

Considerations about interference RNA for the control of fungal diseases in Mexican and Latin American agriculture

Consideraciones sobre el ARN de interferencia para el control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas en México y América Latina

Oswaldo Jhosimar Couoh-Dzul, ¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida C.P. 97205, Yucatán, México; **Karla Gisel Carreón-Anguiano**¹, **Oscar A. Moreno-Valenzuela**, ²Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida C.P. 97205, Yucatán, México; **Blondy Canto-Canché***¹,

*Corresponding autor: cantocanche@cicy.mx.

Received: October 30, 2022.

Accepted: June 01, 2023.

Couoh-Dzul OJ, Carreón-Anguiano KG, Moreno-Valenzuela OA and Canto-Canché B. 2023. Considerations about interference RNA for the control of fungal diseases in Mexican and Latin American agriculture. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(3): 479-513.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-5>

First DOI publication: June 15, 2023.

Primera publicación DOI: 15 de Junio, 2023.

Abstract. The control of phytopathogens is key for food security. In the last decade, the use of interference RNA (iRNA) has been proposed as a technological tool for controlling diseases and pests in agriculture. Although different approaches have been described, such as the use of “Host-Induce Gene Silencing” (HIGS) and “Virus-Induce Gene Silencing” (VIGS), more recently a non-transgenic and environmentally friendly approach has emerged, called “Spray -Induce Gene Silencing”

Resumen. El control de fitopatógenos es fundamental para la seguridad alimentaria. En la última década se ha propuesto el uso de ARN de interferencia (iRNA) como herramienta tecnológica para el control de enfermedades y plagas agrícolas. Aunque se han descrito distintos enfoques como el uso de “Host-Induce Gene Silencing” (HIGS) y de “Virus-Induce Gene Silencing” (VIGS), más recientemente ha surgido un enfoque no transgénico y amigable con el ambiente, denominado “Spray-Induce Gene Silencing” (SIGS), que hace uso de cadenas dobles de ARN (dsRNA) “desnudos”. Esta revisión analiza trabajos recientes que hacen uso del dsRNA, en especial del SIGS, para el control de hongos fitopatógenos; se enfatizan aspectos de su eficacia, inocuidad en la salud humana y su estabilidad en el medio ambiente. Se enfocan también importantes problemas fitosanitarios en México y América Latina que podrían ser abordadas con el uso del SIGS. La conclusión de esta revisión es que SIGS es una tecnología con verdadero potencial para el control de hongos fitopatógenos en plantas

(SIGS), which uses double-stranded “naked” RNA (dsRNA). This review discusses recent reports on the use of dsRNA, especially SIGS, to control phytopathogenic fungi; emphasizing factors such as efficacy, safety in terms of human health and its stability in the environment. It also focuses on important phytosanitary problems in Mexico and Latin America that can be addressed with SIGS. This review concludes that SIGS technology has real potential to be used to control phytopathogenic fungi on plants in the field and on postharvest fruits. At the end, the critical tasks and the lines of research that must be carried out to promote the SIGS to make it a reality are considered.

Key words: Gene silencing, dsRNA, SIGS, plant pathogens

The constant growth of the population demands a guarantee for food production, making it a global challenge. It has been estimated that by 2050, food demand will have increased more than 50% (van Dijk *et al.*, 2021), with the added responsibility of increasing productivity without causing a further environmental impact. The challenge is even greater, because pests and diseases are serious and constant constraints on food security. In particular, phytopathogenic fungi cause approximately 30% of all losses in agricultural crops in the world (Savary *et al.*, 2019). Currently, the main control method is the use of chemical fungicides, which causes a strong pressure of selection on pathogens, favoring a greater genetic diversity and the appearance of more resistant strains in their populations, as well as problems in the environment and in human health (Brito *et al.*, 2020). This makes it increasingly urgent to protect crops without depending on chemical fungicides. One option that offers great opportunities is the use of interference RNA (iRNA), which is the subject of this study.

de campo y en frutos postcosecha. Al final se plantean las rutas críticas e investigaciones que deben abordarse para que eventualmente el uso de SIGS pueda concretarse.

Palabras clave: Silenciamiento génico, dsRNA, SIGS, patógenos vegetales

El constante crecimiento de la población demanda garantizar la producción de alimentos, convirtiéndose en un reto mundial. Se estima que para el 2050 la demanda de alimentos incrementa más del 50% (van Dijk *et al.*, 2021), con la responsabilidad además de incrementar la productividad sin provocar mayor impacto ambiental. El desafío es aún mayor, porque las plagas y enfermedades ponen en constante riesgo la seguridad alimentaria. En particular, los hongos fitopatógenos provocan aproximadamente 30% de pérdidas en los cultivos agrícolas en el mundo (Savary *et al.*, 2019). Actualmente el principal método de control es el uso intensivo de fungicidas químicos, ocasionando una fuerte presión de selección sobre los patógenos, favoreciendo mayor diversidad genética y la aparición de aislados más resistentes en sus poblaciones, así como problemas en el medio ambiente y salud humana (Brito *et al.*, 2020). Por estas razones, es cada vez más apremiante proteger los cultivos sin depender de fungicidas químicos. Una opción que ofrece grandes oportunidades es el uso del ARN de interferencia (iRNA), sobre lo cual se tratará la presente revisión.

El iRNA es un mecanismo conservado, presente en la mayoría de las células eucariotas, que se relaciona con la represión de la transcripción (regulación transcripcional de la expresión génica) y/o degradación del ARN mensajero (mRNA), o inhibición de la traducción (regulación post-transcripcional); también participa en la defensa de los organismos contra elementos extraños (García-Ruiz *et al.*,

Interference RNA is a conserved mechanism, present in most eukaryotic cells, and associated with the repression of the transcription (transcriptional regulation of the gene expression) and/or degradation of the messenger RNA (mRNA), or inhibition of the translation (post-transcriptional regulation). It also participates in the defense of organisms against foreign elements (García-Ruiz *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2018). This mechanism, known as gene silencing, is triggered by double-stranded RNA (dsRNA), which can have the structure of a double strand or a hairpin structure (Figure 1). The small RNAs (sRNAs) that trigger the silencing can be divided into two large groups, depending on their origin: micro-RNAs (miRNA) and small interfering RNA (siRNA).

The miRNAs come from the transcription of the MIR genes; the initial transcript is called pri-miRNA and it forms a hairpin structure, recognized by a Dicer-like ribonuclease III (DCL), which cuts them into smaller structures called pre-miRNA. DCL cuts again on the pre-RNAs and the miRNAs are produced.

On the other hand, siRNAs are produced through the transcription of repeated sequences or of transposition elements, or through the replication in the genome of sequences of viral origin, or by the secondary amplification of dsRNA after the sRNA were cut by Dicer, or by hybridizations of complementary regions between two independent transcripts (that codify different proteins). The original dsRNAs, produced by either one of these paths, are processed by DCL in smaller fragments. Both sRNAs (miRNA and siRNA) are fragments of approximately 19-24 nucleotides (nt) in length, and are recruited by the protein Argonaut (AGO) and processes in the RNA-induced silencing complex (RISC). The RISC complex uses one of the strands in the sRNA to guide the specific degradation of the target mRNA, which sRNA is complementary with;

2016; Rosa *et al.*, 2018). Este mecanismo, conocido como silenciamiento génico, es desencadenado por estructuras de ARN de doble cadena (siglas en inglés dsRNA, por “double strand RNA”), que pueden tener una estructura de dúplex lineales o una estructura tipo “hairpin” (horquilla, también llamada estructura tallo-asa) (Figura 1). Los sRNAs (por “small RNA”, o ARN pequeños) que desencadenan el silenciamiento pueden dividirse en dos grandes grupos según su origen, los micro-ARNs (miRNA) y los pequeños ARN de interferencia (siRNA, de small interfering RNA).

Los miRNA provienen de la transcripción de los genes MIR; el transcrito inicial es llamado pri-miRNA y forma una estructura de horquilla que es reconocida por una ribonucleasa III tipo Dicer (DCL, por Dicer-like), que los corta a estructuras más pequeñas llamadas pre-miRNA. DCL hace un nuevo corte sobre los pre-RNA y se producen los miRNA.

Los siRNA por su parte, son producidos a través de la transcripción de secuencias repetidas o de elementos de transposición, o por la replicación en el genoma de secuencias de origen viral, o por la amplificación secundaria de dsRNA después de que los sRNA fueron cortados por Dicer, o por hibridaciones de regiones complementarias entre dos transcritos independientes (que codifican diferentes proteínas). Los dsRNA originales, producidos por cualquiera de estas vías, son procesados por DCL en fragmentos más pequeños.

Ambos sRNA (miRNA y siRNA), son fragmentos de aproximadamente 19-24 nucleótidos (nt), y son reclutados por la proteína Argonaut (AGO) y procesados en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por “RNA-induced silencing complex”). El complejo RISC usa una de las dos cadenas del sRNA para guiar la degradación específica del mRNA diana o blanco, con el cual el sRNA es complementario; de este modo el sistema regula

Mecanismos naturales de producción de sRNA

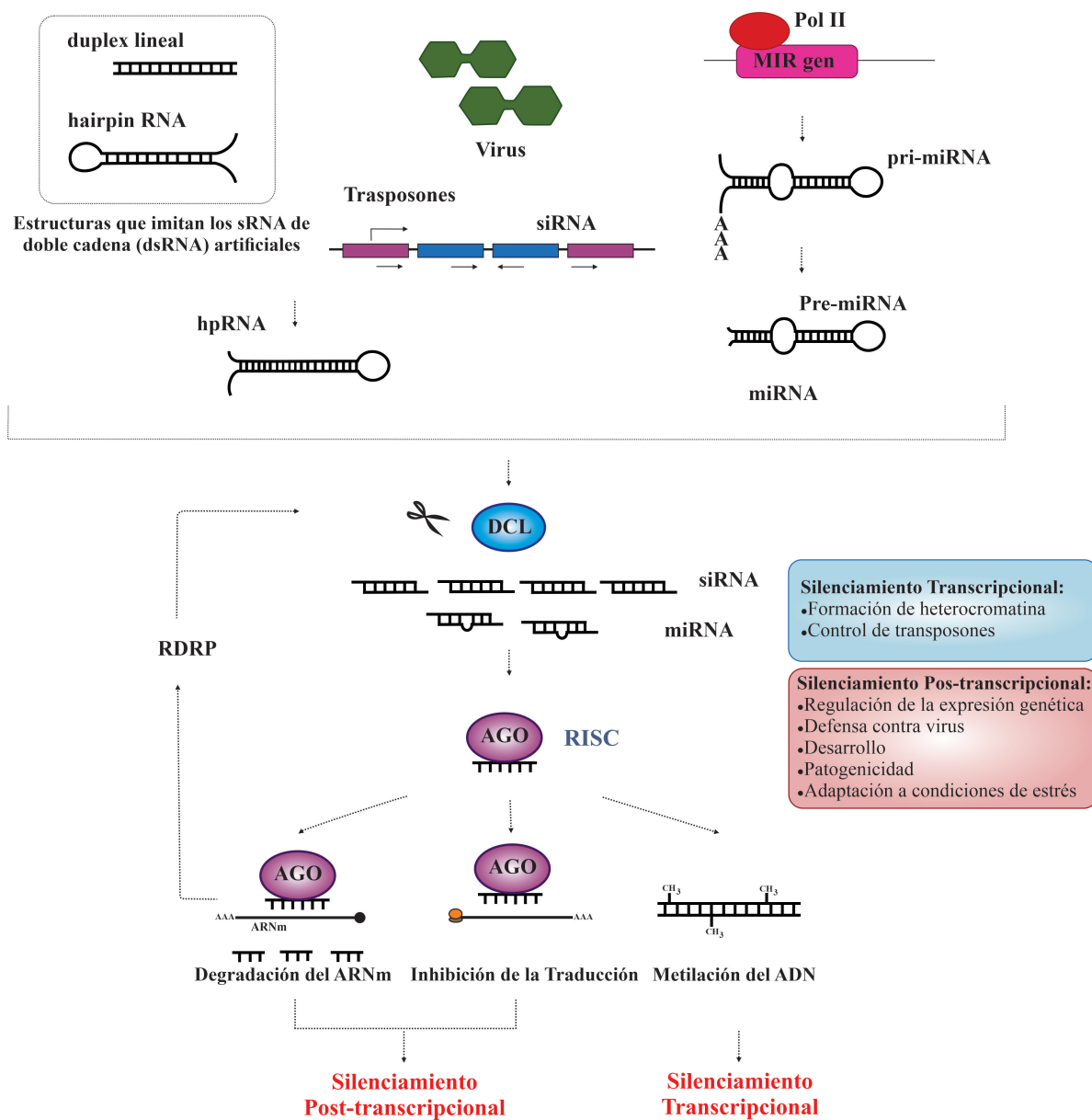


Figure 1. Mechanisms of small RNA (sRNA) production in eukaryotes. sRNAs comprise the small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA). On the left, the scheme shows the different biosynthetic pathways to produce siRNA, which may have structure of lineal-double strand DNA, or hairpin (stem-loop) structure. These two structures (lineal double strand DNA and hairpin) are those imitated by the artificial double strand sRNA (dsRNA), it means, those designed for biotechnology. On the right, the picture shows the biosynthesis of miRNA which come from MIR genes, which are transcribed to pri-RNA. Silencing starts when the pri-RNA or siRNA precursors are recognized and cut by DCL (Dicer protein), producing siRNA and pre-RNA respectively. The last one is cut again by DCL into miRNA. siRNA and miRNA bind AGO (Argonaut protein) becoming into RISC (RNA-induced silencing complex). In RISC, one siRNA or miRNA strand is used to guide transcriptional or post-transcriptional silencing. In fungi, iRNA regulates processes of development, defense, and pathogenicity on transcriptional and post-transcriptional levels.

Figura 1. Mecanismos de producción de los ARN pequeños (sRNA) en eucariotas. Los sRNA comprenden los pequeños ARN de interferencia (siRNA) y los micro ARNs (miRNA). En la izquierda se presentan las diferentes rutas de biosíntesis de los siRNA, los cuales pueden tener la forma estructural de doble cadena lineal o de hairpin (horquilla o tallo-asa). Estas dos estructuras (dúplex lineal y hairpin) son las estructuras que imitan los sRNA de doble cadena (dsRNA) artificiales, es decir, diseñados con fines biotecnológicos. A la derecha se observa la biosíntesis de los miRNA que provienen de los genes MIR, a partir de los cuales se transcriben los pri-RNA. El silenciamiento inicia cuando los pri-RNA o los precursores de los siRNA son reconocidos y cortados por DCL (proteína Dicer), generando los siRNA y los pre-miRNA respectivamente. Estos últimos son nuevamente cortados por DCL a miRNA. Los siRNA y miRNA posteriormente se unen a la proteína AGO (argonauta), formando el complejo RISC (por “RNA-induced silencing complex” o complejo de silenciamiento inducido por ARN). En RISC, una hebra del siRNA o del miRNA es usada para guiar el silenciamiento transcripcional o post transcripcional. En hongos el sistema de silenciamiento regula, tanto a nivel transcripcional como post transcripcional, procesos de desarrollo, defensa y patogenicidad.

in this way, the system regulates the expression of genes in a sequence-specific way. Figure 1 outlines the production and processing of both types of sRNAs: miRNA and siRNA.

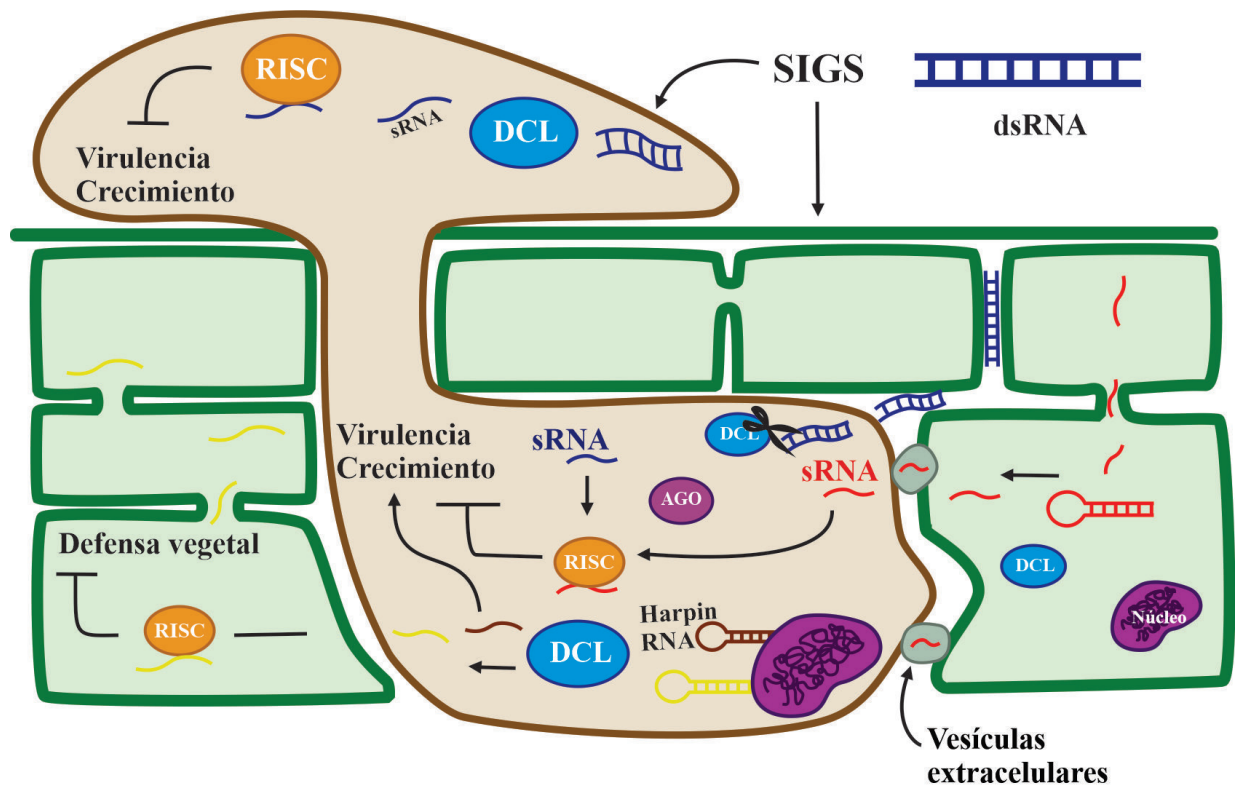
Plants have the natural ability to exchange sRNAs with their pathogens in a process called Crosskingdom iRNA, which plants can use to fight pathogens (Hudzik *et al.*, 2020) (Figure 2). In biotechnology there are three approaches to using iRNA to protect crops against pathogens and pests: 1) the expression of transgenes in the plant, or host-induced gene silencing (HIGS). This is a strategy to silence the genes of pathogens through the production *in vivo* of sRNA complementary to the sequences of the pathogen, using genetic engineering and the transformation with *Agrobacterium tumefaciens*, resulting in a plant that is a genetically modified organism, or GMO

la expresión de genes de una manera específica a la secuencia. La Figura 1 esquematiza la producción y procesamiento de ambos tipos de sRNAs: miRNA y siRNA.

Las plantas tienen la habilidad natural de intercambiar sRNAs con sus patógenos, en un proceso denominado “Crosskingdom iRNA” o intercambio cruzado entre reinos, con lo cual las plantas pueden combatir a los patógenos (Hudzik *et al.*, 2020) (Figura 2). En la biotecnología, existen tres enfoques para aprovechar el iRNA para proteger los cultivos: 1) la expresión de transgenes en la planta, llamado HIGS por “host-induced gene silencing” (silenciamiento génico por la producción de dsRNA por el hospedante). HIGS es una estrategia para silenciar los genes de los patógenos a través de la producción *in vivo* de sRNA complementarios a las secuencias del patógeno, mediante el uso de la

(Halder *et al.*, 2022; Ghag *et al.*, 2019; Koch and Wassenegeger, 2021). Most of the genes that have been targeted in fungi have been structural genes, development regulators and pathogenicity factors (Yin and Hulbert, 2015). 2) Use of recombinant viral vectors, which when replicated produce sRNAs in plants and these are directed to a fragment of the

ingeniería genética y a través de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, resultando en una planta que es un organismos genéticamente modificado u OGM (Halder *et al.*, 2022; Ghag *et al.*, 2019; Koch y Wassenegeger, 2021). La mayoría de los genes que han sido dianas en los hongos han sido genes estructurales, reguladores del desarrollo



Naturales	Sintéticos
sRNA fúngicos	sRNA derivados de dsRNA
Hairpin RNA fúngicos	
sRNA vegetales	
Hairpin RNA vegetales	

Figure 2. Global representation of sRNA movement and their functions between the fungus and plant host. The plant sRNA is delivered in extracellular vesicles, targeting the fungal cell to silence fungal genes involved in growth and virulence. The fungal sRNAs promote its virulence and growth, as well as they suppress the plant defense. This process of interchanging sRNA between the pathogen and the host is called “Cross-kingdom iRNA”. When exogenous double strand sRNA, dsRNA, (designed to target important fungal genes involved in growth and virulence) are sprayed directly on the fungus or on the leaf, they are later absorbed by the fungus resulting in siRNA that silence the targeted genes. The figure also shows that artificial silencing (designed with biotechnological purposes), occur in the pathosystem at same time as host genes silencing because natural sRNAs delivered by the fungus, as well as fungal genes silencing because natural sRNAs delivered by the host.

Figura 2. Representación global del movimiento de sARNs y sus funciones entre el hongo y el hospedante. Los sRNA vegetales son enviados a través de vesículas extracelulares hacia la célula fúngica para silenciar genes involucrados en su crecimiento o virulencia. Los sRNA fúngicos promueven la virulencia y el crecimiento del hongo, y también bloquean la respuesta vegetal de defensa. Este proceso de intercambio de sRNAs entre patógenos y hospedantes es llamado “Crosskingdom iRNA” (interferencia entre reinos mediado por ARN). Cuando los sRNA de doble cadena (dsRNA) exógenos (diseñados contra dianas importantes, generalmente involucrados en el crecimiento fúngico y/o su virulencia), son asperjados directamente sobre el hongo o sobre la hoja, son absorbidos por el hongo, dando lugar a siRNA que bloquean los genes diana que se seleccionaron. La figura muestra también que el silenciamiento artificial (diseñado con fines biotecnológicos), ocurre en el patosistema al mismo tiempo que el silenciamiento de genes del hospedante por envío de sRNAs naturales por parte del hongo, y también silenciamiento de genes del hongo por envío de sRNAs naturales por parte del hospedante.

transcribed target, thus triggering its silencing. This procedure is known as virus-induced gene silencing (VIGS) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). An example of this is the use of the Barley stripe mosaic virus (BSMV) to silence important genes of the fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* to avoid the infection of wheat (*Triticum aestivum*) (Qi *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 201). 3) The exogenous application of dsRNA, homologous to genes exclusive to the pathogen. This method is known as spray-induced gene silencing (SIGS) (Wang and Jin, 2017). Both HIGS and VIGS imply the use of genetically modified organisms (GMOs); the former, because it requires the genetic transformation of the plants of interest and the latter, because of the genetic modification of the viruses, with the constructs of expression, to replicate in plant cells and transcribe the sRNAs (Figure 3). Table 1 shows a summary of the comparison of the three techniques, as well as the advantages and disadvantages of each one. In several countries, the regulations on the use of

y factores de patogenicidad (Yin y Hulbert, 2015). 2) uso de vectores virales recombinantes, que al replicarse producen los sRNA en las plantas, dirigidos contra un fragmento del transcrito diana y de esta manera desencadena su silenciamiento. Este procedimiento se conoce como VIGS, por “virus-induced gene silencing” (silenciamiento génico por dsRNA producidos con base en un vector viral) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). Un ejemplo es el uso del Virus del mosaico estriado de la cebada (*Barley stripe mosaic virus*-BSMV) para el silenciamiento de genes importantes del hongo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* y evitar la infección del trigo (*Triticum aestivum*) (Qi *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 201). 3) la aplicación exógena de dsRNA, homólogos a genes exclusivos del patógeno. A este método se le conoce como SIGS, por “spray induced gene silencing”, o silenciamiento génico inducido por aspersión de dsRNA (Wang y Jin, 2017). Tanto HIGS como VIGS implican el manejo de organismos genéticamente modificados (OGMs); el

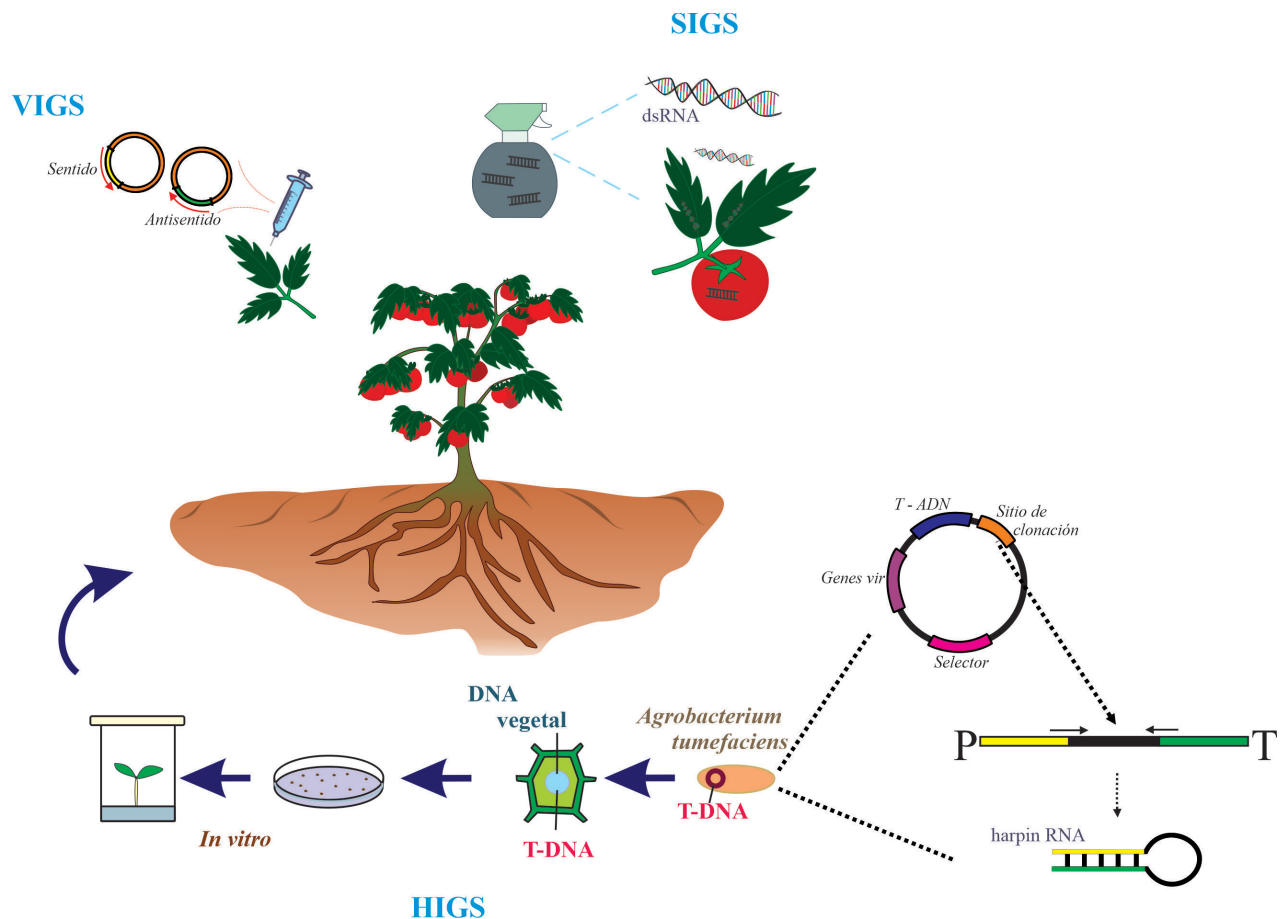


Figure 3. Schematic representation of the different control approaches based on the interfering RNA mechanism. HIGS (host induced gene silencing); in HIGS the host is transformed and genetically modified for endogenous generation of artificial sRNA; silencing cassette is introduced by *Agrobacterium tumefaciens* with a T-DNA cassette in which there are cloning the sense fragment (yellow square, arrow with right end), the antisense fragment (green square, arrow with left end), both flanking an independent sequence (black rectangle). Yellow and green sequences are the same sequences but inverted each other, then, they are complementary. In the expression cassette, P corresponds to the promoter and T to the terminator. When dsRNA is transcribed, it gets a hairpin structure. VIGS (virus induced gene silencing); the virus is genetically modified to produce each strand of sRNA (sense and antisense). SIGS (spray induced gene silencing) by exogenous sprayed dsRNA.

Figura 3. Representación esquemática de los diferentes enfoques de control usando el mecanismo de RNA de interferencia. HIGS (host induced gene silencing; es silenciamiento génico mediado por sRNA producidos en el hospedante); en HIGS el hospedante es transformado y modificado genéticamente para la generación de sRNA artificiales endógenos; el casete de silenciamiento es introducido mediante *Agrobacterium tumefaciens* con un vector de tipo T-DNA en el que se clonan los fragmentos sentido (barra amarilla con flecha a la derecha) y antisentido (barra verde, con flecha a la izquierda) flanqueando una secuencia independiente (representada con un rectángulo negro). Las regiones amarillo y verde son las mismas secuencias, pero invertidas una respecto a la otra, por lo que son complementarias. En el casete de expresión, P corresponde al promotor y T al terminator. Al transcribirse el dsRNA, se forma una estructura tipo hairpin. En VIGS (virus induced gene silencing; silenciamiento génico por dsRNA producidos por vectores virales), el virus es genéticamente modificado para la generación de cada una de las hebras del sRNA (sentido y antisentido). SIGS (spray induced gene silencing), es el silenciamiento génico por dsRNA asperjados exógenamente.

Table 1. Comparison of technologies based on interference RNA for the control of pests and agricultural diseases.**Cuadro 1. Comparación de tecnologías basadas en ARN de interferencia para el control de plagas y enfermedades agrícolas**

Tecnología	Significado del acrónimo	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencias
HIGS	Host Induced Gene Silencing (silenciamiento génico por la producción de dsRNA por el hospedante).	La planta es transformada con un vector de ADN que integra el constructo de silenciamiento al genoma.	Producción estable y permanente de los dsRNA. Los dsRNA tienen mayor probabilidad de absorción por los patógenos de diferentes reinos. El procesamiento de los dsRNA depende de la maquinaria de silenciamiento de la planta.	Requiere protocolos de transformación y regeneración a planta de la especie que se quiera convertir en HIGS. La planta es OGM. Poca aceptación de consumidores.	Halder <i>et al.</i> , 2022; Papadopoulou <i>et al.</i> , 2020; Wang <i>et al.</i> , 2016
VIGS	Virus Induced Gene Silencing (silenciamiento génico por dsRNA producidos con base en un vector viral).	La planta es inoculada con el vector de silenciamiento viral que contiene un fragmento del gen diana. El nuevo ADN no se integra al genoma vegetal.	No requiere de un protocolo de transformación de la planta de interés. El vector VIGS se inocula por bombardeo o agroinfiltración. El procesamiento de los dsRNA depende de la maquinaria de silenciamiento de la planta.	Requiere que el vector VIGS sea capaz de moverse, replicarse y transcribirse en la planta de interés. La producción de los dsRNA es temporal. No provee de una resistencia permanente hacia los patógenos. El vector viral es un OGM.	Halder <i>et al.</i> , 2022; Villanueva-Alonzo <i>et al.</i> , 2022
SIGS	Spray Induced Gene Silencing (silenciamiento génico inducido por dsRNA asperjados).	Los dsRNAs son producidos por transcripción <i>in vitro</i> o sintetizados químicamente.	Para la transcripción <i>in vitro</i> se generan constructos de silenciamiento, pero los OGMs solo se manejan en el laboratorio. Las plantas asperjadas con dsRNA no son OGMs.	Los dsRNA entran de manera ineficiente a la planta y se degradan fácilmente sobre la superficie vegetal. La producción <i>in vitro</i> actualmente es costosa. El éxito del silenciamiento depende de que el patógeno posea una maquinaria de silenciamiento eficiente.	Gurusamy <i>et al.</i> , 2020a, 2020b; Hoffle <i>et al.</i> , 2020; Koch y Wassenecker, 2021; Qiao <i>et al.</i> , 2021; Sarkar y Roy-Barman, 2021

GMOs in the field is still restricted, which means an opportunity for SIGS, since the exogenously applied dsRNA are temporary and does not require the creation or application of GMOs in the field. The aim of this manuscript is to present the potential of SIGS as the option for the use of iRNA in the field for the management of phytopathogenic fungi, particularly in Mexico and Latin America, and the aspects that still need to be overcome for this technology to be successfully used in the field.

In the cases of HIGS and VIGS, for the processing of the dsRNAs (that is, the cutting of the dsRNAs into siRNA by Dicer, the recognition of the siRNAs by Argonaut and the formulation of the RICS complex), depends almost entirely on the mechanism of the plant (Höfle *et al.*, 2020), whereas in SIGS, it depends on the ability of the pathogen to absorb and process the dsRNAs into siRNA (Koch and Wassenegger, 2021; Qiao *et al.*, 2021). Therefore, in order for the SIGS to be successful, a functional silencing machinery is required in the target organism. Consequently, it is important to analyze the components of the fungal silencing machinery.

Silencing machinery in fungi

As mentioned earlier, the silencing system is conserved in eukaryotes. In the first reports on *Neurospora crassa* and *Schizosaccharomyces pombe*, silencing was given the name of “quelling.” Thus, fungal proteins related to silencing were named QDE, or “quelling defective.” But these names may be confusing because while QDE1 is a DNA- dependent RNA polymerase, QDE2 is an argonaut protein. Similarly, SMS2 (Suppressor of meiotic silencing 2) is a homologous to argonaut protein in *Neurospora crassa* (Gaffar *et al.*, 2019). Although narratives on the first investigations keep mentioning QDE proteins, the tendency is to name

primero porque requiere la transformación genética de las plantas de interés y el segundo por la modificación genética de los virus, con los constructos de expresión, para replicarse en las células vegetales y transcribir los sRNA (Figura 3). El Cuadro 1 muestra un resumen de la comparación de las tres técnicas, así como las ventajas y desventajas de cada una. En varios países las regulaciones del uso de OGMs en el campo aun es restringido, lo que abre una ventana de oportunidad para el SIGS, ya que los dsRNA aplicados exógenamente son transitorios y no requiere crear o aplicar OGMs en el campo. El objetivo de este manuscrito es presentar el potencial del SIGS para convertirse en la vía de uso de los iRNA en el campo para el manejo de hongos fitopatógenos, en particular en México y en Latinoamérica, y los aspectos que faltan superar para que esta tecnología pueda usarse exitosamente en el campo.

En los casos de HIGS y VIGS, para el procesamiento de los dsRNA (es decir, el corte de los dsRNA a siRNA por Dicer, el reconocimiento de los siRNA por Argonauta y la formación del complejo RISC), depende casi totalmente de la maquinaria de la planta (Höfle *et al.*, 2020), mientras que en el SIGS depende de la capacidad del patógeno de absorber y procesar los dsRNA en siRNA (Koch y Wassenegger, 2021; Qiao *et al.*, 2021); por tanto, para el éxito del SIGS se requiere una maquinaria funcional en el microorganismo diana. En consecuencia, es importante analizar los componentes de la maquinaria de silenciamiento de los hongos.

Maquinaria de silenciamiento en los hongos

Como se ha mencionado previamente, el sistema de silenciamiento es conservado en los eucariotas. En los primeros reportes realizados en *Neurospora crassa* y *Schizosaccharomyces pombe*, el silenciamiento recibió el nombre de “quelling” (sofoco o

proteins of the silencing system like their plant counterparts, that is, dicer (DCL), argonaut (AGO) and RNA-dependent RNA polymerase (RDRP). In fungi, the number of members described in these families are lower than those described in the plants. For example, in the plant kingdom, more than 15 members of the AGO family have been described, along with at least 6 RDRP (García-Ruiz *et al.*, 2016), while in fungi, three AGO members are known, along with two DCLs and five suppressors of ascus, or SAD (Lax *et al.*, 2020).

Gene silencing in fungi, as in other eukaryotes, participates in multiple processes (Figure 1) such as the regulation of genetic expression, the formation of heterochromatin, defense against viruses, the control of transposable elements, adaptation to conditions of stress, cell division and development, as well as in pathogenesis (Lax *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021). Recently, Gaffar and collaborators (2019) studied the conidiation, ascoprogenesis, virulence and production of the metabolite deoxynivalenol in *Fusarium graminearum* and observed different combinations of AGO, DCL and RDRP in the different processes, which shows the complexity of the mechanism for the silencing, despite the fact that only a few members in the main families of the proteins involved are known in fungi.

The role of interference RNA in fungal virulence

Silencing plays an important role in the virulence of fungi (Gaffar *et al.*, 2019; Weiberg *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021), therefore these proteins have been proposed as targets for the control of plant pathogens (Haile *et al.*, 2021; Werner *et al.*, 2020). For example, *Botrytis cinerea* is able to release sRNAs (Bc-sRNAs) during the infection of its host's cells (Cai *et al.*, 2018). These Bc-sRNAs act by sequestering

apagamiento de la expresión génica). Así, las proteínas fúngicas relacionadas al silenciamiento recibieron los nombres de QDE, por “quelling defective”. Pero estas denominaciones pueden ser confusas porque mientras QDE1 es una ARN polimerasa dependiente de ADN, QDE2 es una proteína tipo argonauta. Similarmente, SMS2 (por “Suppressor of meiotic silencing 2”), es una proteína homóloga a argonauta en *Neurospora crassa* (Gaffar *et al.*, 2019). Aunque en las narrativas sobre las primeras investigaciones se siguen mencionando a las proteínas QDE, la tendencia es nombrar a las proteínas del sistema de silenciamiento como sus homólogas en plantas, es decir como dicer (DCL), argonauta (AGO), y ARN Polimerasas dependientes de ARN (RDRP, por RNA-dependent RNA polymerase). En los hongos el número de miembros descritos en estas familias son menores a las descritas en las plantas. Por ejemplo, en el reino vegetal se han descrito más de 15 miembros en la familia AGO y al menos 6 RDRP (García-Ruiz *et al.*, 2016); mientras que en los hongos se conocen tres miembros de AGO, dos DCL y cinco helicasas tipos SAD (por “suppressor of ascus”; supresor de la formación de las ascas) (Lax *et al.*, 2020).

El silenciamiento génico en los hongos, como en otros eucariontes, participa en múltiples procesos (Figura 1) como son la regulación de la expresión genética, la formación de heterocromatina, la defensa contra virus, el control de elementos transponibles, la adaptación a condiciones de estrés, la división celular y desarrollo, y también en la patogénesis (Lax *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021). Recientemente, Gaffar y colaboradores (2019) al estudiar los procesos de conidiación, ascopogénesis, virulencia y producción del metabolito deoxinivalenol en *Fusarium graminearum* observaron diferentes combinaciones de AGO, DCL y RDRP en los diferentes procesos, lo que evidencia la complejidad del mecanismo de silenciamiento a pesar

the AGO protein of the host, such as *Arabidopsis thaliana* or *Solanum lycopersicum*, which is key in the defense system of both hosts (Weiberg *et al.*, 2013). Interestingly, a single sRNA, named Bc-siR37, suppresses at least eight genes involved in the defense of *A. thaliana*. Among these, WRKY transcription factors, receptor kinases and cell wall modifying enzymes (Wang *et al.*, 2017). *Verticillium dahliae* is another pathogen in which the role of the sRNAs has been studied regarding the invasion of the host, and it was found that it uses mechanisms similar to those described for *B. cinerea* (Wang *et al.*, 2016). In another example, *Fusarium graminearum* also releases Fg-sRNAs, which help silence defense genes in hosts, favoring their colonization (Jian and Liang, 2019; Werner *et al.*, 2021). When *F. graminearum* invades wheat (*T. aestivum*), it secretes the sRNA Fg-sRNA1, which reduces the expression of a chitin elicitor binding protein (TaCEBiP) that has the function of eliciting the defense (Jian and Liang, 2019). In addition, it has been proven that DCL-dependent Fg-sRNAs generally regulate the expression of defense genes in grasses (Werner *et al.*, 2021). The elimination of several components of the siRNA production system, particularly DCL1 and AGO2, results in a reduction of blight in wheat spikes, highlighting the importance of these proteins in the virulence of *F. graminearum* (Gaffar *et al.*, 2019). Due to this, both genes (DCL1 and AGO2) have been proposed for the control of this pathogen in barley leaves (*H. vulgare*) (Werner *et al.*, 2020). On the other hand, in *Penicillium italicum*, protein DCL2 regulates the expression of the microRNAs, and contributes in crucial ways to the pathogenesis (Yin *et al.*, 2020), which shows that the importance of the different DCLs can vary between species. It is worth clarifying that, in the case of fungi, miRNAs are called micro-RNA like (milRNAs). Recently, Haile and collaborators (2021) created a chimera

de que en los hongos se conocen pocos miembros en las principales familias de las proteínas involucradas.

Papel del ARN de interferencia en la virulencia fúngica

El silenciamiento juega un papel importante en la virulencia de los hongos (Gaffar *et al.*, 2019; Weiberg *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2020; Zanini *et al.*, 2021), por lo que estas proteínas se han propuesto como dianas para el control de patógenos vegetales (Haile *et al.*, 2021; Werner *et al.*, 2020). Por ejemplo, *Botrytis cinerea* es capaz de liberar sRNAs (Bc-sRNAs) durante la infección de las células de sus hospedantes (Cai *et al.*, 2018). Estos Bc-sRNAs actúan secuestrando a la proteína AGO del hospedante, por ejemplo de *Arabidopsis thaliana* o *Solanum lycopersicum*, la cual es pieza clave en el sistema de defensa en ambos hospedantes (Weiberg *et al.*, 2013). Interesantemente, un solo sRNA, nombrado Bc-siR37, suprime al menos ocho genes involucrados en la defensa de *A. thaliana*. Entre ellos, factores de transcripción tipo WRKY, cinasas tipo receptores y enzimas modificadoras de la pared celular (Wang *et al.*, 2017). *Verticillium dahliae* es otro patógeno en el que se ha estudiado el papel de los sRNA en la invasión del hospedante, y se encontró que usa mecanismos parecidos al descrito en *B. cinerea* (Wang *et al.*, 2016). En otro ejemplo, *Fusarium graminearum* también libera Fg-sRNAs, los cuales le permiten silenciar genes de defensa en los hospedantes, favoreciendo la colonización (Jian y Liang, 2019; Werner *et al.*, 2021). Cuando *F. graminearum* invade trigo (*T. aestivum*), secreta el sRNA Fg-sRNA1, el cual reduce la expresión de una proteína que posee dominio de unión a quitina (“chitin elicitor binding protein”, TaCEBiP) que posee función elicitora de la defensa (Jian y Liang, 2019). Adicionalmente, se ha comprobado

to silence the expression of both DCL genes in *Plasmopara viticola*, a strategy which suppressed the ability of this pathogen to colonize grapevines (*Vitis vinifera*).

In the fungus *Valsa mali*, virulence is regulated with a miRNA called VdmilR1, which operates at a transcriptional level on the extreme 3' UTR of VdHy1 through the K9 methylation of histone H3; VdHy1 is necessary for the virulence of *V. mali* on *Gossypium herbaceum* (cotton) plants (Jin *et al.*, 2019). Interestingly, unlike other canonical pathways for the biogenesis of miRNAs, the biogenesis of VdmilR1 does not depend on DCL or AGO, but on a protein called VdR3, which contains a domain of RNase III (Jin *et al.*, 2019), which highlights the importance of particularly characterizing the pathosystem to be controlled. Likewise, miRNAs play a crucial role in the posttranscriptional regulation of *V. mali* virulence genes during the infection in *Malus domestica* (apple) (Xu *et al.*, 2020), as well as in the destabilization of the defense system of the host (Xu *et al.*, 2022). These data suggest that the silencing machinery as a whole provides a mechanism maintained in fungi for the invasion of their hosts (Figure 2). Most sRNAs have the goal of inhibiting genes related to the plant defense system, and function in similar ways to the effector proteins of the pathogens (Todd *et al.*, 2023).

POSSIBILITIES OF INTERFERENCE RNA IN AGRICULTURE

It has been suggested that the use of iRNA can represent a powerful technological tool for the control of fungal diseases in plants (Wang and Jin, 2017; Zotti *et al.*, 2018), and other pathogens such as viruses, insects and nematodes (Koch and Wassenecker, 2021). In the case of HIGS, most

que los Fg-sRNAs dependientes de DCL, regulan en general la expresión de los genes de defensa en las gramíneas (Werner *et al.*, 2021). La eliminación de varios componentes del sistema de producción de iRNA, en particular DCL1 y AGO2, tiene como resultado una disminución del tizón en espigas de trigo, resaltando la importancia de estas proteínas en la virulencia de *F. graminearum* (Gaffar *et al.*, 2019). Por esa razón, ambos genes (DCL1 y AGO2) han sido propuestos para el control de este patógeno en hojas de cebada (*H. vulgare*) (Werner *et al.*, 2020). En *Penicillium italicum* en cambio, la proteína DCL2 es la que regula la expresión de los microRNAs, y contribuye de manera crucial en la patogénesis (Yin *et al.*, 2020), lo que evidencia que la importancia de las diferentes DCL puede variar entre especies; cabe aclarar que en el caso de los hongos los miRNAs reciben el nombre de milRNAs (por micro-RNA like o *parecidos* a los micro-ARNs). Recientemente, Haile y colaboradores (2021) construyeron una quimera para silenciar la expresión de ambos genes DCL en *Plasmopara viticola*, estrategia que logró suprimir la capacidad de este patógeno para colonizar la vid (*Vitis vinifera*).

En el hongo *Valsa mali* la virulencia se regula con un miRNA nombrado VdmilR1, que opera a nivel transcripcional sobre el extremo 3' UTR de VdHy1 a través de la metilación K9 de la histona H3; VdHy1 es necesaria para la virulencia de *V. mali* sobre plantas de *Gossypium herbaceum* (algodón) (Jin *et al.*, 2019). Interesantemente, a diferencia de otras rutas canónicas de biogénesis de miRNAs, la biogénesis de VdmilR1 no depende de DCL ni de AGO, pero si de una proteína llamada VdR3 que contiene un dominio de RNasa III (Jin *et al.*, 2019), lo que pone en relieve la importancia de caracterizar en particular el patosistema que se quiere controlar. Igualmente, los miRNAs juegan un papel fundamental en la regulación post-trans-

papers are based on the use of binary vectors that overexpress inverted sequences, separated by an intron, which help to form the hairpin (Figure 3). However, this approach is restricted to plants with established transformation methods, while most plants of agronomic interest do not have these protocols (Halder *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2016). The greatest limitation in many countries is the inherent use of GMOs, due to the limited acceptance and lack of regulations for their use (Papadopoulou *et al.*, 2020). In the case of VIGS, it uses RNA or DNA viral vectors with the ability to transcribe foreign genes, without having to transform the entire plant (Halder *et al.*, 2022; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). This approach is limited to the availability and efficiency of viral vectors for the plant of interest, but it also implies the management of genetically manipulated viral genomes (Figure 3). On the other hand, in the SIGS technology, dsRNAs are applied exogenously on the surface of the plant tissue, without the need for transformation (Koch *et al.*, 2016; Sarkar and Roy-Barman, 2021). For the use of SIGS, the dsRNAs are produced by the chemical synthesis of each independent strand (sense and antisense), which are then mixed equimolarly, that is, in equal amounts, to generate the double strand. The chemical synthesis of each strand is analogous to the commercial synthesis of oligonucleotides, but using ribonucleotides as building blocks for the synthesis of the RNA strands. The dsRNAs can also be produced by *in vitro* transcription. In this case, the sequence chosen to silence in the target transcript is cloned in a circular DNA vector under the regulation of a promoter of bacteriophage origin such as T3, T7 or SP6. Two clones are generated, one of which has a sequence in a sense direction (5'-3'), and the other, in an antisense direction (3'-5'). For the transcription, both vectors are linearized with a restriction enzyme that has

cripcional de genes de virulencia en *V. mali* durante la infección en *Malus domestica* (manzana) (Xu *et al.*, 2020), así como en la desestabilización del sistema de defensa del hospedante (Xu *et al.*, 2022). Estos datos sugieren que la maquinaria de silenciamiento en su conjunto provee un mecanismo conservado en los hongos, para la invasión de sus hospedantes (Figura 2). Los sRNA en su mayoría tienen como objetivo inhibir genes relacionados al sistema de defensa vegetal, y funcionan parecido a las proteínas efectoras de los patógenos (Todd *et al.*, 2023).

POSIBILIDADES DEL ARN DE INTERFERENCIA EN LA AGRICULTURA

Se ha propuesto que el uso del iRNA puede representar una poderosa herramienta tecnológica para el control de enfermedades fúngicas de plantas (Wang y Jin, 2017; Zotti *et al.*, 2018), y otros patógenos como virus, insectos y nematodos (Koch y Wassenegger, 2021). En el caso de HIGS, la mayoría de los trabajos se basan en el uso de vectores binarios que sobreexpresan secuencias invertidas, separados por un intrón, que permite la formación de la horquilla o “hairpin” (Figura 3). Sin embargo, este tipo de enfoques está restringido a plantas en las que existen métodos de transformación establecidos, y para la mayoría de las plantas de interés agronómico no se cuenta con estos protocolos (Halder *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2016). La mayor limitante en muchos países es el uso inherente de OGMs, debido la limitada aceptación y falta de regulaciones para su uso (Papadopoulou *et al.*, 2020). En el caso de VIGS, usa vectores virales de ARN o ADN que tienen la capacidad de transcribir genes foráneos, sin tener que transformar a la planta completa (Halder *et al.*, 2022; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2022). Este enfoque está limitado a la disponibilidad

only one restriction site in these vectors. The *in vitro* transcription is carried out in a tube with a reaction mixture containing the linearized vectors, an RNA polymerase that recognizes the promoter being used (whether T3, T7 or SP6), and the ribonucleotides (Li and Zamore, 2019; Sun and Riggs, 2017). Figure 4A shows how the dsRNAs are synthesized *in vitro*.

SIGS has a regulatory advantage, since the crops sprayed with the dsRNAs are not considered

y eficiencia de vectores virales para la planta de interés, pero también implica el manejo de genomas virales manipulados genéticamente (Figura 3). Por su parte, en la tecnología de SIGS los dsRNA se aplican de forma exógena sobre la superficie del tejido vegetal, sin necesidad de transformación (Koch *et al.*, 2016; Sarkar y Roy-Barman, 2021). Para el uso de SIGS, los dsRNA se producen mediante la síntesis química, de cada cadena independiente (sentido y antisentido), las cuales luego se

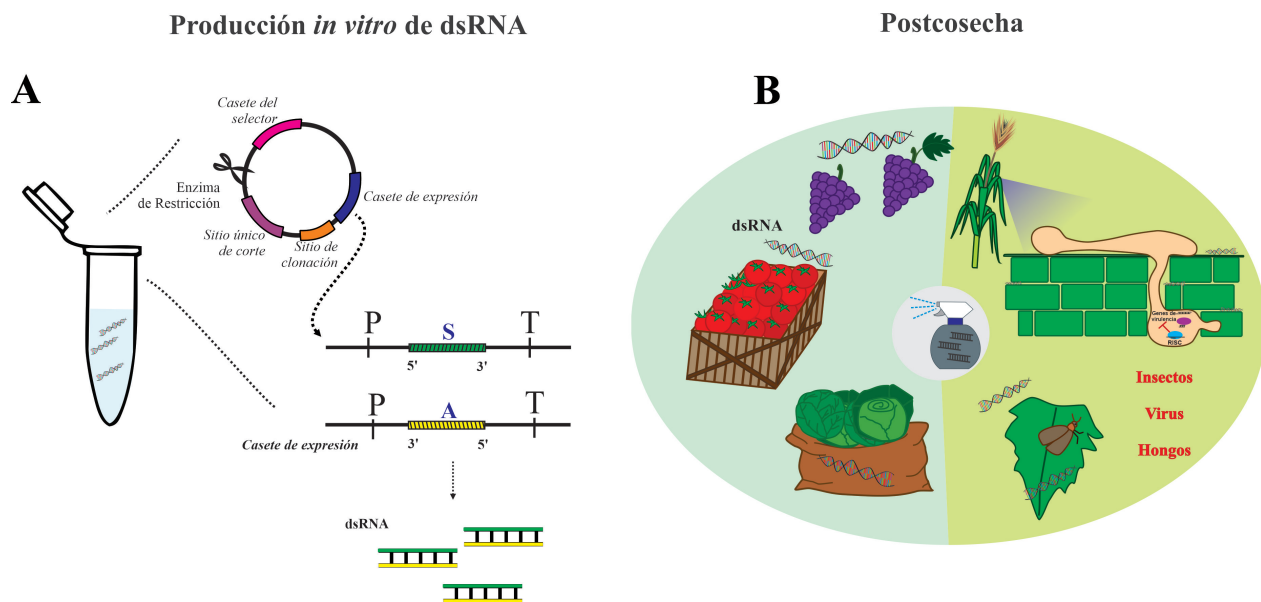


Figure 4. SIGS for controlling fungi, viruses and insects. A) *in vitro* production of dsRNA for exogenous spray. The target fragment is cloning in a circular vector under control of a bacteriophage promoter (T3, T7 o SP6); one vector is created for sense strand and another vector for antisense strand. For *in vitro* transcription, the vector is linearized with a restriction enzyme that cut one time on the vector (unique site), and that templete is mixed with the ribonucleotides and the RNA polymerase (T3, T7 o SP6 RNA polymerase, according the promoter in use), that carried out the *in vitro* synthesis of dsRNA. In the expression cassette, P corresponds to the promoter and T to the terminator. Both strands (sense and antisense) are synthesized and form the dsRNA B) The use of SIGS for controlling pathogens and pests on post-harvest fruit and vegetables is one of the applications that can be achieved soon.

Figura 4. SIGS para el control de hongos, virus e insectos. A) Producción *in vitro* de los dsRNA para la aspersión exógena. El fragmento diana es clonado en un vector circular bajo la regulación del promotor de un bacteriófago (T3, T7 o SP6); se genera un vector para la cadena sentido y otro para la cadena antisentido. Para la transcripción *in vitro*, el vector es linealizado con una enzima de restricción que corta una sola vez el vector (sitio único), y ese templado se mezcla con los ribonucleótidos y la ARN polimerasa (T3, T7 o SP6 ARN polimerasa, según sea el promotor usado), que lleva a cabo la síntesis *in vitro* del dsRNA. En el casete de expresión, P corresponde al promotor y T al terminador. Se sintetizan las dos hebras (sentido y antisentido) que forman el dsRNA. B) El uso de SIGS para el control de patógenos y plagas en frutas y verduras en condiciones de post cosecha es una de las aplicaciones que se puede lograr más pronto.

as GMOs (Dalakouras *et al.*, 2020; Taning *et al.*, 2020). However, there are also limitations that must be overcome in order to apply SIGS in the field.

EXTERNAL APPLICATIONS ON NON-MODEL PLANTS AND POST-HARVEST PRODUCTS

The use of SIGS is an alternative to the classic plant genetic transformation. This approach has been described as eco-friendly, highly specific and with a wide range of crops it can be used on. It is worth mentioning that it can be applied on crops in the field, as well as on harvested agricultural products (Figure 4B).

The first analyses regarding its feasibility were performed on plants such as *Nicotiana benthamiana* and *A. thaliana* (Dalakouras *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016), but it has also been evaluated on barley (*H. vulgare*), rice (*Oryza sativa*), canola (*Brassica napus*), and cucurbits (Haile *et al.*, 2021; Kaldis *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Sarkar and Roy-Barman, 2021); in harvested strawberry (*Fragaria vesca*), grapevine (*Vitis vinifera*), tomato (*S. lycopersicum*) and apple (*M. domestica*) fruits (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016); as well as vegetables such as lettuce (*Lactuca sativa*) and onion (*Allium cepa*) (Qiao *et al.*, 2021) and flowers (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016). The topical application of the dsRNAs has been observed to provide protection, not only in the area on which it is applied, but also in other parts of the plant. The ability of plants to absorb dsRNA through their leaves varies, although there are alternatives such as applying on the petioles (Dalakouras *et al.*, 2018). Studies with *Sclerotinia sclerotiorum* suggest that the absorption of the dsRNAs in fungi takes place predominantly on the tip of the hypha, through endocytosis mediated by the protein

mezclan de manera equimolar, es decir en las mismas cantidades, para dar lugar a la doble cadena. La síntesis química de cada cadena es análoga a la síntesis comercial de oligonucleótidos, pero empleando ribonucleótidos como bloques de construcción para la síntesis de las cadenas de ARN. Los dsRNA también pueden producirse mediante transcripción *in vitro*. En este caso la secuencia que se seleccionó para silenciar en el transcrito diana, se clona en un vector de ADN circular, bajo la regulación de un promotor de origen bacteriófago, como T3, T7 o SP6. Se generan dos clonas, una con la secuencia en sentido (dirección 5'-3'), y la otra con la secuencia en antisentido (dirección 3'-5'). Para la transcripción, ambos vectores son digeridos con una enzima de restricción que tiene un solo sitio de corte en estos vectores y éstos se abren y quedan linealizados. La transcripción *in vitro* se realiza en un tubo, con una mezcla de reacción que contiene los vectores linealizados, una ARN polimerasa que reconozca al promotor que se esté usando (ya sea T3, T7 o SP6), y los ribonucleótidos (Li y Zamore, 2019; Sun y Riggs, 2017). La Figura 4A muestra cómo se sintetizan *in vitro* los dsRNA.

SIGS tiene ventaja regulatoria, ya que los cultivos asperjados con los dsRNA no están considerados como OGMs (Dalakouras *et al.*, 2020; Taning *et al.*, 2020). Sin embargo, también existen limitantes que tendrán que superarse para la aplicación de SIGS en el campo.

APLICACIONES TÓPICAS EN PLANTAS NO MODELO Y PRODUCTOS COSECHADOS

El uso de SIGS es una alternativa a los trabajos clásicos de transformación genética. Este enfoque se ha descrito como amigable con el medio ambiente, altamente específico y con un amplio espectro de cultivos en los que se pudiera aplicar. Es

clathrin (Wytinck *et al.*, 2020). The results of all these recent investigations show the potential of the dsRNAs to control fungal diseases in agricultural crops.

ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF dsRNAs IN PLANT PROTECTION

Specificity of the dsRNAs. The greatest advantage of using dsRNA is that user can decide to silence a gene or a gene family, or several different genes in an organism, where virulence can be drastically reduced, or the fungal growth can even be drastically reduced. The user can also opt for the silencing the target in one single organism or many organisms simultaneously (Haile *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2019; Nerva *et al.*, 2020; Werner *et al.*, 2020). The specificity of the dsRNAs depends on the sequence used *per se* (Wang *et al.*, 2016). Some fungal genes are monogenic, that is, they appear only once in the genome, for example, the LYS2 gene that encodes the enzyme α -aminoacidipate reductase, or the HGMR gene, which encodes the enzyme hidroxymethylglutaryl CoA reductase. In these cases, silencing is only on one gene. Other genes have multiple members in the genome and they are said to form a gene family, such as the genes in catalases, chitinases, kinases, etc. For the design of silencing, the sequences of the messenger RNAs are compared and the user can choose a region that is identical for all the family members and silence them all, or silence them by groups, or choose regions that are different in each one and silence a specific member (Figure 5), whether to prove its relevance in the gene family, or because it contributes to the pathogenicity of the fungus. In order to achieve specificity and avoid unwanted targets, it is recommended to direct the design of the silencing towards divergent regions, whether in

importante mencionar que puede ser aplicado tanto a los cultivos en el campo, como en los productos agrícolas ya cosechados (Figura 4B).

Los primeros análisis en cuanto a su factibilidad se realizaron en plantas modelo como *Nicotiana benthamiana* y *A. thaliana* (Dalakouras *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016), pero también se han evaluado en cebada (*H. vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), canola (*Brassica napus*), y cucurbitáceas (Haile *et al.*, 2021; Kaldis *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Sarkar y Roy-Barman, 2021); en frutos cosechados de fresa (*Fragaria vesca*), vid (*Vitis vinifera*), jitomate (*S. lycopersicum*) y manzana (*M. domestica*) (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016); y vegetales como lechuga (*Lactuca sativa*) y cebolla (*Allium cepa*) (Qiao *et al.*, 2021) y flores (Qiao *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016). Se ha observado que la aplicación tópica de los dsRNA otorga protección no solo en el sitio de aplicación, sino en otras partes de la planta. La capacidad de las plantas para absorber dsRNA a través de las hojas varía, pero existen alternativas como la aplicación en los peciolo (Dalakouras *et al.*, 2018). Estudios con *Sclerotinia sclerotiorum* sugieren que la absorción de las dsRNA en los hongos ocurre predominantemente en la punta de la hifa, a través de endocitosis mediado por la proteína clatrina (Wytinck *et al.*, 2020). Los resultados de todas estas recientes investigaciones muestran el potencial de los dsRNA para el control de enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS dsRNA EN LA PROTECCIÓN VEGETAL

Especificidad de los dsRNA. La gran ventaja de emplear dsRNA es que se puede decidir silenciar un gen o una familia génica, o varios genes diferentes de un organismo, donde se puede disminuir dramáticamente la virulencia o incluso evitar el

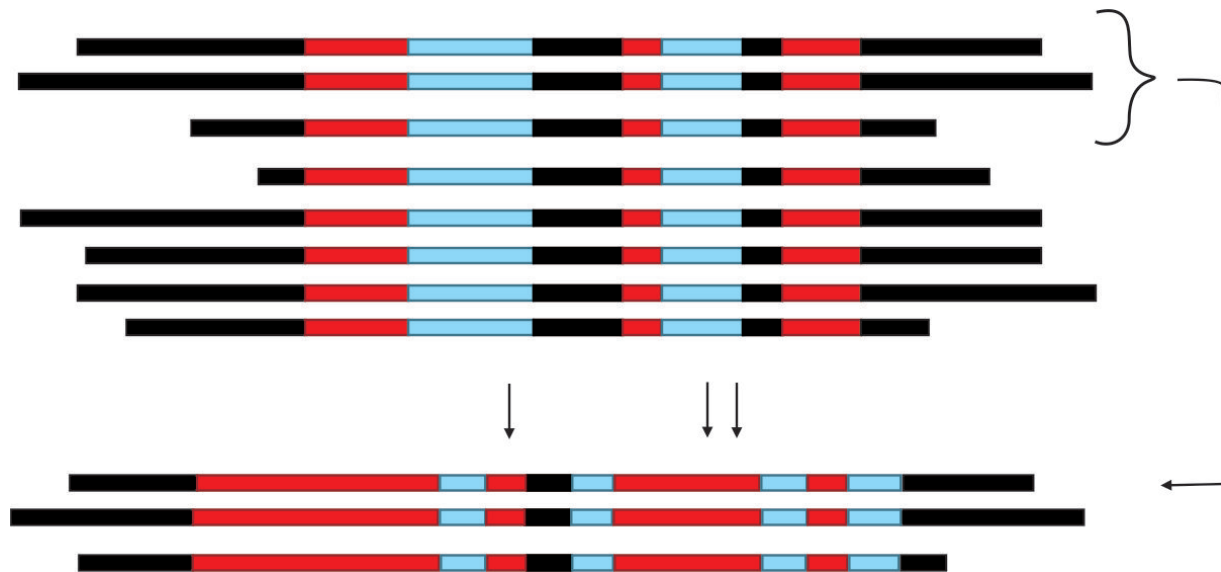


Figure 5. Strategies for designing dsRNA for either specific or multiple gene silencing. To achieve this, the nucleotide sequences are compared by using any bioinformatic tool for multialignment. The scheme may represent different situations: A) the same gene from different organisms. B) different genes belonging to the same gene family from the same organisms (for example, catalases family because there are multiple genes in the genome of a single organism). The red lines correspond to highly conserved regions, even 100%; the blue lines correspond to moderated conserved regions, and black lines to highly divergent regions. The dsRNA designed on the red regions in the alignment are able to silence the gen in different organisms (situation A), or all gene members in the gene family (situation B) in one organism (non-specific dsRNA). The dsRNA designed on the black regions will silence specifically the gene in a single organism with no silencing on others (situation A), or a single gene in a gene family (situation B) (specific dsRNA). The alignment below corresponds to: C) the same gene from close relative organisms, or D) members belonging to a gene subfamily; it is observed that some regions which were blue in the global alignment (above), in the close relatives (situation C) or the gene subfamily (situation D) become highly conserved (in red), and allow to design dsRNA able to silence that group of close relative organisms, but not others (situation C), or all members belonging to this subfamily, but with no interference on other members in this gene family (situation D).

Figura 5. Estrategias para diseñar dsRNA para el silenciamiento específico o múltiple de genes. Para ello, se comparan las secuencias de nucleótidos mediante alguna herramienta bioinformática para alineamientos múltiples. El esquema puede representar diferentes situaciones: A) el mismo gen, pero las secuencias son de diferentes organismos. B) los diferentes genes de una familia génica de un mismo organismo (por ejemplo, la familia de las catalasas, porque hay múltiples genes en el genoma de un organismo). Las barras rojas representan las regiones altamente conservadas, incluso al 100%; las barras azules corresponden a regiones moderadamente conservadas, y las negras a las regiones más divergentes. Los dsRNA diseñados sobre las regiones rojas serían capaces de silenciar el gen en diferentes organismos (situación A) o a todos los miembros de la familia génica (situación B) en un organismo (dsRNA no específicos). Los dsRNA diseñados sobre alguna de las secuencias en negro producirán silenciamiento específico, ya sea del gen de un organismo sin afectar a otros (situación A), o de un solo gen en una familia génica en un organismo (situación B) (dsRNA específico). El alineamiento de abajo puede representar: C) un gen en un grupo de organismos filogenéticamente muy cercanos, o D) los miembros de una subfamilia génica; se observa que algunas regiones que eran azules en el alineamiento global (de arriba), en los organismos más cercanos (situación C) o la subfamilia génica (situación D) son altamente conservadas (en rojo), y permiten diseñar dsRNA que silencian a ese grupo de organismos, sin afectar a otros organismos (situación C), o todos los miembros de la subfamilia, pero sin silenciar otros miembros de esta familia génica (situación D).

the encoding region or in the 5' and 3' UTR ends (Untranslated Regions) of the mRNA, particularly in the case of genes that encode highly conserved proteins. The UTRs are parts of the messenger RNA and they are found on its ends, respectively. They are important for its structure, although they are not translated into amino acids. The UTR sequences vary, even in the genes for highly conserved proteins.

The strategy is similar to apply silencing on a single organism or several species of organisms, a particular genus, etc. That is, it depends on whether regions are chosen that are highly conserved among all of them, or sequences that are exclusive to a particular organism. For example, Gutiérrez-Domínguez *et al.* (2022) recently reported a type of lipase that is only found in some genera of the Hypocreales and Glomerellales orders of filamentous fungi, including the genera *Trichoderma*, *Fusarium*, *Nectria* and *Colletotrichum*. If highly conserved regions are chosen in the gene of this lipase, silencing will occur in all these fungi, but if divergent sequences are chosen between them, silencing can be directed only at those we want to control, preventing them from affecting, for example, the species of the *Trichoderma* genus, which are beneficial fungi for agriculture, whereas the others are phytopathogenic.

The availability of constantly growing public databases of genomes and transcriptomes help to adequately design silencing strategies and prevent it from occurring with non-target organisms, that is, those that do not want to be affected.

dsRNA, low risk for humans. According to Fletcher *et al.* (2020), Jensen *et al.* (2013), and Rodrigues and Petrick (2020), the risk of consuming dsRNA in humans is low or none. For the dsRNAs applied on fruits or plants have a possible impact

crecimiento del hongo. También, puede optarse por silenciar el gen de un solo organismo, o de múltiples organismos a la vez (Haile *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2019; Nerva *et al.*, 2020; Werner *et al.*, 2020). La especificidad de los dsRNA depende de la secuencia *per se* empleada (Wang *et al.*, 2016). Algunos genes fúngicos son monogénicos, es decir, están solo una vez en el genoma, por ejemplo, el gen LYS2 que codifica a la enzima α -aminoadipato reductasa, o el gen HGMR, que codifica a la enzima hidroximetil-glutaril CoA reductasa. En estos casos el silenciamiento es sobre un solo gen. Otros genes tienen múltiples miembros en el genoma y se dice que forman una familia génica; por ejemplo, los genes de catalasas, de quitinasas, de cinasas, etc. Para el diseño del silenciamiento se comparan las secuencias de los ARN mensajeros y se puede elegir alguna región que es idéntica entre todos los miembros de la familia y silenciarlos todos, o silenciarlos por grupos, o seleccionar regiones que son diferentes en cada uno y se silencia un miembro específico (Figura 5), ya sea para probar su relevancia dentro de la familia génica, o porque es el que contribuye a la patogenicidad del hongo. Para lograr la especificidad y evitar dianas no deseadas, se aconseja dirigir el diseño de silenciamiento hacia regiones no conservadas, ya sea dentro de la región codificante o en los extremos 5' y 3' UTR del mRNA (Untranslated Region; región no traducible), sobre todo en el caso de genes que codifican proteínas altamente conservadas. Los UTRs forman parte del ARN mensajero y se localizan respectivamente en los extremos de éste; son importantes para su estructura, pero no son traducidos a aminoácidos. Aun en genes de proteínas altamente conservadas, las secuencias de los UTR varían.

La estrategia que se sigue es similar para aplicar el silenciamiento sobre un solo organismo, o múltiples especies de organismos, un género particular, etc.; es decir, depende si se escogen regiones

in human health, the dsRNAs must have to enter the cells and match with some of the human genes (Fletcher *et al.*, 2020). However, in humans and mammals in general, there are many biological barriers in the gastrointestinal tract, blood flow and at a cellular level in which they are degraded due to the large amount of existing nucleases (Fletcher *et al.*, 2020; Rodrigues and Petrick, 2020). In addition, man has consumed plant dsRNAs naturally by way of their conventional diet in maize (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), rice (*O. sativa*), lettuce and tomato (Jensen *et al.*, 2013). For the suppression of the human gene, the sRNAs would need to be complementary and accumulated in biologically important concentrations in the target site, which does not occur (Jensen *et al.*, 2013).

No persistence of dsRNAs in the plant. In a pioneering investigation by Koch and collaborators (2016), they applied in *H. vulgare* (barley) dsRNA designed against transcripts of the green fluorescent protein (GFP) and 48 h later, they infected the leaves with a transformed strain of *F. graminearum*, which produces the GFP. Interestingly, the silencing of GFP remained for 6 days post infection (dpi) in distal regions from where the dsRNA-GFP was applied, indicating its stability in the tissue and that the dsRNA moves inside the plant. In a similar fashion, the application on roses (*Rosa chinensis*) and tomato fruits of dsRNA that silence DCL1/2 of *B. cinerea* protected them against the pathogen for 8 -10 days. Reports on other plants with other fungal pathogens coincide with these times of stability of the dsRNAs (Nerva *et al.*, 2020; Sarkar and Roy Barman, 2021).

Several papers report the application of the dsRNAs first and then they inoculate with the pathogen (Höfle *et al.*, 2020; Koch *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2020; Sarkar and Roy-Barman, 2021), that is, a preventive effect of the

que están altamente conservadas entre todos ellos, o secuencias que son exclusivas de un organismo particular. Por ejemplo, Gutiérrez-Domínguez *et al.* (2022) reportaron recientemente un tipo de lipasa que en hongos filamentosos sólo está presente en algunos géneros de los órdenes Hypocreales y Glomerellales; estos incluyen los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Nectria*, y *Colletotrichum*. Si se eligen regiones altamente conservadas en el gen de esta lipasa, el silenciamiento ocurriría en todos estos hongos, pero si se eligen secuencias que divergen entre ellas, el silenciamiento puede dirigirse únicamente a las que se quiere controlar, para no afectar por ejemplo a las especies del género *Trichoderma*, que son hongos benéficos para la agricultura, mientras los otros son fitopatógenos.

La disponibilidad de bases de datos públicas de genomas y transcriptomas, las cuales están en constante crecimiento, permiten diseñar correctamente las estrategias de silenciamiento y evitar que éste ocurra en organismos que no son diana, es decir, que no se quieren afectar.

dsRNA, de bajo riesgo para humanos. De acuerdo a Fletcher *et al.* (2020), Jensen *et al.* (2013), y Rodrigues y Petrick (2020), el riesgo por consumir dsRNA en humanos es bajo o nulo. Para que los dsRNA aplicados en frutos o plantas tengan un posible impacto sobre la salud humana, los dsRNA tienen que internarse dentro de las células y coincidir con la secuencia de alguno(s) de los genes humanos (Fletcher *et al.*, 2020). Sin embargo, en el humano y mamíferos en general, hay una multitud de barreras biológicas en el tracto gastrointestinal, torrente sanguíneo y a nivel celular, en los que se degradan por la gran cantidad de nucleasas existentes (Fletcher *et al.*, 2020; Rodrigues y Petrick, 2020). Adicionalmente, el hombre ha consumido de manera natural dsRNA de origen vegetal, a través de la dieta convencional en el maíz (*Zea mays*),

infection. Recently, Haile and collaborators (2021) infected de *Vitis vinifera* leaves with *Plasmopara viticola*, they let the disease progress for 7 days, and later applied the dsRNA. This helped reduce the disease progress rate, implying that the control with dsRNAs could also be a curative treatment. However, the dsRNAs applied exogenously are extremely susceptible to degradation and have very low persistence in the environment (Bachman *et al.*, 2020), therefore one of the main challenges for its success in agriculture is extending its stability in the environment.

Factors that affect the design of dsRNAs for SIGS. One of the main factors to be taken in consideration when designing the dsRNAs are the molecular targets themselves. Some of the targets that have been considered have included the most conventional ones, such as genes that encode enzymes that synthesize intermediaries in the synthesis of lanosterol (Cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase, CYP51) (Koch *et al.*, 2016), the silencing of effectors (Sarkar and Roy-Barman, 2021) and even the silencing components themselves (Wang *et al.*, 2016) (Table 2). Both in experiments performed *in vitro* and in the applications on the surface of leaves, the effect of silencing has been observed to increase as the dose of the dsRNAs increases (Haile *et al.*, 2021, McLoughlin *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2016). However, if the concentration is too high, better results are not obtained; this suggests that the iRNA machinery becomes saturated and it ceases to process the dsRNAs (McLoughlin *et al.*, 2018). Consequently, to achieve the best results with the SIGS, characterizing every pathosystem and determining the most adequate length and concentration of dsRNA is crucial to control the disease.

soya (*Glycine max*), arroz (*O. sativa*), lechuga y jitomate (Jensen *et al.*, 2013). Para la supresión del gen humano se requeriría que los sRNA fueran complementarios y estuvieran acumulados en concentraciones biológicamente importantes en el sitio blanco, lo cual no ocurre (Jensen *et al.*, 2013).

No persistencia de los dsRNA en la planta. En un trabajo pionero de Koch y colaboradores (2016), aplicaron en hojas de *H. vulgare* (cebada) dsRNA diseñados contra transcritos de la proteína GFP (green fluorescent protein; proteína verde fluorescente) y 48 h después infectaron las hojas con una cepa de *F. graminearum* transformada, que produce la proteína GFP. Interesantemente, el silenciamiento de GFP se mantuvo durante 6 días post infección (dpi) en regiones distales de donde se aplicó el dsRNA-GFP, lo que muestra su estabilidad en el tejido y que el dsRNA se mueve dentro de la planta; similarmente, la aplicación en rosas (*Rosa chinensis*) y frutos de jitomate (*S. lycopersicum*) de dsRNA que silencian la DCL1/2 de *B. cinerea* los protegió contra este patógeno por 8 -10 días. Reportes en otras plantas, con otros patógenos fúngicos, coinciden con estos tiempos de estabilidad de los dsRNA (Nerva *et al.*, 2020; Sarkar y Roy Barman, 2021).

En varios trabajos reportan la aplicación primero de los dsRNA y luego inoculan con el patógeno (Höfle *et al.*, 2020; Koch *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2020; Sarkar y Roy-Barman, 2021); es decir, un efecto preventivo de la infección. Recientemente, Haile y colaboradores (2021) infectaron hojas de *Vitis vinifera* con *Plasmopara viticola*, dejaron progresar la enfermedad por 7 días, y posteriormente aplicaron los dsRNA. Estos lograron reducir la tasa de progreso de la enfermedad, implicando que el control con dsRNA pudiese ser también de tipo curativo. Sin embargo, los dsRNA aplicados de manera exógena son extremadamente

**Table 2. Successful examples of SIGS^y in the inhibition of phytopathogenic fungi.
Cuadro 2. Ejemplos exitosos del SIGS^y en la inhibición de hongos fitopatógenos.**

Hospedante	Patógeno	Gen diana	Función	Longitud dsRNA (nt)	Máxima persistencia en la planta o <i>in vitro</i>	Referencias
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	<i>Fusarium graminearum</i>	FgCYP51A, FgCYP51B, FgCYP51C	Enzima clave en la biosíntesis de Ergosterol	791 (20 ng μL^{-1}) (CYP51A/CYP51B/CYP51C)	8 días (6 dpi) ^z	Koch <i>et al.</i> , 2016
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	<i>F. graminearum</i>	FgCYP51A, FgCYP51B, FgCYP51C	Enzima clave en la biosíntesis de Ergosterol	294 (CYP1A), 220 (CYP1B), 238 (CYP1C), 514 (CYP1A/CYP1B), 532 (CYP1A/CYP51C), 458 (CYP1B/CYP51C)	7 días (5 dpi) ^z	Koch <i>et al.</i> , 2019
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	<i>F. graminearum</i>	DCL, AGO	Maquinaria de silenciamiento	372 (AGO2/DCL1), 1782 (DCL1/DCL2), 1529 (AGO1/AGO2), 1741 (AGO2/DCL2)	7 días ^z	Werner <i>et al.</i> , 2020
Cebada (<i>H. vulgare</i>)	<i>F. graminearum</i>	FgCYP51A, FgCYP51B, FgCYP51C	Enzima clave en la biosíntesis de Ergosterol	500 (CYP51A), 400 (CYP51B), 400 (CYP51C), 800 (CYP51A), 800 (CYP51B), 800 (CYP51C), secuencia completa para CYP51A, B y C	7 días ^z	Höfle <i>et al.</i> , 2020
Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Botrytis cinerea</i>	DCL1, DCL2	Maquinaria de silenciamiento		7 días	Qiao <i>et al.</i> , 2021
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>B. cinerea</i>	BcCYP51, BcChs1, BcEF2	Biosíntesis de ergosterol, quitina y factor de elongación	732 (CYP51/Chs1/EF2) (300 μg en 3 mL, absorción por peciolo)	7 días	Nerva <i>et al.</i> , 2020
Vid (<i>V. vinifera</i>)	<i>Plasmopara viticola</i>	DCL	Maquinaria de silenciamiento	258 (DCL1), 257 (DCL2), 515 (DCL1/DCL2) (75, 100 o 125 ng μL^{-1})	14 días	Haile <i>et al.</i> , 2021
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Magnaporthe oryzae</i>	MoDES1	Efecto (patogenicidad)	300 (MoDES1) 300 nM	10 días ^z	Sarkar y Roy-Barman, 2021
Fresa (<i>Fragaria vesca</i>) en post cosecha	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	DCL, quitina sintasa clase III	Maquinaria de silenciamiento, estructura de la pared celular	dsRNA encapsulado en células de <i>E. coli</i>	12 días	Islam <i>et al.</i> , 2021
Vid (<i>V. vinifera</i>) en post cosecha	<i>B. cinerea</i>	BcCYP51, BcChs1, BcEF2	Biosíntesis de ergosterol, quitina y factor de elongación	732 (CYP51/Chs1/EF2)	3 días	Nerva <i>et al.</i> , 2020
Sin hospedante. Cultivo del hongo en medio sólido (<i>in vitro</i>)	<i>Macrophomina phaseolina</i>	β -1,3-Glucano sintasa (GLS)	Enzima clave en la síntesis de β -1,3 glucano, componente de la pared celular	siRNA (100 nM)	2.5 días	Forster y Shuai, 2020
Sin hospedante. Cultivo del hongo en medio líquido (<i>in vitro</i>)	<i>F. culmorum</i>	CYP51A, CYP51B, CYP51C	Biosíntesis de Ergosterol	791 (20 ng μL^{-1})	2 días	Koch <i>et al.</i> , 2018

^y Spray Induced gene Silencing. / Inducción de silenciamiento génico mediante dsRNA asperjados.

^z The previous 48 h of treating with dsRNA were considered, along with the days of infection monitored. / Se consideraron las 48 h previas de tratamiento con dsRNA, más los días de infección monitoreados.

Current limitations of SIGS in agriculture. In the SIGS system, success depends on the sRNAs being able to permeabilize into the tissue of the host, which depends on the presence or absence of stomata, the thickness of the cuticle and the degree of suberization of the epidermis, as well as on the efficiency of absorption and the processing of the dsRNA by the pathogen (Hoffle *et al.*, 2020). Therefore, SIGS is effective on pathogens with an efficient absorption of dsRNAs and that have a functional iRNA machinery to process the sRNAs. Although this is a highly conserved process and present in most organisms, not all fungi have silencing mechanisms, an example being the basidiomycete *Ustilago maydis*. Likewise, it seems that iRNA is scarcely efficient in the control of *Zymoseptoria tritici*, one of the most devastating fungi for wheat (*T. aestivum*). Kettles and collaborators (2019) attempted to use HIGS to silence four key *Z. tritici* genes, but they were not successful, showing the inability of the fungus to absorb dsRNAs through the interaction with wheat. Later, Ma and collaborators (2020) reported that during the colonization of wheat by *Z. tritici*, they did not identify the presence of iRNA, therefore they concluded that the silencing mechanism does not participate in this infection. Despite *Z. tritici* maintaining the components of iRNA machinery, it does not seem to play a part in the infection of the host. This suggests that for the success of SIGS, it is crucial for a natural intercommunication to exist between the pathogen and the host via sRNA. Recently, Qiao and collaborators (2021) performed a test in which they used a fluorescent dsRNA to evaluate the ability of absorption of several fungi *in vitro*. They found that *Colletotrichum gloeosporioides* is unable to absorb them, whereas in *B. cinerea*, *V. dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* and *S. sclerotiorum*, the fluorescence was observed inside their cells after

susceptibles a la degradación y tienen muy poca persistencia en el ambiente (Bachman *et al.*, 2020), por lo que uno de los principales retos para su éxito en la agricultura es alargar su estabilidad en el ambiente.

Factores que afectan el diseño de dsRNA para SIGS. Uno de los principales factores que se debe considerar al diseñar los dsRNA son las propias dianas moleculares. Entre las dianas se han considerado desde las más convencionales; por ejemplo, genes que codifican enzimas que sintetizan intermediarios en la síntesis del lanosterol (Citocromo P450 lanosterol C-14 α -demetilasa, CYP51) (Koch *et al.*, 2016), silenciamiento de efectores (Sarkar y Roy-Barman, 2021) e incluso de los propios componentes del silenciamiento (Wang *et al.*, 2016) (Cuadro 2). Tanto en experimentos realizados *in vitro*, como en las aplicaciones sobre la superficie de las hojas, se ha observado que el efecto del silenciamiento incrementa al aumentar la dosis de los dsRNA (Haile *et al.*, 2021, McLoughlin *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2016); sin embargo, si la concentración es demasiado alta no se obtienen mejores resultados, lo que sugiere que la maquinaria de iRNA se satura y deja de procesar los dsRNA (McLoughlin *et al.*, 2018). En consecuencia, para lograr los mejores resultados con el SIGS, es necesario caracterizar cada patosistema y determinar la longitud y la concentración más adecuada de dsRNA, para conseguir el control de la enfermedad.

Limitaciones actuales del SIGS en la agricultura. En el sistema SIGS el éxito depende de que los sRNA puedan permeabilizar al interior del tejido del hospedante, lo cual depende de la presencia o ausencia de estomas, del grosor de la cutícula, y del grado de suberización de la epidermis; también depende de la eficiencia de absorción y del procesamiento de los dsRNA por parte del patógeno

6 h, indicating the internalization of the dsRNAs. Other microorganisms such as *Trichoderma virens* and *Phytophthora infestans* absorbed the dsRNA in a limited manner. Curiously, Mahto and collaborators (2020) silenced a *C. gloeosporioides* gene and control anthracnosis in chili pepper (*Capsicum annuum*) and tomato, where they used HIGS and proposed that the sRNA go through the haustorium of the fungus via extracellular vesicles secreted by the plant. However, it is important to remember that silencing via HIGS did not work in *Z. tritici* (Kettles *et al.*, 2019), suggesting that the entry methods of the iRNAs can vary between microorganisms, and in some cases, may not exist. For most phytopathogenic fungi, their abilities of absorption and processing of dsRNAs are unknown, therefore these tests must be broadened to better establish the potential of SIGS for the control of phytopathogenic fungi.

POTENTIAL OF INTERFERENCE RNA IN AGRICULTURAL CROPS IN MEXICO AND LATIN AMERICA

Latin America and the Caribbean (LAC) is an important food-producing region in the world. Its main agricultural products are cereals, oily seeds, banana, coffee, sugar, fruits and vegetables. In addition, 26% of the world's production of tropical fruit [banana (*M. acuminata*), mango (*Mangifera indica*), pineapple (*Ananas comosus*), avocado (*Persea americana*) and papaya (*Carica papaya*)] are grown in LAC, mainly in Brazil, Ecuador, Mexico and Costa Rica. LAC is an important exporting region and key in the world economy. For example, bananas and plantains (*M. balbisiana*) are among the most important food products in the world and their marketing is a cornerstone in the economies of many LAC countries. Despite this, their production

(Hoffle *et al.*, 2020). Por lo tanto, SIGS es efectivo sobre patógenos que tienen una eficiente absorción de las dsRNA y que poseen una maquinaria funcional de procesamiento de los sRNA. Aunque se trata de un proceso altamente conservado y presente en la mayoría de los organismos, no todos los hongos poseen maquinaria de silenciamiento, por ejemplo, el basidiomiceto *Ustilago maydis*. Asimismo, parece que el iRNA es poco eficiente para controlar a *Zymoseptoria tritici*, uno de los hongos más devastadores en los cultivos de trigo (*T. aestivum*). Kettles y colaboradores (2019) intentaron mediante HIGS silenciar cuatro genes claves de *Z. tritici*, pero ninguno fue exitoso, demostrando la incapacidad del hongo de absorber dsRNA a través de la interacción con trigo. Posteriormente, Ma y colaboradores (2020) reportaron que durante la colonización de trigo por *Z. tritici* no identificaron la presencia de iRNA, por lo que concluyeron que el mecanismo de silenciamiento no participa en esta infección. A pesar de que *Z. tritici* mantiene los componentes del iRNA, parece no tener un papel durante la infección del hospedante. Esto sugiere que para el éxito de SIGS es clave que exista una intercomunicación natural entre patógeno y hospedante por medio de sRNA. Recientemente Qiao y colaboradores (2021) realizaron un ensayo en el que usaron un dsRNA fluorescente para evaluar la capacidad de absorción de varios hongos *in vitro*. Encontraron que *Colletotrichum gloeosporioides* es incapaz de absorberlos, mientras que en *B. cinerea*, *V. dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger* y *S. sclerotiorum* la fluorescencia se observó en el interior de sus células a las 6 h, lo que indica la internalización de los dsRNAs. Otros microorganismos como *Trichoderma virens* y *Phytophthora infestans* absorbieron los dsRNA de manera limitada. Curiosamente, Mahto y colaboradores (2020) lograron silenciar un gen de *C. gloeosporioides* y controlar la antracnosis en chile (*Capsicum annuum*) y

is constantly threatened by diverse diseases, mainly black Sigatoka (SN), caused by the ascomycete fungus *Pseudocercospora fijiensis*, and wilting from *Fusarium*, also known as the Panama disease. SN is a foliar disease that significantly reduces the rate of photosynthesis in the plant, weakening it and eventually killing it (Chí-Manzanero *et al.*, 2021). On the other hand, the Panama disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (Foc1), killed an entire Gros Michel banana crop, forcing farmers to change to a more resistant crop (cultivar Cavendish). However, with the appearance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc4), the banana industry is in grave danger. The urgent need to control this dangerous race of Foc has led to an evaluation of the technology of silencing using iRNA via HIGS (Ghag and Ganapathi, 2019). These authors developed transgenic banana lines that express iRNA against the *velvet* gene and the *Factor 1* of the transcription of Foc4, both genes related to growth, development and pathogenesis; the plants survived for six weeks and other for up to eight months without developing symptoms (Ghag *et al.*, 2014). Likewise, transgenic banana lines have been generated that have been able to silence the transcripts of enzyme C-24 sterol methyltransferase (ERG6) and of the cytochrome P450 lanosterol C-14 α dimethylase (ERG11), both of which are involved in the synthesis of ergosterol; both lines were evaluated for up to two years (Dou *et al.*, 2020).

In other crops, it has been estimated that global mango (*M. indica*) and avocado (*P. americana*) production will continue to grow in LAC. Brazil and Mexico are the most important mango and avocado producers, and of the latter, Mexico is the main exporter, while Colombia, the Dominican Republic and Peru have increased their production; LAC covers 73% of the world's avocado production, which highlights its importance in the agriculture in

jitomate donde emplearon HIGS y propusieron que los sRNA atraviesan el haustorio del hongo a través de vesículas extracelulares secretadas por la planta. Sin embargo, es importante recordar que el silenciamiento mediante HIGS no funcionó en *Z. tritici* (Kettles *et al.*, 2019), lo que sugiere que los métodos de ingreso de los iRNA pueden variar entre los microorganismos y en algunos casos no existir. Para la mayoría de los hongos fitopatógenos se desconocen sus capacidades de absorción y procesamiento de los dsRNAs, por lo que se requiere ampliar estas pruebas para establecer mejor el potencial de SIGS para el control de hongos fitopatógenos.

POTENCIAL DEL ARN DE INTERFERENCIA EN CULTIVOS AGRÍCOLAS DE MÉXICO Y AMÉRICA LATINA

América Latina y el Caribe (ALC) es una importante región productora de alimentos en el mundo. Sus principales productos agrícolas son cereales, semillas oleaginosas, banano, café, azúcar, frutas y verduras. Adicionalmente, 26% de la producción global de los principales frutos tropicales [bananas (*M. acuminata*), mango (*Mangifera indica*), piña (*Ananas comosus*), aguacate (*Persea americana*) y papaya (*Carica papaya*)] se cultivan en ALC, principalmente en Brasil, Ecuador, México y Costa Rica. ALC es una importante región exportadora y clave en la economía global. Por ejemplo, los bananos y los plátanos (*M. balbisiana*) se encuentran entre los productos alimenticios más importantes en el mundo y su comercialización es un pilar importante en la economía de muchos países de ALC. Sin embargo, su producción es constantemente amenazada por diversas enfermedades, entre las que destacan la Sigatoka negra (SN) cuyo agente causal es el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis*, y el marchitamiento por *Fusarium*, también llamado

the region. Among these tropical fruits, the disease anthracnose (*Colletotrichum* sp.) is common under post-harvest conditions. In mango and avocado, anthracnose is caused by *C. gloeosporioides* and this fungus attacks fruits in pre- and post-harvest, and also damages leaves. The evidence available in literature suggests that *C. gloeosporioides* does not efficiently absorb the exogenous dsRNAs (Qiao *et al.*, 2021). However, it has been proven that anthracnose in chili pepper and tomato may be controlled using HIGS (Mahto *et al.*, 2020), suggesting that the use of vesicles as carriers may be an alternative for the control via SIGS. One of the main pests that attack important crops in LAC is the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), a polyphagous pest that damages different crops, preferably maize, sorghum (*Sorghum bicolor*), cotton and soybean, onion, carrot (*Daucus carota*), lettuce, papaya, watermelon (*Citrullus lanatus*), melon (*Cucumis melo*), cucumber (*Cucumis sativus*), avocado, banana, rice, coffee (*Coffea arabica*), tomato, cacao (*Theobroma cacao*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), and many others (Montezano *et al.*, 2018). This pest is widely distributed in LAC and part of North America, and its larvae can cause losses of up to 100% of crops. Recently, Gurusamy and collaborators (2020a; 2020b) described the control of *S. frugiperda* via iRNA, using formulations of dsRNA with cationic lipids that protect the dsRNAs from degradation inside the insect, and make silencing more efficient (Gurusamy *et al.*, 2020a). Another report by the same authors evaluated the use of nanoparticles for the protection of the dsRNAs, preferring the formulations with chitosan due to its protective abilities and for being a biodegradable, non-toxic, cheap and eco-friendly polymer, meaning an improvement in the efficiency of silencing by SIGS (Gurusamy *et al.*, 2020b). Another important pest for LAC is the coffee berry borer (*Hypothenemus*

Mal de panamá. La SN es una enfermedad foliar que reduce significativamente la tasa de fotosíntesis en la planta, provocando su debilitamiento y eventualmente su muerte (Chí-Manzanero *et al.*, 2021). Por otro lado, el Mal de Panamá provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc1), acabó con el cultivo del banano Gros Michel, obligando a los productores a cambiar a un cultivo más resistente (cultivar Cavendish). Sin embargo, con la aparición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 (Foc4), la industria bananera corre un grave peligro. La urgente necesidad de controlar esta peligrosa raza de Foc ha llevado a evaluar la tecnología del silenciamiento por iRNA mediante HIGS (Ghag y Ganapathi, 2019). Estos autores desarrollaron líneas transgénicas de banano que expresan iRNA contra el gen *velvet* y el *Factor 1* de la transcripción de Foc4, ambos genes relacionados con el crecimiento, desarrollo y la patogénesis; estas plantas sobrevivieron seis semanas y algunas hasta ocho meses sin generar síntomas (Ghag *et al.*, 2014). Así mismo, se han generado líneas transgénicas de banano capaces de silenciar los transcritos de la enzima C-24 esterol metiltransferasa (ERG6) y del citocromo P450 lanosterol C-14 α dimetilasa (ERG11), ambas enzimas involucradas en la síntesis del ergosterol; ambas líneas fueron evaluadas hasta por dos años (Dou *et al.*, 2020).

En otros cultivos, se estima que la producción global de mango y aguacate seguirá creciendo en ALC. Brasil y México son los mayores productores de mango y aguacate, y de este último, México es el mayor exportador, mientras que Colombia, República Dominicana y Perú han aumentado su producción; ALC cubre el 73% de la producción global de aguacate en el mundo, lo que resalta su importancia en la agricultura de la región. Entre estos frutos tropicales, la enfermedad antracnosis (*Colletotrichum* sp.), es común en condiciones de post-cosecha. En mango y aguacate, la antracnosis

hampei). This insect is responsible for most of the losses in coffee in the world (Jaramillo *et al.*, 2006). The application of fragments of dsRNA in the preoral cavity of the borer larvae is effective for gene silencing, as well as the exogenous application for acquisition by ingestion (Aguilera *et al.*, 2011). Among the target genes evaluated, the best results were obtained by silencing the mannanases or xylanases involved in the hydrolysis of the main carbohydrates of the coffee grain (Aguilera *et al.*, 2011). The silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci*) is another important pest insect, widely distributed throughout LAC. This insect attacks avocado, bean (*Phaseolus vulgaris*), tomato, chili pepper and other crops, since it feeds from the phloem of plants, causing physiological disorders. In addition, it is a *Begomovirus* vector. To date, there have been reports of the silencing of several *B. tabaci* target genes via HIGS or artificial diets that contain dsRNA (Grover *et al.*, 2019), proving that the iRNA technology is a promising alternative for its control. However, there are still no reports of the evaluation in the field on the control of *B. tabaci* using any of these technologies, although the potential for their control using SIGS has recently been demonstrated, in combination with Mg-Fe layered double hydroxide nanoparticles (MgFe-LDH “Bioclay”) (Jain *et al.*, 2022). Likewise, the potential of homologous sequences derived from the *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) and heterologous derived from the *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV) has been proven, opening the possibility of protection against the *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Medina-Hernández *et al.*, 2013; Vargas-Salinas *et al.*, 2021). Despite being promising for an integrated and eco- and human-friendly management, the potential of the dsRNAs, and particularly of SIGS, in the agriculture of LAC is unknown.

In Mexico, iRNA have been used in the application of VIGS to study plant genes. Álvarez-

es causada por *C. gloeosporioides* y este hongo ataca al fruto en pre- y post-cosecha, y también causa daño foliar. La evidencia disponible en la literatura sugiere que *C. gloeosporioides* no absorbe eficientemente los dsRNA exógenos (Qiao *et al.*, 2021). Sin embargo, se ha demostrado que la antracnosis en chile y jitomate puede ser controlado por medio de HIGS (Mahto *et al.*, 2020), lo que sugiere que el uso de vesículas como acarreadores pudiera ser una alternativa para el control por SIGS. Entre las plagas que atacan cultivos de importancia en ALC destaca el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), una plaga polífaga que daña diferentes cultivos vegetales, preferentemente a maíz, sorgo (*Sorghum bicolor*), algodón y soya, cebolla, zanahoria (*Daucus carota*), lechuga, papaya, sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), pepino (*Cucumis sativus*), aguacate, banana, arroz, café (*Coffea arabica*), jitomate, cacao, caña de azúcar, entre muchos otros (Montezano *et al.*, 2018). Esta plaga se encuentra ampliamente distribuida en ALC y parte de Norte América y sus larvas pueden ocasionar pérdidas de hasta el 100% en los cultivos. Recientemente Gurusamy y colaboradores (2020a; 2020b) describieron el control de *S. frugiperda* mediante iRNA, empleando formulaciones de dsRNA con lípidos catiónicos que protegen los dsRNA de la degradación en el interior del insecto y eficientizan el silenciamiento (Gurusamy *et al.*, 2020a). En otro reporte, los mismos investigadores evaluaron el uso de nanopartículas para la protección de los dsRNA, ponderando las formulaciones con quitosano por su capacidad de protección y por ser un polímero biodegradable, no tóxico, económico y seguro con el ambiente, demostrando una mejora en la eficiencia del silenciamiento por SIGS (Gurusamy *et al.*, 2020b). Otra plaga de gran importancia en ALC es la broca de café (*Hypothenemus hampei*). Este insecto es responsable de las mayores pérdidas en el cultivo de café en el mundo (Jaramillo *et al.*, 2006). La aplicación de fragmentos de dsRNA en

Venegas *et al.* (2011) silenced genes related to flowering in canola (*B. napus*) and they obtained plants that flower without vernalization. In another study, Villanueva-Hernández *et al.* (2013), created a VIGS vector using an isolated *Begomovirus* in Yucatán in plants of the *Euphorbia* genus, which they called pEuMV-YP, with which they silenced ChII as a reporter gene to evaluate the functionality of the VIGS vector. ChII encodes a protein that protects chlorophyll and its silencing generates a photobleaching phenotype. The authors showed that pEuMV-YP is adequate for silencing genes in *N. benthamiana* and *C. annuum* plants. Similarly, Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo (2020) created a viral vector based on the Tobacco rattle virus (TRV), in which they incorporated a Gateway technology cassette in order to clone in it the DNA by recombination and they also incorporated the T-ADN region of *A. tumefaciens* to introduce the VIGS construct via agroinfiltration. This VIGS was used as a proof of concept to silence the gene that encodes the phytoene desaturase in chili pepper, which reduced the synthesis of phytoene, a precursor of the carotenes, and generated a phenotype of photobleaching in the leaves. Recently, Villanueva-Hernández *et al.* (2022) used pEuMV-YP to express in *N. benthamiana* an siRNA against the Krt18 gene in mice (*Mus musculus*), showing that the expression in plants mediated by VIGS can be used to silence genes in different kingdoms, in this case, from plants to mammals. We naturally consume small RNAs from some plants that we use as food or medications. For example, in China, the *Lonicera japonica* plant is used against influenza A and the SARS-CoV-2 virus, and its active ingredient has been proven to be a small RNA, miRNA-type, miRNA2911 (Zhou *et al.*, 2015; 2020), therefore the production in plants of dsRNA directed against human pathogens can be of medical interest, although there are many

la cavidad preoral de las larvas de la broca es efectiva para el silenciamiento génico, al igual que la aplicación exógena para la adquisición por ingestión (Aguilera *et al.*, 2011). Entre los genes diana evaluados, los mejores resultados fueron obtenidos silenciando las mananases o xilanasas involucradas en la hidrólisis de los principales carbohidratos del grano de café (Aguilera *et al.*, 2011). La mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) es otro insecto plaga importante, ampliamente distribuida por toda ALC. Este insecto afecta cultivos de aguacate, frijol (*Phaseolus vulgaris*), jitomate, chile y otras hortalizas; al alimentarse del floema de las plantas, provocando desórdenes fisiológicos. Adicionalmente, es vector de *Begomovirus*. A la fecha se ha reportado el silenciamiento de numerosos genes diana de *B. tabaci* a través de HIGS o de dietas artificial que contenga dsRNA (Grover *et al.*, 2019), demostrando que la tecnología del iRNA es una alternativa prometedora para su control. Sin embargo, aún no hay reportes de la evaluación en campo del control de *B. tabaci* con alguna de estas tecnologías, aunque recientemente se ha demostrado el potencial de control mediante SIGS, en combinación con nanopartículas de doble hidróxido en capas de MgFe (MgFe-LDH “Bioclay”) (Jain *et al.*, 2022). Así mismo se ha reportado el potencial de secuencias homólogas derivadas del virus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y heterólogas derivadas de *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV), abriendo las posibilidades de protección contra *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (Medina-Hernández *et al.*, 2013; Vargas-Salinas *et al.*, 2021). A pesar de ser promisorios para un manejo integrado y amigable para el medio ambiente y humano, aún se desconoce el potencial de los dsRNAs y en particular de SIGS en la agricultura de ALC.

En México, se han empleado iRNA en el uso de VIGS para estudiar genes vegetales. Álvarez-Venegas *et al.* (2011) silenciaron genes relacionados con la

points still to solve, such as the low stability of sRNAs and reaching a sufficient concentration for it to be therapeutic. Although the number of studies on the silencing in plants or phytopathogens in Mexico is still limited, the methodological tools that have been created help expect that the number of investigations in this field continue to increase.

CHALLENGES TO ESTABLISH SIGS IN THE FIELD

The potential of the iRNAs in tropical crops using the strategy of producing transgenic plant (HIGS) has been evaluated in several investigations. Although results have been promising, there are limitations in the legislations of most LAC countries for the agronomic use of genetically modified materials. However, the results have revealed the potential of iRNA to control, for example, Foc4, and pave the way for the evaluation of non-transgenic alternatives, SIGS (Dou *et al.*, 2020; Ghag *et al.*, 2014; Koch *et al.*, 2019; Koch and Wassenegger, 2021; Mahto *et al.*, 2020; Montezano *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2017).

In order to successfully protect plants and post-harvest fruits of agronomic interest using SIGS, the functionality of the dsRNAs in the plant-pathogen interaction must be studied. One of the challenges is the construction of nanovehicles that protect and extend the stability of the dsRNAs, which must be innocuous to humans and other living beings, as well as biodegradable. A nanoparticle that has these characteristics is bioclay, a layered double hydroxide clay that forms nanofilms, that nanoencapsulates the dsRNAs and keeps them stable for up to 20 days (Gebremichael *et al.*, 2021). It was initially developed as a form of plant protection against phytopathogenic viruses, but it is currently being evaluated for protection against fungal diseases

floración en canola (*B. napus*) y obtuvieron plantas que florecen sin vernalización. En otro trabajo, Villanueva-Hernández *et al.* (2013), crearon un vector VIGS empleando un *Begomovirus* aislado en Yucatán en plantas del género *Euphorbia*, al que le llamaron pEuMV-YP y con el que silenciaron ChII como gen reportero para evaluar la funcionalidad del vector VIGS; ChII codifica una proteína que protege la clorofila, y su silenciamiento genera un fenotipo de fotoblanqueo. Los autores demostraron que pEuMV-YP es adecuado para silenciar genes en plantas de *N. benthamiana* y de *C. annuum*. Similarmente, Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo (2020), crearon un vector viral basado en el virus del sonajero del tabaco (*Tobacco rattle virus*, TRV), al que le incorporaron un casete de tecnología Gateway para clonar en él, el ADN mediante recombinación, y también le incorporaron la región T-ADN de *A. tumefaciens* para introducir el constructo VIGS mediante agroinfiltración. Como prueba de concepto se utilizó este vector VIGS para silenciar el gen que codifica la fitoeno desaturasa en chile, lo que disminuyó la síntesis de fitoeno, un precursor de los carotenos, y generó un fenotipo de fotoblanqueo en las hojas. Recientemente, Villanueva-Hernández *et al.* (2022), usaron el pEuMV-YP para expresar en *N. benthamiana* un siRNA contra el gen Krt18 de ratón (*Mus musculus*), demostrando que la expresión en planta mediada por VIGS puede ser usada para silenciar genes en organismos de diferentes reinos, en este caso, de plantas a mamíferos. De manera natural, consumimos ARNs pequeños de algunas plantas que usamos como alimentos o medicinas. Por ejemplo, en China, se usa la planta *Lonicera japonica* para combatir la influenza A y el virus SARS-CoV-2 y se ha demostrado que su principio activo es un ARN pequeño de tipo miRNA, el miRNA2911 (Zhou *et al.*, 2015; 2020), por lo que la producción dirigida de dsRNA en plantas contra patógenos de humanos puede ser de interés

in plants. Another challenge to overcome is the improvement of the absorption of the dsRNAs in the fungi that have silencing machinery, but are recalcitrant, such as *C. glosporoides*. As well as finding more profitable dsRNA production costs. The next investigations should focus on solving these challenges to turn SIGS from a promise into a reality. The normativity also requires work, so that it can eventually become a commercial technology.

PERSPECTIVES OF SIGS

It is important to focus efforts on overcoming the technical limitations of SIGS, since its perspective is huge. The selection of possible targets is very broad. Practically any gene involved in the viability or the pathogenicity of an organism is susceptible of being a target, and the ease of production of dsRNAs makes this technology friendly for large-scale studies. Its nearest commercial applications are the control of plant and human disease vector insects (Castellanos *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Zotti *et al.*, 2018), the control of post-harvest fruit and vegetable diseases (de Oliveira *et al.*, 2021; Qiao *et al.*, 2021) and the control of weeds (Zabala-Pardo *et al.*, 2022), because there are already reports that prove the conditions under which they can be effective for these cases.

CONCLUSIONS

The iRNA technology has great potential for the control of pests and diseases caused by fungi, particularly the SIGS strategy, the use of which is safe and eco-friendly. Further investigations in this direction on the agronomically important pathosystems in Mexico and Latin America is crucial to create a catalogue of the pathogens that can be controlled using SIGS.

médico, aunque todavía quedan muchos puntos por resolver como la baja estabilidad de los sRNAs y alcanzar una concentración suficiente que sea terapéutica. Aunque aún es limitado el número de trabajos de silenciamiento en plantas o fitopatógenos en México, las herramientas metodológicas que se han ido construyendo permiten esperar que las investigaciones en este campo vayan en aumento.

DESAFÍOS PARA ESTABLECER SIGS EN EL CAMPO

Se ha evaluado el potencial de los iRNA en los cultivos tropicales utilizando la estrategia de generación de plantas transgénicas (HIGS); aunque los resultados han sido prometedores, se tiene limitaciones en las legislaciones de la mayoría de los países en ALC para el uso agronómico de materiales genéticamente modificados. Sin embargo, los resultados han revelado el potencial del iRNA para controlar por ejemplo, a Foc4, y abren camino para evaluar la alternativa no transgénica, el SIGS (Dou *et al.*, 2020; Ghag *et al.*, 2014; Koch *et al.*, 2019; Koch y Wassenegger, 2021; Mahto *et al.*, 2020; Montezano *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2017).

Para conseguir una exitosa protección de plantas y frutos en post-cosecha de interés agronómico mediante el uso de SIGS, se requiere estudiar la funcionalidad de los dsRNA en la interacción planta-patógeno. Uno de los desafíos es construir nanovehículos que protejan y alarguen la estabilidad de los dsRNA, y que sean inocuos para el hombre y demás seres vivos, además de ser biodegradables. Una nanopartícula que cumple estas características es una arcilla de doble hidróxido que forma nanoláminas en capas (llamada “bioclay”), que nanoencapsula los dsRNA y los mantiene estables hasta 20 días (Gebremichael *et al.*, 2021). Fue inicialmente desarrollada para conferir protección contra virus

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the National Humanities, Sciences and Technologies Council (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías - CONAHCyT), with projects FOSEC-SEP 220957, and FOP16-2021-01 No. 320993, and grant #644399 to OJCD and #700673 to KGCA.

LITERATURE CITED

- Aguilera GC, Padilla E, Flórez CP, Rubio JD y Acuña JR. 2011. ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (coleoptera: Scolytinae). Revista Colombiana de Entomología 37(2): 167–172. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882011000200001&script=sci_arttext&lng=es
- Álvarez-Venegas R, Zhang Y, Kraling Konrad and Tulsieram L. 2011. Flowering without vernalization in winter canola (*Brassica napus*): use of Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) to accelerate genetic gain. Nova scientia 3(5): 29-50. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052011000100003&lng=es&tlng=en
- Arce-Rodríguez M and Ochoa-Alejo N. 2020. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in Chili Pepper (*Capsicum* spp.). Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2172: 27–38. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0751-0_3
- Brito FSD, Santos JRP, Azevedo VCR, Peixoto YS, de Oliveira SA, Ferreira CF, Haddad F, Amorim EP, Fraaije B and Miller RNG. 2020. Genetic diversity and azole fungicide sensitivity in *Pseudocercospora musae* field populations in Brazil. Frontiers in Microbiology 11(99): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00099>
- Cai Q, He B, Kogel KH and Jin H. 2018. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi-nature's blueprint for modern crop protection strategies. Current opinion in microbiology 46: 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.003>
- Castellanos NL, Smagghe G, Sharma R, Oliveira EE and Christiaens O. 2019. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. Pest. Management Science 75: 537–548. doi: 10.1002/ps.5167
- Chí-Manzanero B, Carreón-Anguiano KG, Todd JNA, Góme-Tah R, Grijalva-Arango R, Tzec- Simá MA and Canto-Canché B. 2021. Analysis of *Pseudocercospora fijiensis* genes upregulated during early interaction with *Musa acuminata* (var. dwarf cavendish). Bionatura 6(1): 1540–1546. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.15>
- Dalakouras A, Jarausch W, Buchholz G, Bassler A, Braun M, Manthey T, Krczal G and Wassenecker M. 2018. Delivery of hairpin rnas and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. Frontiers in Plant Science 9: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01253>

fitopatógenos, pero actualmente se está evaluando para protección vegetal contra enfermedades fúngicas. Otro reto por superar es mejorar la absorción de los dsRNA en los hongos que sí poseen la maquinaria de silenciamiento, pero que resultan recalcitrantes, como *C. glosporoides*. Así como obtener costos más rentables de producción de los dsRNAs. Las próximas investigaciones deberán enfocarse en resolver estos retos para llevar a SIGS de promesa a realidad. También se requiere trabajar en la normatividad, para que eventualmente pueda llegar a ser una tecnología comercial.

PERSPECTIVAS DE LA SIGS

Es importante enfocar los esfuerzos para superar las limitantes técnicas de SIGS, pues su perspectiva es enorme. La selección de posibles dianas es muy amplia; prácticamente cualquier gen involucrado en la viabilidad o en la patogenicidad de un organismo es susceptible de ser diana, y la facilidad de producción de los dsRNA hace que esta tecnología sea amigable para estudios en alta escala. Sus aplicaciones comerciales más cercanas son el control de insectos vectores de enfermedades de plantas y humanos (Castellanos *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019; Zotti *et al.*, 2018), el control de enfermedades de frutos post-cosecha (de Oliveira *et al.*, 2021; Qiao *et al.*, 2021) y el control de malezas (Zabala-Pardo *et al.*, 2022), porque ya existen reportes que evidencian bajo qué condiciones pueden ser efectivos en estos casos.

CONCLUSIONES

La tecnología del iRNA tiene gran potencial para el control de plagas y enfermedades causadas por hongos, en particular la estrategia SIGS, cuya

- Dalakouras A, Wassenegeger M, Dadami E, Ganopoulos I, Pappas ML and Papadopoulou K. 2020. Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. *Plant Physiology* 182: 1–13. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00570>
- de Oliveira-Filho JG, Silva GDC, Cipriano L, Gomes M and Egea MB. 2021. Control of postharvest fungal diseases in fruits using external application of RNAi. *Journal of Food Science* 86(8): 3341–3348. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15816>
- Dou T, Shao X, Hu C, Liu S, Sheng O, Bi F, Deng G, Ding L, Li C, Dong T, Gao H, He W, Peng X, Zhang S, Huo H, Yang Q and Yi G. 2020. Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal* 18: 11–13. <https://doi.org/10.1111/pbi.13204>
- Fletcher SJ, Reeves PT, Hoang BT and Mitter N. 2020. A perspective on RNAi-based biopesticides. *Frontiers in Plant Science* 11: 51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
- Forster H and Shuai B. 2020. RNAi-mediated knockdown of β -1,3-glucan synthase suppresses growth of the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 110: 101486. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101486>
- Gaffar FY, Imani J, Karlovsky P, Koch A and Kogel KH. 2019. Different components of the RNA interference machinery are required for conidiation, ascosporeogenesis, virulence, deoxynivalenol production, and fungal inhibition by exogenous double-stranded rna in the head blight pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology* 10: 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01662>
- García-Ruiz H, Ruiz M, Peralta S, Gabriel C and El-Mounadi K. 2016. Mechanisms, applications, and perspectives of antiviral RNA silencing in plants. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 286–307. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1606-8>
- Ghag SB and Ganapathi TR. 2019. RNAi-mediated protection against banana diseases and pests. *3 Biotech* 9(3): 112. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1650-7>
- Ghag SB, Shekhawat UKS and Ganapathi TR. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12: 541–553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Grover S, Jindal V, Banta G, Taning CNT, Smagghe G and Christiaens O. 2019. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 100(2): 1–17. <https://doi.org/10.1002/arch.21522>
- Gurusamy D, Mogilicherla K and Palli SR. 2020. Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104(4): 1–15. <https://doi.org/10.1002/arch.21677>
- Gurusamy D, Mogilicherla K, Shukla JN and Palli SR. 2020. Lipids help double-stranded RNA in endosomal escape and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104(4): 1–19. <https://doi.org/10.1002/arch.21678>

aplicación es segura y ecoamigable. Es crucial desarrollar investigaciones en esta dirección sobre los patosistemas de importancia agronómica en México y Latinoamérica, para crear un catálogo de los patógenos que pueden ser controlados por SIGS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), con los Proyectos FOSEC-SEP 220957, y FOP16-2021-01 No. 320993, y la beca #644399 a OJCD y #700673 a KGCA.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Haile ZM, Gebremichael DE, Capriotti L, Molesini B, Negrini F, Collina M, Sabbadini S, Mezzetti B and Baraldi E. 2021. Double-stranded RNA targeting dicer-like genes compromises the pathogenicity of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Frontiers in Plant Science* 12: 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.667539>
- Halder K, Chaudhuri A, Abdin MZ, Majeed M and Datta A. 2022. RNA interference for improving disease resistance in plants and its relevance in this clustered regularly interspaced short palindromic repeats-dominated era in terms of dsRNA-based biopesticides. *Frontiers in plant science* 13: 885128. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.885128>
- Höfle L, Biedenkopf D, Werner B. T, Shrestha A, Jelonek L and 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>
- Hudzik C, Hou Y, Ma W and Axtell MJ. 2020. Exchange of small regulatory RNAs between plants and their pests. *Plant Physiology* 182: 51–62. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00931>
- Islam MT, Davis Z, Chen L, Englaender J, Zomorodi S, Frank J, Bartlett K, Somers E, Carballo SM, Kester M, Shakeel A, Pourtaheri P and Sherif SM. 2021. Minicell-based fungal RNAi delivery for sustainable crop protection. *Microbial Biotechnology* 14(4): 1847–1856. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13699>
- Jain RG, Fletcher SJ, Manzie N, Robinson KE, Li P, Lu E, Brosnan CA, Xu ZP and Mitter N. 2022. Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. *Nature Plants* 8(5): 535–548. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01152-8>



- Jaramillo J, Borgemeister C and Baker P. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* 96(3): 223–233. <https://doi.org/10.1079/ber2006434>
- Jensen PD, Zhang Y, Wiggins BE, Petrick JS, Zhu J, Kerstetter RA, Heck GR and Ivashuta SI. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food* 4(2): 90–97. <https://doi.org/10.4161/gmcr.25285>
- Jian J and Liang X. 2019. One small RNA of *Fusarium graminearum* targets and silences CEBiP gene in common wheat. *Microorganisms* 7(10): 425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100425>
- Jin Y, Zhao JH, Zhao P, Zhang T, Wang Sand Guo HS. 2019. A fungal miRNA mediates epigenetic repression of a virulence gene in *Verticillium dahliae*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 374(1767): 20180309. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0309>
- Kaldis A, Berbati M, Melita O, Reppa C, Holveva M, Otten P and Voloudakis A. 2018. 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/mpp.12572>
- Kettles GJ, Hofinger BJ, Hu P, Bayon C, Rudd JJ, Balmer D, Courbot M, Hammond-Kosack K E, Scalliet G and Kanyuka K. 2019. sRNA profiling combined with gene function analysis reveals a lack of evidence for cross-kingdom RNAi in the wheat – *Zymoseptoria tritici* pathosystem. *Frontiers in Plant Science* 10: 892. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00892>
- Kiselev KV, Suprun AR, Aleynova OA, Ogneva ZV and Dubrovina AS. 2021. Physiological conditions and dsRNA application approaches for exogenously induced RNA interference in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* 10(264): 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10020264>
- Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L, Rossbach O, Abdellatif E, Linicus L, Johannsmeier J, Jelonek L, Goesmann A, Cardoza V, McMillan J, Mentzel T and Kogel KH. 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): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>
- Koch A, Höfle L, Werner BT, Imani J, Schmidt A, Jelonek L and Kogel KH. 2019. SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. *Molecular Plant Pathology* 20(12): 1636–1644. <https://doi.org/10.1111/mpp.12866>
- Koch A, Stein E and Kogel KH. 2018. RNA-based disease control as a complementary measure to fight *Fusarium* fungi through silencing of the azole target Cytochrome P450 Lanosterol C-14  $\alpha$ -Demethylase. *European Journal of Plant Pathology* 152(4): 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1518-4>
- Koch A and Wassenegger M. 2021. Host-induced gene silencing – mechanisms and applications. *New Phytologist* 231(1): 54–59. <https://doi.org/10.1111/nph.17364>
- Lax C, Tahiri G, Patiño-Medina JA, Cánovas-Márquez JT, Pérez-Ruiz JA, Osorio-Concepción M, Navarro E and Calo S. 2020. The evolutionary significance of RNAi in the fungal kingdom. *International Journal of Molecular Science* 21(24): 9348. <https://doi.org/10.3390/ijms21249348>. PMID: 33302447; PMCID: PMC7763443
- Li C and Zamore PD. 2019. Preparation of dsRNAs for RNAi by *in vitro* transcription. *Cold Spring Harbor protocols* (3). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot097469>
- Ma X, Wiedmer J and Palma-Guerrero J. 2020. Interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici*. Small RNA bidirectional crosstalk during the interaction between wheat and *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science* 10: 1669. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01669>
- Mahto BK, Singh A, Pareek M, Rajam MV, Dhar-Ray S and Reddy PM. 2020. Host-induced silencing of the *Colletotrichum gloeosporioides* conidial morphology 1 gene (CgCOM1) confers resistance against Anthracnose disease in chilli and tomato. *Plant Molecular Biology* 104: 381–395. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01046-3>
- Majumdar R, Rajasekaran K and Cary JW. 2017. RNA Interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science* 8(200): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00200>
- McLoughlin AG, Wytinck N, Walker PL, Girard IJ, Rashid KY, De Kievit T, Fernando WGD, Whyard S and Belmonte MF. 2018. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports* 8: 7320. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25434-4>
- Medina-Hernández D, Rivera-Bustamante RF, Tenllado F and Holguín-Peña RJ. 2013. Effects and effectiveness of two RNAi constructs for resistance to pepper golden mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Viruses* 5(12): 2931–2945. <https://doi.org/10.3390/v5122931>
- Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SV, Peterson JA and Hunt TE. 2018. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology* 26(2): 286–300. <https://doi.org/doi.org/10.4001/003.026.0286>
- Nerva L, Sandrini M, Gambino G and Chitarra W. 2020. Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: effectiveness of different application methods in an open-air environment. *Biomolecules* 10(2): 200. <https://doi.org/10.3390/biom10020200>
- Papadopoulou N, Devos Y, Álvarez-Alfageme F, Lanzoni A and Waigmann E. 2020. Risk assessment considerations for genetically modified RNAi plants: EFSA's activities and perspective. *Frontiers in Plant Science* 11: 445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00445>
- Parker JE, Warrilow AGS, Price CL, Mullins JGL, Kelly DE and Kelly SL. 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology* 7(4): 143–161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>
- Qi T, Guo J, Peng H, Liu P, Kang Z and Guo J. 2019. Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of wheat and barley. *International Journal of Molecular Sciences* 20(206): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20010206>



- Qi T, Zhu X, Tan C, Liu P, Guo J, Kang Z and Guo J. 2018. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnology Journal* 16(3): 797–807. <https://doi.org/10.1111/pbi.12829>
- Qiao L, Lan C, Capriotti L, Ah-Fong A, Nino Sanchez J, Hamby R, Heller J, Zhao H, Glass NL, Judelson HS, Mezzetti B, Niu D and Jin H. 2021. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal* 19(9): 1756–1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>
- Rodrigues TB and Petrick JS. 2020. Safety considerations for humans and other vertebrates regarding agricultural uses of externally applied RNA molecules. *Frontiers in Plant Science* 11: 407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00407>
- Rosa C, Kuo Y, Wuriyanghan H and Falk BW. 2018. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology* 56: 581–610.
- Sang H and Kim JI. 2020. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnology Reports* 14: 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00588-3>
- Sarkar A and Roy-Barman S. 2021. Spray-induced silencing of pathogenicity gene MoDES1 via exogenous double-stranded RNA can confer partial resistance against fungal blast in rice. *Frontiers in Plant Science* 12: 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.733129>
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N and Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* 3(3): 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Sun G and Riggs AD. 2017. A Simple and cost-effective approach for *in vitro* production of sliced siRNAs as potent triggers for RNAi. *Molecular therapy. Nucleic acids* 8: 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.008>
- Taning CNT, Arpaia S, Christiaens O, Dietz-Pfeilstetter A, Jones H, Mezzetti B, Sabbadini S, Sorteberg HG, Sweet J, Ventura V and Smagghe G. 2020. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science* 76(3): 841–845. <https://doi.org/10.1002/ps.5686>
- Todd JNA, Carreón-Anguiano KG, Couoh-Dzul OJ, de los Santos-Briones C and Blondy Canto-Canché. 2023. Effectors: key actors in phytopathology. *Mexican Journal of Phytopathology* 41(2): 203–228. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2210-4>
- van Dijk M, Morley T, Rau ML and Saghai Y. 2021. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food* 2(7): 494–501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>
- Vargas-Salinas M, Medina-Hernández D, Arcos-Ortega GF, Luis-Villaseñor IE and Holguín-Peña RJ. 2021. RNAi activation with homologous and heterologous sequences that induce resistance against the begomovirus Pepper golden mosaic virus (PepGMV). *3 Biotech* 11(3): 1–19. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02653-7>
- Villanueva-Alonzo HJ, Haro-Álvarez AP, Alvarado-Segura AA, Valle-Gough RE, Collí-Mull JG, Cal-Torres A, Arana-Argáez VE, Torres-Romero JC, Moreno-Valenzuela OA, Nic-Can G, Ayil-Gutiérrez BA and Acosta-Viana KY. 2022. A method to produce vsiRNAs in plants with cross-kingdom gene silencing capacity. *Applied Sciences* 12(11): 5329. <https://doi.org/10.3390/app12115329>
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, López-Ochoa LA, Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-García Y and Moreno-Valenzuela OA. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology letters* 35(5): 811–823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>
- Wang M and 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 B, Sun Y, Song N, Zhao M, Liu R, Feng H, Wang X and Kang Z. 2017. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-miR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *The New phytologist* 215(1): 338–350. <https://doi.org/10.1111/nph.14577>
- Wang M, Weiberg A, Lin FM, Thomma BPHJ, Huang H and Jin H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* 2: 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang HD and Jin H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342(6154): 118–123. <https://doi.org/10.1126/science.1239705>
- Werner BT, Gaffar FY, Schuemann J, Biedenkopf D and Koch AM. 2020. RNA-spray-mediated silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL genes improve barley disease resistance. *Frontiers in Plant Science* 11(476): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Werner BT, Koch A, Šečić E, Engelhardt J, Jelonek L, Steinbrenner J and Kogel KH. 2021. *Fusarium graminearum* DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence. *PLoS One* 16(8): e0252365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252365>. PMID: 34351929; PMCID: PMC8341482
- Yin C and Hulbert S. 2015. Host Induced Gene Silencing (HIGS), a promising strategy for developing disease resistant crops. *Gene Technology* 4(3): 1–2. <https://doi.org/10.4172/2329-6682.1000130>
- Yin C, Jurgenson JE and Hulbert SH. 2011. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(5): 554–561. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0229>
- Yin C, Zhu H, Jiang Y, Shan Y and Gong L. 2020. Silencing Dicer-like genes reduces virulence and sRNA generation in *Penicillium italicum*, the cause of citrus blue mold. *Cells* 9(2): 363. <https://doi.org/10.3390/cells9020363>

- Xu M, Guo Y, Tian R, Gao C, Guo F, Voegelé RT, Bao J, Li C, Jia C, Feng H and Huang L. 2020. Adaptive regulation of virulence genes by microRNA-like RNAs in *Valsa mali*. The New phytologist 227(3): 899–913. <https://doi.org/10.1111/nph.16561>
- Xu M, Li G, Guo Y, Gao Y, Zhu L, Liu Z, Tian R, Ga, C, Han P, Wang N, Guo F, Bao J, Jia C, Feng H and Huang L. 2022. A fungal microRNA-like RNA subverts host immunity and facilitates pathogen infection by silencing two host receptor-like kinase genes. The New phytologist 233(6): 2503–2519. <https://doi.org/10.1111/nph.17945>
- Zabala-Pardo D, Gaines T, Lamego FP and Avila LA. 2022. RNAi as a tool for weed management: challenges and opportunities. Advance in Weed Science 40(spe1): <https://doi.org/10.51694/AdvWeedSci/2022;40:seventy-five006>
- Zanini S, Šečić E, Busche T, Galli M, Zheng Y, Kalinowski J and Kogel KH. 2021. Comparative analysis of transcriptome and sRNAs expression patterns in the *Brachypodium distachyon*-*Magnaporthe oryzae* pathosystems. International journal of molecular sciences 22(2): 650. <https://doi.org/10.3390/ijms22020650>
- Zeng J, Gupta VK, Jiang Y, Yang B, Gong L and Zhu H. 2019. Cross-kingdom small rnas among animals, plants and microbes. Cells 8(4): 371. <https://doi.org/10.3390/cells8040371>
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H, Song D, Yin M and Shen J. 2019. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. Pest Management Science 75(7): 1993–1999. <https://doi.org/10.1002/ps.5313>
- Zhou Z, Li X, Liu J, Dongxia H, Chen Q, Liu J, Kong H, Zhang Q, Qianyi Z, Hou D, Zhang L, Zhang G, Liu Y, Zhang Y, Li J, Wang J, Chen X, Wang H, Zhang J, Chen H and Zhang CY. 2015. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. Cell Research 25: 39–49. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.130>
- Zhou LK, Zhou Z, Jiang XM, Zheng Y, Chen X, Fu Z, Xiao G, Zhang CY, Zhang LK and Yi Y. 2020. Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients. Cell discovery 6(1): 54. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00197-3>
- Zhu L, Zhu J, Liu Z, Wang Z, Zhou C and Wang H. 2017. Host-induced gene silencing of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* pathogenicity genes mediated by the brome mosaic virus. Genes 8(10): 241. <https://doi.org/10.3390/genes8100241>
- Zotti M, Avila dos Santos E, Cagliari D, Christiaens O, Tizi Taning CN and Smagghe G. 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. Pest Management Science 74: 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>
- Zotti ., Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT and Smagghe G. 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. Pest Management Science 74: 1239–1250. <https://doi.org/10.1002/ps.4813>