

## HERRAMIENTAS DE ENSEÑANZA EN BIOLOGÍA VEGETAL™: NOTAS DE CLASES

# El mundo de los RNAs pequeños

El dogma central de la biología establece que el DNA se transcribe a mRNA, este se traduce a proteínas, con la ayuda de tRNAs y ribosomas, de los cuales sus componentes clave son rRNAs. En la década de 1990, empezó a reconocerse que los RNA tienen funciones adicionales además de aquellas como mRNAs, tRNAs, y rRNAs. A través del desarrollo de diversas estrategias experimentales, ahora sabemos que los RNAs (que tienen entre 21 y 24 nucleótidos de longitud) pueden tener funciones de silenciamiento secuencia-específica sobre genes, descritas colectivamente como RNA de interferencia o RNAi. El silenciamiento de genes mediado por RNA puede implicar modificaciones a la cromatina, resultando en la supresión de la transcripción (conocido como silenciamiento génico transcripcional), o interferir con la traducción o estabilidad de mRNA, conocido como silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Estas funciones de silenciamiento génico participan en varios procesos biológicos incluyendo la regulación de la expresión génica, el silenciamiento de elementos transponibles y la defensa antiviral.

### ¿QUÉ SON LOS RNAs PEQUEÑOS?

El término "RNA pequeño" se refiere a un conjunto de especies de RNA. En las plantas, estos incluyen pequeños RNAs de interferencia (siRNAs), microRNAs (miRNAs), y un tipo especial de siRNA conocido como siRNAs en fase, cada uno de los cuales difiere en su biogénesis.

Los miRNAs derivan de los genes *MIR* que no codifican proteínas. La transcripción mediada por RNA polimerasa II de genes *MIR* produce transcriptos de RNA de cadena sencilla que forman estructuras características de horquilla vástago-bucle, en las que un RNA de cadena simple se pliega sobre sí mismo a través del apareamiento de bases. El segmento de RNA doble cadena resultante (dsRNA) es cortado por una endonucleasa del tipo DICER en miRNAs cortos. Los miRNAs maduros reconocen y se unen a transcriptos de otros genes en regiones que presenten complementariedad de secuencia. Esta interacción hace que el mRNA sea degradado, se traduzca ineficientemente, o se convierta en una plantilla para la producción de siRNAs. En general, los miRNAs modulan la expresión

(temporal o espacial) de genes endógenos a través de silenciamiento génico post-transcripcional.

La mayoría de los siRNAs derivan de precursores de dsRNA producidos a través de RNA Polimerasas dependientes de RNA (RdRP), pero también pueden originarse como estructuras de horquilla vástago-bucle. En general, los siRNAs funcionan en la defensa contra patógenos y en el silenciamiento de transposones a través del silenciamiento transcripcional de genes.

Los siRNAs en fase y en trans (phasiRNAs y tasiRNAs) son clases especiales de siRNAs que tienen un origen particular que involucra componentes de las vías de miRNA y de siRNA. Al igual que los miRNAs, su función es principalmente la regulación de la expresión de genes endógenos, generalmente a través de PTGS.

### HISTORIA: EL DESCUBRIMIENTO DE LOS RNAs PEQUEÑOS EN PLANTAS

Diversas líneas de investigación de biología vegetal, incluyendo la observación de resultados inusuales de transgenes introducidos y de la resistencia sistémica a los virus, fue decisiva en el descubrimiento y el estudio de los RNAs pequeños.

#### Descubrimiento de los RNAs Pequeños: Silenciamiento de Transgenes

Las técnicas de producción de plantas transgénicas se desarrollaron en la década de 1980, con trabajos iniciales enfocados en dos especies fácilmente transformables, el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y la petunia (*Petunia hybrida*). En 1990, dos grupos reportaron sus esfuerzos para modificar el color de los pétalos en las petunias, alterando la expresión de una enzima clave en la ruta de la biosíntesis del pigmento, la chalcona sintasa. Las plantas fueron diseñadas para producir una transcripción en sentido (similar a la producida por el gen endógeno) o una transcripción anti-sentido de este gen. La expectativa era que el transcripto anti-sentido se uniría al mRNA endógeno por medio de apareamiento complementario de bases, impidiendo su traducción y disminuyendo así la biosíntesis del pigmento.

Inesperadamente, los investigadores observaron que la producción de pigmento se redujo no sólo en las plantas que

expresaban los transcritos anti-sentido, sino también las que expresaban los transcritos en sentido. Además, observaron una disminución en la cantidad de mRNA del gen endógeno en plantas manipuladas para producir cualquiera de los transcritos. Este efecto fue denominado "co-supresión", indicando que el gen introducido de alguna manera suprimió la expresión del gen endógeno relacionado. Debido a que esta forma de silenciar actúa sobre el transcrito de mRNA, nos referimos a ella como silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS.

En paralelo, otro grupo de investigación observó que cuando dos transgenes diferentes con las mismas secuencias promotoras se introdujeron en la misma planta, el DNA de uno de los transgenes era metilado, suprimiendo su transcripción y silenciando el gen. Debido a que esta forma de silenciar impide la transcripción, nos referimos a ella como el silenciamiento génico transcripcional. El mecanismo se denomina metilación del DNA dirigida por RNA.

### **Descubrimiento de los RNAs Pequeños: Estudios de Resistencia Viral**

Otros estudios importantes que condujeron al descubrimiento de RNAs pequeños, involucraron esfuerzos en entender cómo una planta se convierte en resistente a un virus. Se ha observado que una planta que sobrevivió a la infección con un virus se vuelve resistente a la infección subsiguiente por el mismo tipo de virus (pero permanece susceptible a virus no relacionados). En animales, este tipo de resistencia se debe a un aumento en la producción de anticuerpos y es la base para las vacunas. Como las plantas no producen anticuerpos, un mecanismo diferente debía estar involucrado. Se postuló que la célula vegetal era capaz de detectar el RNA viral y producir un factor celular capaz de inactivarlo, un modelo notablemente intuitivo. Un avance clave fue el descubrimiento, en plantas resistentes, de un RNA pequeño complementario a las secuencias de RNA viral. Asimismo, este RNA pequeño podía encontrarse incluso en tejidos no infectados, lo que sugirió que el movimiento sistémico de los RNAs pequeños (o un precursor) confería resistencia viral sistémica.

### **Descubrimiento de los RNAs Pequeños: Estudios en *C. elegans***

Estudios paralelos utilizando el nematodo *Caenorhabditis elegans* también contribuyeron al descubrimiento de los RNAs pequeños. Un estudio exploró la interacción entre dos genes, *lin-14* y *lin-4*, que promueven o reprimen la progresión del desarrollo. El gen *lin-4* codifica un miRNA

que actúa de forma antagonista a *lin-14*. Se descubrió que el dominio funcional de *lin-4* era complementario a varias regiones del extremo 3' no traducido de *lin-14*, y se demostró que la interacción entre estas secuencias complementarias era necesaria para la represión de *lin-14* por *lin-4*, revelando las bases de la regulación de genes por miRNAs. Los estudios en *C. elegans* también mostraron que los genes endógenos podrían ser silenciados por la introducción de dsRNAs homólogos. Por este trabajo, Andrew Fire y Craig Mello fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina "por su descubrimiento de RNA de interferencia - silenciamiento de genes por RNA doble cadena."

## **BIOGENESIS DE RNAs PEQUEÑOS EN PLANTAS**

Existen diversos tipos de RNA pequeños que comparten algunos aspectos de su biogénesis pero que también difieren en algunos otros. En términos generales, todos los RNAs pequeños derivan de dsRNAs. Los dsRNAs pueden originarse a partir del plegamiento de RNA de cadena simple, de la formación de dúplex de RNA complementarios, o por la producción de dsRNA por RdRPs. Cualquiera sea su origen, los dsRNAs son clivados por las proteínas RNAsas DICER o DICER-LIKE (DCL) en segmentos de 21 a 24 nucleótidos, que en las plantas son 2'-O- metilados en su nucleótido 3'-terminal por la acción de HUA ENHANCER1 de modo de ser protegidos contra la uridilación y la degradación. Los RNA pequeños resultantes se unen a una de varias proteínas ARGONAUTE (AGO), formando la base del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). A través de la complementariedad de bases, los complejos RISC se unen y modifican los blancos de DNA o RNA, dando lugar a diversos efectos, que pueden describirse en general como silenciamiento génico post-transcripcional o transcripcional. Este fenómeno puede implicar el corte de mRNA o interferencia en la traducción (ejemplos de PTGS), o modificaciones en la cromatina que resultan en silenciamiento transcripcional. Las enzimas que llevan a cabo la producción y función de los RNAs pequeños están codificadas por familias de genes pequeñas de RNA Polimerasas, RdRP, DCLs y AGOs.

### **Enzimas Involucradas en la Producción de RNAs Pequeños**

#### **RNA Polimerasas**

La mayoría de los eucariotas tienen tres polimerasas de RNA (Pol); Pol I transcribe la mayoría de los rRNAs, Pol II transcribe mRNAs, y Pol III transcribe 5S rRNAs y tRNAs. Las plantas tienen dos RNA polimerasas adicionales, Pol

IV y Pol V, que están involucradas en metilación del DNA y silenciamiento génico mediado por RNAs pequeños, particularmente de regiones ricas en transposones, como se describe a continuación.

### **RdRPs o RDR**

Varios estudios han demostrado el requerimiento del funcionamiento de RdRP en defensa antiviral y producción de siRNAs derivados de virus. Arabidopsis presenta seis genes RDR, algunos de los cuales son inducidos por infección de virus. Los seis genes RDR de *Arabidopsis thaliana* tienen diferentes patrones de expresión y funciones, según estudios de mutación.

Las funciones en la biogénesis de RNAs pequeños han sido claramente descritas para un subconjunto de tres de estos genes RDR (RDR1, RDR2 y RDR6), mientras que los otros tres, de función relativamente desconocida, comprenden una repetición en tándem en el genoma de Arabidopsis.

### **Proteínas DCL**

Arabidopsis y la mayoría de las dicotiledóneas tienen cuatro genes DCL, mientras que la mayoría de las monocotiledóneas tienen cinco. En Arabidopsis, DCL1 se dedica principalmente a la producción de miRNAs de 21 nucleótidos, DCL3 en la producción de siRNAs de 24 nucleótidos implicados en el silenciamiento de transposones, y DCL4 en la producción de tasiRNAs de 21 nucleótidos. DCL2 produce RNA pequeños de 22 nucleótidos originados por diversas fuentes de dsRNA y puede ser algo redundante en su función con DCL4. En contraste con las células animales, que requieren dos enzimas para producir miRNAs maduros (Drosha/Pasha en el núcleo y Dicer en el citoplasma), las células de las plantas procesan miRNAs maduros en el núcleo a través de DICER. El quinto gen de DCL, específico de monocotiledóneas, es el resultado de un evento de duplicación de DCL3 que ocurrió alrededor del tiempo de la división de las dicotiledóneas. Este gen DCL5 funciona en la producción de siRNAs en fase reproductivos, de 24 nucleótidos.

### **Proteínas AGO**

Las proteínas AGO obtuvieron su nombre de un tipo de pulpo, *Argonauta*, porque el mutante *ago1* de Arabidopsis produce hojas delgadas parecidas a lápices, que se asemejan a tentáculos de pulpo. Las AGOs unidas a RNAs pequeños forman el núcleo del RISC. La especificidad y función del RISC está determinada por la AGO específica y la secuencia del RNA pequeño. En plantas, el número de

genes AGO varía de tres en *Chlamydomonas reinhardtii* a 17 en arroz (*Oryza sativa*). Las AGO pueden diferenciarse en tres grupos. En general, los grupos AGO 1/5/10 y 2/3/7 están involucrados en PTGS, mientras que AGO 4/6/8/9 median la metilación del DNA dependiente de RNA para el silenciamiento génico transcripcional. En Arabidopsis, AGO1 y AGO2 son fundamentalmente importantes en la defensa contra los virus de RNA. Recientemente se reportó que TRANSPORTIN 1 ayuda a la carga de miRNAs a AGO1, mientras que otra importina, ENHANCED miRNA ACTIVITY 1, previene la interacción miRNA-AGO1.

### **Biogénesis de siRNAs**

La biogénesis de los siRNAs depende del origen del transcripto de RNA. Los siRNAs pueden originarse a partir de RNAs virales (siRNA viral), transcriptos derivados de la heterocromatina (hcRNAs), o transcriptos de genes PHAS o TAS (phasiRNAs y tasiRNAs).

### **siRNAs Virales**

Los virus pueden producir anualmente miles de millones de dólares en pérdidas en cultivos. El RNAi es una pieza fundamental de las defensas de las plantas contra los virus, y muchos de los pormenores de esta respuesta de defensa han sido ya identificados. Las plantas son capaces de detectar el genoma viral o intermediarios de la replicación viral, que sirven como desencadenantes en la producción de siRNAs. Para los virus de RNA, se cree que la fuente de siRNAs son estructuras en horquilla derivadas del apareamiento de bases complementarias dentro del genoma de RNA. La producción de siRNAs primarios deriva del corte de estas regiones horquilla por DCL2 y DCL4. Si bien hay alguna redundancia en su función, la pérdida de DCL2 generalmente resulta en una mayor susceptibilidad a los virus. Los siRNAs primarios pueden dirigirse a otros RNAs virales e iniciar la producción de dsRNA mediante RdRPs, en un proceso que amplifica el sistema de defensa basado en RNA. Estos dsRNAs nacientes son posteriormente procesados por DCLs para producir siRNA secundarios.

La importancia de los siRNAs virales para la defensa antiviral fue revelada mediante estudios experimentales. Los mutantes deficientes en la producción de siRNA son más susceptibles a los virus, y las plantas que han sido diseñadas para aumentar la producción de siRNAs muestran mayor resistencia a los virus.

Asimismo, la mayoría de los virus producen supresores de las vías de silenciamiento del RNA del hospedante; es decir que los virus exitosos han evolucionado la capacidad de evadir el silenciamiento. Los blancos de los supresores virales incluyen a DCLs, RdRPs y AGOs. Los virus en los

que los supresores han sido eliminados experimentalmente son significativamente menos patogénicos que los virus inalterados.

### **siRNA Asociados a la Heterocromatina**

La heterocromatina es la región rica en repeticiones de la cromatina, que está repleta de elementos transponibles (también conocidos como transposones). Cuando están activos, los transposones pueden replicarse y propagarse a través del genoma, y su inserción en genes o regiones reguladoras puede causar mutaciones perjudiciales. Los transposones se mantienen en estado silenciado mediante una combinación de metilación del DNA y modificación de las histonas (ver Herramientas de Enseñanza en Biología Vegetal: Epigenética).

La iniciación y el establecimiento del estado silenciado requiere de siRNAs. Estudios de secuenciación de RNA han revelado que el tipo más abundante de RNA pequeños son los derivados de la heterocromatina rica en transposones. Aunque existe cierta variabilidad, un modelo general para la iniciación del silenciamiento involucra la transcripción de las regiones ricas en repeticiones mediante la RNA Pol IV. El transcripto de RNA de cadena sencilla resultante es típicamente lo suficientemente pequeño como para producir un solo siRNA de 24 nucleótidos a partir de cada precursor derivado de Pol IV. El precursor es convertido entonces en dsRNA por RDR2, y cortado por DCL3 en siRNAs de 24 nucleótidos que se cargan en AGO4 o AGO6. El RISC de AGO4/6 interactúa en el núcleo con los transcriptos de RNA producidos por Pol V. Esta interacción recluta la maquinaria de silenciamiento génico, incluyendo metiltransferasas de DNA e histonas, a las regiones de DNA a ser silenciado.

### **Los siRNAs en Fase: PhasiRNAs y TasiRNAs**

Los siRNAs en fase se producen cuando un dsRNA es cortado repetidamente por DCL para producir una serie de siRNAs en una disposición en tandem. El proceso comienza con la transcripción de genes *PHAS* o *TAS* por Pol II para producir un mRNA, que a continuación es cortado mediante una proteína AGO que es guiada por un miRNA "gatillo". Los miRNA que desencadenan phasiRNAs son habitualmente de 22 nucleótidos de largo, mientras que los miRNAs de 21 nucleótidos comúnmente no generan phasiRNAs derivados de sus blancos. El mRNA blanco cortado es convertido en dsRNA por RDR6. El dsRNA resultante es el sustrato para el procesamiento en fase mediado por DCL4, que genera siRNAs de 21 nucleótidos. En los órganos reproductores, principalmente las anteras de las gramíneas, se ha demostrado que DCL5 procesa

RNAs no codificantes largos y de baja copia en siRNAs abundantes pero efímeros de 24 nucleótidos, cuya función es desconocida. En la producción de phasiRNA, se genera más de una especie de siRNA por molde, lo que significa que la señal inicial del es amplificada. Algunos phasiRNAs actúan en trans, es decir en otros sitios blanco, por lo que son conocidos como siRNAs transactivos o tasiRNAs.

### **Biogénesis de miRNAs**

Los miRNAs están codificados en los genes *MIR*. Los genes *MIR* generan transcriptos largos llamados miRNA primarios (pri-miRNA) con regiones auto-complementarias extensas pero imperfectas. El transcripto pri-miRNA se pliega sobre sí mismo en una estructura de vástago-bucle u horquilla parcial de doble cadena (hpRNA) que es clivada por DCL1. El producto del clivaje de DCL1 es un dsRNA con una saliente de 2 nucleótidos a 3' denominado dúplex miRNA-miRNA\*. Este dúplex abandona el núcleo con la ayuda de un homólogo de *exportin-5* denominado *HASTY*, el cual fue descrito como un gen crítico para el desarrollo juvenil, como se refiere a continuación. Muchos de los genes involucrados en el procesamiento de miRNAs se identificaron primero como genes que controlaban el desarrollo, subrayando el importante rol de los miRNAs como reguladores del desarrollo.

Hasta el 2016, 325 genes *MIR* han sido identificados en *Arabidopsis* y agrupados en más de 50 familias. Los *MIR* de una familia codifican un miRNA maduro idéntico o muy similar. Más de la mitad de las familias de genes *MIR* de *Arabidopsis* incluyen un único miembro. Ocho familias de genes *MIR* se conservan entre todas las plantas multicelulares, incluyendo musgos, y otras 10 familias de genes *MIR* se conservan entre todas las angiospermas.

## **FUNCIONES DE LOS RNAs PEQUEÑOS**

### **Movilidad y Funciones No Autónomas a Nivel Celular de los RNAs Pequeños**

Se ha demostrado que los RNAs pequeños actúan de manera no autónoma a nivel celular (es decir, actúan sobre una célula diferente a la que los originó), aunque los pormenores sobre cómo se mueven de una célula a otra permanecen algo inciertos. Una de las demostraciones más claras de la movilidad de los RNAs pequeños proviene de estudios de resistencia sistémica a los virus. Después de inocular una hoja con un virus, se pueden recuperar RNAs pequeños homólogos a secuencias virales de exudados de floema, así como de hojas distalmente localizadas. El movimiento entre células de los RNAs

pequeños también está involucrado en el silenciamiento generacional de los transposones, los patrones de desarrollo, la señalización de nutrientes y las interacciones entre plantas y parásitos o simbiontes, que se describen más adelante.

### ***El Silenciamiento Trans-generacional de Transposones Involucra siRNAs Móviles***

Durante la reproducción, los genomas de dos gametos se unen en un solo núcleo cigótico. También durante la reproducción hay una relajación del silenciamiento de transposones y un estallido concomitante en la producción de siRNAs. Las células en las que esto ocurre no son los gametos ni los cigotos en sí mismos (evitando así la posibilidad de mutaciones asociadas con la transposición en la línea germinal), sino más bien las células acompañantes incluyendo las del endosperma, la célula central del gametofito femenino y la célula vegetativa del polen. Estas células, a diferencia de los gametos y el cigoto, no transfieren su DNA a la siguiente generación. Recientemente se demostró que siRNAs generados en la célula vegetativa de polen se mueven a la célula espermática, asegurando el silenciamiento de los transposones en la línea germinal. Un proceso adicional distinto, pero quizás similar, ocurre en los tejidos reproductivos de las gramíneas, aunque los RNA pequeños reproductivos de los pastos se generan en una etapa más temprana en el desarrollo del polen y se acumulan en el tapetum y las microsporas.

### **Funciones Biológicas de los miRNAs**

#### ***Regulación del Patrón de Desarrollo por miRNAs***

Algunos de los primeros roles funcionales para miRNAs en las plantas fueron determinados a partir de estudios de desarrollo foliar. Las hojas tienen lados, uno superior (adaxial) y otro inferior (abaxial), que se definen a través de patrones de expresión restringidos de factores de transcripción, incluyendo la proteína HD-ZIP III PHABULOSA (*PHB*). El gen que codifica *PHB* se identificó inicialmente mediante un alelo de ganancia de función, que posteriormente se encontró que afectaba a la capacidad de miR165/6 de unirse al mRNA de *PHB*. En plantas de tipo silvestre, la actividad de *PHB* está restringida al lado adaxial de la hoja por la acción de miR165/6 en el lado abaxial. El mRNA de ganancia de función resistente a miRNA, permite la acumulación de *PHB* a lo largo de la hoja en desarrollo y resulta en una pérdida de polaridad de la hoja.

Otro papel de los miRNAs en el desarrollo foliar ocurre en los márgenes de la hoja. La familia TCP de factores de transcripción y CUC2/CUC3 están regulados por miR319 y miR164, respectivamente, y su interacción determina el borde dentado de las hojas y la complejidad foliar. Datos recientes demuestran que las interacciones entre los miRNAs y sus blancos, forman una red reguladora que también contribuye a un aumento, relacionado con la edad, en la complejidad de la hoja, integrando elementos de cambio de fase y patrones de desarrollo. De hecho, los miRNAs son reguladores claves a lo largo del desarrollo foliar, desde la iniciación hasta la senescencia.

Curiosamente, la represión de la actividad de *PHB* mediada por miR165/6 también afecta el patrón radial en la raíz. Los genes *MIR165A* y *MIR166B* se expresan en la endodermis, la capa de células justo fuera del cilindro vascular. Estos miRNAs se mueven hacia el tejido vascular central, donde contribuyen a la formación de un gradiente de actividad de *PHB*, lo que a su vez condiciona el patrón radial adecuado de los tejidos vasculares. El patrón radial también depende de una proteína móvil. El factor de transcripción SHORT ROOT se expresa en el tejido vascular interno, pero se desplaza de célula a célula a la endodermis, donde activa los genes *MIR165A* y *MIR166B*. Por lo tanto, el patrón radial de raíz se establece a través de miRNAs y proteínas móviles.

Los RNAs pequeños también están implicados en el desarrollo de la raíz lateral y adventicia, así como en la formación de nódulos. Se ha demostrado que los miRNAs cuyo blanco son factores de transcripción ARF y NAC, así como las proteínas receptoras de auxina TIR/AFB, alteran el desarrollo de raíces laterales. Los miRNAs también contribuyen a la regulación de la arquitectura del sistema radicular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes.

#### ***Regulación del Tiempo de Desarrollo por miRNAs***

Muchas plantas exhiben una progresión de su crecimiento basadas en la transición del desarrollo embrionario a juvenil, a adulto y a reproductivo. La progresión de juvenil a adulto se llama cambio de fase vegetativa y afecta distintas características, incluyendo la forma y disposición de las hojas, la longitud de los entrenudos, el desarrollo de pelos epidérmicos (tricomas) y la acumulación de ceras epicuticulares.

El miR156 es necesario y suficiente para el mantenimiento de la fase juvenil. En el maíz (*Zea mays*), tres mutaciones (*Corngrass1*, *Teopod1* y *Teopod2*) asociadas a inicio tardío de la fase adulta causan sobre-expresión del altamente conservado miR156, cuyos blancos incluyen los genes SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-box (llamados genes *SPL* en

Arabidopsis) que promueven la transición hacia adultez. La introducción de genes *SPL* resistentes a miRNAs, o la eliminación de miR156, acelera el cambio de fase y el crecimiento reproductivo. Los blancos transcripcionales de los SPLs incluyen los reguladores clave de floración FT, SOC1, LFY y AP1. Otro blanco transcripcional de SPL es el gen *MIR172B*. A medida que los niveles de miR156 disminuyen, los niveles de SPL y miR172 aumentan. Los blancos de miR172 incluyen mRNAs que codifican factores de transcripción que están correlacionados con un retraso en la transición de fase juvenil a adulto. Al eliminar su acción, miR172 promueve el cambio de fase. La interacción entre miR156 y SPL se ha demostrado en plantas leñosas de larga vida, así como en el musgo (*Physcomitrella patens*), lo que indica que este mecanismo ha estado presente desde los últimos ancestros comunes de angiospermas y musgos, hace más de 400 millones de años.

### **Funciones Biológicas de phasiRNAs y tasiRNAs**

Los primeros phasiRNAs identificados funcionaban en trans (es decir, dirigían y silenciaban un gen diferente del que se produjeron), por lo que se los describió como tasiRNAs. Sin embargo, no todos los phasiRNAs son tasiRNAs - muchos genes producen phasiRNAs que no tienen actividad conocida en trans. En Arabidopsis, hay cuatro genes *TAS* que codifican tasiRNAs. El más caracterizado, *TAS3*, está presente en todas las plantas terrestres, al igual que miR390, el inductor de la producción de tasiRNA procedentes de *TAS3*. Los tasiRNAs derivados de *TAS3* son móviles, formando un gradiente hacia el exterior de sus células de origen, y asociados en Arabidopsis a contribuir en la formación de patrones en la hoja en desarrollo. Las mutaciones en los genes *TAS3* o en los genes de procesamiento de tasiRNA como *RDR6*, *DCL4* o *AGO7* (alias *ZIPPY*) conducen a la sobreexpresión del blanco *ARF3* de los tasiRNA. Recientemente, se demostró que tasiRNAs derivados de *TAS3* regulan la respuesta a auxinas en *P. patens*, también a través de genes ARF, lo que indica que este módulo tasiRNA-ARF ha persistido por alrededor de 400 millones de años.

La diversidad y abundancia de loci que codifican phasiRNAs (PHAS loci) varían según las especies. Aunque muchos PHAS loci son miembros de familias de genes pequeños, los PHAS loci más estudiados se producen a partir de transcritos de genes pertenecientes a familias numerosas, más específicamente a la familia de factores de transcripción *MYB*, la familia *PPR* de proteínas de repetición pentatricopeptídicas involucradas en el procesamiento de organelas, y la familia de genes NB-LRR que codifica proteínas de defensa a patógenos. La mayoría

de los phasiRNAs parecen estar involucrados en la regulación de genes de la familia de la que derivan y proporcionar otro nuevo mecanismo para controlar la expresión génica. Una hipótesis es que los phasiRNAs pueden amortiguar o modular el nivel de expresión génica en la célula con el fin de mantener un nivel bajo de las proteínas correspondientes.

Los phasiRNA "reproductivos", de 21 ó 24 nucleótidos de longitud, se caracterizan por acumularse a niveles elevados en las anteras en desarrollo de gramíneas. Estos phasiRNA son producidos a partir de cientos de RNAs no codificantes largos, gatillados por una de dos familias de miRNAs: miR2118 que induce phasiRNAs de 21 nucleótidos en anteras pre-meióticas y miR2275 que induce phasiRNAs de 24 nucleótidos en anteras meióticas. Las funciones o blancos de estos phasiRNAs aún no se han descrito.

### **Los Emuladores de Blancos, los Señuelos y los RNA Endógenos Competitivos**

La interacción entre los pequeños RNAs y sus blancos es sensible a la competencia artificial y endógena de emuladores de blancos. Si este último no es complementario a nivel de bases en el sitio de corte esperado, el complejo formado puede estabilizarse, secuestrando así los RNAs pequeños (a veces los emuladores de blancos se denominan esponjas de RNAs pequeños o señuelos).

El primer emulador de blanco endógeno identificado en las plantas fue INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION1 (*IPS1*). *IPS1* genera un RNA no codificante largo que se une y secuestra miR399. *PHO2* es un supresor de la acumulación de fosfato, que es regulado negativamente por miR399, pero dicha regulación puede verse afectada por el efecto vinculado a *IPS1* y el secuestro de miR399.

Más recientemente, se han identificado RNAs no codificantes largos endógenos adicionales como blancos o señuelos para RNAs pequeños en plantas. Estos son también conocidos como RNAs endógenos competitivos (ceRNAs). Inicialmente fueron identificados a través de homología de secuencia y algunos de ellos tienen un papel funcional en la regulación de las actividades de miRNAs, pero esta sigue siendo un área de investigación activa.

También es posible diseñar plantas que expresen emuladores de blancos artificiales. Esto facilita el estudio de las funciones de los RNA pequeños (bloqueando su actividad). También proporciona una herramienta mediante la cual se puede desreprimir selectivamente un gen cuya actividad es regulada negativamente por RNA pequeños.

### **Pequeños RNAs en Interacciones Bióticas y Defensa**

Se ha demostrado que los RNA pequeños transitan entre plantas y patógenos, aumentando o suprimiendo la severidad de enfermedades. El silenciamiento génico inducido por el hospedante, que involucra la transferencia de siRNAs de plantas a hongos, nematodos, insectos o plantas parasitarias, confiere protección a estas plagas. Por el contrario, los patógenos pueden utilizar siRNAs contra sus hospedantes. Como ejemplo, *Botrytis cinerea*, un patógeno fúngico dañino que afecta muchos frutos incluyendo la uva

(*Vitis vinifera*), introduce en su hospedante siRNAs que suprimen las respuestas de defensa de este.

Tal como se ha descrito anteriormente, los transcriptos que codifican las proteínas centrales de defensa del tipo NB-

LRR de plantas son blancos endógenos regulados a través de phasiRNAs. Este tipo de regulación tal vez permite a una planta mantener niveles bajos de proteínas NB-LRR (a través de la supresión mediada por RNAs) pero, al ser expuestas a patógenos, el sistema de silenciamiento de genes NB-LRR sería suprimido (posiblemente por un supresor de silenciamiento producido por el patógeno) resultando en el aumento de niveles de proteínas de defensa.

## **APLICACIONES DE LAS INVESTIGACIONES EN RNAs PEQUEÑOS**

El silenciamiento de RNA tiene muchas aplicaciones potenciales en la producción de alimentos, fibra y combustibles. Los genes endógenos de plantas pueden ser silenciados mediante la introducción de cassettes de expresión especializados de RNAi para desencadenar una fuerte supresión del tipo post-transcripcional. Esta estrategia es importante en los esfuerzos para identificar la función de los genes, pero también tiene aplicaciones comerciales. Los compuestos no deseados pueden eliminarse de los cultivos alimentarios utilizando el silenciamiento de genes para desactivar las vías bioquímicas involucradas. Por ejemplo, puede ser posible eliminar el compuesto tóxico gossypol de las semillas de algodón para que puedan usarse como fuente de alimento, para eliminar los alérgenos del maní o para producir café descafeinado. La vida útil de los tomates (*Solanum lycopersicum*) se puede prolongar mediante la supresión de la producción de etileno a través de la inhibición mediada por RNA de la síntesis de etileno. Asimismo, algunos esfuerzos para alterar el desarrollo de los frutos a través de miRNAs dirigidos a factores de transcripción serían promisorios. También es posible modificar el tiempo y el patrón de desarrollo de una planta a través de la alteración

de la expresión de RNAs pequeños. Como ejemplo, las plantas de álamo que sobre-expresan el gen *Cg1MIR156* tienen patrones alterados de arquitectura vegetal, así como composición de pared celular, lo que podría conducir a una mayor y más maleable biomasa para la producción de fibra de papel. Se obtuvieron resultados similares con el cultivo tipo de bioenergía, el pasto varilla.

Diversas estrategias han sido empleadas con éxito para generar resistencia a virus en plantas a través de enfoques mediados por RNAi, y se han diseñado vectores virales para optimizar este efecto en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. La resistencia a patógenos también ha sido

inducida por el silenciamiento mediado por RNA de genes endógenos que confieren susceptibilidad al patógeno. El silenciamiento de genes de distintos reinos, en el que un dsRNA producido por plantas conduce al silenciamiento de genes y reduce la patogenicidad en un nematodo o insecto herbívoro, también puede ser desarrollado. Recientemente, plantas rociadas con una solución de dsRNA presentaron una mayor resistencia a patógenos, esta estrategia eliminaría la necesidad de producir plantas genéticamente modificadas con este fin.

La herencia trans-generacional de un estado de inhibición transcripcional de un gen, proporciona una intrigante posibilidad para la producción de plantas modificadas genéticamente que no acarrean ningún DNA exógeno. Por ejemplo, una planta puede infectarse con un virus portador de secuencias homólogas a un gen de interés, que conduce al silenciamiento transcripcional del gen endógeno. El estado silenciado podría ser transmitido a la siguiente generación, incluso en ausencia del virus. Alternativamente, un sistema de raíces genéticamente modificadas que desencadena la producción de siRNAs podría ser injertado a un brote receptor, y luego después de que el gen correspondiente silencie en el tallo, se podría tomar un corte para la propagación clonal o el vástago podría ser transferido a un sistema de raíz salvaje, generando una planta "modificada epigenéticamente" que no presenta DNA foráneo.

## **CONCLUSIÓN**

Las células eucariotas producen diversos tipos de RNAs pequeños no codificantes que contribuyen a la regulación y defensa de sus genes y genomas. Los siRNAs se producen a partir de regiones ricas en repeticiones silenciadas heterocromáticas y son necesarios para silenciar transposones y asegurar que estas regiones permanezcan en un estado silenciado. Los siRNAs también se producen en respuesta al DNA o RNA foráneo y son importantes

contribuyentes a las defensas contra patógenos. Los miRNAs, los phasiRNAs y los tasiRNAs, codificados por los genes *MIR*, *PHAS* y *TAS*, regulan la actividad de sus mRNA blanco, muchos de los cuales están implicados en la sincronización del desarrollo, absorción de nutrientes o respuestas al estrés. El descubrimiento de las vías de regulación de los RNAs pequeños ha proporcionado nuevas herramientas para la modulación de la expresión génica para el mejoramiento de cultivos y terapias médicas. Las recientes y rápidas revelaciones del mundo de los RNAs pequeños nos recuerdan que las células todavía tienen la capacidad de sorprendernos con su complejidad y que aún quedan grandes descubrimientos ante nosotros.

**Mary Williams Features Editor, The Plant Cell  
Laboratory of Plant Physiology and Biophysics  
University of Glasgow mwilliams@aspb.org  
ORCID ID: 0000-0003-4447-7815**

#### Traducción

**Humberto Debat  
Instituto de Patología Vegetal – CIAP  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
debat.humberto@inta.gov.ar**

#### Revisión

**Javier Palatnik  
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario  
UNR-CONICET Centro de Estudios Interdisciplinarios  
palatnik@ibr-conicet.gov.ar**

#### LECTURA RECOMENDADA

(Esta es una lista representativa de fuentes para ayudar al lector a acceder a una gran cantidad de literatura. Pedimos disculpas por adelantado a aquellos autores cuyo trabajo no está incluido.)

#### Historia: El Descubrimiento de RNA Pequeño en Plantas

- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B.** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13079–13084. doi: 10.1073/pnas.95.22.13079
- Beachy, R.N., Loesch-Fries, S., and Tumer, N.E.** (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 451–472. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.002315
- Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N.A., and Waterhouse, P.M.** (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* 147: 456–468. doi:10.1104/pp.108.117275
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811. doi:10.1038/35888

- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C.** (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952. doi:10.1126/science.286.5441.950
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
- Lindbo, J.A., and Dougherty, W.G.** (2005). Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 191–204. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.140228
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., and Dougherty, W.G.** (1993). Induction of a highly specific antiviral state in trans-genic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749–1759. doi:10.1105/tpc.5.12.1749
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J., and Matzke, A.J.** (1989). Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8: 643–649.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289. doi:10.1105/tpc.2.4.279
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., and Baulcombe, D.C.** (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558–1560. doi:10.1126/science.276.5318.1558
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N.M., and Stuitje, A.R.** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291–299. doi:10.1105/tpc.2.4.291
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., and Wang, M.B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959–13964. doi: 10.1073/pnas.95.23.13959
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G.** (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855–862. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4

#### Biogénesis de RNAs Pequeños

- Axtell, M.J.** (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 137–159. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120043
- Borges, F., and Martienssen, R.A.** (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 727–741. doi:10.1038/nrm4085
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., Wolfe, S.A., and Giraldez, A.J.** (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328: 1694–1698. doi:10.1126/science.1190809
- Cui, Y., Fang, X., and Qi, Y.** (2016). TRANSPORTIN1 promotes the association of microRNA with ARGONAUTE1 in Arabidopsis. *Plant Cell* 28: 2576–2585. doi:10.1105/tpc.16.00384



- Czech, B., and Hannon, G.J.** (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* 12: 19–31. doi:10.1038/nrg2916
- Elvira-Matelot, E., Hachet, M., Shamandi, N., Comella, P., Sáez-Vázquez, J., Zytnicki, M., and Vaucheret, H.** (2016). Arabidopsis RNASE THREE LIKE2 modulates the expression of protein-coding genes via 24-nucleotide small interfering RNA-directed DNA methylation. *Plant Cell* 28: 406–425. doi:10.1105/tpc.15.00540
- Fang, X., and Qi, Y.** (2016). RNAi in plants: An Argonaute-centered view. *Plant Cell* 28: 272–285. doi:10.1105/tpc.15.00920
- Fang, X., Shi, Y., Lu, X., Chen, Z., and Qi, Y.** (2015). CMA33/XCT regulates small RNA production through modulating the transcription of Dicer-Like genes in Arabidopsis. *Mol. Plant* 8: 1227–1236. doi:10.1016/j.molp.2015.03.002
- Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12: 483–492. doi:10.1038/nrm3152
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C.** (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118–120. doi:10.1126/science.1106910
- Matzke, M.A., and Mosher, R.A.** (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15: 394–408. doi:10.1038/nrg3683
- McCue, A.D., and Slotkin, R.K.** (2012). Transposable element small RNAs as regulators of gene expression. *Trends Genet.* 28: 616–623. doi:10.1016/j.tig.2012.09.001
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S.** (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* 120: 613–622. doi:10.1016/j.cell.2005.02.007
- Parent, J.S., Bouteiller, N., Elmayan, T., and Vaucheret, H.** (2015). Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *Plant J.* 81: 223–232. doi:10.1111/tpj.12720
- Ren, G., Xie, M., Zhang, S., Vinovskis, C., Chen, X., and Yu, B.** (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylylates 59 RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 6365–6370. doi:10.1073/pnas.1405083111
- Rogers, K., and Chen, X.** (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* 25: 2383–2399. doi:10.1105/tpc.113.113159
- Sanei, M., and Chen, X.** (2015). Mechanisms of microRNA turnover. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 199–206. doi:10.1016/j.pbi.2015.07.008
- Simon, S.A., and Meyers, B.C.** (2011). Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 148–155. doi:10.1016/j.pbi.2010.11.007
- Vazquez, F., Legrand, S., and Windels, D.** (2010). The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci.* 15: 337–345. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.001
- Wang, F., Polydore, S., and Axtell, M.J.** (2015). More than meets the eye? Factors that affect target selection by plant miRNAs and heterochromatic siRNAs. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 118–124. doi:10.1016/j.pbi.2015.06.012
- Wang, W., Ye, R., Xin, Y., Fang, X., Li, C., Shi, H., Zhou, X., and Qi, Y.** (2011). An importin b protein negatively regulates MicroRNA activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 3565–3576. doi:10.1105/tpc.111.091058
- Wierzbicki, A.T.** (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 517–522. doi:10.1016/j.pbi.2012.08.008
- Willmann, M.R., Endres, M.W., Cook, R.T., and Gregory, B.D.** (2011). The functions of RNA-dependent RNA polymerases in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 9: e0146, doi/10.1199/tab.0146.
- Xie, Z., Khanna, K., and Ruan, S.** (2010). Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 790–797. doi:10.1016/j.semcd.2010.03.012
- Zhai, J., et al.** (2015). A one precursor one siRNA model for Pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell* 163: 445–455. doi:10.1016/j.cell.2015.09.032
- Zhang, C., Wu, Z., Li, Y., and Wu, J.** (2015). Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants. *Front. Microbiol.* 6: 1237. doi:10.3389/fmicb.2015.01237
- Zhang, H., Xia, R., Meyers, B.C., and Walbot, V.** (2015). Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 84–90. doi:10.1016/j.pbi.2015.06.011
- Zhang, X., Niu, D., Carbonell, A., Wang, A., Lee, A., Tun, V., Wang, Z., Carrington, J.C., Chang, C.E., and Jin, H.** (2014). ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 5: 5468. doi:10.1038/ncomms6468
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X.-J., and Zhang, X.** (2016). Arabidopsis AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epi-genetic silencing. *Nat Plants* 2: 16049. doi:10.1038/nplants.2016.49
- Zhong, X., Hale, C.J., Nguyen, M., Ausin, I., Groth, M., Hetzel, J., Vashisht, A.A., Henderson, I.R., Wohlschlegel, J.A., and Jacobsen, S.E.** (2015). Domains rearranged methyltransferase3 controls DNA methylation and regulates RNA polymerase V transcript abundance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 911–916. doi:10.1073/pnas.1423603112
- Zhou, M., and Law, J.A.** (2015). RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 154–164. doi:10.1016/j.pbi.2015.07.005

## Funciones No-Autonomas a Nivel Celular de RNAs Pequeños

- Dunoyer, P., Melnyk, C., Molnar, A., and Slotkin, R.K.** (2013). Plant mobile small RNAs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5: a017897. doi:10.1101/cshperspect.a017897
- Lewsey, M.G., Hardcastle, T.J., Melnyk, C.W., Molnar, A., Valli, A., Urich, M.A., Nery, J.R., Baulcombe, D.C., and Ecker, J.R.** (2016). Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E801–E810. doi:10.1073/pnas.1515072113
- Melnyk, C.W., Molnar, A., Bassett, A., and Baulcombe, D.C.** (2011). Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of Arabidopsis thaliana. *Curr. Biol.* 21: 1678–1683. doi:10.1016/j.cub.2011.08.065

- Melnyk, C.W., Molnar, A., and Baulcombe, D.C.** (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30: 3553–3563. doi:10.1038/emboj.2011.274
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., 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
- Sarkies, P., and Miska, E.A.** (2014). Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 525–535. doi:10.1038/nrm3840
- Weiberg, A., Bellinger, M., and Jin, H.** (2015). Conversations between kingdoms: small RNAs. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32: 207–215. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.025
- Zhang, W., Kollwig, G., Stecyk, E., Apelt, F., Dirks, R., and Kragler, F.** (2014). Graft-transmissible movement of inverted-repeat-induced siRNA signals into flowers. *Plant J.* 80: 106–121. doi:10.1111/tpj.12622

### siRNAs: Silenciamiento de Transposones y Virus y Metilación de DNA Mediada por RNA

- Baulcombe, D.C.** (2015). VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26: 141–146. doi:10.1016/j.pbi.2015.06.007
- Bologna, N.G., and Voinnet, O.** (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65: 473–503. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035728
- Bond, D.M., and Baulcombe, D.C.** (2014). Small RNAs and heritable epigenetic variation in plants. *Trends Cell Biol.* 24: 100–107. doi:10.1016/j.tcb.2013.08.001
- Carbonell, A., and Carrington, J.C.** (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 111–117. doi:10.1016/j.pbi.2015.06.013
- Chekanova, J.A.** (2015). Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 207–216. doi:10.1016/j.pbi.2015.08.003
- Fultz, D., Choudury, S.G., and Slotkin, R.K.** (2015). Silencing of active transposable elements in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 67–76. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.027
- Ibarra, C.A., et al.** (2012). Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science* 337: 1360–1364. doi:10.1126/science.1224839
- Kawashima, T., and Berger, F.** (2014). Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nat. Rev. Genet.* 15: 613–624. doi:10.1038/nrg3685
- Lu, J., Zhang, C., Baulcombe, D.C., and Chen, Z.J.** (2012). Maternal siRNAs as regulators of parental genome imbalance and gene expression in endosperm of Arabidopsis seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5529–5534. doi:10.1073/pnas.1203094109
- Martínez, G., and Slotkin, R.K.** (2012). Developmental relaxation of transposable element silencing in plants: functional or

- byproduct? *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 496–502. doi:10.1016/j.pbi.2012.09.001
- Martínez, G., Panda, K., Köhler, C., and Slotkin, R.K.** (2016). Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nat Plants* 2: 16030. doi:10.1038/nplants.2016.30
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., and Vance, V.** (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci.* 13: 375–382. doi:10.1016/j.tplants.2008.04.009
- Mosher, R.A., Melnyk, C.W., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Studholme, D.J., and Baulcombe, D.C.** (2009). Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. *Nature* 460: 283–286. doi:10.1038/nature08084
- Peláez, P., and Sanchez, F.** (2013). Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: similarities and differences. *Front. Plant Sci.* 4: 343. doi:10.3389/fpls.2013.00343
- Pumplin, N., and Voinnet, O.** (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 745–760. doi:10.1038/nrmicro3120
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J.D., Feijó, J.A., and Martienssen, R.A.** (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136: 461–472. doi:10.1016/j.cell.2008.12.038
- Wang, X.-B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.-X., Chen, X., Yu, J.-L., and Ding, S.-W.** (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 484–489. doi:10.1073/pnas.0904086107
- Wierzbicki, A.T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M.J., Gregory, B.D., Ecker, J.R., Tang, H., and Pikaard, C.S.** (2012). Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes Dev.* 26: 1825–1836. doi:10.1101/gad.197772.112
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S.** (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* 41: 630–634. doi:10.1038/ng.365

### Funciones de los miRNAs: Desarrollo y Sincronización

- Ameres, S.L., and Zamore, P.D.** (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14: 475–488. doi:10.1038/nrm3611
- Carlsbecker, A., et al.** (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465: 316–321. doi:10.1038/nature08977
- Chen, X.** (2012). Small RNAs in development - insights from plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22: 361–367. doi:10.1016/j.gde.2012.04.004
- Chitwood, D.H., Nogueira, F.T.S., Howell, M.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C., and Timmermans, M.C.P.** (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev.* 23: 549–554. doi:10.1101/gad.1770009

- Chitwood, D.H., and Sinha, N.R.** (2014). Plant development: small RNAs and the metamorphosis of leaves. *Curr. Biol.* 24: R1087–R1089. doi:10.1016/j.cub.2014.10.013
- Chuck, G., Cigan, A.M., Saeteurn, K., and Hake, S.** (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from over-expression of a tandem microRNA. *Nat. Genet.* 39: 544–549. doi:10.1038/ng2001
- Couzigou, J.-M., and Combiér, J.-P.** (2016). Plant microRNAs: key regulators of root architecture and biotic interactions. *New Phytol.* 212: 22–35. doi:10.1111/nph.14058
- Curaba, J., Singh, M.B., and Bhalla, P.L.** (2014). miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *J. Exp. Bot.* 65: 1425–1438. doi:10.1093/jxb/eru002
- Feng, X., Zilberman, D., and Dickinson, H.** (2013). A conversation across generations: soma-germ cell crosstalk in plants. *Dev. Cell* 24: 215–225. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.014
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., and Paz-Ares, J.** (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* 39: 1033–1037. doi:10.1038/ng2079
- Furuta, K., Lichtenberger, R., and Helariutta, Y.** (2012). The role of mobile small RNA species during root growth and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24: 211–216. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.005
- Hisanaga, T., Miyashima, S., and Nakajima, K.** (2014). Small RNAs as positional signal for pattern formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21: 37–42. doi:10.1016/j.pbi.2014.06.005
- Knauer, S., Holt, A.L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E.J., Hinze, A., Pisch, M., Javelle, M., Timmermans, M.C., Tucker, M.R., and Laux, T.** (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Dev. Cell* 24: 125–132. doi:10.1016/j.devcel.2012.12.009
- Kulcheski, F.R., Córrea, R., Gomes, I.A., de Lima, J.C., and Margis, R.** (2015). NPK macronutrients and microRNA homeostasis. *Front. Plant Sci.* 6: 451. doi:10.3389/fpls.2015.00451
- Lauresergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H.S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., and Combiér, J.-P.** (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* 520: 90–93. doi:10.1038/nature14346
- Li, C., and Zhang, B.** (2016). MicroRNAs in control of plant development. *J. Cell. Physiol.* 231: 303–313. doi:10.1002/jcp.25125
- Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., and Hu, S.** (2015). Long non-coding RNAs and their biological roles in plants. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13: 137–147. doi:10.1016/j.gpb.2015.02.003
- Mallory, A.C., Bartel, D.P., and Bartel, B.** (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17: 1360–1375. doi:10.1105/tpc.105.031716
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D., and Maizel, A.** (2010). miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* 22: 1104–1117. doi:10.1105/tpc.109.072553
- Meng, Y., Shao, C., Wang, H., and Jin, Y.** (2012). Target mimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants. *BMC Genomics* 13: 197. doi:10.1186/1471-2164-13-197
- Miyashima, S., Koi, S., Hashimoto, T., and Nakajima, K.** (2011). Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development* 138: 2303–2313. doi:10.1242/dev.060491
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., and Laufs, P.** (2006). The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2929–2945. doi:10.1105/tpc.106.045617
- Plavskin, Y., and Timmermans, M.C.P.** (2012). Small RNA-regulated networks and the evolution of novel structures in plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77: 221–233. doi:10.1101/sqb.2013.77.014878
- Poethig, R.S.** (2009). Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19: 374–378. doi:10.1016/j.gde.2009.06.001
- Pyott, D.E., and Molnar, A.** (2015). Going mobile: non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnol. J.* 13: 306–318. doi:10.1111/pbi.12353
- Rubio-Somoza, I., Zhou, C.-M., Confraria, A., Martinho, C., von Born, P., Baena-Gonzalez, E., Wang, J.-W., and Weigel, D.** (2014). Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Curr. Biol.* 24: 2714–2719. doi:10.1016/j.cub.2014.09.058
- Skopelitis, D.S., Husbands, A.Y., and Timmermans, M.C.P.** (2012). Plant small RNAs as morphogens. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24: 217–224. doi:10.1016/j.ceb.2011.12.006
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B.D., Scheible, W.-R., and Bäurle, I.** (2014). *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *Plant Cell* 26: 1792–1807. doi:10.1105/tpc.114.123851
- Thompson, B.E., Basham, C., Hammond, R., Ding, Q., Kakrana, A., Lee, T.-F., Simon, S.A., Meeley, R., Meyers, B.C., and Hake, S.** (2014). The dicer-like1 homolog fuzzy tassel is required for the regulation of meristem determinacy in the inflorescence and vegetative growth in maize. *Plant Cell* 26: 4702–4717. doi:10.1105/tpc.114.132670
- Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J., and Weigel, D.** (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 6: e1001031. doi:10.1371/journal.pgen.1001031
- Wu, H.-J., Wang, Z.-M., Wang, M., and Wang, X.-J.** (2013). Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants. *Plant Physiol.* 161: 1875–1884. doi:10.1104/pp.113.215962
- Yu, S., Lian, H., and Wang, J.-W.** (2015). Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 1–7. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.009

## Biogénesis de PhasiRNAs y TasiRNAs

- Allen, E., and Howell, M.D.** (2010). miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 798–804. doi:10.1016/j.semcdb.2010.03.008
- Arikiti, S., Xia, R., Kakrana, A., Huang, K., Zhai, J., Yan, Z., Valdés-López, O., Prince, S., Musket, T.A., Nguyen, H.T., Stacey, G., and Meyers, B.C.** (2014). An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. *Plant Cell* 26: 4584–4601. doi:10.1105/tpc.114.131847
- Cho, S.H., Coruh, C., and Axtell, M.J.** (2012). miR156 and miR390 regulate tasiRNA accumulation and developmental timing in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 24: 4837–4849. doi:10.1105/tpc.112.103176
- de Felippes, F.F., Wang, J.W., and Weigel, D.** (2012). MIGS: miRNA-induced gene silencing. *Plant J.* 70: 541–547. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04896.x
- Fei, Q., Xia, R., and Meyers, B.C.** (2013). Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 25: 2400–2415. doi:10.1105/tpc.113.114652
- Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayer, T., Vaucheret, H., Crespi, M.D., and Maizel, A.** (2012). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *EMBO J.* 31: 1704–1713. doi:10.1038/emboj.2012.20
- Manavella, P.A., Koenig, D., and Weigel, D.** (2012). Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 2461–2466. doi:10.1073/pnas.1200169109
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C.** (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133: 128–141. doi:10.1016/j.cell.2008.02.033
- Plavskin, Y., Nagashima, A., Perroud, P.-F., Hasebe, M., Quatrano, R.S., Atwal, G.S., and Timmermans, M.C.** (2016). Ancient trans-acting siRNAs confer robustness and sensitivity onto the auxin response. *Dev. Cell* 36: 276–289. doi:10.1016/j.devcel.2016.01.010
- Zhai, J., Zhang, H., Arikiti, S., Huang, K., Nan, G.L., Walbot, V., and Meyers, B.C.** (2015). Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phased siRNAs in maize anthers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 3146–3151. doi:10.1073/pnas.1418918112
- Zheng, Y., Wang, Y., Wu, J., Ding, B., and Fei, Z.** (2015). A dynamic evolutionary and functional landscape of plant phased small interfering RNAs. *BMC Biol.* 13: 32. doi:10.1186/s12915-015-0142-4

## RNAs Pequeños en Defensa e Interacciones Abióticas

- Katiyar-Agarwal, S., and Jin, H.** (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 225–246. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114457
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., and Baker, B.** (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 1790–1795. doi:10.1073/pnas.1118282109

- Mason, G.A., Lemus, T., and Queitsch, C.** (2016). The mechanistic underpinnings of an ago1-mediated, environmentally dependent, and stochastic phenotype. *Plant Physiol.* 170: 2420–2431. doi:10.1104/pp.15.01928
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., and Schweizer, P.** (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeriagraminis*. *Plant Cell* 22: 3130–3141. doi:10.1105/tpc.110.077040
- Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., and Ma, W.** (2015). Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 5850–5855. doi:10.1073/pnas.1421475112
- Sarkies, P., and Miska, E.A.** (2014). Small RNAs break out: the molecular cell biology of mobile small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 525–535. doi:10.1038/nrm3840
- Shivaprasad, P.V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A.C.M., and Baulcombe, D.C.** (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24: 859–874. doi:10.1105/tpc.111.095380
- Teotia, S., Singh, D., Tang, X., and Tang, G.** (2016). Essential RNA-based technologies and their applications in plant functional genomics. *Trends Biotechnol.* 34: 106–123. doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.001
- Weiberg, A., and Jin, H.** (2015). Small RNAs—the secret agents in the plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26: 87–94. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.033
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., and Jin, H.** (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342: 118–123. doi:10.1126/science.1239705
- Yi, H., and Richards, E.J.** (2007). A cluster of disease resistance genes in Arabidopsis is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell* 19: 2929–2939. doi:10.1105/tpc.107.051821
- Zhai, J., et al.** (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* 25: 2540–2553. doi:10.1101/gad.177527.111
- Zhang, H., Tao, Z., Hong, H., Chen, Z., Wu, C., Li, X., Xiao, J., and Wang, S.** (2016). Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus. *Nat Plants* 2: 16016. doi:10.1038/nplants.2016.16

## Aplicaciones

- Durand, E., et al.** (2014). Dominance hierarchy arising from the evolution of a complex small RNA regulatory network. *Science* 346: 1200–1205. doi:10.1126/science.1259442
- Jacobs, T.B., Lawler, N.J., LaFayette, P.R., Vodkin, L.O., and Parrott, W.A.** (2016). Simple gene silencing using the trans-acting siRNA pathway. *Plant Biotechnol. J.* 14: 117–127. doi:10.1111/pbi.12362
- Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M., and Datta, A.** (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 6: 208. doi:10.3389/fpls.2015.00208
- Koch, A., and Kogel, K.-H.** (2014). New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-

- mediated gene silencing. *Plant Biotechnol. J.* 12: 821–831.  
doi:10.1111/pbi.12226
- Lauressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H.S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., and Combier, J.-P.** (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* 520: 90–93. doi:10.1038/nature14346
- Li, F., et al.** (2015). Regulation of nicotine biosynthesis by an endogenous target mimicry of microRNA in tobacco. *Plant Physiol.* 169: 1062–1071. doi:10.1104/pp.15.00649
- Megraw, M., Cumbie, J.S., Ivanchenko, M.G., and Filichkin, S.A.** (2016). Small genetic circuits and microRNAs: Big players in poly-merase II transcriptional control in plants. *Plant Cell* 28: 286–303. doi:10.1105/tpc.15.00852
- Molesini, B., Pii, Y., and Pandolfini, T.** (2012). Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. *Trends Biotechnol.* 30: 80–88. doi:10.1016/j.tibtech.2011.07.005
- Pyott, D.E., and Molnar, A.** (2015). Going mobile: non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. *Plant Biotechnol. J.* 13: 306–318. doi:10.1111/pbi.12353
- Reis, R.S., Eamens, A.L., and Waterhouse, P.M.** (2015). Missing pieces in the puzzle of plant microRNAs. *Trends Plant Sci.* 20: 721–728. doi:10.1016/j.tplants.2015.08.003
- Sunilkumar, G., Campbell, L.M., Puckhaber, L., Stipanovic, R.D., and Rathore, K.S.** (2006). Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 18054–18059. doi:10.1073/pnas.0605389103
- Sunkar, R., Li, Y.-F., and Jagadeeswaran, G.** (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* 17: 196–203. doi:10.1016/j.tplants.2012.01.010
- Zhang, B.** (2015). MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 66: 1749–1761. doi:10.1093/jxb/erv013