



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Junta de Andalucía
Consejería de Agricultura, Ganadería,
Pesca y Desarrollo Sostenible
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

Desarrollo de vacunas basadas en tratamientos SIGS para el control de patógenos en plantas

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Josemaría Delgado Martín

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Málaga

Director:

Dr. Leonardo Velasco Arjona

IFAPA Centro de Málaga

Málaga, Julio de 2023





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Josemaría Delgado Martín

 <https://orcid.org/0000-0001-7027-3766>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña JOSEMARÍA DELGADO MARTÍN

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: DESARROLLO DE VACUNAS BASADAS EN TRATAMIENTOS SIGS PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS EN PLANTAS

Realizada bajo la tutorización de EDUARDO BEJARANO RODRÍGUEZ y dirección de LEONARDO VELASCO ARJONA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 7 de JULIO de 2023

Fdo.: JOSEMARÍA DELGADO MARTÍN Doctorando/a	Fdo.: EDUARDO BEJARANO RODRÍGUEZ Tutor/a
Fdo.: LEONARDO VELASCO ARJONA Director/es de tesis	



Leonardo Velasco Arjona, doctor en CC Biológicas e investigador titular del IFAPA Centro de Málaga.

RATIFICA, CERTIFICA y AUTORIZA:

La presentación de la tesis doctoral titulada “*Desarrollo de vacunas basadas en tratamientos SIGS para el control de patógenos en plantas*” para optar al grado de doctor en Biotecnología avanzada, realizada por el Graduado Josemaría Delgado Martín, siendo desarrollada bajo mi dirección.

Además, la relación de publicaciones científicas que avalan esta tesis, no han sido usadas para avalar otra tesis doctoral, ni pasada ni futura.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente escrito en Málaga a 20 de julio 2023.

Fdo.: Leonardo Velasco Arjona

Director de la Tesis

Eduardo Bejarano Rodríguez, Catedrático titular del IHSM “La Mayora”, como profesor adscrito al Programa de Doctorado de Biotecnología Avanzada de la Universidad de Málaga.

RATIFICA, CERTIFICA y AUTORIZA:

Que la tesis doctoral titulada “*Desarrollo de vacunas basadas en tratamientos SIGS para el control de patógenos en plantas*” ha sido realizada por Josemaría Delgado Martín, graduado en Biología, para optar al título de Doctor en Biotecnología Avanzada y bajo la dirección de Leonardo Velasco Arjona, investigador titular de IFAPA Centro de Málaga.

Que esta tesis doctoral ha sido realizada bajo mi tutorización y sobre la que autorizo su presentación.

Además, la relación de publicaciones científicas que avalan esta tesis, no han sido usadas para avalar otra tesis doctoral, ni pasada ni futura.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente escrito en Málaga a 20 de julio de 2023.

Fdo.: Eduardo Bejarano Rodríguez

Tutor de la Tesis



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

*“No es tanto que consigas tu sueño, si no la persona en la que te tienes
que convertir para lograrlo”*

Anónimo



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A Papá, por ser la Guía

A Mamá, por Todo

A Elena, por Nuestro futuro

Agradecimientos

Los agradecimientos son ese momento donde intentas plasmar, porque solo puedes intentarlo, el impacto que las personas de tu alrededor tienen sobre tu vida. Como dijo Ortega y Gasset “yo soy yo y mis circunstancias”, unas circunstancias que normalmente nos son impuestas. Es nuestra forma de percibir las, aceptarlas y enfrentarlas las que las convierten en un trampolín para crecer o un peso que nos haga retroceder. Hoy y siempre podré decir que “mis circunstancias” han sido privilegiadas. La vida me ha regalado un inmenso grupo de personas con una altura humana y una ambición personal que solo te dejan la opción de ser mejor cada día y convertirte en la suma de todas ellas.

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi director de Tesis, el Dr. Leonardo Velasco, por la inmensa oportunidad de hacerla bajo su dirección. Gracias por todo el esfuerzo, trabajo y dedicación, por todo el conocimiento, paciencia y tiempo dedicado durante estos últimos 4 años. Mil gracias por ayudarme a crecer en el plano profesional y personal.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a todas las personas que han participado activamente en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Al equipo Fito (Josefa Alcalá, Emanuel Martínez, Cristina G, Noemi, Juan Ángel y Sara Zarrabi) por ayudarme siempre en el laboratorio. Al resto de compañeros del IFAPA con los que siempre se puede contar, ya sea para buscar ayuda, consejo o un buen guateque (Maite, Carmen, Elsa, Isa, Modesto, Mario, Clara, Iris, Sabine, Ana, Javier, Marta, Julia, Rocio, Mario, Eva, Nani, Esperanza, Jesús, Francisco, Juana, Pepillo y Eli). Me gustaría agradecer en especial a nuestra directora en la Sombra, Pepica, por las grandes charlas, ayuda, cervecitas y algún que otro mosqueteo. Muchas gracias por tener ese buen carácter y corazón.

También agradecer de forma especial a aquellas personas que empezaron siendo jefes y compañeros y hoy son buenos amigos. Gracias Luis Galipienso por aquel mes y medio en tu tierra, Valencia, donde además de descubrir que un valenciano es como un Hobbit, se puede crecer mucho y llegar muy lejos, aunque la vida lo ponga complicado. Gracias a Anderson por acogerme y recibirme en Brasil como a un hermano y por darme la oportunidad de entrar en tu familia como uno más. Siempre tendré a tu familia, a Japa y Brasil como uno de los mejores recuerdos de mi vida. Gracias Alejandro Heredia, por darme la oportunidad de ver el mundo como un químico, y por la cercanía y disposición que te caracteriza. Gracias Enrique Niza, por tu energía, conocimiento y siempre tener una nueva idea.

Gracias a Leticia, Dirk y Luis Rubio piezas fundamentales en el desarrollo de mi tesis. A Jose María, Luis Zafra y Adolfo por enseñarme tanto y estar siempre dispuestos a una pregunta más.

No puedo dejar pasar la oportunidad de agradecer y recordar a todas las personas que día a día me llevaron de la mano hasta el inicio de esta tesis. Comenzando por el equipo radiactivo bajo la supervisión de “quien no debe ser nombrado”. Con su equipo y su ejemplo he podido aprender que ser firme en los valores, el crecimiento constante y crecer

en equipo son las claves para una vida feliz y plena. Mil gracias al Dr. Seleneda, leyenda entre las leyendas. Mil gracias Jaime, Pablo, Ivan y Manolo. Mil gracias Yisus, Susan, German, Ana U, Marcos, Mar, Migue Rabelo, Platero, Juanma, etc. Gracias por las infinitas cervezas, charlas y alpisteos varios.

Agradecer, siempre, al tridente de los mares, el team velero Vergantil, a Ylenia y Vicky. Por darme un punto de referencia al que mirar para crecer, por generar un ambiente de mejora continua, amistad y cerveza furtiva y por ser una maravillosa constante. Siempre cerca.

Gracias Fran, David y Chiki por ser la familia más fiel que existe. Porque, aunque la vida nos separe, seamos un pilar fijo en nuestras vidas.

Gracias Mamá por todo. Has construido lo que todos soñamos, una familia firme, fuerte y que crece. Gracias por todo el esfuerzo y amor que pones en todas las cosas. Gracias por hacerme quien soy. Gracias, también, a todos mis hermanos, una buena tribu que se multiplica cada día.

Gracias Papá, quizás el agradecimiento más difícil. Eres el espejo al que muchos nos miramos. Ejemplo de trabajo, esperanza, fe, cariño, amistad, pasión por la vida y alegría. Gracias, gracias por cuidarme siempre.

A ti, Elena, por ser mi pilar, por hacer que siempre quiera ser mejor, por todo el apoyo y cariño que recibo de ti. Gracias por ayudarme a crecer y a apuntar siempre mal alto. Gracias por ser mi futuro.

A todos, mil gracias.

Abreviaturas clave

CGMMV Cucumber Green Mottle Mosaic Virus

ToLCNDV Tomato Leaf Curl New Delhi Virus

PTI *PAMP-triggered immunity*

PAMP *pathogen-associated molecular pattern*

PRRs *pattern recognition receptors*

NB-LRR *nucleotide binding leucine-rich repeat*

ETI *effector-triggered immunity*

ETS *effector-triggered susceptibility*

MAMPs *Microbe associated molecular patterns*

DAMPs *damage associated molecular pattern*

dsRNA doble strand RNA

RNAi RNA interferente o silenciamiento

PTGS silenciamiento génico post-transcripcional

TGS silenciamiento génico transcripcional

RdDM metilación del DNA dependiente de RNA

RdRP RNA polimerasa dependiente de RNA

vsRNA virus derived small interfering RNA

siRNA small interfering RNA

miRNA micro RNA

hpRNA hairpin dsRNA

RdRP RNA polimerasa dependiente de RNA

VIGS Virus induced gene silencing, silenciamiento génico inducido por virus

HIGS Host induced gene silencing, silenciamiento génico inducido por el huésped

SIGS Spray induced gene silencing, silenciamiento génico inducido por pulverización



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice general



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Índice general.

Capítulo I: Introducción general y Objetivos.....	1
1. Enfermedades emergentes.....	3
2. El cultivo de cucurbitáceas en el sudeste de España.....	3
3. Cucumber Green Mottle Mosaic Virus (CGMMV).....	4
4. Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV).....	5
5. Control de virus de plantas.....	7
6. Sistema de defensa vegetal frente infecciones virales.....	10
7. RNAi principal defensa antiviral.....	13
8. Diferentes formas de inducir el RNAi: VIGS, HIGS y SIGS.....	17
9. Barreras y limitaciones de SIGS.....	20
10. Retos para el diseño de nanoformulaciones de dsRNA-NPs en SIGS.....	21
11. Producción de dsRNA.....	22
12. Tipos de nanotransportadores usado en SIGS.....	23
13. Carbon Dots.....	25
14. Posibles riesgos, problemas de seguridad y limitaciones legales de SIGS.....	32
Objetivos.....	34
Capitulo II: An efficient dsRNA constitutive expression system in Escherichia coli.....	35
Abstract.....	38
Introduction.....	39
Materials and Methods.....	40
Results.....	45
Discussion.....	48
References.....	51
Figures.....	54
Capitulo III: Exogenous application of dsRNA for the control of viruses in cucurbits	61
Abstract.....	63



Introduction.....	64
Materials and Methods.....	66
Results.....	70
Discussion.....	76
References.....	81
Tables and Figures.....	85
Capitulo IV: Carbon dots boost dsRNA delivery in plants and increase local and systemic siRNA production	95
Abstract.....	97
Introduction.....	98
Results.....	100
Discussion.....	114
Materials and Methods.....	119
Conclusiones.....	123
Referencias.....	124
Resumen de los resultados.....	129
Discusión general.....	139
Conclusiones.....	149
Bibliografía.....	153
Curriculum vitae.....	169
Anexos	175



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen de la tesis

En la actualidad, la agricultura se enfrenta a enormes desafíos. Las plagas y enfermedades provocan la pérdida del 40% de las cosechas en todo el mundo. En este sentido las enfermedades virales juegan un papel crítico, siendo la segunda causa de estas pérdidas. Los métodos actuales de control están basados en limitar el impacto que generan en los cultivos y no en estrategias que las ataquen de forma directa y preventiva la acción de patógenos virales. Bajo este contexto, los recientes desarrollos en activación foliar del RNAi, principal defensa antiviral, están permitiendo por primera vez desarrollar tratamientos que pre-inmunizan a las plantas frente a la llegada de estos patógenos virales.

La presente tesis doctoral aborda el diseño y aplicación foliar de vacunas de plantas basadas en dsRNA, capaces de activar las defensas en las plantas frente a CGMMV y ToLCNDV, dos patógenos virales con gran relevancia en los cultivos de cucurbitáceas en España. Para ello, diseñamos vectores de expresión bacteriana de dsRNA de alta eficiencia, que incorporan promotores de expresión constitutiva (proD). Los nuevos vectores, L4440-2XproD y pUC-2XproD suponen un gran paso en la producción a gran escala e industrial de dsRNA pues evitan el uso de inductores de la expresión, reduciendo la posibilidad de contaminación en los fermentadores y los costes adicionales.

Los dsRNA resultantes se usaron como vacunas para plantas en tratamientos SIGS con el fin de limitar el desarrollo de las enfermedades producida por CGMMV y ToLCNDV en cucurbitáceas. Al cabo de 18 dpi en experimentos de invernadero, los tratamientos mostraron limitar de forma muy efectiva la multiplicación viral de CGMMV, reduciendo el impacto de la enfermedad. En el caso de ToLCNDV, los tratamientos no limitaron la progresión de la enfermedad, posiblemente debido a la baja dosis de tratamiento usado u otros factores específicos de virus DNA. Además, hemos desarrollado un método de detección y cuantificación de dsRNA y siRNA que nos permite evaluar la idoneidad de los diferentes tratamientos, dando lugar a una herramienta muy útil en procesos de optimización de las nuevas formulaciones.

La entrada y penetración del dsRNA en la planta y la célula es un factor limitante en la efectividad de las vacunas vegetales. Por ello, optamos por sintetizar nanopartículas de CDs con el objetivo de ser usado como adyuvante en las formulaciones. El nuevo CDs ha demostrado mejorar la penetración y movilidad de los dsRNA por la planta, haciéndolos más accesibles a la maquinaria del RNAi. Y, por tanto, mejorando notablemente la efectividad de las nanoformulaciones usadas en tratamiento SIGS de vacunas de plantas.

Nuestros resultados demuestran que la aplicación foliar de dsRNA es efectiva en limitar la progresión de la enfermedad producida por CGMMV en cultivos de cucurbitáceas. Hemos diseñado una metodología versátil, modular y de fácil aplicación, extensible para el desarrollo de vacunas en plantas dirigidas a diferentes patógenos virales. Aportamos una alternativa preventiva, específica y de rápida implantación a los sistemas tradicionales basados en la búsqueda de resistencias o el uso de pesticidas químicos para hacer frente a los patógenos virales.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo I

Introducción general y objetivos

1. Enfermedades emergentes

La agricultura se ve afectada continuamente por enfermedades y plagas que según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, provocan la pérdida del 40% de las cosechas. Las enfermedades en plantas son causadas en primer lugar por hongos y en segundo lugar por virus, seguidos por las bacteriosis. Los virus son los responsables del 50% de las pérdidas totales con un impacto económico de 30.000 millones de dólares anuales a nivel mundial (De Ronde *et al.*, 2019; Jones y Naidu 2019). Estas enfermedades, denominadas emergentes, se caracterizan por no tener métodos de control específico que limiten su impacto en cultivos, bienestar humano y biodiversidad (Anderson *et al.*, 2004).

Las enfermedades emergentes son causadas principalmente por virus patógenos que: (a) han incrementado su incidencia, distribución geográfica o rango de hospedadores, (b) se vuelven más agresivas por aumento de su capacidad para infectar y generar enfermedad, (c) han evolucionado recientemente y (d) son enfermedades nuevas o en una fase de reintroducción (Anderson *et al.*, 2004). Los movimientos fronterizos promovidos por la economía global generan oportunidades de diseminación de agentes infecciosos, vectores o huéspedes exóticos que colonicen nuevos ambientes. Además, los cambios en el clima promueven la aparición de zonas favorables para el desarrollo de nuevos patógenos (Manley *et al.*, 2015). El principal foco de entrada y aparición de este tipo de enfermedades en la península ibérica es el sureste español debido a la alta producción de cultivos hortícolas bajo invernadero.

2. El cultivo de cucurbitáceas en el Sudeste de España

La agricultura es una de las principales actividades de la economía española, representó el 9.2 % del PIB durante el año 2021. España cuenta con una superficie invernada de 49.000 hectáreas, dedicada principalmente a la producción de hortalizas, convirtiéndose así en el país con más superficie protegida de toda la región mediterránea. Esta superficie productora se concentra principalmente en el sudeste de la península ibérica con 40.000 hectáreas, lo que supone el 40% de la producción hortícola nacional (Calvo, 2019). La agricultura protegida se localiza, principalmente, en la zona costera del mar Mediterráneo donde las condiciones climáticas posibilitan el cultivo de una gran variedad de especies vegetales, pues cuenta con una temperatura media anual de unos 20 grados y más de 300 días de sol por año. Los cultivos mayoritarios son el tomate, pimiento, melón, calabacín, berenjena, pepino, sandía, judía, fresa y lechuga, entre los que destacan las cucurbitáceas (Baudoin *et al.*, 2002; Crespo *et al.*, 2020).

Se estima que en los cultivos del sureste español aparece un patógeno viral nuevo cada dos años, desde donde extiende a otras regiones. El cultivo intensivo de cucurbitáceas se ve afectado por al menos 60 especies de virus patógenos. Entre ellos, los tobamovirus

(CGMMV), potyvirus (CVYV), begomovirus (ToLCNDV) y closterovirus (CYSDV), se cuentan entre los principales grupos virales que afectan a las cucurbitáceas en el área (Crespo *et al.*, 2018; Velasco *et al.*, 2020).

3. Cucumber Green Mottle Mosaic Virus (CGMMV)

El virus del mosaico verde del pepino (CGMMV) fue descrito por primera vez en 1935, aunque ya en 1923 se describieron síntomas compatibles en pepino (*Cucumis sativus*) (Ainsworth *et al.*, 1935; Smith, 1937). CGMMV pertenece al género *Tobamovirus* de la familia *Virgaviridae*, tiene una distribución mundial donde causa enormes pérdidas en la producción de calabaza, calabacín, pepino, sandía y melón, entre otras cucurbitáceas (Dombrovsky *et al.*, 2017).

Síntomas de CGMMV

Los síntomas más comunes que ocasiona CGMMV en las cucurbitáceas son mosaicos, moteado clorótico, abullonamiento en hoja y deterioro de la pulpa en frutos (Shim *et al.*, 2006). Está bien documentado como la virulencia de CGMMV depende de la especie y del cultivar, pero también de las condiciones ambientales, fase de crecimiento de la planta, momento de la infección y cepa viral. La infección en etapas tempranas de crecimiento induce síntomas más severos que en la infección de plantas maduras (Reingold *et al.*, 2016). CGMMV presenta características de virus de clima cálido ya que la propagación sistémica se ve más favorecida a 29°C que a 24°C (Moreno *et al.*, 2004). En pepino, produce moteado verde en hojas jóvenes y frutos. Las plantas presentan retardo del crecimiento y en ocasiones pueden llagar a colapsar y morir (Dombrovsky *et al.*, 2017). Los síntomas aparecen entre 7-14 días post infección, mostrando a bajas temperaturas una deformación foliar menos evidente (Smith *et al.*, 1937). En sandía se aprecia moteado en las hojas, mosaico en las plantas jóvenes y en tallo se pueden desarrollar lesiones necróticas. En calabaza y calabacín el follaje infectado es asintomático o produce moteado y mosaico. En melón, las hojas jóvenes desarrollan síntomas iniciales de moteado y mosaico que a menudo desaparecen en follaje maduro. En general, los frutos desarrollan diferentes grados de malformación, moteado y abullonado superficial. Las pérdidas económicas causadas por CGMMV van asociadas a la mala calidad de la fruta y de la reducción de producción neta de la planta, que puede ir desde el 15% en pepino a más del 50% en sandía.

Morfología y características del genoma

CGMMV tiene un genoma de RNA de cadena simple positiva de 6,4 kb encapsulado en ~2000 moléculas idénticas de la proteína de la cápside, dando lugar a una partícula viral de ~300 nm × 18 nm (Dombrovsky *et al.*, 2017). El extremo 5' del RNA genómico tiene un nucleótido metilado cap (m7G5pppG) y en su extremo 3' hay una

estructura similar al RNAt. Las modificaciones de los extremos protegen la integridad del genoma viral de la degradación (Tan *et al.*, 2000). El genoma de CGMMV presenta 4 marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican para dos proteínas de RdRP de 129 y 186 kDa, una proteína MP de 29 kDa y una CP de 17.3 kDa (Ishibashi *et al.*, 2016).

Transmisión

La transmisión de CGMMV ocurre principalmente por contacto, de forma mecánica. Cuando en una planta se provocan heridas, ya sean por acción de agentes ambientales, insectos o por técnicas culturales, CGMMV es capaz de penetrar, infectar y desencadenar la enfermedad. La transmisión de CGMMV por la semilla es posible gracias a las partículas virales presentes en la superficie de la semilla infectando a la plántula durante la germinación. Se ha observado la capacidad de CGMMV de ser transmitido a través del polen (Shargil *et al.*, 2015). También se ha descrito que es capaz de ser transmitido por abejas (*A. mellifera*) durante los procesos de polinización (Shargil *et al.*, 2015).

Rango de hospedadores

Las cucurbitáceas son las plantas más afectadas por CGMMV que afecta al menos a 16 especies cultivables como melón, sandía, pepino, calabaza y calabacín, y a otras 15 especies silvestres ampliamente distribuidas que actúan de hospedadores naturales (Antignus *et al.*, 1990). Otras familias como *Apiaceae*, *Solanaceae*, *Amaranthaceae* también se ven afectadas por el virus (Dombrovsky *et al.*, 2017).

Control y manejo de la enfermedad

El manejo óptimo de CGMMV requiere del uso de la gestión integrada de plagas. Mediante la combinación de medidas fitosanitarias, culturales, y tratamientos químicos se persigue limitar o evitar la llegada y dispersión de CGMMV por el cultivo. Se ha encontrado resistencia natural total o parcial en plantas de pepino, melón y diversos tipos de cucurbitáceas (Antignus *et al.*, 2008; Rajamony *et al.*, 1990). Debido a su estabilidad en suelo, el uso de portainjertos de calabaza resistentes a CGMMV supone una estrategia para el control efectivo en infecciones transmitidas por el suelo, como es el caso. Aparte de las resistencias naturales se está explorando el uso de transgénicos o el sistema CRISPR/Cas9 para expresar pequeñas moléculas de RNA de interferencia o genes del virus que activen las defensas naturales para hacer frente a estas infecciones (Price *et al.*, 2015).

4. Tomato Leaf Curl New Delhi Virus (ToLCNDV)

El virus del rizado de la hoja del tomate de Nueva Delhi (ToLCNDV) es el begomovirus más importante asociado a la enfermedad del enrollamiento de la hoja del tomate en Asia (ToLCD, por sus siglas en inglés), de los 13 descritos. Esta enfermedad fue

descrita inicialmente en 1948 afectando principalmente al tomate en el subcontinente indio (Vasudeva y Raj, 1948). ToLCNDV es un miembro de la familia *Geminiviridae*. Esta familia incluye, hasta la fecha, 288 especies que se clasifican en 7 géneros *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Mastrevirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus* y *Eragrovirus* (Varsani *et al.*, 2014). La forma de transmisión y dispersión de los begomovirus es principalmente por la mosca blanca del tabaco *Bemisia tabaci* (Zaidi *et al.*, 2017).

Rango de hospedadores de ToLCNDV

ToLCNDV se identificó inicialmente en cultivos de solanáceas en la India (Padidam *et al.*, 1995), pero desde entonces se ha descrito que infecta a 43 especies de varias familias, incluyendo *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Solanaceae*, *Malvaceae* y *Fabaceae* en diferentes regiones del mundo (Seal *et al.*, 2006). En 2012 se identificó por primera vez, en cucurbitáceas afectadas por la enfermedad del enrollamiento foliar en invernaderos de Murcia, reportándose ese mismo año síntomas similares en Almería. Desde entonces, ToLCNDV se ha extendido a todo el sur de España, donde se considera actualmente como uno de los patógenos más importantes de cucurbitáceas (López *et al.*, 2015).

Morfología y características del genoma de ToLCNDV

Los geminivirus se caracterizan por consistir estructuralmente en una partícula viral dividida en dos casi perfectos icosaedros que contienen un genoma circular monocatenario de 2,5-3.1 kb dividido en dos componentes genómicos diferentes o iguales (Stanley, 1985). ToLCNDV presenta dos componentes genómicos diferentes asignados como DNA-A y DNA-B. El DNA-A codifica para la proteína de replicación (Rep, codificada pro AC1), una proteína potenciadora de la replicación (REn; codificada por AC2), una proteína activadora de la transcripción (TrAp; codificada por AC3), una proteína de cubierta (CP, codificada por AV1), una proteína AV2 y una proteína AC4. El DNA-B codifica para la proteína de movimiento (MP, codificada por BC1) y una proteína de transporte nuclear (NSP, codificado por BV1) (Zaidi *et al.*, 2017; Fondong, 2013). ToLCNDV está asociado a la presencia de beta-satélites, por lo general tienen la mitad de tamaño que los componentes DNA-A y DNA-B, con 1,4 kb. ToLCNDV y algunos begomovirus pueden sufrir reordenamiento o recombinación genómica y captura de beta-satélites durante la formación de las nuevas partículas virales, generando alta variabilidad que le permiten adaptarse para infectar a nuevos hospedadores (Lefeuvre y Moriones, 2015; Zaidi *et al.*, 2017).

Control y manejo de la enfermedad causada por ToLCNDV

Convencionalmente, las estrategias de control de los begomovirus se dirigen hacia el control de sus vectores mediante el uso de pesticidas, empleo de depredadores o parasitoides naturales y el uso de barreras físicas, tales como las mallas de alta densidad

y/o hilos que dispersan los rayos UV para causar confusión en los desplazamientos de los insectos. Sin embargo, los complejos factores epidemiológicos asociados a los brotes de la enfermedad por begomovirus, como la dinámica migratoria de la mosca blanca, la rápida evolución del virus y las impredecibles expansiones de la gama de hospedadores, han dificultado enormemente el desarrollo de estrategias eficaces de gestión de la enfermedad a largo plazo (Loebenstein y Katis, 2014).

5. Control de virus de plantas

El control de enfermedades y patógenos virales es complejo a pesar del gran esfuerzo que se realiza a nivel de sanidad vegetal. Con los virus, a diferencia de hongos y bacterias, no es posible la aplicación de tratamientos curativos. La mayoría de las medidas que se adoptan para el control son indirectas, focalizadas en disminuir la fuente de infección dentro del cultivo, reducir la dispersión de la enfermedad o limitar los efectos de la infección. Las soluciones que se obtienen no son permanentes y obligan a una revisión periódica de las actuaciones realizadas (Moreno-Pérez *et al.*, 2016).

Medidas sanitarias para la reducir cantidad de inóculo inicial

Las medidas orientadas a la reducción de la cantidad de inóculo inicial se basan en dos estrategias principales. La primera está enfocada hacia la optimización de las prácticas culturales, de manera que limiten la llegada masiva de inóculo. La rotación de cultivos, la modificación de las fechas de siembra, evitar el solapamiento de cultivos, reducir las fuentes de inóculo dentro y fuera del cultivo eliminando los reservorios tanto de virus como de vectores o la eliminación de restos de poda contaminados son algunas de las más simples y efectivas (Morrión *et al.*, 2020).

La segunda estrategia se enfoca en aspectos regulatorios que aseguren la calidad de los materiales vegetales y semillas. Estas medidas incluyen el control fronterizo de los materiales que pretenden acceder al territorio nacional, uso de certificaciones y programas para la validación de variedades y materiales libre de virus, entre otras. En la Unión Europea hay un marco coordinado de normativas que regulan la sanidad vegetal: el Reglamento (UE) 2016/2031 sobre medidas de protección contra las plagas de los vegetales y el Reglamento (UE) 2017/625 relativo a los controles y otras actividades oficiales (Página oficial Ministerio de agricultura, pesca y alimentación del gobierno de España. 2023, 3 de marzo).

Métodos que limitan dispersión viral

- a. **Métodos de manejo cultivos:** El éxito de la agricultura protegida depende en gran medida de evitar la presencia de enfermedades, ya que el 80% de los problemas que aparecen en un cultivo son causados por la aparición de patógenos. Es importante mantener un control exhaustivo de los métodos y protocolos culturales usados para

evitar la dispersión viral. Como son el adecuado manejo de semillas y plántulas, desinfección de herramientas, maquinaria y espacio de trabajo, limitación del movimiento del personal dentro de las instalaciones, uso de guantes y desinfección de manos, desinfección periódica de herramientas y ropa de trabajo, y la habilitación de las instalaciones para la desinfección de sustrato, sistemas de riego, agua de riego y suelo de forma correcta y periódica (Dara, 2019).

- b. Desinfección de suelo:** La desinfección de suelos es un proceso muy común y extendido en agricultura. El objetivo es eliminar o reducir la presencia de patógenos en el suelo de cultivo. Los hongos y bacterias son los agentes principales, pero los patógenos virales como CGMMV pueden permanecer activos durante largos periodos en restos de cosecha, raíces, etc. La desinfección se puede llevar a cabo por aplicación de químicos como el 1,3 dicloropropeno o la cloropicrina. También se puede llevar a cabo por el uso de alternativas no químicas como: solarización, biofumigación y biosolarización (García-Ralla *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2015; Kirkegaard *et al.*, 1993; Bello-Pérez *et al.*, 1997).
- c. Control del vector:** Los vectores son uno de los principales agentes que afectan a la dispersión de patógenos en los cultivos, ya que pueden transmitir virus a las plantas hospedadoras durante parte o todo su ciclo de vida. Para controlar los vectores y limitar la transmisión de enfermedades, se puede utilizar el tratamiento con plaguicidas químicos o biológicos y el control biológico mediante la liberación de enemigos naturales de los vectores. El uso y abuso de los plaguicidas y pesticidas químicos genera inevitablemente resistencias en los insectos, por lo que se requiere de forma creciente el uso de plaguicidas de origen biológico (Dara, 2019). El control biológico ha demostrado ser bastante efectivo en la reducción drástica de las poblaciones de vectores mediante liberación de enemigos naturales (Heimpel y Cock 2018).
- d. Resistencia genética al vector:** La resistencia genética al vector consiste en obtener variedades de cultivares con características físicas, morfológicas o bioquímicas que reduzcan la capacidad del vector de alimentarse, desarrollarse o reproducirse con éxito. De esta manera se consigue que, al no poder multiplicarse el patógeno con la misma eficiencia, se reduzca la tasa de dispersión y por ende el efecto nocivo de la enfermedad (Nelson *et al.*, 2018).

Métodos que limitan la infección viral de la planta

Con frecuencia, a pesar de las actuaciones dirigidas a limitar la llegada y dispersión del virus en un cultivo, se producen infecciones. Por tanto, es necesario el desarrollo de estrategias de control orientadas a limitar el daño que provoca la infección en la planta. Entre ellas:

- a. **Agentes de inmunidad vegetal:** Dentro de los métodos que limitan la infección de las plantas encontramos las sustancias llamadas agentes de inmunidad vegetal. Un nuevo concepto que surge de comprender en profundidad la regulación y acción de los sistemas de defensa vegetal. Los agentes de inmunidad vegetal son inductores químicos, de origen orgánico o no, de la respuesta inmunitaria vegetal a diferentes niveles. Algunos de estos son: Ningnanmicina, Dufulin, Vanisulfano, Metiadinil, Citosinpeptidemycina, Amino-oligosacarinas, Acibenzolar-S-methyl, Ácido Abscísico o ABA y la Vitamina C (Baebler *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2023; Kulye *et al.*, 2012; Owens *et al.*, 2012).
- b. **Protección cruzada:** La protección cruzada de cepas leves o MSCP (por sus siglas en inglés) es una estrategia prometedora para proteger los cultivos contra patógenos virales. Esta técnica implica el uso de una cepa viral leve para infectar de manera controlada el cultivo y pre inmunizarse contra cepas virales más virulentas (Ziebell y Carr, 2010). La MSCP es una estrategia de baja tecnología, sostenible y de rápida aplicación. Los mecanismos detrás de la efectividad de la protección cruzada parecen ser complejos y multifactoriales. El silenciamiento del RNA o RNA interferente (RNAi) juega un papel importante en la protección cruzada (Ziebell *et al.*, 2007). El inconveniente de esta estrategia es las posibles interacciones sinérgicas en infecciones múltiples de virus.
- c. **Resistencia genética al virus:** Una de las estrategias más importantes para luchar contra las enfermedades virales es la introducción de cultivares con resistencias genéticas. Estas resistencias confieren protección o atenúan el efecto de los virus patógenos en los cultivos. La mejora genética clásica permite obtener variedades resistentes, pero se ve limitada por el largo tiempo de desarrollo y la ausencia de resistencias naturales en muchos cultivos (Morrion *et al.*, 2020). Otro enfoque consiste en incorporar estos rasgos deseados al genoma de la planta de forma directa con la generación de organismos transgénicos o a través de edición genética, permitiendo una fuente casi inagotable de nuevas resistencias frente a enfermedades provocadas por patógenos virales. Las técnicas más usadas en la agricultura moderna son mejoras por mutación aleatoria química (ácido nitroso, gas mostaza y agentes alquilantes) o física (rayos X, gamma y luz UV), mejora genética por incorporación de transgenes mediante el uso de *Agrobacterium* o biolística y mejora genética por edición directa de genomas mediante el uso de meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc y CRISPR (Chen *et al.*, 2019; Dhaliwal *et al.*, 2015; Gelvin *et al.*, 2003; Parcher *et al.*, 2017; Ramkumar *et al.*, 2020).

En general, los mecanismos que generan cultivares resistentes permiten combatir con bastante éxito las enfermedades que asedian los cultivos. Es importante resaltar que la estricta regulación contra organismos modificados genéticamente y la creciente demanda de productos ecológicos limitan las herramientas disponibles para el control de patógenos virales.

6. Sistema de defensa vegetal frente infecciones virales

Los sistemas de defensa vegetal están basados en complejos mecanismos que las protegen de los ataques de agentes patógenos. A diferencia de los animales, las plantas no pueden desplazarse ni poseen un sistema circulatorio por donde las células de defensa se desplacen para generar una respuesta eficaz y localizada. Por tanto, los mecanismos de defensa vegetal se componen tanto de barreras físicas (películas de cera en la superficie de sus órganos, paredes celulares rígidas, etc.), así como de potentes mecanismos moleculares de resistencia local y señales sistémicas que se desplazan desde el punto de la infección al total de la planta, encontrándose paralelismos con la inmunidad innata de los animales (Zipfel, 2008; Boller y He, 2009).

El sistema inmune innato de las plantas está formado dos niveles fundamentales: el primero, PTI (del inglés: *PAMP-triggered immunity*) basado en un reconocimiento de PAMP (del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*), mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés: *pattern recognition receptors*) situados en la superficie de las células vegetales. Este primer nivel puede ser sobrepasado por efectores producidos por patógenos que bloqueen la PTI. Estos efectores son reconocidos de forma específica por NB-LRR (del inglés: *nucleotide binding leucine-rich repeat*), los cuales desencadenan cascadas de respuestas contra estos patógenos, siendo considerada como la segunda forma de actuación de la inmunidad innata en plantas y es denominada genéricamente como ETI (del inglés: *effector-triggered immunity*) (Boller y He, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Jones y Dangl, 2006).

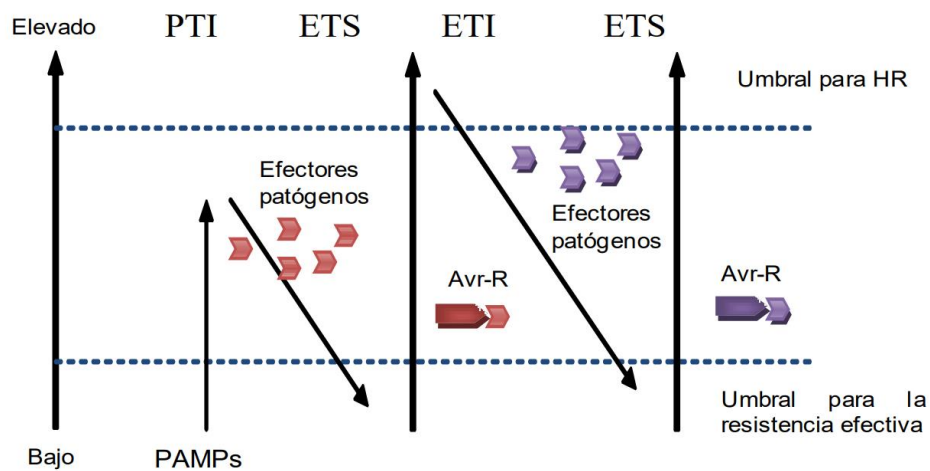


Figura 1: Modelo de zigzag que ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas (Jones y Dangl, 2006).

El modo de acción coordinado de la PTI y ETI se ha representado con un modelo de zigzag de cuatro fases (Figura 1). En la fase 1 una vez el patógeno ha penetrado la infección del tejido vegetal. Si los patógenos consiguen bloquear la PTI, liberando factores que contribuyen a la virulencia, resulta en una ETS (del inglés: *effector-triggered susceptibility*) que hace a la planta susceptible a la infección y dispersión de los patógenos. Si estos efectores son reconocidos por alguna de las proteínas NB-LRR y desencadenan la activación de la ETI entramos en la fase 3. La ETI genera una respuesta acelerada y amplificadora de PTI que conlleva resistencia a la enfermedad y usualmente activa una respuesta de hipersensibilidad dando lugar a la muerte celular en el sitio de la infección. La fase 4 es a nivel adaptativo, donde la presión selectiva actúa sobre el patógeno evitando o diversificando el efector permitiendo evadir la ETI. A su vez en las plantas la selección natural da lugar a nuevos genes o proteínas de resistencia que activan la señalización de ETI nuevamente (Jones y Dangl, 2006).

PTI (*Pattern-Triggered Immunity*)

Como se ha comentado, el primer nivel de defensa vegetal es la PTI. Cuando un patógeno penetra la planta es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos patrones pueden ser derivados de microorganismos (del inglés MAMPs; *Microbe associated molecular patterns*), de patógenos (PAMPs) o asociados a daños (del inglés DAMPs; *damage associated molecular pattern*). Los PRRs se pueden clasificar en receptores tipo quinasa (RK) localizados en la membrana plasmática con un dominio externo, un dominio transmembrana y un dominio quinasa intracelular mediante el que se transfiere la señal de reconocimiento. O bien pueden ser proteínas similares a receptores (RLP) que carecen de dominio intracelular y están relacionados con respuestas a estrés biótico (Norman *et al.*, 2019)

Cuando las PAMPs, MAMPs, DAMPs han sido reconocidos por los PRR desencadenan cascadas de respuesta que da lugar a la inmunidad de la planta. Estas respuestas pueden ser aumento de calcio citosólico, producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), activación de quinasas dependientes de calcio o por mitógeno, fosforilación de proteínas, producción de etileno, inhibición del crecimiento de la raíz de la planta y regulación de genes de defensa (Kørner *et al.*, 2013; Nielhl *et al.*, 2016; Noman *et al.*, 2011; Tena *et al.*, 2019; Yamaguchi *et al.*, 2011).

La respuesta PTI está bastante bien estudiada en el caso de los patógenos no virales. Sin embargo, en los patógenos virales el conocimiento de los mecanismos y efectores de respuesta PTI es preliminar. Entre estos, el dsRNA se considera el principal patrón molecular desencadenante de respuestas PTI, activando respuestas típicas de PTI independientemente de la secuencia. Los mecanismos activados por dsRNA o virus son similares a las activadas por patógenos microbianos.

Huang y colaboradores (2022) demostraron que la PTI inducida por dsRNA aumentaba la deposición de callosa en los plasmodesmos limitando el transporte macromolecular en la interacción célula-célula, limitando la dispersión sistémica del virus y activando la defensa antiviral. En este mecanismo intervienen los módulos quinasa de la membrana plasmática SERK1 y BIK1/PBL1, proteínas localizadas en plasmodesmos (PDL1/2/3 y CML41) y las señales de calcio. Las proteínas de movimiento virales son las encargadas de contrarrestar este mecanismo inhibiendo y favoreciendo la dispersión viral.

Samarskaya y colaboradores (2022) sugieren que la activación de la PTI por reconocimiento de dsRNA no es lo suficientemente robusta como para hacer frente a una infección viral por sí sola. También apuntan a que la activación de la PTI tenga cierto grado de competencia con la activación del RNAi ya que los dsRNA estarían secuestrados, no estando disponibles para la respuesta RNAi. La aplicación de dsRNA parece también modular el metabolismo de la poli(adenina-ribosa) una proteína implicada en la inmunidad de las plantas actuando a nivel de remodelación de la cromatina, muerte celular, desarrollo, metabolismo y respuesta a estrés biótico y abiótico.

ETI (*Effector-Triggered Immunity*)

Los efectores producidos por los patógenos inhiben la PTI y desencadenan la ETI. El reconocimiento citosólico de los efectores corresponde a un grupo de proteínas de reconocimiento llamadas NB-LRR o receptores con repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos. Estas proteínas están codificadas por los genes R, una superfamilia de genes de plantas que son en muchos casos genes de resistencia. Se encuentran como genes aislados o formando grupos. Presentan en su estructura un dominio quinasa bien definido o unido a otros dominios funcionales (Bonardi *et al.*, 2011; Ronald Shirasu, 2012; Norman *et al.*, 2019).

La ETI es una respuesta cualitativamente más robusta, rápida y efectiva que PTI (Wang *et al.*, 2013). La PTI, ETI y la respuesta basal comparten mecanismos de señalización que generan una respuesta integrada y coordinada de la planta en la defensa contra patógenos (Ashraf *et al.*, 2018). Cálculos recientes contemplan que en torno al 20% del genoma en plantas está implicado en el reconocimiento de patógenos (Ashraf *et al.*, 2018; Eulgem *et al.*, 2003). Las vías del ácido salicílico, el jasmonato y el etileno son reguladores de la expresión génica en la defensa de las plantas amplificando y coordinando la respuesta PTI (Betsuyaku *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2018).

Cuando un patógeno viral suprime la PTI por la producción de efectores, la principal vía que se activa es el RNAi o silenciamiento génico. Estos efectores, proteicos o no, son reguladores de la expresión viral que permiten la extensión de la infección y limitan las defensas vegetales. Como consecuencia de la expresión de genes virales se producen RNA pequeños derivados de la acción de RNAi que juegan un papel fundamental en la reprogramación de la expresión de genes en PTI y ETI durante la

interacción planta-patógeno activando rutas de defensa y reprimiendo la expresión de genes virales (Billir *et al.*, 2022).

7. RNAi principal defensa antiviral

El RNAi fue observado por primera vez en 1990 en plantas (Napoli *et al.*, 1990), no fue hasta 1998 cuando Andrew Fire y Craig Melo descubrieron que el dsRNA causaba un fuerte silenciamiento en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). El RNAi es un proceso evolutivo conservado en la mayoría de los eucariotas y que interfiere en la regulación de todos los procesos biológicos. Está basado en el reconocimiento y procesamiento de dsRNA en RNA pequeños no codificantes que dirigen el silenciamiento a través de la especificidad de secuencia. En plantas, el procesamiento de RNA en horquilla o dsRNA produce RNA pequeños primarios denominados microRNA o siRNA por la acción de enzimas DICER (DCL) (Meister *et al.*, 2004). Las proteínas Argonautas o AGO se unen a siRNA o miRNA y degradan la cadena pasajera, mientras que la hebra guía permanece para formar un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). RISC mediante apareamiento de bases se une a RNA complementarios para mediar la degradación o la inhibición de la traducción en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) o inducir el silenciamiento génico transcripcional (TGS) (Jin *et al.*, 2022). Para alcanzar un silenciamiento efectivo es necesaria la amplificación de los microRNA o siRNA primarios por la acción de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) y su posterior difusión por la planta.

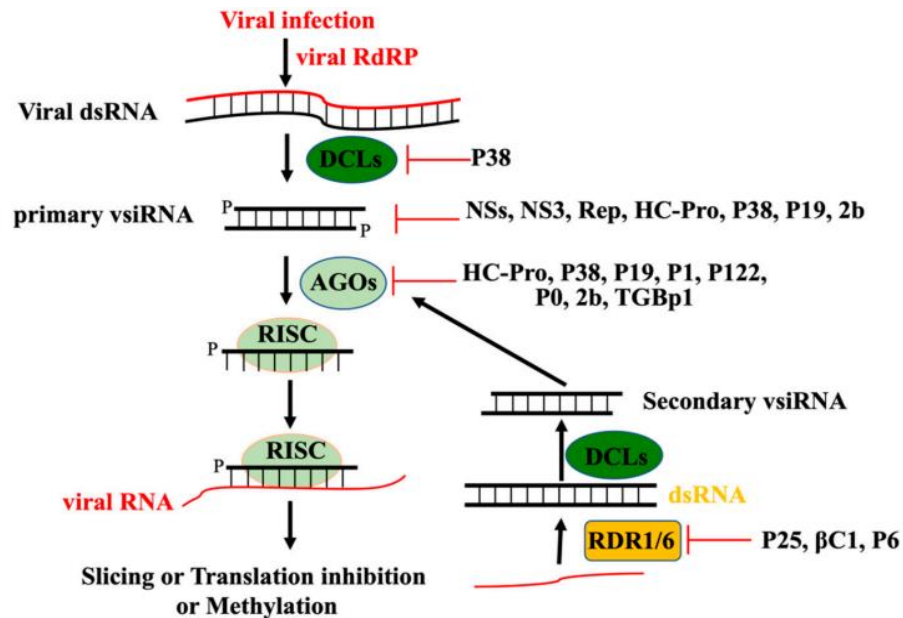


Figura 2: Mecanismo de resistencia antiviral en *Arabidopsis*. El RNA viral de doble cadena (dsRNA) es recibido y procesado en vsiRNA primarios de 21, 22 o 24 nt, respectivamente, por DCL4, DCL2 o DCL3. Estos vsiRNA de 21 y 22 nt serán cargados en AGO1 y AGO2 formando el complejo RISC que degrada o inhibe la traducción del RNA viral mediante PTGS (*post-transcriptional gene silencing*). Los vsiRNA de 24 nt se cargarán en AGO4, AGO6 o AGO9 para formar RISC induciendo la metilación de los DNA o modificación de las histonas para silenciar virus DNA a través de TGS. La amplificación de la señal a través de producción de vsiRNA secundarios se lleva a cabo por RDR1/RDR6 o RDR2, necesarios para reforzar la defensa antiviral y obtener una respuesta sistémica. Las dianas de los supresores de silenciamiento antiviral producidos por virus se dirigen a los diferentes componentes de la cadena (Jin *et al.*, 2022).

Existen dos clases principales de RNA pequeños endógenos en las plantas: los microRNA (miRNA) y los siRNA. En *Arabidopsis*, los miRNA tienen una longitud de 21 nucleótidos, derivan de los genes MIR y son producidos por Dicer-like 1 (DCL1). Los miRNA endógenos generalmente median el PTGS y desempeñan un papel esencial en todos los procesos de desarrollo de las plantas. Por otro lado, los siRNA de 21, 22 y 24 nucleótidos son producidos, respectivamente, por DCL4, DCL2 o DCL3 y regulan diversos procesos biológicos del desarrollo de *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2022).

Cuando el virus infecta las células vegetales es reconocido y procesado por el RNAi en vsiRNA (siRNA derivados de virus) que inducen la inmunidad antiviral basada en RNAi, confiriendo resistencia a la planta hospedadora (Niu *et al.*, 2021). La defensa antiviral basada en RNAi fue descubierta por primera vez en plantas y, posteriormente, se descubrió que desempeña un papel vital en la inmunidad antiviral en invertebrados y mamíferos (Nayak *et al.*, 2013). La inmunidad innata antiviral basada en RNAi es inducida en infecciones de virus de RNA o DNA en casi todos los eucariotas siguiendo el esquema de la figura 2.

Recepción del RNA viral e inicio de la defensa basada en RNAi

Cuando un virus infecta una célula, durante su replicación pasa por una fase de dsRNA que, a su vez, es reconocido por las proteínas Dicer y lo cortan en vsiRNA de 21-24 nt de longitud. Las proteínas Dicer pertenecen a la familia de enzimas tipo RNasa III (Cenik *et al.*, 2011). Hay 4 DCL descritas en *Arabidopsis*: DCL1, DCL2, DCL3, y DCL4. Estas enzimas cuentan con varios dominios estructurales básicos, la DExD-helicasa, la helicasa-C, el dominio de función desconocida 283 (DUF283), el dominio Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), dos dominios (PAZ), dos dominios RNasa III en tándem, y uno o dos dominios de unión a dsRNA (dsRBDs) desde el N terminal hasta el C-terminal (Margis *et al.*, 2006). En general, el dominio helicasa utiliza la hidrólisis de ATP para facilitar el desenrollamiento del dsRNA. El dominio DUF283 facilita el emparejamiento de bases RNA-RNA y la unión a RNA. Los dominios PAZ y RNasa III son vitales para la escisión del dsRNA. El dominio PAZ reconoce la terminación del dsRNA y los dominios RNasa III y corta una de las hebras del dsRNA. La distancia entre el dominio PAZ y los dominios RNasa III viene determinada por la longitud de los productos. El dominio dsRBD

facilita la unión del dsRNA y también sirve como señal de localización nuclear (Jin *et al.*, 2022; Qim *et al.*, 2010). DCL1 actúa en la vía de biogénesis de microRNA de 21 nt (miRNA) con funciones esenciales en el desarrollo de la planta y en la respuesta a estímulos ambientales. DCL1 puede funcionar indirectamente en la inmunidad innata antiviral basada en RNAi (Xie *et al.*, 2015). DCL2 actúa procesando moléculas exógenas dsRNA o de siRNA antisentido natural en siRNA de 22 nt (Xie *et al.*, 2004). DCL3 genera siRNAs de 24 nt que regulan la metilación del DNA dependiente de RNA (RdDM) en el silenciamiento génico transcripcional (TGS) durante infecciones provocadas por virus DNA (Matzke *et al.*, 2014). En la inmunidad innata antiviral basada en RNAi, DCL4 recibe y procesa dsRNAs virales para producir vsiRNA de 21 nt para prevenir la infección viral, especialmente tras la infección de virus RNA (Kakiyawa *et al.*, 2019). Las DCL actúan de forma redundante o jerárquica en la inmunidad innata antiviral basada en RNAi. El genoma de *Arabidopsis* codifica cinco proteínas de unión a dsRNA (DRB): DRB1/HYL1, DRB2, DRB3, DRB4 y DRB5. Las DRB son necesarias para la correcta recepción y procesamiento de los RNAs virales por parte de las DCLs actuando en la biogénesis de siRNA (Nakazawa *et al.*, 2007).

Producción y amplificación de vsiRNA

Tras la activación del RNAi es necesario amplificar la señal para que la respuesta antiviral sea eficaz. Las proteínas RNA polimerasa dependientes del RNA del huésped (RdRP) son las encargadas de amplificar los vsiRNA en plantas y en *C. elegans* (Jin *et al.*, 2022). Multiplican exponencialmente el dsRNA viral, que sirve como sustrato a las DCL para la biogénesis de vsiRNA secundarios, probablemente utilizando RNAs virales como plantillas o moldes (Guo *et al.*, 2018). Existen seis proteínas RdRP en *Arabidopsis* (RDR1 a RDR6). RDR1, RDR2 y RDR6 comparten el motivo catalítico canónico C-terminal DLDGD de las RDRs eucariotas y poseen ortólogos en muchas especies de plantas, mientras que RDR3, RDR4 y RDR5 comparten un motivo atípico de aminoácidos DFDGD en el dominio catalítico. RDR1, RDR2, y RDR6 están implicadas en el control de la inmunidad innata antiviral basada en RNAi en *Arabidopsis*.

En *Arabidopsis*, RDR1 es inducida por la infección del virus amplificando vsiRNAs de 21 nt o 22 nt en la inmunidad innata antiviral basada en RNAi, especialmente tras la infección de virus RNA (Li *et al.*, 2021). RDR6 se expresa constitutivamente en varios tejidos de *Arabidopsis* y promueve tanto la inmunidad innata antiviral basada en RNAi como el desarrollo de la planta. Curiosamente, RDR6 actúa regulando negativamente la inmunidad desencadenada por PAMP (PTI) y la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) a través del control post-transcripcional de genes de resistencia a enfermedades (Boccaro *et al.*, 2014). RDR2 amplifica dsRNA cortos usados por DCL3 como sustrato para producir siRNAs de 24 nt para dirigir la metilación del DNA. También es capaz de amplificar pequeños RNAs de 23 a 27 nt a partir de genes MIR para mediar en la metilación del DNA (Chellappan *et al.*, 2010). RDR2 y DCL3, elementos centrales en la vía RdDM, mediando la producción de vsiRNA de 24 nt en infecciones de

virus de DNA, como es el caso de los geminivirus. Los vsiRNA de 21 nt amplificados a través de RDR1 y RDR6 actúan facilitando esta vía (Stroud *et al.*, 2013). Recientemente se han descubierto varios factores implicados en la amplificación de vsiRNA secundarios. Estos son el *Antiviral RNAi-defective* (AVA1), el transportador de amino fosfolípidos, la ATPasa 2 (ALA2), ALA1 y AVI2. Las RDRs y nuevos factores como ALA1/2 y AVI2 están ampliamente conservados en plantas para asegurar una amplificación suficiente de vsiRNAs para una inmunidad innata antiviral eficiente basada en RNAi (Jin *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2017).

Función antiviral de las proteínas argonautas efectores de RNAi

Una vez que el vsiRNA está cargado en los efectores AGO y forma RISC, se dirige a los genomas virales para efectuar PTGS o TGS en la inmunidad innata antiviral. Las proteínas AGO, que están altamente conservadas en los eucariotas, y no encontrándose en procariontes (Fang y Qi, 2016), intervienen en numerosos procesos del desarrollo biológico de las plantas y de respuesta a estímulos ambientales, además de en la defensa antiviral (Ramesh *et al.*, 2021). Las proteínas AGOs contienen cinco dominios, entre ellos el dominio N-terminal (N), el dominio PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE (PAZ), el dominio medio (MID), un dominio PIWI y un dominio de función desconocida 1785 (DUF1785) (Carbonell, 2017; Silvia-Martins *et al.*, 2020). La función última de estos dominios es facilitar la interacción y unión correcta entre RNAs y RNA diana para obtener un silenciamiento adecuado.

En *Arabidopsis* se han descrito diez AGOs. AGO1 y AGO2 son los principales componentes de la inmunidad antiviral mediada por RNAi contra virus RNA (Carbonell y Carrington, 2015). AGO1 también actúa como efector de miRNA donde regula todos los aspectos del desarrollo de la planta regulando la expresión de genes endógenos (Bologna *et al.*, 2018). AGO 2 tiende a unirse con mayor preferencia con vsiRNA con 5' terminal A y AGO1 prefiere U. AGO2 ha demostrado ser necesario para la resistencia a un amplio espectro de virus de plantas participando en la respuesta local y sistémica (García-Ruiz *et al.*, 2015). En *Arabidopsis*, AGO4, AGO6, y AGO9 son los encargados de actuar en la vía RdDM uniéndose a pequeños siRNA heterocromáticos de 24 nt. AGO 4, a través de RdDM, es el principal componente en la defensa antiviral frente a virus DNA (Duan *et al.*, 2014; Raja *et al.*, 2014). Han sido descritos numerosos AGO en otros organismos. Por ejemplo, se han encontrado 19 ortólogos en arroz y 15 en tomate. Los AGO pueden evolucionar para tener funciones clave en la defensa antiviral y el desarrollo vegetal (Jin *et al.*, 2022).

Supresores virales del RNAi

Los virus han evolucionado para responder, contrarrestar y suprimir las defensas de la planta. Los supresores virales del silenciamiento o VSR son producidas para inhibir la inmunidad innata antiviral basada en el RNAi. Estas VSR actúan en todos los niveles de la

ruta conservada del RNAi: impidiendo la amplificación de vsRNA secundarios (Zhang *et al.*, 2020), impidiendo el corte de dsRNA viral (Deleris *et al.*, 2006), alterando la función antiviral de los AGO, impidiendo la movilidad de la señal de RNAi célula-célula o inhibiendo la PTGS y TGS mediante metilación inversa (Li *et al.*, 2020). Todos los virus, especialmente los patógenos, poseen VSR que contribuyen al éxito de la infección y por tanto de las epidemias virales (Jin *et al.*, 2022; Pumplin *et al.*, 2013).

8. Diferentes formas de inducir el RNAi: VIGS, HIGS y SIGS

La activación artificial del RNAi se puede realizar mediante la expresión endógena o aplicación exógena de dsRNA en la planta con el fin de modular el desarrollo de la planta o para el control de patógenos.

Los primeros intentos de utilizar esta vía artificial se llevaron a cabo mediante el uso de silenciamiento génico inducido por virus (*vector-induced gene silencing*: VIGS). En este proceso se manipula el genoma de un virus que se utiliza como vector eliminando los genes causantes de enfermedad y se añaden regiones con repeticiones invertidas para la formación de hairpin dsRNA (hpRNA) frente a un gen diana (transgén) del patógeno que se desea controlar, distinto del vector. Posteriormente el virus vector modificado es inoculado mediante *Agrobacterium* en las plantas huésped. El virus recombinante entra en las células vegetales del huésped y la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) transcribe el RNA viral, incluido el transgén, generando un dsRNA que es procesado y cargado en el sistema DICER-RISC para dirigirse al RNA complementario y efectuar el silenciamiento en el gen diana del patógeno (Dalmay *et al.*, 2000; Meister *et al.*, 2004).

Posteriormente, se dio un paso más, con el silenciamiento génico inducido por el huésped (HIGS). Donde se silencian genes de patógenos o de la planta mediante la expresión transgénica de secuencias activadoras del RNAi (Harvey *et al.*, 2011). En HIGS, las plantas transgénicas se generan introduciendo una secuencia homóloga al gen diana con repeticiones invertidas que genera un dsRNA o hpRNA. Los dsRNA o hpRNA son procesados en siRNA capaces de llevar a cabo el silenciamiento génico limitando la infección de patógenos o regulando a la baja la expresión de genes endógenos (Akbar *et al.*, 2022).

HIGS o VIGS proporcionan silenciamiento efectivo, pero el uso de transgenes y organismos modificados genéticamente puede suscitar preocupación entre los consumidores y responsables políticos. En la actualidad las grandes limitaciones legislativas reducen el uso de estas tecnologías prácticamente a la investigación académica. De esta necesidad surge SIGS o silenciamiento génico inducido por pulverización.

Spray induced gene silencing (SIGS)

El silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS) es una estrategia avanzada que elimina los problemas con el uso de transgénicos y favorece un desarrollo rápido para el control de patógenos. Consiste en aplicar dsRNA, hpRNA o siRNA homólogos a genes diana del patógeno para pre-inmunizar a la planta huésped. Activando el RNAi, previa a la infección, generando una respuesta más rápida y eficaz contra infecciones virales futuras. Se ha usado eficazmente contra infecciones de patógenos de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Qi *et al.*, 2019). La aplicación exógena del dsRNA se puede realizar por infiltración con jeringa en las hojas y tronco, mediante riego, inmersión total de la planta o por pulverización foliar usando o no adyuvantes en las formulaciones (Figura 3) (Akbar *et al.*, 2022; Das y Sherif, 2020).

Actualmente, SIGS está siendo investigado como un método alternativo para el control de patógenos (virus y hongos) y plagas de plantas de diversa naturaleza, entre las que se encuentran los insectos, incluidos dípteros, coleópteros, hemípteros, lepidópteros, himenópteros e isópteros (Aronstein *et al.*, 2006; Cappelle *et al.*, 2016; Nitnavare *et al.*, 202; Wang *et al.*, 2014; Wynant *et al.*, 2014), hongos (Killiny *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016; Wytinck *et al.*, 2020), nematodos (Fanelli *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2022) y virus (Dalakouras *et al.*, 2020; Das y Sherif, 2020; Mitter *et al.*, 2017; Tenllado *et al.*, 2001). Quizás el mayor reto recaiga sobre la generación de una protección sólida y duradera frente a patógenos virales o fúngicos ya que cuentan con numerosas medidas de contradefensa capaces de inhibir o evadir los sistemas de defensa innata del huésped.

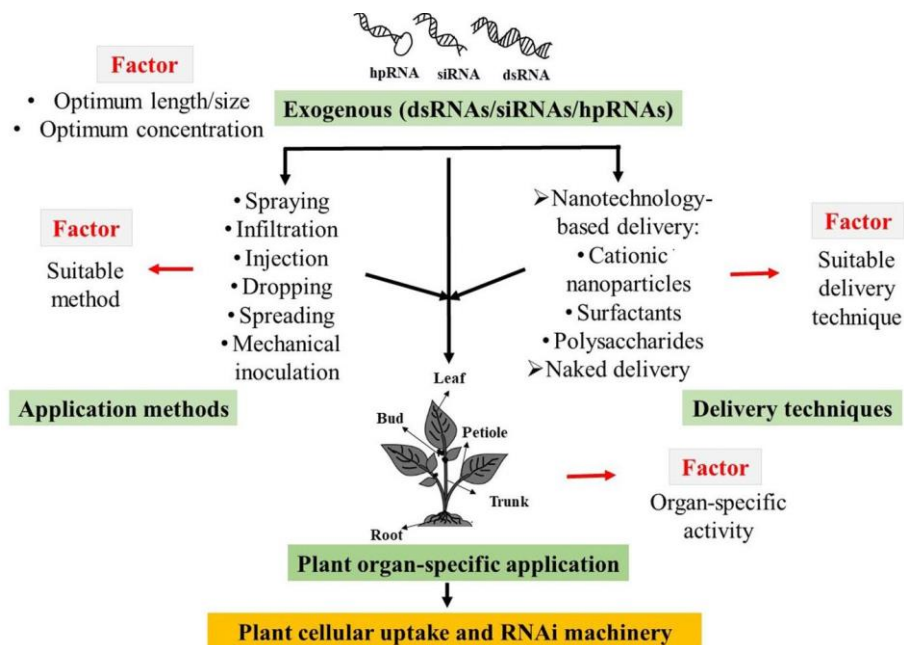


Figura 3: Diagrama esquemático de los factores que influyen en la penetración y activación efectiva de RNAi por parte de dsRNA, siRNA y hpRNA en plantas (Das y Sherif, 2020).

El empleo de SIGS frente patógenos virales se ha descrito mediante la aplicación tanto de siRNA como dsRNA largos homólogos a los genes virales. La aplicación más común es por aplicación mecánica o por pulverización foliar. La forma más sencilla en campo es por pulverización, resultando más efectiva a presiones medias y altas que a bajas presiones tanto para siRNA como para dsRNA largos (Dalakouras *et al.*, 2020).

F. Tenllado y colaboradores (2001) fueron los primeros en demostrar que la aplicación foliar de dsRNA en plantas confería resistencia a enfermedades víricas. Estos investigadores trataron plantas de *N. benthamiana* simultáneamente con dsRNA largo producido *in vitro* del virus moteado del pimiento (PMMoV), virus del grabado del tabaco (TMV) y virus del mosaico de la alfalfa (AMV) atenuando las infecciones víricas (Tenllado y Díaz-Ruíz, 2001). Desde 2001 se ha logrado resistencia viral en maíz pulverizando extracto crudo de dsRNA frente a CP de virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV) (Gan *et al.*, 2010). En papaya mediante aplicación mecánica de extracto crudo dsRNA dirigido a CP del virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV) (Shen *et al.*, 2014). En guisante mediante biolística de dsRNA producido *in vitro* de CP frente al virus del mosaico transmitido por semillas del guisante (PSbMV) (Safarova *et al.*, 2014). En orquídeas, mediante inoculación mecánica de extracto crudo de dsRNA frente CP del virus del mosaico del *cymbidium* (CymMV) (Lau *et al.*, 2014). En tabaco, mediante inoculación mecánica de dsRNA frente p126 producido *in vitro* dirigido al TMV (Konakalla *et al.*, 2016). En cucurbitáceas mediante inoculación mecánica de dsRNA producido *in vitro* dirigido a la proteinasa del virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) (Kaldis *et al.*, 2018) y dsRNA frente CP de virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV) (Delgado-Martín *et al.*, 2022). En *N. benthamiana* mediante pulverización de extractos crudos de dsRNA frente MP de TMV (Niehl *et al.*, 2018), dsRNA frente replicasa de virus del moteado leve del pimiento (PMMoV) y dsRNA frente supresor 2b del virus del mosaico del pepino (CMV) (Mitter *et al.*, 2017).

La aplicación foliar mediante pulverización de dsRNA presenta ciertas limitaciones. Como la estabilidad del dsRNA en la superficie foliar, baja penetración celular y activación insuficiente del RNAi. Para salvar estas desventajas se ha propuesto el uso de nanopartículas, capaces de formas nanocompuestos estables con el dsRNA que mejoren la eficiencia de penetración, estabilidad y activación del RNAi (Mitter *et al.*, 2017; Dalakouras *et al.*, 2020; Das y Sherif, 2020).

9. Barreras y limitaciones de SIGS

El éxito en la aplicación foliar de dsRNA en SIGS se ve limitado por una serie de barreras y factores. Debido a la degradación y baja penetración del dsRNA, la ventana de protección, frente a patógenos virales, es de 5-7 días aplicando dsRNA libre (Mitter *et al.*, 2017). Los dsRNA son vulnerables a la degradación por agentes ambientales y la degradación por RNasas de microorganismos. Esta degradación contribuye a una menor disponibilidad del dsRNA provocando esta baja ventana de protección. Los principales factores ambientales que afectan al dsRNA son la luz, CO₂ ambiental, radiación solar, humedad y calor (Wytinck *et al.*, 2020). La eficacia de SIGS puede verse limitada por barreras propias de las plantas, como la cutícula (Figura 4). La cutícula es una capa resistente al agua que envuelve toda la planta. Las estomas pueden ser un punto de entrada del dsRNA ya que son poros en la cutícula que permiten el intercambio activo gaseoso (Schönherr y Bukovac, 1972). La pared celular es la principal barrera en el transporte de dsRNA. La capacidad del dsRNA de atravesar la pared celular determina en gran medida la eficacia en la activación del RNAi frente a virus. Está constituida por una matriz muy densa de polisacáridos con un límite de exclusión celular de entre 3 y 20 nm que limita el libre paso de las moléculas (Schwartz *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Para salvar esta serie de limitaciones se propone el uso de nanopartículas capaces de unir dsRNA y siRNA (Mitter *et al.*, 2017). La mayoría de estos nanotransportadores (*nanocarriers*) tienen como objetivo principal aumentar la estabilidad y la persistencia del dsRNA y siRNA en la superficie foliar, así como favorecer la penetración en la célula que derive en la activación sostenida del RNAi, generando una resistencia eficaz contra patógenos virales de cultivos de plantas (Wytinck *et al.*, 2020).

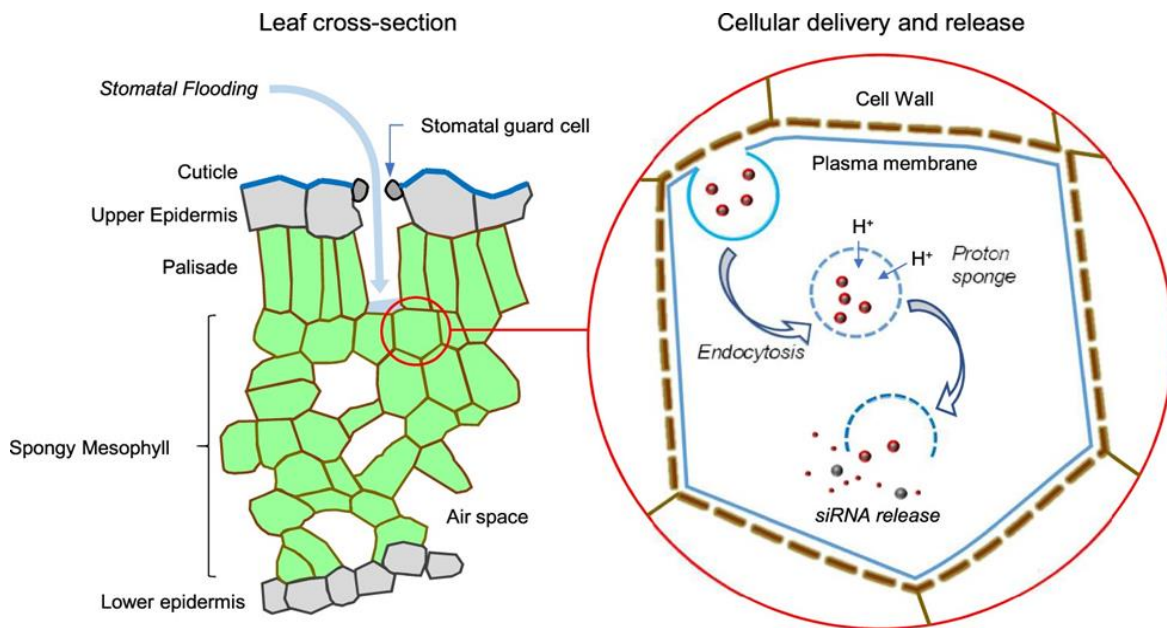


Figura 4: Estrategia de administración de siRNA a las plantas. Se muestra la cutícula y la capacidad de penetración del siRNA y dsRNA por los estomas. Una vez que están en el apoplasto de la hoja deben atravesar la pared celular. Los nanotransportadores de entre 3 y 20 nm podrán pasar por difusión, donde por endocitosis son captados por la célula. La liberación del dsRNA o siRNA de las vesículas de endocitosis ocurre por un proceso de hinchazón osmótica que lisa las vesículas denominado "protón-esponja" (Behr, 1997). Una parte de la liberación del dsRNA o siRNA por parte de la nanopartícula puede darse por cambios de pH o por competencia entre otras biomoléculas de la célula.

10. Retos para el diseño de nanoformulaciones de dsRNA-NPs en SIGS

Como hemos comentado anteriormente, la aplicación foliar de dsRNA presenta algunas limitaciones como son la degradación, eficiencia en la penetración celular y de inducción del RNAi, así como de selección de genes diana que eviten efectos no deseados en organismos no objetivo (Whitfield *et al.*, 2018; Pugsley *et al.*, 2021). Es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones a la hora de diseñar métodos de aplicación foliar de dsRNA.

- a) La selección adecuada de los genes diana es crucial para ejercer un control efectivo en los patógenos virales, pero también es clave seleccionar secuencias de dsRNA que eviten interferir en los procesos de la propia planta y en otros organismos no objetivos. El uso de herramientas bioinformáticas como dsCheck (<http://dscheck.rnai.jp>), OfftargetFinder (<https://www.specifly.org>), siRNA-Finder (<https://github.com/snowformatics/siFi21>), pssRNAit SVM (<https://www.zhaolab.org/pssRNAit>) y PFRED (<https://github.com/pfred>) ayudan a la selección correcta de secuencias diana. Estas herramientas generan secuencias de muy alta calidad pero deben ser comprobadas experimentalmente con el fin de verificar los efectos fuera de la diana (*off-target*) y dar solidez frente a evaluaciones de riesgos por las agencias evaluadoras (Mat Jalaluddin *et al.*, 2023).
- b) Antes de la aplicación, las vacunas frente a patógenos virales deben diseñarse como una dispersión homogénea de nanotransportador y dsRNA. Las formulaciones deben conservar su estabilidad coloidal, desde su fabricación y almacenamiento hasta su forma de dilución y aplicación en campo. Se deben diseñar también contemplando una baja toxicidad, fácil preparación y bajos costes de producción para hacerlas accesibles y seguras en aplicaciones masivas.
- c) El método de aplicación foliar debe ser el adecuado para provocar la entrada del dsRNA sin provocar daños. Además, debe mantener una distribución homogénea y limitar las pérdidas de la formulación fuera del cultivo. Esta distribución favorecerá la captación por parte de las plantas del dsRNA generando una respuesta mas efectiva.

- d) Una vez aplicada la formulación, el nanotransportador debe mantener la integridad del dsRNA frente a los agentes bióticos y abióticos y generar una liberación estable en el tiempo que permita una activación sostenida del RNAi.
- e) Una vez captado el dsRNA debe alcanzar el citoplasma celular y estar disponible a la maquinaria del RNAi, por lo que debe resistir el ataque de nucleasas que lo degraden antes de completar su función. Para ello las formulaciones deben favorecer el paso a través de la pared celular y favorecer el movimiento sistémico del dsRNA.

11. Producción de dsRNA

Existen dos formas generales de producir dsRNA con aplicaciones en RNAi: métodos *in vitro* e *in vivo*. En la mayor parte de los casos, se utiliza la RNA polimerasa del bacteriófago T7 para la transcripción de secuencias específicas (Voloudakis *et al.*, 2015). La síntesis *in vitro* de dsRNA requiere de kits comerciales capaces de transcribir y amplificar dsRNA de suficiente calidad y cantidad. Estos kits suelen ser caros, limitados a una escala de producción pequeña y propensos a cometer errores que deriven en mala calidad de los productos de dsRNA (Das y Sherif, 2020). La síntesis de dsRNAs por métodos *in vivo* implica el uso de bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli* y *Pseudomonas syringae*), levaduras (*Yarrowia lipolytica*) y microalgas (*Chlorella vulgaris*) (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017; Fei *et al.*, 2021; Voloudakis *et al.*, 2015).

E. coli HT115 (DE3) es uno de los organismos modelo más usado para la producción de dsRNA. Esta cepa, es deficiente en RNasa III, porta en su genoma el gen codificante de la T7 RNA polimerasa bajo el promotor *lac*, siendo capaz de producir y almacenar dsRNA. Este sistema de expresión bacteriana alcanza rendimientos medios de 4 µg/mL de cultivo bacteriano que sumado al uso de fermentadores industriales se podría satisfacer la demanda de la industria agrícola (Dalakouras *et al.*, 2020; Tenllado *et al.*, 2004). Otro sistema bastante prometedor es *Pseudomonas syringae*, una bacteria que alberga los componentes del bacteriófago phi 6, amplificando dsRNA mediante transcripción de RNA por una RNA polimerasa dependiente de RNA. Este sistema parece ser más eficiente en producción neta comparado con *E. coli* HT115 (DE3) (Niehl *et al.*, 2018).

Para que el control de plagas y patógenos sea una realidad se necesita una producción de dsRNA en toneladas métricas. Se calcula que por hectárea de cultivo se requiere de la aplicación de 2 a 10 gramos de dsRNA. Estos valores pueden variar en función de la sensibilidad de la especie diana al RNAi, la capacidad de silenciamiento sistémico y los métodos de aplicación y entrega del dsRNA (Das y Sherif, 2020; Voloudakis *et al.*, 2015). Debido a los costes de producción *in vitro* (+100USD por gramo) no se puede hacer frente a esta demanda (Zotti *et al.*, 2018). Con este fin la

empresa "RNAgri" utiliza bacterias y levaduras que simultáneamente producen dsRNA y una proteína de la cápside que le confiere protección contra nucleasas. El complejo dsRNA-proteína se autoensambla y acumula en enormes cantidades, en el interior celular, que pueden aislarse con métodos convencionales a bajo coste. Resultando en producto acabado, estable frente a la degradación y con costes de producción cercanos a 2 USD por 1 g de dsRNA (<http://www.rnagri.com/>) (Dalakouras *et al.*, 2020).

12. Tipos de nanotransportadores usados en SIGS

Con el fin de mejorar las estrategias SIGS se ha propuesto el uso de nanotransportadores. Las nanopartículas debido a su pequeño tamaño y facilidad de funcionalización superficial se convierten en el aliado perfecto para incrementar la penetración y captación del dsRNA por parte de la célula. Estas pueden ser sintetizadas principalmente por coprecipitación, síntesis solvotermal o hidrotérmal y por síntesis química. Son aplicados por pulverización, inmersión o infiltración tanto de las hojas, tallos y raíces. Se han usado para generar uniones estables con siRNA y dsRNA para el silenciamiento de genes endógenos y transgénicos en plantas, hongos, insectos y virus (Mat Jalaluddin *et al.*, 2023). Algunos de los más usados como nanotransportadores en SIGS son los siguientes:

- a. **Hidróxido doble capa o LDH:** Son nanopartículas de tipo laminar cargadas positivamente similares a hidrotalcita. La fórmula general de una LDH es $[M_2+1-xM_3+ x(OH)_2][An-]_x/n-zH_2O$, donde M_2+ y M_3+ son iones metálicos divalentes y trivalentes, y $An-$ es el anión que equilibra la carga entre las capas. La captación de LDH por las células vegetales se ha descrito por entrada libre o por endocitosis mediada por Clatrin. Diversos estudios confirman la mayor eficiencia de penetración y activación del RNAi del dsRNA encapsulado en LDH que libre (Mosa *et al.*, 2021; Yong *et al.*, 2021). Mitter y colaboradores (2017) fueron los primeros en usar LDH frente a infecciones virales. Aplicaron los LDH con altas presiones para favorecer la llegada al interior celular. Demostraron que nanopartículas de 80-100 nm eran capaces de proteger frente a la degradación de RNasa y factores ambientales a los dsRNA. Facilitando la penetración celular y activación de RNAi, ampliando la ventana de protección de 5-7 días hasta 20 con una sola dosis.
- b. **Nanotubos de carbono:** son estructuras de carbono cilíndricas, huecas e hidrofóbicas y poco biocompatibles. Para reducir su hidrofobicidad y aumentar su biocompatibilidad deben sufrir modificaciones de su superficie (Edwards *et al.*, 2020). Se usaron por primera vez para transformación de células de *N. tabacum* usando nanotubos de carbono de pared simple oxidados (SWNT) (Liu *et al.*, 2009). Posteriormente se han usado para introducir biomoléculas en células vegetales intactas, por ejemplo, celulosa (Serag *et al.*, 2011), DNA plasmídico

(Golestanipour *et al.*, 2018) y siRNA (Demier *et al.*, 2020). El conjugado se formó por uniones electrostáticas permitiendo una internalización eficiente, retrasando la degradación por acción de nucleasas intracelulares y prolongó sus efectos silenciadores en plantas de *N. benthamiana* (Demier *et al.*, 2020).

- c. Quitosano:** El quitosano es un biopolímero desacetilado derivado de la quitina, está compuesto de copolímeros aleatorios con unidades repetitivas de ($\beta 1 \rightarrow 4$) 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranososa (GlcN) y ($\beta 1 \rightarrow 4$)-2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranososa (GlcNAc) unidades repetitivas (Petrônio *et al.*, 2022). La facilidad de modificación de su estructura química lo hacen muy versátil. Por ejemplo, la adición de una solución ligeramente ácida provoca la protonación de los grupos -NH² en -NH³. Estas cargas positivas pueden formar interacciones electrostáticas con los ácidos nucleicos generando que se encapsulen en nanoestructuras estables protegiéndolos frente la acción de nucleasas (Grusamy *et al.*, 2020; Kashyap *et al.*, 2015). El nanocompuesto formado por quitosano-dsRNA genera poca toxicidad y buena activación de los mecanismos de RNAi generando un buen candidato para estrategias SIGS en cultivos (Petrônio *et al.*, 2022).
- d. Péptidos de penetración celular:** Los péptidos de penetración celular son cadenas cortas de aminoácidos cargados positivamente. Estas cargas positivas permiten la unión electrostática de los ácidos nucleicos cargados negativamente, generando un transporte eficaz, ya que permite la translocación a través de las paredes celulares de las plantas (Lakshmanan *et al.*, 2015; Thagun *et al.*, 2019). El uso de Bp100 (con una secuencia de aminoácidos: KKLFFKKILKYL) ayudó a condensar y trasladar dsRNA a través de las paredes celulares y membrana plasmática en *Arabidopsis* (Numata *et al.*, 2014).
- e. Nanopartículas de oro:** La síntesis sencilla de nanopartículas con diferentes tamaños, la facilidad de funcionalización y la biocompatibilidad hacen a las nanopartículas de oro muy interesantes en aplicaciones de RNAi (Kozielski *et al.*, 2013). Por ejemplo, la presencia de radicales COOH, S y NHS permiten la modificación de la superficie de las partículas y por tanto la formación de complejos con ácidos nucleicos como el siRNA (Kim *et al.*, 2014; Laisney *et al.*, 2020). Zhang y colaboradores (2021) funcionalizaron oro con polietilenimina para producir nanopartículas Au-PEI de 6 a 27 nm, demostrando que podían liberar siRNA de 21 pb y silenciar mGFP5 en *N. benthamiana* con una alta biocompatibilidad.
- f. Nanopartículas de silicio:** La estabilidad fisicoquímica y térmica y su alta capacidad de carga, debido a su porosidad, hacen a las nanopartículas de silicio una opción prometedora en estrategias de RNAi (Buchman *et al.*, 2019). La buena capacidad de penetración en la célula está relacionada con la carga superficial y tamaño (Lu *et al.*, 2014). Xu y colaboradores (2023) usaron nanopartículas de sílice

mesoporoso y dsRNA para el control efectivo del virus de la patata Y, alcanzando silenciamiento efectivo durante al menos 14 días.

- g. Carbon dots (o carbon quantum dots):** Son nanopartículas de carbono con un tamaño comprendido entre los 2 y 10 nm con unas propiedades superficiales y ópticas que los hacen muy interesantes para aplicaciones en transporte de ácidos nucleicos en biotecnología vegetal. Será explicado con mayor profundidad en los siguientes apartados.

13. Carbon Dots

Los Carbon Dots (CDs ó CQDs) fueron descubiertos en 2004 de forma accidental mientras se preparaban nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) (Xu *et al.*, 2004). En 2006, Sun y colaboradores sintetizaron por primera vez CDs de carbono fluorescentes de ~5 nm de diámetro mediante ablación láser de un blanco de carbono. Fue en 2013 cuando se sintetizaron CDs de forma estable y con un rendimiento cuántico superior al 80% por síntesis hidrotérmica basados en ácido cítrico y etilendiamina (Zhu *et al.*, 2013).

Los CDs están recibiendo mucha atención dentro de los nanomateriales de carbono. Son nanopartículas de carbono casi esféricas con un diámetro inferior a 10 nm. Una de las principales características con respecto a los Quantum Dots (QDs) metálicos es la baja toxicidad y facilidad de preparación (Geys *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017). Los CDs presentan unas propiedades que los hacen muy versátiles. Las más representativas son: una fuerte emisión de fluorescencia sin parpadeo (Li *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2014), bajo coste, métodos de síntesis sencillos, alta conductividad, buenas propiedades fisicoquímicas, alto rendimiento cuántico (*quantum yield*, QY), bajo fotoblanqueo, fotoluminiscencia (PL) sintonizable, alta absorptividad óptica, excelente biocompatibilidad, buena solubilidad en agua, baja toxicidad, alta estabilidad química y son poco contaminantes (Cao *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014). Por todo esto se plantean como alternativa a la proteína verde fluorescente, a los QDs metálicos y los QDs semiconductores en aplicaciones biotecnológicas.

Las propiedades foto-físicas y químicas de los CDs dependen en gran medida de su tamaño, composición química y forma. Por lo que pueden ser modificados variando el método y precursores usados durante la síntesis. Por ejemplo, usando diferentes dopajes como oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre y boro, mejora la capacidad de captación de electrones y mejoran sus propiedades superficiales y rendimiento cuántico en la región roja e infrarroja cercana (NIR) (Tuerhong *et al.*, 2017). Tanto el núcleo como la superficie de la partícula pueden ser funcionalizados con facilidad, aumentando la solubilidad en agua, selectividad, detección y propiedades fotoluminiscencia. Este conjunto de características ofrece una gama de aplicaciones biológicas, medioambientales y relacionadas con la energía, como la bioimagen, la detección, el diagnóstico médico, la catálisis, los agentes

anticancerígenos, los agentes antibacterianos, los antioxidantes, sondas *in vitro* e *in vivo* para bioimagen, producción de diodos emisores de luz (LED) multicolor, fototerapia, administración de fármacos y genes, seguridad alimentaria y conversión de energía (Hui, 2023). La aplicación más interesante en nuestro contexto es la entrega de siRNA y dsRNA en tratamientos SIGS (Delgado-Martin *et al.*, 2022; Schwartz *et al.*, 2020)

Estructura de los CD

Los CDs son nanopartículas de carbono casi esféricas, de dimensión cero (puntos) y con un diámetro medio de <10 nm (Li *et al.*, 2012). Los núcleos de carbono están formados por átomos de carbono con orbitales híbridos sp^3 y sp^2 . Los átomos con orbitales híbridos sp^3 forman una estructura tridimensional de tipo diamante, mientras que los átomos con orbitales híbridos sp^2 producen una estructura amorfa o nanocrystalina gráfica (Georgakilas *et al.*, 2015). Según su tamaño, forma y características químicas se pueden distinguir tres tipos de CDs: puntos cuánticos de carbono (CQD), puntos cuánticos de grafeno (GQD) y puntos de polímero carbonizado (CPD) (Nie *et al.*, 2020). Normalmente encontramos regiones amorfas y cristalinas con una altura de 0,5 a 5 nm. Los espaciados atómicos en el plano gráfico son de 0,18-0,24 nm y entre capas es de 0,334 nm (Yuan *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2015). A diferencia de otros materiales de carbono, los CDs son solubles y estables en agua. Esta estabilidad es debida a la presencia de grupos funcionales superficiales como -OH, -COOH, -CO, -CHO, -NH₂, epoxi y éter en sus superficies (Cao *et al.*, 2007) (Figura 5, A). La alta diversidad de grupos funcionales pasiva las superficies aumentando su capacidad de polimerización con diferentes materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos y mejoran sus propiedades físicas como solubilidad, fotoestabilidad, el área superficial, la conductividad, la actividad catalítica y las propiedades ópticas, incluida la fluorescencia (Hui, 2023). Las propiedades fisicoquímicas y estructurales pueden ser alteradas significativamente al variar los métodos y los precursores de la síntesis y ser adaptadas en función de la aplicación requerida. Las distintas variables de química superficial juegan un papel clave en el comportamiento de excitación y emisión de fluorescencia, por lo que, ajustar la química superficial de los CDs conlleva aumentos en el QY y la solubilidad (Bag *et al.*, 2021).

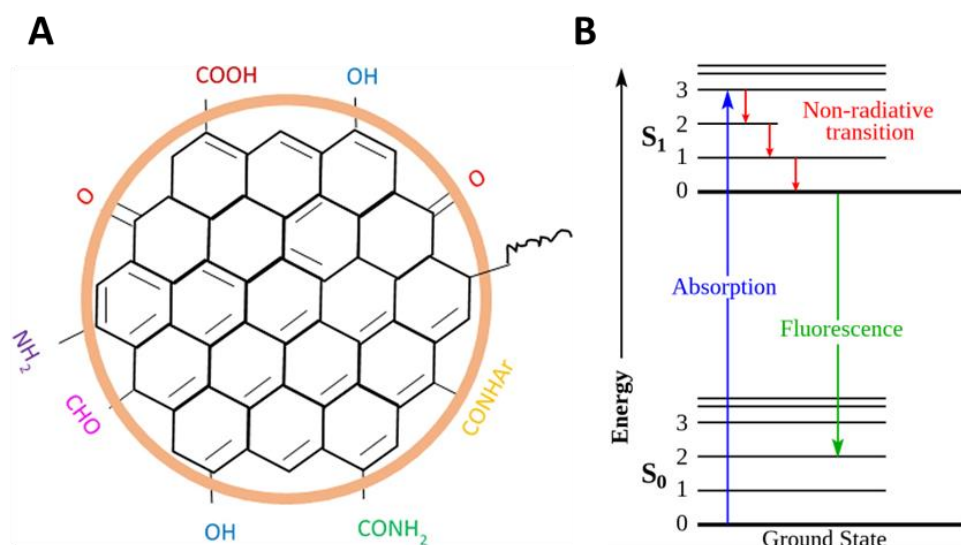


Figura 5: A) Estructura general de un CDs (Hui, 2023). B) Diagrama de Jablonski de absorción, decaimiento no radiativo y fluorescencia (Wikipedia, 6-6-2023).

Mecanismo de fluorescencia

Desde el descubrimiento de los CDs los investigadores han tratado de describir y entender el mecanismo de fotoluminiscencia, su dependencia de la excitación y la relación entre estructura de la partícula y la vida útil (Zhu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016). Pequeños cambios en la química de superficie o en los procesamientos posteriores a su síntesis cambian las propiedades ópticas de los CDs, lo que indica un alto grado de complejidad en el mecanismo de fluorescencia. El diagrama de Jablonski (Figura 5, B) muestra el sistema general de la emisión de fluorescencia, en donde al ser irradiados con luz UV, los CDs captan energía, pasando a un estado excitado a diferentes niveles, una vez que la energía queda confinada en la partícula pasa por estados intermedios de excitación de menor energía y cuando encuentra la vía de salida, es emitida en forma de fluorescencia (Wang *et al.*, 2022).

Actualmente existen varias teorías para explicar el mecanismo de fluorescencia de los CDs donde influye su estado molecular/estado superficial, tamaño y efectos de emisión mejorada por reticulación (CEE). Todas ellas están directamente relacionadas con los mecanismos de síntesis y formación de los CDs (Ai *et al.*, 2021; Cadramel *et al.*, 2019). Durante la formación inicial, las moléculas se polimerizan, y en este punto el mecanismo de emisión es mayormente dependiente del estado molecular. Conforme aumenta el grado de reticulación y polimerización con la formación de estructuras poliméricas de CDs el mecanismo de fluorescencia está dominado por los efectos de emisión mejorada por

reticulación (CEE). La generación de un núcleo sólido de carbono conlleva la aparición de una estructura denominada *core-shell*, en donde el mecanismo de emisión depende ahora del núcleo de carbono, el tamaño y los estados de superficie. Este estado de superficie viene determinado por la hibridación del esqueleto de carbono y los grupos químicos conectados. Cuando se alcanza un grado de carbonización total, el efecto de los grupos funcionales deja de interferir, predominando el efecto del tamaño del núcleo en la formación de la fluorescencia (Figura 6) (Liu *et al.*, 2019; Qu y Sun, 2020; Tian y Yin, 2019). Se ha descrito recientemente que la modificación de las relaciones entre el núcleo interno y los grupos funcionales permite controlar la fluorescencia de los CDs (Wang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022).

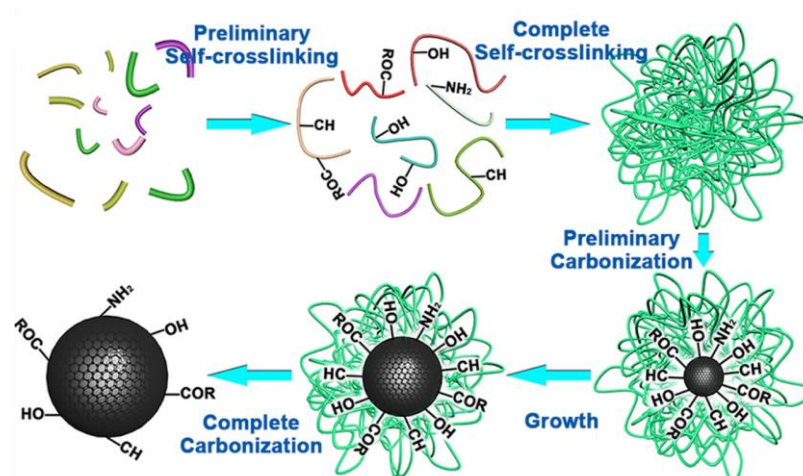


Figura 6: El proceso de formación de CD en el proceso ascendente (Wang *et al.*, 2022).

Síntesis de CDs

En los últimos años se han sintetizado CDs a partir de diversos precursores como compuestos orgánicos naturales y sintéticos, plantas, restos de alimentos, residuos orgánicos y biopolímeros (Hsu *et al.*, 2012; Hui, 2023; Lio *et al.*, 2017). La síntesis de CDs está basada en dos aproximaciones o enfoques: (a) enfoques "Top-down" y (b) enfoques "Bottom-Up".

La síntesis "Top-down" utiliza métodos químicos y físicos para producir CDs partiendo de macromoléculas. Generalmente se usan materiales derivados del carbono como precursores (grafito o fibra de carbono). Los métodos más característicos son:

- a) **Ablación láser:** La radiación láser funciona en dos modos: onda continua y onda pulsada. Sun y colaboradores (2006) fueron los primeros en usar este método. La reacción se produjo en presencia de vapor de agua y una atmósfera de argón a 900°C y 75 kPa. Los CDs resultantes necesitaron de pasivación con polímero para

aumentar la fluorescencia. Este método es rápido, eficaz y sencillo. Por lo general los CDs tienen bajo rendimiento cuántico, un elevado coste de producción, partículas de tamaño polidisperso y usan gran cantidad de material de carbono como materia prima (Hui, 2013).

- b) Método electroquímico:** Este método se caracteriza por que los electrolitos y los parámetros de funcionamiento controlan la reacción. Variando la solución electrolítica, los CDs son funcionalizados con distintas propiedades. Wang y colaboradores (2014) sintetizaron CDs fluorescentes sensibles al pH a partir de glicina en condiciones alcalinas que podían detectar hemoglobina. La síntesis se llevó a cabo en varios pasos: electrooxidación, electropolimerización, carbonización y pasivación. Este método requiere de un equipo sencillo capaz de preparar CDs ultrapuros, multifuncionales y rentables con un alto rendimiento cuántico. Además, de producir CDs de tamaño y color de emisión controlable (Deng *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2020).
- c) Método de descarga de arco:** La descarga en arco usa la descomposición eléctrica de un gas que genera un plasma. La reacción ocurre en una cámara con un ánodo (carbono en polvo y un catalizador) y un cátodo de grafito puro. Al formarse el plasma se genera un hollín donde se encuentran los CDs (Arosa y Sharma, 2014). Fue de esta forma, en 2004, como se sintetizaron por primera vez los CDs (Xu *et al.*, 2004). Este método permite sintetizar CDs con buenas propiedades de fluorescencia, buena solubilidad en agua, bajo rendimiento cuántico y alta polidispersidad de partículas.

La síntesis "Bottom-Up" los CDs se sintetizan a partir de pequeñas moléculas orgánicas y compuestos que aporte pasivación de superficie como precursores. En general, en la obtención de estos CDs intervienen cuatro pasos: deshidratación, polimerización, carbonización y pasivación (Hsu y Chang, 2012). Los métodos más característicos son:

- a) Método solvotermal/hidrotermal:** Este método se basa en la disolución del precursor carbonatado en una solución acuosa para su posterior tratamiento con altas temperaturas usando o no altas presiones en el proceso. El efecto del tiempo de reacción, la temperatura y el uso de diferentes precursores y soluciones durante la síntesis provoca la aparición de CDs con distintos tamaños, longitudes de onda de excitación y emisión y propiedades de superficie (Gayen *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019). Es un método de síntesis poco contaminante y de alta eficiencia que permite diseñar CDs con un rendimiento cuántico y tamaño de partícula deseado, aunque con tiempos de reacción largos (Hui, 2023).
- b) Método de irradiación por microondas:** Este método permite sintetizar CDs fluorescentes mediante una disolución acuosa de un compuesto carbonado y un agente pasivante, posteriormente son calentados en hornos microondas (Arsalani *et*

al., 2019; Jiang *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2009). Este método es respetuoso con el medio ambiente, eficiente energéticamente y rápido.

- c) **Método de pirólisis:** Este método usa altas temperaturas en presencia de de ácido fuerte o álcali para sintetizar CDs. El tamaño y la cristalinidad de los CDs sintetizados dependen de la temperatura y el tiempo de reacción (Ismail *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2019). Es un método con tiempos de reacción cortos, rentable, fácil de usar y tiene la ventaja de no emplear disolventes orgánicos, aunque generando CDs con bajo rendimiento cuántico.

Estos procesos pueden ser suplementados con post-tratamientos de centrifugación, diálisis, filtración, electroforesis en gel y cromatografía en columna después de la síntesis para obtener CDs más puros, con tamaños y fluorescencia deseada (Hu *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011). También se puede modificar la superficie de los CDs ya que poseen grupos funcionales reactivos como carboxilo, amino e hidroxilo. Para modificar los CDs se pueden usar dos estrategias: modificación superficial/funcionalización/pasivación y dopaje de heteroátomos. Esta modificación post síntesis puede mejorar las propiedades fisicoquímicas, electrónicas y ópticas de los CDs ampliando sus aplicaciones (Behi *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2023).

CDs en la entrega de ácidos nucleicos

La terapia génica es un nuevo enfoque de trabajo en los campos biotecnológico y médico. Consiste en la entrega de ácidos nucleicos con funciones terapéuticas en células vegetales y animales. Esta terapia depende en gran medida del uso de nanotransportadores eficaces para dirigir los genes a las células diana (Cao *et al.*, 2018). El pequeño tamaño y fluorescencia de los CDs facilitan la captación y seguimiento celular, aumentando la eficacia en las transfección genética y permitiendo su localización (Ghosh *et al.*, 2019; Han y Na, 2019), lo que convierte a los CDs en una nanopartícula clave para la entrega y liberación de ácidos nucleicos.

Se han usado en numerosas ocasiones los CDs en aplicaciones de bioimagen y diferentes terapias génicas. Wu y colaboradores (2016) usaron CDs pasivados con PEI para dirigir terapias frente al cáncer. Estos autores emplearon fc-rPEI-Cdots/siRNA, un CDs multifuncional, que portaba siRNA (EGFR y ciclina B1) mostrando un buen silenciamiento génico con efecto anticancerígeno en células de cáncer de pulmón. Chen y colaboradores (2017) sintetizaron CDs fluorescentes de menos de 10 nm y rendimiento cuántico 56.3%, siguieron el método de carbonización hidrotermal con polisacáridos de porfirina como precursores. Estos CDs se utilizaron para transfección en cultivos celulares con alta eficiencia y muy baja toxicidad en comparación con reactivos de transfección comerciales PEI (25 KDa), Lipofectaimne 2000, y SQDs. Este sistema de siRNA-CDs generó un silenciamiento elevado de genes tumorales inhibiendo el crecimiento del tumor en cáncer de mama. Cao y colaboradores (2018) sintetizaron CDs catiónicos con fines de

autoimagen y liberación génica no viral para la condrogénesis. Sintetizaron estos CDs por el método de pirólisis asistido por microondas, con arginina y glucosa como precursores. Wong y colaboradores (2018) sintetizaron nanopartículas sensibles a estímulos. Este sistema condensaba miRNA y DNAs que responden a cambios de pH en el endosoma liberando el material genético haciéndolo accesible para el transporte nuclear. Luo y colaboradores (2018) mediante carbonización por polimerización deshidratante sintetizaron CDs fotoluminiscentes dopados con flúor con aplicaciones en bioimagen y liberación de genes, mejorando la eficiencia de transfección 30 veces con respecto al PEI 25 kDa, usado como estándar. Para el uso de CDs con aplicaciones de imagen y seguimiento es necesario usar concentraciones de entre 300 y 500 mg/ml. Li y colaboradores (2021) sintetizaron PEI-CDs cargados positivamente con emisión de fluorescencia de color naranja brillante, baja toxicidad y alto rendimiento cuántico para obtención de imágenes celulares y liberación de genes. Estos PEI-CDs unen por interacciones electrostáticas siRNA, haciéndolos rastreables en cultivos celulares y silenciando genes de hepatoma con baja toxicidad.

Los CDs han adquirido importancia en aplicaciones de RNAi en organismos vegetales con resultados prometedores. Wang y colaboradores (2020) aplicaron PEI-CDs para llevar a cabo la transfección génica de plantas intactas. Trataron hojas y raíces de arroz (*Oryza Sativa japonica*), hojas de trigo (*Triticum aestivum*) y hojas de judía mungo (*Phaseolus radiatus*) con estas nanopartículas unidas a DNA, alcanzando un suministro eficaz de DNA y una fuerte expresión génica sin integración del DNA exógeno en el genoma vegetal. En concreto consiguieron introducir el gen de resistencia a la hidamicina e inducir la resistencia frente higromicina en arroz. Estos CDs facilitan el transporte y evitan la degradación del DNA por acción de DNasa. Schwartz y colaboradores (2020) sintetizaron CDs funcionalizados con PEI para la entrega de siRNAs en *Nicotiana benthamiana* y tomate (*Solanum lycopersicum*), silenciando con éxito genes endógenos de la planta. A diferencia de las células animales, las células vegetales poseen una pared celular que debe ser sobrepasada con éxito para obtener un silenciamiento efectivo. La aplicación por pulverización foliar a baja presión de siRNA frente GFP unidos a PEI-CDs generó un silenciamiento eficaz de la expresión GFP en tabaco y tomate. Además, estudiaron el efecto de este sistema frente a los genes endógenos que codifican dos subunidades de la quelatasa de magnesio, genes implicados en la síntesis de clorofila, con efectos similares en la reducción de la expresión.

Los CDs se componen mayormente de carbono y pueden ser sintetizados mediante métodos y precursores ecológicos y biocompatibles no tóxicos (Hui, 2023). Las aplicaciones biomédicas y en agricultura exigen una baja toxicidad de los compuestos usados. La toxicidad de los CDs fue analizada a bajas y altas concentraciones en diversos tipos de células humanas como MCF-7 (células mamarias humanas), HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano) y células H460 (Sun *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2016), no encontrándose efectos tóxicos sustanciales.

Los CDs pueden jugar un papel doble. Por un lado, actuando como nanotransportadores de fármacos y genes a células diana y por otro, como agentes de seguimiento por sus propiedades fluorescentes (Hui, 2023). Además, aparecen ser efectivos en la entrega de moléculas efectoras de RNAi en plantas (Schwartz *et al.*, 2020), convirtiéndose en herramientas valiosas para el silenciamiento génico con aplicaciones prácticas en la genómica funcional vegetal y el control de plagas en la agricultura.

14. Posibles riesgos, problemas de seguridad y limitaciones legales de SIGS

Las vacunas basadas en aplicación tópica de dsRNA frente patógenos virales deben ser evaluadas desde el punto de vista de la seguridad. Se han publicado dos informes de agencias gubernamentales sobre los aspectos claves a considerar en la evaluación de la seguridad y riesgos de la aplicación de dsRNA en plantas (US-EPA, 2013 y OECD, 2020). Los riesgos de aplicación tópica de dsRNA-NPs son similares a los de pesticidas convencionales. La irritación o los daños cutáneos y respiratorios y la contaminación ambiental son aspectos que deben evaluarse si se pretende comercializar estas nanoformulaciones. El factor más preocupante de esta tecnología son los posibles efectos inespecíficos en especies y organismos no diana (Darsan Singh *et al.*, 2019; Romeis y Widner, 2020). Alcanzar una especificidad total de estos tratamientos es clave para una aceptación pública a la hora de llegar al mercado. Por tanto, los diseños de las dianas de SIGS deben ser altamente específicos y no tener homología en ninguna secuencia fuera de la diana, minimizando impactos no deseados. Para ello, además del empleo de herramientas y modelos bioinformáticos que se han desarrollado para este fin (Mat Jalaluddin *et al.*, 2023), es requerida la realización de ensayos experimentales. También está generando expectativa los riesgos asociados a los aerosoles de SIGS, pues el combinado dsRNA-nanopartículas prolonga la estabilidad de los dsRNA en el medio ambiente, el suelo y los sistemas de riego. El uso de nanopartículas en la pulverización debe ser evaluado rigurosamente para evitar posibles riesgos en la seguridad de los tratamientos tanto en los cultivos, humanos como en el medio ambiente (Lichtenberg *et al.*, 2019).

Actualmente las incertidumbres relacionadas con las vías regulatorias para el RNAi son el principal obstáculo de esta tecnología. La mayoría de los países aún no han tomado una postura regulatoria frente a SIGS. Algunos países han dado un primer paso en la revisión y definición de sus procesos reguladores. En EE.UU., los tratamientos basados en RNAi se analizan al igual que los pesticidas químicos. En Canadá en base al producto y la novedad del rasgo diana. En Australia han optado por una postura favorable, no incluyendo los tratamientos de dsRNA dentro de las regulaciones de organismos modificados genéticamente. Estas decisiones han facilitado la aprobación de ensayos de campo acercando la aprobación final de esta tecnología. Otras áreas políticas, como es el caso de

la Unión Europea, aún no han aclarado qué postura tomarán frente a SIGS (Branlett *et al.*, 2020; Darsan Singh *et al.*, 2019; De Schutter *et al.*, 2022).

Cabe resaltar que las tecnologías de activación de RNAi por aplicaciones SIGS son la nueva generación de biopesticidas y vacunas frente a patógenos virales (Mat Jalaluddin *et al.*, 2023). Las grandes limitaciones regulatorias sumado, a las cada vez mayores restricciones en el uso de productos de origen químico, generan una situación muy tensionada en la agricultura actual. Se necesitan cambios en favor de estas nuevas tecnologías para que la industria del RNAi florezca y podamos hacer frente tanto a la reducción de insumos químicos como para aumentar las producciones netas de los cultivos.

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el desarrollo y obtención de vacunas para plantas basadas en la aplicación tópica de dsRNA mediada por nanopartículas de carbono (“carbon dots”).

Los objetivos particulares de esta tesis doctoral se pueden desglosar en:

- I. Diseño y evaluación de sistemas de expresión constitutiva de dsRNA en bacterias para inducir RNAi en tratamientos tópicos foliares (Capítulo II).
- II. Evaluación y análisis de la eficacia de la aplicación de vacunas basadas en dsRNA que activen el RNAi en cucurbitáceas frente a los virus CGMMV y ToLCNDV (Capítulo III).
- III. Síntesis y caracterización de carbon dots para el desarrollo de “nanocomposites” que mejoren la entrega y movilidad de dsRNA en tratamientos tópicos foliares en plantas e induzcan el RNAi (Capítulo IV).

Capítulo II

An efficient dsRNA constitutive expression system in Escherichia coli

Delgado-Martín, J., & Velasco, L. (2021). An efficient dsRNA constitutive expression system in Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16), 6381-6393. DOI: 10.1007/s00253-021-11494-6

Abstract

Synthetic dsRNA are valuable tools for reverse genetics research and virus silencing applications. Its synthesis can be performed both *in vivo* or *in vitro*. Whilst the latter presents the drawback of high production cost, the former has the advantage of being less expensive and suitable for scalable production. In general, dsRNAs are obtained *in vivo* from *Escherichia coli* heterologous systems that requires the gene for the T7 RNA polymerase inducible by IPTG. The (ds)RNAs for gene of interest are then synthesized under the T7 promoter. In this work, we present a reliable vector system that includes the insulated promoter proD for the constitutive expression of dsRNA in *E. coli* that does not require any inducer and that renders elevated dsRNA yield. In tandem, the T7 and proD promoters renders the highest dsRNA yield. The accumulation of dsRNA in this system entails a high metabolic cost for the cell. Bacterial RNA extractions that included dsRNAs homologous to the *m5GFP_{er}* gene and derived from both the synthetic and constitutive promoters induce silencing of GFP expression in *Nicotiana benthamiana* 16c.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo III

Exogenous Application of dsRNA for the Control of Viruses in Cucurbits

Delgado-Martín, J., Ruiz, L., Janssen, D., & Velasco, L. (2022). Exogenous application of dsRNA for the control of viruses in cucurbits. *Frontiers in plant science*, 13. DOI: 10.3389/fpls.2022.895953

Abstract

The recurrent emergence of virus diseases in intensive horticultural crops requires alternative control strategies. Topical application of dsRNA molecules homologous to pathogens has been proposed as a tool for plant virus control. These dsRNAs induce the silencing mechanism (RNAi) that degrades homologous dsRNAs. Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) represents a serious threat to cucurbit crops. Since genetic resistance to the virus is not yet available in commercial varieties, we aimed to control this virus by RNAi. For this purpose, we obtained constructions both for expressing dsRNA in bacteria to treat cucumber plants by topical application and for agroinoculation in experiments done in the growth chamber. Besides, greenhouse tests were performed in spring and in summer when plants were challenged with the virus and differences in several parameters were investigated, including severity of symptoms, dry weight, total height, virus accumulation and virus-derived small interfering RNAs (vsiRNAs). Spraying of plants with dsRNA reduced significantly CGMMV symptoms in the plants in growth chamber tests. Agroinfiltration experiments done under identical conditions were also effective in limiting the progress of CGMMV disease. In the greenhouse assay performed in spring, symptoms were significantly reduced in dsRNA-sprayed plants and the development of the plants improved with respect to non-treated plants. Virus titers and vsiRNAs were clearly reduced in dsRNA-treated plants. The effect of protection of the dsRNA was less evident in the greenhouse assay carried out in summer. Besides, we investigated the mobility of long (ds)RNA derived from spraying or agroinfiltrated dsRNA and found that it could be detected in local, close distal and far distal points from the site of application. VsiRNAs were also detected in local and distal points and the differences in accumulation were compared. In parallel, we investigated the capacity of dsRNAs derived from genes of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), another economically important virus in cucurbits, to limit the disease in zucchini, both by agroinfiltration or direct spraying, but found no protection effect. In view of the results, topical application of dsRNAs is postulated as a promising strategy for CGMMV control in cucumber.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Capítulo IV

Carbon Dots Boost dsRNA Delivery in Plants and Increase Local and Systemic siRNA Production

Delgado-Martín, J., Delgado-Olidén, A., & Velasco, L. (2022). Carbon dots boost dsRNA delivery in plants and increase local and systemic siRNA production. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5338. DOI: 10.3390/ijms23105338

Abstract: In this work, we obtained carbon dots from glucose or saccharose as the nucleation source and passivated them with branched polyethylenimines for developing dsRNA nanocomposites. The CDs were fully characterized using hydrodynamic analyses, transmission electron microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. The ζ potential determined that the CDs had positive charges, good electrophoretic mobility and conductivity, and were suitable for obtaining dsRNA nanocomposites. DsRNA naked or coated with the CDs were delivered to leaves of cucumber plants by spraying. Quantitation of the dsRNA that entered the leaves showed that when coated with the CDs, 50-fold more dsRNA was detected than when naked dsRNA. Moreover, specific siRNAs derived from the sprayed dsRNAs were 13 times more abundant when the dsRNA was coated with the CDs. Systemic dsRNAs were determined in distal leaves and showed a dramatic increase in concentration when delivered as a nanocomposite. Similarly, systemic siRNAs were significantly more abundant in distal leaves when spraying with the CD-dsRNA nanocomposite. Furthermore, FITC-labeled dsRNA was shown to accumulate in the apoplast and increase its entry into the plant when coated with CDs. These results indicate that CDs obtained by hydrothermal synthesis are suitable for dsRNA foliar delivery in RNAi plant applications.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Resumen de los resultados

Los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral se exponen de acuerdo con los objetivos planteados.

En relación al **Objetivo I**, se abordó la construcción de vectores de expresión bacteriana de dsRNA con aplicaciones en RNAi. Las aplicaciones en laboratorio y campo de dsRNA demanda grandes cantidad de dsRNA que ayuden a comprender y evaluar los mecanismos de acción del RNAi y conocer la efectividad de los nuevos tratamientos en condiciones reales. Por ello, se diseñaron 3 vectores de expresión L4440-cp (2x promotor T7), L4440-2xprod-cp (2x promotor T7 y 2x promotor proD) y pUC-2XproD-CP (2x promotor proD) con los que se transformó a *Escherichia coli* HT115 (DE3) en cuyo genoma está presente el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el promotor *lac*, inducible por lactosa o IPTG. En las bacterias en las que está presente el vector L4440-cp, en presencia de IPTG se producen dsRNAs de ~570 pb de longitud además de otros dsRNA de menor peso molecular producto de síntesis incompletas. Por otra parte, cuando además se adiciona lactosa da lugar a un incremento del 48% en la producción de dsRNA frente a la inducción simple con IPTG. Cuando se expresa pUC-2XproD-CP, se genera dsRNA de tamaño esperado ~640 pb, así como otras bandas de menor peso molecular por síntesis incompleta. Al inducir con IPTG las bacterias en las que está presente el vector con doble promotor (constitutivo e inducible) L4440-2xprod-cp, se generan dsRNAs de tamaños esperados para ambos promotores (T7 ~850 pb y proD ~640 pb).

Se determinó el número de moléculas de dsRNA mediante RT-qPCR que los distintos vectores eran capaces de producir. Las células HT115 (DE3), que portaban el L4440-CP, produjeron $9,36 \times 10^9$ moléculas de dsRNA por ml de cultivo cuando se indujeron con IPTG, tres veces más que las células inducidas con lactosa. Cuando las células HT115 (DE3) portaban el L4440-2XproD-CP, el rendimiento de dsRNA era de $2,4 \times 10^8$, $1,6 \times 10^9$ moléculas/ml y $1,7 \times 10^8$ moléculas/ml para ningún inductor, IPTG y lactosa. Por último, cuando el promotor constitutivo fue el único disponible para la producción de dsRNA en pUC-2XproD-CP, el rendimiento fue del mismo orden de magnitud para cada inductor, $1,7 \times 10^8$ y $2,3 \times 10^8$ moléculas/ml, para IPTG y lactosa, respectivamente. De esta manera la mayor producción de dsRNA es llevada a cabo por L4440-CP y L4440-2XproD-CP inducidos por IPTG.

Estudiamos el efecto sobre el crecimiento de *E. coli* HT115(DE3) cuando portaban los vectores de expresión al ser inducidos, analizando las curvas de crecimiento, la proteína citosólica y el RNA total. Las curvas de crecimiento mostraron diferencias en el punto de inflexión y la pendiente en función del plásmido y del inductor utilizado. Las células con el vector L4440-CP crecían más cuando no eran inducidas y, al usar inductores, el crecimiento era mayor cuando se utilizaba lactosa en vez de IPTG. Las células L4440-2XproD-CP, con los dos promotores, mostraron mayor efecto de la expresión en el crecimiento. El fuerte estrés metabólico producido por la producción de dsRNA provocado por la expresión simultánea del promotor inducible y constitutivo generó un retraso en el

crecimiento. Las células HT115(DE3) con el vector pUC-2XproD-CP no mostraron diferencias significativas entre condiciones.

Los sistemas de expresión y producción de dsRNA se validaron en aplicaciones SIGS silenciando la proteína GFP en plantas *N. benthamiana* 16c. Se observó silenciamiento de la fluorescencia de la GFP cuando se aplicaron dsRNA homólogos del gen *mGFP5er* producidos en células HT115 que albergaban los vectores L4440-GFP (IPTG) y L4440-2XproD-GFP (no inducidas). Cuando se usó dsRNA-GFP de L4440-GFP el silenciamiento comenzó a los 3 días post aplicación (dpa), extendiendo su efecto a otras partes de la planta a 4-5 dpa. El silenciamiento fue completo en la hoja tratada a los 6 dpa. Al tratar las plantas con dsRNA-GFP de L4440-2XproD-GFP el comienzo del silenciamiento se retrasaba hasta los 5 dpa, apareciendo en otras partes después de 8 dpa. A los 25 dpa, se apreció silenciamiento incluso en flores tanto en plantas tratadas con extracto de RNA L4440-GFP como L4440-2XproD-GFP.

Los resultados obtenidos para este objetivo nos permiten concluir que los vectores de expresión bacteriana L4440 y L4440-2XproD una gran herramienta para la producción masiva de dsRNA en aplicaciones SIGS con fines industriales y de investigación.

En relación al **Objetivo II**, se abordó el efecto inductor del RNAi de la aplicación foliar de dsRNA en plantas de pepino inoculadas y no inoculadas con CGMMV y ToLCNDV. De esta manera pretendimos evaluar la efectividad de vacunas vegetales basada en dsRNA largos para el control de CGMMV y ToLCNDV, dos virus con una gran importancia en cultivos de cucurbitáceas de los que aún no se posee resistencia genética comercial.

Se obtuvieron plásmidos para la expresión de dsRNA usando el vector L4440 para dos genes (*AV1* y *BC1*) de ToLCNDV y dos genes (*cp* y *mp*) de CGMMV introducidos en *E. coli* HT115(DE3). Los tamaños de los dsRNA esperados fueron de 720, 700, 590 y 650 pb para las construcciones L4440-AV1, -BC1, -cp y -mp, respectivamente. Se obtuvo un promedio de ~50 µg de extracto de RNA total por cada ml de cultivo bacteriano.

Además, se realizaron una serie de experimentos preliminares llevados a cabo en fitotrón donde se determinó que la aplicación de dsRNA mediante pulverización, frotación o expresión transitoria (agroinoculación) limitaba el progreso de la enfermedad producida por CGMMV. Posteriormente, se desarrollaron ensayos en invernadero (primavera y verano). El primer experimento se realizó en abril, temperatura media de 23,5 °C, con las siguientes condiciones: 15 plantas control sin tratamiento ni inoculación viral, 15 plantas tratadas de forma simulada (*mock*) e inoculadas con CGSPCu16 a los 3 dpa y 15 plantas fueron pulverizadas con 60 µg de extracto de dsRNA-CP por hoja (120 µg/planta) e inoculadas con CGSPCu16 a 3 dpa. 18 días post inoculación (dpi), las plantas fueron cosechadas y se determinó el peso seco, altura total y niveles de expresión de síntomas (0 a 3, sin síntomas a síntomas severos). Además, se tomaron muestras para la extracción de

RNA y la cuantificación viral mediante RT-qPCR. Los resultados de peso seco y altura entre las plantas control no inoculadas y las tratadas con dsRNA-CP no mostraron diferencias significativas, pero si frente a las inoculadas con el virus pero no tratadas, que mostraron menor desarrollo por la acción viral. Las mayores diferencias se obtuvieron en la expresión de síntomas, donde todas las plantas no tratadas mostraban síntomas graves (media 2,13) frente a las tratadas con dsRNA-CP entre las que 4 mostraron síntomas leves y 11 resultaron asintomáticas.

Además, un enfoque experimental similar se realizó en verano (principios de julio) con temperaturas más elevadas (28°C de media). Los resultados obtenidos a los 18 dpi mostraron que no hubo diferencias en peso seco para los diferentes tratamientos. Frente a la altura, se observó que las plantas control no inoculadas y las inoculadas tratadas con dsRNA-CP no mostraron diferencias significativas, pero si entre el control y las inoculadas no tratadas y entre las tratadas con dsRNA y las no tratadas. En el caso de la expresión de síntomas, las 15 plantas no tratadas mostraron síntomas severos (media 3) mientras que las plantas tratadas con dsRNA mostraron una media de síntomas de 1,6 (2 mostrando síntomas severos, 1 asintomática, 7 síntomas leves y 5 síntomas graves). Al comparar entre experimentos, se observó como las plantas crecieron un 70% más y pesaron un 62% más en verano que las cultivadas en abril. El análisis de correlación lineal mostró diferencias en el comportamiento de los tratamientos entre ambas estaciones, resultando un mayor efecto de los tratamientos con dsRNA en la limitación de los efectos de la enfermedad en abril.

A continuación, fue analizada la acumulación viral relativa mediante comparación de la expresión del gen viral *cp* y el gen *18s* ribosómico de *Cucumis sativus* tanto en plantas tratadas como no tratadas. En el ensayo de primavera se detectó una diferencia de 47,7 veces más acumulación viral en plantas no tratadas frente a las tratadas con dsRNA-CP. En verano, las diferencias fueron menos evidentes, mostrando una reducción de sólo 5,8 veces menos carga viral en plantas tratadas con respecto a las no tratadas. Cuando se comparó la acumulación viral entre los ensayos, encontramos 30 veces más en verano que en primavera en las plantas no tratadas. Pero, si comparamos entre plantas tratadas, esta diferencia asciende a 243 veces. Así pues, el efecto del dsRNA en la reducción de la acumulación viral fue significativamente mayor en primavera.

Se analizaron y estudiaron las distintas poblaciones de vsiRNAs obtenidos por secuenciación masiva de plantas infectadas con CGMMV. Del total de RNA pequeños (21-24 nt) encontrados, solo 199.534 vsiRNA alineaban con el genoma de CGMMV en las muestras de plantas inoculadas y tratadas (DS) y 692.505 vsiRNAs en inoculadas y no tratadas (MO). Se identificaron puntos calientes en las regiones *cp* y *mp* en ambos tratamientos, apareciendo mayor prevalencia de vsiRNAs coincidentes con la región del gen de la replicasa en la muestra MO. El 95% de los vsiRNAs de 21-24 nt que alineaban con CGMMV eran de la clase 21-22 nt. En ambos tratamientos la clase 21 nt vsiRNAs prevaleció frente la de 22 nt. La mayoría de los vsiRNAs de 21 a 22 nt alineados con el genoma del CGMMV eran de polaridad negativa, mostrando un sesgo hacia los vsiRNAs

antisentido. La adenina fue la base predominante en el extremo 5' de los vsiRNAs y el uracilo en el extremo 3'. Las lecturas de la muestra no inoculada pero tratada con dsRNA-CP (NI) se alinearon únicamente con el gen *cp* de CGMMV, prevaleciendo las secuencias en dirección sentido (85,9%) sobre las antisentido. El vsiRNA de 22 nt fue el más abundante con el 44,9 %

La HTS permitió identificar varios vsiRNAs alineados con el genoma de CGMMV. Mediante cuantificación específica de estos vsiRNAs encontramos que las plantas tratadas con dsRNA mostraban menor cantidad de vsiRNAs específicos que las no tratadas, siendo 7,4 veces menor para el 1193-vsiRNA, localizado en el gen RdRp, 14 veces menor para el 5234-vsiRNA, correspondiente al gen *mp* y 15,8 veces menor para el 6125-vsiRNA, que correspondía al gen *cp* del virus. El 6125-vsiRNA resultó ser el más abundante tanto en las plantas tratadas con dsRNA como en las no tratadas.

Además, investigamos los movimientos sistémicos de los (ds)RNA largos y siRNA derivados tras la aplicación de dsRNA. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes, uno donde se realizó agroinfiltración con pGHE-CP o pGHE-MP y otro donde se pulverizó con dsRNA-CP. En el punto 1, la hoja donde se aplicó el dsRNA, se cuantifican por RT-qPCR (ds)RNA-CP o MP y el vsiRNA 6126 o el vsiRNA 5324. Detectándose (ds)RNA largos y siRNA en hojas distales en ambos tratamientos, hallando 9 veces más (ds)RNA en las plantas pulverizadas que en las agroinoculadas (valores $\Delta\Delta Cq$ de dsRNA-MP y dsRNA-CP). Por otro lado, los valores de $\Delta\Delta Cq$ mostraron que las cantidades de vsiRNAs derivados de los dsRNA-CP y MP en las plantas agroinfiltradas estaban en el mismo rango, mientras que los 6125-vsiRNAs derivados del dsRNA-CP en las plantas rociadas eran 14 veces más abundantes. En otro experimento, analizamos la movilidad de los RNA largos y vsiRNA cuantificados en 3 puntos de muestreo diferentes. El punto 1 corresponde a la mitad de la hoja donde se realizó la aplicación, el punto 2 la otra mitad de la hoja previamente protegida y, el punto 3, corresponde a la hoja opuesta, se trataron las plantas con dsRNA-CP tomándose muestras a 3 dpt (n=6), posteriormente fueron analizadas por RT-qPCR. El cálculo del $\Delta\Delta Cq_{CP-18S}$ nos permitió establecer que en los puntos 2 y 3 había $3,8 \times 10^4$ y $1,55 \times 10^5$ veces menos (ds)RNA-CP, respectivamente, con respecto al punto de pulverización del dsRNA-CP (punto 1). Los (ds)RNA fueron 4 órdenes de magnitud más abundantes en el punto de aplicación frente al punto distal cercano, y 5 órdenes de magnitud menos abundantes las que se desplazaron a la hoja distal lejana. Esta diferencia era solo de 50 veces entre el punto 2 (distal cercano) frente a punto 3 (distal lejano). Cuando se investigó el RNAi, encontramos que los 6125-vsiRNAs podían detectarse en hojas no tratadas a los 3 dpt, indicando un movimiento sistémico a larga distancia de la señal de silenciamiento. Analizando la presencia de vsiRNAs en cada punto de muestreo se detectaron más vsiRNAs en punto 1 que en punto 2 y 3 ($9,1 \times 10^3$ veces y $3,3 \times 10^4$ veces, respectivamente). Así pues, los (ds)RNA/vsiRNA que llegaban a los puntos distales estaban muy diluidos en comparación con las cantidades cuantificadas en el punto de aplicación. Cuando se compararon las proporciones de los valores de (ds)RNA

largos y vsiRNAs entre puntos, se observó que entre punto 1 y 2 eran similares, pero entre punto 1 y 3 se apreciaban 7,9 veces más vsiRNA, sugiriendo diferentes movimientos sistémicos de (ds)RNAs largos en el floema. El análisis mediante RT-qPCR de la estabilidad del dsRNA aplicado en la hoja mostraron cómo podía detectarse, al menos, a los 10 dpt en el punto de aplicación, manteniéndose estable la cantidad (ds)RNA detectada entre 6 y 10 dpt. Además, se pudo detectar a 10 dpt una cantidad similar de (ds)RNA en ápice a la encontrada a los 3 dpt en las hojas rociadas y distales.

Por último, se trató de investigar el efecto protector de dsRNA en la enfermedad producida por ToLCNDV. Se rociaron grupos de 8 plantas con dsRNA-AV1/BC1 o se agroinfiltración con las construcciones pGHE-AV1 y pGHE-BC1. A los 3 dpt se infectaron con insectos virulíferos hospedadores de ToLCNDV-ES y se mantuvieron en jaulas a prueba de insectos. A los 15 dpi, no observamos diferencias en el número de plantas sintomáticas ni en la gravedad de los síntomas entre las plantas tratadas y las no tratadas, ya fueran rociadas con dsRNA o agroinoculadas.

Los resultados obtenidos demuestran la efectividad en el control viral de CGMMV de los dsRNA producidos en sistemas bacterianos derivados de L4440, no siendo efectivo, por el momento, para ToLCNDV. Además, demostramos el movimiento sistémico y local tanto de dsRNA y vsiRNA en plantas tratadas. Los métodos que fueron usados para evaluar estos movimientos abren la puerta al uso de esta herramienta en protocolos intensivos de evaluación de condiciones que agilicen el conocimiento y evaluación de vacunas vegetales frente patógenos virales.

En relación al **Objetivo III**, se abordó la síntesis de nanopartículas de carbono denominadas *carbon dots* para su uso como nanotransportadores de dsRNA en aplicaciones SIGS capaces de activar los mecanismos de RNAi, ya que una de las limitaciones de las vacunas vegetales es el incremento de la efectividad de los dsRNA aplicados. Por estos motivos, obtuvimos CDs con el objetivo de mejorar la penetración y movilidad del dsRNA en las plantas.

Nuestro enfoque fue la fabricación de puntos de carbono o *carbon dots* (CDs) mediante síntesis solvo-hidrotermal (6 horas a 180 °C) usando como precursores glucosa (gCD) o sacarosa (sCD) y bPEI (polietilenimina ramificada) de 2 kDa de masa molecular, con una proporción 1:1. Obteniendo CDs de 1-10 nm de tamaño mediante filtración (0,22 μ m) y diálisis (1 kDa de límite de exclusión).

Se llevó a cabo una caracterización profunda de los gCD y sCD. Los espectros de absorción UV-Vis mostraron un máximo a 233 nm atribuido a transición π - π^* de C=C, apareciendo un hombro alrededor de 366 nm para sCD y 300-350 para gCD. Los espectros de fluorescencia mostraron valores máximos a 468 nm (azul claro) para ambas partículas cuando eran excitadas a 350nm y presentan un rendimiento cuántico de 1% para sCD y 2% para gCD.

Por otro lado, para determinar los grupos funcionales se usó FT-IR y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X o XPS. Los espectros FT-IR fueron similares en las dos partículas, mostrando energías de vibración o estiramiento típicas de enlaces O-H (3435 cm^{-1}), C-H ($2926/2920$ y 2852 cm^{-1}), C=C (1629 cm^{-1}), N-H (1630 cm^{-1}), CH₃ (1499 y 1458 cm^{-1}), C-OH (1384 cm^{-1}) y C-O-C (1062 cm^{-1}). Las únicas diferencias notables se encontraron en la región $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, donde para la muestra sCD aparecen resueltas dos señales a 1160 y 1051 cm^{-1} que corresponden a señales de flexión C-O/C-O-C. El análisis XPS mostró los picos esperados de C1s, N1s y O1 a $283,2$, $399,2$ y $531,6\text{ eV}$ respectivamente. La deconvolución de los espectros C1s generó 3 picos característicos $285,0$, $286,2$ y $287,8\text{ eV}$, correspondientes a estructura gráfica de tipo C-C/C=C, C-N/C-O y O-C=O, respectivamente. La deconvolución N1s mostró un pico a $399,4\text{ eV}$, que podría corresponder a grupos amina o amida. C1s mostró picos a $531,3$ y $532,6\text{ eV}$ que podrían corresponder a vibraciones C=O y C-O. La relación N/C resultó ser del $21,9\%$ y $22,6\%$ para la sCD y la gCD, respectivamente. Así pues, ambos CDs parecían estar dopadas con N y presentaban grupos hidrófilos en sus superficies. Los radios hidrodinámicos de las partículas purificadas fueron de 5 nm para las gCD y de 4 nm para las sCD. Las imágenes de TEM junto con análisis por transformada de Fourier de las imágenes demostraron que las gCDs tenían estructura cristalina. Mediante el uso de Zetasizer se determinó el potencial ζ de las dispersiones coloidales de las nanopartículas, con una media de $+9,54$ y $+9,92\text{ mV}$ para el sCD y el gCD. Las movilidades electroforéticas en agua desionizada fueron similares, siendo de $0,74$ y $0,77\text{ }\mu\text{m cm V}^{-1}\text{ s}^{-1}$, para la sCD y la gCD, respectivamente, y las conductividades fueron de $8,41$ y $5,2\text{ mS m}^{-1}$ para las respectivas nanopartículas gCD y sCD. Por último, los puntos isoeléctricos se situaron en pH $9,68$ y $8,93$, para la gCD y la sCD, respectivamente.

La unión del dsRNA a los CD se realizó a temperatura ambiente y se produjo rápidamente. El potencial ζ del nanocompuesto fue de $-7,7$ y $-14,0\text{ mV}$ para gCD-dsRNA y sCD-dsRNA frente a $-26,0\text{ mV}$ del dsRNA en agua. El tamaño del nanocompuesto resultó ser mayor (350 nm y 160 nm gCD-dsRNA y el sCD-dsRNA) que el de los precursores por separado (45 nm para el dsRNA). Además, se redujo la movilidad electroforética hacia el polo positivo en geles de agarosa cuando se incrementa la concentración de nanopartícula, indicando unión progresiva de las nanopartículas al dsRNA. Al contrario de lo que se había descrito con anterioridad, los CDs no confieren protección frente RNasa A al dsRNA.

Para evaluar la efectividad de los CDs en aplicaciones SIGS tratamos plantas de pepino con dsRNA desnudo (1X) o gCD-dsRNA (1X) y diluciones 1:10 (0,1X). Tres días después del tratamiento se lavaron las hojas y tomaron muestras para análisis por RT-qPCR de (ds)RNA largos y siRNA. El cálculo del $\Delta\Delta\text{Cq}$ mostró que el RNA específico era 50 veces mayor en muestras rociadas con gCD-dsRNA (1X) que en dsRNA (1X). Al rociar gCD-dsRNAs (0,1X) y dsRNA (1X) sin diluir sobre un grupo de plantas se observó que el (ds)RNA específico encontrado estaba en el mismo orden de magnitud. Cuantificamos por RT-qPCR los siRNA derivados del procesamiento del dsRNA por RNAi celular. Usando el

6125-vsiRNA descrito previamente. Observamos que los 6125-vsiARN eran 13,6 veces más abundantes en el conjunto de muestras rociadas con gCD-dsRNA (1X) que con dsRNA desnudo (1X). Además, el gCD-dsRNA diluido (0,1X) pudo producir en las hojas una cantidad de siRNA similar a la del dsRNA sin diluir (1X).

El movimiento sistémico se analizó mediante la detección y cuantificación de (ds)RNA y siRNA en hojas distales a las pulverizadas con los tratamientos. En este caso, el (ds)RNA detectado fue $1,2 \times 10^3$ veces mayor en las plantas rociadas con los gCD-dsRNA con respecto al dsRNA desnudo y 12,4 veces mayor en el caso de los siRNAs (6125-vsiRNA), derivados del RNAi celular. Al comparar los (ds)RNA y vsiRNA en sitios proximales y distales, se pudo observar que la cantidad de (ds)RNA y vsiRNA distales frente a locales eran dos y un orden de magnitud mayores, respectivamente, cuando el dsRNA estaba recubierto con los gCD que con el dsRNA desnudo, lo que sugiere que el dsRNA recubierto mejoraba el movimiento a larga distancia.

Con el fin de profundizar en la capacidad de gCD para mejorar la entrada del dsRNA en la planta, se marcó dsRNA con el fluorocromo FITC y se analizó mediante microscopía confocal. Después del tratamiento, las hojas se visualizaron directamente y tras un fuerte lavado. Como resultado, se observó una fuerte señal de fluorescencia en todos los tratamientos antes del lavado y sólo en las tratadas con gCD-dsRNA*FITC después del lavado, lo que indica que se penetró más dsRNA de forma más consistente. Además, las observaciones a mayor resolución mostraron que las señales de fluorescencia se acumulaban principalmente en el apoplasto o en las paredes celulares. Los gCDs cuando se iluminaron a 405 nm o longitudes de onda inferiores no se pudieron detectar, probablemente debido a su baja fluorescencia y rendimiento cuántico.

Los resultados obtenidos muestran como estos nuevos CDs pueden ser adyuvantes clave en las formulaciones RNAi aplicadas como vacunas en plantas, pues incrementan drásticamente la penetración y movilidad del dsRNA en las plantas, mejorando plausiblemente la efectividad de estas vacunas frente patógenos virales.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Discusión general

En la actualidad la agricultura se ve afectada por plagas y enfermedades que provocan la pérdida del 40% de las cosechas a nivel mundial. Específicamente, las enfermedades provocadas por virus de plantas se consideran como responsables en segundo lugar de estas pérdidas (De Ronde *et al.*, 2019). La entrada y aparición, cada vez más frecuente, de patógenos virales se debe a los cambios en el clima, el aumento del comercio global, la aparición de nuevos vectores, así como la extensión de las zonas de cultivo. En el caso de España se contabiliza la aparición de un virus nuevo cada dos años, como son el casos de CGMMV y ToLCNDV (Anderson *et al.*, 2004; Dombrovsky *et al.*, 2017). Por estos motivos, es fundamental la búsqueda de estrategias de rápido desarrollo que permitan reducir el enorme impacto generado por estos patógenos virales limitando las pérdidas económicas y aumentando la producción neta de los cultivos.

En este contexto, una de las estrategias con mayor potencial en el control de enfermedades virales es el RNAi, siendo el principal mecanismo de defensa natural frente a patógenos virales de las plantas. Desde que fue descrito en 1990, el RNAi ha ido ganando relevancia como herramienta alternativa a uso de pesticidas químicos y GMO (Dalmay *et al.*, 2000; Fire *et al.*, 1998). Está basado en el reconocimiento y procesado de moléculas de dsRNA, derivadas de la multiplicación viral, por el complejo enzimático DICER-RISC (Jin *et al.*, 2022). Por ello, imitando el mecanismo de defensa vegetal, mediante la aplicación de dsRNA homólogo viral se puede activar el RNAi, generando un estado de pre-inmunización que limite los efectos dañinos de estos virus (Tenllado *et al.*, 2004). De esta manera, las estrategias basadas en pulverización foliar de dsRNA o SIGS promueven el diseño de vacunas vegetales de forma dirigida y específica frente patógenos virales. El uso de estrategias SIGS está generando un enorme interés por su sencillez de aplicación y efectividad, convirtiéndose en una alternativa real al uso de mejora tradicional, GMO y pesticidas químicos en la agricultura.

En la presente tesis doctoral se ha diseñado, desarrollado y validado, por primera vez, el uso de vacunas de dsRNA de aplicación tópica frente a CGMMV y ToLCNDV, dos importantes virus patógenos de cucurbitáceas. Para ello, partimos con el diseño de dos nuevos vectores de expresión de dsRNA bacteriana capaces de producir dsRNA en cantidad y calidad (Capítulo II) y posteriormente realizamos la aplicación de tratamientos SIGS para alcanzar resistencia frente CGMMV y ToLCNDV en diferentes especies de cucurbitáceas (Capítulo III) y, con el fin de mejorar la penetración y movilidad del dsRNA en planta, sintetizamos un nuevo CDs capaz de movilizar con éxito el dsRNA al interior celular activando de forma efectiva la maquinaria del RNAi (Capítulo IV).

El diseño de vacunas vegetales en base a dsRNA debe ser planteado desde una perspectiva integral. Teniendo en cuenta todos los elementos que intervienen en el proceso: el tipo de dsRNA usado, los sistemas de expresión y purificación del dsRNA, la forma de aplicación, la dosis y número de dosis, los adyuvantes de la formulación, la época y estado

fisiológico de la planta, la variedad y resistencia natural de la planta, la fisiología y ciclo de vida viral, etc. (Fletcher *et al.*, 2020; Mitter *et al.*, 2017). Todo ello, con el fin de alcanzar mecanismos efectivos de control de patógenos virales que afectan a cultivos.

El diseño de vacunas de RNAi presenta ciertas limitaciones que deben ser resueltas, entre ellos el rango de tamaño de los dsRNAs aplicados. Zhang y colaboradores (2022) han propuesto que dsRNAs de, al menos, 29 pb son capaces de ejercer un efecto cruzado en organismos no diana, generando un efecto cruzado indeseado. Además, definen varias vías por las que el dsRNA es liberado por la planta y es accesible a otras especies, entre ellas: por generación de gotas de glutación, por ingestión de estas gotas de glutación, por secreciones de savia provocadas por heridas, exudados de las raíces y por alimentación directa de la planta pre-inmunizada. Aunque existen numerosos programas para el diseño de dsRNAs efectivos (OfftargetFinder, siRNAfinder, pssRNAitSVM, etc; Mat Jalaluddin *et al.*, 2023) cabe resaltar la importancia de evaluar la seguridad de cada uno de ellos con rigurosos protocolos evitando así efectos no deseados en organismos no diana. Otro de los inconvenientes en cuanto al diseño es la generación de métodos de producción de dsRNA capaz de solventar las necesidades de la agricultura industrial. Para hacer frente a esta limitación, nos propusimos desarrollar vectores de expresión bacteriana inducida y constitutiva de alta eficiencia para aplicaciones SIGS en laboratorio y campo (Capítulo II). Diversos autores se centraron en el uso de sistemas de producción *in vitro*, con grandes rendimientos de dsRNA y siRNA, pero asumiendo grandes costes que limitan su uso en aplicaciones masivas de laboratorio o de campo (Carbonell *et al.*, 2008; Konakalla *et al.*, 2016; Tenllado *et al.*, 2001). En nuestro caso nos decantamos por sistemas de producción bacteriana basados en *E. coli* HT115 (DE3) deficientes en Rnasa III, que permiten la producción de dsRNA, así como su almacenamiento en el citoplasma (Tenllado *et al.*, 2001). Los vectores de expresión diseñados fueron L4440-2XproD y puC-2XproD demostraron una alta eficiencia en la expresión inducida como constitutiva de dsRNA. Los resultados obtenidos nos permiten entender que L4440-2XproD es un vector de expresión idóneo para su uso en laboratorio con una producción óptima y las limitaciones en el uso de inductores son menores, generando un dsRNA en cantidad y calidad. El vector puC-2XproD, aunque menos productivo, es idóneo para uso en biorreactores a escala industrial debido a que evita el uso de inductores reduciendo los riesgos en contaminación y los costes de producción (Gilman y Love, 2016). Cabe resaltar la versatilidad natural de estos vectores de expresión bacteriana, ya que pueden ser incorporados en otros microorganismos. Así, incorporar L4440-2XproD o puC-2XproD a *E. coli* BL21 (DE3) podría duplicar la capacidad productiva neta de moléculas de dsRNA, según resultados obtenidos por Ma *et al.* (2020). Por todo ello, el uso de BL21 u otros sistemas de más alta eficiencia, permiten reducir de forma significativa los costes asociados a la producción de dsRNA, facilitando la producción a escala industrial. Por otra parte, algunas empresas como “GreenLight Biosciences” se han decantado por la producción *in vitro* de dsRNA para sus formulaciones (<https://www.greenlightbiosciences.com/>). Aseguran poder producir dsRNA en rangos de 2 dólares por gramo usando RNA polimerasas purificadas de

levaduras. De esta manera no solo son capaces de producir dsRNA de gran calidad, sino que reducen el efecto de las restricciones relacionadas con la producción en organismos transgénicos.

Otro aspecto a tener en cuenta en el diseño racional de vacunas vegetales es el tipo dsRNA usado como elicitador del RNAi. Algunos autores, como Schwarts y colaboradores (2020), usaron siRNA sintéticos con éxito para desencadenar silenciamiento efectivo en el gen GFP de *Nicotiana benthamiana* 16c. El uso de siRNA presenta grandes limitaciones de cara a una aplicación masiva, tanto en laboratorio como en campo, en los costes de producción y purificación debido al uso de kits comerciales (Dalakouras *et al.*, 2016; Demirer *et al.*, 2020; Voloudakis *et al.*, 2015). Esta limitación se ve suprimida con el uso de sistemas bacterianos para la producción de dsRNA, como se ha comentado anteriormente.

Lin y colaboradores (2012) plantearon el uso de dsRNA quiméricos compuesto por diferentes regiones homólogas a genes de WSNV, WMV y CGMMV induciendo resistencia a todos ellos. La aplicación de siRNA genera una respuesta muy efectiva a dosis bajas por dos motivos, el primero debido a que el siRNA es inductor directo del silenciamiento específico por RNAi y segundo, la aplicación de siRNA genera una amplificación masiva y específica por medio de RdDR (Demirer *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2012; Schwarts *et al.*, 2020). Así, la maquinaria de silenciamiento está centrada en un único siRNA al contrario que ocurre con el dsRNA. El uso de dsRNA largo diluye, aparentemente, la efectividad del RNAi. Cuando un dsRNA entra en la planta debe ser procesado por DICER-RISC antes de cumplir su función. Produciendo múltiples vlsiRNA con mayor o menor eficiencia en el silenciamiento que posteriormente serán amplificados en vlsiRNA secundario generando una dilución de la maquinaria del RNAi en los numerosos vlsiRNA, limitando la efectividad real de los vlsiRNA específicos (Dalakouras *et al.*, 2016; Mitter *et al.*, 2017; Tenllado *et al.*, 2004). La suma de estos dos conceptos abre la puerta a la generación y uso de dsRNAs largos derivados de la repetición en tándem de los siRNA generando moléculas más efectivas en aplicaciones SIGS. Pudiendo generar dsRNAs con un nivel de silenciamiento elevado usando métodos de producción bacterianos.

La extracción o purificación del dsRNAs es otro punto crítico. La síntesis *in vitro* de dsRNAs permite la obtención de un producto acabado sin la necesidad de purificaciones posteriores. La expresión bacteriana requiere de una extracción y purificación para poder ser usados en tratamientos SIGS encontrando aquí una importante restricción. Los protocolos usados en laboratorio se basan en el uso de fenol-cloroformo o productos comerciales (Trizol o Tiarizol) que son difíciles de escalar por su elevado coste (19 mil euros/gramo de dsRNA producido) y por la generación de gran cantidad de residuos tóxicos (Dalakouras *et al.*, 2020). Se pone de manifiesto la necesidad de métodos de purificación sencillos, escalables y respetuosos con el medio ambiente para hacer viable el uso

industrial de vacunas vegetales (Figueiredo Prates *et al.*, 2023). En estos momentos estamos evaluando la posibilidad de usar un protocolo libre de fenol-cloroformo que genera altos rendimientos ($\pm 8 \mu\text{g}$ de dsRNA total por ml de cultivo bacteriano inicial) basado en el uso de agentes no tóxicos y de bajo coste, óptimo para la producción de dsRNAs en laboratorio y a escala industrial y alcanzando un coste aproximado de 80 euros/gramo de dsRNAs (resultados no mostrados, patente en desarrollo). Este nuevo método permitirá el uso masivo de estrategias basadas en RNAi en laboratorio y por tanto acelerar en comprender los mecanismos detrás del RNAi.

La aplicación de vacunas vegetales debe tener en cuenta la biología tanto del virus objetivo como de la especie y variedad vegetal de la planta a la que se aplica (Dombrovsky *et al.*, 2017; Moreno *et al.*, 2004). Como se observa en el capítulo III, la aplicación de dsRNA libre genera alta protección frente a CGMMV en los experimentos llevados a cabo en primavera, reduciendo significativamente su efectividad cuando los experimentos se realizaron en verano cuando las temperaturas eran más altas y el virus se multiplica más eficientemente. Dado que existe una compleja coevolución entre los patógenos virales y sus hospedadores para evadir las defensas vegetales (Jin *et al.*, 2022; Pumplin *et al.*, 2013) que incluye los supresores virales del silenciamiento que actúan bloqueando la ruta RNAi a múltiples niveles dependiendo, entre otros factores, de las temperaturas óptimas de desarrollo viral (Atabekova *et al.*, 2023), debemos profundizar en el estudio del estado fisiológico vegetal más idóneo para realizar los tratamientos y que sea pre-inmunizada con éxito. Por otro lado, cuando tratamos de inducir resistencia frente a ToLCNDV aplicando dsRNA-AV1/BC1 foliar en plantas de calabacín no observamos efectos en el control de la enfermedad. Esto puede ser debido a dos motivos, el primero que el dsRNA seleccionado no genere una pre inmunización suficientemente elevada para generar protección y segundo, los sistemas de defensa vegetal frente al virus DNA están basado en RdDM y la eficiencia de estrategias SIGS se ve limitada. Algunos autores presentan resultados similares frente otros virus DNA demostrando que la efectividad en virus DNA de SIGS está limitada o influida por otros factores aún poco comprendidos (Rego-Machado *et al.*, 2020; Van Vu *et al.*, 2013). A la vista de los resultados, existe aún bastante margen de mejora a la hora de limitar la infección de virus DNA, ya que plantas transgénicas de tomate que expresan microRNAs específicos para ToLCNDV han demostrado incrementar su tolerancia frente a la enfermedad (Van Vu *et al.*, 2013).

Curiosamente, nuevas investigaciones han demostrado que la aplicación de dsRNA foliar desencadena respuestas mediadas por PTI, además de activar la ruta principal de RNAi. Lo citado anteriormente demuestra la acción coordinada de numerosos mecanismos de defensa simultáneos para hacer frente a las infecciones virales por parte de la planta. Huang y colaboradores (2022) describieron el efecto inductor del dsRNA en la deposición de callosa en plasmodesmos de plantas tratadas con dsRNA foliar. De esta manera el flujo célula-célula se ve reducido, limitando el movimiento de dsRNAs y siRNAs. Los virus por su parte son capaces de inhibir este efecto a través del uso de las proteínas de movimiento

aumentando su dispersión por la planta (Huang *et al.*, 2022). La activación de diversos sistemas de defensa simultáneos conduce al secuestro de los dsRNA, no estando tan disponibles para la maquinaria de RNAi, generando respuestas menos intensas y por ende menos efectivas. El uso de adyuvantes en las formulaciones podría reducir la disponibilidad de los dsRNAs en las rutas PTI, mejorando la disponibilidad para el RNAi (Fletcher *et al.*, 2020; Mitter *et al.*, 2017; Schwartz *et al.*, 2020).

La aplicación de dsRNA foliar adolece de una importante relación entre la cantidad capaz de penetrar las barreras y la efectividad del silenciamiento. Además, la baja estabilidad del dsRNA en la superficie de la planta, generada por su fácil degradación, conduce a una ventana reducida de tiempo donde la planta está pre-inmunizada frente al virus diana (Bennett *et al.*, 2020; Mitter *et al.*, 2017). Para resolver todas estas limitaciones se ha propuesto el uso de nanopartículas como adyuvantes en las formulaciones. Mitter y colaboradores (2017) aplicaron por primera vez nanopartículas LDH conjugado con dsRNA (Bioclay) para el control de CMV en judía (*Vigna unguiculata*). Estas LDH protegen el dsRNA de la degradación biótica y abiótica y generando una liberación sostenida en el tiempo, demostrando una activación del RNAi de al menos 20 dpa frente a los 5-7 dpa del dsRNA aplicado desnudo (Mitter *et al.*, 2017). Con estos resultados se pone de manifiesto la necesidad de mejorar las formulaciones de las vacunas vegetales, donde las nanopartículas de diversa naturaleza pueden jugar un papel clave (Schwartz *et al.*, 2020; Tenllado *et al.*, 2003; Uslu y Wassenegger, 2020).

Para que el dsRNA sea efectivo y active el RNAi debe llegar al interior celular y ser reconocido por el sistema DICER-RISC. En este contexto, se sintetizaron “carbon dots” (CDs), que son nanopartículas (NPs) fluorescentes de carbono capaces de favorecer la entrada y movimiento del dsRNA por la planta activando el RNAi de forma sostenida (Capítulo IV). Los resultados obtenidos mostraron como los CDs mejoran la penetración del dsRNA en el punto de tratamiento 50 X con respecto al dsRNA desnudo. Además, estudiando su movilidad en puntos distales al tratamiento con dsRNA-CD observamos un incremento de la presencia de dsRNA largos (1000 X) y siRNA (12,4 X) con respecto al dsRNA desnudo, por tanto, demostrando cómo el uso de CDs en las formulaciones de los tratamientos incrementa la movilidad del dsRNA por la planta haciéndola más accesible a la maquinaria del RNAi y permitiendo la reducción de las dosis necesarias o mejorar la eficiencia de las mismas. Las mejoras generadas por el uso de CDs en los tratamientos son debidas a sus excelentes propiedades físicas, el pequeño tamaño y la carga superficial (Schwartz *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). El pequeño tamaño (<10 nm) de los CDs permite evadir el tamaño de exclusión de la pared celular y atravesar la membrana plasmática por difusión. Por tanto, los CDs unidos al dsRNA facilitan el libre paso por las barreras celulares alcanzando en mayor grado el citoplasma celular y activando con mayor eficiencia el RNAi que el dsRNA libre (Schwartz *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022).

Los CPP o péptidos de penetración celular son pequeños péptidos menores de 30 aminoácidos que presentan carga positiva y alto contenido en aminoácidos básicos. Al igual que los CDs, son conocidos por tener una buena permeación en las células y son capaces de atravesar las membranas de las células (Zhang *et al.*, 2016). En los últimos años han adquirido mucha atención por la posibilidad de ser usados en entrega de diversos compuestos y fármacos al interior celular. Aunque su modo de acción no se comprende en su totalidad se sabe que depende en gran medida de su carga superficial y de su longitud. Las vías por las que los CPP entran al interior celular son dos principalmente, por endocitosis (captación activa o dependiente de la energía) o por translocación de membrana (captación directa/pasiva o independiente de la energía). De esta manera un mismo CPP puede actuar por la vía endocítica o translocación directa en función de la concentración aplicada (Pae *et al.*, 2014; Ruseska y Zimmer, 2020; Wang *et al.*, 2014). Las grandes similitudes en tamaño y fisicoquímica superficial entre CDs y CPP hace pensar que puedan favorecer la penetración celular del dsRNA por un mecanismo similar.

Una vez en el interior celular o en el interior de las endosomas los CDs pueden liberar el dsRNA unido por cambios de pH. Wong y colaboradores (2018) demostraron cómo partículas auto ensambladas (SaNP) eran capaces de responder a estímulos (cambios de pH) provocando la liberación del DNAP unido a ellas. De forma semejante los CDs liberan el dsRNA en el interior celular, siendo plenamente accesible a la maquinaria de RNAi. Por tanto, el uso de nano transportadores como los CDs, mejoran de forma significativa la entrada y movilidad del dsRNA en las células y por tanto permiten generar formulaciones de vacunas de dsRNA más efectivas.

El tipo de nanopartícula usada en las nano formulaciones se plantea desde dos perspectivas diferenciales. La primera basada en el concepto desarrollado por Mitter y colaboradores (2017) donde la partícula seleccionada debe cumplir dos funciones fundamentales: protección frente a degradación biótica o abiótica del dsRNA y liberación sostenida en el tiempo del dsRNA (Buchman *et al.*, 2019; Mitter *et al.*, 2017; Petrônio *et al.*, 2022). El uso de Bioclay (dsRNA-LDH) ha demostrado generar una protección frente a RNasa I del dsRNA y la liberación sostenida en el tiempo. La liberación temporal se lleva a cabo por medio de la degradación que sufre la nanopartícula por la acción del CO₂ ambiental y la radiación solar. Por todo ello, se consigue una activación de al menos 20 días del RNAi vegetal. El segundo concepto se basa en el uso de nanopartículas de pequeño tamaño, como CDs, que mantienen la integridad y favorecen la penetración del dsRNA a través de las barreras físicas de la hoja y célula (Chen *et al.*, 2016; Schwartz *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2016). A la hora de diseñar nuestra investigación nos decantamos por este segundo concepto ya que uno de los principales cuellos de botella en aplicaciones SIGS radica en la dosis de dsRNA que es capaz de penetrar y activar el RNAi. Como se ha comentado los CDs han demostrado generar una entrada significativamente mayor que el dsRNA libre, además debido a su pequeño tamaño y propiedades generan una entrada directa en las células y un movimiento sistémico mayor

que el dsRNA libre. Una forma de generar tratamientos SIGS más efectivos, de cara a una aplicación industrial, podría ser la unión de estas dos perspectivas de forma que se generen nano formulaciones capaces de favorecer una penetración y movilidad óptima del dsRNA, desde la aplicación, y que a su vez lo protejan de la degradación y liberen de forma sostenida en el tiempo. De esta manera, se genera en última instancia un sistema híbrido de alta eficiencia para el control de patógenos virales.

Como se ha descrito anteriormente, la respuesta antiviral es multifacética, se basa en el silenciamiento génico viral, pero no es la única ruta defensiva que las plantas poseen para hacer frente a patógenos virales. Actualmente se están desarrollando y aplicando formulados químicos que activan defensas vegetales diferentes a RNAi con buena capacidad protectora frente a infecciones virales. Uno de estos compuestos, denominados agentes de inmunidad vegetal, es el vanisulfano. Se trata de una molécula pequeña que actúa incrementando los niveles de SOD, CAT y POD, así como la expresión de genes de defensa relacionados con la vía de señalización del ácido abscísico (Huang *et al.*, 2023; Shi *et al.*, 2018). Se ha demostrado su actividad protectora frente a virus como el virus Y de la patata (PVY) y el virus del mosaico del pepino (CMV) (Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.* 2017). En base a esto, una posible implementación en vacunas de dsRNA sería el uso de vanisulfano, o similares, para inducir una respuesta antiviral de múltiples defensas, que conduzca a una resistencia sólida frente al virus. Bajo este contexto de respuesta antiviral multifacética, se plantea el uso de dsRNAs de doble acción. Generando un dsRNA mixto entre un dsRNA homólogo viral y un dsRNA que active o reprima genes de resistencia frente patógenos virales. La mejora genética clásica se basa en la búsqueda de resistencias genéticas naturales en las variedades de plantas con interés comercial. Esta área de investigación exige un vasto conocimiento de las bases genéticas de la resistencia en plantas y sus mecanismos de acción (Morrión *et al.*, 2020). Este conocimiento aplicado al diseño racional de dsRNAs capaces de modular la expresión de estos genes y a la vez activar el silenciamiento genético de los genes virales podría producir una activación multifactorial de las defensas vegetales dando lugar a un “priming” de los genes de resistencia y la pre-inmunización generada por el RNAi.

Como hemos visto, son múltiples las limitaciones que encontramos al tratar de desarrollar vacunas vegetales verdaderamente efectivas, las cuales requieren planteamientos innovadores con una visión holística. En la presente tesis doctoral se ha demostrado cómo los nuevos vectores de expresión bacteriana son una herramienta prometedora en obtención de cantidades industriales de dsRNA con aplicaciones en agricultura. La aplicación de dsRNA homólogos a genes de CGMMV ha demostrado que genera una fuerte resistencia frente CGMMV y que esta resistencia se ve limitada por las condiciones ambientales como el incremento de la temperatura, permitiendo entender mejor las condiciones de aplicación óptima de los tratamientos. Además, hemos desarrollado método de detección y cuantificación de dsRNA y siRNA en plantas, que nos permite evaluar la idoneidad de los diferentes tratamientos, dando lugar a una herramienta

muy útil en procesos de optimización de condiciones de las formulaciones. Entendiendo que la aplicación de dsRNA libre presenta grandes limitaciones de penetración celular a través de las barreras físicas de la hoja, sintetizamos un nuevo tipo de CDs. Nuestros CDs mejoraron significativamente la penetración y movilidad del dsRNA aplicado en tratamientos SIGS. El incremento de la disponibilidad del dsRNA por parte de la célula conlleva un incremento en la activación de la maquinaria enzimática del RNAi y por tanto una mejora en la eficiencia de control viral de las nuevas nano formulaciones.

Cabe destacar el largo camino al que aun debe someterse el uso de tratamientos SIGS basado en dsRNA y nanopartículas. Aún queda por comprender en profundidad los mecanismos de penetración y movimiento del dsRNA en la planta, los complejos sistemas de defensa vegetal y su regulación entre sí, la compleja relación entre el silenciamiento génico, la regulación del desarrollo y la respuesta antiviral, los mecanismos de acción de los supresores virales de silenciamiento, y un largo etc. Sólo alcanzando este nivel de comprensión podremos diseñar y desarrollar vacunas vegetales capaces de hacer frente a infecciones virales de una forma rápida, rentable y sostenible.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se exponen las siguientes conclusiones:

1. Los nuevos sistemas de expresión L4440-2XproD y pUC-2XproD, basados en el uso del promotor constitutivo proD, expresan de forma efectiva dsRNA en *Escherichia coli*. Proporcionan un método novedoso para la producción masiva de dsRNA de bajo coste y alta eficiencia que puede ser usado en condiciones de laboratorio o escala industrial en aplicaciones de RNAi.
2. Los extractos de dsRNA resultantes de la expresión bacteriana mostraron dsRNA de tamaños completo y una fracción de menor tamaño, resultado de síntesis incompletas de los dsRNA. Han demostrado ser efectivos en aplicaciones SIGS para el silenciamiento del gen GFP en *Nicotiana benthamiana* 16c.
3. La aplicación foliar de dsRNA-CP induce resistencia y reduce la carga viral, reduciendo el impacto de la enfermedad provocada por CGMMV en cultivos de *Cucumis sativus* en condiciones de invernadero. La efectividad de los tratamientos se ve condicionada por las altas temperaturas, debido a que son óptimas para el desarrollo de CGMMV.
4. DsRNAs homólogos a los genes AV1 y BC1 de ToLCNDV no indujeron resistencia en cultivos de *Cucurbita pepo*, siendo incapaz de activar los mecanismos de RNAi a un nivel efectivo.
5. Se ha puesto a punto un método de cuantificación directa de dsRNA y vsiRNA específicos. Este método es una herramienta sencilla y de fácil aplicación para comparación de procedimientos y formulaciones en la administración de dsRNA, siendo un elemento clave en el desarrollo de vacunas vegetales para el control de patógenos virales.
6. La síntesis hidrotermal de *carbon dots* (CDs), derivados de glucosa y polietilenimina (PEI), mostraron una carga positiva y N en su estructura resultado de la pasivación del PEI en la nanopartícula. Estos CDs mostraron ser efectivos para la encapsulación de dsRNA.
7. El uso de los nuevos CDs en las formulaciones para la administración de vacunas vegetales mejora significativamente la penetración y movilidad del dsRNA en planta, penetrando 50 veces más dsRNA que con el dsRNA desnudo. Además, el dsRNA del nanocompuesto se localizó sistémicamente 1000 veces más con respecto al dsRNA desnudo y aumentaron significativamente los siRNA derivados tanto local como sistémicamente.

Bibliografía

- Ai, L., Yang, Y., Wang, B., Chang, J., Tang, Z., Yang, B., & Lu, S. (2021). Insights into photoluminescence mechanisms of carbon dots: advances and perspectives. *Science Bulletin*, 66(8), 839-856.
- Ainsworth, G. C. (1935). Mosaic diseases of the cucumber. *Annals of Applied Biology*, 22(1), 55-67.
- Akbar, S., Wei, Y., & Zhang, M. Q. (2022). RNA interference: promising approach to combat plant viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5312.
- Álvarez-Sánchez, A. R., Romo-Quinones, C., Rosas-Quijano, R., Reyes, A. G., Barraza, A., Magallón-Barajas, F., ... & Mejía-Ruiz, C. H. (2018). Production of specific dsRNA against white spot syndrome virus in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Aquaculture Research*, 49(1), 480-491.
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in ecology & evolution*, 19(10), 535-544.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Maslenin, L., & Rosner, A. (2008). A new pathotype of Pepper mild mottle virus (PMMoV) overcomes the L 4 resistance genotype of pepper cultivars. *Plant Disease*, 92(7), 1033-1037.
- Antignus, Y., Pearlsman, M., Ben-Yoseph, R., & Cohen, S. (1990). Occurrence of a variant of cucumber green mottle mosaic virus in Israel. *Phytoparasitica*, 18, 50-56.
- Aronstein, K.; Pankiw, T.; Saldívar, E. SID-1 is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *J. Apicult. Res.* 2006, 45, 20–24.
- Arora, N., & Sharma, N. N. (2014). Arc discharge synthesis of carbon nanotubes: Comprehensive review. *Diamond and related materials*, 50, 135-150.
- Arsalani, N., Nezhad-Mokhtari, P., & Jabbari, E. (2019). Microwave-assisted and one-step synthesis of PEG passivated fluorescent carbon dots from gelatin as an efficient nanocarrier for methotrexate delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 540-547.
- Ashraf, M. F., Yang, S., Wu, R., Wang, Y., Hussain, A., Noman, A., ... & He, S. (2018). *Capsicum annuum* HsfB2a positively regulates the response to *Ralstonia solanacearum* infection or high temperature and high humidity forming transcriptional cascade with CaWRKY6 and CaWRKY40. *Plant and Cell Physiology*, 59(12), 2608-2623.
- Atabekova, A. K., Solovieva, A. D., Chergintsev, D. A., Solovyev, A. G., & Morozov, S. Y. (2023). Role of Plant Virus Movement Proteins in Suppression of Host RNAi Defense. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 9049.
- Baebler, Š., Witek, K., Petek, M., Stare, K., Tušek-Žnidarič, M., Pompe-Novak, M., ... & Hennig, J. (2014). Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. *Journal of experimental botany*, 65(4), 1095-1109.
- Bag, P., Maurya, R. K., Dadwal, A., Sarkar, M., Chawla, P. A., Narang, R. K., & Kumar, B. (2021). Recent Development in Synthesis of Carbon Dots from Natural Resources and Their Applications in Biomedicine and Multi-Sensing Platform. *ChemistrySelect*, 6(11), 2774-2789.
- Baudoin, W., Grafiadellis, M., Jimenez, R., La Malfa, G., Martínez-García, P.F., Monteiro, A. A., Nisen, A., Verloft, H., de Villele, O., Zabeltitz, V., Garnaud, J.C. (2002) El cultivo protegido en el clima mediterráneo. *Estudio FAO Producción y protección vegetal 90*. Ed: FAO. pp. 1-6;9-23; 201.
- Behi, M., Gholami, L., Naficy, S., Palomba, S., & Dehghani, F. (2022). Carbon dots: a novel platform for biomedical applications. *Nanoscale Advances*, 4(2), 353-376.
- Behr, J. P. (1997). The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*, 51(1-2), 34-34.
- Bello Pérez, A., González-Pérez, J. A., & Tello, J. C. (1997). La biofumigación como alternativa a la desinfección de suelos. *Hortic. Int.* 1997, 43, 41–43.
- Bennett, M., Deikman, J., Hendrix, B., & Iandolino, A. (2020). Barriers to efficient foliar uptake of dsRNA and molecular barriers to dsRNA activity in plant cells. *Frontiers in plant science*, 11, 816.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., & Fukuda, H. (2018). Salicylic acid and jasmonic acid pathways are activated in spatially different domains around the infection site during effector-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 59(1), 8-16.

- Bilir, Ö., Göll, D., Hong, Y., McDowell, J. M., & Tör, M. (2022). Small RNA-based plant protection against diseases. *Frontiers in Plant Science*, 2973.
- Boccardo, M., Sarazin, A., Thiebauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., & Colot, V. (2014). The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP-and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS pathogens*, 10(1), e1003883.
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324(5928), 742-744.
- Bologna, N. G., Iselin, R., Abriata, L. A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., ... & Voinnet, O. (2018). Nucleocytoplasmic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant microRNA pathway. *Molecular Cell*, 69(4), 709-719.
- Bonardi, V., Tang, S., Stallmann, A., Roberts, M., Cherkis, K., & Dangl, J. L. (2011). Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), 16463-16468.
- Bramlett, M., Plaetinck, G., & Maienfisch, P. (2020). RNA-based biocontrols—a new paradigm in crop protection. *Engineering*, 6(5), 522-527.
- Buchman, J. T., Elmer, W. H., Ma, C., Landy, K. M., White, J. C., & Haynes, C. L. (2019). Chitosan-Coated mesoporous silica nanoparticle treatment of *Citrullus lanatus* (watermelon): Enhanced fungal disease suppression and modulated expression of stress-related genes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(24), 19649-19659.
- Cadranel, A., Margraf, J. T., Strauss, V., Clark, T., & Guldi, D. M. (2019). Carbon nanodots for charge-transfer processes. *Accounts of chemical research*, 52(4), 955-963.
- Calvo, F. J. (2019). Evolución del control de plagas en la horticultura del sudeste español: papel del control biológico aumentativo. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (310), 96-101.
- Cao, L., Wang, X., Mezziani, M. J., Lu, F., Wang, H., Luo, P. G., ... & Sun, Y. P. (2007). Carbon dots for multiphoton bioimaging. *Journal of the American Chemical Society*, 129(37), 11318-11319.
- Cao, L. I., Mezziani, M. J., Sahu, S., & Sun, Y. P. (2013). Photoluminescence properties of graphene versus other carbon nanomaterials. *Accounts of chemical research*, 46(1), 171-180.
- Cao, X., Wang, J., Deng, W., Chen, J., Wang, Y., Zhou, J., ... & Xu, X. (2018). Photoluminescent cationic carbon dots as efficient non-viral delivery of plasmid SOX9 and chondrogenesis of fibroblasts. *Scientific reports*, 8(1), 7057.
- Cappelle, K., de Oliveira, C. F. R., Van Eynde, B., Christiaens, O., & Smaghe, G. (2016). The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect molecular biology*, 25(3), 315-323.
- Carbonell, A. (2017). Plant ARGONAUTES: features, functions, and unknowns. *Plant Argonaute Proteins: Methods and Protocols*, 1-21.
- Carbonell, A., & Carrington, J. C. (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current opinion in plant biology*, 27, 111-117.
- Carbonell, A., de Alba, Á. E. M., Flores, R., & Gago, S. (2008). Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology*, 371(1), 44-53.
- Cenik, E. S., Fukunaga, R., Lu, G., Dutcher, R., Wang, Y., Hall, T. M. T., & Zamore, P. D. (2011). Phosphate and R2D2 restrict the substrate specificity of Dicer-2, an ATP-driven ribonuclease. *Molecular cell*, 42(2), 172-184.
- Chellappan, P., Xia, J., Zhou, X., Gao, S., Zhang, X., Coutino, G., ... & Jin, H. (2010). siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic acids research*, 38(20), 6883-6894.
- Chen, J., Wang, Q., Zhou, J., Deng, W., Yu, Q., Cao, X., ... & Xu, X. (2017). Porphyra polysaccharide-derived carbon dots for non-viral co-delivery of different gene combinations and neuronal differentiation of ectodermal mesenchymal stem cells. *Nanoscale*, 9(30), 10820-10831.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual review of plant biology*, 70, 667-697.

- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). *Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response*. *Cell*, 124(4), 803-814.
- Crespo, O., Janssen, D., Robles, C., & Ruiz, L. (2018). *Resistance to Cucumber green mottle mosaic virus in Cucumis sativus*. *Euphytica*, 214(11), 201.
- Crespo, O., Robles, C., Ruiz, L., & Janssen, D. (2020). *Antagonism of Cucumber green mottle mosaic virus against Tomato leaf curl New Delhi virus in zucchini and cucumber*. *Annals of Applied Biology*, 176(2), 147-157.
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., Dadami, E., Ganopoulos, I., Pappas, M. L., & Papadopoulou, K. (2020). *Genetically modified organism-free RNA interference: exogenous application of RNA molecules in plants*. *Plant physiology*, 182(1), 38-50.
- Dalakouras, A., Wassenegger, M., McMillan, J. N., Cardoza, V., Maegle, I., Dadami, E., ... & Wassenegger, M. (2016). *Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of in vitro-synthesized small RNAs*. *Frontiers in plant science*, 7, 1327.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (2000). *An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus*. *Cell*, 101(5), 543-553.
- Dara, S. K. (2019). *The new integrated pest management paradigm for the modern age*. *Journal of Integrated Pest Management*, 10(1), 12.
- Darsan Singh, J. K., Mat Jalaluddin, N. S., Sanan-Mishra, N., & Harikrishna, J. A. (2019). *Genetic modification in Malaysia and India: current regulatory framework and the special case of non-transformative RNAi in agriculture*. *Plant cell reports*, 38, 1449-1463.
- Das, P. R., & Sherif, S. M. (2020). *Application of exogenous dsRNAs-induced RNAi in agriculture: Challenges and triumphs*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 946.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2006). *Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense*. *Science*, 313(5783), 68-71.
- Delgado-Martín, J., Delgado-Olidén, A., & Velasco, L. (2022). *Carbon dots boost dsRNA delivery in plants and increase local and systemic siRNA production*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5338.
- Delgado-Martín, J., Ruiz, L., Janssen, D., & Velasco, L. (2022). *Exogenous application of dsRNA for the control of viruses in cucurbits*. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Demirer, G. S., Zhang, H., Goh, N. S., Pinals, R. L., Chang, R., & Landry, M. P. (2020). *Carbon nanocarriers deliver siRNA to intact plant cells for efficient gene knockdown*. *Science advances*, 6(26), eaaz0495.
- Deng, J., Lu, Q., Mi, N., Li, H., Liu, M., Xu, M., ... & Yao, S. (2014). *Electrochemical synthesis of carbon nanodots directly from alcohols*. *Chemistry—A European Journal*, 20(17), 4993-4999.
- De Ronde, D., Lohuis, D., & Kormelink, R. (2019). *Identification and characterization of a new class of Tomato spotted wilt virus isolates that break Tsw-based resistance in a temperature-dependent manner*. *Plant Pathology*, 68(1), 60-71.
- De Schutter, K., Taning, C. N. T., Van Daele, L., Van Damme, E. J., Dubruiel, P., & Smaghe, G. (2022). *RNAi-based biocontrol products: Market status, regulatory aspects, and risk assessment*. *Frontiers in Insect Science*, 1.
- Dhaliwal, A. K., Mohan, A., Sidhu, G., Maqbool, R., & Gill, K. S. (2015). *An ethylmethane sulfonate mutant resource in pre-green revolution hexaploid wheat*. *PLoS one*, 10(12), e0145227.
- Ding, X., Niu, Y., Zhang, G., Xu, Y., & Li, J. (2020). *Electrochemistry in carbon-based quantum dots*. *Chemistry—An Asian Journal*, 15(8), 1214-1224.
- Dombrovsky, A., Tran-Nguyen, L. T., & Jones, R. A. (2017). *Cucumber green mottle mosaic virus: rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management*. *Annual review of phytopathology*, 55, 231-256.
- Duan, C. G., Zhang, H., Tang, K., Zhu, X., Qian, W., Hou, Y. J., ... & Zhu, J. K. (2015). *Specific but interdependent functions for Arabidopsis AGO 4 and AGO 6 in RNA-directed DNA methylation*. *The EMBO journal*, 34(5), 581-592.



- Edwards, C. H., Christie, C. R., Masotti, A., Celluzzi, A., Caporali, A., & Campbell, E. M. (2020). Dendrimer-coated carbon nanotubes deliver dsRNA and increase the efficacy of gene knockdown in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports*, 10(1), 12422.
- Eulgem, T., Weigman, V. J., Chang, H. S., McDowell, J. M., Holub, E. B., Glazebrook, J., ... & Dangl, J. L. (2004). Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. *Plant Physiology*, 135(2), 1129-1144.
- Fanelli, E., Di Vito, M., Jones, J. T., & De Giorgi, C. (2005). Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. *Gene*, 349, 87-95.
- Fang, X., & Qi, Y. (2016). RNAi in plants: an argonaute-centered view. *The Plant Cell*, 28(2), 272-285.
- Fei, X., Zhang, Y., Ding, L., Xiao, S., Xie, X., Li, Y., & Deng, X. (2021). Development of an RNAi-based microalgal larvicide for the control of *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 14, 1-11.
- Figueiredo Prates, L. H., Merlau, M., Rühl-Teichner, J., Schetelig, M. F., & Häcker, I. (2023). An Optimized/Scale Up-Ready Protocol for Extraction of Bacterially Produced dsRNA at Good Yield and Low Costs. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9266.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806-811.
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020). A perspective on RNAi-based biopesticides. *Frontiers in plant science*, 11, 51.
- Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular plant pathology*, 14(6), 635-649.
- Gan, D., Zhang, J., Jiang, H., Jiang, T., Zhu, S., & Cheng, B. (2010). Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. *Plant cell reports*, 29, 1261-1268.
- García-Raya, P., Ruiz-Olmos, C., Marín-Guirao, J. I., Asensio-Grima, C., Tello-Marquina, J. C., & de Cara-García, M. (2019). Greenhouse soil biosolarization with tomato plant debris as a unique fertilizer for tomato crops. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(2), 279.
- García-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J. S., Fahlgren, N., Gilbert, K. B., Takeda, A., ... & Carrington, J. C. (2015). Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during Turnip mosaic virus infection. *PLoS pathogens*, 11(3), e1004755.
- Gayen, B., Palchoudhury, S., & Chowdhury, J. (2019). Carbon dots: A mystic star in the world of nanoscience. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1-19.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.
- Georgakilas, V., Perman, J. A., Tucek, J., & Zboril, R. (2015). Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chemical reviews*, 115(11), 4744-4822.
- Geys, J., Nemmar, A., Verbeken, E., Smolders, E., Ratoi, M., Hoylaerts, M. F., ... & Hoet, P. H. (2008). Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. *Environmental health perspectives*, 116(12), 1607-1613.
- Ghosh, S., Ghosal, K., Mohammad, S. A., & Sarkar, K. (2019). Dendrimer functionalized carbon quantum dot for selective detection of breast cancer and gene therapy. *Chemical Engineering Journal*, 373, 468-484.
- Gilman, J., & Love, J. (2016). Synthetic promoter design for new microbial chassis. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 731-737.
- Golestanipour, A., Nikkhah, M., Aalami, A., & Hosseinkhani, S. (2018). Gene delivery to tobacco root cells with single-walled carbon nanotubes and cell-penetrating fusogenic peptides. *Molecular biotechnology*, 60, 863-878.
- Guo, Y., Dong, Y., Xu, C., Xie, Q., Xie, Y., Xia, Z., ... & Wu, Y. (2020). Novel combined biological antiviral agents Cytosinepeptidomycin and Chitosan oligosaccharide induced host resistance and changed movement protein subcellular localization of tobacco mosaic virus. *Pesticide biochemistry and physiology*, 164, 40-46.
- Guo, Z., Li, Y., & Ding, S. W. (2019). Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nature Reviews Immunology*, 19(1), 31-44.

- Gurusamy, D., Mogilicherla, K., & Palli, S. R. (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), e21677.
- Han, J., & Na, K. (2019). Transfection of the TRAIL gene into human mesenchymal stem cells using biocompatible polyethyleneimine carbon dots for cancer gene therapy. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 80, 722-728.
- Harvey, J. J., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. P., & Baulcombe, D. C. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PloS one*, 6(1), e14639.
- He, P., Shan, L., & Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular microbiology*, 9(6), 1385-1396.
- Heimpel, G. E., & Cock, M. J. (2018). Shifting paradigms in the history of classical biological control. *BioControl*, 63, 27-37.
- Hsu, P. C., & Chang, H. T. (2012). Synthesis of high-quality carbon nanodots from hydrophilic compounds: role of functional groups. *Chemical communications*, 48(33), 3984-3986.
- Hsu, P. C., Shih, Z. Y., Lee, C. H., & Chang, H. T. (2012). Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots. *Green Chemistry*, 14(4), 917-920.
- Hu, S., Guo, Y., & Tian, R. (2011, July). Synthesis and size control of carbon quantum dots by tailoring laser parameters. In *Proceedings of 2011 International Conference on Electronics and Optoelectronics (Vol. 2, pp. V2-283)*. IEEE..
- Huang, C., Sede, A. R., Elvira-González, L., Yan, Y., Rodriguez, M., Mutterer, J., ... & Heinlein, M. (2022). dsRNA-induced immunity targets plasmodesmata and is suppressed by viral movement proteins. *bioRxiv*, 2022-11.
- Huang, C. Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., & Jin, H. (2019). Small RNAs—big players in plant-microbe interactions. *Cell host & microbe*, 26(2), 173-182.
- Huang, M., Wu, Z., Li, J., Ding, Y., Chen, S., & Li, X. (2023). Plant Protection against Viruses: An Integrated Review of Plant Immunity Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4453.
- Hui, S. (2023). Carbon dots (CDs): basics, recent potential biomedical applications, challenges, and future perspectives. *Journal of Nanoparticle Research*, 25(4), 68.
- Hussain, A., Li, X., Weng, Y., Liu, Z., Ashraf, M. F., Noman, A., ... & He, S. (2018). CaWRKY22 acts as a positive regulator in pepper response to *Ralstonia solanacearum* by constituting networks with CaWRKY6, CaWRKY27, CaWRKY40, and CaWRKY58. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1426.
- Ishibashi, K., & Ishikawa, M. (2016). Replication of tobamovirus RNA. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 55-78.
- Ismail, N. S., Husain, U. S., Selvan, S. I. S., Mordani, N. A., Juhari, N., & Halim, N. H. A. (2020, January). Effect of heating power towards synthesis of carbon dots through microwave pyrolysis method for optical-based biosensor. In *AIP Conference Proceedings (Vol. 2203, No. 1, p. 020057)*. AIP Publishing LLC.
- Jiang, K., Wang, Y., Gao, X., Cai, C., & Lin, H. (2018). Facile, quick, and gram-scale synthesis of ultralong-lifetime room-temperature-phosphorescent carbon dots by microwave irradiation. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(21), 6216-6220.
- Jin, L., Chen, M., Xiang, M., & Guo, Z. (2022). RNAi-based antiviral innate immunity in plants. *Viruses*, 14(2), 432.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Jones, R. A., & Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual review of virology*, 6, 387-409.
- Kakiyama, S.; Tabara, M.; Nishibori, Y.; Moriyama, H.; Fukuhara, T. Long DCL4-substrate dsRNAs efficiently induce RNA interference in plant cells. *Sci. Rep.* 2019, 9, 6920.
- Kaldis, A., Berbati, M., Melita, O., Reppa, C., Holeva, M., Otten, P., & 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.



- Kang, Y. F., Li, Y. H., Fang, Y. W., Xu, Y., Wei, X. M., & Yin, X. B. (2015). Carbon quantum dots for zebrafish fluorescence imaging. *Scientific reports*, 5(1), 11835.
- Kashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International journal of biological macromolecules*, 77, 36-51.
- Killiny, N., Hajeri, S., Tiwari, S., Gowda, S., & Stelinski, L. L. (2014). Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PloS one*, 9(10), e110536.
- Kim, H. J., Takemoto, H., Yi, Y., Zheng, M., Maeda, Y., Chaya, H., ... & Kataoka, K. (2014). Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS nano*, 8(9), 8979-8991.
- Kirkegaard, J.A.; Gardner, P.A.; Desmarchelier, J.M.; Angus, J.F. Biofumigation-using Brassica species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. In *Proceedings of the 9th Australian Research Assembly on Brassica*, Wagga Wagga, Australia, 5–7 October 1993; Volume 1, pp. 77–82.
- Konakalla, N. C., Kaldis, A., Berbati, M., Masarapu, H., & Voloudakis, A. E. (2016). Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco. *Planta*, 244, 961-969.
- Kozielski, K. L., Tzeng, S. Y., & Green, J. J. (2013). Bioengineered nanoparticles for siRNA delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(5), 449-468.
- Kulye, M., Liu, H. U. A., Zhang, Y., Zeng, H., Yang, X., & Qiu, D. (2012). Hrip1, a novel protein elicitor from necrotrophic fungus, *Alternaria tenuissima*, elicits cell death, expression of defence-related genes and systemic acquired resistance in tobacco. *Plant, cell & environment*, 35(12), 2104-2120.
- Kørner, C. J., Klausner, D., Niehl, A., Domínguez-Ferrerías, A., Chinchilla, D., Boller, T., ... & Hann, D. R. (2013). The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(11), 1271-1280.
- Laisney, J., Gurusamy, D., Baddar, Z. E., Palli, S. R., & Unrine, J. M. (2020). RNAi in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells via nanomaterial mediated delivery of dsRNA: a comparison of poly-l-arginine polyplexes and poly-l-arginine-functionalized Au nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 12(23), 25645-25657.
- Lakshmanan, M., Yoshizumi, T., Sudesh, K., Kodama, Y., & Numata, K. (2015). Double-stranded DNA introduction into intact plants using peptide–DNA complexes. *Plant Biotechnology*, 32(1), 39-45.
- Lau, S. E., Mazumdar, P., Hee, T. W., Song, A. L. A., Othman, R. Y., & Harikrishna, J. A. (2014). Crude extracts of bacterially-expressed dsRNA protect orchid plants against *Cymbidium mosaic virus* during transplantation from in vitro culture. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(5), 569-576.
- Lefevre, P., & Moriones, E. (2015). Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies. *Current Opinion in Virology*, 10, 14-19.
- Li, H., Kang, Z., Liu, Y., & Lee, S. T. (2012). Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. *Journal of materials chemistry*, 22(46), 24230-24253.
- Li, R., Wei, F., Wu, X., Zhou, P., Chen, Q., Cen, Y., ... & Hu, Q. (2021). PEI modified orange emissive carbon dots with excitation-independent fluorescence emission for cellular imaging and siRNA delivery. *Carbon*, 177, 403-411.
- Li, S., Zhang, Z., Zhou, C., & Li, S. (2021). RNA-dependent RNA polymerase 1 delays the accumulation of viroids in infected plants. *Molecular Plant Pathology*, 22(10), 1195-1208.
- Li, Z., Du, Z., Tang, Y., She, X., Wang, X., Zhu, Y., ... & He, Z. (2020). C4, the pathogenic determinant of tomato leaf curl Guangdong virus, may suppress post-transcriptional gene silencing by interacting with BAMI protein. *Frontiers in Microbiology*, 11, 851.
- Lichtenberg, S. S., Tsyusko, O. V., Palli, S. R., & Unrine, J. M. (2019). Uptake and bioactivity of chitosan/double-stranded RNA polyplex nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & technology*, 53(7), 3832-3840.
- Liu, M. L., Chen, B. B., Li, C. M., & Huang, C. Z. (2019). Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green chemistry*, 21(3), 449-471.

- Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., Shi, X., Xiao, Z., Lin, J., & Fang, X. (2009). Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano letters*, 9(3), 1007-1010.
- Liu, W., Diao, H., Chang, H., Wang, H., Li, T., & Wei, W. (2017). Green synthesis of carbon dots from rose-heart radish and application for Fe³⁺ detection and cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 190-198.
- Liu, X., Jin, X., Deng, H., Sha, Z., & Zhou, X. (2021). Formation of nitrogen-doped blue-and green-emitting fluorescent carbon dots via a one-step solid-phase pyrolysis. *Journal of Nanoparticle Research*, 23, 1-17.
- Liu, X., Zhou, X., Zhou, L., Hu, J., & Guo, K. (2022). Application of RNA Interference in the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (181), e63645.
- Loebenstein, G., & Katis, N. (Eds.). (2014). *Control of plant virus diseases: seed-propagated crops*. Academic Press.
- López, C., Ferriol, M., & Picó, M. B. (2015). Mechanical transmission of Tomato leaf curl New Delhi virus to cucurbit germplasm: selection of tolerance sources in *Cucumis melo*. *Euphytica*, 204, 679-691.
- Lu, F., Wu, S. H., Hung, Y., & Mou, C. Y. (2009). Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 5(12), 1408-1413.
- Luo, T. Y., He, X., Zhang, J., Chen, P., Liu, Y. H., Wang, H. J., & Yu, X. Q. (2018). Photoluminescent F-doped carbon dots prepared by ring-opening reaction for gene delivery and cell imaging. *RSC advances*, 8(11), 6053-6062.
- Ma, C. A., Yin, C., Fan, Y., Yang, X., & Zhou, X. (2019). Highly efficient synthesis of N-doped carbon dots with excellent stability through pyrolysis method. *Journal of Materials Science*, 54(13), 9372-9384.
- Ma, Z. Z., Zhou, H., Wei, Y. L., Yan, S., & Shen, J. (2020). A novel plasmid-*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing. *Pest management science*, 76(7), 2505-2512.
- Manley, R., Boots, M., & Wilfert, L. (2015). Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 331-340.
- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2006). The evolution and diversification of *Dicers* in plants. *FEBS letters*, 580(10), 2442-2450.
- Mat Jalaluddin, N. S., Asem, M., Harikrishna, J. A., & Ahmad Fuaad, A. A. H. (2023). Recent Progress on Nanocarriers for Topical-Mediated RNAi Strategies for Crop Protection—A Review. *Molecules*, 28(6), 2700.
- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, 15(6), 394-408.
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349.
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., ... & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature plants*, 3(2), 1-10.
- Moreno, I. M., Thompson, J. R., & García-Arenal, F. (2004). Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *Journal of General Virology*, 85(3), 749-759.
- Moreno-Pérez, M. G., García-Luque, I., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2016). Mutations that determine resistance breaking in a plant RNA virus have pleiotropic effects on its fitness that depend on the host environment and on the type, single or mixed, of infection. *Journal of virology*, 90(20), 9128-9137.
- Morrion, E., Diaz-Pendo, J.A.(2020). Control de virus de plantas. *Fitopatología, publicación oficial de la sociedad española de fitopatología*. 5, 6-11.
- Mosa, M. A., & Youssef, K. (2021). Topical delivery of host induced RNAi silencing by layered double hydroxide nanosheets: An efficient tool to decipher pathogenicity gene function of *Fusarium crown and root rot* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101684.
- Nakazawa, Y.; Hiraguri, A.; Moriyama, H.; Fukuhara, T. The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway. *Plant Mol. Biol.* 2007, 63, 777-785.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.



- Nayak, A., Tassetto, M., Kunitomi, M., & Andino, R. (2013). RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in invertebrates. *Intrinsic Immunity*, 183-200.
- Nelson, R., Wiesner-Hanks, T., Wisser, R., & Balint-Kurti, P. (2018). Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics*, 19(1), 21-33.
- Nie, X., Jiang, C., Wu, S., Chen, W., Lv, P., Wang, Q., ... & Wei, Q. (2020). Carbon quantum dots: A bright future as photosensitizers for in vitro antibacterial photodynamic inactivation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 206, 111864.
- Niehl, A., Soininen, M., Poranen, M. M., & Heinlein, M. (2018). Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. *Plant biotechnology journal*, 16(9), 1679-1687.
- Niehl, A., Wyrusch, I., Boller, T., & Heinlein, M. (2016). Double-stranded RNA s induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytologist*, 211(3), 1008-1019.
- Nitnavare, R. B., Bhattacharya, J., Singh, S., Kour, A., Hawkesford, M. J., & Arora, N. (2021). Next generation dsRNA-based insect control: Success so far and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 2310.
- Niu, D., Hamby, R., Sanchez, J. N., Cai, Q., Yan, Q., & Jin, H. (2021). RNAs—A new frontier in crop protection. *Current opinion in biotechnology*, 70, 204-212.
- Noman, A., Aqeel, M., & Lou, Y. (2019). PRRs and NB-LRRs: from signal perception to activation of plant innate immunity. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1882.
- Noman, A., Hussain, A., Ashraf, M. F., Khan, M. I., Liu, Z., & He, S. (2019). CabZIP53 is targeted by CaWRKY40 and act as positive regulator in pepper defense against *Ralstonia solanacearum* and thermotolerance. *Environmental and experimental botany*, 159, 138-148.
- Numata, K., Ohtani, M., Yoshizumi, T., Demura, T., & Kodama, Y. (2014). Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. *Plant biotechnology journal*, 12(8), 1027-1034.
- OECD. *Considerations for the Environmental Risk Assessment of the Application of Sprayed or Externally Applied ds-RNA-Based Pesticides*; OECD: Paris, France, 2020.
- Owens, R. A., Tech, K. B., Shao, J. Y., Sano, T., & Baker, C. J. (2012). Global analysis of tomato gene expression during Potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(4), 582-598.
- Pacher, M., & Puchta, H. (2017). From classical mutagenesis to nuclease-based breeding—directing natural DNA repair for a natural end-product. *The Plant Journal*, 90(4), 819-833.
- Padidam, M., Beachy, R. N., & Fauquet, C. M. (1996). The role of AV2 (“precoat”) and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, 224(2), 390-404.
- Pae, J., Säälik, P., Liivamägi, L., Lubenets, D., Arukuusk, P., Langel, Ü., & Pooga, M. (2014). Translocation of cell-penetrating peptides across the plasma membrane is controlled by cholesterol and microenvironment created by membranous proteins. *Journal of Controlled Release*, 192, 103-113.
- Página oficial Ministerio de agricultura, pesca y alimentación del gobierno de España. (2023, 3 de marzo) Nueva normativa en sanidad vegetal. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/nueva-normativa/>
- Pérez A., Martín E., Giménez M., Fernández MM., Gómez, J. (2015). Eficacia de la solarización y biosolarización en cultivos enarenados contra patógenos fúngicos de suelo. *Actas del XIII Congreso de SEAE: “Sistemas Alimentarios Agroecológicos y Cambio Climático”*. ISBN: 978-84-946563-8-5.
- Petrônio, M. S., Barros-Alexandrino, T. T., Lima, A. M., Assis, O. B., INOUE-NAGATA, A. K., Nakasu, E. Y., ... & Pilon, L. (2022). Physicochemical and toxicity investigation of chitosan-based dsRNA nanocarrier formation.
- Price, A. A., Sampson, T. R., Ratner, H. K., Grakoui, A., & Weiss, D. S. (2015). Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), 6164-6169.
- Pugsley, C. E., Isaac, R. E., Warren, N. J., & Cayre, O. J. (2021). Recent advances in engineered nanoparticles for RNAi-mediated crop protection against insect pests. *Frontiers in Agronomy*, 3, 652981.
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745-760.
- Qi, T., Guo, J., Peng, H., Liu, P., Kang, Z., & Guo, J. (2019). Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of wheat and barley. *International journal of molecular sciences*, 20(1), 206.

- Qin, H.; Chen, F.; Huan, X.; Machida, S.; Song, J.; Yuan, Y.A. Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein–protein interaction. *RNA* 2010, 16, 474–481.
- Qu, D., & Sun, Z. (2020). The formation mechanism and fluorophores of carbon dots synthesized via a bottom-up route. *Materials Chemistry Frontiers*, 4(2), 400-420.
- Raja, P., Jackel, J. N., Li, S., Heard, I. M., & Bisaro, D. M. (2014). *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *Journal of virology*, 88(5), 2611-2622.
- Rajamony, L., More, T. A., Seshadri, V. S., & Varma, A. (1990). Reaction of muskmelon collections to cucumber green mottle mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, 129(3), 237-244.
- Ramesh, S. V., Yogindran, S., Gnanasekaran, P., Chakraborty, S., Winter, S., & Pappu, H. R. (2021). Virus and viroid-derived small RNAs as modulators of host gene expression: molecular insights into pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3170.
- Ramkumar, T. R., Lenka, S. K., Arya, S. S., & Bansal, K. C. (2020). A short history and perspectives on plant genetic transformation. *Biolistic DNA delivery in plants: methods and protocols*, 39-68.
- Rego-Machado, C. M., Nakasu, E. Y., Silva, J. M., Lucinda, N., Nagata, T., & Inoue-Nagata, A. K. (2020). siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants. *Scientific Reports*, 10(1), 22277.
- Reingold, V., Lachman, O., Belausov, E., Koren, A., Mor, N., & Dombrovsky, A. (2016). Epidemiological study of Cucumber green mottle mosaic virus in greenhouses enables reduction of disease damage in cucurbit production. *Annals of Applied Biology*, 168(1), 29-40.
- Romeis, J., & Widmer, F. (2020). Assessing the risks of topically applied dsRNA-based products to non-target arthropods. *Frontiers in plant science*, 11, 679..
- Ronald, P. C., & Shirasu, K. (2012). Front-runners in plant-microbe interactions. *Current opinion in plant biology*, 15(4), 345-348.
- Ruseska, I., & Zimmer, A. (2020). Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11(1), 101-123.
- Šafářová, D., Brazda, P., & Navrátil, M. (2014). Effect of artificial dsRNA on infection of pea plants by pea seed-borne mosaic virus. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(2), 105-108.
- Samarskaya, V. O., Spechenkova, N., Markin, N., Suprunova, T. P., Zavriev, S. K., Love, A. J., ... & Taliansky, M. (2022). Impact of exogenous application of Potato Virus Y-specific dsRNA on RNA interference, pattern-triggered immunity and poly (ADP-ribose) metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7915.
- Schönherr, J., & Bukovac, M. J. (1972). Penetration of stomata by liquids: dependence on surface tension, wettability, and stomatal morphology. *Plant Physiology*, 49(5), 813-819.
- Schwartz, S. H., Hendrix, B., Hoffer, P., Sanders, R. A., & Zheng, W. (2020). Carbon dots for efficient small interfering RNA delivery and gene silencing in plants. *Plant physiology*, 184(2), 647-657.
- Seal, S. E., VandenBosch, F., & Jeger, M. J. (2006). Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical reviews in plant sciences*, 25(1), 23-46.
- Serag, M. F., Kaji, N., Gaillard, C., Okamoto, Y., Terasaka, K., Jabasini, M., ... & Baba, Y. (2011). Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. *ACS nano*, 5(1), 493-499.
- Shargil, D., Zemach, H., Belausov, E., Lachman, O., Kamenetsky, R., & Dombrovsky, A. (2015). Development of a fluorescent in situ hybridization (FISH) technique for visualizing CGMMV in plant tissues. *Journal of virological methods*, 223, 55-60.
- Sharma, A., & Das, J. (2019). Small molecules derived carbon dots: synthesis and applications in sensing, catalysis, imaging, and biomedicine. *Journal of nanobiotechnology*, 17(1), 1-24.
- Shen, W., Yang, G., Chen, Y., Yan, P., Tuo, D., Li, X., & Zhou, P. (2014). Resistance of non-transgenic papaya plants to papaya ringspot virus (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. *Acta virologica*, 58(3), 261-266.

- Shi, J., Yu, L., & Song, B. (2018). Proteomics analysis of Xiangcaoliusuobingmi-treated *Capsicum annuum* L. infected with Cucumber mosaic virus. *Pesticide biochemistry and physiology*, 149, 113-122.
- Shi, W., Wang, Q., Long, Y., Cheng, Z., Chen, S., Zheng, H., & Huang, Y. (2011). Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. *Chemical Communications*, 47(23), 6695-6697.
- Shim, C. K., Lee, J. H., Hong, S. M., Han, K. S., & Kim, H. K. (2006). Construction of antibodies for detection and diagnosis of Cucumber green mottle mosaic virus from watermelon plants. *The Plant Pathology Journal*, 22(1), 21-27.
- Silva-Martins, G., Bolaji, A., & Moffett, P. (2020). What does it take to be antiviral? An Argonaute-centered perspective on plant antiviral defense. *Journal of Experimental Botany*, 71(20), 6197-6210.
- Smith, K. M. (1937). A textbook of plant virus diseases. *A textbook of plant virus diseases*.
- Stanley, J. (1985). The molecular biology of geminiviruses. *Advances in Virus Research*, 30, 139-177.
- Stroud, H., Greenberg, M. V., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., & Jacobsen, S. E. (2013). Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell*, 152(1-2), 352-364.
- Sun, Y. P., Zhou, B., Lin, Y., Wang, W., Fernando, K. S., Pathak, P., ... & Xie, S. Y. (2006). Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *Journal of the American Chemical Society*, 128(24), 7756-7757.
- Tan, S. H., Nishiguchi, M., Murata, M., & Motoyoshi, F. (2000). The genome structure of kyuri green mottle mosaic tobamovirus and its comparison with that of cucumber green mottle mosaic tobamovirus. *Archives of Virology*, 145, 1067-1079.
- Tang, L., Ji, R., Li, X., Bai, G., Liu, C. P., Hao, J., ... & Lau, S. P. (2014). Deep ultraviolet to near-infrared emission and photoresponse in layered N-doped graphene quantum dots. *ACS nano*, 8(6), 6312-6320.
- Tena, G., Boudsocq, M., & Sheen, J. (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current opinion in plant biology*, 14(5), 519-529.
- Tenllado, F., & Diaz-Ruiz, J. R. (2001). Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of virology*, 75(24), 12288-12297.
- Tenllado, F., Llave, C., & Díaz-Ruiz, J. R. (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus research*, 102(1), 85-96.
- Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M., & Díaz-Ruiz, J. R. (2003). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC biotechnology*, 3, 1-11.
- Thagun, C., Chuah, J. A., & Numata, K. (2019). Targeted gene delivery into various plastids mediated by clustered cell-penetrating and chloroplast-targeting peptides. *Advanced Science*, 6(23), 1902064.
- Tian, X. T., & Yin, X. B. (2019). Carbon dots, unconventional preparation strategies, and applications beyond photoluminescence. *Small*, 15(48), 1901803.
- Tuerhong, M., Yang, X. U., & Xue-Bo, Y. I. N. (2017). Review on carbon dots and their applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45(1), 139-150.
- US-EPA. *White Paper on RNAi Technology as a Pesticide: Problem Formulation for Human Health and Ecological Risk Assessment*; US-EPA: Washington, DC, USA, 2013.
- Uslu, V. V., & Wassenegger, M. (2020). Critical view on RNA silencing-mediated virus resistance using exogenously applied RNA. *Current Opinion in Virology*, 42, 18-24.
- Van Vu, T., Choudhury, N. R., & Mukherjee, S. K. (2013). Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, Tomato leaf curl New Delhi virus, show tolerance to virus infection. *Virus Research*, 172(1-2), 35-45.
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J. K., ... & Martin, D. P. (2014). Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: *Becurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. *Archives of virology*, 159, 2193-2203.
- Vasudeva, R. S., & Sam Raj, J. (1948). A leaf-curl disease of tomato. *Phytopathology*, 38(5).
- Velasco, L., Ruiz, L., Galipienso, L., Rubio, L., & Janssen, D. (2020). A historical account of viruses in intensive horticultural crops in the Spanish mediterranean arc: New challenges for a sustainable agriculture. *Agronomy*, 10(6), 860.

- Voloudakis, A. E., Holeva, M. C., Sarin, L. P., Bamford, D. H., Vargas, M., Poranen, M. M., & Tenllado, F. (2015). Efficient double-stranded RNA production methods for utilization in plant virus control. *Plant Virology Protocols: New Approaches to Detect Viruses and Host Responses*, 255-274.
- Wang, B., & Lu, S. (2022). The light of carbon dots: From mechanism to applications. *Matter*, 5(1), 110-149.
- Wang, B., Huang, J., Zhang, M., Wang, Y., Wang, H., Ma, Y., ... & Kang, Z. (2020). Carbon dots enable efficient delivery of functional DNA in plants. *ACS applied bio materials*, 3(12), 8857-8864.
- Wang, B., Yu, J., Sui, L., Zhu, S., Tang, Z., Yang, B., & Lu, S. (2021). Rational design of multi-color-emissive carbon dots in a single reaction system by hydrothermal. *Advanced Science*, 8(1), 2001453.
- Wang, C. I., Wu, W. C., Periasamy, A. P., & Chang, H. T. (2014). Electrochemical synthesis of photoluminescent carbon nanodots from glycine for highly sensitive detection of hemoglobin. *Green Chemistry*, 16(5), 2509-2514.
- Wang, D., Wang, Z., Zhan, Q., Pu, Y., Wang, J. X., Foster, N. R., & Dai, L. (2017). Facile and scalable preparation of fluorescent carbon dots for multifunctional applications. *Engineering*, 3(3), 402-408.
- Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S., & Jin, F. (2014). Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *Journal of Controlled Release*, 174, 126-136.
- Wang, H., Gong, L., Qi, J., Hu, M., Zhong, G., & Gong, L. (2014). Molecular cloning and characterization of a SID-1-like gene in *Plutella xylostella*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 87(3), 164-176.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P., Huang, H. D., & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature plants*, 2(10), 1-10.
- Wang, R., Lu, K. Q., Tang, Z. R., & Xu, Y. J. (2017). Recent progress in carbon quantum dots: synthesis, properties and applications in photocatalysis. *Journal of Materials Chemistry A*, 5(8), 3717-3734.
- Wang, Y., Dang, F., Liu, Z., Wang, X., Eulgem, T., Lai, Y., ... & He, S. (2013). C a WRKY 58, encoding a group I WRKY transcription factor of *C. annuum*, negatively regulates resistance to *R. solanacearum* infection. *Molecular plant pathology*, 14(2), 131-144.
- Wang, Y., He, F., Wu, S., Luo, Y., Wu, R., Hu, D., & Song, B. (2020). Design, synthesis, anti-TMV activity, and preliminary mechanism of cinnamic acid derivatives containing dithioacetal moiety. *Pesticide biochemistry and physiology*, 164, 115-121.
- Wei, W., Xu, C., Wu, L., Wang, J., Ren, J., & Qu, X. (2014). Non-enzymatic-browning-reaction: a versatile route for production of nitrogen-doped carbon dots with tunable multicolor luminescent display. *Scientific reports*, 4(1), 1-7.
- Whitfield, R., Anastasaki, A., Truong, N. P., Cook, A. B., Omedes-Pujol, M., Loczenski Rose, V., ... & Haddleton, D. M. (2018). Efficient binding, protection, and self-release of dsRNA in soil by linear and star cationic polymers. *ACS Macro Letters*, 7(8), 909-915.
- Wong, L. Y., Xia, B., Wolvetang, E., & Cooper-White, J. (2018). Targeted, stimuli-responsive delivery of plasmid DNA and miRNAs using a facile self-assembled supramolecular nanoparticle system. *Biomacromolecules*, 19(2), 353-363.
- Wu, Y. F., Wu, H. C., Kuan, C. H., Lin, C. J., Wang, L. W., Chang, C. W., & Wang, T. W. (2016). Multi-functionalized carbon dots as theranostic nanoagent for gene delivery in lung cancer therapy. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Wynant, N., Santos, D., Van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2014). Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *S. gregaria*. *Insect molecular biology*, 23(3), 320-329.
- Wytinck, N., Manchur, C. L., Li, V. H., Whyard, S., & Belmonte, M. F. (2020). dsRNA uptake in plant pests and pathogens: insights into RNAi-based insect and fungal control technology. *Plants*, 9(12), 1780.
- Wytinck, N., Sullivan, D. S., Biggar, K. T., Crisostomo, L., Pelka, P., Belmonte, M. F., & Whyard, S. (2020). Clathrin mediated endocytosis is involved in the uptake of exogenous double-stranded RNA in the white mold phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific reports*, 10(1), 12773.
- Xie, M., Zhang, S., & Yu, B. (2015). microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 87-99.

- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., ... & Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS biology*, 2(5), e104.
- Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., & Scrivens, W. A. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736-12737.
- Xu, X., Yu, T., Zhang, D., Song, H., Huang, K., Wang, Y., ... & Yang, J. (2023). Evaluation of the anti-viral efficacy of three different dsRNA nanoparticles against potato virus Y using various delivery methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 255, 114775
- Yamaguchi, Y.; Huffaker, A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011, 14, 351–357.
- Yan, F., Jiang, Y., Sun, X., Bai, Z., Zhang, Y., & Zhou, X. (2018). Surface modification and chemical functionalization of carbon dots: a review. *Microchimica Acta*, 185, 1-34.
- Yong, J., Zhang, R., Bi, S., Li, P., Sun, L., Mitter, N., ... & Xu, Z. P. (2021). Sheet-like clay nanoparticles deliver RNA into developing pollen to efficiently silence a target gene. *Plant Physiology*, 187(2), 886-899.
- Yuan, F., Li, S., Fan, Z., Meng, X., Fan, L., & Yang, S. (2016). Shining carbon dots: Synthesis and biomedical and optoelectronic applications. *Nano Today*, 11(5), 565-586.
- Zaidi, S. S. E. A., Martin, D. P., Amin, I., Farooq, M., & Mansoor, S. (2017). Tomato leaf curl New Delhi virus: a widespread bipartite begomovirus in the territory of monopartite begomoviruses. *Molecular plant pathology*, 18(7), 901-911.
- Zhang, C., Chen, D., Yang, G., Yu, X., & Wu, J. (2020). Rice stripe mosaic virus–encoded P4 is a weak suppressor of viral RNA silencing and is required for disease symptom development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(3), 412-422.
- Zhang, D., Wang, J., & Xu, D. (2016). Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *Journal of controlled release*, 229, 130-139.
- Zhang, H., Cao, Y., Xu, D., Goh, N. S., Demirer, G. S., Cestellos-Blanco, S., ... & Yang, P. (2021). Gold-nanocluster-mediated delivery of siRNA to intact plant cells for efficient gene knockdown. *Nano letters*, 21(13), 5859-5866.
- Zhang, H., Chen, J., Gao, J., Zhang, Q., Liu, X., & Han, Z. (2022). New insights into transmission pathways and possible off-target effects of insecticidal dsRNA released by treated plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188, 105281.
- Zhang, H., Goh, N. S., Wang, J. W., Pinals, R. L., González-Grandío, E., Demirer, G. S., ... & Landry, M. P. (2022). Nanoparticle cellular internalization is not required for RNA delivery to mature plant leaves. *Nature nanotechnology*, 17(2), 197-205.
- Zhang, J., Zhao, L., Zhu, C., Wu, Z., Zhang, G., Gan, X., ... & Song, B. (2017). Facile synthesis of novel vanillin derivatives incorporating a bis (2-hydroxyethyl) dithioacetal moiety as antiviral agents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(23), 4582-4588.
- Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., Ma, S., & Zhou, G. (2018). Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant biotechnology journal*, 16(8), 1415-1423.
- Zhang, Y., Jia, Q., Nan, F., Wang, J., Liang, K., Li, J., ... & Wang, P. (2023). Carbon dots nanophotosensitizers with tunable reactive oxygen species generation for mitochondrion-targeted type I/II photodynamic therapy. *Biomaterials*, 293, 121953.
- Zheng, X. T., Ananthanarayanan, A., Luo, K. Q., & Chen, P. (2015). Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications. *small*, 11(14), 1620-1636.
- Zhu, B., Gao, H., Xu, G., Wu, D., Song, S., Jiang, H., ... & Xie, D. (2017). Arabidopsis ALA1 and ALA2 mediate RNAi-based antiviral immunity. *Frontiers in Plant Science*, 8, 422.
- Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., & Yang, X. (2009). Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chemical Communications*, (34), 5118-5120.
- Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano research*, 8, 355-381.

- Zhu, S., Zhao, X., Song, Y., Lu, S., & Yang, B. (2016). *Beyond bottom-up carbon nanodots: Citric-acid derived organic molecules*. *Nano Today*, 11(2), 128-132.
- Ziebell, H., & Carr, J. P. (2010). *Cross-protection: a century of mystery*. In *Advances in virus research* (Vol. 76, pp. 211-264). Academic Press.
- Ziebell, H., Payne, T., Berry, J. O., Walsh, J. A., & Carr, J. P. (2007). *A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains*. *Journal of general virology*, 88(10), 2862-2871.
- Zipfel, C. (2008). *Pattern-recognition receptors in plant innate immunity*. *Current opinion in immunology*, 20(1), 10-16.
- Zotti, M., Dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C. N. T., & Smagghe, G. (2018). *RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes*. *Pest management science*, 74(6), 1239-1250.

Curriculum vitae

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el IFAPA de Málaga, sede de Churriana, y dirigida por Leonardo Velasco Arjona perteneciente al Área Temática de Fitopatología.

Este trabajo a sido posible gracias a la “Ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores 2018” con referencia PRE2018-087167 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU). Dicha ayuda se disfruto encuadrada dentro del proyecto RTA2017-00061-C03-01 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU) cuyo investigador principal fue Leonardo Velasco Arjona, investigador titular del departamento de Fitopatología de IFAPA Málaga.

Todo el trabajo realizado durante el periodo de desarrollo de la tesis doctoral ha resultado en:

Publicaciones de calidad

1. **Delgado-Martín, J., & Velasco, L. (2021).** An efficient dsRNA constitutive expression system in Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16), 6381-6393. DOI: 10.1007/s00253-021-11494-6
2. **Delgado-Martín, J., Delgado-Olidén, A., & Velasco, L. (2022).** Carbon dots boost dsRNA delivery in plants and increase local and systemic siRNA production. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5338. DOI: 10.3390/ijms23105338
3. **Delgado-Martín, J., Ruiz, L., Janssen, D., & Velasco, L. (2022).** Exogenous application of dsRNA for the control of viruses in cucurbits. *Frontiers in plant science*, 13. DOI: 10.3389/fpls.2022.895953
4. **Jiménez-Carretero, M., Rodríguez-López, J., Ropero-Moreno, C., Granada, J., Delgado-Martín, J., Martínez-Bueno, M., ... & Jiménez-López, C. (2023).** Biomimetic magnetic nanoparticles for bacterial magnetic concentration in liquids and qPCR-detection. *Food Control*, 147, 109623. DOI: 10.1016/j.foodcont.2023.109623

Otras publicaciones

1. **J. Delgado-Martín, L. Ruiz, D. Janssen and L. Velasco (2021).** Aplicación tópica de dsRNA para el control del virus del mosaico verde del pepino. *Acta de Horticultura N.º 86* correspondiente a XVI Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. 1, 158-161.

Asistencia y participación a congresos

1. "Gene therapy for virus control in vegetable crops: use of LDH nanoparticles for double stranded RNA encapsulation"-Autores (**J. Delgado Martín**, L.J. Alemany, C. Herrera, S. Molina Ramírez, L. Ruiz, D. Janssen & L. Velasco) en *II Congreso de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Rey Juan Carlos*. Evento nacional. Madrid del 27 al 28 de noviembre de **2019**. Comunicación oral.
2. Asistencia a Congreso internacional Imaginenano (IM2020) Online Conference, 29 septiembre a 1 octubre de **2020**.
3. "La aplicación tópica de dsRNA reduce la enfermedad producida por Cucumber Green Mosaic Mottle virus"-Autores (**J. Delgado-Martín**, L. Ruiz, D. Janssen and L. Velasco) en el *XVI Congreso Nacional De Ciencias Hortícolas*. Córdoba 17-21 octubre **2021**. Comunicación Oral.
4. "Analysis and production of dsRNA-layered double hydroxides nanocomposites for plant protection" - Authors (**J. Delgado Martín**, L.J. Alemany, C. Herrera, S. Molina Ramírez, L. Ruiz, D. Janssen & L. Velasco) at "ImagineNano2021 International Event - Nanospain2021 Conference". Bilbao, del 23 al 25 de noviembre de **2021**. Poster
5. "Carbon dots boost dsRNA delivery in plants and increase local and systemic siRNA production"- Autores (**J. Delgado-Martín & L. Velasco**) en la *III Reunión de la red nacional de Virología de Plantas* (Renaviplant). Murcia 25 de mayo de **2022**. Comunicación Oral.
6. "Exogenous Application of dsRNA for the Control of Viruses in Cucurbits"- Autores (**J. Delgado-Martín**, L. Ruiz, A. Delgado-Olidén, D. Janssen, L. Velasco) en la *III Reunión de la red nacional de Virología de Plantas* (Renaviplant). Murcia, 25 de mayo de **2022**. Poster.
7. "Vacunas vegetales: RNAi y nanotecnología para el control de virus en cultivos hortícolas" -Autores (**J. Delgado Martín & L. Velasco**) en *III Congreso Nacional - V Jornadas de Investigadores en Formación Fomentando la interdisciplinariedad*. Evento nacional. Granada, 22-24 junio **2022**. Comunicación Oral.

8. “Desarrollo de herramientas inductoras del silenciamiento génico mediado por dsRNA-Carbon Dots para el control de patógenos virales en cucurbitáceas”- Autores (**J. Delgado-Martín**, C. García Merino & L. Velasco) en *IV Jornada de seguimiento del Programa de doctorado de Biotecnología Avanzada*. Evento nacional. Málaga a 5 de mayo de **2023**. Comunicación oral.
9. “Empleo de nanopartículas magnéticas biomiméticas para concentrar bacteria magnéticamente y detectarlas por qPCR”-Autores (M. Jiménez Carretero, J. Rodríguez López, C. Ropero Moreno, J. Granada hurtado, **J. Delgado-Martín**, M. Martínez bueno, A. Fernández Vivas, C. Jiménez López) en *XXIX Congreso Nacional de Microbiología* de la Sociedad Española de Microbiología. Burgos, del 25 al 28 de junio de **2023**. Poster

Estancias breves en centros de investigación

1. Estancia breve en Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias- Valencia, España, bajo la dirección del Dr. Luis Galipienso Torregrosa. Del 15 de septiembre de 2020 a 31 oct de 2020 con una duración de 1,5 meses.
2. Estancia breve e São Paulo State University – Campus Sorocaba-Brasil, bajo la dirección del Dr. Leonardo Fernades Fracheto. Del 14 de febrero de 2022 a 15 mayo de 2022 con una duración de 3 meses.
3. Estancia breve en Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"- Málaga, España bajo la dirección de Dr. José Alejandro Heredia-Guerrero. Del 1 de octubre de 2022 a 31 de diciembre de 2022 con una duración de 3 meses.
4. Estancia breve en Instituto Botánico de Castilla-La Mancha- Albacete, España. Bajo la dirección del Dr. Enrique Niza González. Del 20 de febrero de 2023 a 24 de febrero de 2023 con una duración de 5 días.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA