

Silenciamiento de genes virales: el contraataque de las plantas frente a infecciones de virus fitopatógenos*

Juan Jovel¹
Pilar Ramírez²

RESUMEN. El silenciamiento de genes es un sofisticado sistema de defensa mediante el cual plantas transgénicas y no transgénicas disparan, en respuesta a infecciones localizadas de virus fitopatógenos, un mecanismo de degradación de ARN viral. Durante el proceso de su replicación, los virus ARN generan moléculas intermediarias de ARN de doble cadena (ARNdc). Las células de las plantas normalmente no poseen ARNdc. Así, estas moléculas son detectadas por el mecanismo de vigilancia de la planta y posteriormente degradadas a pequeños fragmentos de ARNdc que finalmente son desnaturalizados y dirigen la degradación específica de transcritos homólogos. Los virus de ADN, como los pararetrovirus y geminivirus, también pueden ser silenciados mediante algún mecanismo análogo. Dicha respuesta de silenciamiento es adaptativa y puede ser diseminada sistémicamente dentro de la planta hospedante, protegiéndola de ataques subsecuentes del mismo virus o de otros que presenten secuencias de nucleótidos similares. Sin embargo, los virus fitopatógenos se han contrarefendido y evolutivamente han desarrollado diferentes estrategias moleculares para neutralizar la maquinaria de silenciamiento de las plantas hospedantes, planteando así un claro desafío a nuestro entendimiento sobre interacciones planta-patógeno. La investigación activa en este campo se presenta como una oportunidad de diseñar mejores prácticas para el manejo de las enfermedades virales en plantas.

Palabras clave: Virus fitopatógenos, Secuencias homólogas, Silenciamiento de genes.

ABSTRACT. Gene silencing: the counterattack of plants to infections by pathogenic viruses. Gene silencing is a defense system by which transgenic and non-transgenic plants marshal, in response to localized infections of pathogenic viruses, a sophisticated mechanism of viral RNA degradation. During their replication process, RNA viruses generate intermediary molecules of double-stranded RNA (dsRNA). Plant cells do not normally possess RNAdc. So these molecules are detected by the surveillance mechanism of the plant and subsequently degraded to small fragments of dsRNA which are finally denatured and guide the specific degradation of homologous transcripts. DNA viruses, such as pararetrovirus and geminivirus, can also be silenced by an analogous mechanism. Such a silencing response is adaptive and can be systemically spread throughout the host plant, thus protecting it against subsequent attacks by the same virus or others that have similar sequences of nucleotides. However, plant viruses have counter-defended and have evolved different molecular strategies to neutralize the silencing mechanism of host plants, thus establishing a clear challenge to our understanding of plant-pathogen interactions. Research in this field present an opportunity to design improved practices for the management of viral diseases in plants.

Key words: Plant viruses, Homologous sequences, Gene silencing.

Introducción

Los virus fitopatógenos poseen genes asociados a su propia replicación, transporte dentro de la planta y encapsidación. Sin embargo, son dependientes de la maquinaria celular del hospedante para completar su replicación y expresión génica, e intervienen ne-

gativamente en los procesos moleculares de la célula. Por esta razón, hasta el momento los numerosos intentos de curar plantas infectadas con virus mediante el uso de productos químicos han sido infructuosos.

*Algunos nombres de virus y las abreviaturas de todos ellos aparecen escritos en inglés debido a la dificultad de encontrar una traducción satisfactoria. Las siguientes abreviaturas son usadas en el texto y corresponden a los términos en Inglés indicados entre paréntesis: **SG:** Silenciamiento de genes (*gene silencing, GS*); **SGDH:** Silenciamiento de genes dependiente de la homología (*homology-dependent gene silencing, HDGS*); **STG:** Silenciamiento transcripcional de genes (*transcriptional gene silencing, TGS*); **SPTG:** Silenciamiento postranscripcional de genes (*PTGS*); **GFP:** Proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*); **RdRP:** ARN polimerasa dependiente de ARN (*ARN-dependent ARN polymerase*).

¹Biologisches Institut, Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart, Alemania. juan.jovel@po.uni-stuttgart.de

²Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM). Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pramirez@cibcm.ucr.ac.cr

Desde 1929 se sabe que las plantas expuestas a la infección de una raza de virus atenuado están protegidas contra la infección posterior de un virus más severo, pero relacionado genéticamente con el primero (McKinney 1929). Esto se conoce como protección cruzada y se ha usado desde hace décadas, en algunos casos con éxito, aunque el mecanismo de protección subyacente no era totalmente comprendido. En el caso de plantas transgénicas, inicialmente se pensó que la introducción de uno o más transgenes virales, en forma funcional, podría conferir resistencia a plantas contra futuros ataques de virus relacionados (Waterhouse *et al.* 1999). En muchos casos, este enfoque ha sido eficaz (Lomonossoff 1995, Baulcombe 1996). Sin embargo, contrario a las teorías prevalecientes, muchas veces los transgenes no requerían ser traducidos en proteínas virales para conferir resistencia (Lindbo y Dougherty 1992, Angell y Baulcombe 1997) y más bien el mecanismo estaba basado, al menos parcialmente, en la homología del transgen viral y los genes del virus invasor. Este fenómeno ha sido denominado silenciamiento de genes dependiente de la homología (SGDH) y puede ocurrir a dos niveles de la fisiología de células infectadas: bloqueando la transcripción de los transgenes virales o degradando el ARN viral transcrito durante la infección. Los fenómenos descritos se han denominado, respectivamente, silenciamiento transcripcional (STG) y silenciamiento postranscripcional de genes (SPTG).

Actualmente se sabe que el silenciamiento de genes (SG) no es una propiedad restringida a plantas transgénicas. En forma natural las plantas cuentan con mecanismos especializados para silenciar virus cuyo genoma está compuesto de ADN o ARN (Covey *et al.* 1997, Al-Kaff *et al.* 1998); no obstante, éste es un fenómeno que apenas empieza a ser dilucidado gracias a la producción de plantas transgénicas resistentes a virus. Dado que el SGDH actúa aun cuando dicha homología es sólo parcial (Matzke *et al.* 1994), la posibilidad de incorporar genes virales defectuosos (que no codifican para las proteínas virales) se incrementa con el descubrimiento de este mecanismo de defensa, haciendo la producción de plantas transgénicas más segura y mejorando su uso. Recientemente, en experimentos con genes reporteros se ha determinado que secuencias homólogas de apenas 23 nucleótidos, entre el transgen y el gen viral, pueden activar SPTG (Thomas *et al.* 2001).

Esta revisión bibliográfica resume los avances de investigación más relevantes en el área de silenciamiento de genes, haciendo énfasis en el potencial que este mecanismo natural de defensa de las plantas representa para el manejo de enfermedades virales. Además se incluyen algunos conceptos básicos de genética útiles para una mejor comprensión de la información presentada.

Conceptos básicos de genética

En las plantas, el ADN se presenta como una molécula compuesta por dos cadenas de nucleótidos, complementarias entre sí y unidas mediante puentes de hidrógeno, que discurren en direcciones antiparalelas y se enroscan sobre su propio eje, conformando una estructura helicoidal. Por otro lado, el ARN mensajero (ARNm) normalmente es de cadena sencilla, conformación que favorece su transporte desde el núcleo hacia el citoplasma y su posterior traducción en proteínas (Lewin 2000).

Algunos virus poseen ADN de una sola cadena (ADNsc) o de doble cadena (ADNdc) como material genético, y otros tienen ARN de doble cadena (ARNdc); sin embargo, más del 90% poseen ARN de una sola cadena (ARNsc) y se replican con la intervención de una enzima denominada ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRP, por sus siglas en inglés) (Bos 1999, Hull 2002). La replicación de los virus ARN ocurre en el citoplasma y genera una molécula intermediaria de ARNdc, requerimiento que es utilizado por la planta para su propia defensa contra las infecciones virales (Waterhouse *et al.* 2001a). Los virus con ADN, como los geminivirus, se replican y transcriben exclusivamente en el núcleo de células infectadas y exportan al citoplasma ARNsc; otros más, como los pararetrovirus, presentan estrategias de replicación mucho más complicadas (Hull 2002).

Transcripción: síntesis de ARN a partir de ADN

La maquinaria celular transcribe básicamente aquellos fragmentos de ADN que codifican para proteínas, es decir los genes o cistrones. Por lo tanto, existen en el ADN señales codificadas en lenguaje de nucleótidos que indican a la ARN-polimerasa dependiente de ADN (la enzima que lleva a cabo la transcripción) el sitio exacto en que ésta debe acoplarse al ADN para dar inicio a la transcripción de un gen determinado. Un proceso análogo ocurre para virus ARN.

Tal región es denominada *promotor* y presenta complejidad estructural y funcional variable entre organismos y aun entre genes. Por ejemplo, uno de los promotores eucarióticos más poderosos que se ha encontrado pertenece al *Virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) (Benfey *et al.* 1989, 1990). Este promotor se denomina p35S y ha llegado a ser una herramienta primordial para virólogos de plantas, por cuanto puede clonarse junto a genes de interés, conformando moléculas recombinantes o quiméricas que pueden introducirse al genoma de una planta mediante la intervención de *Agrobacterium tumefaciens*. Debido al vigor que este promotor le confiere al gen así clonado, se espera una sobre expresión de dicho gen dentro de las células de la planta. Otro promotor ampliamente utilizado en la producción de plantas transgénicas es el del gen nopalina sintasa de *A. tumefaciens*, denominado Nospro (Nopaline synthase promotor) (Matzke *et al.* 1994).

La afinidad de la ARN-polimerasa por un promotor determinado puede ser influenciada por varios factores. Por ejemplo, la presencia de otras proteínas solapando dicha secuencia promotora interferirá con la unión entre la enzima y el promotor, reduciendo el nivel de la transcripción o impidiendo su inicio (Tamarin 1996). La interferencia en dicha unión parece ser la estrategia favorita de la célula para regular la expresión génica. Por el contrario, algunas proteínas pueden favorecer dicha unión (ARN-polimerasa-promotor) incrementando la actividad transcripcional.

La metilación (adición de un grupo metilo [CH₃] en nucleótidos ya sea en la secuencia promotora o codificante de un gen) cuando ocurre en exceso da como resultado la atenuación o la anulación de la transcripción. Inicialmente se consideró que la incorporación deficiente de grupos metilo en el ADN no tenía consecuencias fenotípicas, hoy se sabe que afecta el desarrollo normal de plantas y la expresión de genes específicos (Finnegan *et al.* 2000). La metilación también protege al ADN de la acción de ADNasas (enzimas que degradan ADN). En eucariontes, la metilación ocurre normalmente a nivel de la citosina (un nucleótido N⁵-metil-citosina surge como producto de la metilación de la citosina en el carbono 5) (Finnegan *et al.* 1998). Para efectos de nuestra discusión posterior sobre silenciamiento de genes, debe tenerse presente que la metilación es un mecanismo de la célula para regular la expresión génica.

Finalmente, la transcripción también necesita una señal de terminación. El conjunto de señales que mar-

can la finalización de la transcripción se denomina "*terminador*" (Tamarin 1996). En ingeniería genética, uno de los *terminadores* más utilizados corresponde al gen de la nopalina sintasa (*Nos terminator*). Una vez finalizada la transcripción en el núcleo, los precursores de ARNm son procesados y exportados al citoplasma, lugar donde serán traducidos en proteínas por los ribosomas.

Conceptos adicionales

Los transposones son segmentos específicos de ADN que tienen la facultad de transportarse de un punto a otro del genoma. Es decir que ellos se escinden de su ubicación original, "saltan" y luego se insertan en otro punto del cromosoma. Este proceso puede alterar la función y la estructura de los genes y acelerar la evolución genética. Sin embargo, ellos también son agentes mutagénicos que tienen la facultad de lacerar el genoma del organismo (Lewin 2000).

La **clonación de ADN** puede definirse como la multiplicación exponencial de un determinado gen o grupo de genes de interés. Aún cuando el proceso se ha revestido de gran complejidad, los mecanismos subyacentes son relativamente simples. Las bacterias poseen segmentos extracromosómicos de ADN, denominados plásmidos, los cuales son estructuras circulares de ADNdc con la propiedad de autoreplicación. Mediante la utilización de endonucleasas de restricción (enzimas que cortan al ADN en puntos específicos) es posible cortar la estructura circular de dicho plásmido, insertar el gen que se desea clonar y finalmente "pegarlo" o religarlo mediante el uso de otra enzima denominada ligasa, produciendo así una molécula híbrida llamada construcción o quimera. Dicha construcción puede ser introducida a células bacterianas, mediante procesos de transformación químicos o físicos que permeabilizan la pared celular. Estas bacterias, al mismo tiempo que replican su ADN y se dividen, amplifican el número de plásmidos conteniendo el gen o genes de interés, lo cual da origen a millones de copias de dicha construcción. *Escherichia coli* ha sido la bacteria comúnmente utilizada para la clonación de genes.

La *producción de plantas transgénicas* generalmente se lleva a cabo mediante la utilización de *A. tumefaciens*. Dicha bacteria posee un plásmido denominado Plásmido *Ti*, el cual es el responsable de la inducción de tumores en diferentes especies de plantas (Zambirsky 1992, Gelvin 2000), y provoca la enfermedad

conocida como "agallas de la corona" (Agrios 1995). Esta enfermedad, de gran importancia agrícola, resulta de la transferencia de un segmento de ADNsc del plásmido *Ti* de la bacteria, denominado *T-DNA*, ("tumor inducing DNA") hacia los cromosomas de la planta hospedante. Los genes contenidos en el segmento transferido dirigen la síntesis de hormonas de la planta, provocando un crecimiento anormal de las células que culmina en la formación de tumores o agallas. Dichos genes bacterianos también inducen la producción de *opinas*, compuestos ricos en carbón y nitrógeno que sólo pueden ser metabolizados por las bacterias. De esa forma, *Agrobacterium* ha evolucionado un sofisticado método de ingeniería genética para modificar las plantas para su propio beneficio.

Tal habilidad de transformación genética ha sido ampliamente explotada por los investigadores para la producción de plantas transgénicas, con propósitos de investigación y agrícolas. El procedimiento normal consiste en insertar el gen o los genes de interés dentro del plásmido *Ti* de *Agrobacterium*, clonarlo, e introducir las bacterias dentro de las plantas, por ejemplo pinchando el tallo de éstas con una aguja y colocando una gotita de suspensión bacteriana que causará la infección. De forma similar al caso de las agallas, *Agrobacterium* integra los transgenes dentro del genoma del hospedante y éstos son expresados por la maquinaria celular de la planta, ahora transgénica. Sin embargo, en este caso, la inducción de tumores es suprimida porque los genes causantes fueron previamente removidos del plásmido *Ti*.

Adicionalmente, el ADN de los plásmidos conteniendo los genes a ser insertados en el genoma de plantas puede ser fusionado a partículas de oro (u otro metal idóneo) e insertado en las células vegetales mediante el "bombardeo" de dichas partículas. Esta técnica normalmente se utiliza para la producción de plantas transgénicas en monocotiledóneas, mediante la regeneración de callos embriogénicos.

Genes reporteros. La fusión de genes de interés a otro gen que codifica una proteína visualmente detectable es una herramienta valiosa para estudios de transformación genética. La proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) de la hidromedusa *Aequorea victoria* (Tsien 1998) produce una fluorescencia que puede ser detectada al microscopio de fluorescencia (Fig. 1A) y que además de correlacionar con la expresión de los genes fusionados (Biggar y Crabtree 2001) facilita el estudio de la fun-

ción de las proteínas virales (Baulcombe *et al.* 1995, Zhang *et al.* 2001). Otro gen reportero ampliamente utilizado en virología es el de la β -glucuronidasa (GUS) (Fig. 1B).

Análisis de transcripción nuclear e hibridación del ARN: discriminando entre STG y SPTG. La primera de estas técnicas ("transcriptional run-on assays") permite conocer si la transcripción de un gen se está llevando a cabo dentro del núcleo. La segunda técnica revela la acumulación de ARNm en el citoplasma. De manera que si un gen es capaz de transcribirse en el núcleo pero el ARNm falla en acumularse en el citoplasma (SPTG), el resultado será positivo en el primer caso y negativo en el segundo. Si el gen está transcripcionalmente silenciado, ambos resultados serán negativos. La combinación de estas dos técnicas ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico de transgenes transcripcional o postranscripcionalmente silenciados (Kooter *et al.* 1999).

Silenciamiento de genes

Perspectiva histórica

El SGDH ha sido descubierto (no creado) como resultado de la introducción de transgenes en diferentes organismos. Actualmente, se sabe que se encuentra ampliamente difundido en diferentes especies de plantas (Cogoni y Macino 1999, Meins Jr. 2000). Fenómenos como la paramutación (Brink 1973, Matzke *et al.* 1996) y la totipotencia (Heslop-Harrison 1967, Tamarin 1996) sugieren la existencia de este mecanismo desde tiempos ancestrales.

A finales de los años 80, un grupo de investigadores liderados por el biólogo molecular Rich Jorgensen, del Instituto de Tecnología de ADN de Plantas, en Oakland, California, trataban de incrementar el color púrpura de las flores de petunia (*Petunia hybrida*, L). Para ello, el gen de la chalcona sintasa (ChsA), responsable de la producción de pigmentos antocianinos en dicha planta, había sido clonado junto al promotor p35S e insertado al genoma de petunia mediante *Agrobacterium*. En teoría, este poderoso promotor debía incrementar la función de dicho gen y dar origen a flores de color más intenso. Sin embargo, en 42% de las plantas transformadas, el resultado fueron flores de color variegado, con zonas púrpuras y albinas (Fig. 1C y D). De alguna forma, el transgen había provocado su propia mutación así como la del gen endógeno de la planta (Napoli *et al.* 1990). Jorgensen denominó a este fenómeno **cosupresión**.

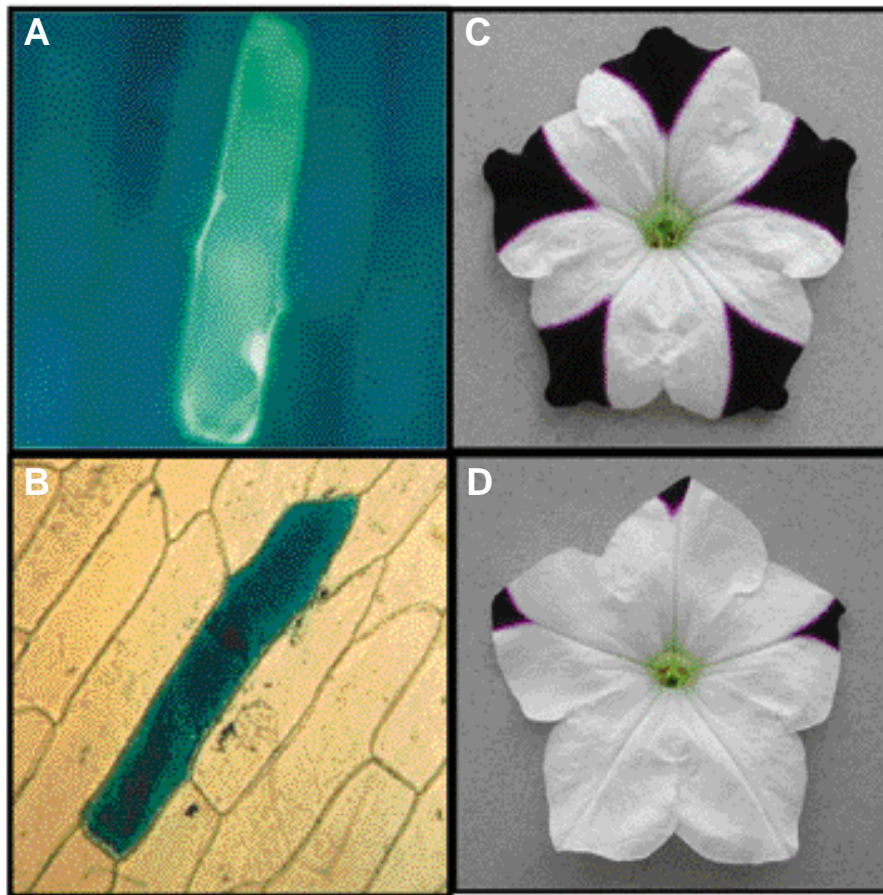


Figura 1. (A) Proteína verde fluorescente (GFP) y (B) Gen de la β -glucuronidasa (GUS), expresados bajo el control del promotor p35S y el terminador Nos, en células de cebolla (*Allium cepa* L.). (C y D) Flores de petunia de plantas transgénicas conteniendo copias únicas del gen de la chalcona sintasa (ChsA); el color púrpura es el natural de las flores y el tejido albino corresponde a regiones de la flor en que dicho gen fue silenciado.

La primera evidencia acerca de la capacidad de virus fitopatógenos para inducir silenciamiento de genes (*virus-induced gene silencing, VIGS*) surgió al observar que plantas transgénicas conteniendo un gen potyviral se recuperaron de la infección del mismo potyvirus y los nuevos brotes permanecieron aparentemente resistentes al mismo virus, pero fueron susceptibles a otros (Lindbo *et al.* 1993).

Algunos años más tarde, en el Centro de Investigación John Innes, en Norwich, Inglaterra, David Baulcombe y su equipo creaban plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) mediante la introducción de genes del *Virus X de la papa* (PVX). La idea era activar, en respuesta a la expresión de los transgenes virales, los mecanismos de defensa de la planta y reducir de esta forma su vulnerabilidad a futuras infecciones del virus. Curiosamente, aquellas plantas que presentaron un mayor nivel de resistencia no habían expresado en proteínas los transgenes virales (los transgenes así como los genes del virus invasor

estaban silenciados) y más bien la homología que los genes virales presentaban con respecto a los transgenes había cosuprimido la expresión de ambos (Angell y Baulcombe 1997). Dougherty *et al.* (1994), en la Universidad de Oregon, Corvallis, habían informado resultados similares para un virus del tabaco (*Tobacco etch virus, TEV*).

Posteriormente, observaciones detalladas revelaron que tanto en el caso de cosupresión como en el de la transformación con genes virales, sólo una proporción de las plantas transgénicas presentaron cosupresión o resistencia a enfermedades virales, y que esas plantas generalmente contenían muchas copias de los transgenes, los cuales se encuentran metilados (Waterhouse *et al.* 2001b).

Por otro lado, la introducción de ARN en antisentido se ha convertido en una estrategia ampliamente utilizada para el estudio de la función génica en plantas (Mol *et al.* 1994) y se presenta como una alternativa promisoriosa para el manejo de enfermedades virales

(Bejarano y Lichtenstein 1992). El principio funcional de esta técnica es muy simple: el ARN en antisentido presenta secuencia complementaria al ARN viral y forma cadenas dobles con este último, impidiendo la síntesis de proteínas o conduciendo a su rápida degradación por parte de la célula; además, también se afecta el transporte del ARNm desde el núcleo hacia el citoplasma. Paralelamente, el ARN puede interactuar con ADN (formando híbridos ADN-ARN) interfiriendo así con la actividad de las polimerasas dentro de la célula (Day *et al.* 1991).

En 1995, tal enfoque estaba siendo estudiado por Guo, en la Universidad de Cornell en Ithaca, Nueva York, para el estudio de la función de genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. En estos experimentos, el ARN en antisentido fue microinyectado dentro de las células del nematodo con el objetivo de silenciar el gen *par-1*, el cual es responsable del crecimiento simétrico del nematodo, y ARN en sentido normal fue inyectado como un control (para evaluar si el solo hecho de la microinyección o bien la introducción de ARN foráneo tenían un efecto sobre *par-1*). Curiosamente, en varios de los experimentos de control, el ARN en sentido normal también había silenciado la expresión de *par-1*. Un par de años más tarde se sugirió que en los experimentos control de Guo, de alguna forma, el ARN en antisentido había contaminado al ARN en sentido normal y formado cadenas dobles (Gura 2000). Esto fue "interpretado" por las células del nematodo como un virus ARN que había iniciado el proceso de replicación y disparó la degradación del supuesto ARNdc viral. Estos resultados sugirieron que el silenciamiento de genes evolucionó como un mecanismo de protección de la célula frente a infecciones virales. Esta variante de silenciamiento fue denominada **interferencia del ARN** (*RNA interference*, *iRNA*) (Fire *et al.* 1998). A nivel genómico, ARN puede inducir modificaciones epigenéticas de ADN homólogo, al mediar su metilación (Wasseneger 2000).

Además de plantas y nematodos, el silenciamiento de genes ha sido estudiado en hongos, protozoos, insectos y hasta en mamíferos (Cogoni y Macino 2000, Meins Jr. 2000), demostrando que ésta es una estrategia celular común a muchos organismos.

Silenciamiento transcripcional versus postranscripcional

En el *silenciamiento transcripcional*, la ausencia o reducción de la transcripción en el núcleo impide la acumulación de ARNm en el citoplasma, bloqueando de

esta forma la síntesis proteica, y la hipermetilación de la región del promotor aparece frecuentemente asociada a STG (Fagar y Vaucheret 2000). Además, presenta altos niveles de transmisión genética (mitótica y meióticamente) (Meins Jr. 2000). El ARNdc puede mediar STG (Chandler y Vaucheret 2001), sugiriendo la participación de virus ARN en el surgimiento de este mecanismo. Además, los virus que poseen ADN como el CaMV, han sido señalados como inductores de STG en plantas transgénicas y genotipos silvestres de *Brassica napus*, según un mecanismo dependiente de la homología de ácidos nucleicos (Al-Kaff *et al.* 1998).

El *silenciamiento postranscripcional* permite la transcripción pero impide la acumulación de ARNm en el citoplasma, al conducir a su degradación (Fagar y Vaucheret 2000). Este parece un proceso menos estable, y frecuentemente se pierde después de la meiosis, durante la embriogénesis (o sea que es meióticamente reversible) y usualmente no está correlacionado con la hipermetilación de la secuencia promotora (Meins Jr. 2000), pero varios estudios indican la asociación entre SPTG y metilación a nivel de la región codificante (Fagar y Vaucheret 2000).

En el contexto de la ingeniería genética, inicialmente, se consideró que un gran número de copias de un transgen, insertadas en el genoma de una planta produciría niveles excesivamente altos de ARNm que activarían los mecanismos de defensa de la planta. Otros investigadores sugirieron que la metilación de los transgenes daría lugar a ARNm aberrantes, los cuales serían detectados y degradados. Una tercera hipótesis plantea que múltiples copias de los transgenes podrían insertarse dentro de los cromosomas en orientaciones inversas (algunas copias en sentido 5' 3' y otras en la orientación inversa 3' 5') dando origen a segmentos de ARNdc que desencadenarían la maquinaria de silenciamiento, en forma similar al caso de *C. elegans*. El ARNdc puede originarse de secuencias repetidas invertidas por hibridación intramolecular debido a retroplegamientos y dar origen al silenciamiento postranscripcional (Fig. 2) (Jorgensen *et al.* 1999).

Además, se considera que el SPTG puede dar origen a la metilación de ADN dentro del núcleo, originando de esta forma STG (Fig. 3) (Fagar y Vaucheret 2000) y es probable que ambos mecanismos interactúen para conformar un sistema de regulación (supresión) génica complejo (Meins Jr. 2000, Waterhouse *et al.* 2001b, Bender 2001).

Los transposones también han sido propuestos como fuerza motriz de la evolución del silenciamiento

de genes (Waterhouse *et al.* 2001b); no obstante, dado el enfoque de la presente revisión, únicamente se considera dicho mecanismo en el contexto de las interacciones planta-virus fitopatógenos.

Virus fitopatógenos y silenciamiento de genes

Diferentes secuencias virales se han utilizado para la producción de plantas transgénicas resistentes a virus. Las dos secuencias más utilizadas son la de la cubierta proteica y la de la proteína de replicación (Lomonosoff 1995). En ambos casos, el mecanismo mediante el cual la resistencia ocurre no ha sido comprendido totalmente (Jones *et al.* 1998). Transgenes de la cubierta proteica tienden a producir resistencia de amplio espectro (p.ej. contra cepas y otros virus dentro de la misma familia); mientras que aquellos de la proteína de replicación confieren resistencia específica (Lomonosoff 1995). Es probable que todas las secuencias virales tengan el potencial para inducir resistencia a través de mecanismos de SPTG (Jones *et al.* 1998).

En plantas transgénicas de arveja (*Pisum sativum*) conteniendo el gen de la replicasa (Nlb) del *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) se observó resistencia inducida cuando fueron infectadas con un aislamiento homólogo (PSbMV-DPD1). En este caso, la resistencia fue asociada con la pérdida de ARN viral así como del transgen, indicando que el mecanismo opera con base en SPTG. Cuando dichas plantas, recuperadas de la infección, fueron inoculadas con un aislamiento de PSbMV, el cual presenta la secuencia más distante

(PSbMV-NY), la respuesta de las plantas transgénicas fue variable, indicando que la homología con el gen Nlb era requerida para reactivar SPTG. Para complementar dichos resultados, la resistencia fue inducida con PSbMV-NY y, curiosamente, inoculaciones subsiguientes con PSbMV-DPD1 no produjeron infección en dichas plantas (ARN viral no fue detectado en el citoplasma). Es decir que PSbMV-NY había inducido resistencia a ambos aislamientos del virus. Jones *et al.* (1998) concluyeron que la homología requerida para activar el proceso (SPTG) es menor que aquella requerida para volver a desencadenar la degradación de ARN de virus invasores posteriores, una vez que la señal de silenciamiento se ha diseminado sistémicamente. Esta información es importante cuando se consideran estrategias de resistencia basadas en SPTG que podrían ser utilizadas a nivel de campo, dado que muchas enfermedades virales dependen de la asociación de dos o más virus dentro de la misma planta (Hull 2002).

Es importante mencionar que este tipo de pérdida de susceptibilidad o recuperación no está restringida a plantas transgénicas. Por ejemplo, Ratcliff *et al.* (1997) inocularon plantas de *N. clevelandii* con *Tomato black ring nepovirus* (cepa W22) y éstas presentaron síntomas iniciales que posteriormente desaparecieron. En reinoculaciones de las hojas recuperadas con W22 los autores no determinaron incrementos en el contenido de ARN viral y las plantas permanecieron libres de síntomas. Sin embargo, las plantas que

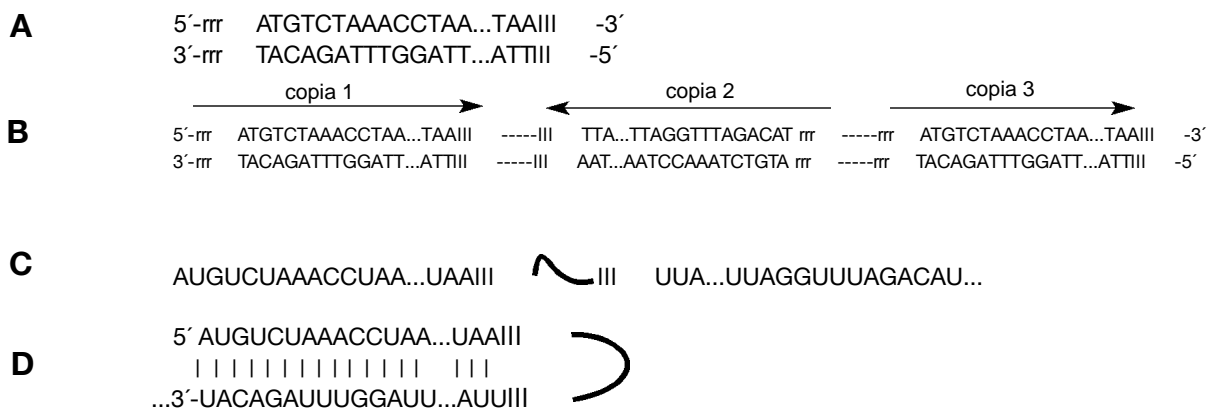


Figura 2. Representación esquemática del proceso de generación de ARNdc a partir de copias repetidas invertidas de transgenes. (A) Estructura elemental de un transgen, los cuadrados representan la secuencia del promotor incorporado para sobre-expresar dicho transgen y los puntos negros representan la secuencia del terminador. (B) Algunas copias del transgen se insertan en orientación 5'→3' (copia 1 y 3) mientras que otras podrían insertarse en orientación 3'→5' (copia 2). Eventualmente, la ARN polimerasa puede integrar dos copias del transgen en un solo transcrito, cuando el terminador correspondiente no funciona apropiadamente debido a daños estructurales durante el proceso de integración. (C) La región transcrita de la copia 1 será complementaria a aquella de la copia 2. (D) Las regiones complementarias del transcrito forman ARNdc mediante un proceso de hibridación intramolecular debido a retroplegamiento.

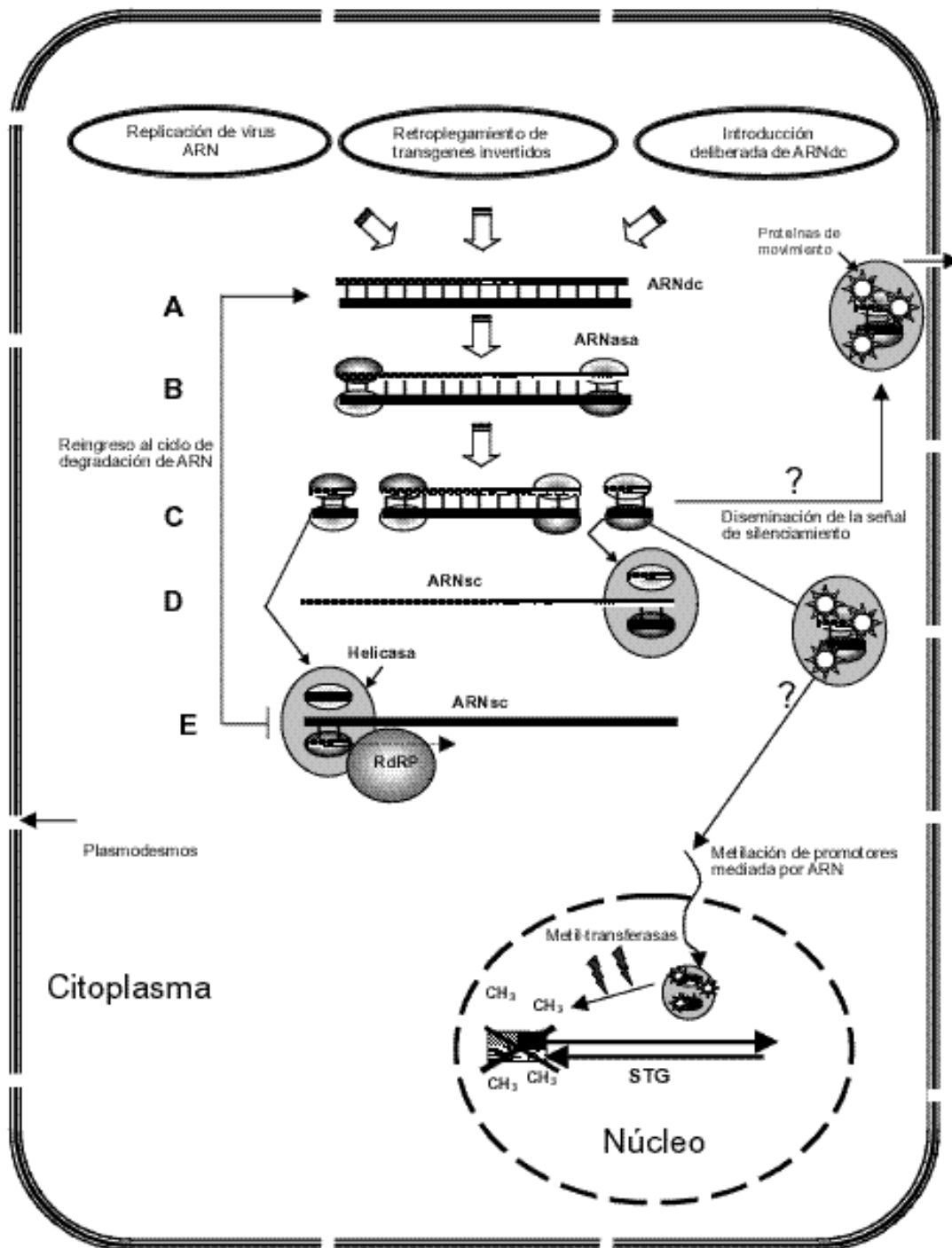


Figura 3. Modelo de silenciamiento postranscripcional. (A) ARNdc puede generarse de copias invertidas de transgenes, de la introducción deliberada de ARNdc, o bien como producto de la replicación de virus ARN. (B) Proteínas cortadoras ("Dicers") degradan el ARNdc a segmentos de aproximadamente 21-23 nucleótidos (ARNc, ARN corto) en cada uno de los extremos de la molécula. (C) Nuevas moléculas de proteínas cortadoras repiten el proceso tan pronto se da la interacción de éstas con el extremo de la molécula de ARN recortada. (D-E) El complejo ARNc-proteína cortadora es interceptado por una segunda proteína con propiedades helicicas, la cual disocia las bandas de ARNdc y permite la hibridación de estos fragmentos con moléculas de ARN monocatenario. Luego, una ARN polimerasa de la planta genera de novo ARNdc redisparando el proceso en forma cíclica. Alternativamente, el complejo ARNc-proteína cortadora (quizás con nuevos componentes) podría degradar ARNsc (transcriptos y ARNs aberrantes). En el punto C, algunos fragmentos de ARNc-proteína cortadora (probablemente en asociación con proteínas helicicas y de movimiento) podrían ingresar al núcleo y participar en la metilación del ADN o bien moverse de célula a célula, diseminando la señal de silenciamiento.

no habían sido previamente expuestas a W22 presentaron alta concentración de ARN viral así como síntomas típicos de la enfermedad.

Profundizando en este enfoque, las hojas recuperadas de la infección primaria con W22 fueron inoculadas con virus progresivamente más distantes de W22 y la acumulación de ARN viral fue consistente y paulatinamente ascendente, sugiriendo que la resistencia inducida por la infección primaria era, de alguna manera, dependiente de la homología con el nuevo virus invasor. La resistencia inducida por W22 fue aparentemente ineficaz contra infecciones secundarias con el *Tomato ringspot nepovirus* o con el PVX, los cuales eran los virus más distantes de W22.

Con el objetivo de aclarar el mecanismo que impedía la acumulación de ARN viral en las hojas recuperadas, un segmento de W22 fue insertado en un sitio de PVX donde no alteraba la expresión génica de este último. Si la recuperación de la infección primaria implicaba la degradación de proteínas virales, la acumulación de PVX:W22 no debería ser afectada por inoculaciones previas con W22. Por el contrario, si la recuperación dependía de la degradación del ARN viral de PVX:W22, la acumulación de este último sería sensiblemente reducida en hojas recuperadas. Mediante técnicas de hibridación de ARN no fue posible detectar ARN viral en hojas W22-recuperadas; pero éste fue abundante en las hojas que habían sido utilizadas como testigo negativo. Estos resultados indicaron que la resistencia inducida estaba basada en la degradación del ARN viral y que además fue dependiente de la homología, puesto que al substituir el fragmento de W22 por GFP (PVX:GFP) la transcripción no resultó afectada (Ratcliff *et al.* 1997).

En forma coincidente, los viroides pueden desencadenar el silenciamiento de genes e inducir la metilación de ADN conduciendo así a STG. Dado que dichos viroides carecen de cubierta proteica, esto evidencia que el mecanismo involucra a los ácidos nucleicos y no a las proteínas virales (Wassenegger *et al.* 1994).

Análogamente, Al-Kaff *et al.* (1998) informaron que plantas no transgénicas de *B. napus* presentaron una respuesta de supresión del CaMV similar a aquella de las plantas transgénicas conteniendo fragmentos de dicho virus. Entre 28 y 50 días después de la inoculación, la preponderancia de ADN superenrollado, indicativo de que la replicación de pararetrovirus ha finalizado, fue detectada en ambos tipos de plantas (transgénicas y no transgénicas). Los pararetrovirus

poseen una estructura inusual, su ADNc circular es el resultado de un proceso de transcripción reversa. En el CaMV, el transcripto 35S sirve como molde para la síntesis de ADN complementario. Este transcripto posee extremos redundantes. Un ARN de transferencia de la planta (ARNt-met₁) se acopla a la región 5' de dicho transcripto y permite la síntesis de ADN usando la cadena de ARN del transcripto como molde, dando origen así a un pequeño fragmento doble cadena de ARN/ADN, el cual es un buen candidato para inducir silenciamiento de este virus. Posteriormente, una ARNasa H degrada el ARN de la cadena molde y el ADN recién sintetizado se acopla a la región redundante en el extremo 3' para copiar en ADN el transcripto completo (Hull 2002).

Por otro lado, la transcripción bidireccional del ADNsc de los geminivirus (Hanley-Bowdoin *et al.* 1999) podría conducir a la síntesis de ARNs complementarios, capaces de formar estructuras bicatenarias y de inducir silenciamiento postranscripcional de geminivirus (Voinnet 2001).

El SPTG en plantas no transgénicas no está restringido a nepovirus y caulimovirus, como inicialmente se consideró. Ratcliff *et al.* (1999) presentan evidencia sobre el silenciamiento postranscripcional del *Tobacco rattle virus* (TRV, Tobravirus) y del PVX (Potexvirus). Para esto se usaron plantas de *N. benthamiana*, las cuales fueron infectadas con TRV o PVX para inducir resistencia (silenciamiento) contra un segundo virus. La metodología empleada es un poco complicada, pero en resumen incluye lo siguiente: La cepa PPK20 del *Tobacco rattle virus* fue usada como vector de GFP. *Tobacco rattle virus* posee un genoma bipartito, el ARN-1 codifica para las proteínas esenciales para la replicación y el movimiento del virus dentro de la planta, el ARN-2 codifica para la cubierta proteica y dos proteínas no esenciales para la infección (Hull 2002). La GFP fue insertada en el lugar de dichas proteínas no esenciales (TRV:GFP). Dicho vector fue capaz de infectar plantas sistémicamente y de inducir síntomas leves; sin embargo, el patrón de fluorescencia de GFP indicó que se había diseminado extensivamente por toda la planta. La fluorescencia de GFP desapareció de 8-10 días después de la inoculación (todas las plantas se recuperaron de la infección, n>100). La hibridación de ARN también indicó una reducción coincidente en la transcripción de TRV (Ratcliff *et al.* 1999). Dichas hojas recuperadas de TRV:GFP fueron inoculadas con PVX, mediante el

uso de una quimera que incluía al gen GUS dentro de PVX (PVX:GUS) y otra que además incluía 363 nucleótidos de GFP (PVX:GUS:GF). La lógica indicaba que si el mecanismo de silenciamiento era dependiente de la homología, la expresión de PVX:GUS no debería resultar afectada, pero sí debería afectarse la de PVX:GUS:GF, debido a su homología con TRV:GFP. Los resultados mostraron altos niveles de expresión de PVX:GUS (manchas azules después de la detección histoquímica) y altos niveles de ARNm correspondiente a GUS; esto ocurrió en plantas TRV:GFP recuperadas y en plantas testigo (inicialmente inoculadas con agua). Sin embargo, en el caso de PVX:GUS:GF, la expresión de GUS fue detectada sólo en las plantas testigo y no en las plantas que habían silenciado la expresión de TRV:GFP.

Con el objetivo de determinar si el mecanismo de defensa natural de *N. benthamiana* era funcionalmente equivalente al SPTG observado y parcialmente caracterizado en plantas transgénicas, hojas de *N. benthamiana* recuperadas de TRV:GFP así como de plantas testigo se transformaron en forma transitoria, infiltrándolas con una suspensión de *A. tumefaciens* conteniendo el vector binario pTDB, en el cual el T-DNA incluía las secuencias del promotor p35S, GFP, el terminador Nos, p35S, GUS, y Nos (p35S:GFP:Nos:p35S:GUS:Nos), de manera que ambos genes eran expresados individualmente bajo el control del mismo promotor. La expresión de GUS (manchas azules) y de GFP (fluorescencia) fue detectada en plantas testigo, pero en aquellas TRV:GFP recuperadas sólo se detectó la expresión de GUS y no la de GFP. Esta expresión diferencial no podía ser el resultado de STG puesto que ambos genes reporteros tenían promotores idénticos. Por tanto, un mecanismo equivalente a SPTG ocurrió en el silenciamiento de GFP.

Finalmente, experimentos análogos con PVX (inductor) y TMV (retador) tuvieron resultados similares; aun cuando PVX no induce la recuperación de las plantas infectadas, éstas se protegen contra la infección de un segundo virus, mediante un mecanismo relacionado con la degradación de ARN (Ratcliff *et al.* 1999).

Debido a que la introducción de resistencia mediante ingeniería genética y sobre todo su explotación en la agricultura a niveles comerciales es un área relativamente nueva e inexplorada, la precaución es obviamente importante y los riesgos potenciales deben ser evitados o al menos investigados a profundidad (Gibbs *et al.* 1997, Hammond *et al.* 1999). De acuerdo con este

planteamiento, plantas de *N. benthamiana* se transformaron con constructos quiméricos conteniendo la cubierta proteica (CP) del *Virus del mosaico del nabo* (TuMV) y pequeños fragmentos (110 y 218 nt) del gen de la CP del *Virus de la marchitez manchada del tomate* (TSWV) (Jan *et al.* 2000), dos virus económicamente importantes a nivel mundial (Tomlinson 1987). En cuatro de las 18 líneas transgénicas analizadas, el segmento de 218 nt del gen de la CP de TSWV ligado a CP-TuMV confirió resistencia a ambos virus. Análisis más detallados confirmaron la existencia de SPTG como mecanismo de defensa (Jan *et al.* 2000). Aún cuando en estos experimentos la CP de TuMV fue utilizada como silenciador, dicho papel puede ser asumido inclusive por un gen reportero como GFP (Pang *et al.* 1997) o GUS (English *et al.* 1996).

Este enfoque tiene al menos dos ventajas importantes sobre otros tradicionalmente probados. Primero, se podría generar resistencia múltiple para enfermedades causadas por complejos virales, o bien para cultivos afectados por diferentes virus. Segundo, la utilización de pequeños fragmentos que no codifican para proteínas virales reduce el riesgo de recombinación, trans-encapsidación, sinergismo o complementación; las cuales han sido señaladas como desventajas del uso de secuencias completas de genes virales (Jan *et al.* 2000).

El silenciamiento postranscripcional de genes también ha sido informado en monocotiledóneas transgénicas (Ingelbrecht *et al.* 1999). Callos embrionarios de caña de azúcar (*Saccharum spp. hybrid*) fueron transformados mediante bombardeo de partículas de oro recubiertas con la quimera conteniendo la cubierta proteica de la cepa SCH del *Virus del mosaico del sorgo* (SrMV-SCH), bajo el control del promotor del maíz *ubiquitin* (Ubi-1). SrMV es miembro del complejo de potyvirus que causan la enfermedad del mosaico de la caña de azúcar. Entre 220 plantas transgénicas, tres clases fenotípicas fueron identificadas según su respuesta a inoculaciones posteriores con SrMV-SCH. Algunas plantas fueron susceptibles, otras se recuperaron de la enfermedad, y un tercer grupo fue inmune. Estos resultados demuestran la generalidad del mecanismo de silenciamiento de genes en diferentes familias de plantas e incrementan el potencial de aplicación del mismo para el manejo de enfermedades virales en diferentes cultivos y/o sistemas agrícolas.

Defensa y contradefensa

En el contexto de enfermedades virales en plantas, el silenciamiento de genes es un sistema de defensa com-

pleto y sofisticado que las protege del efecto detrimental de la proliferación de los virus fitopatógenos. No obstante, algunos virus han evolucionado estrategias moleculares que contrarrestan el silenciamiento de sus genes (Vance y Vaucheret 2001, Voinnet 2001, Waterhouse *et al.* 2001b).

Por ejemplo, los potyvirus son patógenos importantes de cultivos agrícolas, cuyo representante típico es el *Virus Y de la papa* (PVY), son transmitidos por áfidos, presentan ARNsc como material genético y una organización genómica denominada poliproteica porque se transcriben y traducen como una sola entidad que posteriormente es fraccionada para dar origen a las diferentes proteínas virales (Hull 2002). La enzima encargada de cortar los genes traducidos es denominada HC-Pro (*helper component protease*). Esta proteína interfiere, además, con la capacidad de las plantas para llevar a cabo silenciamiento postranscripcional de genes, facilitando así las infecciones virales (Savenkov y Valkonen 2001). Se presume que HC-Pro interfiere con la diseminación de la señal de silenciamiento a través de la planta (Smyth 1999), al igual que lo hace la proteína p25 del PVX (Voinnet *et al.* 2000). Por el contrario, la proteína 2b del *Virus del mosaico del pepino* (CMV) no tiene influencia sobre SPTG, una vez que éste se ha establecido, pero se ha demostrado que previene su inicio (Brigneti *et al.* 1998). La proteína AC2 de los geminivirus, señalada como regulador de la transcripción viral (Hanley-Bowdoin *et al.* 1999) también ha sido señalada como supresor de silenciamiento de genes (Voinnet 2001).

Plantas de *N. benthamiana*, en las cuales la expresión de GFP había sido silenciada, volvieron a expresar esta última después de la infección con diferentes tipos de virus. Cada tipo de virus produjo un patrón diferente de supresión del silenciamiento. Por ejemplo, los potyvirus suprimieron el silenciamiento en hojas jóvenes y maduras, mientras CMV (Cucumovirus) lo hizo únicamente en hojas jóvenes. El *Virus del mosaico africano de la yuca* (ACMV, Geminivirus) y el PVX (Potexvirus), entre otros, permitieron la reexpresión de GFP en todos los tejidos; mientras que el *Virus del achaparramiento arbustivo del tomate* (TBSV, Tombusvirus), el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV, Tobamovirus) y el *Virus del mosaico del caupí* (CPMV, Comovirus) suprimieron el silenciamiento sólo en los tejidos adyacentes a las venas. Estos resultados sugieren que los supresores de silenciamiento codificados por virus presentan diferentes modos de

acción y afectan diferentes componentes de la maquinaria silenciadora de las plantas; además presentan una evolución dinámica con la planta hospedante (Voinnet *et al.* 1999).

Por otro lado, estudios sobre infecciones sinérgicas, en las cuales la coinfección con dos o más virus heterólogos conduce a síntomas mucho más severos que aquellos provocados por infecciones individuales han aportado evidencia importante sobre la existencia de mecanismos de defensa en plantas. Por ejemplo, TEV es capaz de desarrollar infecciones sinérgicas con un vasto ámbito de otros virus, mediante la secuencia de las proteínas P1/HC-Pro (Pruss *et al.* 1997). Esto sugiere que la expresión de estas proteínas interfiere con un sistema general de defensa en las plantas, permitiendo la acumulación de otros virus más allá de los límites mediados por el hospedante mediante el silenciamiento postranscripcional (Anandalkshmi *et al.* 1998). Además, debido a que la supresión de silenciamiento de genes promueve la acumulación de distintos virus, con estrategias moleculares y ámbito de hospedantes diferentes, el silenciamiento de genes es concebido como un mecanismo de defensa generalizado en plantas (Ratcliff *et al.* 1999). Esto reafirma la necesidad de estudiar a profundidad las epidemias virales que resultan de infecciones mixtas de dos o más virus dentro de un cultivo.

Consideraciones finales

Los virus atacan al reclutar la maquinaria genética de la planta para su propio beneficio, las plantas se defienden mediante mecanismos de silenciamiento de genes virales, los virus contraatacan inactivando el silenciamiento; sin embargo, la dinámica evolución planta-patógeno continúa. Por ejemplo, la proteína 2b del *Tomato aspermy cucumovirus* (Tav2b) ha sido reportada como supresor del silenciamiento de genes cuando ésta es expresada utilizando el CMV como vector en plantas transgénicas de *N. benthamiana*. Sin embargo, el mismo sistema induce una respuesta similar al mecanismo de resistencia *gen por gen* en plantas no transgénicas de tabaco (*N. tabacum* cv Samsun nn), incluyendo la inducción transcripcional de ARNm viral así como la formación de lesiones necróticas que restringen la diseminación de la infección (respuesta hipersensitiva), mientras que genotipos silvestres de *N. benthamiana* fueron altamente susceptibles a la infección con dicho virus (quimera) (Li *et al.* 1999). Esto indica que esta planta ha desarrollado un mecanis-

mo aparentemente independiente para inactivar las proteínas supresoras del silenciamiento. La inducción de hipersensibilidad no estuvo asociada a la secuencia de ARN, sino a la presencia de la secuencia completa capaz de traducirse en proteínas, indicando que el producto del gen era la molécula activa en la inducción de resistencia. Sin embargo, la proteína 2b del CMV, también reportada como supresor de silenciamiento, permitió la infección sistémica del mismo cultivar de plantas de tabaco (Li *et al.* 1999).

Los resultados de investigaciones sobre silenciamiento de genes, presentados en este artículo, revelan interacciones genéticas complejas entre virus y plantas hospedantes. Esto explica las dificultades del manejo de enfermedades virales en el campo, pero a la vez plantea un reto importante, el de estudiar y comprender la naturaleza de estas interacciones con el propósito de definir y desarrollar medidas que contribuyan efectivamente a reducir las pérdidas ocasionadas por virus en campos de cultivos.

Agradecimientos

A Shuo Cheng Zhang y Martin Höhnle (Universidad de Stuttgart, Alemania), así como Rich Jorgensen y Natalie Doestch (Universidad de Arizona, Tucson, USA) por brindarnos gentilmente las fotos de la figura 1. Los autores asumen responsabilidad total por la interpretación de los resultados de investigación presentados en el artículo.

Literatura citada

Agrios, GN. 1995. Fitopatología. 2 ed. México, Limusa. 838 p.
 Al-Kaff, NS; Covey, SN; Kreike, MM; Page, DM; Pinder, R; Dale, PJ. 1998. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279:2113-2115.
 Anandalakshmi, R; Pruss, GJ; Marathe, R; Mallory, AC; Smith, TH; Vance, VB. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:13079-13084.
 Angell, SM; Baulcombe, DC. 1997. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J.* 16(12):3675-3684.
 Baulcombe, DC. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8:1833-1844.
 Baulcombe, DC; Chapman, S; Santa Cruz, S. 1995. Jellyfish fluorescent protein as a reporter for virus infection. *Plant J.* 7:1945-1953.
 Bejarano, ER; Lichtenstein, CP. 1992. Prospects for engineering virus resistance in plants with antisense RNA substrates. *Trends Biotech.* 10:383-388.
 Bender, J. 2001. A vicious cycle: RNA silencing and DNA methylation in plants. *Cell* 106:129-132.
 Benfey, PN; Ren, L; Chua, N. 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* 8(8):2195-2202.
 Benfey, PN; Ren, L; Chua, N. 1990. Combinatorial and synergis-

tic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J.* 9(6):1685-1696.
 Biggar, SR; Crabtree, GR. 2001. Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *EMBO J.* 20(12):3167-3176.
 Bos, L. 1999. Plant viruses, unique and intriguing pathogens. Leiden, Netherlands, Backhuys Publishers. 358 p.
 Brigneti, G; Voinnet, O; Li, WX; Ji, LH; Ding, SW; Baulcombe, DC. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17:6739-6746.
 Brink, RA. 1973. Paramutation. *Ann. Rev. Genet.* 7:129-152.
 Chandler, VL; Vaucheret, H. 2001. Gene activation and gene silencing. *Plant Physiol.* 125:145-148.
 Cogoni, C; Macino, G. 1999. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:657-662.
 Cogoni, C; Macino, G. 2000. Posttranscriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:638-643.
 Covey, SN; Al-Kaff, NS; Langara, A; Turner, DS. 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 387:781-782.
 Day, AG; Bejarano, ER; Buck, KW; Burrell, M; Lichtenstein, CP. 1991. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:6721-6725.
 Dougherty, WG; Lindbo, JA; Smith, HA; Parks, TD; Swaney, S; Proebsting, WM. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7:544-552.
 English, JJ; Mueller, E; Baulcombe, BC. 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8:179-188.
 Fagard, M; Vaucheret, H. 2000. (Trans) Gene silencing in plants: how many mechanisms?. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:167-194.
 Finnegan, EJ; Genger, RK; Peacock, WJ; Dennis, ES. 1998. DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:223-247.
 Finnegan, EJ; Peacock, WJ; Dennis, ES. 2000. DNA methylation, a key of plant development and other processes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:217-223.
 Fire, A; Xu, SQ; Montgomery, MK; Kostas, SA; Driver, SE; Mello, CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
 Gelvin, SB. 2000. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 51:223-256.
 Gibbs, MJ; Armstrong, GF; Weiller, GF; Gibbs, AJ. 1997. Virus evolution; the past, a window on the future. *In* Tepfer, M; Balázs, E. Ed. *Virus-resistant transgenic plants: potential ecological impact.* Berlin, Springer Verlag. p. 1-19.
 Gura, T. 2000. A silence that speaks volumes. *Nature* 404:804-808.
 Hammond, J; Lecoq, H; Raccach, B. 1999. Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Adv. Virus Res.* 54:189-314.
 Hanley-Bowdoin, L; Settledge, SB; Orozco, BM; Nagar, S; Robertson, D. 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:71-106.
 Heslop-Harrison, J. 1967. Differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18:325-348.

- Hull,R.2002. Matthews' plant virology.4 ed. London,Academic Press.1001 p.
- Ingelbrecht,IL;Irvine,JE;Mirkov,TE.1999. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiol.* 119:1187-1197.
- Jan,F;Fagoaga,C;Pang,S;Gonsalves,D. 2000. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multivirus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing. *J.Gen. Virol.*81:2103-2109.
- Jones, AL; Johansen,IE;Bean,SJ;Bach,I;Maule, AJ. 1998. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J. Gen. Virol.*79:3129-3137.
- Jorgensen,RA;Que, Q;Stam,M.1999. Do unintended antisense transcripts contribute to sense co-suppression in plants?. *Trends Genet.* 15(1):11-12.
- Kooter, JM;Matzke, MA;Meyer,P. 1999. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4(9):340-347.
- Lewin, B.2000. Genes VII. Oxford University Press. 990 p.
- Li,H;Lucy,A;Guo, H;Li, W;Ji, L; Wong, S;Ding,S. 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* 18(10):2683-2691.
- Lindbo, JA;Dougherty, WG. 1992. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189:725-733.
- Lindbo, JA; Silva-Rosales, L; Proebsting, WM; Dougherty, WG. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5:1749-1759.
- Lomonosoff, GP. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu.Rev. Phytopathol.*33:323-343.
- Matzke, M; Matzke, AJM; Eggleston, WB. 1996. Paramutation and transgene silencing: A common response to invasive DNA?. *Trends Plant Sci.* 1:382-388.
- Matzke, M; Matzke, AJM; Mittelsten-scheid, O. 1994. Inactivation of repeated genes- DNA-DNA interaction?. *In Paszkowski, J.*Ed. Homologous recombination and gene silencing in plants. Netherlands,Kluwer Academic.p. 271-307.
- Meins, F. Jr. 2000. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol.Biol.*32:63-78.
- McKinney, HH.1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39:557-578.
- Mol,JNM;Blokland, RV;De Lange, P;Stam,M; Kooter, JM.1994. Posttranscriptional inhibition of gene expression: sense and antisense genes. *In Paszkowski, J.*Ed. Homologous recombination and gene silencing in plants. Netherlands,Kluwer Academic.p. 309-334.
- Napoli,C;Lemieux,C;Jorgensen,R.1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results un reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Pang, SZ; Jan,FJ; Gonsalves,D. 1997. Non-target DNA sequences reduce the transgene length necessary for RNA-mediated tospovirus resistance in transgenic plants. *Proc. Natl.Acad. Sci.*94:8261-8266.
- Pruss, G; Ge, X;Shi, XM;Carrington,JC; Vance, VB. 1997. Plant viral synergism:the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9:859-868.
- Ratcliff, F;Harrison,BD;Baulcombe, DC. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276:1558-1560.
- Ratcliff, F; Mac Farlane, SA; Baulcombe, DC. 1999. Gene silencing without DNA:RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11:1207-1215.
- Savenkov, EI; Valkonen, PT. 2001. Coat protein gene-mediated resistance to potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *J. Gen. Virol.* 82:2275-2278.
- Smyth, DR.1999. Gene silencing: plants and viruses fight it out. *Curr. Biol.*9:R100-R102.
- Tamarin,R.1996. Principios de Genética. 4 ed. Barcelona,Reverté. 607 p.
- Thomas, CL; Jones, L; Baulcombe, DC; Maule, AJ. 2001. Size constraints for targeting posttranscriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato X vector. *Plant J.* 25(4):417-425.
- Tomlinson, JA.1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Annals Applied Biol.* 110:661-681.
- Tsien, RY.1998. The green fluorescent protein. *Annu.Rev. Biochem.*67:509-544.
- Vance,V; Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in plants-defense and counter-defense. *Science* 292:2277-2280.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Gen.* 17:449-459.
- Voinnet,O;Pinto, YM;Baulcombe, DC. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(24):14147-14152.
- Voinnet,O;Lederer, C;Baulcombe, DC.2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103:157-167.
- Wasseneger, M; Heines, S; Riedel, L; Sanger, HL. 1994. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576.
- Wasseneger, M. 2000. RNA-directed DNA methylation. *Plant Mol.Biol.* 43:403-220.
- Waterhouse, PM; Smith, NA; Wang, M. 1999. Virus resistance and gene silencing:Killing the messenger. *Trends Plant Sci.* 4(11):452-457.
- Waterhouse, PM; Wang, M; Finnegan, EJ. 2001a. Role of short RNAs in gene silencing. *Trends Plant Sci.* 6(7):297-301.
- Waterhouse, PM; Wang, M;Lough, T.2001b. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411:834-842.
- Zambryski, PC. 1992. Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 43:465-490.
- Zhang, SC; Wege, C; Jeske, H. 2001. Cellular site changes of Abutilon mosaic geminiviral movement protein in different plant cell as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology* 290:249-260.