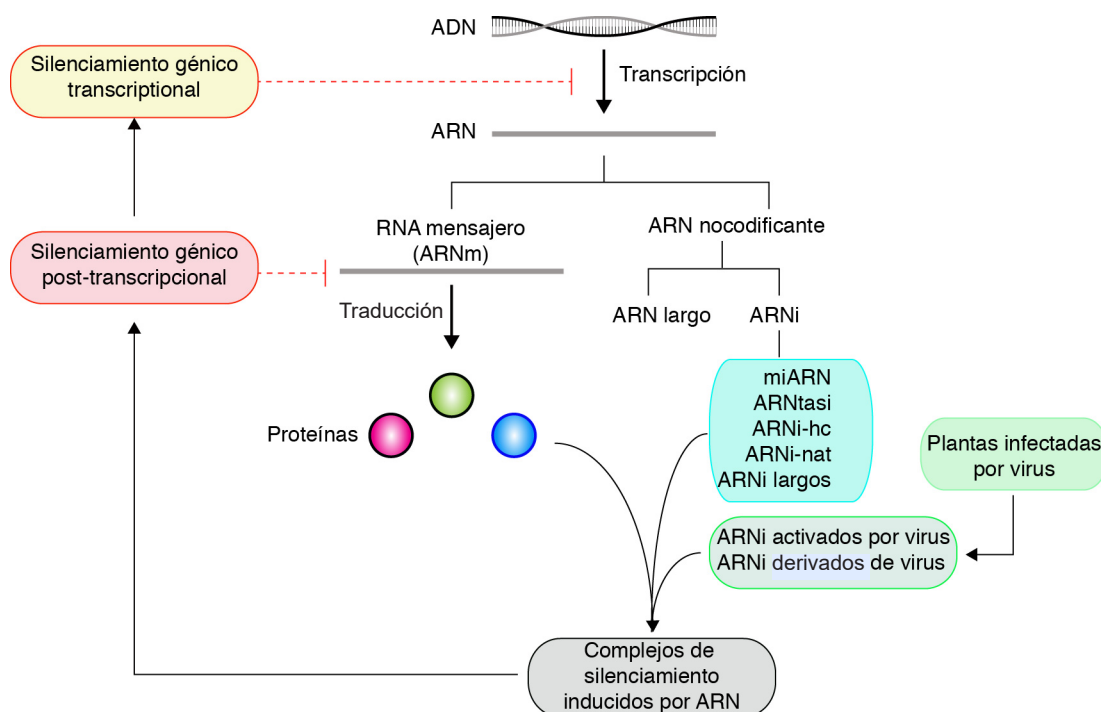


Figura 1. Flujo de información genética y silenciamiento génico en plantas. Complejos de silenciamiento inducido por ARN se forman entre proteínas y ARN interferentes (ARNi) derivados de transcritos que no codifican proteínas. El silenciamiento génico bloquea el flujo de información genética lo cual evita la transcripción, induce la degradación o evita la traducción. Plantas infectadas por virus acumulan ARNi derivados del ARN viral y ARNi celulares activados por la infección viral.

Figure 1. Flow of genetic information and gene silencing in plants. RNA-induced silencing complexes are formed between effector proteins and small interfering RNAs (siRNAs) derived from non-coding transcripts. Gene silencing is a block in the flow of genetic information by preventing transcription or by inducing degradation or translational repression of protein-coding RNAs directed by endogenous siRNAs. Virus-infected plants accumulate virus-induced siRNAs and virus-derived siRNAs.

la síntesis de ARN mensajero vía la metilación de ADN en cromosomas, plásmidos o minicromosomas virales (Raja *et al.*, 2008; Cenicerros-Ojeda *et al.*, 2016). El silenciamiento génico transcripcional es dirigido por los RNAi que guían la metilación enzimática del ADN (Ding and Voinnet, 2007). El silenciamiento génico a nivel post-transcripcional consiste en el corte endonucleolítico y degradación o la represión de la traducción de ARN mensajeros (Cuperus *et al.*, 2010) (Figura 1). Todos los virus usan ARN para expresar sus genes, para replicarse o ambos. Este ARN es potencialmente percibido por la célula y activa defensas antivirales, tal como el silenciamiento génico (Ivanov *et al.*, 2014). El silenciamiento génico antiviral a nivel transcripcional y pos-transcripcional ha sido demostrado para virus de ADN, virus de ARN, viroides y ARN satelitales (Cuadro 1).

La infección viral en plantas ocurre en dos fases: Tras entrar en la célula, los virus se replican, después se mueven localmente de una célula a otra y sistemáticamente a otros órganos y tejidos de la planta vía el sistema vascular (Ivanov *et al.*, 2014). El silenciamiento génico dirigido contra ARN viral restringe la replicación del virus y su movimiento (García-Ruiz *et al.*, 2015). La defensa antiviral vía silenciamiento génico depende de la detección y degradación de ARN viral en las células infectadas y de la amplificación de la señal en células lejos del sitio de infección inicial (Ding and Voinnet, 2007).

Los virus modifican el ambiente celular para favorecer su replicación y movimiento dentro de la planta (Ivanov *et al.*, 2014) usando mecanismos que incluyen la subversión, la reprogramación transcripcional y la inducción y supresión del silenciamiento génico (Ding and Voinnet, 2007; García-Ruiz *et al.*, 2015). La supresión del silenciamiento génico es esencial para que los virus se repliquen, establezcan infección y se muevan local y sistemáticamente (García-Ruiz *et al.*, 2015). Una mejor

and organs (Ivanov *et al.*, 2014). RNA silencing directed against viral RNA (antiviral RNA silencing) restricts virus replication and movement (García-Ruiz *et al.*, 2015). Antiviral defense through RNA silencing is dependent on sensing and targeting viral RNA both; in the initially infected cells and in cells away from the initial site of infection (Ding and Voinnet, 2007).

Viruses modify the cellular environment to support their replication and spread (Ivanov *et al.*, 2014) using mechanisms that include subversion, transcriptional reprogramming and both RNA silencing induction and suppression (Ding and Voinnet, 2007; García-Ruiz *et al.*, 2015). Suppression of RNA silencing is essential for viruses to replicate, establish infection and move both cell-to-cell and systemically (García-Ruiz *et al.*, 2015). A better understanding of the basic mechanism of endogenous and antiviral RNA silencing and silencing suppression is important to explain several phenomena of interest to plant pathologists, such as virus resistance, virus movement, host range, tissue-specific distribution of virus, viral synergism, genetic determinants of virus resistance, and genetic engineering of plant-virus resistance.

ROLES OF RNA SILENCING

In eukaryotes, a wide range of biological processes are regulated through silencing mechanisms, including development, organ formation, and stress responses (Chitwood *et al.*, 2009). For example, in plants, the abaxial-adaxial leaf polarity is regulated by siRNA gradients moving between cells (Chitwood *et al.*, 2009). ARGONAUTE (AGO) proteins are the catalytic component of RNA silencing. In association with siRNA, AGO proteins slice target RNA (Carbonell *et al.*, 2012; Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et*

Cuadro 1. Componentes genéticos esenciales del silenciamiento génico con base en combinaciones planta-virus representativas y agrupadas siguiendo la organización genómica del virus.

Table 1. Core genetic determinants of antiviral silencing for representative plant-pathogen combinations.

Patógeno	Hospedero	Perfil	DCL	AGO	RDR	Referencia
Virus de ARN de cadena positiva						
TCV	Arabidopsis	22, ND	DCL4DCL2	AGO1 AGO7	RDR6	Deleris <i>et al.</i> , 2006; Qu <i>et al.</i> , 2008
GRSPaV	Vid	21, (+)	ND	ND	ND	Pantaleo <i>et al.</i> , 2010
MCMV	Maíz	22, (+)	ND	ND	ND	Xia <i>et al.</i> , 2016
GfKv	Vid	22, (+/-)	ND	ND	ND	Pantaleo <i>et al.</i> , 2010
GRGV	Vid	21, (+/-)	ND	ND	ND	Pantaleo <i>et al.</i> , 2010
PapMV	Papaya	21, (+/-)	ND	ND	ND	Chavez-Calvillo <i>et al.</i> , 2016
TuMV	Arabidopsis	21, (+/-)	DCL4 DCL2	AGO1 AGO2 AGO10	RDR1 RDR6	Garcia-Ruiz <i>et al.</i> , 2010; Garcia-Ruiz <i>et al.</i> , 2015
PRSV	Papaya	21, (+/-)	ND	ND	ND	Chavez-Calvillo <i>et al.</i> , 2016
SCMV	Maíz	21, (+/-)	ND	ND	ND	Xia <i>et al.</i> , 2016
Virus de ARN de cadena negativa						
RSV	Arroz	21, (+)	ND	AGO1 AGO18	RDR6	Wu <i>et al.</i> , 2015
TSWV	Tomato	21, (+)	ND	ND	ND	Mitter <i>et al.</i> , 2013
Virus de ARN bicatenario						
OsEV	Arroz	21, ND	DCL2	ND	ND	Urayama <i>et al.</i> , 2010
RDV	Arroz	21, (+)	ND	AGO1	RDR6	Hong <i>et al.</i> , 2015
Virus de ADN de cadena sencilla						
ACMV	Yuca	24, ND	ND	ND	ND	Akbergenov <i>et al.</i> , 2006
CaLCuV	Yuca	24, ND	ND	ND	ND	Akbergenov <i>et al.</i> , 2006
Virus de ADN de cadena doble						
CaMV	Arabidopsis	21, (-)	DCL4	NS	RDR6	Blevins <i>et al.</i> , 2006
Viroides						
GYSVd	Vid	21, (-)	ND	ND	ND	Navarro <i>et al.</i> , 2009
HSVd	Vid	21, (-)	ND	ND	ND	Navarro <i>et al.</i> , 2009
PSTVd	N. b.	21, (+)	ND	AGO1 AGO2	RDR6	Minoia <i>et al.</i> , 2014
ARN satelitales						
Y-sat	N. b.	22, (+)	ND	ND	ND	Shimura <i>et al.</i> , 2011

Patógenos. *Virus del mosaico de la yuca africana* (ACMV), *Virus del enrollamiento de la hoja de col* (CaLCuV), *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV), *ARN satelital Y del Virus del mosaico del pepino* (Y-sat), *Virus de la mancha de la vid* (GFkV), *Virus asociado al globo de la vid roja* (GRGV), *Virus asociado a la picadura del tallo de la vid rupestre* (GRSPaV), *Viroide 1 del moteado amarillo de la vid* (GYSVd), *Viroide del enanismo del lúpulo* (HSVd), *Virus del moteado clorótico del maíz* (MCMV), *Endornavirus del arroz* (OsEV), *Virus del mosaico de la papaya* (PapMV), *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV), *Viroide del tuberculo fusiforme de la papa* (PSTVd), *Virus del enanismo del arroz* (RDV), *Virus del rayado del arroz* (RSV), *Virus del mosaico de la caña de azúcar* (SCMV), *Virus del bronceado del tomate* (TSWV), *Virus del encrespado del nabo* (TCV), *Virus del mosaico del nabo* (TuMV) / **Pathogens.** *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Cucumber mosaic virus Y satellite RNA* (Y-sat), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine Red Globe associated virus* (GRGV), *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV), *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV), *Oryza sativa endornavirus* (OsEV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Rice dwarf virus* (RDV), *Rice stripe virus* (RSV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Turnip crinkle virus* (TCV), *Turnip mosaic virus* (TuMV).

Hospederos. Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Yuca (*Manihot esculenta*), Vid (*Vitis vinifera*), Maíz (*Zea mays*), N. b. (*Nicotiana benthamiana*), Papaya (*Carica papaya*), Arroz (*Oryza sativa*), Tomate (*Solanum lycopersicum*) / **Hosts.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Cassava (*Manihot esculenta*), Grapevine (*Vitis vinifera*), Maize (*Zea mays*), N. b. (*Nicotiana benthamiana*), Papaya (*Carica papaya*), Rice (*Oryza sativa*), Tomato (*Solanum lycopersicum*).

Perfil de la población de ARNi derivados del virus. Tamaño en nt de los ARNi más abundantes derivados de los virus. Las poblaciones fueron caracterizadas por medio de secuenciación de nueva generación, geles de ARN, o ambas. (+): Los ARNi de polaridad positiva son más abundantes que los de polaridad negativa. (-): Los ANRi de polaridad negativa son más abundantes que los de polaridad positiva. (+/-): Los ARNi de polaridad positiva y negativa son igualmente abundantes / **Size and polarity.** Size (nt) of the most abundant virus-derived siRNAs based on next generation sequencing, northern blotting, or both. Profile of virus-derived siRNAs determined by next generation sequencing. (+): siRNAs of positive polarity are more abundant than antisense. (-): siRNAs of negative polarity are more abundant than sense. (+/-): siRNAs of positive and negative polarity are equally abundant.

comprensión del mecanismo básico del silenciamiento génico tanto de ARN celular como viral es importante para explicar varios fenómenos que interesan a los fitopatólogos, tales como la resistencia contra virus, su movimiento, su rango de hospedantes, su distribución en la planta, el sinergismo viral, las determinantes genéticas de resistencia a virus y la ingeniería genética de plantas resistentes a virus.

FUNCIONES DEL SILENCIAMIENTO GENICO

En eucariotas varios procesos biológicos, como el desarrollo, la formación de órganos y las respuestas al estrés, son regulados por silenciamiento génico (Chitwood *et al.*, 2009). Por ejemplo, en plantas, la polaridad abaxial-adaxial de las hojas está regulada por gradientes de RNAi que se mueven entre células (Chitwood *et al.*, 2009). Las proteínas ARGONAUTA (AGO) son componentes catalíticos del silenciamiento génico. En asociación con RNAi, las proteínas AGO cortan moléculas de ARN mensajero complementario (el blanco) a los ARNi (Carbonell *et al.*, 2012; Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2011). AGO7 y AGO10 se expresan específicamente en los primordios de hojas y en los tejidos vasculares. AGO7 restringe la actividad del micro ARN390 (miR390) y dirige un gradiente de ARNi del lado adaxial al lado abaxial de las hojas (Chitwood *et al.*, 2009). El papel antiviral del silenciamiento génico ha sido demostrado en varias especies de plantas (Cuadro 1) y los ARNi están involucrados también en las interacciones entre plantas y bacterias y entre plantas y hongos (Weiberg *et al.*, 2014).

ARN NO CODIFICANTE Y PEQUEÑOS ARN INTERFERENTES EN PLANTAS

al., 2011). AGO7 and AGO10 are expressed specifically in the adaxial leaf primordial and in vascular tissues. AGO7 restricts activity of micro RNA390 (miR390) and directs a gradient of trans-acting small interfering RNAs from the adaxial to the abaxial side of developing leaves (Chitwood *et al.*, 2009). The antiviral role of RNA silencing has been demonstrated in many plant species (Table 1), and regulatory siRNAs are also involved in plant-bacterial and plant-fungal interactions (Weiberg *et al.*, 2014).

NON-CODING AND SMALL RNAS IN PLANTS

Plant genomes encode two kinds of non-coding RNAs (Figure 1): long non-coding RNAs (lncRNA) and small regulatory RNAs also called small interfering RNAs (siRNAs). LncRNAs are formed by sense or antisense transcription, from introns or intergenic regions, are longer than 200 nucleotides (nt) and have been implicated in regulation of tissue differentiation, reproductive development, stress response, vernalization, flowering time, and plant immunity (Shafiq *et al.*, 2016). Plant siRNAs range in size from 21 to 24 nt and are naturally expressed as part of the mechanisms of temporal and spatial gene regulation. Other siRNAs are produced in response to biotic (viral, bacterial or fungal infections) or abiotic stress (salt, water, heat or cold) (Axtell, 2013). Single stranded RNAs (ssRNA) that form a hairpin structure are precursors to hairpin small RNAs: microRNAs (miRNAs) and other siRNAs. Double stranded RNAs (dsRNA) are the precursors to heterochromatic siRNAs and secondary siRNAs such as trans-acting siRNAs and natural antisense transcript-derived siRNAs (Cuperus *et al.*, 2010). A comprehensive review on this subject is provided by (Axtell, 2013).

El genoma de las plantas contiene dos tipos de ARN no codificantes (Figura 1): ARN largo no codificante (ARNlnc) y pequeños ARNs interferentes (RNAi). Los ARNlnc se forman vía transcripción bipolar y a partir de intrones o regiones intergénicas. Los ARNlnc no miden más de 200 nucleótidos (nt) y han sido implicados en la diferenciación de tejidos, el desarrollo reproductivo, la respuesta a estrés, la vernalización, el tiempo de floración y en la inmunidad de plantas (Shafiq *et al.*, 2016). Los ARNi miden 21 a 24 nucleótidos (nt) se expresan de manera natural y son parte de los mecanismos de regulación temporal y espacial de genes mediante silenciamiento génico. Otros ARNi son producidos en respuesta al estrés biótico (infecciones virales, bacterianas o fungosas) o abiótico (estrés salino, hídrico, por calor o por frío) (Axtell, 2013). Los ARN monocatenarios que forman una estructura doble son precursores de pequeños ARNi: microARNs (miARNs) y otros ARNi. Los ARNs bicatenarios son precursores de ARNi heterocromáticos (ARNi-hc), ARNi antisentido (ARNi-nat) y ARNi secundarios (Figura 1) (Cuperus *et al.*, 2010). Una revisión completa del tema está disponible en el artículo de Axtell (Axtell, 2013).

MicroARNs. Los miARNs juegan papeles críticos en el desarrollo de órganos y tejidos de eucariotas (Cuperus *et al.*, 2011). En general, los miARNs de plantas miden 21 nt y son formados por la endonucleasa Dicer-Like 1 (DCL1) a partir de transcritos formados por la polimerasa II (Cuperus *et al.*, 2011). En *Arabidopsis thaliana*, la mayoría de los miARNs se asocian con AGO1 mientras los demás miARNs se asocian con AGO2 o AGO10 (Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2011). Una alta complementariedad entre el miARN y el ARN mensajero guía el corte endonucleolítico del transcrito por las proteínas AGO y resulta en la degradación o la represión de la traducción del ARN mensajero (Carbonell *et al.*, 2012). Los miARNs involucrados

MicroRNAs. MicroRNAs have critical roles in organ and tissue development of eukaryotes (Cuperus *et al.*, 2011). Plant miRNAs usually measure 21 nt and are formed by endonuclease Dicer-Like I (DCL1) protein from Pol II-dependent transcripts (Cuperus *et al.*, 2011). In *Arabidopsis* most miRNAs associate with AGO1, and a small number associate with AGO2 or AGO10 (Cuperus *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2011) to collectively target at least 250 transcripts. High complementarity between the miRNA and the target site guides transcript RNA endonucleolytic cleavage by AGO proteins and degradation or translational repression (Carbonell *et al.*, 2012). MicroRNAs involved in plant development are highly conserved (Cuperus *et al.*, 2011).

Trans-acting small interfering RNAs (tasiRNA). TasiRNAs function like miRNAs to repress target transcripts (Cuperus *et al.*, 2010). During tasiRNA biogenesis, specific miRNAs in association with specific AGOs facilitate cleavage of tasiRNA primary transcripts, and recruit cellular RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) and/or associated factors to the processed RNA precursor to dsRNA synthesis. Importantly, only a small subset of miRNA, most of which associate with AGO1, enable RDR6 recruitment. RDR6 recruitment by AGO1-miRNA complexes requires 22 nt long miRNAs, or 21 nt asymmetric duplexes (Cuperus *et al.*, 2010).

Long siRNAs (lsiRNAs). LsiRNAs are induced by bacterial infection or some stress conditions. They are 30 to 40 nucleotides long. Several R genes involved in resistance to bacteria and fungi are regulated by lsiRNAs (Padmanabhan *et al.*, 2009).

Virus-activated siRNAs. Infection of *Arabidopsis thaliana* with *Cucumber mosaic virus* (CMV) or

en el desarrollo están altamente conservados entre especies de plantas (Cuperus *et al.*, 2011).

Los ARNs interferentes en trans (ARNtasi). Los ARNtasi regulan transcritos de la misma manera que los miARNs (Cuperus *et al.*, 2010). Durante la biogénesis de los ARNtasi, miARNs específicos en asociación con proteínas AGO facilitan el corte de los transcritos precursores de ARNtasi y reclutan la polimerasa-dependiente de ARN número 6 (RDR6) al transcrito para sintetizar ARN bicatenario. Solamente algunos miARNs participan en la biogénesis de RNAi secundarios mediante amplificación por RDR6. El reclutamiento de RDR6 por los complejos AGO1-miARN necesita la presencia de miARNs que miden 22 nt o de híbridos asimétricos de miARNs/miRNA* que midan 21 nt (Cuperus *et al.*, 2010).

ARN largos interferentes (ARNli). Los ARNli son inducidos por infecciones bacterianas u otras condiciones de estrés. Los ARNli miden de 30 a 40 nt y regulan varios genes de resistencia a bacterias y hongos (Padmanabhan *et al.*, 2009).

ARN interferentes activados por virus. En *Arabidopsis thaliana*, infección con el *Virus del mosaico del pepino* (CMV) o el *Virus del mosaico del nabo* (TuMV) induce la biogénesis de ARNi derivados de aproximadamente 1,000 genes celulares vía un mecanismo que depende de la polimerasa-dependiente de ARN número I (RDR1). Estos ARNi se asocian con AGO1 y AGO2 y probablemente modulan la respuesta a infecciones virales (Cao *et al.*, 2014).

ARN interferentes derivados del virus. Plantas infectadas acumulan ARNi derivados del virus (ARNiv) que miden de 21 a 24 nt y son formados por las proteínas Dicer-Like (DCL). Los ARNiv

Turnip mosaic virus (TuMV) induce the biogenesis of endogenous siRNAs from approximately 1,000 *A. thaliana* genes, by a mechanism dependent on RNA-dependent RNA polymerase 1 (RDR1). These siRNAs associate with AGO1 and AGO2 and are predicted to modulate host responses to virus infection (Cao *et al.*, 2014).

Virus-derived siRNAs. Infected plants accumulate virus-derived siRNAs that are generally 21 to 24 nt long and are made by Dicer-Like (DCL) proteins. The most abundant size classes are 21 and 22 nt, and are made by DCL4 and DCL2, respectively (Deleris *et al.*, 2006) (Table 1). Virus-derived siRNAs mediate antiviral defense by inducing transcriptional and post-transcriptional gene silencing of viruses (Brosseau and Moffett, 2015; Cenicerros-Ojeda *et al.*, 2016).

ANTIVIRAL RNA SILENCING PATHWAYS

Antiviral RNA silencing is non-cell autonomous, initiates at the single cell level and spreads cell-to-cell and long distance through plasmodesmata and the plant vascular system (Ding and Voinnet, 2007; Molnar *et al.*, 2010). The pathway consists of four parts: Initiation, targeting, amplification, and systemic spread (Figure 2). After sensing viral RNA, siRNAs derived from viral dsRNA are made by DCL proteins (Deleris *et al.*, 2006). In the targeting phase, virus-derived siRNAs associate with ARGONAUTE (AGO) proteins to form RNA-induced silencing complexes (RISC) and are predicted to target viral ssRNA for endonucleolytic cleavage or translational repression (Brosseau and Moffett, 2015). Initial recognition of viral RNA is necessary but not sufficient to restrict plant virus infection (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Restriction of plant virus infection requires silencing amplification by cellular RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). After moving

más abundantes miden 21 y 22 nt y son formados por DCL4 y DCL2, respectivamente (Deleris *et al.*, 2006) (Cuadro 1). Los ARNi derivados del virus regulan la defensa antiviral mediante la inducción del silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional de genes virales (Brosseau and Moffett, 2015; Cenicerós-Ojeda *et al.*, 2016).

VIAS DEL SILENCIAMIENTO GENICO ANTIVIRAL

El silenciamiento génico antiviral inicia en una célula y se mueve a otras células y a otras partes de la planta a través de los plasmodesmos y el sistema vascular (Ding and Voinnet, 2007; Molnar *et al.*, 2010). La vía consiste en cuatro partes: Inicio, degradación, amplificación y movimiento sistémico (Figura 2). Tras detectar el ARN viral, las proteínas DCL forman ARNi derivados del ARN bicatenario viral (Deleris *et al.*, 2006). Durante la etapa de degradación, los ARNi derivados del virus se asocian con las proteínas ARGONAUTAS (AGO) para formar los complejos de silenciamiento inducidos por ARN (RISC) que llevarán a cabo el corte endonucleolítico de ARN monocatenario viral o la represión de la traducción (Brosseau and Moffett, 2015). El reconocimiento inicial del ARN viral es necesaria pero no es suficiente para restringir la infección de la planta por el virus (García-Ruiz *et al.*, 2010). Restricción de la infección viral requiere la amplificación del silenciamiento génico mediante las polimerasas dependientes de ARN (RDRs) (García-Ruiz *et al.*, 2010). Las RDRs celulares forman ARN bicatenario viral en células receptoras para amplificar el silenciamiento y establecer un estado antiviral (Figura 2). Esta amplificación contribuye a la especificidad y la fuerza del silenciamiento génico antiviral y es mediada por RDR1 y RDR6 para formar ARNi secundarios derivados del virus (Cuadro 1). Los virus de ADN expresan

out of the infected cell, in recipient cells, endogenous RDRs make viral dsRNA to amplify the silencing response and establish an antiviral state (Figure 2). This amplification contributes to the specificity and strength of antiviral RNA silencing and is mediated by RDR1 and RDR6 to form secondary virus-derived siRNAs (Table 1). DNA viruses express their genes through mRNA. Silencing is activated at the post-transcriptional level, resulting in the formation of siRNAs that guide targeting of viral RNA. Furthermore, virus-derived siRNAs in association of AGO and RDR proteins guide methylation of viral DNA, resulting in transcriptional gene silencing which prevents virus replication and movement (Raja *et al.*, 2008; Buchmann *et al.*, 2009; Cenicerós-Ojeda *et al.*, 2016).

VIRUS-DERIVED siRNA PROFILES

For a growing number of plant-virus combinations virus-derived siRNA populations have been profiled by next generation sequencing (Table 1). Three kinds of profiles have been described: sense and antisense strand equally represented (ambisense), and biased towards the sense or antisense polarity. For some plant positive-strand RNA viruses, virus-derived siRNAs of sense polarity are more abundant than antisense and there are fragments of the viral genome that accumulate more virus-derived siRNAs than others (Table 1). This pattern suggests that positive-strand viral RNA sequences, or structures, are recognized by DCL proteins. For most plant-virus combinations, infected plants accumulate virus-derived siRNAs from the entire viral genome in nearly equal amounts for both polarities (Table 1). Interestingly, mutant plants lacking silencing amplification proteins RDR1 or RDR6 accumulate reduced amounts of virus-derived siRNAs, implicating cellular RDRs

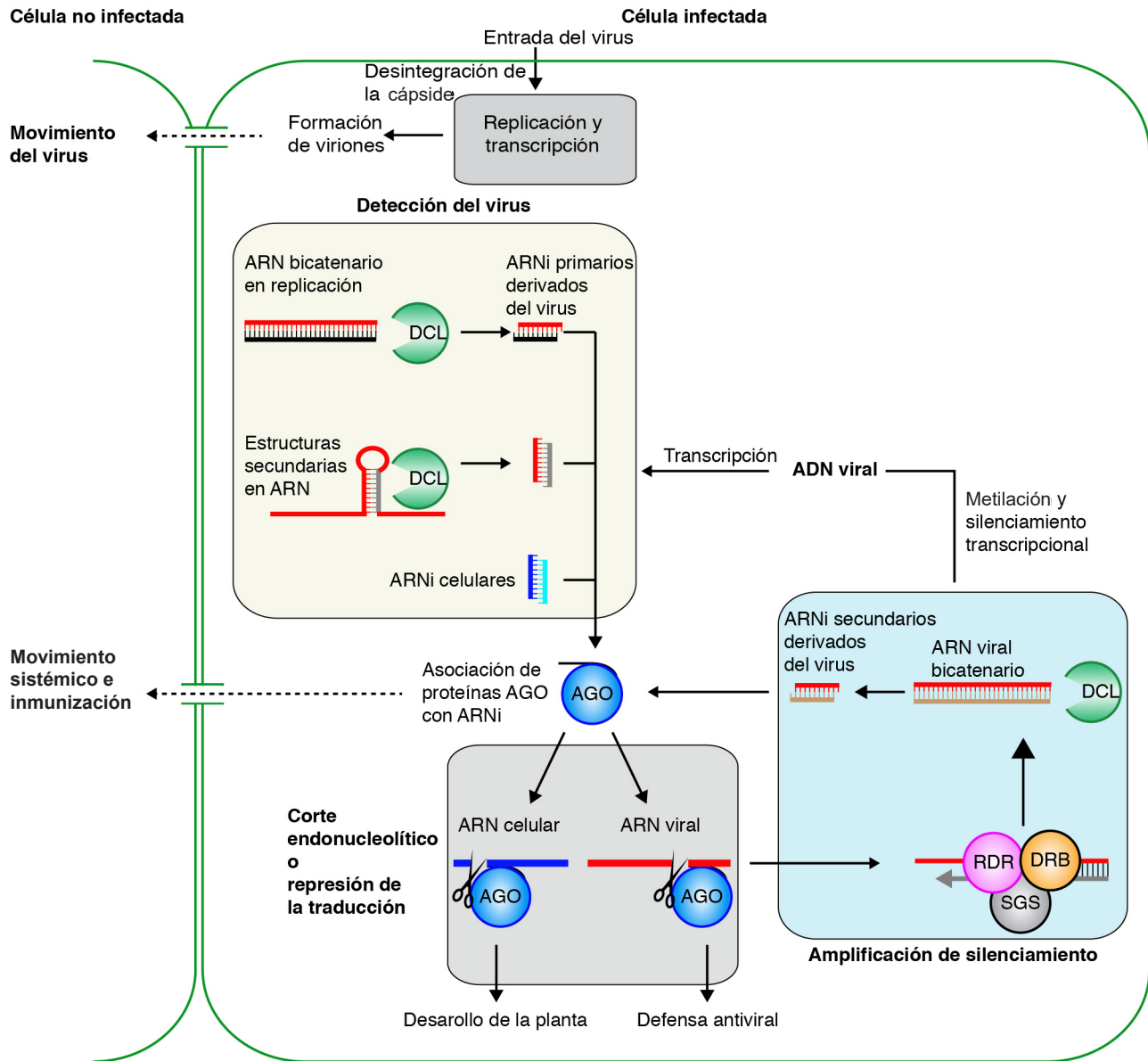


Figura 2. Componentes básicos del silenciamiento génico antiviral en plantas. Proteínas Dicer-like (DCL) cortan ARN bicatenario viral y forman ARNi primarios que se asocian con proteínas ARGONAUTA (AGO) y guían el silenciamiento de ARN viral. El corte endonucleolítico de ARN viral activa la amplificación de silenciamiento génico antiviral y resulta en la formación de ARN viral bicatenario por medio de polimerasas celulares dependientes de ARN (RDR) el cual es procesado por DCL y resulta en la formación de ARNi secundarios derivados del ARN viral. Amplificación de silenciamiento génico activa la metilación de ADN viral, estableciendo silenciamiento génico transcripcional. Los ARNi derivados del virus se mueven de una célula a otra y de manera sistémica, estableciendo un estado de inmunidad en toda la planta.

Figure 2. Antiviral RNA silencing pathway and basic components in plants. Dicer-like (DCL) proteins cut viral dsRNA to form primary virus-derived siRNAs that associate with ARGONAUTA (AGO) proteins and guide targeting of viral RNA. Slicing of viral RNA triggers amplification of antiviral RNA silencing resulting in the formation of viral dsRNA by cellular RNA-dependent RNA polymerases (RDR) and processed by DCL to form secondary-virus-derived siRNAs. Silencing amplification triggers methylation of viral DNA establishing transcriptional silencing. Virus-derived siRNA move cell-to-cell and systemically to establish a state of antiviral immunity away from the initial infection site.

sus genes vía ARN mensajero. El silenciamiento génico contra virus de ADN se activa a nivel post-transcripcional resultando en la formación de ARNi que guían la detección del ARN viral. Además, los ARNi derivados del virus en asociación con las proteínas AGO y RDR guían la metilación de ADN viral resultando en el silenciamiento génico transcripcional del minicromosoma viral, lo que impide la replicación y el movimiento del virus (Raja *et al.*, 2008; Buchmann *et al.*, 2009; Cenicerros-Ojeda *et al.*, 2016).

POBLACIONES DE ARN INTERFERENTES DERIVADOS DE VIRUS

En varias especies de plantas y virus, las poblaciones de ARNi derivados de virus han sido caracterizadas mediante secuenciación de nueva generación (Cuadro 1). Tres tipos de poblaciones han sido descritos: Poblaciones en las que moléculas de cadena positiva y negativa son igualmente abundantes, y en las que poblaciones de moléculas de cadena positiva son más abundantes que moléculas de cadena negativa y viceversa. Para algunos virus fitopatógenos de ARN de cadena positiva, los ARNi derivados de virus de polaridad positiva son más abundantes que los de polaridad negativa y hay fragmentos del genoma viral que acumulan más RNAi que otros (Cuadro 1). Este patrón sugiere que las secuencias de ARN viral de cadena positiva, o sus estructuras, son reconocidas por las proteínas DCL. Para la mayoría de combinaciones de virus-plantas, las plantas infectadas acumulan RNAi derivados de virus de la totalidad del genoma viral en cantidades similares para ambas polaridades (Cuadro 1). Resulta muy interesante la observación de que las plantas mutantes que carecen de polimerasas de amplificación RDR1 o RDR6, acumulan cantidades reducidas de RNAi derivados

in their biogenesis (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010).

TRIGGERS OF ANTIVIRAL RNA SILENCING

The nature of the viral RNA that is recognized by the cell and triggers the antiviral response has not been determined. Based on several genetic analyses (Table 1), sources of viral substrates for DCL are cellular RDR-independent and cellular RDR-dependent (Figure 2). Viral dsRNA formed during silencing amplification is RDR-dependent. Self-complementary sequences in viral genomic RNA, viral replication intermediates, and products of overlapping or bidirectional transcription are cellular RDR-independent (Ding and Voinnet, 2007). It is widely assumed, that these RNA populations trigger the antiviral RNA silencing response and DCL proteins form primary virus-derived siRNAs (Ding and Voinnet, 2007). Alternatively, or in addition, viral RNA could be recognized by translational repressors arrested and routed to DCL processing or directed to cellular RDR-dependent dsRNA synthesis (Luo and Chen, 2007). A surveillance mechanism could also be formed by AGO proteins loaded with endogenous siRNAs with complementarity to viral RNA to trigger the antiviral RNA silencing pathway as described for artificial micro RNAs targeting viral RNA (Niu *et al.*, 2006).

SMALL RNAS DIRECT ANTIVIRAL IMMUNITY

Virus-derived siRNAs associate with AGO proteins and are the specificity determinant guiding translational repression or cleavage of viral RNA with sequence complementarity to

de virus, implicando a las RDRs celulares en su biogénesis (García-Ruiz *et al.*, 2010).

ACTIVACION DE SILENCIAMIENTO GENICO ANTIVIRAL

La naturaleza del RNA viral que es reconocido por la célula y que activa el silenciamiento génico antiviral no se ha identificado. Con base en varios análisis genéticos (Cuadro 1), las fuentes de substratos virales para las proteínas DCL se puede dividir en dos grupos: Dependientes o independientes de las RDR celulares (Figura 2). Los RNA bicatenarios virales formados durante la amplificación de silenciamiento génico son dependientes de RDR celulares. Las secuencias auto-complementarias en el ARN genómico viral, productos intermedios de la replicación viral y los productos de transcripción bidireccional son independientes de RDR celulares (Ding y Voinnet, 2007). En general se asume, que estas poblaciones de ARN activan el silenciamiento génico antiviral y las proteínas DLC forman ARNi primarios derivados de virus (Ding y Voinnet, 2007). Alternativamente, o además, el ARN viral podría ser reconocido por represores de traducción que envían el ARN viral para ser procesado por proteínas DCL, o dirigidos a la síntesis de ARN bicatenario por RDR celulares (Luo y Chen, 2007). Un mecanismo de vigilancia también podría estar formado por proteínas AGO cargadas con ARNi celulares con complementariedad al ARN viral y activar silenciamiento génico antiviral como sucede con los microARNs artificiales dirigidos contra ARN viral (Niu *et al.*, 2006).

INMUNIDAD ANTIVIRAL DIRIGIDA POR ARN INTERFERENTE

Los ARNi derivados de virus y que se asocian con proteínas AGO determinan la especificidad

the siRNA (Schuck *et al.*, 2013). In a variation of the pathway targeting DNA viruses, silencing complexes formed by virus-derived siRNAs and AGO4 direct methylation of viral DNA to prevent transcription (Raja *et al.*, 2008). The end result is the establishment of a virus resistant state that inhibits virus replication and movement. Several phenomena in plant-virus interactions involve gene silencing such as cross protection, symptom recovery, synergism, and non-host resistance.

Cross protection occurs when infection by a mild virus strain prevents subsequent infection by a second virus of the same or closely related species (Kung *et al.*, 2014). Although not all cross-protection cases are explained, according to the antiviral RNA silencing model, siRNAs-derived from the mild virus strain directs targeting of viruses with sequence similarity, thus creating a state of immunity (Kung *et al.*, 2014). Symptom recovery has been described for several plant-virus combinations. Infected plants accumulate high virus titers and develop visible symptoms. However, the upper leaves of those plants contain low virus titers and do not develop symptoms. Virus-derived siRNAs formed in the lower part of the plant move systemically to the meristem to direct viral RNA targeting and prevent virus invasion of the meristem. Leaves formed after that harbor virus-derived siRNAs that mediate virus downregulation (Ma *et al.*, 2015).

Viral synergism occurs when co-infection by two viruses results in disease with more severe symptoms than single virus infection (Xia *et al.*, 2016). Most documented cases of viral synergism involve viruses in the Potyvirus genus and depend on silencing suppressors HC-Pro or P1 (Chavez-Calvillo *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2016). Potyviral HC-Pro binds both endogenous and virus-derived siRNAs (García-Ruiz *et al.*, 2015). Based on the silencing model (Figure 2), potyviral RNA

del silenciamiento génico antiviral guiando represión de la traducción o el corte endonucleolítico de ARN viral con complementariedad a los ARNis (Schuck *et al.*, 2013). En una variación del sistema, en el caso de virus de ADN, los complejos de silenciamiento formados por ARNi derivados de virus y AGO4 guían la metilación de ADN viral, lo cual bloquea la transcripción (Raja *et al.*, 2008). El resultado final es el establecimiento de un estado de resistencia viral que inhibe la replicación y movimiento virus.

En las interacciones virus-plantas, varios fenómenos pueden ser explicados con base en silenciamiento génico antiviral, tales como la protección cruzada, recuperación de síntomas, sinergismo y la resistencia de no hospedantes. La protección cruzada ocurre cuando la infección por una cepa de virus previene la infección posterior por un segundo virus de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada (Kung *et al.*, 2014). Aunque no todos los casos de protección cruzada se han explicado, de acuerdo con el modelo de silenciamiento génico antiviral, los ARNAi derivados del virus que causa la primera infección dirigen el corte o represión de la traducción de virus similares al intentar establecer una segunda infección, creando así un estado de inmunidad (Kung *et al.*, 2014). La recuperación de los síntomas se ha descrito para varias combinaciones de virus-planta. Las plantas infectadas acumulan altas cantidades de virus y desarrollan síntomas visibles. Sin embargo, las hojas superiores de dichas plantas contienen bajas cantidades de virus y no desarrollan síntomas. Los ARNi derivados del virus y formados en la parte inferior de la planta se mueven sistémicamente al meristemo para guiar el corte o represión de la traducción de ARN viral lo cual evita la invasión del meristemo por el virus. Las hojas formadas después de estos eventos acumulan bajas cantidades de virus y no presentan síntomas (Ma *et al.*, 2015).

silencing suppressors bind siRNAs derived from co-infecting viruses, preventing targeting of viral RNA and resulting in severe symptoms and higher accumulation of the non-potyvirus (Xia *et al.*, 2016).

Several mechanisms explain non-host resistance, such as antiviral RNA silencing, host genetic determinants of viral RNA translation, replication or movement (Ivanov *et al.*, 2014). Viral RNA targeting by endogenous siRNAs or virus activated siRNAs supports non-host resistance (Ding and Voinnet, 2007).

SUPPRESSION OF RNA SILENCING BY VIRUSES

In order to replicate and move cell-to-cell and systemically, plant viruses must protect themselves from antiviral defense responses. At least two mechanisms have been described: evasion and suppression of RNA silencing. Positive-strand RNA viruses replicate in membrane bound compartments that sequester replication intermediates. Negative-strand RNA viruses and dsRNA viruses replicate in the nucleus or in enveloped vesicles. These structures might prevent access to viral dsRNA by the RNA silencing machinery (Laliberte and Sanfacon, 2010).

Most plant and some insect viruses encode silencing suppressors that inactivate RNA silencing by multiple mechanisms such as inhibition of siRNA biogenesis, sequestration of virus-derived siRNAs, triggering degradation of AGO or DCL proteins, and blocking RNA silencing amplification (Table 2). Virus-encoded silencing suppressors also bind cellular miRNAs and other siRNAs. Similarly effects on AGO, DCL, RDR and their accessory proteins affects biogenesis and activity of cellular miRNAs and siRNAs (Chapman *et al.*, 2004). Gene silencing regulates plant development. Thus,

El sinergismo viral se produce cuando una infección simultánea por dos virus resulta en una enfermedad con síntomas más severos que infección por un solo virus (Xia *et al.*, 2016). La mayor parte de los casos documentados de sinergismo incluyen a los virus del género *Potyvirus* y dependen de los supresores de silenciamiento HC-Pro o P1 (Chávez-Calvillo *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2016). El supresor HC-Pro se asocia tanto con los ARNi celulares como con los ARNi derivados de virus (García-Ruiz *et al.*, 2015). Basado en el modelo de silenciamiento génico (Figura 2), los supresores del silenciamiento génico se unen a los ARNi derivados de ambos virus presentes en la misma planta, bloqueando tanto el silenciamiento génico antiviral como el silenciamiento de genes celulares, lo cual resulta en síntomas severos, así como en mayor acumulación de los virus que acompañan al potyvirus (Xia *et al.*, 2016).

Varios mecanismos que explican la resistencia de no hospedante, tales como silenciamiento génico antiviral y determinantes genéticos del hospedante necesarios para la replicación o movimiento de virus (Ivanov *et al.*, 2014). Silenciamiento génico antiviral dirigido por ARNi celulares o activados por infecciones virales pueden ser responsables de la resistencia de no hospedante (Ding y Voinnet, 2007).

SUPRESION DE SILENCIAMIENTO GENICO POR VIRUS

Con el fin de replicarse y moverse de célula a célula y sistémicamente, los virus de plantas deben protegerse de las respuestas de defensa antivirales, incluyendo el silenciamiento génico. Se han descrito al menos dos mecanismos: la evasión y la supresión de silenciamiento génico. Los virus de ARN de cadena positiva se replican en vesículas membranosas que contienen ARN bicatenario que

perturbation of silencing pathways leads to changes in host gene expression and is, at least in part, responsible for symptom development (Chapman *et al.*, 2004). Because antiviral silencing results in methylation of DNA virus minichromosomes, geminiviruses encode suppressor proteins that interfere with DNA methylation (Table 2).

GENETIC ENGINEERING OF VIRUS RESISTANCE

For some plant-virus combinations, sources of natural genetic resistance have been identified and introduced by breeding into commercial cultivars. However, for most plant-virus combinations, natural genetic resistance has not been identified (Mehta *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014). Several RNA silencing-based approaches have been used to engineer virus resistance in plants using transgenes that express dsRNA, single stranded sense or antisense RNA, artificial miRNA (amiRNAs), or tasiRNAs (Figure 3 and Table 3). Sequences derived from the virus are integrated into DNA cassettes under control of constitutive or tissue-specific promoter. The transcript forms dsRNA processed into siRNAs that program targeting of viral RNA, creating a state of immunity.

These plants display a phenotype that varies from immunity to tolerance. The most targeted areas are the viral coat protein, the viral RNA-dependent RNA polymerase, silencing suppressor, or the geminiviral replication initiation site (Table 3).

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) are segments of bacterial DNA containing short repetitions separated by a spacer sequence. CRISPR are bacteriophage virus, or plasmid DNA, integrated into the bacterial genome, and are processed by Cas nucleases into small RNA guides. Nuclease

se forma durante la replicación. Los virus de ARN de cadena negativa y los virus de ARN bicatenario se replican en el núcleo o en vesículas membranosas. Estas estructuras pueden proteger el ARN viral del silenciamiento génico (Laliberté y Sanfacon, 2010).

El genoma de la mayoría de los virus de plantas y algunos virus de insectos codifica supresores que inactivan el silenciamiento génico mediante múltiples mecanismos, tales como la inhibición de la biogénesis de los ARNi, asociación con ARNi derivados de virus, degradación de proteínas AGO y DCL, o bloqueando la amplificación del silenciamiento (Cuadro 2). Los supresores virales de silenciamiento génico también se asocian con miARNs y otros ARNi celulares. Del mismo modo, efectos sobre AGO, DCL, RDR y sus proteínas accesorias afecta la biogénesis y la actividad de los miARNs y ARNi celulares (Chapman *et al.*, 2004). El silenciamiento génico regula el desarrollo de plantas. Por lo tanto, la perturbación de las rutas de silenciamiento génico conduce a cambios en la expresión génica del hospedante y es, al menos en parte, responsable del desarrollo de síntomas visibles en plantas infectadas por virus (Chapman *et al.*, 2004). Dado que el silenciamiento génico antiviral resulta en la metilación de minicromosomas de virus de ADN, los geminivirus codifican proteínas supresoras que interfieren con la metilación del ADN (Cuadro 2).

INGENIERIA GENETICA DE RESISTENCIA A VIRUS

Para algunas combinaciones de virus-planta, fuentes de resistencia genética se han identificado e introducido mediante mejoramiento en variedades comerciales. Sin embargo, para muchas combina-

Cas9 associates with guide RNAs and specifically cuts DNA with sequence complementarity to the guide RNA. Interestingly, this specific RNA-guided DNA-nuclease provides antiviral immunity in bacteria (Horvath and Barrangou, 2010). This system has been adapted to design the most powerful genome editing tool available today with endless applications in functional genomics of eukaryotes, including humans, insects, nematodes, fungi, and plants (Ali *et al.*, 2015). The CRISPER/Cas9 system has recently been used to design antiviral resistance against geminiviruses (Table 4) and will be part of current efforts to identify or validate plant susceptibility genes, leading to genetic engineering of antiviral resistance without transgenes.

FUTURE CHALLENGES

Research efforts are currently focused on the identification of additional genetic components, identification and characterization of silencing suppressor proteins, and RNAs. Basic mechanisms expected to be elucidated in the near future include initial sensing of viral RNA by the cell, genetic determinants and mechanism of silencing amplification, downregulation of viral RNA by cleavage or translational repression, and the roles of virus-derived siRNAs in transcriptional reprogramming of infected cells. A challenge for plant pathologists is to translate basic knowledge into practical applications.

ACKNOWLEDGMENTS

Research in the Garcia-Ruiz laboratory is supported by an NIH grant (RO1GM120108).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

**Cuadro 2.** Ejemplos representativos de proteínas virales supresoras de silenciamiento génico organizados con base en su mecanismo de actividad.

**Tabla 2.** Representative virus-encoded gene silencing suppressors.

| Virus                                                   | Supresor                    | Mecanismo                             | Otras funciones                                                                 | Referencias                      |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Asociación con ARNi pequeños</b>                     |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| Potyvirus                                               | HC-Pro                      | ARNi de cadena doble o sencilla       | Movimiento del virus, desarrollo de los síntomas, determinante de patogenicidad | García-Ruiz <i>et al.</i> , 2015 |
| TBSV                                                    | P19                         | ARNi de cadena doble                  | Movimiento del virus, desarrollo de los síntomas, determinante de patogenicidad | Chapman <i>et al.</i> , 2004     |
| BYV                                                     | P21                         | ARNi de cadena doble                  | Requerido para la replicación                                                   | Chapman <i>et al.</i> , 2004     |
| RDV                                                     | PNS10                       | ARNi de cadena doble                  | ND                                                                              | Ren <i>et al.</i> , 2010         |
| <b>Asociación con ARN bicatenario largo</b>             |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| TCV                                                     | P38 CP                      | ARN bicatenario                       | Formación de viriones<br>Movimiento de virus                                    | Merai <i>et al.</i> , 2006       |
| <b>Degradación o inhibición de AGO</b>                  |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| CMV                                                     | 2b                          | AGO1<br>AGO4                          | Movimiento de virus                                                             | Zhang <i>et al.</i> , 2006       |
| ToRSV                                                   | CP                          | AGO1                                  | Formación de viriones                                                           | Karran and Sanfacon, 2014        |
| TCV                                                     | P38 CP                      | AGO1<br>AGO2                          | Formación de viriones<br>Movimiento de virus                                    | Azevedo <i>et al.</i> , 2010     |
| <b>Inhibición de DCL</b>                                |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| RYMV                                                    | P1                          | DCL4                                  | Patogénesis, desarrollo de síntomas                                             | Lacombe <i>et al.</i> , 2010     |
| TCV                                                     | P38 CP                      | DCL2                                  | Formación de viriones<br>Movimiento de virus                                    | Azevedo <i>et al.</i> , 2010     |
| <b>Inhibición de la amplificación de silenciamiento</b> |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| RDV                                                     | PNS10                       | Reducción de la expresión de RDR6     | ND                                                                              | Ren <i>et al.</i> , 2010         |
| <b>Interferencia con la metilación de ADN</b>           |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| TGMV                                                    | AL2                         | Inhibición de la quinasa de adenosina | Patogénesis                                                                     | Buchmann <i>et al.</i> , 2009    |
| BCTV                                                    | L2                          |                                       |                                                                                 |                                  |
| <b>ARN disfrazados</b>                                  |                             |                                       |                                                                                 |                                  |
| CaMV                                                    | Traducción líder de 35S ARN | Sobrecarga de DCL                     | Traducción y transcripción reversa                                              | Blevins <i>et al.</i> , 2011     |

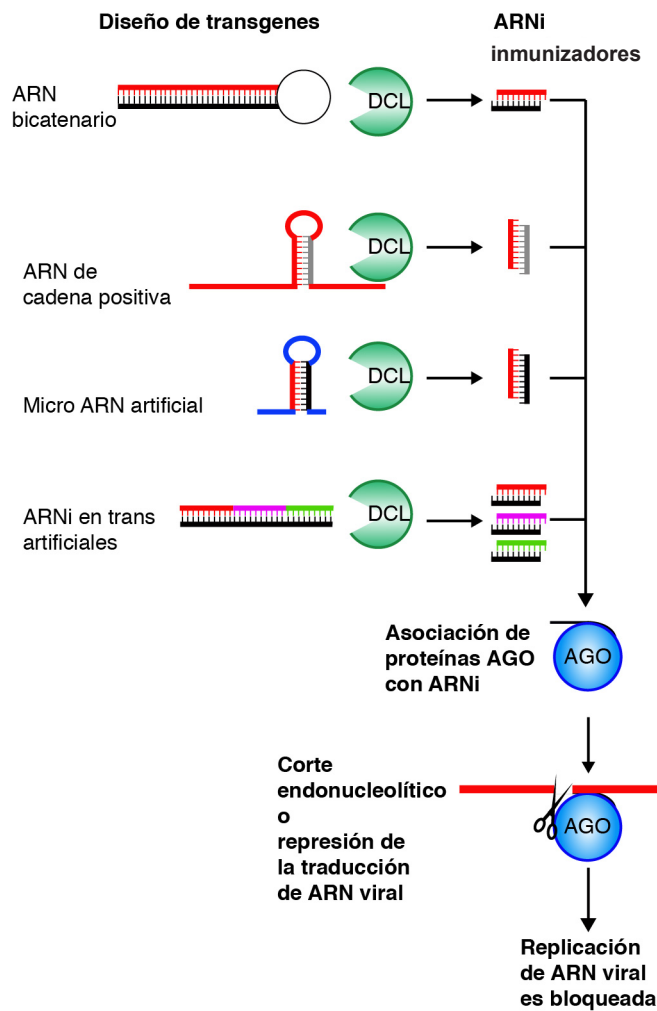
**Virus.** *Virus del rizado de la remolacha azucarera (BCTV)*, *Virus del amarillamiento de la remolacha azucarera (BYV)*, *Virus del mosaico de la coliflor (CaMV)*, *Virus del mosaico del pepino (CMV)*, *Phytoreovirus del enanismo del arroz (RDV)*, *Virus del moteado amarillo del arroz (RYMV)*, *Virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV)*, *Virus mosaico dorado del tomate (TGMV)*, *Virus de la mancha anular del tomate (ToRSV)*, *Virus del encrespado del nabo (TCV)* / **Viruses.** *Beet curly top virus (BCTV)*, *Beet yellows virus (BYV)*, *Cauliflower mosaic virus (CaMV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Rice dwarf phytoreovirus (RDV)*, *Rice yellow mottle virus (RYMV)*, *Tomato bushy stunt virus (TBSV)*, *Tomato golden mosaic virus (TGMV)*, *Tomato ringspot virus (ToRSV)*, *Turnip crinkle virus (TCV)*.

ciones de planta-virus, resistencia genética natural no ha sido identificada (Mehta *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014). Varios enfoques basados en el silenciamiento génico se han utilizado para obtener resistencia a virus en plantas utilizando transge-

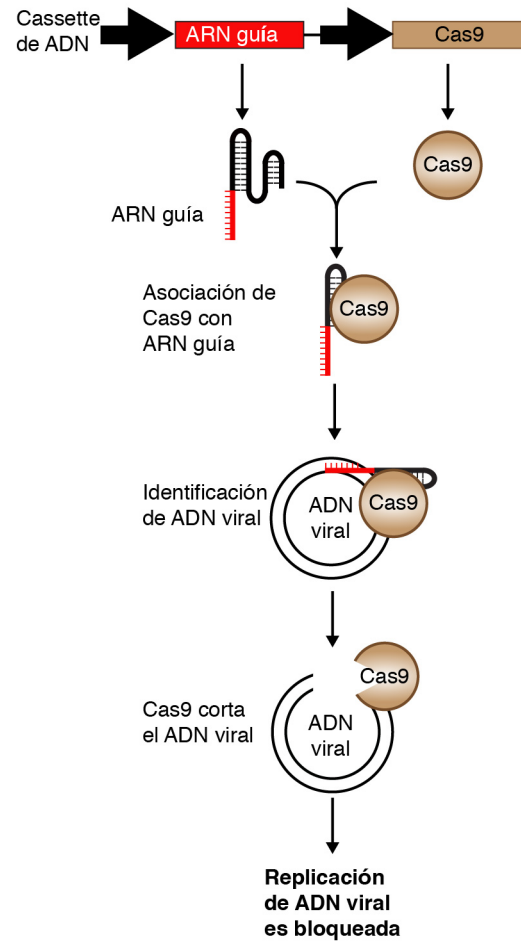
nes que expresan ARN bicatenario, ARN monocatenario de cadena positiva o negativa, microARNs artificiales, o ARN interferentes en trans artificiales (Figura 3 y Cuadro 3). Las secuencias derivadas del virus se integran en cassettes de ADN bajo el



**A Resistencia contra ARN viral**



**B Resistencia contra ADN viral**



**Figura 3.** Ingeniería genética de resistencia antiviral en plantas por medio de silenciamiento génico o edición del genoma. **A.** Producción de ARNi inmunizadores activada por transgenes de origen viral que forma ARN bicatenario y es procesado por proteínas DCL. **B.** Diseño de resistencia antiviral contra virus de ADN usando el sistema CRISPR/Cas9. La proteína Cas9 se asocia con ARN guía (20 a 24 nt) y de manera específica corta ADN, evitando la replicación de virus de ADN.

**Figure 3.** Genetic engineering of antiviral immunity in plants by RNA silencing or DNA editing. **A.** Production of immunizing antiviral siRNAs is triggered by transgenes of viral origin forming dsRNA processed by Dicer-like proteins (DCL). **B.** Design of antiviral resistance against DNA viruses using the CRISPR/Cas9 system. Cas9 protein associates with the guide RNA (20 to 24 nt) to specifically cut DNA targets, preventing DNA replication.

control de un promotor constitutivo o específico de algún tejido. El transcrito forma ARN bicatenario que es procesado por proteínas DCL formando ARNi que programan el corte o represión de traducción de RNA viral. Estas plantas muestran un

fenotipo que varía de inmunidad a tolerancia. Los fragmentos virales mas usados son la proteína de la cápside viral, la replicasa, los supresores de silenciamiento, o el sitio de iniciación de la replicación en geminivirus (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Ejemplos representativos de plantas resistentes a virus desarrolladas mediante silenciamiento génico o edición del genoma. Los ejemplos están agrupados con base en el diseño del transgen.

**Table 3.** Representative virus resistant plants developed by RNA silencing or genome editing approaches.

| Especies                                 | Resistencia a                                         | Silenciamiento de                                      | Fase         | Referencias                          |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| <b>ARN de cadena positiva</b>            |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Tomate                                   | TMV                                                   | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Abel <i>et al.</i> , 1986            |
| Papaya                                   | PRSV                                                  | Proteína de la cápside                                 | Comercial    | Fitch <i>et al.</i> , 1993           |
| Tabaco                                   | TEV                                                   | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Lindbo <i>et al.</i> , 1993          |
| Calabacita                               | ZYMV y WMV                                            | Proteína de la cápside                                 | Comercial    | Fuchs and Gonsalves, 1995            |
| <b>ARN de cadena positiva y negativa</b> |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Tomato                                   | ToRV                                                  | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Yepes <i>et al.</i> , 1996           |
| <b>ARN bicatenario</b>                   |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Frijol común                             | BGMV                                                  | AC1                                                    | Experimental | Bonfim <i>et al.</i> , 2007          |
| Arroz                                    | RGSV                                                  | Nucleocápside<br>Proteína de movimiento                | Experimental | Shimizu <i>et al.</i> , 2013         |
| Ciruela                                  | PPV                                                   | eiFiso4E *                                             | Experimental | Wang <i>et al.</i> , 2013            |
| <b>ARN que forma una horquilla</b>       |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Ciruela                                  | PPV                                                   | 5' UTR-P1                                              | Experimental | Di Nicola-Negri <i>et al.</i> , 2010 |
| Trigo                                    | WSMV                                                  | Proteína de la cápside                                 | Experimental | Cruz <i>et al.</i> , 2014            |
| <b>miARN artificiales</b>                |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Arabidopsis                              | TuYMV<br>TuMV                                         | P69, HC-PRO                                            | Experimental | Niu <i>et al.</i> , 2006             |
| Yuca africana                            | CBSV                                                  | P1, Nib, y proteína de la cápside                      | Experimental | Wagaba <i>et al.</i> , 2016          |
| <b>ARNtasi</b>                           |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Tomate                                   | ToLCNDV                                               | AC2 and AC4                                            | Experimental | Singh <i>et al.</i> , 2015           |
| Tabaco                                   | ToLCNDV                                               | AC2 and AC5                                            | Experimental | Singh <i>et al.</i> , 2015           |
| <b>CRISR/Cas9</b>                        |                                                       |                                                        |              |                                      |
| Arabidopsis                              | TuMV                                                  | eiFiso4E*                                              | Experimental | Pyott <i>et al.</i> , 2016           |
| Algodón                                  | Complejo de enfermedades del enrollamiento de la hoja | Sitio de inicio de la replicación, replicasa, proteína | Experimental | Iqbal <i>et al.</i> , 2016           |

**Virus.** *Virus del mosaico dorado del frijol* (BGMV), *Virus del rayado marrón de la yuca africana* (CBSV), *Virus del mosaico del pepino* (CMV), *Virus de la mancha anular de la papaya* (PRSV), *Virus de la sharka de la ciruela* (PPV), *Virus del enanismo del arroz* (RGSV), *Virus del grabado del tabaco* (TEV), *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), *Virus de Nueva Delhi del rizado de la hoja del tomate* (ToLCNDV), *Virus de la mancha anular del tomate* (ToRV), *Virus del mosaico del nabo* (TuMV), *Virus del mosaico amarillo del nabo* (TuYMV), *Virus del mosaico de la sandía* (WMV), *Virus del mosaico estriado del trigo* (WSMV), *Virus del mosaico amarillo de la calabaza* (ZYMV).

Complejo de enfermedades del enrollamiento de la hoja del algodón: *Virus del enrollamiento de la hoja de algodón de Alabad* (CLCuAIV), *Virus del enrollamiento de la hoja de algodón de Bangalore* (CLCuBaV), *Virus del enrollamiento de la hoja de algodón de Kokhran* (CLCuKoV), *CLCuKoV-Bu* (cepa de Burewala), *Virus del enrollamiento de la hoja del algodón de Multan* (CLCuMuV) y *Virus del enrollamiento de la hoja del algodón* (CLCuRaV) / **Virus.** *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Cassava brown streak virus* (CBSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ring spot virus* (PRSV), *Plum pox virus* (PPV), *Rice grassy stunt virus* (RGSV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Tomato ringspot virus* (ToRV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TuYMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV).

Cotton leaf curl disease complex: *Cotton leaf curl Alabad virus* (CLCuAIV), *Cotton leaf curl Bangalore virus* (CLCuBaV), *Cotton leaf curl Kokhran virus* (CLCuKoV), *CLCuKoV-Bu* (Burewala strain), *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) and *Cotton leaf curl Rajasthan virus* (CLCuRaV).

**Hospederos.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Yuca africana (*Manihot esculenta*), Frijol común (*Phaseolus vulgaris*), Algodón (*Gossypium hirsutum*), Papaya (*Carica papaya*), Ciruela (*Prunus spp*), Arroz (*Oryza sativa*), Calabacita (*Cucurbita pepo*), Tabaco (*Nicotiana tabacum*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Trigo (*Triticum aestivum L.*) / **Hosts.** Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), Cassava (*Manihot esculenta*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), Cotton (*Gossypium hirsutum*), Papaya (*Carica papaya*), Plum (*Prunus spp*), Rice (*Oryza sativa*), Squash (*Cucurbita pepo*), Tobacco (*Nicotiana tabacum*), Tomato (*Solanum lycopersicum*), Wheat (*Triticum aestivum L.*).

**Gene silenciado.** Nombre de los genes virales o de la planta (\*) sometidos a silenciamiento génico o edición del genoma / **Target gene.** Name of the viral or host genes (\*) targeted for silencing or genome editing.

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) son segmentos de ADN bacteriano que contienen repeticiones cortas separadas por una secuencia espaciadora. Los CRISPR se derivan de virus bacteriófagos, o plásmido de ADN, integrado en el genoma bacteriano, y son procesados por nucleasas Cas para formar guías de ARN pequeño. La nucleasa Cas9 se asocia con RNAs guía y específicamente corta ADN con secuencia complementaria al ARN guía. Este sistema proporciona inmunidad antiviral en bacterias (Horvath y Barrangou, 2010) y ha sido adaptado para diseñar la herramienta de edición de genomas más poderosa y disponible en la actualidad con un sin fin de aplicaciones en la genómica funcional de eucariotas, incluyendo humanos, insectos, nematodos, hongos y plantas (Ali *et al.*, 2015). El sistema CRISPR/Cas9 se ha utilizado recientemente para diseñar resistencia antiviral contra geminivirus (Cuadro 3) y será parte de los esfuerzos actuales para identificar o validar los genes de susceptibilidad en plantas, dirigiendo la ingeniería genética de resistencia antiviral sin necesidad de hacer plantas transgénicas.

## RETOS FUTUROS

Los esfuerzos de investigación se centran actualmente en la identificación de los componentes genéticos del sistema de silenciamiento génico, así como en la identificación y caracterización de ARNs y proteínas virales supresoras de silenciamiento. Se espera que en un futuro cercano se definan los mecanismos básicos responsables de la detección inicial de ARN viral por la célula, los determinantes genéticos y el mecanismo de amplificación del silenciamiento génico, corte y degradación o represión de traducción de ARN viral, y los roles de los ARNi derivados de virus en la reprogramación transcripcional de las células infectadas.

Un reto especial para los fitopatólogos es traducir el conocimiento básico en aplicaciones prácticas.

## AGRADECIMIENTOS

La investigación en el laboratorio del Dr. H. Garcia-Ruiz es financiada por un proyecto con el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos, NIH (RO1GM120108).

## LITERATURA CITADA

- Abel PP, Nelson RS., De B, Hoffmann, N, Rogers SG, Fraley, RT and Beachy RN. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743. PMID: 3457472
- Akbergenov R, Si-Ammour A, Blevins T, Amin I, Kutter C, Vanderschuren H, Zhang P, Gruissem W, Meins F Jr, Hohn T and Pooggin MM. 2006. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res* 34, 462-471. DOI: 10.1093/nar/gkj447
- Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M and Mahfouz MM. 2015. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol* 16, 238. DOI: 10.1186/s13059-015-0799-6
- Axtell, MJ. 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol* 64, 137-159. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050312-120043
- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge, S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T and Voinnet O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24, 904-915. DOI: 10.1101/gad.1908710
- Blevins T, Rajeswaran R, Aregger M, Borah BK, Scheptilnikov M, Baerlocher L, Farinelli L, Meins F Jr, Hohn T and Pooggin MM. 2011. Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Res* 39, 5003-5014. DOI: 10.1093/nar/gkr119
- Blevins T, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Beknazariants D, Si-Ammour A, Park HS, Vazquez F, Robertson D, Meins F Jr, Hohn T and Pooggin MM. 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res* 34, 6233-6246. DOI: 10.1093/nar/gkl886
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EO, Mendes EA and Aragao FJ. 2007. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant Microbe Interact* 20, 717-726. DOI: 10.1094/MPMI-20-6-0717
- Brosseau C and Moffett P. 2015. Functional and Genetic

- Analysis Identify a Role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. *Plant Cell* 27, 1742-1754. DOI: 10.1105/tpc.15.00264
- Buchmann RC, Asad S, Wolf JN, Mohannath G and Bisaro DM. 2009. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 83, 5005-5013. DOI: 10.1128/JVI.01771-08
- Cao M, Du P, Wang X, Yu YQ, Qiu YH, Li W, Gal-On A, Zhou C, Li Y and Ding SW. 2014. Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 14613-14618. DOI: 10.1073/pnas.1407131111
- Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, Montgomery TA, Nguyen T, Cuperus JT and Carrington JC. 2012. Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *The Plant cell* 24, 3613-3629. DOI: 10.1105/tpc.112.099945
- Ceniceros-Ojeda EA, Rodriguez-Negrete EA and Rivera-Bustamante RF. 2016. Two Populations of Viral Minichromosomes Are Present in a Geminivirus-Infected Plant Showing Symptom Remission (Recovery). *J Virol* 90, 3828-3838. DOI: 10.1128/JVI.02385-15
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV and Carrington JC. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18, 1179-1186. DOI: 10.1101/gad.1201204
- Chavez-Calvillo G, Contreras-Paredes CA, Mora-Macias J, Noa-Carrazana JC, Serrano-Rubio AA, Dinkova TD, Carrillo-Tripp M and Silva-Rosales L. 2016. Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in Carica papaya is determined by their order of infection. *Virology* 489, 179-191. DOI: 10.1016/j.virol.2015.11.026
- Chitwood DH, Nogueira FT, Howell MD, Montgomery TA, Carrington, JC and Timmermans MC. 2009. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev* 23, 549-554. DOI: 10.1101/gad.1770009
- Cruz LF, Rupp JLS, Trick HN and Fellers JP. 2014. Stable resistance to Wheat streak mosaic virus in wheat mediated by RNAi. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 50, 665-672. DOI: 10.1007/s11627-014-9634-0
- Cuperus JT, Fahlgren N and Carrington JC. 2011. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant cell* 23, 431-442. DOI: 10.1105/tpc.110.082784
- Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA and Carrington JC. 2010. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nature structural & molecular biology* 17, 997-1003. DOI: 10.1038/nsmb.1866
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC and Voinnet O. 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68-71. DOI: 10.1126/science.1128214
- Di Nicola-Negri E, Tavazza M, Salandri L and Ilardi V. 2010. Silencing of Plum pox virus 5'UTR/P1 sequence confers resistance to a wide range of PPV strains. *Plant cell reports* 29, 1435-1444. DOI: 10.1007/s00299-010-0933-6
- Ding SW and Voinnet O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.039
- Fitch MM, Manshardt RM, Gonsalves D and Slightom JL. 1993. Transgenic papaya plants from Agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos. *Plant cell reports* 12, 245-249. DOI: 10.1007/BF00237128
- Fuchs M and Gonsalves D. 1995. Resistance of Transgenic Hybrid Squash Zw-20 Expressing the Coat Protein Genes of Zucchini Yellow Mosaic-Virus and Watermelon Mosaic-Virus-2 to Mixed Infections by Both Potyviruses. *Bio-Technology* 13, 1466-1473. DOI: 10.1038/nbt1295-1466
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Bremel KJ and Carrington JC. 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22, 481-496. DOI: 10.1105/tpc.109.073056
- Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, Fahlgren N, Gilbert KB, Takeda A, Giampetruzzi A, Garcia Ruiz, MT, McGinn MG, Lowery N, Martinez Baladejo MT and Carrington JC. 2015. Roles and Programming of Arabidopsis ARGONAUTE Proteins during Turnip Mosaic Virus Infection. *PLoS Pathog* 11, e1004755. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004755
- Hong W, Qian D, Sun R, Jiang L, Wang Y, Wei C, Zhang Z and Li Y. 2015. OsRDR6 plays role in host defense against double-stranded RNA virus, Rice Dwarf Phyto-reovirus. *Sci Rep* 5, 11324. DOI: 10.1038/srep11324
- Horvath P and Barrangou R. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167-170. DOI: 10.1126/science.1179555
- Iqbal Z, Sattar MN and Shafiq M. 2016. CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease. *Frontiers in plant science* 7, 475. DOI: 10.3389/fpls.2016.00475
- Ivanov KI, Eskelin K, Lohmus A and Makinen K. 2014. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J Gen Virol* 95, 1415-1429. DOI: 10.1099/vir.0.064220-0
- Karran RA and Sanfacon H. 2014. Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 933-943. DOI: 10.1094/MPMI-04-14-0099-R
- Kung YJ, Lin PC, Yeh SD, Hong SF, Chua NH, Liu LY, Lin CP, Huang YH, Wu HW, Chen CC and Lin SS. 2014. Genetic analyses of the FRNK motif function of Turnip mosaic virus uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 944-955. DOI: 10.1094/MPMI-04-14-0116-R
- Lacombe S, Bangratz M, Vignols F and Brugidou C. 2010. The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J* 61, 371-382. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04062.x
- Lablerte JF and Sanfacon H. 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 48, 69-91. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114239
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM and Dougherty WG. 1993. Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene

- Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* 5, 1749-1759. DOI: 10.1105/tpc.5.12.1749
- Luo Z and Chen Z. 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 943-958. DOI: 10.1105/tpc.106.045724
- Ma X, Nicole MC, Meteignier LV, Hong N, Wang G and Moffett P. 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of experimental botany* 66, 919-932. DOI: 10.1093/jxb/eru447
- Mehta R, Radhakrishnan T, Kumar A, Yadav R, Dobaría JR, Thirumalaisamy PP, Jain RK and Chigurupati P. 2013. Coat protein-mediated transgenic resistance of peanut (*Arachis hypogaea* L.) to peanut stem necrosis disease through Agrobacterium-mediated genetic transformation. *Indian J Virol* 24, 205-213. DOI: 10.1007/s13337-013-0157-9
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L and Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80, 5747-5756. DOI: 10.1128/JVI.01963-05
- Minoia S, Carbonell A, Di Serio F, Gisel A, Carrington JC, Navarro B and Flores R. 2014. Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *J Virol* 88, 11933-11945. DOI: 10.1128/JVI.01404-14
- Mitter N, Koundal V, Williams S and Pappu H. 2013. Differential expression of tomato spotted wilt virus-derived viral small RNAs in infected commercial and experimental host plants. *PLoS One* 8, e76276. DOI: 10.1371/journal.pone.0076276
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R and Baulcombe, D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872-875. DOI: 10.1126/science.1187959
- Navarro B, Pantaleo V, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Di Serio F and Burgyan J. 2009. Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant-viroid interaction. *PLoS One* 4, e7686. DOI: 10.1371/journal.pone.0007686
- Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD and Chua NH. 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. *Nat Biotechnol* 24, 1420-1428. DOI: 10.1038/nbt1255
- Padmanabhan C, Zhang X and Jin H. 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* 12, 465-472. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.005
- Pantaleo V, Saldarelli P, Miozzi L, Giampetruzzi A, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G and Burgyan J. 2010. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology* 408, 49-56. DOI: 10.1016/j.virol.2010.09.001
- Pyott DE, Sheehan E and Molnar A. 2016. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Mol Plant Pathol*. DOI: 10.1111/mpp.12417
- Qu F, Ye X and Morris, TJ. 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14732-14737. DOI: 10.1073/pnas.0805760105
- Raja P, Sanville BC, Buchmann RC and Bisaro, DM. 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol* 82, 8997-9007. DOI: 10.1128/JVI.00719-08
- Ren B, Guo Y, Gao F, Zhou P, Wu F, Meng Z, Wei C and Li Y. 2010. Multiple functions of Rice dwarf phytoevirus Pns10 in suppressing systemic RNA silencing. *J Virol* 84, 12914-12923. DOI: 10.1128/JVI.00864-10
- Schuck J, Gursinsky T, Pantaleo V, Burgyan J and Behrens SE. 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Res* 41, 5090-5103. DOI: 10.1093/nar/gkt193
- Shafiq S, Li J and Sun Q. 2016. Functions of plants long non-coding RNAs. *Biochim Biophys Acta* 1859, 155-162. DOI: 10.1016/j.bbaggm.2015.06.009
- Shimizu T, Ogamino T, Hiraguri A, Nakazono-Nagaoka E, Uehara-Ichiki T, Nakajima M, Akutsu K, Omura T and Sasaya T. 2013. Strong resistance against Rice grassy stunt virus is induced in transgenic rice plants expressing double-stranded RNA of the viral genes for nucleocapsid or movement proteins as targets for RNA interference. *Phytopathology* 103, 513-519. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0165-R
- Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J, Sueda K, Burgyan J and Masuta C. 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, e1002021. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002021
- Singh A, Taneja J, Dasgupta I and Mukherjee SK. 2015. Development of plants resistant to tomato geminiviruses using artificial trans-acting small interfering RNA. *Mol Plant Pathol* 16, 724-734. DOI: 10.1111/mpp.12229
- Urayama S, Moriyama H, Aoki N, Nakazawa Y, Okada R, Kiyota E, Miki D, Shimamoto K and Fukuhara T. 2010. Knock-down of OsDCL2 in rice negatively affects maintenance of the endogenous dsRNA virus, *Oryza sativa* endornavirus. *Plant Cell Physiol* 51, 58-67. DOI: 10.1093/pcp/pep167
- Wagaba H, Patil BL, Mukasa S, Alicai T, Fauquet CM and Taylor NJ. 2016. Artificial microRNA-derived resistance to Cassava brown streak disease. *J Virol Methods* 231, 38-43. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.02.004
- Wang X, Kohalmi SE, Svircev A, Wang A, Sanfacon H and Tian L. 2013. Silencing of the host factor eIF(iso)4E gene confers plum pox virus resistance in plum. *PLoS One* 8, e50627. DOI: 10.1371/journal.pone.0050627
- Weiberg A, Wang M, Bellinger M and Jin H. 2014. Small RNAs: a new paradigm in plant-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol* 52, 495-516. DOI: 10.1146/annurev-phyto-102313-045933
- Wu J, Yang Z, Wang Y, Zheng L, Ye R, Ji Y, Zhao S, Ji S, Liu R, Xu L, Zheng H, Zhou Y, Zhang X, Cao X, Xie L, Wu Z, Qi Y and Li Y. 2015. Viral-inducible Argonaute18 confers broad-spectrum virus resistance in rice by sequestering a host microRNA. *Elife* 4. DOI: 10.7554/eLife.05733

- Xia Z, Zhao Z, Chen L, Li M, Zhou T, Deng C, Zhou Q and Fan Z. 2016. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Sci Rep* 6, 20520. DOI: 10.1038/srep20520
- Yepes LM, Fuchs M, Slightom JL and Gonsalves D. 1996. Sense and antisense coat protein gene constructs confer high levels of resistance to tomato ringspot nepovirus in transgenic *Nicotiana* species. *Phytopathology* 86, 417-424. DOI: 10.1094/Phyto-86-417
- Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ and Chua NH. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20, 3255-3268. DOI: 10.1101/gad.1495506.