



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Silenciamiento sistémico
inducido por pequeños
RNAs artificiales en
*Nicotiana benthamiana***

Tesis de Máster

Autor: Ainhoa De La Torre Montaña

Máster en Investigación en Biología Molecular, Celular y
Genética

Universitat de València

Director: Dr. Alberto Tomás Carbonell Olivares,
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
(CSIC-UPV)

Tutor académico: Dra. Isabel Arrillaga Mateos

Curso 2019/2020

Especial COV19

Resumen

Los pequeños RNAs (sRNAs), microRNAs (miRNAs) y sRNAs de interferencia (siRNAs), degradan específicamente moléculas de RNA de secuencia complementaria, proceso conocido como silenciamiento génico. En algunos casos, los miRNAs de 22 nucleótidos inducen la producción de siRNAs secundarios a partir sus RNAs diana, y estos siRNAs secundarios se desplazan por la planta a corta y larga distancia propagando el silenciamiento. Experimentos previos mostraron que la expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* del miRNA artificial (amiRNA) amiR-NbSu-2 de 21 nucleótidos frente al gen *SULPHUR* inducía silenciamiento sistémico (SS) en hojas jóvenes no agroinfiltradas, además de silenciamiento local, caracterizados por el amarilleamiento de los tejidos silenciados. Para averiguar las causas moleculares del SS se analizaron diversos sRNAs artificiales, tanto amiRNAs como siRNAs sintéticos (syn-tasiRNAs). Nuestros resultados muestran que el amiR-NbSu-2 es más eficiente produciendo SS que un syn-tasiRNA de secuencia idéntica, mientras que una versión de 22 nucleótidos del amiR-NbSu-2 es incapaz de inducir SS. En experimentos próximos, analizaremos el papel de la base en posición 3' del amiR-NbSu-2 de 21 nucleótidos en el proceso de SS, y comprobaremos si amiR-NbSu-2 es capaz de inducir SS en plantas de *N. benthamiana* mutantes para genes implicados en la biogénesis de siRNAs secundarios.

Abstract

Small RNAs (sRNAs), microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs), are responsible for the sequence-specific degradation of highly sequence complementary RNA molecules, a process known as gene silencing. Some 22-nucleotide miRNAs can induce the production of secondary siRNAs from their target RNAs, and these secondary siRNAs can travel through the plant at short and long distances spreading the gene silencing. Previous experiments in our laboratory showed that the transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves of the 21-nucleotide artificial microRNA (amiRNA) amiR-NbSu-2 against the *SULPHUR* gene induced systemic silencing (SS) in young non-agroinfiltrated leaves, in addition to local silencing, characterized by the yellowing of silenced tissues. To study the molecular basis of SS, we functionally analysed various artificial sRNAs, both amiRNAs and synthetic trans-acting siRNAs (syn-tasiRNAs). Our results show that amiR-NbSu-2 is more efficient at producing SS than a syn-tasiRNA of identical sequence, whereas a 22-nucleotide version of amiR-NbSu-2 is unable to induce SS. In future experiments we will analyse the role of the 3' base of the 21-nucleotide amiR-NbSu-2 in the SS process, and we will study if amiR-NbSu-2 is capable of inducing SS in *N. benthamiana* mutant plants for genes involved in secondary siRNA biogenesis.

Palabras clave: silenciamiento sistémico, pequeños RNAs, microRNA artificial, tasiRNA sintético, *Nicotiana benthamiana*

INTRODUCCIÓN

El silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs (sRNAs) es un mecanismo por el cual sRNAs se unen específicamente a moléculas de RNA con las que presentan una elevada complementariedad de secuencia y las degradan, evitando la expresión génica. Los microRNAs (miRNAs) y los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) son las principales clases de sRNAs que actúan en las rutas de silenciamiento. La asociación de los sRNAs con ribonucleasas de tipo H de la familia Argonauta (AGO) da lugar a los complejos de silenciamiento inducidos por RNA (RISC), que provocan la represión génica del RNA diana mediante escisión endonucleotídica o represión traduccional.

En plantas, los miRNAs proceden de transcritos de genes *MIRNA* con estructura plegada en horquilla y sin complementariedad perfecta, que son procesados por la ribonucleasa de tipo III “Dicer-Like 1” (DCL1), generando dúplex de miRNAs que son metilados por el potenciador hua 1 (HEN1). En cuanto a los siRNAs, encontramos una subclase denominada siRNAs que actúan en trans (tasiRNAs). La ruta de biosíntesis de los tasiRNAs en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) se inicia con el corte de un transcrito no codificante de la familia *TAS* por parte de un complejo miRNA-AGO. Uno de los fragmentos de cadena simple resultante del corte es estabilizado, se desconoce si directa o indirectamente, por la proteína supresora del silenciamiento génico 3 (SGS3) y de silenciamiento defectivo 5 (SDE5), de manera que se impide la acción de enzimas degradativas sobre estos fragmentos (Yoshikawa *et al.*, 2005). Posteriormente la RNA polimerasa RNA dependiente 6 (RDR6) sintetiza un RNA de doble cadena (dsRNA) a partir del fragmento de corte estabilizado. A continuación, el dsRNA es procesado por DCL4 de manera secuencial cada 21 nucleótidos empezando desde el extremo, lo que da lugar a la síntesis de múltiples dúplex de tasiRNA de 21 nucleótidos. Se dice que los tasiRNAs están en fase con respecto al sitio de corte del miRNA. En cualquier caso, tanto para los miRNAs como los tasiRNAs, una de las dos cadenas del dúplex se incorpora en una proteína AGO. Esta cadena se denomina cadena guía y es escogida en función de la identidad del nucleótido 5', así como en base a otros elementos de secuencia o estructurales presentes en el sRNA o en el dúplex. La otra cadena, llamada cadena estrella, es generalmente degradada (Bologna y Voinnet, 2014).

En algunos casos se generan siRNAs secundarios, siRNAs que provienen de un precursor de dsRNA sintetizado por una RDR a partir de un fragmento de RNA resultante del corte por parte de un complejo miRNA-RISC. Si además los siRNAs secundarios se han producido por un procesamiento en fase del dsRNA, entonces se les llama siRNAs en fase (o phasiRNAs) (Zhai *et al.*, 2011). Los siRNAs secundarios pueden ser de 21 o 22 nucleótidos si son generados

por DCL4 o DCL2, respectivamente, y actúan en la ruta de silenciamiento postranscripcional (PTGS), o de 24 nucleótidos si son producidos por DCL3 y actúan en la ruta de silenciamiento transcripcional (TGS) (Vazquez y Hohn 2013). En cualquier caso, los siRNAs secundarios pueden actuar de dos maneras: en cis silenciando los transcritos del gen diana y por lo tanto amplificando la señal de silenciamiento del miRNA original, o en trans afectando a genes que no son diana del miRNA original. Los tasiRNAs son un ejemplo de siRNAs secundarios que actúan en trans.

De particular interés en este trabajo es la generación de siRNAs secundarios de 21 nucleótidos por la ruta RDR6/DCL4 tras el corte de un transcrito por un complejo miRNA-AGO. En realidad, todavía se desconocen los mecanismos moleculares concretos que explican la incorporación de los complejos RDR6 para la síntesis de un dsRNA a partir de un transcrito cortado por un complejo miRNA-AGO. Aún así, se sabe que principalmente son el tamaño del miRNA y la estructura del dúplex miRNA/miRNA* las características que definen a estos miRNAs que inducen la ruta de generación de siRNAs secundarios de 21 nucleótidos. Respecto al tamaño, la mayoría de miRNAs son de 21 nucleótidos, pero análisis en Arabidopsis han revelado que los miRNAs que inducen la síntesis de siRNAs secundarios de 21 nucleótidos suelen ser de 22 nucleótidos (Chen *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2010). Estos se generan a causa de un bucle asimétrico que se forma tras el apareamiento entre los nucleótidos correspondientes al miRNA y al miRNA* en el precursor, lo que provoca la síntesis de un dúplex con un miRNA de 22 nucleótidos (y un miRNA* de 21 nucleótidos). La otra característica, la estructura del dúplex miRNA/miRNA*, está relacionada con la característica anterior, con la asimetría del dúplex (para una revisión reciente sobre la implicación de los siRNAs secundarios en la regulación génica consultar de Felippes 2019).

Otra cuestión clave para este trabajo es el hecho de que el silenciamiento de RNA se puede propagar dentro de una planta tanto a corta como a larga distancia. El primero es conocido como silenciamiento de RNA de propagación a corto rango (SRS), y el segundo como silenciamiento sistémico (SS). El SRS se limita a una zona celular concreta, que se estima que corresponde a un radio de aproximadamente 10-15 células más allá del grupo de células donde se inició el silenciamiento (Himber *et al.*, 2003). Los responsables son siRNAs de 21 nucleótidos producidos por DCL4, miRNAs y tasiRNAs, aunque podría haber más moléculas responsables (Dunoyer *et al.*, 2005). En el caso de los miRNAs, se han encontrado evidencias de SRS en Arabidopsis por parte de miR166 (Carlsbecker *et al.*, 2010) y miR394 (Knauer *et al.*, 2013). Para los tasiRNAs, se trata de aquellos producidos a partir del locus *TAS3* (Chitwood *et al.*, 2009; Schwab *et al.*, 2009).

En cuanto al SS, los primeros experimentos en los que se describió la movilidad a larga distancia de RNAs observaron que la señal de silenciamiento se propagaba desde las hojas silenciadas hacia hojas más jóvenes, manifestándose inicialmente en la zona de las venas para extenderse a continuación por toda la hoja (Figura 1). La identidad de la señal de SS no se conoce con certeza, aunque sí parece claro que sería un ácido nucleico que se desplazaría desde la región silenciada a través del floema, en concreto siRNAs y miRNAs, de entre 21 y 24 nucleótidos (Palauqui *et al.*, 1997; Voinnet y Baulcombe 1997). Por un lado, se cree que podría tratarse de sRNAs de cadena simple formando complejos con una o diversas proteínas del floema, como la pequeña proteína de unión al RNA del floema 1 (CmPSRP1) (Yoo *et al.*, 2004). Por otro lado, el movimiento desde las raíces a las semillas podría darse mediante los plasmodesmos, de una manera similar al SRS. Sin embargo, a diferencia del SRS, se requiere amplificación en las células receptoras de la señal (Vaistij *et al.*, 2002; Himber *et al.*, 2003). En concreto, se sugiere que RDR6 está involucrada en la percepción de la señal de silenciamiento, y que DCL3 podría estar relacionada con la producción de la señal (Schwach *et al.*, 2005; Brosnan *et al.*, 2007; Melnyk *et al.*, 2011). En cualquier caso, parece que los siRNAs secundarios tanto de 21 como de 24 nucleótidos podrían estar relacionados con el movimiento de la señal sistémica (Vazquez y Hohn 2013). Diversos estudios concluyen que usar genes endógenos como diana de silenciamiento provoca menor grado de SS que genes exógenos (Palauqui y Balzergue 1999; Zhai *et al.*, 2011; Yoshikawa 2013; Guo *et al.*, 2016). La hipótesis que se baraja es que la planta evita la propagación de la señal sistémica de un gen endógeno, protegiéndose de una posible reacción adversa (Kalantidis *et al.*, 2008). Este modelo recibe el nombre de “límite”, y hace referencia al nivel de transcritos por debajo del cual no se da señal sistémica (Voinnet 2005). Se cree que también las características del gen endógeno contribuirían a evitar el SS (Dadami *et al.*, 2013a). Para una revisión reciente sobre SS consultar Mermigka *et al.*, 2016.

Las técnicas de RNA de interferencia (RNAi) permiten inducir el silenciamiento dirigido de un gen diana. Las técnicas de RNAi clásicas o de primera generación se basan en expresar precursores de dsRNA o de RNA con estructura de horquilla corta (hpRNA) que incluyen secuencias complementarias a la secuencia diana. Debido a que se producen gran cantidad de siRNAs diferentes a partir de estos precursores, estos siRNAs podrían silenciar no sólo a sus RNAs diana sino también, de forma accidental, a otros transcritos celulares altamente complementarios. Mediante el uso de sRNAs artificiales (art-sRNAs) se pueden superar estos problemas de inespecificidad propios de las técnicas de RNAi clásicas. Es por ello que se considera que las estrategias basadas en art-sRNAs son estrategias de RNAi de segunda

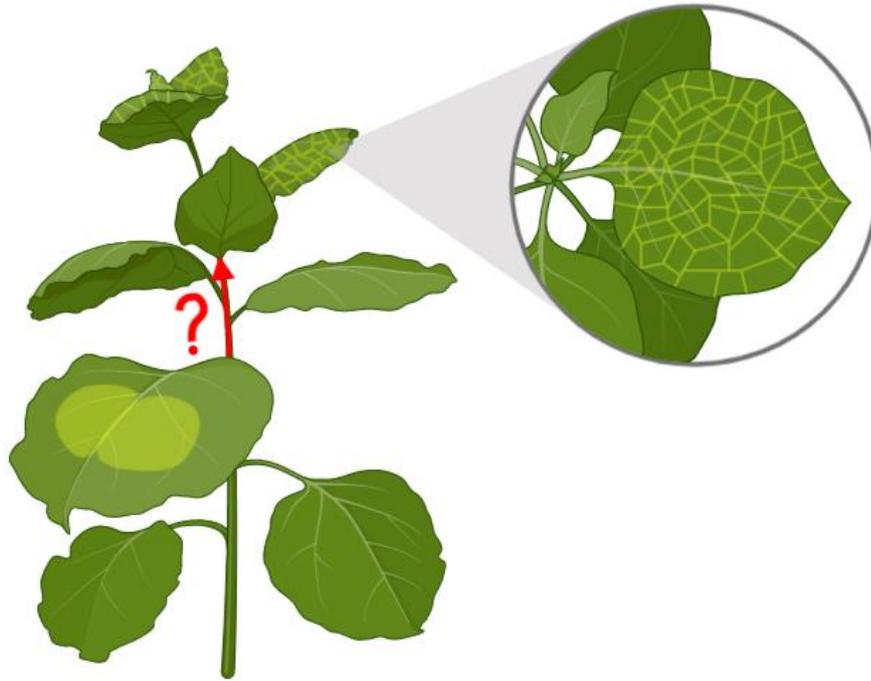


Figura 1. Esquema representativo del silenciamiento sistémico en plantas. Se ha observado en algunas ocasiones el silenciamiento de un gen en una hoja basal (zonas en amarillo) puede producir una señal de SS de naturaleza desconocida que se transportaría por el floema de la planta hasta llegar a las hojas más jóvenes, en las que produciría el silenciamiento del gen fundamentalmente alrededor de las nervaduras.

generación. El uso de art-sRNAs para regular la expresión génica es una herramienta muy útil para obtener plantas con características únicas. En concreto, las dos clases principales de art-sRNAs son los microRNAs artificiales (amiRNAs) y los tasiRNAs sintéticos (syn-tasiRNAs), que se suelen diseñar para silenciar específicamente uno o diversos genes diana, respectivamente (Carbonell, 2017).

Los amiRNAs se expresan en la planta a partir de un precursor de miRNA endógeno, en el que se ha sustituido la secuencia del miRNA por la del amiRNA que se ha diseñado (Figura 2). Es importante no modificar la estructura secundaria original del precursor para que éste pueda ser procesado correctamente por DCL1. La cadena guía suele presentar un uracilo en posición 5', ya que esto facilita su asociación con AGO1. Los amiRNAs se suelen diseñar para silenciar un único transcrito diana, aunque también se han descrito amiRNAs capaces de silenciar simultáneamente varios transcritos si estos presentan una similitud de secuencia suficiente, como en el caso de los genes *TRIPTYCHON* (*TRY*), *CAPRICE* (*CPC*) y potenciador de triptychon y caprice (*ETC2*) de la familia MYB en *Arabidopsis* (Liang *et al.*, 2012). Otra posibilidad consiste en expresar múltiples amiRNAs a partir de una única construcción, bien mediante un precursor endógeno policistrónico (Fahim *et al.*, 2012) o bien incorporando distintas copias del precursor en tándem, cada una con un amiRNA distinto (Liang *et al.*, 2012).

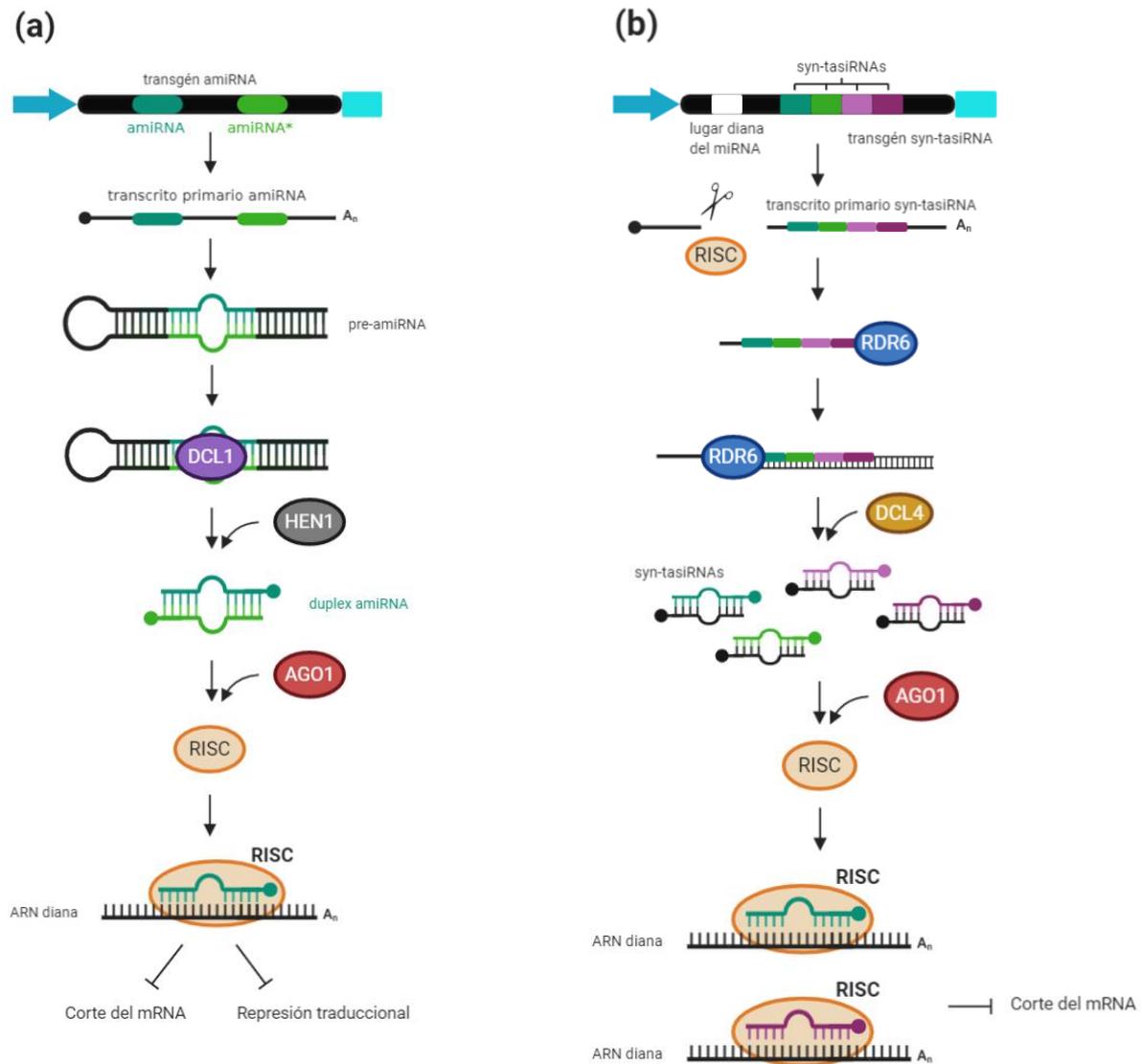


Figura 2. Rutas de art-sRNAs en plantas. (a) Ruta de los amiRNAs. Un transgén amiRNA, en que se han sustituido las secuencias miRNA/miRNA* por las secuencias amiRNA/amiRNA* en el precursor, es introducido en las células, donde se transcribe, generándose un transcrito primario amiRNA, que es procesado en un pre-amiRNA. Mediante la acción de DCL1 se genera un duplex amiRNA, metilado por HEN1. La cadena amiRNA que presenta un uracilo en posición 5' crea un complejo con AGO1, generándose así RISC. RISC tiene la capacidad de silenciar transcritos con los que comparte una elevada complementariedad de secuencia mediante el corte del mRNA o la represión traduccional. (b) Ruta de los syn-tasiRNAs. Un transgén syn-tasiRNA, en que se han sustituido diversas secuencias tasiRNA por múltiples secuencias syn-tasiRNA en tándem en el precursor TAS, es introducido en las células, donde se transcribe, generándose un transcrito primario syn-tasiRNA. Un miRNA endógeno corta el transcrito primario, proceso que provoca que se reclute RDR6, que sintetiza un dsRNA. DCL4 procesa entonces el dsRNA en duplex tasiRNA de 21 nucleótidos. La cadena syn-tasiRNA que presenta un uracilo en posición 5' crea un complejo con AGO1, generándose así RISC. RISC tiene la capacidad de silenciar diversos transcritos con independencia de su secuencia mediante el corte del mRNA. Figura realizada con la ayuda de www.biorender.com

En cuanto a los syn-tasiRNAs, de forma similar a los amiRNAs, se sustituye la región de un precursor TAS endógeno correspondiente a diversos tasiRNAs por la secuencia de los syn-tasiRNAs diseñados (Figura 2). Además, también se diseña la cadena guía con un uracilo en 5'. Se han identificado 8 locis TAS en Arabidopsis: *TAS1a-c*, *TAS2*, *TAS3a-c* y *TAS4*, pero sólo *TAS1a*, *TAS1c* y *TAS3a* se han usado como precursores para producir syn-tasiRNAs. La síntesis

de syn-tasiRNAs requiere de la presencia del miR173 en caso de usar precursores de *TAS1a* y *TAS1c*, y del miR390a en el caso de precursores de *TAS3a*, ya que los complejos miR173/AGO1 y miR390/AGO7, respectivamente, son los responsables del corte del transcrito *TAS* (Carbonell, 2017). La principal ventaja de los syn-tasiRNAs es la posibilidad de expresar múltiples syn-tasiRNAs mediante una única construcción, pudiendo así silenciar diversos genes dianas simultáneamente independientemente de la secuencia que presenten.

Gracias a programas bioinformáticos como WMD3 (Ossowski *et al.*, 2008) o P-SAMS (Fahlgren *et al.*, 2016) se pueden diseñar sRNAs de 21 nucleótidos con secuencia complementaria a la del transcrito del gen a silenciar. Un punto importante a considerar durante el diseño de art-sRNAs es la complementariedad de secuencia que presenta el art-sRNA con el transcrito diana. Un desapareamiento en la posición 1 o entre la 14 y la 21 provoca un efecto menor en la efectividad del sRNA, mientras que, si el desapareamiento se da en la región semilla, nucleótidos del 2 al 14, la actividad del sRNA se ve gravemente disminuida. La especificidad también es un factor imprescindible, ya que hay que asegurar que el art-sRNA silencie únicamente el/los gen/es diana. El análisis de todas las posibles interacciones del art-sRNA con los transcritos celulares permite evitar que el art-sRNA seleccionado presente la suficiente complementariedad de secuencia para silenciar un transcrito no deseado. Para realizar este tipo de análisis a nivel genómico es necesario disponer del transcriptoma anotado o de una colección de marcadores de secuencia expresada (EST). Lo más habitual es que los programas bioinformáticos de diseño de art-sRNAs diseñen art-sRNAs altamente complementarios con su RNA(s) diana(s) y altamente específicos.

En experimentos previos en nuestro laboratorio se observó que la expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* del amiRNA amiR-NbSu-2, de 21 nucleótidos, frente al gen *SULPHUR* inducía no sólo silenciamiento local en hojas agroinfiltradas (amarilleamiento de las regiones agroinfiltradas) sino también, y de forma inesperada, SS en hojas más jóvenes no agroinfiltradas (amarilleamiento en regiones próximas a las nervaduras). Por el contrario, otros dos amiRNAs, también de 21 nucleótidos y diseñados frente al gen *SULPHUR*, únicamente indujeron silenciamiento local, pero no sistémico.

El objetivo de este trabajo es tratar de entender desde un punto de vista molecular cuáles son los factores que contribuyen a la aparición del SS. Para ello se han realizado diversos experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* en los que se ha comprobado i) si el SS puede ser producido también por un syn-tasiRNA de idéntica secuencia al amiR-NbSu-2, ii) si el SS puede aumentarse al expresar una versión de 22 nucleótidos de amiR-NbSu-2, y iii) el papel del nucleótido del extremo 3' del amiR-NbSu-2 en la inducción de SS, y iv) si el SS

está asociado a la producción de siRNAs secundarios del gen *SULPHUR* dependientes de RDR6 o DCL4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* crecidas inicialmente en cabina de invernadero, y transferidas tras ser agroinfiltradas a una cámara de crecimiento a 25°C y con un fotoperiodo de 12 h de luz – 12 h de oscuridad. Plantas de 3-4 semanas de edad fueron transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 siguiendo el protocolo de agroinfiltración para expresión transitoria explicado a continuación. Los mutantes usados habían sido descrito previamente en otros artículos (Dadami *et al.*, 2013b; Katsarou *et al.*, 2019; Schwach *et al.*, 2005).

Ensayo de agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana*

Una colonia de *A. tumefaciens* transformada con la construcción de interés y crecida en placa de cultivo LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl pH 7) con 50 µg/ml kanamicina (ThermoFisher Scientific) y 50 µg/ml de rifampicina (ThermoFisher Scientific) se transfirió a un matraz que contenía 5 ml de LB con 50 µg/ml kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina. Se incubó el cultivo a 28°C durante 24 h en agitación (200 rpm aproximadamente). Se transfirieron 4 ml de este cultivo a un matraz con 50 ml de LB y 50 µg/ml kanamicina y se incubó de 4 a 6 h a 28°C en agitación. Una vez se alcanzó una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5 se transfirieron 45 ml a un tubo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el pellet en 45 ml de medio de inducción vir (6 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,5 g/l NaCl, 1mM MgSO₄, 0,3 mM CaCl₂, 0,4% glucosa, 10 mM MES, 1mM acetosiringona) y se transfirieron de vuelta al matraz, incubándose a 28°C durante 14 h. Pasado el tiempo de incubación se midió la OD₆₀₀ y se calculó el volumen para que al resuspender el pellet la OD₆₀₀ fuese de aproximadamente 1,1. Se centrifugó el volumen necesario para el experimento a 5000 rpm durante 10 min, y se resuspendió en el volumen calculado con solución de infiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5,2 y 1,5 mM acetosiringona). Se ajustó la OD₆₀₀ de cada cultivo hasta 1,0.

En todos los experimentos se co-infiltraron dos construcciones (OD₆₀₀ final de 0,5 para cada cultivo), en concreto se mezclaron volúmenes iguales. Se usaron lotes de 9 plantas por condición, con 3 bloques por lote. Cada bloque corresponde a 3 réplicas biológicas en las que 2 hojas de cada planta son agroinfiltradas. En concreto en el primer y tercer bloque se agroinfiltraron 2 hojas completas y en el segundo bloque se agroinfiltraron 2 halos por hoja.

Las hojas agroinfiltradas de las plantas del primer bloque se recolectaron a día 2 post-agroinfiltración y se usaron para el análisis de sRNAs por Northern blot, determinando así la acumulación del sRNA a día 2 post-agroinfiltración. En concreto el proceso se basó en recolectar las hojas agroinfiltradas, congelarlas en nitrógeno líquido y almacenarlas a -80°C. Las plantas del segundo bloque se usaron para documentar fotográficamente la presencia o no presencia de silenciamiento en la hoja agroinfiltrada a día 7 post-agroinfiltración. El último bloque también sirvió para documentar fotográficamente la presencia o no presencia de silenciamiento, pero en este caso es la presencia de SS en la planta a día 14 post-agroinfiltración.

Construcción de plásmidos recombinantes

Los plásmidos *35S:GUS* y *35S:MIR173* (Montgomery *et al.*, 2008), *35S:amiR-GUS* (Carbonell y Daròs, 2017) y *35S:syn-tasiR-NbSu-2-D2* (López-Dolz *et al.*, 2020) habían sido previamente construidos y descritos. Los plásmidos *35S:amiR-NbSu-1*, *35S:amiR-NbSu-2*, *35S:amiR-NbSu-3*, *35S:amiR-NbSu-1-22*, *35S:amiR-NbSu-2-22* y *35S:amiR-NbSu-3-22* fueron construidos en el laboratorio con anterioridad pero no se han publicado todavía. En este trabajo, se construyeron los plásmidos *35S:amiR-NbSu-2-3'U*, *35S:amiR-NbSu-2-3'C*, *35S:amiR-NbSu-2-3'G* y *35S:syn-tasiR-GUS*, tal y como se describe más abajo empleando las parejas de oligonucleótidos AC-339/AC-340, AC-341/AC-342 y AC-343/AC-344 y AC-334/AC-335 respectivamente (Tabla S1).

A partir del vector de clonado *pMDC32B-AtMIR390-B/c* (Carbonell *et al.*, 2014) se construyeron los plásmidos *35S:amiR-NbSu-2-3'C*, *35S:amiR-NbSu-2-3'G* y *35S:amiR-NbSu-2-3'U*. El plásmido *35S:syn-tasiR-GUS* fue construido a partir del vector de clonado *pMDC32B-AtTAS1c-B/c* (López-Dolz *et al.*, 2020). El protocolo seguido fue el mismo tanto para la clonación de amiRNAs como de syn-tasiRNAs, y se describe a continuación.

Clonación de miRNAs y syn-tasiRNAs

Para el clonaje de los insertos de amiRNAs y syn-tasiRNAs se siguió el protocolo descrito en Carbonell *et al.* 2014. Inicialmente se añadieron 2 µl de cada pareja de oligonucleótidos (stock a 100 µM) a 46 µl de tampón de anillamiento. Esta solución se puso en un baño a 95°C durante 5 min, transcurridos los cuales se apagó el equipo y se mantuvo la solución en él hasta alcanzar temperatura ambiente. Los oligonucleótidos hibridados fueron diluidos en agua hasta 0,15 µM posteriormente.

Se llevó a cabo una reacción de digestión-ligación basada en la incubación a 37°C durante 30 min de una mezcla de 10 µl compuesta por 50 ng del plásmido B/c correspondiente, 1 µl de

los oligonucleótidos hibridados diluidos, 1 µl de tampón 10X T4 DNA ligasa (ThermoFisher Scientific), 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa (5 U/µl, ThermoFisher Scientific) y 1 µl de la enzima *BsaI*-HF (10 U/µl, ThermoFisher Scientific). En todos los casos se usaron 1, 2 o 4 µl de la reacción de ligación para transformar cepas de *Escherichia coli* de la cepa DH5α. Se sembraron las bacterias transformadas en placas de LB-agar con kanamicina (50 µg/ml). 4 colonias crecidas en medio sólido fueron transferidas y crecidas en medio líquido, en concreto 4 ml de LB con kanamicina (50 µg/ml) durante 1 h a 37°C en agitación. Una vez crecidas las colonias se purificaron los plásmidos mediante el kit “GeneJet Plasmid miniprep kit” (ThermoFisher Scientific) según las instrucciones del fabricante.

Para confirmar la correcta construcción de los plásmidos se llevó a cabo una reacción de digestión con la enzima *EcoRV* o *HindIII*, dependiendo de la construcción. En concreto *35S:amiR-NbSu-2-3'U*, *35S:amiR-NbSu-2-3'C* y *35S:amiR-NbSu-2-3'G* se digirieron con *EcoRV* y *35S:syn-tasiR-GUS* con *HindIII*. Se incubó 1 h a 37°C una solución de 20 µl formada por 0,5 µl de la enzima *EcoRV* o *HindIII* (10 U/µl, ThermoFisher Scientific), 2 µl de tampón Red x10 (ThermoFisher Scientific) y 0,5-1 µg de DNA. Una electroforesis en gel de agarosa al 1% (75 V y 75 min) nos permitió identificar colonias probablemente positivas. Estas colonias se mandaron a secuenciar con el oligonucleótido AC-285.

Extracción de clorofila

A partir de la hoja agroinfiltrada 7 días post-agroinfiltración, se obtuvieron 2 círculos de cada hoja al presionar con la tapa de un tubo Eppendorf de 1,5 ml, 4 en total por planta, y se introdujeron en tubos de 13 ml que contenían 5 ml de acetona al 80%. Los tubos se pusieron en un recipiente que se cubrió con papel de aluminio para evitar la incidencia de luz y la degradación de la clorofila. Se puso en agitación moderada durante 16-24 h. Al día siguiente se preparó una placa de 96 pocillos en la que se añadieron 100 µl de muestra y 100 µl de acetona al 80%. Cada muestra se añadió en dos pocillos y se midió la absorbancia de cada pocillo a 647 nm y 663 nm por duplicado mediante un lector de micropocillos Multiskan GO (ThermoFisher Scientific) y el software SkanIt v.3.2 (ThermoFisher Scientific).

Extracción de RNA

Las hojas congeladas a -80°C se pusieron en un mortero con 30-50 ml de nitrógeno líquido. Con la mano del mortero se molieron ligeramente las hojas. Una vez evaporado el nitrógeno líquido se molieron más vigorosamente unos 30 seg, momento en que se añadieron 4 ml de trizol (1M tiocianato de amonio, 1M tiocianato de guanidinio, 0,1M NaAc (pH 5), 5% glicerol,

38% fenol saturado de H₂O), y se siguió moliendo. Una vez se obtiene consistencia líquida se transfirió a un tubo de 15 ml, y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min a 4°C de temperatura. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, y se añadieron 2,4 ml de cloroformo, agitando manualmente unos 20 seg. Tras 4 min de incubación a temperatura ambiente se centrifugó en las mismas condiciones que el caso anterior. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, donde se añadieron 4 ml de isopropanol. Se invirtió el tubo diversas veces y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C de temperatura. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75%. Se dejaron los tubos secar durante 10 min para eliminar el etanol residual. Por último, se resuspendió el pellet en H₂O, añadiendo entre 50 y 150 µl, y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml.

Northern blot de pequeños RNA

Se prepararon alícuotas de 20 µg de RNA en un volumen de 20 µl. Posteriormente se añadió tampón de carga en una proporción 1:1, en este caso, 20 µl. A partir de estas muestras de RNA se realizó un Northern blot en un gel de acrilamida formado por 20,16 g de urea, 27,2 ml de acrilamida al 30%, 2,4 ml de Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X y 3,2 ml de H₂O. Esta mezcla se preparó en tubos de 50 ml y se puso en un baño a 65°C durante 10 min. Una vez disuelto se puso 20 min en hielo. Se añadieron 40 µl de TEMED y 250 µl de PSA y se vertió la mezcla entre los dos cristales para su polimerización, que tarda unos 30 min. Antes de cargar las muestras se desnaturalizaron calentándolas 2 min a 95°C, seguidos de 2 min en hielo. El tampón de electroforesis usado fue TBE 0,5X. Al tratarse de un Northern blot de sRNAs se cargaron cada una de las réplicas en el mismo gel con 45 min de diferencia y a 180 V. Una vez cargada la tercera réplica se corrió durante 180 min más. Al consumirse el tiempo se comprueba la presencia de las bandas con un transiluminador. Al ser el resultado satisfactorio se cortó el gel en dos, separando el RNA de alto peso molecular (parte superior) de los sRNAs (parte inferior).

Transferencia del RNA a una membrana de nitrocelulosa

Se utilizó un aparato de electrotransferencia en semi-seco (Clever Scientific). El montaje consistió en empapar todos los elementos (papel Whatman, membrana y gel) en TBE 0.5X y apilarlos siguiendo un orden específico: tres papeles Whatman, gel, membrana y tres papeles Whatman. El RNA migra hacia el polo positivo, por lo que hay que poner la membrana y el gel de tal manera que se transfieran los RNAs del gel a la membrana. El proceso de transferencia se realizó a 250 mA por 40 min. Por último, se fijó el RNA a la membrana aplicando radiación ultravioleta con el aparato CL-1000 ultraviolet crosslinker (Clever Scientific).

Preparación de sondas marcadas con radioactividad

La sonda se obtiene marcando radiactivamente el extremo de un oligonucleótido de DNA complementario al sRNA que se quiere detectar mediante una reacción en la que se mezclan 1 µl del oligonucleótido (10 µM), 1 µl de tampón polinucleótido quinasa 10X (ThermoFisher Scientific), 4 µl de [³²P] γ-ATP y 3 µl de H₂O. Se añaden 40 µl de H₂O y se trasvasa la muestra a una columna Micro-Bio Spin P-6 (Biorad), de manera que se pueda purificar la muestra mediante una centrifuga oscilante. Con el tampón quitado, se deja la muestra reposar durante 30 min-1 h a temperatura ambiente, para a continuación centrifugar 2 min a 1000 rcf para eliminar el exceso de líquido. Se cambia la columna a un nuevo tubo y se centrifuga 4 min a 1000 rcf para recoger el eluido, que contiene el oligonucleótido marcado.

Detección de sRNAs mediante sondas

La membrana que se quiere hibridar se coloca en el interior de un tubo de hibridación de manera que el RNA queda en la parte superior, y se prehibrida en 5 ml de PerfectHybTMPlus buffer (SIGMA) un mínimo de 5 min a una temperatura de 40°C en rotación. Se añade 25 µl de la sonda a la solución de prehibridación y se incuba a 40°C durante 16 h. A continuación, se lava la membrana 3 veces con una solución de 2X SSC y 0.2% SDS durante 20 min en rotación a 55°C. Los dos últimos lavados son con una solución de 1X SSC y 0.1% SDS, el primero son 20 min y el segundo 30 min, los dos en rotación a 55°C. Se enjuaga la membrana en 3X SSC y se deja secar brevemente, para después envolverla con papel de plástico. Por último, se hace una autoradiografía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis comparativo del silenciamiento local y sistémico del gen *SULPHUR* de *Nicotiana benthamiana* inducido por amiRNA-NbSu-2 o por un syn-tasiRNA de secuencia idéntica

En primer lugar, nos preguntamos si el SS inducido por el amiRNA amiR-NbSu-2 podría obtenerse también al expresar un syn-tasiRNA de secuencia idéntica a este amiRNA. De esta manera podríamos conocer si el tipo de art-sRNA es un factor determinante en la aparición de SS o si lo es la secuencia concreta de 21 nucleótidos independientemente de su origen.

Para poder contestar la pregunta anterior construimos el plásmido *35S:syn-tasiR-GUS* que expresa el syn-tasiRNA control syn-tasiR-GUS que no debe inducir ningún tipo de silenciamiento del gen *SULPHUR*. Dicho plásmido se construyó siguiendo el protocolo detallado en el apartado de materiales y métodos. Una vez realizada la digestión con la enzima *HindIII* se corrió un gel, mostrando los 4 carriles el patrón de bandas correspondiente a un clon

posiblemente positivo (Figura S1). Se confirmó la secuencia mediante secuenciación Sanger. Los otros plásmidos utilizados en el experimento fueron los plásmidos *35S:amiR-GUS*, *35S:amiR-NbSu-2* y *35S:syn-tasiR-NbSu-2* que expresan un amiRNA control frente a GUS (amiR-GUS), amiR-NbSu-2 y un syn-tasiRNA (syn-tasiR-Su-2) con secuencia idéntica a amiR-NbSu-2, respectivamente (Figura 3a). Como se ha explicado con anterioridad, para activar la síntesis de los tasiRNAs es necesario el corte del transcrito *TAS* por parte de un complejo miRNA-AGO. En concreto, la síntesis de syn-tasiRNAs a partir de transcritos *TAS1c* requiere el miRNA miR173 (Montgomery *et al.*, 2008), por lo que se co-expresó la construcción *35S:MIR173* junto con cada construcción syn-tasiRNA.

Se llevó a cabo un estudio de expresión transitoria en *N. benthamiana* en el cual se expresó de manera independiente y en 9 plantas los plásmidos *35S:amiR-NbSu-2* y *35S:syn-tasiR-NbSu-2*, al igual que *35S:amiR-GUS* y *35S:syn-tasiR-GUS* como controles respectivos. Tres de las plantas fueron usadas para recolectar muestra de hoja infiltrada a 2 días post agroinfiltración. A día 7 post agroinfiltración las 6 plantas agroinfiltradas restantes para *35S:amiR-NbSu-2* y *35S:syn-tasiR-NbSu-2* mostraron amarilleamiento en las zonas agroinfiltradas, mientras que ninguna de las hojas infiltradas con las construcciones control mostró amarilleamiento (Figura 3b). En concreto, las hojas que expresaban amiR-NbSu-2 mostraron mayor amarilleamiento que las hojas que expresaban syn-tasiR-NbSu-2 (Figura 3b).

Para confirmar que el amarilleamiento observado en hojas es consecuencia de la pérdida de clorofila debido al silenciamiento del gen *SULPHUR*, se analizó el contenido en clorofila *a* en tejidos agroinfiltrados. Para ello se llevó a cabo un protocolo de extracción de clorofila de muestras congeladas a 7 días post-agroinfiltración. Con los resultados espectrofotométricos a 647 nm y 663 nm se calculó la cantidad de clorofila *a* media para cada condición. Los resultados confirman la disminución de la cantidad de clorofila *a* en un 34% en hojas agroinfiltradas con *35S:amiR-NbSu-2* y de un 23% en hojas agroinfiltradas con *35S:syn-tasiR-NbSu-2* respecto al control (Figura 3c).

A continuación, quisimos comprobar los niveles de acumulación de amiR-NbSu-2 y syn-tasiR-NbSu-2 a partir de las hojas agroinfiltradas recolectadas 2 días post-agroinfiltración. Se llevó a cabo la extracción de RNA total de dichas hojas, y posteriormente se corrió un gel desnaturizante (Figura 4a) y se transfirieron los RNAs a una membrana para su posterior análisis por Northern blot. El siguiente paso hubiera sido la hibridación con sondas radioactivas de la membrana transferida con los RNAs, para conocer los niveles de acumulación de amiR-NbSu-2 y syn-tasiR-NbSu-2. En los dos casos, se esperaría la acumulación en altos niveles de una banda única de 21 nucleótidos (Figura 4b). Dado que el grado de acumulación de un art-

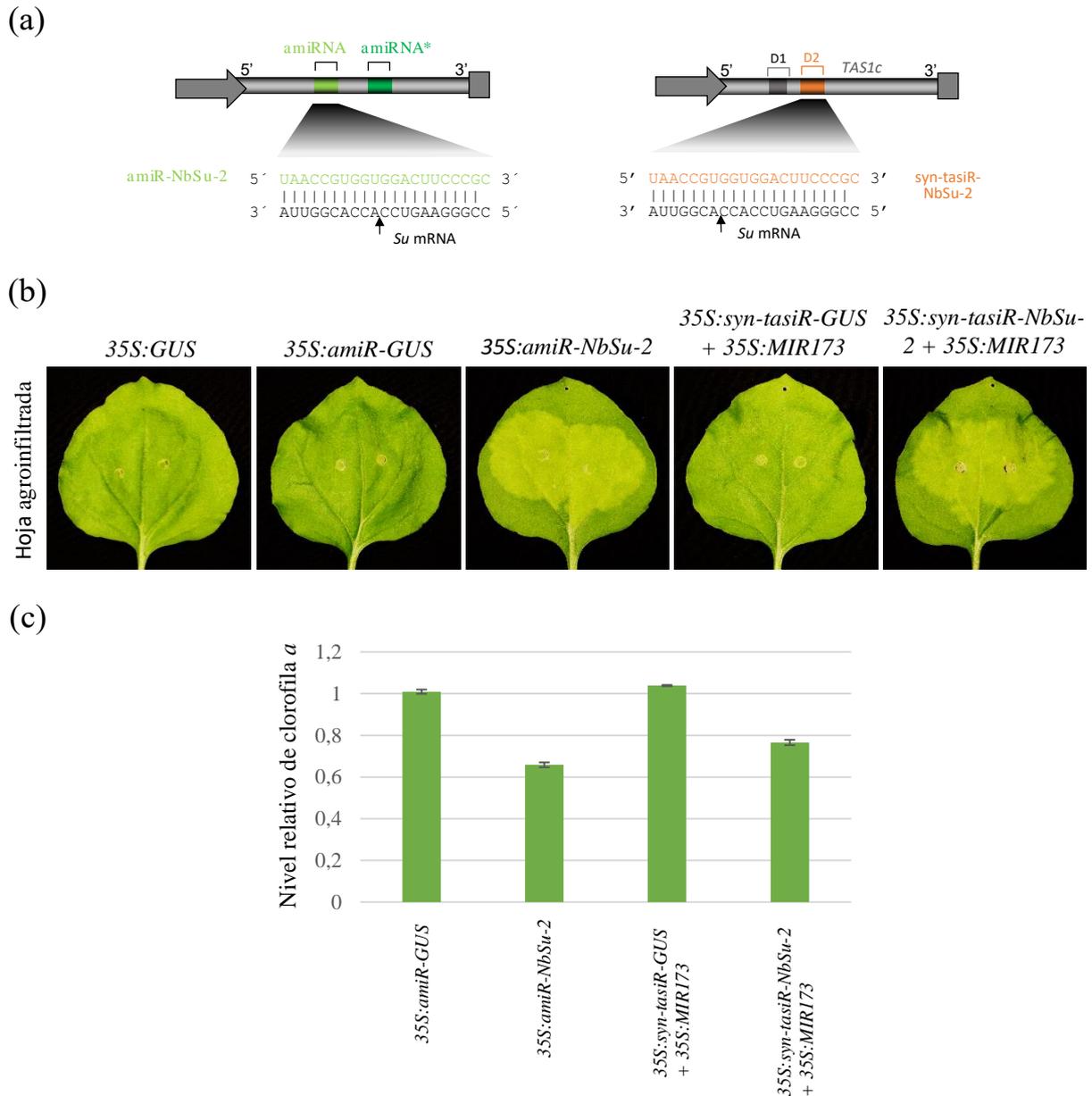


Figura 3. Análisis del silenciamiento local y sistémico del gen *SULPHUR* en *N. benthamiana* inducido por amiRNAs o syn-tasiRNAs. (a) Diagrama de las construcciones 35S:*amiR-NbSu-2* y 35S:*syn-tasiR-NbSu-2* que expresan un amiRNA y un syn-tasiRNA contra el gen *SULPHUR* de *N. benthamiana* respectivamente. (b) Fotografías de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas tomadas a 7 días post-agroinfiltración. Las hojas agroinfiltradas con 35S:*amiR-NbSu-2* y 35S:*syn-tasiR-NbSu-2* muestran amarilleamiento en la zona agroinfiltrada, consecuencia del silenciamiento del gen *SULPHUR*. (c) Gráfico que representa la acumulación relativa de clorofila en hojas agroinfiltradas a día 7 post agroinfiltración. Los resultados están normalizados respecto a la cantidad de clorofila presente en las hojas de la planta control (35S:*GUS*). El valor representado se basa en la media de 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas.

sRNA correlaciona positivamente con su nivel de silenciamiento inducido (Carbonell, 2017), creemos que habría una mayor acumulación del amiR-NbSu-2 que del syn-tasiR-NbSu-2 (Figura 4b) que podría explicar el mayor amarilleamiento y menor nivel de clorofila *a* en las muestras con amiR-NbSu-2 (Figura 3b y 3c).

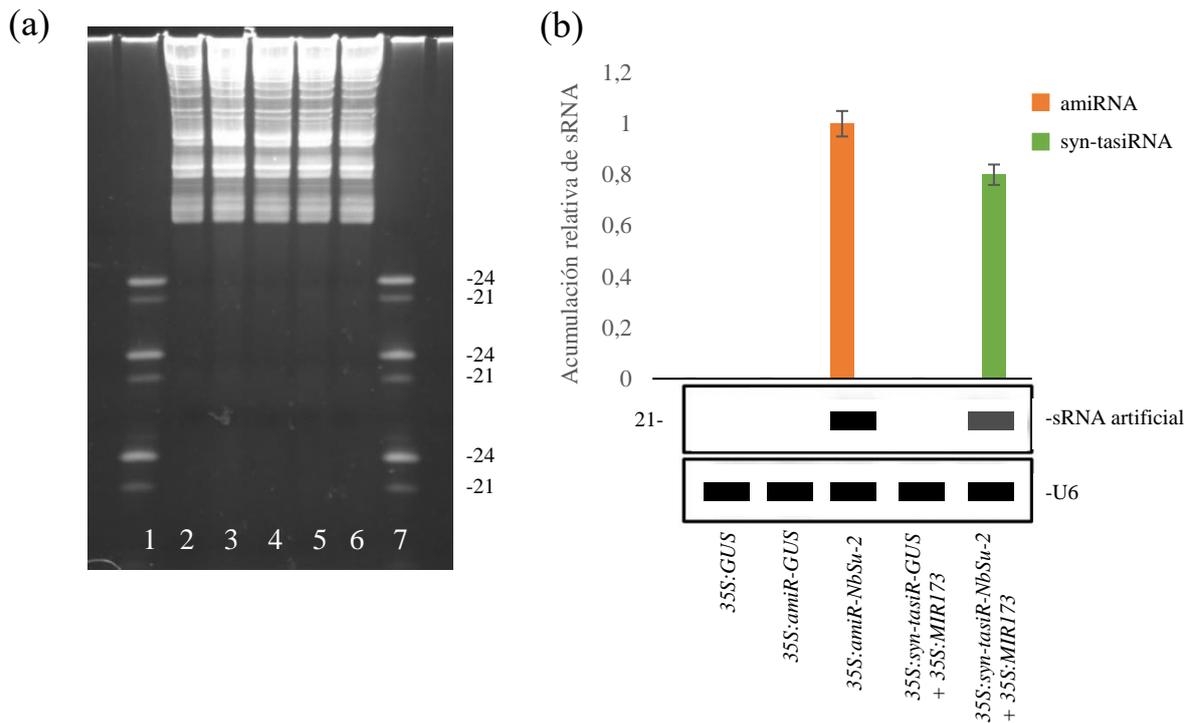


Figura 4. (a) Gel desnaturalizante de acrilamida de muestras de RNA obtenidas de hojas agroinfiltradas recolectadas 2 días post-agroinfiltración. 1 y 7, marcador GFP; 2, *35S:GUS*; 3, *35S:amiR-GUS*; 4, *35S:amiR-NbSu-2*; 5, *35S:syn-tasiR-GUS + 35S:MIR173*; 6, *35S:syn-tasiR-NbSu-2 + 35S:MIR173*. (b) Imagen simulada de la detección por Northern blot de *amiR-NbSu-2* y *syn-tasiR-NbSu-2* a partir de muestras de RNA de hojas agroinfiltradas a día 2 post-agroinfiltración con *35S:GUS*, *35S:amiR-GUS*, *35S:amiR-NbSu-2*, *35S:syn-tasiR-GUS + 35S:MIR173* y *35S:syn-tasiR-NbSu-2 + 35S:MIR173*.

A día 14 post-agroinfiltración las 6 plantas agroinfiltradas con *35S:amiR-NbSu-2* y *35S:syn-tasiR-NbSu-2* mostraban amarilleamiento de la zona agroinfiltrada así como SS, caracterizado por el amarilleamiento de las regiones adyacentes a las nervaduras en hojas más jóvenes. A destacar que este amarilleamiento sistémico fue más notable en el caso de plantas que expresaban el *amiRNA* que en las plantas que expresaban el *syn-tasiRNA* (Figura 5). Creemos que esto se puede deber a la menor acumulación del *syn-tasiRNA*, que induciría un SS menor. En definitiva, estos resultados indican la capacidad del *syn-tasiRNA* de inducir también SS. Aun así, el *amiRNA* induce un mayor grado de SS muy probablemente debido a su mayor acumulación. La causa de la menor acumulación del *syn-tasiRNA* podría estar relacionada con la complejidad de su ruta de biosíntesis en donde uno o más factores podrían limitar la acumulación, tal y como se ha propuesto anteriormente (Montgomery *et al.*, 2008; Carbonell *et al.*, 2014).

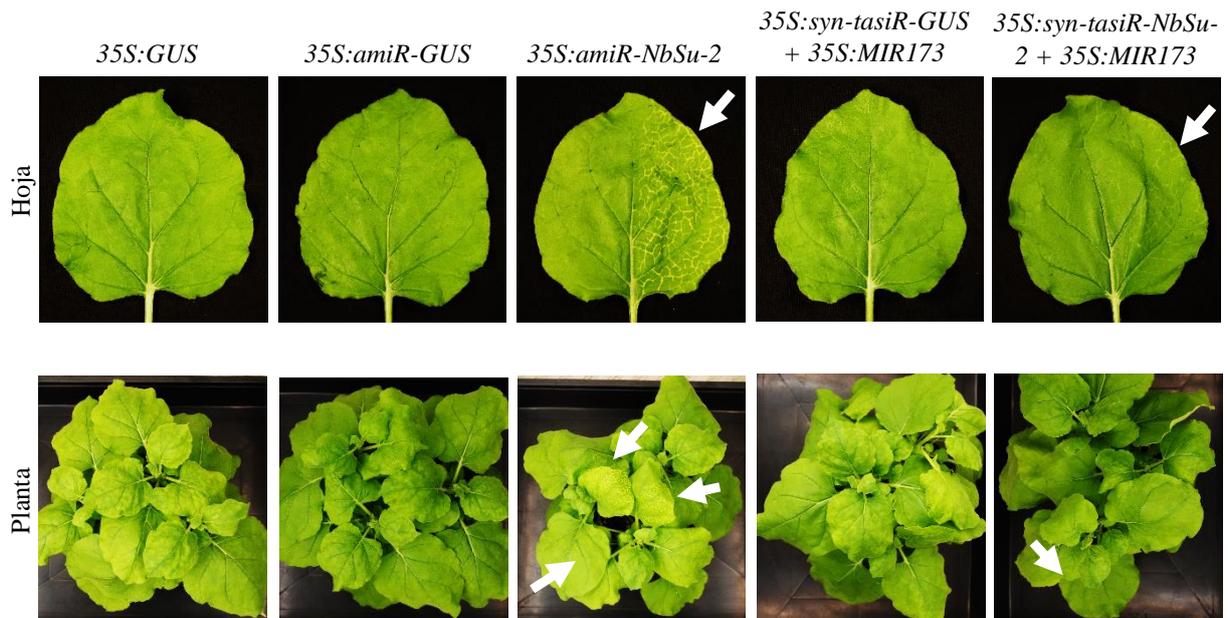


Figura 5. Fotografías de hojas y plantas de *Nicotiana benthamiana* a 14 días post-agroinfiltración. Las hojas para *35S:amiR-NbSu-2* y *35S:syn-tasiR-NbSu-2* muestran silenciamiento sistémico, caracterizada por regiones con amarilleamiento en hojas más jóvenes que las hojas agroinfiltradas, indicadas por flechas blancas.

Análisis comparativo del silenciamiento local y sistémico del gen *SULPHUR* de *Nicotiana benthamiana* inducido por varios amiRNAs de 21 o 22 nucleótidos

La inducción de la señal de SS podría estar relacionada con la producción de siRNAs secundarios a partir de los transcritos del gen *SULPHUR*. Como se sabe que miRNAs de 22 nucleótidos inducen la producción de siRNAs secundarios a partir de sus RNAs diana (Chen *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2010), decidimos explorar si una versión de 22 nucleótidos del amiR-NbSu-2 podría inducir un mayor SS. Por otro lado, pensamos que quizás una versión de 22 nucleótidos de cada uno de los otros dos amiRNAs (amiR-NbSu-1 y amiR-NbSu-3, ambos de 21 nucleótidos) frente a *SULPHUR* que ensayamos en experimentos previos podría inducir SS, cosa que no habíamos observado con las versiones de 21 nucleótidos de ambos amiRNAs.

El experimento consistió en agroinfiltrar de manera independiente en plantas de *N. benthamiana* los plásmidos *35S:amiR-NbSu-1*, *35S:amiR-NbSu-1-22*, *35S:amiR-NbSu-2*, *35S:amiR-NbSu-2-22*, *35S:amiR-NbSu-3*, y *35S:amiR-NbSu-3-22* tal y como se ha descrito anteriormente. De nuevo, se analizó visualmente la aparición de amarilleamiento en tejidos infiltrados y en hojas jóvenes. Únicamente se observó SS en plantas agroinfiltradas con *35S:amiR-NbSu-2* (datos no mostrados), es decir ninguna de las versiones de 22 nucleótidos indujo SS, ni siquiera la correspondiente a amiR-NbSu-2. Es posible que no hayamos logrado producir correctamente *in vivo* las versiones de 22 nucleótidos. Para confirmar esto, se realizó un análisis por Northern blot para detectar los distintos amiRNAs (Figura 6). Si el análisis por Northern blot confirmase la presencia de versiones de 22 nucleótidos, entonces habría que

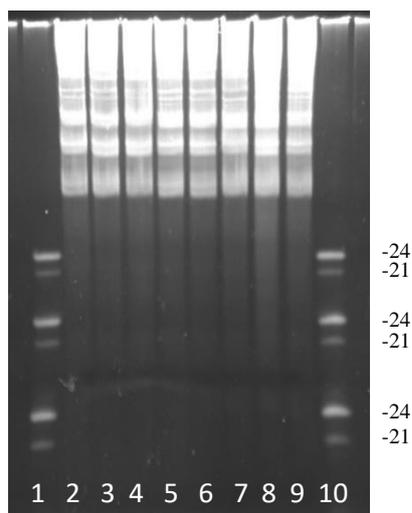


Figura 6. Gel desnaturalizante de acrilamida de muestras de RNA obtenidas de hojas agroinfiltradas recolectadas 2 días post-agroinfiltración. 1 y 10, marcador GFP; 2, *35S::GUS*; 3, *35S::amiR-GUS*; 4, *35S::amiR-NbSu-1*; 5, *35S::amiR-NbSu-1-22*; 6, *35S::amiR-NbSu-2*; 7, *35S::amiR-NbSu-2-22*; 8, *35S::amiR-NbSu-3*; 9, *35S::amiR-NbSu-3-22*.

plantarse la posibilidad de que la inducción de SS no correspondería a los sRNAs secundarios o que hay más factores implicados que únicamente con la versión de 22 nucleótidos no se hubieran podido reproducir.

Efecto del nucleótido del extremo 3' del amiR-NbSu-2 en el silenciamiento local y sistémico del gen *SULPHUR* de *Nicotiana benthamiana*

La ausencia de SS observada en plantas que expresan amiR-NbSu-2-22 parece indicar que la versión de 21 nucleótidos amiR-NbSu-2 tiene alguna característica única que promueve la aparición de SS. En este contexto, quisimos comprobar si el extremo 3' de amiR-NbSu-2 es necesario para inducir SS. En amiR-NbSu-2, el nucleótido en el extremo 3' es una adenina que aparea con un uracilo presente en el mRNA de *SULPHUR* (Figura S3).

Se generaron los plásmidos *35S::amiR-NbSu-2-3'C*, *35S::amiR-NbSu-2-3'G* y *35S::amiR-NbSu-2-3'U* para expresar variantes de amiR-NbSu-2 con una citosina, guanidina y uracilo, respectivamente, en el extremo 3'. Así averiguaríamos si el apareamiento de la base en posición 3' es importante, ya que en el caso de *35S::amiR-NbSu-2-3'U* sí se producirá apareamiento (Figura S3). Se siguió el protocolo indicado en el apartado de materiales y métodos. Para comprobar la correcta construcción de los plásmidos se realizó una digestión con *EcoRV*, y una posterior electroforesis (Figura S2). Todos los carriles presentaban un patrón de bandas correspondiente a clones posiblemente positivos, que con la posterior secuenciación Sanger se confirmó.

Se llevaría a cabo un experimento de expresión transitoria en *N. benthamiana* agroinfiltrando de forma independiente los plásmidos *35S::amiR-NbSu-2*, *35S::amiR-NbSu-2-3'C*, *35S::amiR-*

NbSu-2-3'G y *35S:amiR-NbSu-2-3'U* de manera similar a los experimentos descritos anteriormente. Se analizará el grado de amarilleamiento tanto local como sistémico en plantas que expresan las distintas variantes de secuencia de amiR-NbSu-2. Si todas las variantes de amiR-NbSu-2 indujeran el mismo grado de silenciamiento local y sistémico esto indicaría que el nucleótido 3' del amiRNA no juega ningún papel en estos procesos. Sin embargo, si las tres variantes de secuencia del amiRNA no indujeran SS, esto significaría que la adenina en posición 3' de amiR-NbSu-2 juega un papel determinante en la inducción de SS.

Análisis del silenciamiento del gen *SULPHUR* por amiR-NbSu-2 en mutantes *rdr6* y *dcl4* de *Nicotiana benthamiana*

Por último, pretendemos utilizar un abordaje genético para comprobar si la producción de siRNAs secundarios es necesaria para la aparición de SS. Como se sabe que las enzimas RDR6 y DCL4 están involucradas en la generación de los sRNAs secundarios (Peragine *et al.*, 2004; Gascioli *et al.*, 2005), aprovecharemos la disponibilidad de mutantes *rdr6* (Schwach *et al.*, 2005) y *dcl4* (Dadami *et al.*, 2013b; Katsarou *et al.*, 2019) en *N. benthamiana* para expresar en dichos mutantes el amiR-NbSu-2 y comprobar si se produce SS observando la presencia de amarilleamiento en hojas jóvenes. Aunque el mecanismo no está totalmente dilucidado, se cree que serían estas dos enzimas junto con el miRNA de 22 nucleótidos los responsables de generar sRNAs secundarios (Chen *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2010).

Si no apareciese SS en los mutantes *rdr6* y *dcl4* agroinfiltrados con *35S:amiR-NbSu-2* esto indicaría que tanto RDR6 como DCL4 son necesarias para su aparición, y sugeriría que la aparición de SS sería dependiente de la presencia de siRNAs secundarios derivados de la acción de RDR6 o DCL4. Por el contrario, en el supuesto de que se observe presencia de SS en los dos tipos de mutantes, esto podría indicar tanto que las enzimas no son las responsables de la síntesis de sRNAs como que los siRNAs secundarios derivados de RDR6 o DCL4 no son los responsables de este fenómeno. En este último caso, podríamos plantearnos analizar la aparición de SS en plantas mutantes para otras enzimas implicadas en producción de siRNAs secundarios como DCL3 o RDR2 (Vazquez y Hohn 2013).

BIBLIOGRAFIA

- Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 473–503.
- Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M., & Carroll, B. J. (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in

- Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37), 14741–14746.
- Carbonell, A. (2017). Artificial small RNA-based strategies for effective and specific gene silencing in plants. In: Dalmay, T. (ed). *Plant Gene Silencing: Mechanisms and Applications*. CABI Publishing, pp. 110–127.
- Carbonell, A., & Daròs, J. A. (2017). Artificial microRNAs and synthetic trans-acting small interfering RNAs interfere with viroid infection. *Molecular Plant Pathology*, 18(5), 746–753.
- Carbonell, A., Takeda, A., Fahlgren, N., Johnson, S. C., Cuperus, J. T., & Carrington, J. C. (2014). New generation of artificial MicroRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA vectors for efficient gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(1), 15–29.
- Carlsbecker, A., Lee, J. Y., Roberts, C. J., et al. (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 465(7296), 316–321.
- Chen, H. M., Chen, L. T., Patel, K., Li, Y. H., Baulcombe, D. C., & Wu, S. H. (2010). 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15269–15274.
- Chitwood, D. H., Nogueira, F. T. S., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., & Timmermans, M. C. P. (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes and Development*, 23(5), 549–554.
- Cuperus, J. T., Carbonell, A., Fahlgren, N., et al. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(8), 997–1003.
- Dadami, E., Moser, M., Zwiebel, M., Krczal, G., Wassenegger, M., & Dalakouras, A. (2013a). An endogene-resembling transgene delays the onset of silencing and limits siRNA accumulation. *FEBS Letters*, 587(6), 706–710.
- Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I., & Kalantidis, K. (2013b). DICER-LIKE 4 but not DICER-LIKE 2 may have a positive effect on potato spindle tuber viroid accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant*, 6(1), 232–234.
- de Felippes, F. F. (2019). Gene Regulation Mediated by microRNA-Triggered Secondary Small RNAs in Plants. *Plants*, 8(5), 112.
- Dunoyer, P., Himber, C., & Voinnet, O. (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics*, 37(12), 1356–1360.

- Fahim, M., Millar, A. A., Wood, C. C., & Larkin, P. J. (2012). Resistance to Wheat streak mosaic virus generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, *10*(2), 150–163.
- Fahlgren, N., Hill, S. T., Carrington, J. C., & Carbonell, A. (2016). P-SAMS: a web site for plant artificial microRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA design. *Bioinformatics*, *32*(1), 157–158.
- Gascioli, V., Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Vaucheret, H. (2005). Partially redundant functions of arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-Acting siRNAs. *Current Biology*, *15*(16), 1494–1500.
- Guo, Q., Liu, Q., A. Smith, N., Liang, G., & Wang, M.-B. (2016). RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Current Genomics*, *17*(6), 476–489.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., & Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *The EMBO Journal*, *22*(17), 4523–4533.
- Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., & Helm, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell*, *100*(1), 13–26.
- Katsarou, K., Mitta, E., Bardani, E., Oulas, A., Dadami, E., & Kalantidis, K. (2019). DCL-suppressed *Nicotiana benthamiana* plants: valuable tools in research and biotechnology. *Molecular Plant Pathology*, *20*(3), 432–446.
- Knauer, S., Holt, A. L., Rubio-Somoza, I., et al. (2013). A Protodermal miR394 Signal Defines a Region of Stem Cell Competence in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Developmental Cell*, *24*(2), 125–132.
- Liang, G., He, H., Li, Y., & Yu, D. (2012). A new strategy for construction of artificial miRNA vectors in Arabidopsis. *Planta*, *235*(6), 1421–1429.
- López-Dolz, L., Spada, M., Daròs, J. A., & Carbonell, A. (2020). Fine-tune control of targeted RNAi efficacy by plant artificial small RNAs. *Nucleic Acids Research*. *48*(11), 6234–6250.
- Melnyk, C. W., Molnar, A., Bassett, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, *21*(19), 1678–1683.
- Mermigka, G., Verret, F., & Kalantidis, K. (2016). RNA silencing movement in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *58*(4), 328–342.
- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., et al. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting

- siRNA Formation. *Cell*, 133(1), 128–141.
- Ossowski, S., Schwab, R., & Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant Journal*, 53(4), 674–690.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M., & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal*, 16(15), 4738–4745.
- Palauqui, J. C., & Balzergue, S. (1999). Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Current Biology*, 9(2), 59–66.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., & Poethig, R. S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, 18(19), 2368–2379.
- Schwab, R., Maizel, A., Ruiz-Ferrer, V., et al. (2009). Endogenous TasiRNAs mediate non-cell autonomous effects on gene regulation in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 4(6), e5980.
- Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., & Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology*, 138(4), 1842–1852.
- Vaistij, F. E., Jones, L., & Baulcombe, D. C. (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, 14(4), 857–867.
- Vazquez, F. & Hohn, T. (2013). Biogenesis and biological activity of secondary siRNAs in plants. *Scientifica*, 1-12.
- Voinnet, O. (2005). Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters*, 579(26), 5858–5871.
- Voinnet, O., & Baulcombe, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389(6651), 553.
- Yoo, B.-C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., et al. (2004). A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *The Plant Cell*, 16(8), 1979–2000.
- Yoshikawa, M. (2013). Biogenesis of trans-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants. *Genes and Genetic Systems. Genes & genetic systems*, 88(2), 77–84.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., & Poethig, R. S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes and Development*, 19(18), 2164–2175.
- Zhai, J., Jeong, D. H., de Paoli, E., et al. (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes and Development*, 25(23), 2540–2553.

Tabla S1. Nombre, secuencia y uso de oligonucleótidos de ADN utilizados

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
AC-285	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Secuenciación de <i>35S:amiR-NbSu-2-3'U</i> , <i>35S:amiR-NbSu-2-3'C</i> , <i>35S:amiR-NbSu-2-3'G</i> y <i>35S:syn-tasiR-GUS</i>
AC-333	TTTATCTTGTAACGCGCTTTCCCAG	Generación de <i>35S:syn-tasiR-GUS</i>
AC-334	CCGACTGGGAAAGCGCGTTACAAGA	
AC-339	TGTATGTATGACTCCCGGAATTCCTA TGATGATCACATTCGTTATCTATTTTT TAGGAATTCCGTGAGTCATACA	Generación de <i>35S:amiR-NbSu-2-3'U</i>
AC-340	AATGTGTATGACTCACGGAATTCCTA AAAAATAGATAACGAATGTGATCATC ATAGGAATTCCGGGAGTCATACA	Generación de <i>35S:amiR-NbSu-2-3'C</i>
AC-341	TGTATGTATGACTCCCGGAATTCCCA TGATGATCACATTCGTTATCTATTTTT TGGGAATTCCGTGAGTCATACA	
AC-342	AATGTGTATGACTCACGGAATTCCCA AAAAATAGATAACGAATGTGATCATC ATGGGAATTCCGGGAGTCATACA	Generación de <i>35S:amiR-NbSu-2-3'G</i>
AC-343	TGTATGTATGACTCCCGGAATTCCGA TGATGATCACATTCGTTATCTATTTTT TCGGAATTCCGTGAGTCATACA	
AC-344	AATGTGTATGACTCACGGAATTCCGA AAAAATAGATAACGAATGTGATCATC ATCGGAATTCCGGGAGTCATACA	

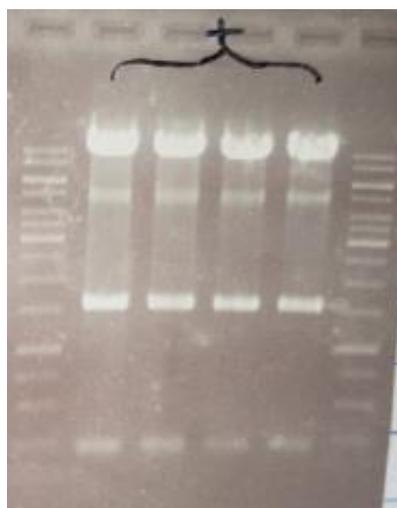


Figura S1. Análisis de construcciones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Plásmidos digeridos con *HindIII* provenientes de colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido *35S:syn-tasiR-GUS*. El patrón observado se corresponde con el esperado para clones posiblemente positivos

