

Artificial Small RNAs in Plants: Characterization of Systemic Activity, and Engineering Minimal Precursors for Transgene-Free, Virus-Based Expression

Adriana E. González Cisneros

RESUMEN

Los pequeños ARNs artificiales (art-sRNAs) son moléculas de ARN de simple cadena, de 21 nucleótidos (nt), diseñados computacionalmente para silenciar genes de la planta con alta eficacia y especificidad. Los art-sRNAs se clasifican en dos grupos: micro ARNs artificiales (amiRNAs) y pequeños ARNs interferentes sintéticos que actúan en trans (syn-tasiRNAs). A pesar de que los art-sRNAs se usan frecuentemente para silenciar genes endógenos y exógenos en plantas, todavía hay ciertos aspectos desconocidos que limitan sus aplicaciones. Uno de ellos es su capacidad de movimiento, dado que se desconoce si son capaces de moverse y silenciar genes endógenos en tejidos distintos a los de origen. Por tanto, el uso de art-sRNAs para inducir silenciamiento génico a nivel de toda la planta habitualmente implica la generación de plantas transgénicas que expresen los precursores completos de art-sRNAs, lo que limita su versatilidad como herramienta biotecnológica para genómica funcional y mejora de cultivos. En esta tesis, hemos investigado en primer lugar la capacidad de silenciamiento sistémico de los art-sRNAs y, posteriormente, hemos diseñado precursores mínimos de art-sRNAs para facilitar la expresión no transgénica a partir de virus y en toda la planta.

En primer lugar, estudiamos la capacidad de silenciamiento local y sistémico de art-sRNAs dirigidos contra la subunidad CHLI de la quelatasa de magnesio, codificada por el gen *SULPHUR* (*NbSu*), mediante ensayos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Tanto amiRNAs como syn-tasiRNAs indujeron el silenciamiento sistémico de *NbSu*, para lo cual se requieren altos niveles de expresión cerca del peciolo. Esta actividad sistémica está facilitada por el movimiento vascular de art-sRNAs de doble cadena y 21 nt a través de la planta, permitiendo silenciar genes en tejidos distintos a los de origen. Este resultado pone de manifiesto el potencial biotecnológico de expresar localmente art-sRNAs que sean capaces de moverse a zonas distales y desencadenar un silenciamiento génico altamente específico en toda la planta.

En segundo lugar, nos centramos en diseñar precursores de tamaño mínimo derivados de las moléculas precursoras endógenas de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*): *MIR390a* (521 nt) y *TAS1c* (1011 nt). Evaluamos la eficacia de silenciamiento de una colección de construcciones que contenían versiones acortadas de los precursores *AtMIR390a* y *AtTAS1c* mediante expresión transitoria y estable en *N. benthamiana* y *Arabidopsis*, respectivamente. Observamos que, tanto amiRNAs como syn-tasiRNAs, son altamente eficientes y se procesan de forma precisa cuando se producen a partir de precursores mínimos de solo 89 y 54 nt respectivamente. Además, comprobamos que cuando se expresan a partir de un vector viral de ARN, como el virus X de la patata, solo se producen art-sRNAs auténticos a partir de precursores mínimos, y no de los de longitud completa, lo que da lugar al silenciamiento eficiente de genes endógenos en *N. benthamiana*.

Asimismo, pudimos inducir silenciamiento génico mediante art-sRNAs expresados a partir de un virus, de forma no transgénica y escalable, mediante la pulverización sobre plantas de extractos infecciosos que contenían los vectores modificados. Estos resultados muestran que la longitud de los precursores de art-sRNAs puede ser acortada de forma significativa sin comprometer la eficacia del silenciamiento inducido, y que los precursores mínimos ofrecen una ventaja biotecnológica sobre los precursores de longitud completa cuando se expresan a partir de vectores virales.