

ARN de interferencia (ARNi): una herramienta eficaz en agrobiotecnología

RNA interference (RNAi): an effective tool in agrobiotechnology

*Maira Gamero**, *Deisy Toloza-Moreno***, *Mariano Belaich****, *Gloria Barrera*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n2.99397

RESUMEN

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo evolutivamente conservado en la mayoría de las células eucariotas que permite silenciar genes mediante la degradación de ARN mensajero (ARNm) y la supresión de la síntesis de proteínas. En plantas, las moléculas de ARNi están involucradas en mecanismos de defensa contra patógenos y transposones, en la respuesta adaptativa al estrés, y en la expresión de genes relacionados con su crecimiento. El ARNi se considera una herramienta biotecnológica eficaz para silenciar la expresión de genes de microorganismos fitopatógenos, esto permite el diseño de bioplaguicidas ambientalmente seguros con una afinidad y selectividad, en muchos casos superior a la de los plaguicidas químicos. En esta revisión se señalan los últimos avances en la aplicación del ARNi en el contexto agrícola y su efectividad en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga. Asimismo, se presentan diversos ensayos experimentales cuyos resultados pueden ser la base para futuros bioproductos, además de algunos ejemplos disponibles en el mercado. Por último, se abordan aspectos de bioseguridad y consideraciones regulatorias necesarias para la aceptación y uso de esta tecnología a nivel global.

Palabras clave: ARNi, aplicaciones, control biológico, fitopatógenos, insectos, genes, plagas.

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is an evolutionarily conserved mechanism in most eukaryotic cells that allows genes to be silenced by degradation of messenger RNA (mRNA) and suppression of protein synthesis. In plants, RNAi molecules are involved in defense mechanisms against pathogens and transposons, in the adaptive response to stress, and in the expression of genes related to their growth. RNAi is an effective biotechnological tool to silence the expression of specific genes which are essential for the survival of phytopathogenic microorganisms, thus allowing the design of environmentally safe biopesticides with affinity and selectivity, in many cases greater than chemical pesticides. This review describes the latest advances in the application of RNAi in the agricultural context and its effectiveness in the biological control of phytopathogens and pest insects. Likewise, various experimental trials are presented, the results of which may be the basis for future bioproducts, as well as some examples available on the market. Finally, biosafety aspects and regulatory considerations necessary for the acceptance and use of this technology at a global level are presented.

Keywords: RNAi, applications, biological control, phytopathogens, insects, genes, pests.

Recibido: noviembre 8 de 2021 **Aprobado:** noviembre 16 de 2022

* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia. mgamero@agrosavia.co

** Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia. dtoloza@agrosavia.co

*** Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos, Universidad Nacional de Quilmes, Provincia de Buenos Aires, Argentina. mbelaich@unq.edu.a

**** Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera, Bogotá, Colombia. gbarrera@agrosavia.co, autor de correspondencia.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de las células eucariotas, la presencia de ARN de doble cadena (ARNdc) o ARN bicatenario, genera una respuesta de silenciamiento específico de secuencia conocida como **ARN de interferencia - ARNi** (*RNA interference - RNAi*), silenciamiento de genes pos-transcripcional o *knock-down* génico, el cual se ha convertido en una de las mejores herramientas biotecnológicas para analizar la funcionalidad de los genes (Senthil-Kumar y Mysore, 2010).

La fuente de ARNdc que dispara el mecanismo de silenciamiento puede ser exógena (generalmente virus) o endógena (a partir de genes nucleares), lo cual produce la hidrólisis del ARNdc en pequeños fragmentos que activan ribonucleasas, que posteriormente atacarán moléculas de ARN de cadena sencilla (ARNcs) que contienen secuencias complementarias. Este mecanismo es altamente conservado, ya que regula la expresión de genes que codifican proteínas e interviene en la resistencia a ácidos nucleicos patógenos (Hannon, 2002).

Los primeros indicios de este mecanismo, aunque sin ser reconocido como tal, fueron reportados por Napoli *et al.* (1990), quienes introdujeron copias del gen que codifica para la chalcona sintasa en petunias (*Petunia* spp.), una enzima responsable de la coloración púrpura de sus flores. El resultado esperado eran plantas púrpuras; sin embargo, encontraron flores blancas con niveles de la enzima 50 veces menores a los de las plantas originales, indicando una cosupresión del gen endógeno de la enzima. En 1992, Romano y Macino en un trabajo con el hongo *Neurospora crassa*, observaron que la sobreexpresión del gen relacionado con la producción de caroteno produjo un fenotipo albino. Este fenómeno ocurría a nivel post-transcripcional, por lo que fue denominado "silenciamiento de genes postranscripcional" o PTGS. Posteriormente, trabajos en *Caenorhabditis elegans* demostraron que el PTGS era debido a un proceso de ARN de interferencia-ARNi (Fire *et al.*, 1998).

Más tarde, Whangbo y Hunter (2008), señalaron que en eucariotas existen dos mecanismos mediados por ARNi. El primero, **ARNi de autonomía celular**, en el que el silenciamiento está limitado a las células que generan el ARNdc o que están directamente expuestas a un ARNdc exógeno. El segundo, **ARNi de autonomía no celular**, que se presenta cuando el efecto se propaga a lo largo de los límites celulares y puede actuar en células o tejidos distantes al lugar donde se inició.

El ARNi de autonomía no celular, se divide a su vez en **ARNi ambiental**, que es observado en respuesta a moléculas de ARN externas presentes en el medio ambien-

te (Wang *et al.*, 2017) y se ha descrito en gusanos planos, garrapatas, abejas y algunos nemátodos, pero no en vertebrados (Huvenne y Smagghe, 2010), y en **ARNi sistémico**, que comienza localmente mediante un complejo sistema de señalización y que se expande de célula a célula en forma controlada, siendo exclusivo de organismos multicelulares (Fire *et al.*, 1998) y es importante para restringir las infecciones virales en plantas (Taliensky *et al.*, 2021).

Dada la gran importancia del uso de la tecnología basada en ARNi en diversos campos, con esta revisión se hace una recopilación de información actualizada en cuanto a su aplicación para el control biológico de plagas y fitopatógenos, con el fin de demostrar su gran potencial para la producción de bioplaguicidas efectivos y ambientalmente seguros.

Silenciamiento génico mediante ARNi

El silenciamiento por ARN está dado principalmente por la acción de varias macromoléculas: 1. una molécula desencadenante de ARNdc que activa el mecanismo; 2. la proteína de la familia de las ARNasa III denominada Dicer en animales, o Dicer-like1 (DCL) en plantas (Kurihara y Watanabe, 2004) que cataliza el primer paso del mecanismo de ARNi; 3. un complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) compuesto por ribonucleoproteínas al que se ensamblan los fragmentos generados por Dicer (Hammond *et al.*, 2001) y cuyo componente activo son las enzimas Argonautas (AGO), que son proteínas de unión a ARN pequeños no codificantes (Hutvagner y Simard, 2008), y 4. una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (*RNA-dependent RNA polymerase*) que contribuye a amplificar la señal de inducción del mecanismo mediante la generación de ARN secundarios (Singh *et al.*, 2016).

De manera general, el mecanismo de ARNi comienza cuando la enzima Dicer reconoce y corta el ARNdc en fragmentos de doble cadena de 20-25 nucleótidos (ARNip y miARN), con grupos fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos libres en el extremo 3'. El ARNip dúplex se une a la proteína AGO, y una vez ensamblado en el complejo RISC, es desenrollado y sólo una de las dos cadenas, la cadena guía, dirige el proceso de degradación del ARNm complementario, mientras que la otra cadena, la cadena pasajera, es clivada, liberada y rápidamente degradada durante el proceso de activación de RISC (Gregory *et al.*, 2005), dándose el silenciamiento en la expresión de genes (Dominska y Dykxhoorn 2010; Singh *et al.*, 2016).

Tipos de ARN interferente

Los ARN endógenos pequeños derivan del procesamiento de sus precursores y se agrupan de acuerdo con diferencias en biogénesis y función. Existen ARN pequeños

derivados de sus precursores de ARN de cadena sencilla, unos con estructura en horquilla ARNhp (*hairpin* RNA), que en plantas pueden ser divididos en los microARN y los no microARN; y los ARN derivados de precursores de ARNdc, que corresponden a ARNip (*small interference* RNA - siRNA) (Axtell, 2013, Tabla 1).

Adicionalmente, se reconocen tres categorías principales de ARN pequeños de acuerdo con su origen, estructura, proteínas efectoras asociadas y funciones biológicas: ARN interferentes pequeños (ARNip); microARN (miARN) y ARN asociados a PIWI - piARN. Estos últimos han sido descritos solamente en células animales y se asocian específicamente con proteínas PIWI (*P-element induced wimpy testis*), las cuales son miembros de la familia de las proteínas AGO (Axtell, 2013; Ozata et al. 2019). Entre estos, los ARNip y miARN son los más ampliamente distribuidos, ya que actúan en células somáticas y líneas germinales en un amplio rango de especies eucariota.

Protección frente a fitopatógenos

El ARNi le confiere protección a la planta hospedadora frente al desarrollo de infecciones (Koch y Kogel, 2014) y desempeña un papel importante en el control de la expresión de genes frente a respuestas inmunes como mecanismo de resistencia, por ejemplo, contra la replicación viral (Li y Wang, 2019; Jin et al., 2021). Asimismo, protege el genoma de la planta frente a elementos genéticos móviles como los transposones de tipo endógeno (Matzke et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2022).

La aplicación de este proceso natural define una tecnología llamada "Silenciamiento de genes inducido al hos-

pedero" (*Host Induced Gene Silencing* - HIGS), la cual es una herramienta biotecnológica para la protección vegetal, que combina una alta selectividad para el organismo blanco con mínimos efectos secundarios en comparación con el uso de tratamientos químicos (Wang et al., 2017).

Por ejemplo, se ha demostrado que *Botrytis cinerea*, es capaz de absorber ARNdc y ARNi ambiental (Wang et al., 2017), por lo que la aplicación por aspersión de moléculas de ARNi dirigidas contra este patógeno en la superficie de verduras, frutas y flores inhibe la enfermedad causada por el hongo. Esta estrategia se denomina "Silenciamiento génico inducido por aspersión" (*Spray-Induced Gene Silencing* - SIGS) la cual permite el uso de moléculas exógenas de ARNdc y ARNip que son sintetizadas *in vivo* o *in vitro* en sistemas alternativos para su posterior administración tópica en los cultivos (Wang et al., 2017).

Otro caso eficaz, se ha reportado en el control de enfermedades en monocotiledóneas. La aspersión con ARNdc dirigido al gen *CYP51* de *Fusarium graminearum* redujo eficazmente los síntomas de la enfermedad en hojas de *Hordeum vulgare* (Koch et al., 2016). Un ejemplo similar, realizado con *F. asiaticum*, en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) mostró que la aspersión de ARNdc dirigido al gen miosina 5 (*Myo 5*) del patógeno, redujo la virulencia e interrumpió el ciclo de vida del hongo (Song et al., 2018). Otros estudios también mostraron que en plantas de *Brassica napus* y *Arabidopsis thaliana* afectadas por el patógeno *Sclerotinia sclerotium*, el tratamiento permitió disminuir el tamaño de las lesiones provocadas por el hongo (McLoughlin et al., 2018).

Tabla 1. Clasificación de ARN endógenos pequeños en plantas.

ARNi*	ORIGEN	TAMAÑO	CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
ARNhp	Derivados de precursores de ARN de cadena sencilla en forma de horquilla	20-25 nucleótidos	no miARN	Fragmentados por DCL1, codificados en el genoma, son reguladores de genes endógenos, involucrados en el desarrollo de la planta y respuesta al estrés.	Guo et al. (2018); Taliansky et al. (2021)
			miARN		
ARNip	Derivados de precursores de ARN de cadena doble	20-24 nucleótidos	ARNip-hc ARNip-sec ARNip NATs: <i>Cis</i> NAT y <i>Trans</i> NAT	Se generan a partir de un intruso viral, un elemento genético propio o de secuencias de ADN repetidas en tándem.	Axtell (2013); Yuan et al. (2015)

*ARNhp: ARN en forma de horquilla; ARNip: ARN interferente pequeño; miARN: micro ARN; ARNip-hc: ARNip heterocromático; ARNip-sec: ARNip secundario; ARNip NATs: ARNip de transcritos naturales antisentido; DCL1: Dicer tipo 1.

Durante una infección viral en plantas, el ARNdc viral funciona como inductor del silenciamiento génico. Este, puede provenir de la replicación viral (en virus ARN), transcripción bidireccional del genoma viral (en virus ADN), emparejamiento intramolecular del ARN viral, o de la biosíntesis de ARNdc por acción de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Boualem *et al.*, 2016; Taliensky *et al.*, 2021). En este caso, los productos virales generados por el mecanismo de silenciamiento se esparcirán sistémicamente por el floema y los plasmodesmos de la planta desde el sitio de inicio de la infección hacia tejidos distantes, lo que desencadena un silenciamiento de autonomía no celular (Boualem *et al.*, 2016).

Se han descrito mecanismos de protección contra infecciones virales a partir de ARNdc producido de manera *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, la aplicación de ARNdc producido *in vitro* y dirigido hacia la proteína de cápside (*coat protein - Cp*) del virus del mosaico del tomate (*Tomato Mosaic Virus*) confirió protección a las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Rego-Machado *et al.*, 2020). Adicionalmente, ARNdc derivados de TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) producidos *in vivo* en *Pseudomonas syringae* dieron protección a plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) contra la infección (Niehl *et al.*, 2018).

Por otra parte, el uso del “Silenciamiento de Genes Inducido por Virus” (*Virus Induced Gene Silencing - VIGS*) ha permitido la identificación de las funciones de un gran número de genes relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, respuestas de defensa y tolerancia a condiciones ambientales, interacciones planta-microorganismo y estrés abiótico (Gupta *et al.*, 2013; Dommes *et al.*, 2018).

Protección frente a insectos plaga

La investigación en ARNi en el campo de la entomología, ha aportado en el estudio de diferentes funciones, regulación y expresión de genes mediante el empleo de diferentes modelos de insectos. El enfoque hacia el control de plagas ha sido dirigido al bloqueo de genes específicos involucrados en el desarrollo, la reproducción u otros, vitales en la supervivencia del insecto (de Andrade y Hunter, 2016). Por lo anterior, es necesario conocer el ciclo de vida y la fisiología del insecto blanco y también algunas variables como el método de administración y dosis, propagación sistémica del ARNi, tamaño de las moléculas de ARNdc, duración del efecto silenciador, sistemas de producción masiva y formulaciones, entre otras (Jain *et al.*, 2020; Borah y Konakalla, 2021).

Producción y aplicación

La aplicación de la tecnología ARNi depende de la calidad, estabilidad y eficiencia de la producción a gran

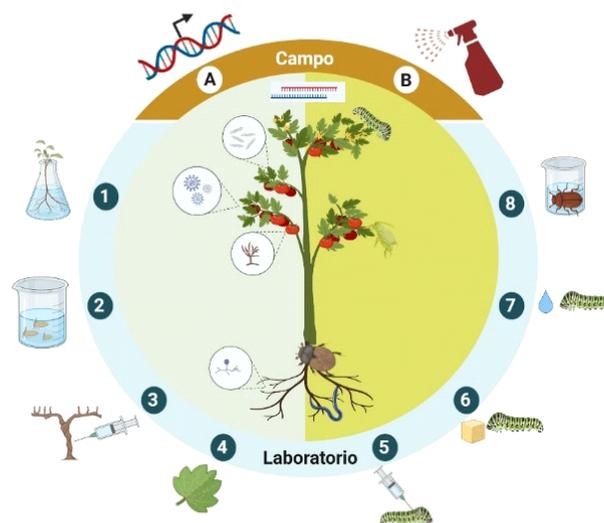


Figura 1. Diferentes estrategias para el control de fitopatógenos e insectos plaga a partir del uso de ARNi en campo y en ensayos de laboratorio. (A) HIGS. (B) SIGS. El lado izquierdo representa los fitopatógenos más comunes (bacterias, virus y hongos), mientras que el derecho muestra invertebrados plaga. Los números indican las principales estrategias de aplicación de ARNi en laboratorio. (1) Inmersión de raíces. (2) Inmersión de semillas. (3) Inyección de ARNi en tallo. (4) Inoculación mecánica de ARNi en hojas con el uso de abrasivos. (5) Inyección de ARNi en invertebrados. (6) Administración en dieta artificial. (7) Administración por gota. (8) Inmersión de insectos. Imagen creada en BioRender.com

escala del ARNdc. En este sentido, existen diferentes métodos para su obtención: la síntesis enzimática, que involucra una transcripción *in vitro* mediada por la polimerasa del bacteriófago T7 y la síntesis en sistemas *in vivo* con células de *E. coli* HT115 (DE3) deficientes en ARNasa III, transformadas con el plásmido que contiene el inserto del gen de interés usualmente flanqueado por promotores que permiten la transcripción de cada una de las cadenas del ADN (Tenllado *et al.*, 2003). El uso de bacterias recombinantes proporciona ventajas debido a su fácil manipulación, rápido crecimiento y capacidad de contener plásmidos en su interior (Papić *et al.*, 2015). Otros sistemas eficientes para la obtención de ARNdc y ARNhp se han desarrollado en *P. syringae* (Niehl *et al.*, 2018) y *Saccharomyces cerevisiae* (Zhong *et al.*, 2019). Existen diversas estrategias para el control de fitopatógenos e insectos plagas, las cuales incluyen enfoques transgénicos (HIGS) y no transgénicos (SIGS) (Figura 1).

El uso de HIGS permite la obtención de cultivos transgénicos que desarrollarán inmunidad contra el patógeno, mediante la expresión de ARNdc endógenos (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a las limitantes que existen para el desarrollo de plantas transgénicas (carencia

Tabla 2. Ensayos experimentales basados en ARNi dirigidos a patógenos de plantas.

MICROORGANISMO OBJETIVO	ENFERMEDAD / PLANTA	TECNOLOGÍA ARNi empleada	GENES BLANCO**	REFERENCIA
HONGOS				
<i>Urémicas appendiculatus</i>	Óxido del frijol común / <i>Phaseolus vulgaris</i>	VIGS	14349PIC15plike, 15794unkn,05732chit, 05026fam26	Cooper y Campbell (2017)
<i>Verticillium dahliae</i>	Marchitez del algodón / <i>Gossypium hirsutum</i>	HIGS	VdRGS1	Xu et al. (2018)
<i>Fusarium graminearum</i>	Fusariosis de la espiga / <i>Hordeum vulgare</i>	SIGS y HIGS	CYP	Höfle et al. (2020)
VIRUS Y VIROIDES*				
TMV	Mosaico del tabaco / <i>Nicotiana tabacum</i>	Inoculación mecánica de ARNdc	P126 y CP	Konakalla et al. (2016)
ZYMV	Mosaico amarillo del zucchini / <i>Cucumis sativus</i> , <i>Citrus lanatus</i> cv Florida, <i>Cucurbita pepo</i> cv Americo	Inoculación mecánica de ARNdc	HC-Pro, CP	Kaldis et al. (2017)
PRSV	Mancha anular de la papaya / <i>Carica papaya</i>	Aplicación tópica de ARNdc		Vadlamudi et al. (2020)
BCMV	Mosaico común del frijol / <i>Vigna unguiculata</i> y <i>N. benthamiana</i>	SIGS con BioClay®	Nib, CP	Worral et al. (2019)
INSECTOS VECTORES				
<i>Diabrotica virgifera</i>	Maíz	Dietas artificiales con ARNdc, Plantas transgénicas	dvvgr, dvbol	Niu et al. (2017)
<i>Aphis gossypii</i>	Infestación de Cucurbitáceas	Dietas artificiales con ARNdc	CHS1	Ullah et al. (2020)
<i>Myzus persicae</i>	Infestación en <i>S. lycopersicum</i>	Plantas transgénicas con ARNip	Ace-1	Faisal et al. (2019)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Infestación en <i>S. tuberosum</i>	SIGS	Actina Mesh	Mehlhorn et al. (2020) Petek et al. (2020)

*TMV: Virus del mosaico del tabaco; ZYMV: virus del mosaico amarillo del zucchini; BCMV: virus de la necrosis del mosaico común del frijol; PRSV: virus de la mancha anular de la papaya; **14349PIC15plike: proteína tipo fosfatasa; 15794unkn: gen de función desconocida; 05732chit: quitinasa; 05026fam26: hidrolasa; VdRGS1: regulador de señalización de proteína C; CYP: citocromo P450 lanosterol C-14 α -desmetilasa; CP: proteína de cápside; P126: proteína supresora de silenciamiento; HC-Pro: proteína del componente auxiliar Nib: inclusión nuclear b; dvvgr y dvbol: genes involucrados en reproducción; CH1: quitina sintasa 1; Ace-1: Acetilcolinesterasa 1

de protocolos de transformación estandarizados, dificultad en la transformación genética de algunas especies de plantas, altos costos, preocupación sobre el uso de organismos genéticamente modificados (OGM)), se desarrolló una metodología basada en SIGS, la cual es más específica y respetuosa con el medio ambiente y menos perjudicial para la salud del consumidor (Wang y Jin, 2017; Wang et al., 2017).

La aplicación externa de ARNdc desnudos, es susceptible a la degradación por el efecto de las enzimas en el intestino de los insectos y factores ambientales (Taning et al., 2019). Por esto, el desarrollo de moléculas de ARNdc protegidas por liposomas, polímeros o nanopartículas, garantiza su integridad al ser consumidas por el insecto (Zhang et al., 201; Mitter et al., 2017). Otro tipo de aplicaciones exógenas utilizadas en laboratorio o en experimentos de pequeña escala, incluyen remojo de raíces o semillas, inyección de tronco, absorción de pecíolo y cebos insecticidas (Dalakouras et al., 2019, Liu et al., 2020).

Algunos de los numerosos ensayos experimentales realizados para entender la genómica funcional de las plantas se presentan en la Tabla 2, cuyos resultados promisorios podrían ser la base para futuros bioplaguicidas disponibles comercialmente en el mercado.

Bioseguridad y consideraciones regulatorias de los bioplaguicidas basados en ARNi

Antes de su comercialización, los bioplaguicidas basados en ARNi deben ser aprobados por parte de las entidades

regulatorias de cada país, por lo que se deben desarrollar estudios de bioseguridad, impacto medio ambiental de las moléculas y evaluación de efectos secundarios en microorganismos no objetivo (Taning et al., 2019).

La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) tiene directrices más exigentes, a partir del enfoque “basado en el proceso” en el que el uso de cualquier técnica de ingeniería genética presenta inconvenientes de seguridad y necesita supervisión regulatoria. Ninguna tecnología con ARNdc para el cultivo de plantas ha sido presentada a las autoridades europeas hasta ahora (Jalaluddin et al., 2018). De esta forma, la EFSA ha publicado varias revisiones sistemáticas para respaldar la evaluación de riesgos al usar ARNi en plantas (Christiaens et al., 2018; Dávalos et al., 2019), las cuales proporcionan una descripción general del ARNi y serán útiles para el desarrollo de lineamientos regulatorios para bioproductos basados en SIGS (Taning et al., 2019).

En Colombia, los alimentos destinados al consumo humano a partir de OGM, solo pueden ser comercializados hasta que cuenten con la autorización por parte del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). El proceso debe cumplir con los requerimientos de la Resolución 4525 de 2005, que evalúa la información técnico-científica relacionada a un evento asociado a OGM. Asimismo, la evaluación de riesgos para la toma de decisiones sobre la autorización o no de un alimento derivado de una planta genética-

Tabla 3. Productos basados en ARNi liberados al mercado o en espera de aprobación por entidades regulatorias.

Nombre /Compañía	Microorganismo	Gen silenciado *	Tipo	Situación actual	Referencias
Huanong N°1	PRSV (Virus de la mancha anular de la papaya)	<i>Rep</i>	Cultivo transgénico	Se comercializa en China	<i>Huanong No. 1 GM Approval Database</i>
Honey Sweet	PPV (Virus de la viruela de la ciruela)	<i>Cp</i>	Cultivo transgénico	Aprobación para consumo y cultivo en USA	(C-5 <i>GM Approval Database</i>)
SmartStax® PRO	Gusano de la raíz del maíz	<i>Snf7</i>	Cultivo transgénico	Disponible en 2022	Bayer (s.f.)
BRS FC401 RMD	VMDF (Virus del mosaico dorado del fríjol)	<i>Rep</i>	Cultivo transgénico	Se comercializa en Brasil	Souza et al. (2018)
RBMT21-129	PLRV (Virus del enrollamiento de la hoja de papa)	<i>Orf1, Orf2</i>	Cultivo transgénico	Aprobación para su uso en 7 países	<i>RBMT21-129 GM Approval Database</i>
Green Light BioScience	Escarabajo de la papa de Colorado	No reportado	Bioplaguicida	En espera de aprobación	Biosciences (2022)

**Rep*: gen que codifica para la replicasa; *Cp*: gen que codifica para la proteína de cápside; *Snf7*: gen que codifica para la sacarosa no fermentativa 7; *Rep*: gen que codifica para la proteína de replicación viral; *Orf1*: Replicasa; *Orf2*: helicasa.

mente modificada para consumo humano en Colombia, también se regula por convenios internacionales, como el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (Ley 740 de 2002) y el Codex Alimentarius (Decreto 977 de 1998, Alimentos transgénicos, s. f.).

Casos exitosos de uso de ARNi en agricultura

En los últimos años, las solicitudes de aprobación de patentes relacionadas con el uso de la tecnología ARNi en plantas, se ha incrementado casi 100 veces (Jalaluddin et al., 2018). Estas patentes se distribuyen entre la industria, la academia y agencias de gobierno, e incluyen métodos para la producción de ARNi, aplicaciones, formulaciones y cultivos transgénicos. En la Tabla 3, se reportan algunos de los productos disponibles en el mercado o que están próximos a su comercialización.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los bioplaguicidas constituyen un mercado pequeño (aproximadamente US \$3000-4000 millones) en comparación con el mercado de pesticidas a nivel global (US \$61000 millones). A pesar de esto, se percibe un rápido crecimiento y se prevé que tengan un aumento anual entre el 10 y 20% (Marrone, 2019).

Los plaguicidas basados en ARNi, son más ecológicos y específicos, lo que evita el daño a otras especies benéficas (de Schutter et al., 2022). Su uso y comercialización constituye una poderosa herramienta para sustituir o

disminuir el uso de plaguicidas químicos, cuyos efectos tóxicos para el ecosistema y el ser humano, ha llevado a la resistencia de diversas plagas a estos productos y a una gran contaminación ambiental.

De acuerdo con lo anterior, los trabajos de investigación deben centrarse en:

- Diseñar moléculas de ARNdc más estables y desarrollar estrategias eficientes para su liberación en las células blanco, ya que las ARNasas endógenas del intestino de los insectos degradan el ARNdc (Kourti et al., 2017).
- Entender los mecanismos de resistencia de los insectos a bioplaguicidas con ARNi, para el diseño de tecnologías efectivas (Khajuria et al., 2018).
- Indagar cómo se filtran y degradan las moléculas de ARNdc en el medio ambiente, y si representan un riesgo para microorganismos no objetivo.
- Generar acuerdos y alianzas estratégicas entre la academia, el sector privado y el gobierno, con el fin de comercializar bioproductos basados en ARNi y establecer directrices regulatorias claras que permitan el uso de esta tecnología (Taning et al., 2019).

REFERENCIAS

Alimentos transgénicos. (s. f.). Ministerio de Salud y Protección. <https://www.minsalud.gov.co/>

- proteccionsocial/Paginas/Alimentos-transg%C3%A9nicos.aspx
- Axtell, M. J. (2013). Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annu. Rev. Plant Biology*, 64 (1), 137–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>
- Bayer. (s. f.). *SmartStax® PRO with RNAi Technology*. <https://traits.bayer.com/corn/Pages/SmartStax-PRO.aspx>
- Biosciences, G. (2022). *In the pipeline: Colorado potato beetle*. Greenlight Bioscience. <https://www.greenlightbiosciences.com/in-the-pipeline-colorado-potato-beetle/>
- Borah, M., & Konakalla, N. RNAi technology: a novel platform in crop protection. (2021). *Emerging Trends in Plant Pathology* pp. 561-575 https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4_24
- Boualem, A., Dogimont, C., & Bendahmane, A. (2016). The battle for survival between viruses and their host plants. *Current Opinion in Virology*, 17, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.12.001>
- C-5 | GM Approval Database- ISAAA.org. (s. f.). ISAAA. <https://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=236>
- Christiaens, O., Dzhambazova, T., Kostov, K., Arpaia, S., Reddy Joga, M., Urru, I., Sweet, J., & Smagghe, G. (2018). *Literature review of baseline information on RNAi to support the environmental risk assessment of RNAi-based GM plants Energy and Sustainable Economic Development (ENEA), Italy*. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1424>
- Cooper, B., & Campbell, K. B. (2017). Protection Against Common Bean Rust Conferred by a Gene-Silencing Method. *Phytopathology*, 107(8), 920–927. <https://doi.org/10.1094/phyto-03-17-0095-r>
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L. & Papadopoulou, K. (2019). Genetically Modified Organism-Free RNA Interference: Exogenous Application of RNA Molecules in Plants. *Plant Physiology*, 182(1), 38–50. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- Dávalos, A., Henriques, R., Latasa, M., Laparra, M. & Coca, M. (2019). Literature review of baseline information on non-coding RNA (ncRNA) to support the risk assessment of ncRNA-based genetically modified plants for food and feed. EFSA Support. 220 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1688>
- de Andrade, E. C., & Hunter, W. B. (2016). RNA Interference – Natural Gene-Based Technology for Highly Specific Pest Control (HiSPeC). *RNA Interference*. Published. <https://doi.org/10.5772/61612>
- de Schutter, K., Taning, C., van Daele, L., van Damme, E., Dubruel, P., & Smagghe, G. (2022). RNAi-Based Biocontrol Products: Market Status, Regulatory Aspects, and Risk Assessment. *Frontiers in Insect Science*, 1. <https://doi.org/10.3389/finsc.2021.81803>
- Dommes, A. B., Gross, T., Herbert, D. B., Kivivirta, K. I., & Becker, A. (2018). Virus-induced gene silencing: empowering genetics in non-model organisms. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 757–770. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery411>
- Dominska, M., & Dykxhoorn, D. M. (2010). Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *Journal of Cell Science*, 123(8), 1183–1189. <https://doi.org/10.1242/jcs.066399>
- Faisal, M., Abdel-Salam, E. M., Alatar, A. A., Saquib, Q., Alwathnani, H. A., & Canto, T. (2019). Genetic Transformation and siRNA-Mediated Gene Silencing for Aphid Resistance in Tomato. *Agronomy*, 9(12), 893. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120893>
- Fire, A. (1998). Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806–811
- Gregory, R., Chendrimada, T., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2005). Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell*, 123, 631–640.
- Guo, Z., Li, Y., & Ding, S. W. (2018). Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nature Reviews Immunology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0071-x>
- Gupta, B., Saha, J., Sengupta, A., & Gupta, K. (2013). Recent Advances on Virus Induced Gene Silencing (VIGS): Plant Functional Genomics. *J Plant Biochem Physiol*, 1(5), 1000e116. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000e116>
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., & Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293 (5532), 1146-50.
- Hannon G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, 11:418 (6894), 244-51. <https://doi.org/10.1038/418244a>
- Höfle, L., Biedenkopf, D., Werner, B. T., Shrestha, A., Jelonek, L., & Koch, A. (2020). Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. *RNA Biology*, 17(4), 463–473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>
- Huanong No. 1 | GM Approval Database- ISAAA.org. (s. f.). ISAAA. <https://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=229&Event=Huanong%20No.%201>
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 22–32. <https://doi.org/10.1038/nrm2321>
- Huvenne, H. & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol*, 56(3), 227-35. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.00>

- Jain, R. G., Robinson, K. E., Asgari, S., & Mitter, N. (2020). Current scenario of RNAi -based hemipteran control. *Pest Management Science*, 77(5), 2188–2196. <https://doi.org/10.1002/ps.6153>
- Jalaluddin N., Othman R., & Harikrishna J. (2018). H Global trends in research and commercialization of exogenous and endogenous RNAi technologies for crops. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 39(1), 67–78 <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1496064>
- Jin, Y., Zhao, J. H., & Guo, H. S. (2021). Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi. *Current Opinion in Virology*, 46, 65–72. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2020.12.001>
- Kaldis, A., Berbati, M., Melita, O., Reppa, C., Holeva, M., Otten, P., & Voloudakis, A. (2017). Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 883–895. <https://doi.org/10.1111/mp.12572>
- Khajuria, C., Ivashuta, S., Wiggins, E., Flagel, L., Moar, W., Pleau, M., et al. (2018). Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *PLoS ONE*, 13(5), e0197059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197059>
- Koch, A., & Kogel, K.H. (2014). New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol J.*, 12(7), 821–31. <https://doi.org/10.1111/pbi.12226>
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Roszbach, O., Abdellatef, et al. (2016). An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS Pathogens*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Konakalla, N.C.; Kaldis, A.; Berbati, M.; Masarapu, H. & Voloudakis, A. (2016). Exogenous application of double-stranded RNA molecules from *TMV p126* and *CP* genes confers resistance against *TMV* in tobacco. *Planta*, 244, 961–969.
- Kourti, A., Swevers, L., & Kontogiannatos, D. (2017). In Search of New Methodologies for Efficient Insect Pest Control: “The RNAi “Movement”. In (Ed.), *Biological Control of Pest and Vector Insects*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66633>
- Kurihara, Y., & Watanabe, Y. (2004). *Arabidopsis* microRNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12753–12758. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403115101>
- Li, F., & Wang, A. (2019). RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing. *Trends in Microbiology*, 27(9), 792–805. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.05.007>
- Liu, S., Jaouannet, M., Dempsey, D. A., Imani, J., Cous-tau, C., & Kogel, K. H. (2020). RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnology Advances*, 39, 107463. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107463>
- Marrone, P.G. (2019). Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*. Published. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>
- Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M. F., & Matzke, A. J. (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et biophysica acta*, 1677(1-3), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.10.015>
- McLoughlin, A.G., Wytinck, N., Walker, P.L., Girard, I.J., Rashid, K.Y., de Kievit, T., et al. (2018). Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25434-4>
- Mehlhorn, S. G., Geibel, S., Bucher, G., & Nauen, R. (2020). Profiling of RNAi sensitivity after foliar dsRNA exposure in different European populations of Colorado potato beetle reveals a robust response with minor variability. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166, 104569. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104569>
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R.G., Taochy, C., & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3(2), 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans., *The Plant Cell*, 2(4), 279–289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Niehl, A., Soininen, M., Poranen, M., & Heinlein, M. (2018). Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. *Plant Biotechnology Journal*, 16(9), 1679–1687. <https://doi.org/10.1111/PBI.12904>
- Niu, X., Kassa, A., Hu, X., Robeson, J., McMahon, M., Richtman, N. M., et al. (2017). Control of Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Reproduction through Plant-Mediated RNA Interference. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12638-3>
- Ozata, D.M., Gainetdinov, I., Zoch, A., O'Carroll, D., & Zamore, P.D. (2019). PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet.*, 20(2), 89–108. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0073-3>
- Papić, L., García, K., & Romero, J. (2015). Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de

- control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(3), 388-401. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-1>
- Petek, M., Coll, A., Ferenc, R., Razinger, J., & Gruden, K. (2020). Validating the Potential of Double-Stranded RNA Targeting Colorado Potato Beetle Mesh Gene in Laboratory and Field Trials. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.0125>
- Ramakrishnan, M., Satish, L., Sharma, A., Kurungara Vinod, K., Emamverdian, A., Zhou, M. and Wei, Q. (2022). Transposable elements in plants: Recent advancements, tools and prospects. *Plant Molecular Biology Reporter*. <https://doi.org/10.1007/s11105-022-01342-w>
- RBMT21-129 | GM Approval Database- ISAAA.org. (s. f.). ISAAA. <https://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/event/default.asp?EventID=202&Event=RBMT21-129>
- Rego-Machado, C., Nakasu, E., Silva, J., Lucinda, N., Nagata, T., & Inoue-Nagata, A. K. (2020). siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79360-5>
- Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6(22), 3343-3353.
- Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2010). RNAi in plants: recent developments and applications in agriculture. En A. Catalano (Ed.), *Gene silencing: theory techniques and applications* (pp. 183-199). Nova Science Publishers.
- Singh, D., Chaudhary, S., Kumar, R., Sirohi, P., Mehla, K., Sirohi, A., Kumar, S., Chand, P., & Singh, P. K. (2016). RNA Interference Technology — Applications and Limitations. En I. Abdurakhmonov. (Ed.), *RNA Interference* (pp.21-36). Intech Open. <https://doi.org/10.5772/61760>
- Song, X. S., Gu, K. X., Duan, X. X., Xiao, X. M., Hou, Y. P., Duan, Y. B., Wang, J. X., Yu, N., & Zhou, M. G. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Molecular plant pathology*, 19(12), 2543-2560. <https://doi.org/10.1111/mpp.12728>
- Souz T., Faria J., Aragã F., Del Peloso, M., Wendland A., Aguiar, M., Quintela E., & Melo, C. (2018). Agronomic Performance and yield stability of the RNA Interference-Based *Bean golden mosaic virus*-Resistant Common Bean. *Crop. Sci.*, 58(), 579-591.
- Taliansky, M., Samarskaya V., Zavriev, S., Fesenko, I., Kalinina, N., & Love, A. (2021). RNA-Based Technologies for Engineering Plant Virus Resistance. *Plants*, 10 (1). <https://doi.org/10.3390/plants10010082>
- Taning, C., Arpaia, S., Christiaens, O., Dietz-Pfeilstetter, A., Jones, H., Mezzetti, B. Sabbadini, S., Sorteberg, S., Sweet, J., Ventura, V., & Smagghe, G. (2019). RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Manag Sci*. <https://doi.org/10.1002/ps.5686>
- Tenllado, F., Martinez-Garcia, B., Vargas, M., & Diaz-Ruiz, J. R. (2003). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, 3, 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-3>.
- Ullah F., Gul H., Wang X., Ding Q., Said F, Gao X., Desneux N., & Song, D. (2020) RNAi-Mediated Knockdown of Chitin Synthase 1 (CHS1) Gene Causes Mortality and Decreased Longevity and Fecundity in *Aphis gossypii*. *Insects*, 11, 22. <https://doi.org/10.3390/insects11010022>
- Vadlamudi, T., Patil, B. L., Kaldis, A., Sai Gopal, D. V. R., Mishra, R., Berbati, M., & Voloudakis, A. (2020). DsRNA-mediated protection against two isolates of Papaya ringspot virus through topical application of dsRNA in papaya. *Journal of Virological Methods*, 275, 113750. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113750>
- Wang, M., & Jin, H. (2017). Spray-Induced Gene Silencing: A Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends in Microbiology*, 25(1), 4-6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
- Wang, M., Thomas, N., & Jin, H. (2017). Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.003>
- Whangbo, J. S., & Hunter, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24(6), 297-305. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2008.03.007>
- Xu, J., Wang, X., Li, Y., Zeng, J., Wang, G., Deng, C., & Guo, W. (2018). Host-induced gene silencing of a regulator of G protein signalling gene (VdRGS1) confers resistance to *Verticillium* wilt in cotton. *Plant Biotechnology Journal*, 16(9), 1629-1643. <https://doi.org/10.1111/pbi.12900>
- Yuan, C., Wang, J., Harrison, A. P., Meng, X., Chen, D., & Chen, M. (2015). Genome-wide view of natural anti-sense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 22(3), 233. <https://doi.org/10.1093/DNARES/DSV008>
- Zhang, X., Mysore, K., Flannery, E., Michel, K., Severson, D. W., Zhu, K. Y., & Duman-Scheel, M. (2015). Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *J. Vis. Exp.*, 97, 52523. <https://doi.org/10.3791/52523>
- Zhong C., Smith N.A., Zhang D., Goodfellow S., Zhang R., Shan W., & Wang M.B. (2019). Full-Length Hairpin RNA Accumulates at High Levels in Yeast but Not in Bacteria and Plants. *Genes (Basel)*, 10, E458. <https://doi.org/10.3390/genes10060458>