

Gene silencing induced by the vector EuMY-YPΔCHS4 during the *Fusarium* sp. - *Nicotiana benthamiana* interaction

Silenciamiento génico inducido por el vector EuMY-YPΔCHS4 durante la interacción *Fusarium* sp.-*Nicotiana benthamiana*

Nidia Esther Hau-Yama, ¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, Mérida, Yucatán, México; **Marianne Soledad Luna-Rivero**, Escuela de Ciencias de la Salud- Universidad Marista de Mérida, Periférico Norte Tablaje Catastral 13941 Carretera Mérida-Progreso, C.P. 97300 Mérida, Yucatán, México; **Blondy Beatriz Canto-Canché**, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, **Yereni Minero-García**¹; **Cecilia Hernández-Zepeda**, Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 8 No 39 SM 64 Mz 29 77500 Cancún, Quintana Roo, México; **Diana Sánchez-Rangel**, Investigadora por México-CONAHCYT, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, Col. El Haya, CP 91070, Xalapa, Veracruz, México; **Oscar Alberto Moreno-Valenzuela***¹.

*Corresponding Author: oamv@cicy.mx

Received: March 24, 2023.

Accepted: August 13, 2023.

Hau-Yama NE, Luna-Rivero MS, Canto-Canché BB, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C, Sánchez-Rangel D and Moreno-Valenzuela OA. 2023. Gene silencing induced by the vector EuMY-YPΔCHS4 during the *Fusarium* sp. - *Nicotiana benthamiana* interaction. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 434-459.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2305-4>

First DOI publication: August 28, 2023.

Primera publicación DOI: 28 de Agosto, 2023.

Abstract. In the literature, RNA-based interference methods have been proposed for the control of pathogenic fungi in plants, such as virus-mediated silencing (VIGS). The objective of this work was to evaluate the functionality and efficiency of the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector,

Resumen. En la literatura, se han propuesto métodos basados en el ARN de interferencia para el control de hongos patógenos en plantas, como el silenciamiento mediado por virus (VIGS). En este trabajo se evaluó la funcionalidad y la eficiencia del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4, el cual contiene un fragmento de la secuencia del gen de la quitina sintasa 4 (*CHS4*) de *Fusarium* sp. y fue construido a partir del vector EuMV-YP:ΔAV1. Se evaluó el vector VIGS en dos condiciones en plantas de *Nicotiana benthamiana*: plantas con inoculación previa con *Fusarium* sp. y en plantas con inoculación del hongo posterior a la inoculación del vector VIGS. Los resultados mostraron que la aplicación de EuMV-YPΔCHS4 en ambos tratamientos provocó un retardo en la caída de hojas durante los primeros días de la infección y una disminución significativa del daño en el tallo de las plantas

which contains a fragment of the *Fusarium* sp. chitin synthase 4 (*CHS4*) gene sequence, and was constructed from the EuMV-YP vector:ΔAV1. The VIGS vector was evaluated under two conditions in *Nicotiana benthamiana* plants previously inoculated with *Fusarium* sp. and in plants with inoculation after the inoculation of the VIGS vector. The results showed that in both treatments with the EuMV-YPΔ*CHS4*, a delay in leaf fall during the first days of infection and a decrease in the stem damage of almost one centimeter, compared to the control infected with the fungus. In addition, a reduction of up to 30% in the relative expression of the *CHS4* gene was observed. These results suggest that the application of VIGS vectors may be efficient as a strategy to protect plants against *Fusarium* sp.

Keywords: Silencing RNA, *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán peninsula, cross-kingdom

Plant diseases caused by fungal pathogens are a significant threat to food security (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020). Fungi are estimated to be accountable for losses exceeding 65% in global crop yield, an annual escalation attributed to factors like shifts in agricultural practices and excessive usage of synthetic fungicides. These elements contribute to the emergence of resistant strains, complicating the control and early-stage detection of fungal infections (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020; Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sharma and Sharma, 2020).

Prominent among the soil-borne fungal pathogens affecting plants are those belonging to the *Fusarium* genus, known for their pronounced pathogenicity. These fungi have been associated with numerous diseases across more than 200 crop

infectadas, comparadas con el control infectado con el hongo. Además, se observó una reducción de hasta 30% en la expresión relativa del gen *CHS4*. Estos resultados sugieren que la aplicación de los vectores VIGS puede ser una estrategia eficiente para proteger a las plantas contra *Fusarium* sp.

Palabras clave: ARN de silenciamiento, *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán península, entre reinos “cross-kingdom”

Las enfermedades ocasionadas en plantas por patógenos fúngicos son una de las amenazas principales en la seguridad alimentaria (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020). Se estima que los hongos son responsables de pérdidas de más del 65% en los cultivos en todo el mundo, las cuales año con año van en aumento debido a factores como el cambio en las prácticas agrícolas, el uso desmedido de fungicidas sintéticos, entre otros, lo que genera la aparición de cepas resistentes y la dificultad para controlar e identificar las infecciones fúngicas en etapas tempranas (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2020; Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sharma y Sharma, 2020).

Entre los principales hongos patógenos del suelo que afectan a las plantas se encuentran los hongos del género *Fusarium*, los cuales se caracterizan por ser altamente patogénicos y se han relacionado con diferentes enfermedades en más de 200 especies de cultivos a nivel mundial, ocasionando graves pérdidas económicas (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020; Summerell, 2019). Estos hongos se caracterizan por invadir el tejido vascular de las plantas e inducir síntomas como el oscurecimiento y la pudrición de la raíz y el tallo, el marchitamiento, el retraso del crecimiento y la defoliación, debido al bloqueo del xilema impidiendo el movimiento del agua y nutrientes en la planta,

species worldwide, causing significant economic losses (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020; Summerell, 2019). Their invasion of plants' vascular tissue leads to symptoms such as root and stem discoloration, decay, wilting, growth inhibition, and defoliation. These effects result from the blockage of xylem, impeding the movement of water and nutrients within the plant and ultimately leading to its death (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020).

The primary challenge in controlling these pathogens lies in their capability to reside within host organisms and form structures that enable them to remain dormant in the soil in the absence of hosts (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Panth *et al.*, 2020).

An alternative approach for pest and disease control involves the utilization of RNA interference (RNAi), a natural mechanism in plants. Plants employ RNAi, which originates from viral infections, to generate specific resistance as a defense against viral attacks (Baulcombe, 2004). RNAi is generated through a process known as post-transcriptional gene silencing. This mechanism involves the recognition of double-stranded RNA (dsRNA) intermediates from the virus replication stage, which are cleaved into short RNAs of 21-26 nucleotides by an RNase III-like enzyme called Dicer. These small RNAs are incorporated into a RNA-induced silencing complex (RISC), containing an Argonaute (AGO) protein with endonucleolytic activity for cleaving the target RNA (Baulcombe, 2004; Van Kammen, 1997; Zhu *et al.*, 2019). The tool known as virus-induced gene silencing (VIGS) was developed based on this natural mechanism. VIGS employs viral vectors designed to carry the fragment of the gene of interest for silencing, enabling the analysis of gene functions in plants (Baulcombe, 1999; Bekele *et al.*, 2019). Additionally, it aids in pathogen control

hasta provocar su muerte (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Sampaio *et al.*, 2020). Además, el control de estos patógenos se ha dificultado principalmente por su capacidad de habitar en el interior de sus hospederos y por producir estructuras que les permiten permanecer en estado de latencia en el suelo cuando los hospederos están ausentes (Fernandez-San Millan *et al.*, 2021; Panth *et al.*, 2020).

Un enfoque alternativo para el control de plagas y enfermedades es el empleo de ARN de interferencia (ARNi), un mecanismo natural de las plantas, que emplean los ARNi producidos a partir de una infección por virus para generar una resistencia específica como defensa contra ese ataque viral (Baulcombe, 2004). Los ARNi se producen a través de un proceso conocido como silenciamiento génico post-transcripcional. Este mecanismo involucra el reconocimiento de intermediarios de ARN de doble cadena (ARNds) de la etapa de replicación de los virus, que son cortados en ARNs cortos de 21-26 nucleótidos por una enzima tipo RNasa III llamada Dicer. Estos ARN pequeños se incorporan a un complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), que contiene una proteína tipo Argonauta (AGO), con actividad endonucleolítica para el corte del ARN objetivo (Baulcombe, 2004; Van Kammen, 1997; Zhu *et al.*, 2019). Basados en este mecanismo natural, se desarrolló la herramienta denominada silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés), que emplea vectores virales diseñados para transportar el fragmento del gen de interés que se quiere silenciar, lo cual permite el análisis de la función de genes en plantas (Baulcombe, 1999; Bekele *et al.*, 2019) y el control de patógenos, al replicarse de manera sistémica junto con el genoma viral (Lange *et al.*, 2013; Becker and Lange, 2010). El silenciamiento génico ha demostrado eficacia para reducir los síntomas producidos por diferentes especies de *Fusarium* en plantas de

by systemic replication alongside the viral genome (Lange *et al.*, 2013; Becker and Lange, 2010). Gene silencing has demonstrated effectiveness in reducing symptoms caused by different *Fusarium* species in *Arabidopsis thaliana* plants, through the silencing of the lanosterol C14 α -demethylase gene (Koch *et al.*, 2013). It has also been employed in banana (*Musa* spp.) by targeting genes related to conidial development and the production of velvet and FTF toxins (Ghag *et al.*, 2014), in wheat (*Triticum aestivum*) by silencing the *CHS3* gene of the chitin synthase family (Cheng *et al.*, 2015), and in barley (*Hordeum vulgare*) through silencing *AGO* and *DICER* genes essential for the silencing mechanism (Werner *et al.*, 2020).

Other potential target genes for the control of plant pathogenic fungi by gene silencing include chitin synthases (CHS), which are enzymes involved in the biosynthesis of chitin, an important structural component of the fungal cell wall (Roncero *et al.*, 2003; Lenardon *et al.*, 2010). Chitin and CHS are absent in plants and mammals, so this gene family has been considered a safe and attractive target for antifungal development (Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2015). Plant pathogenic fungi have multiple *CHS* genes and all of them have different roles in development and virulence (Lenardon *et al.*, 2012; Geoghegan *et al.*, 2017). It has been reported that mutation of *chitin synthase V* can cause alterations such as decreased infective capacity of *Fusarium oxysporum* in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants (Madrid *et al.*, 2003), but silencing of this same gene in *Fusarium culmorum* is not associated with reduced symptoms in maize plants (Chen *et al.*, 2016). Likewise, in some *Fusarium* species, the evaluation of *CHS4* has not been possible by generating mutants, but *in silico* evaluation has reported the possible existence of one or more *CHS4* genes that have been related to a high identity

Arabidopsis thaliana, mediante el silenciamiento del gen *lanosterol C14 α -desmetilasa* (Koch *et al.*, 2013); en banano (*Musa* spp.), con el silenciamiento de los genes relacionados con el desarrollo de los conidios y en la producción de toxinas *velvet* y *ftf* (Ghag *et al.*, 2014), en trigo (*Triticum aestivum*), silenciando el gen *CHS3* de la familia de las quitina sintasas (Cheng *et al.*, 2015); en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante el silenciamiento de los genes *AGO* y *DICER* requeridos para el mecanismo de silenciamiento (Werner *et al.*, 2020).

Otros posibles genes blancos para el control de hongos fitopatógenos mediante el silenciamiento génico son las quitinas sintasas (CHS), que son enzimas involucradas en la biosíntesis de quitina, un componente estructural importante de la pared celular fúngica (Roncero *et al.*, 2003; Lenardon *et al.*, 2010). La quitina y las CHS se encuentran ausentes en plantas y mamíferos, por lo que esta familia de genes ha sido considerada como un objetivo seguro y atractivo para el desarrollo de antifúngicos (Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2015). Los hongos fitopatógenos tienen múltiples genes de CHS y todos ellos presentan diferentes funciones en el desarrollo y en la virulencia (Lenardon *et al.*, 2012; Geoghegan *et al.*, 2017). Se ha reportado que la mutación de la quitina sintasa V puede provocar alteraciones como la disminución de la capacidad infectiva de *Fusarium oxysporum* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Madrid *et al.*, 2003), pero el silenciamiento de este mismo gen en *Fusarium culmorum* no está asociado con la reducción de los síntomas en plantas de maíz (Chen *et al.*, 2016). Así mismo, en algunas especies de *Fusarium*, la evaluación de la *CHS4* no ha sido posible mediante la generación de mutantes, pero la evaluación *in silico* ha reportado la posible existencia de uno o más genes de *CHS4* que se ha relacionado con una alta identidad con el gen *CHS7*; sin embargo, análisis de la actividad

with the *CHS7* gene; however, analysis of *CHS4* activity in *Saccharomyces cerevisiae* showed that they do not present the same cellular localization nor the same function in development (Larson *et al.*, 2011; Martín-Udíroz *et al.*, 2004; Roncero *et al.*, 2003). However, in *Penicillium chrysogenum* it was observed that mutation of this gene reduces conidia formation and presents atrophied hyphae, causing changes in penicillin production (Liu *et al.*, 2013). These reports demonstrate that the function and characteristics of each chitin synthase differ depending on the fungal species and this also varies according to the interactions that the pathogen has with the host plant and its environment.

Gene silencing across organisms from different biological kingdoms is achievable through bidirectional molecule exchange. This exchange occurs, for instance, between pathogens and host plants (Wang *et al.*, 2016) and through cell-cell molecule movement. This inter-kingdom communication also involves transport mechanisms such as vesicles or receptor proteins (Majumdar *et al.*, 2017; Weiberg *et al.*, 2015). Moreover, certain fungal pathogens like *Botrytis cinerea* have the capacity to produce RNA interference (RNAi), enabling them to impede plant defense genes (Wang *et al.*, 2017). Conversely, plant microRNA production initiates fungal gene silencing. For instance, in cotton (*Gossypium hirsutum*) plants expressing *miR166* and *miR159*, specific genes of *Verticillium dahliae* are silenced, resulting in pathogen resistance (Zhang *et al.*, 2016). While this approach is effective, it necessitates the use of genetically modified organisms (GMOs) (Cai *et al.*, 2019).

An alternative strategy involves RNAi production in plants and subsequent transport to fungi via plant-replicating viral vectors, known as virus-induced gene silencing (VIGS). The systemic movement of RNAi from plants to fungi highlights

de *CHS4* en *Saccharomyces cerevisiae*, demostró que no presentan la misma localización celular ni la misma función en el desarrollo (Larson *et al.*, 2011; Martín-Udíroz *et al.*, 2004, Roncero *et al.*, 2003). Sin embargo, en *Penicillium chrysogenum* se observó que la mutación de este gen reduce la formación de conidios y presenta hifas atrofiadas, provocando cambios en la producción de penicilina (Liu *et al.*, 2013). Estos reportes demuestran que la función y características de cada quitina sintasa es diferente dependiendo de la especie de hongo y esto también varía de acuerdo con las interacciones que tenga el patógeno con la planta hospedera y su ambiente.

El silenciamiento génico entre organismos de diferentes reinos biológicos es posible mediante el intercambio bidireccional de moléculas, por ejemplo, entre el patógeno y la planta hospedera (Wang *et al.*, 2016), a través del movimiento de moléculas de célula-célula, así como también se han observado diferentes mecanismos asociados al movimiento como el transporte mediante vesículas o proteínas receptoras (Majumdar *et al.*, 2017; Weiberg *et al.*, 2015). Además, se han reportado a patógenos fúngicos como *Botrytis cinerea* que producen ARNi para inhibir genes de la defensa de las plantas (Wang *et al.*, 2017), pero también se ha inducido la producción de microARN fúngicos en las plantas para controlar a los patógenos, por ejemplo, se ha observado que plantas de algodón (*Gossypium hirsutum*) transformadas para expresar *miR166* y *miR159* logran el silenciamiento específico de genes de *Verticillium dahliae* y de esta manera se genera resistencia contra este patógeno (Zhang *et al.*, 2016). Aunque es un método eficaz, implica la generación de organismos genéticamente modificados (OGM) (Cai *et al.*, 2019).

Una alternativa para la generación de resistencia en las plantas, sin la necesidad de generar cultivos transgénicos, es la producción y transporte

the biotechnological potential of RNAi silencing models (Cai *et al.*, 2018). This study aims to assess a VIGS vector carrying a fragment of the *Fusarium* sp. *CHS4* gene for its effectiveness in controlling fungal infection in *Nicotiana benthamiana*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. Seeds of *Nicotiana benthamiana* were germinated in 120 mL unisel containers with Sunshine #3 special fine mix, which contains short fiber peatmoss, dolomitic lime and vermiculite, at 25 ± 2 °C, with a photoperiod of 16/8 hours light/dark and weekly fertilization with 4 mL L⁻¹ of Bayfolan® Forte (Bayer de México, S.A. de C.V. CropScience Division).

Fungal material. The fungus *Fusarium* sp. strain INECOL_BM-06, provided by the Institute of Ecology A.C. (INECOL), was used. This strain was isolated from the ambrosial insect *Xylosandrus morigerus* in the Jaguaroundi ecological park in Coatzacoalcos, Veracruz (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2022). The strain was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) plates (BD, Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA), with subcultures every 30 days at room temperature, and was also preserved in 20% glycerol at -80 °C for 6 to 24 months.

Cloning of the *chitin synthase 4* gene fragment of *Fusarium* sp. The fungal *CHS4* gene fragment was amplified from DNA using the oligonucleotides CHS4F (5'-CAAATTATCCTCCTCATGTCGTTC-3') and CHS4R (5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3'). These oligonucleotides amplify a 204 bp region encompassing the distinctive domain of chitin synthase 4 found in filamentous fungi. The design of

de ARNi de plantas a hongos empleando vectores virales que se pueden replicar en plantas (VIGS). Debido al movimiento sistémico de moléculas de ARNi de las plantas hacia los hongos, los modelos de silenciamiento por ARNi presentan una ventaja biotecnológica para su aplicación (Cai *et al.*, 2018). El objetivo de este trabajo fue evaluar la funcionalidad y la eficiencia de un vector VIGS que contenga un fragmento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. para controlar el proceso de infección de este hongo en *Nicotiana benthamiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se emplearon semillas de *Nicotiana benthamiana*, las cuales fueron germinadas en recipientes de unisel de 120 mL con mezcla fina especial Sunshine #3, el cual contiene peatmoss de fibra corta, cal dolomítica y vermiculita, a 25 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad y fertilización semanal con 4 mL L⁻¹ de Bayfolan® Forte (Bayer de México, S.A. de C.V. División CropScience).

Material fúngico. Se empleó el hongo *Fusarium* sp. cepa Inecol_BM-06, proporcionada por el Instituto de Ecología A. C (INECOL), el cual fue aislada del insecto ambrosial *Xylosandrus morigerus* en el parque ecológico Jaguaroundi, en Coatzacoalcos, Veracruz (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2022). La cepa se mantuvo en cajas de medio PDA (Potato Dextrose Agar, BD, Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA), con resiembras cada 30 días a temperatura ambiente y también se conservó en glicerol al 20% a -80 °C de 6 a 24 meses.

Clonación del fragmento del gen de quitina sintasa 4 de *Fusarium* sp. El fragmento del gen *CHS4* del hongo se amplificó a partir de ADN, usando

these oligonucleotides was based on the sequences from *Fusarium graminearum* (XM_011318750.1), *F. oxysporum* (XM_018376225.1), and *F. verticillioides* (XM_018888350.1), using the Primer designing tool provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

To ensure standardization, a series of tests were conducted, including gradient temperature alignment, annealing concentration, and oligonucleotide concentration assessments. The optimal conditions for the polymerase chain reaction (PCR) were as follows: initial denaturation at 95 °C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 58 °C for 30 s, extension at 72 °C for 20 s, and a final extension step at 72 °C for 5 min. The resulting PCR product was then inserted into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega®, Madison, WI, USA), in accordance with the manufacturer's guidelines. Subsequently, the ligation products were employed to transform *Escherichia coli* TOP10 competent cells.

Construction of the VIGS EuMV-YPΔCHS4 Vector. For the development of the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, we employed the VIGS vector pEuMV-YP:ΔAV1, which was designed based on the A genomic component of the bipartite geminivirus *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula (EuMV-YP; DQ318937) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). The 204 bp segment of the *CHS4* gene, previously integrated into the pGEM:GCHS4 vector, was isolated using *SphI* and *PstI* restriction enzymes. Subsequently, it was fused with the VIGS pEuMV-YP:ΔAV1 vector, which had been previously treated with the same restriction enzymes. The resultant construct underwent sequencing by Macrogen Inc (Seoul, South Korea). Sequence analysis was performed using the NCBI BLASTn platform. The sequences were edited utilizing the Mega 6 (Tamura *et al.*,

los oligos CHS4F, 5'-CAAATTATCCTCATGTCGTTTC-3' y CHS4R 5'-TCAGGATCTTT-CACCATGGC-3'. Los oligos amplifican una región de 204 pb, que comprende el dominio característico de la quitina sintasa 4 de hongos filamentosos, diseñados a partir de las secuencias de *Fusarium graminearum* (XM_011318750.1), *F. oxysporum* (XM_018376225.1) y *F. verticillioides* (XM_018888350.1), empleando la herramienta "Primer designing tool" del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés).

Para la estandarización se realizaron pruebas de gradiente de temperatura de alineamiento, de concentración de templado y de concentración de oligos. Las condiciones de PCR óptimas fueron las siguientes: 1 ciclo a 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 20 s y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto de PCR fue ligado en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega®, Madison, Wi, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente los productos de la ligación se utilizaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* TOP10.

Construcción del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. Para la construcción del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 se empleó el vector VIGS pEuMV-YP:ΔAV1, diseñado a partir del hemidímero A del geminivirus bipartita *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán península (EuMV-YP; DQ318937) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Se liberó el fragmento de 204 pb del gen *CHS4* clonado en el vector pGEM:GCHS4 con las enzimas de restricción *SphI* y *PstI* y se ligó al VIGS pEuMV-YP:ΔAV1 que previamente había sido digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción obtenida fue enviada a secuenciar a la compañía Macrogen Inc (Seúl, Corea del Sur). El análisis de la secuencia

2013) and Biedit (Hall, 1999) software to eliminate vector-specific elements.

Inoculation of *N. benthamiana* plants with *Fusarium* sp. A fungal culture grown for 15-30 days in Potato Dextrose Broth (PDB) liquid medium (BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) was utilized. The mycelium was gathered and homogenized in a blender at maximum speed for 1 minute. The concentration of the mycelial fragments was adjusted to 10^6 mL⁻¹ and combined with grenetin to reach a final concentration of 1% (v/v). This mixture of mycelial fragments was applied to a previously created scalpel cut of approximately 0.5 mm on the stem, positioned between the root and the first petiole of each plant. Uninoculated control plants (SI) harboring *Fusarium* sp. were inoculated with 1% (v/v) grenetin at the incision point. The plants were then maintained under the photoperiod conditions outlined earlier, either for 14 days or until plant mortality occurred.

Silencing induced by the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector in the context of *Fusarium* sp. and *N. benthamiana* interaction. To assess the influence of VIGS vector treatments during the infection process, symptoms of leaf drop and stem necrosis were monitored in *N. benthamiana* plants. Two groups were examined, each comprising six 3-week-old plants per treatment and collection day: the initial group of *N. benthamiana* plants was exposed to fungal inoculation five days prior to being subjected to bombardment with gold microprojectiles coated with VIGS vector DNA (as detailed later). Stem samples were obtained at 7 and 14 days post bombardment (dpB), corresponding to 12 and 19 days post inoculation (dpI) with *Fusarium* sp. These plants were labeled as E-CHS4 (7 dpB/12 dpI and 14 dpB/19 dpI, respectively). In the second group of *N. benthamiana* plants, bombardment with

se realizó en la plataforma BLASTn del NCBI. Las secuencias fueron editadas con los programas Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) y Biedit (Hall, 1999) para eliminar la secuencia correspondiente al vector.

Inoculación de plantas de *N. benthamiana* con *Fusarium* sp. Se empleó un cultivo del hongo de 15-30 días de crecimiento en medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth, BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA), se colectó el micelio y se homogenizó en una licuadora durante 1 minuto a máxima velocidad. La concentración de fragmentos se ajustó a 10^6 fragmentos de micelio mL⁻¹ y se mezcló con grenetina a una concentración final de 1% (v/v). La mezcla de fragmentos de micelio se aplicó sobre un corte de bisturí de aproximadamente 0.5 mm realizado previamente en el tallo, en el área entre la raíz y el primer peciolo de cada planta. A las plantas control sin inocular (SI) con *Fusarium* sp. se les colocó grenetina al 1% (v/v) en el punto de corte. Las plantas se mantuvieron en las condiciones de fotoperiodo descritas previamente, durante 14 días o hasta la muerte de la planta.

Silenciamiento promovido por el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 durante la interacción de *Fusarium* sp.-*N. benthamiana*. Para analizar el efecto de los tratamientos con el vector VIGS durante el proceso de infección, se observaron los síntomas de caída de hojas y el necrosamiento del tallo en plantas de *N. benthamiana*. Para ello se evaluaron dos grupos, en cada grupo se emplearon seis plantas de tres semanas de edad por tratamiento y por día de colecta: el primer grupo de plantas de *N. benthamiana* fueron inoculadas con el hongo cinco días antes de ser bombardeadas con microprojectiles de oro recubiertos con el ADN del vector VIGS (procedimiento descrito posteriormente) y se tomaron muestras de tallo a los 7 y 14 días posteriores

the VIGS vector preceded fungal inoculation by 5 days, adhering to the previously detailed conditions. Stem samples were collected at 7 and 14 dpI. These plants were designated as O-CHS4 (7 dpI/12 dpB and 14 dpI/19 dpB). All experiments were conducted in triplicate with 6 plants per replicate, yielding a total of 18 plants per treatment/collection day over the study period. For both examined plant groups, bombardment was performed using 1 µm gold microprojectiles (BioRad, Hercules, California, USA) coated with 10 µg of DNA for each viral component. In particular, 5 µg of the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4 and 5 µg of the wild-type EuMV-YP component B were used for component A. Bombardment was conducted from a 2 cm distance from the plant, employing 30 PSI of helium gas. Control groups consisted of SI plants and plants solely inoculated with *Fusarium* sp (I). The number of lost leaves and the extent of damage caused by the fungus during the initial week were documented.

Quantitative PCR (qPCR) analysis of the relative expression of the *CHS4* gene during the *Fusarium* sp. -*N. benthamiana* interaction. To assess the relative expression of the *CHS4* gene, RNA extraction from collected stems was realized using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the provided guidelines. Subsequently, for cDNA synthesis, 100-500 ng of total RNA and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were employed. In brief, 200 ng of oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was incubated for 5 minutes at 65 °C, followed by 1 minute on ice. Then, 4 µL of first-strand buffer, 1 µL of 0.1M DTT, and 1 µL of RNaseOUT™ were added and incubated at 25 °C for 5 minutes, followed by 50 °C for 60 minutes; finally, the reaction was deactivated by incubation at 70 °C for 15 minutes (modified from Gerard *et*

al bombardeo (dpB) correspondiente a 12 y 19 días posterior a la inoculación (dpI) con *Fusarium* sp. Estas plantas se nombraron como E-CHS4 (7 dpB/12 dpI y 14 dpB/19 dpI, respectivamente). El segundo grupo de plantas de *N. benthamiana*, fueron bombardeadas primero con el vector VIGS y cinco días después del bombardeo fueron inoculadas con el hongo, con las condiciones descritas anteriormente. Se colectaron muestras de tallo a los 7 y 14 dpI. Estas plantas se nombraron como O-CHS4 (7 dpI/ 12 dpB y 14 dpI/ 19 dpB). Todos los experimentos se realizaron con 3 réplicas con 6 plantas por réplica, teniendo un total de 18 plantas por tratamiento/día de colecta en el curso temporal. Para ambos grupos de plantas evaluadas, se bombardearon con microproyectiles de oro de 1 µm (BioRad, Hercules, California, USA) cubiertos con 10 µg de ADN de cada componente viral; para el componente A se emplearon 5 µg del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 y 5 µg del componente B de EuMV-YP del virus silvestre. El bombardeo se realizó a 2 cm de distancia de la planta y con 30 PSI de gas helio. Los controles empleados fueron plantas SI y plantas únicamente inoculadas con *Fusarium* sp (I). Se contabilizó el número de hojas perdidas y la longitud del daño causado por el hongo durante la primera semana.

Análisis por PCR cuantitativo (qPCR) de la expresión relativa del gen *CHS4* durante la interacción *Fusarium* sp. -*N. benthamiana*. Para evaluar la expresión relativa del gen *CHS4*, se realizó previamente la extracción del ARN de los tallos colectados, utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, para la síntesis de ADNc se emplearon 100-500 ng de ARN total y la SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, se emplearon 200 ng de oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA,

al., 1997). Subsequently, 10-20 ng of cDNA was utilized for qPCR reactions. These reactions were conducted using the Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, NY, USA) with a 48-well setup, along with SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The qPCR conditions were as follows: one cycle of 50 °C for 2 minutes and 95 °C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 seconds, 58 °C for 1 minute, and 72 °C for 30 seconds. The oligos used were CHS4F, 5'-CAAATTATCCTCATGTCGTTC-3', and CHS4R 5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3' as previously mentioned. The results were normalized to the actin gene of *Fusarium solani* (XM_046282608.1). The treatments used to assess expression were as follows: (1) Uninoculated plants, (2) Plants inoculated with the fungus, (3) Plants inoculated with the vector, (4) E-CHS4 plants 7dpB/12dpI, (5) E-CHS14 plants 14dpB/19dpI, (6) O-CHS4 plants 7dpI/12dpB, and (7) Plants 14dpI/19dpB. Amplifications were performed in quadruplicate, and relative expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis. The data acquired concerning leaf loss and lesion size were subjected to ANOVA, followed by the Tukey *post hoc* test, using a significance level of $p=0.05$, through the employment of RStudio Team (2022) software. Before the ANOVA test, the normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was verified through the Levene test.

RESULTS

Analysis of the cloned CHS4 gene fragment. The obtained results indicated that the cloned

USA), se incubó por 5 min a 65 °C y luego en hielo por 1 min, se agregaron 4 µL de first-strand buffer, 1 µL de 0.1M DTT, 1 µL de RNaseOUT™, se incubó a 25 °C por 5 min, posteriormente a 50 °C por 60 min, finalmente se inactivó la reacción incubando a 70 °C por 15 min (modificado de Gerard *et al.*, 1997). Luego se emplearon de 10-20 ng de ADNc para las reacciones de qPCR. Las reacciones se realizaron en el equipo de Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, NY, USA) de 48 pozos y usando SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de qPCR fueron las siguientes: un ciclo de 50 °C por 2 min y 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30s, 58 °C por 1min y 72 °C por 30 s. Los oligos utilizados fueron CHS4F, 5'-CAAATTATCCTCATGTCGTTC-3' y CHS4R 5'-TCAGGATCTTTCACCATGGC-3' mencionados anteriormente. Los resultados fueron normalizados con el gen de actina de *Fusarium solani* (XM_046282608.1). Los tratamientos empleados para evaluar la expresión fueron los siguientes: (1) Plantas sin inocular (2) Plantas inoculadas con el hongo, (3) Plantas inoculadas con el vector, (4) Plantas E-CHS4 7dpB/12dpI, (5) Plantas E-CHS14 dpB/19dpI, (6) Plantas O-CHS4 7dpI/12dpB y (7) Plantas 14dpI/19dpB. Las ampliificaciones se realizaron por cuadruplicado y los niveles de expresión relativa se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de la pérdida de hojas y el tamaño de la lesión fueron analizados mediante la prueba de ANOVA y Tukey *post hoc* test con un nivel de significancia de $p=0.05$ usando el software RStudio Team (2022). Antes de la prueba de ANOVA, se usaron la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para la homogeneidad de las varianzas.

gene fragment exhibited a 95% identity with the *chitin synthase 4* gene of *Fusarium vanettenii* (XM_003053353.1), a 95% identity with the *CHS4* gene of *F. facilforme* (CP104050.1), and a 94% identity with the *CHS4* gene of a *F. solani* strain (CP090036.1). Upon translating the 204-nucleotide fragment into a protein, a sequence of 68 amino acid residues was discerned (Figure 1), within which the DADT domain was identified. This domain is among those characterizing the chitin synthase family 4, which is the most prevalent among filamentous fungi (Pacheco-Arjona and Ramirez-Prado, 2014).

RESULTADOS

Análisis del fragmento de *CHS4* clonado. Los resultados obtenidos mostraron que el fragmento del gen clonado presentó un 95% de identidad con el gen de la quitina sintasa 4 de *Fusarium vanettenii* (XM_003053353.1), 95% de identidad con el gen *CHS4* de *F. facilforme* (CP104050.1) y 94% de identidad con el gen *CHS4* de una cepa de *F. solani* (CP090036.1). Al traducir a proteína el fragmento obtenido de 204 nucleótidos, se observó una secuencia de aminoácidos de 68 residuos (Figura 1), en el que se identificó el dominio DADT, que

```

1  CAGATCATCCTCATGTCTTTCCTTCAAAGGTCATGTTTGATGAGCGAATGACGGAACTCGAGTAC 66
   Q I I L M S F L Q K V M F D E R M T E L E Y
67  GAAATGTTCAACGGCCTCTGGAAGGTGACTGGTATCTCGCCGGACTACTATGAGATTATTCTGATG 132
   E M F N G L W K V T G I S P D Y Y E I I L M
133 GTAGACGCCGATACAAAGGTGTTCCCTGACAGTCTGACGCACATGATCTCTGCTATGGTCAAAGAT 198
   V D A D T K V F P D S L T H M I S A M V K D
199 CCTGAA 204
   P E
    
```

Figure 1. Amino acid and nucleotide sequence of the partial *CHS4* fragment from *Fusarium* sp. The inset shows the DADT domain, which characterizes family 4 of fungal chitin synthases.

Figura 1. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos del fragmento parcial de *CHS4* de *Fusarium* sp. En el recuadro se muestra el dominio DADT, que caracteriza a la familia 4 de las quitinas sintasas de hongo.

Evaluation of the symptomatology of *Fusarium* sp. inoculation in *N. benthamiana*. A comparison was made between the symptoms observed in the two groups of plants. The results revealed that within the E-CHS4 treatment, the average leaf loss amounted to 4 per plant during the initial week of *Fusarium* sp. infection, whereas for the O-CHS4 treatment, the average leaf loss per plant was 3. In the case of healthy SI plants, the average count of shed leaves was 2, a natural occurrence stemming from mechanical damage inflicted on the plants. Among the infection control plants (I), the average leaf loss reached 6. In the course

es uno de los dominios que caracteriza a la familia 4 de las quitinas sintasas, la más distribuida en hongos filamentosos (Pacheco-Arjona y Ramirez-Prado, 2014).

Evaluación de la sintomatología de la inoculación de *Fusarium* en *N. benthamiana*. Se compararon los síntomas observados en los dos grupos de plantas. Los resultados mostraron que en el tratamiento E-CHS4 la pérdida promedio de hojas fue de 4 por planta durante la primera semana de la infección con *Fusarium* sp., mientras que para el tratamiento O-CHS4, la pérdida promedio de hojas

of the statistical analysis, a noteworthy disparity in leaf drop emerged between the E-CHS4, O-CHS4, and SI treatments compared to the I treatment. Nevertheless, no significant difference materialized between the E-CHS4 and O-CHS4 treatments, and similarly, no significant difference was evident between the O-CHS4 treatment and the SI control. However, a marked variance was discerned between the E-CHS4 treatment and the SI control (Figure 2A). Another variable subjected to analysis for gauging the efficacy of VIGS treatments was the size of lesions arising from the fungus on plant stems. The average lesion size on *N. benthamiana* stems with E-CHS4 and O-CHS4 treatments measured 2 cm, whereas plants subject to the I treatment displayed lesions averaging 3 cm. SI control plants exhibited an average lesion

fue de 3 por planta. En las plantas sanas SI, el promedio de hojas perdidas fue de 2, esta caída natural fue consecuencia del daño mecánico realizado a la planta. Las plantas control de la infección con el hongo (I) el promedio de pérdida de hojas fue de 6. En el análisis estadístico se observó diferencia significativa en la caída de hojas entre los tratamientos E-CHS4, O-CHS4 y SI con el tratamiento I, pero no se observó diferencia significativa entre los tratamientos E-CHS4 y O-CHS4, así como tampoco se obtuvo diferencia significativa entre el tratamiento O-CHS4 con el control SI, pero si se observó diferencia significativa entre el tratamiento E-CHS4 con el control SI (Figura 2A). Otra variable analizada para establecer la eficiencia de los tratamientos con VIGS fue el tamaño de la lesión causada por el hongo en el tallo de las plantas. El tamaño

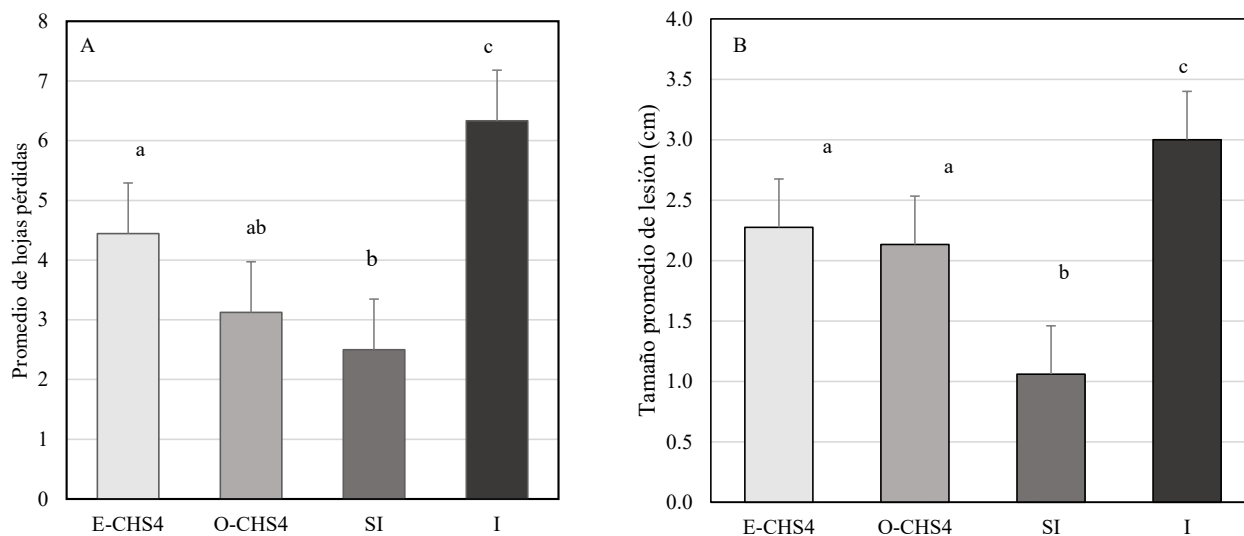


Figure 2. Number of leaves lost and average lesion size in cm, during E-CHS4 and O-CHS4 treatment with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4. A. Average number of leaves lost in *N. benthamiana* plants with E-CHS4 and O-CHS4 treatment, healthy control plants (SI) and plants inoculated with *Fusarium* sp. (I). B. Average lesion size in cm in plants with treatment E-CHS4, O-CHS4, SI and I. Letters above the bar indicate significant differences, with a Tukey's analysis test with a $p < 0.05$.

Figura 2. Número de hojas perdidas y tamaño promedio de lesión en cm, durante tratamiento E-CHS4 y O-CHS4 con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. A. Número promedio de hojas perdidas en plantas de *N. benthamiana* con el tratamiento E-CHS4 y O-CHS4, plantas control sana (SI) y plantas inoculadas con *Fusarium* sp. (I). B. Tamaño promedio de lesión en cm en plantas con el tratamiento E-CHS4, O-CHS4, SI e I. Las letras arriba de la barra indican las diferencias significativas, con una prueba de análisis de Tukey's con una $p < 0.05$.

size of 1 cm due to scalpel-induced mechanical damage. Statistical evaluation indicated that the mean lesion size did not display a significant difference between the E-CHS4 and O-CHS4 treatments. However, both treatments showed a substantial disparity when compared to the I plants solely infected with *Fusarium* sp. (Figure 2B). Collectively, these findings imply that treatments involving the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector can mitigate the symptoms triggered by *Fusarium* sp. in *N. benthamiana*. During the course of the experiment, other symptoms caused by the fungus were analyzed, such as loss of turgor, increased wilting and reduced plant growth. In Figure 3A line 1, it was observed that after 7dpB/12dpI, the I plants showed symptoms such as loss of turgor in the upper leaves and wrinkling and wilting of the

promedio de las lesiones en los tallos de *N. benthamiana* con los tratamientos E-CHS4 y O-CHS4 fue de 2 cm, mientras que las plantas con el tratamiento I tuvieron lesiones con un promedio de 3 cm y en las plantas control SI presentaron un tamaño de lesión promedio de 1 cm, este debido al daño mecánico realizado con el bisturí. El análisis estadístico mostró que el promedio del tamaño de la lesión no tuvo diferencia significativa entre los tratamientos E-CHS4 y O-CHS4, pero ambos tratamientos mostraron una diferencia significativa con las plantas I, aquellas únicamente infectadas con *Fusarium* sp. (Figura 2B). Estos resultados sugieren que los tratamientos con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 pueden atenuar los síntomas causados por *Fusarium* sp. en *N. benthamia*. Durante el curso del experimento se analizaron otros síntomas causados

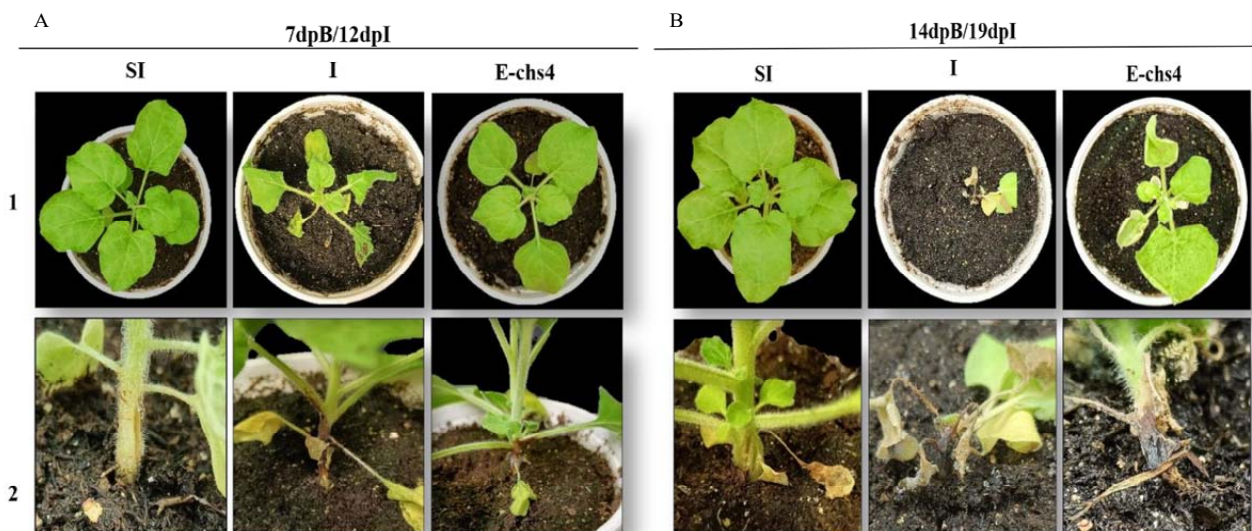


Figure 3. Symptom analysis in *N. benthamiana* plants inoculated with *Fusarium* sp. and subsequently inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4 (treatment E-CHS4). A. *N. benthamiana* plants at 7dpB/12dpI and B. *N. benthamiana* plants at 14dpB/19 dpI; SI: healthy control plants, I: plants inoculated with *Fusarium* sp. and E-CHS4: plants inoculated with *Fusarium* sp. and inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4. 1: Top view and 2: Side view of plants.

Figura 3. Análisis de síntomas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con *Fusarium* sp. y posteriormente inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 (tratamiento E-CHS4). A. Plantas de *N. benthamiana* a los 7dpB/12dpI y B. Plantas de *N. benthamiana* a los 14dpB/19 dpI; SI: plantas control sana, I: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. y E-CHS4: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. e inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. 1: Vista superior y 2: Vista lateral de las plantas.

same, while the plants with the E-CHS4 treatment showed physiological characteristics similar to the SI control plants (Figure 3A, line 1); however, wrinkling was presented in the upper leaves and a decrease in growth was observed compared to the plants with the SI control treatment. Stem necrosis was also observed (Figure 3A line 2). The effect on symptom attenuation was not permanent, since at 14 dpB/19 dpI (Figure 3B), the plants with the E-CHS4 treatment showed symptoms of wilting and wrinkling of the upper leaves, loss of leaf turgor and stem necrosis (Figure 3B line 1), specifically the stem necrosis presented characteristics similar to those observed in the I plants (Figure 3B line 2). In the O-CHS4 treatment, it was observed that the plants at 7 dpI/12 dpB showed a lower level of symptoms compared to the I plants and showed characteristics similar to the SI control plants (Figure 4A line 1), only damage was observed at the base of the stem (Figure 4A line 2). The decrease

por el hongo como pérdida de turgencia, aumento del marchitamiento y la reducción del crecimiento de las plantas. En la Figura 3A línea 1, se observó que después de los 7dpB/12dpI, las plantas I presentaron síntomas como la pérdida de turgencia de las hojas superiores y el arrugamiento y marchitamiento de las mismas, mientras que las plantas con el tratamiento E-CHS4 mostraron características fisiológicas similares a las plantas control SI (Figura 3A, línea 1); sin embargo, se presentó arrugamiento en las hojas superiores y se observó una disminución del crecimiento en comparación con las plantas con el tratamiento control SI. También se observó el necrosamiento en el tallo (Figura 3A línea 2). El efecto en la atenuación de los síntomas no fue permanente, ya que a los 14 dpB/19 dpI (Figura 3B), las plantas con el tratamiento E-CHS4 mostraron síntomas de marchitamiento y arrugamiento de las hojas superiores, pérdida de turgencia de las hojas y necrosamiento del tallo (Figura

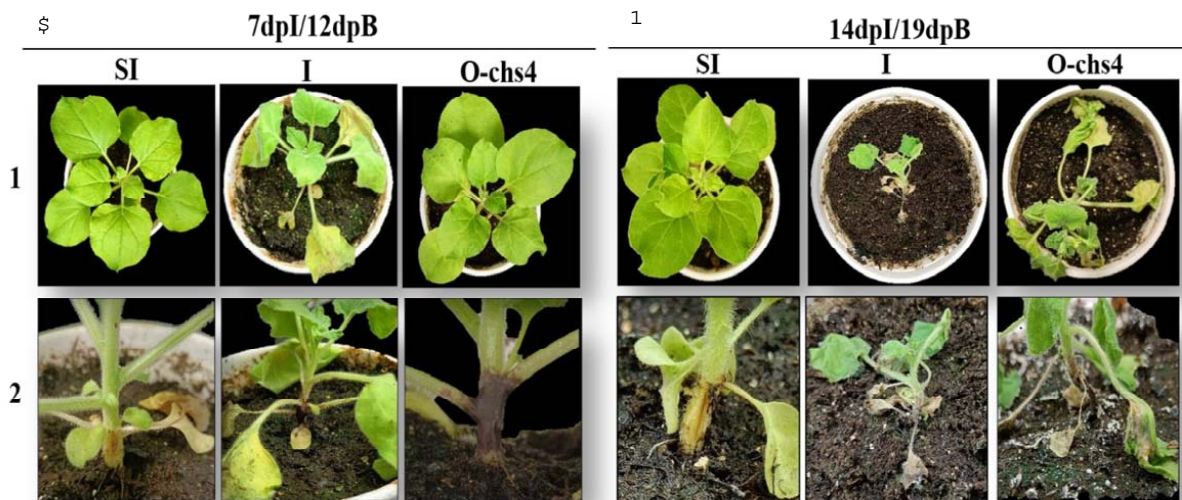


Figure 4. Symptom analysis in *N. benthamiana* plants inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4 and subsequently inoculated with *Fusarium* sp. (treatment O-CHS4). A. Plants at 7dpi/12dpB. B. Plants at 14 dpi and 19 dpB; SI: healthy control plants, I: plants inoculated with *Fusarium* sp and E-chs4: plants inoculated with *Fusarium* sp. and inoculated with the VIGS vector EuMV-YPΔCHS4. 1: Top view and 2: Side view of plants.

Figura 4. Análisis de síntomas en plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 y posteriormente inoculadas con *Fusarium* sp. (tratamiento O-CHS4). A. Plantas a los 7dpi/12dpB. B. Plantas con 14 dpi y 19 dpB; SI: plantas control sana, I: plantas inoculadas con *Fusarium* sp y E-chs4: plantas inoculadas con *Fusarium* sp. e inoculadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. 1: Vista superior y 2: Vista lateral de las plantas.

in symptoms in this treatment was not a permanent effect, since at 14 dpI/19 dpB (Figure 4B line 1), the symptoms of wilting and loss of leaf turgor increased and were similar to that observed in the fungal infection control plants I. The damage to the base of the stem of the plants with the O-CHS4 treatment was similar to that observed in the I plants (Figure 4B line 2). These results showed that the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector is capable of delaying symptoms in the *Fusarium sp.-N. benthamiana* interaction during the establishment of infection, but this effect is transient.

Relative expression of the *CHS4* gene of *Fusarium sp.* during its interaction with *N. benthamiana* plants. In plants subjected to the E-CHS4 treatment, it was observed that the expression of the *CHS4* gene increased fourfold after 7 dpB compared to the I control. However, at 14 dpB using the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, the relative expression of the *CHS4* gene decreased by 20% in comparison to the infected control (Figure 5). For plants treated with the O-CHS4 regimen, a reduction in the relative expression of *CHS4* by 30% was noted after 7 dpI in comparison to infected control plants. Nevertheless, at 14 dpI, the relative expression of the *CHS4* gene increased 2.5 times relative to the infected control (Figure 6). These findings suggest that the observed effects on the symptoms of E-CHS4 and O-CHS4 plants may be linked to the transient silencing of the *CHS4* gene, stemming from the presence of the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector and its replication within *N. benthamiana* plants.

DISCUSSION

In the plant-pathogen interaction, bidirectional exchange facilitates the establishment of pathogen

3B línea 1), específicamente el necrosamiento del tallo presentó características similares al observado en las plantas I (Figura 3B línea 2).

En el tratamiento O-CHS4, se observó que las plantas a los 7 dpI/12 dpB mostraron menor nivel de síntomas en comparación con las plantas I y mostraron características similares a las plantas control SI (Figura 4A línea 1), solo se observó el daño en la base del tallo (Figura 4A línea 2). La disminución de los síntomas en este tratamiento no fue un efecto permanente, ya que a los 14dpI/19dpB (Figura 4B línea 1), los síntomas de marchitamiento y pérdida de turgencia de las hojas aumentó y fue similar a lo observado en las plantas control de infección con el hongo I. El daño de la base del tallo de las plantas con el tratamiento O-CHS4 fue similar a lo observado en las plantas I (Figura 4B línea 2). Estos resultados mostraron que el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 es capaz de retrasar los síntomas en la interacción *Fusarium sp.-N. benthamiana*, durante el establecimiento de la infección, pero este efecto es transitorio.

Expresión relativa del gen *CHS4* de *Fusarium sp.* durante su interacción con plantas de *N. benthamiana*. En las plantas con el tratamiento E-CHS4 se observó que después de los 7 dpB la expresión del gen *CHS4* se incrementó cuatro veces más comparado con el control I, en cambio a los 14 dpB con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4, la expresión del gen *CHS4* disminuyó su expresión relativa un 20% con respecto al control infectado (Figura 5). En el caso de las plantas con el tratamiento O-CHS4 se observó una disminución en la expresión relativa de *CHS4* después de los 7 dpI, del 30% con respecto a las plantas control infectadas, sin embargo, a los 14 dpI la expresión relativa del gen *CHS4* aumentó 2.5 veces con respecto al control infectado (Figura 6). Estos resultados indican que el efecto observado en la sintomatología

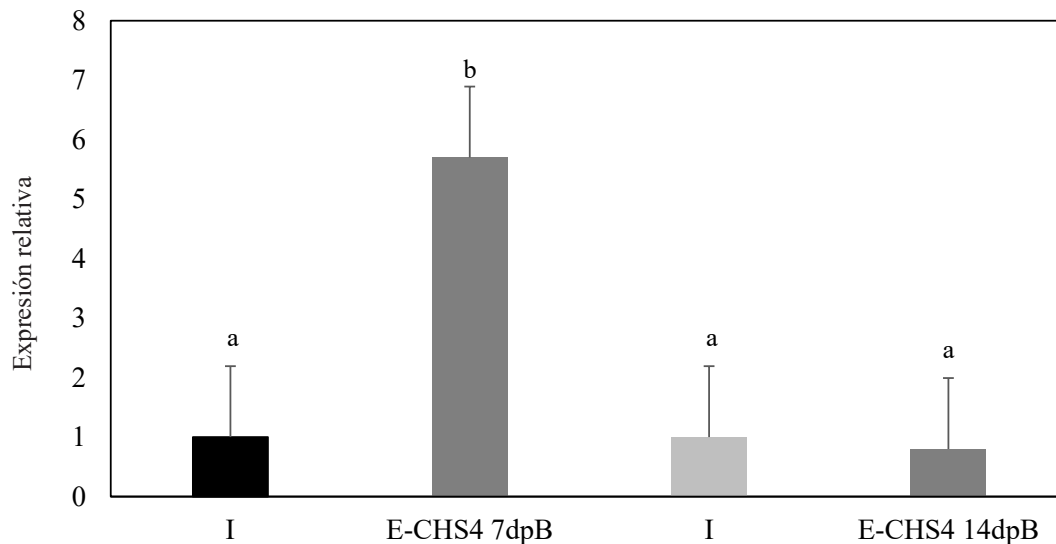


Figure 5. Relative quantification by qPCR analysis of the *CHS4* gene fragment of *Fusarium* sp. in plant stems with the E-CHS4 treatment. The *Fusarium* actin gene was used to normalize the data. E-CHS4 7dpB: relative *CHS4* expression in *Fusarium* sp. inoculated plants at 7 days with E-CHS4 treatment; E-CHS4 14dpB: relative *CHS4* expression in *N. benthamiana* plants with *Fusarium* sp. at 14 days with E-CHS4 treatment. I: Inoculated control plants.

Figura 5. Cuantificación relativa mediante análisis qPCR del fragmento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. en tallos de plantas con el tratamiento E-CHS4. Se empleó el gen de la actina de *Fusarium* para normalizar los datos. E-CHS4 7dpB: Expresión relativa de *CHS4* en plantas inoculadas con *Fusarium* sp. a los siete días con el tratamiento E-CHS4; E-CHS4 14dpB: expresión relativa de *CHS4* en plantas de *N. benthamiana* con *Fusarium* sp. a los 14 días con el tratamiento E-CHS4. I: Plantas control inoculadas.

infection and activation of host defense mechanisms (Cai *et al.*, 2019). This study assessed the impact of employing a VIGS vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula (EuMV-YP) to induce silencing of the *CHS4* gene of *Fusarium* sp. during its interaction with *N. benthamiana*. The results obtained demonstrated a reduction in symptoms among plants infected with *Fusarium* sp. and subjected to bombardment with the VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* vector. Importantly, this effect was achieved without generating stable transgenic plants or relying on fungal mutants, which are conventional methods employed for the analysis of fungal genes.

VIGS systems initially evolved as tools for plant gene analysis. However, the evolution of

de las plantas E-CHS4 y O-CHS4 puede estar relacionado con el silenciamiento transitorio del gen *CHS4*, producto de la presencia del vector VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* y su replicación en las plantas de *N. benthamiana*.

DISCUSIÓN

En la interacción planta-patógeno el intercambio bidireccional permite el establecimiento de una infección por parte del patógeno, así como la activación de la defensa del hospedero (Cai *et al.*, 2019). En este estudio, se evaluó el efecto de la aplicación de un vector VIGS basado en el *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán península (EuMV-YP),

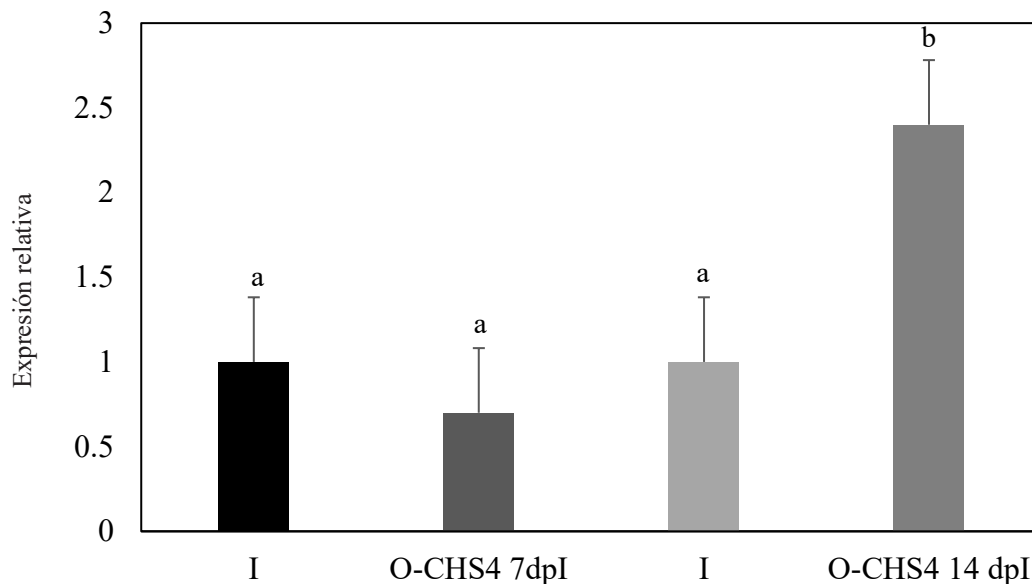


Figure 6. Relative quantification by qPCR analysis of the *CHS4* gene fragment of *Fusarium* sp. in plant stems with the O-CHS4 treatment. The *Fusarium* actin gene was used to normalize the data. O-CHS4 7dpI: relative *CHS4* expression in *N. benthamiana* plants with EuMV-YPΔ*CHS4* VIGS vector treatment seven days post inoculation with *Fusarium* sp.; O-CHS4 14 dpI: relative *CHS4* expression in *N. benthamiana* plants with EuMV-YPΔ*CHS4* vector treatment 14 days post inoculation with *Fusarium* sp. I: inoculated control plants.

Figura 6. Cuantificación relativa mediante análisis qPCR del fragmento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. en tallos de plantas con el tratamiento O-CHS4. Se empleó el gen de la *actina* de *Fusarium* para normalizar los datos. O-CHS4 7dpI: Expresión relativa de *CHS4* en plantas de *N. benthamiana* con tratamiento con el vector VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* siete días posterior a la inoculación con *Fusarium* sp.; O-CHS4 14 dpI: expresión relativa de *CHS4* en plantas de *N. benthamiana* con tratamiento con el vector EuMV-YPΔ*CHS4* 14 días posteriores a la inoculación con *Fusarium* sp. I: plantas control inoculadas.

novel protocols and viral vectors has demonstrated their applicability in fungi. These systems offer a direct and facile strategy, effectively curtailing costs and labor time (Tinoco *et al.*, 2010; Mascia *et al.*, 2014). Application of the VIGS EuMV-YPΔ*CHS4* vector yielded a reduction in the distinct symptoms induced by *Fusarium* sp. infection in *N. benthamiana* plants, including leaf drop and lesion size (Figure 2). Parallel outcomes were documented in studies leveraging HIGS (host-induced gene silencing) technology. For instance, in *A. thaliana*, plants expressing dsRNA against the lanosterol C-14 α -demethylase (*CYP5*) gene of *F. graminearum* remained symptom-free after

para inducir el silenciamiento del gen *CHS4* de *Fusarium* sp. durante la interacción con *N. benthamiana*. Los resultados obtenidos demostraron la disminución de síntomas en las plantas infectadas con *Fusarium* sp. y bombardeadas con el vector VIGS EuMV-YPΔ*CHS4*, sin la producción de plantas transgénicas estables o del uso de mutantes del hongo, que son los métodos empleados para el análisis de genes fúngicos.

Los sistemas VIGS son una herramienta desarrollada originalmente para el análisis génico en plantas, pero el desarrollo de nuevos protocolos y vectores virales han demostrado su utilidad para el análisis en hongos, como una estrategia directa

infection, unlike their non-transformed dsRNA-lacking counterparts. These plants displayed a mere 0.9% leaf area infected, in stark contrast to the 77% presented by untreated, infected controls, three days post-inoculation (Koch *et al.*, 2013). Conversely, wheat plants expressing dsRNA featuring a hairpin structure targeted at the chitin synthase 3 (*Chs3b*) gene of *F. graminearum* demonstrated subdued infection symptoms. Additionally, lesion length diminished from 8.5 mm to values ranging between 6.7 mm and 4.5 mm across all gene constructions evaluated (Cheng *et al.*, 2015). In the context of silencing technologies such as SIGS (Spray-induced gene silencing), Höfle *et al.* (2020) illustrated that applying dsRNA of varying lengths derived from the *CYP5* gene onto *A. thaliana* leaves resulted in up to an 82% reduction in *F. graminearum* infection symptoms, compared to controls. This outcome echoes our observations in this study utilizing VIGS. Here, the EuMV-YPΔCHS4 VIGS vector led to a decrease in lesion size from 3 cm, as seen in plants solely inoculated with *Fusarium* sp., to 2 cm. From these data, it is reasonable to infer that silencing mechanisms may elicit disparate responses and phenotypes, even when targeting genes with related functions or within the same fungal species.

While the HIGS technique has been introduced as a strategy for exploring fungal-plant interactions, it operates through the generation of transgenic plants capable of producing RNAi (Nowara *et al.*, 2010; Panwar *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015). This characteristic has limited its acceptance among consumers due to potential unknown environmental consequences (Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016). Consequently, the use of VIGS vectors emerges as an alternative mechanism to the HIGS system, forming part of the new generation of RNA-based fungicides (Padilla-Roji *et al.*, 2023).

The application of VIGS to silence the expression of fungal genes has been previously

y fácil de realizar, reduciendo costos y tiempo de trabajo (Tinoco *et al.*, 2010; Mascia *et al.*, 2014). La aplicación del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 disminuyó los síntomas característicos provocados por la infección con *Fusarium* sp. en plantas de *N. benthamiana*, como la caída de hojas y el tamaño de la lesión (Figura 2). Resultados similares se reportaron en trabajos en los que se aplica la tecnología HIGS (host inducing gene silencing), por ejemplo, en plantas de *A. thaliana* que expresaban un ARNs contra el gen de la citocromo P450 lanosterol C-14 α -demetilasa (*CYP5*) de *F. graminearum*, las plantas infectadas con el hongo no presentaron síntomas de infección en comparación con el control infectado sin transformar con el ARNs a los tres días después de la inoculación, además, mostraron un porcentaje de área foliar infectada de 0.9%, en contraste con el 77% que presentó el control infectado (Koch *et al.*, 2013). Por otro lado, en plantas de trigo que expresaban ARNs con estructura de horquilla para el gen de la quitina sintasa 3 (*Chs3b*) de *F. graminearum*, presentaron síntomas débiles de infección y una reducción en la longitud de la lesión de 8.5 mm a 6.7, 6.6, 5.7 y hasta 4.5 mm en todas las construcciones evaluadas para este gen (Cheng *et al.*, 2015). En el caso de tecnologías de silenciamiento como SIGS (Spray-induced gene silencing), Höfle *et al.* (2020), mostraron que la aplicación de ARNs del gen *CYP5* de diferentes longitudes en hojas de *A. thaliana* reducía los síntomas de infección por *F. graminearum* en hasta un 82% en comparación del control. Este resultado es comparable con lo observado en este trabajo empleando VIGS, donde se reportó una reducción del tamaño de la lesión de 3 cm presente en las plantas inoculadas únicamente con *Fusarium* sp. a 2 cm en las plantas que contenían el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. Con base en estos datos se sugiere que los mecanismos de silenciamiento presentarán diferentes respuestas y fenotipos, aún cuando se aplique a genes con actividades relacionadas o a la misma especie de hongo.

documented. *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) has served as a VIGS vehicle to express dsRNA targeting genes associated with the haustorium of *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* (Pst) (Yin *et al.*, 2011). These findings revealed that silencing was most effective in haustorium cells with greater contact with host cells (Yin *et al.*, 2011). Similarly, wheat plants employing BSMV as a VIGS tool were used to evaluate dsRNA targeting three *Puccinia triticina* (Pt) genes: *PtCYCI* (cyclophilin), *PtMAPK1* (a protein kinase), and *PtCNB* (a calcineurin regulatory subunit), all associated with pathogenicity. The study indicated that silencing any of these three target genes led to a reduction in lesion size during the infection process (Panwar *et al.*, 2013). In another instance, BSMV-mediated silencing of the *PstCFEM* effector gene in wheat plants resulted in decreased sporulation, leading to a significant reduction in fungal biomass and infection area (Bai *et al.*, 2022). In this study, the utilization of EuMV-YP as a VIGS vector resulted in observed reductions in foliar damage (leaf drop and wrinkling), as well as diminished lesion size following *Fusarium* sp. infection. These effects were attributed to the presence of the EuMV-YP Δ CHS4 VIGS vector. This suggests that VIGS vectors offer non-transgenic, environmentally friendly alternatives for studying and analyzing new tools against plant pathogens and insect pests (Coleman, 2016; Dinolfo *et al.*, 2017; Martín-Udíroz *et al.*, 2004), while also highlighting the application potential of EuMV-YP-based VIGS vectors.

Apart from the observed disparities in symptomatology between plants infected with *Fusarium* sp. and those treated with the VIGS EuMV-YP Δ CHS4 vector, compared to plants solely infected by *Fusarium* sp., notable silencing effects of up to 20% on the *CHS4* gene expression were evident in plants subjected to the E-CHS4

Si bien la técnica de HIGS se ha presentado como una estrategia para el estudio de la interacción hongo-planta, esta herramienta se realiza mediante la generación de plantas transgénicas capaces de producir ARNi (Nowara *et al.*, 2010; Panwar *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015), lo que provoca que tenga poca aceptación para su uso por los consumidores y poca confiabilidad debido al desconocimiento de sus repercusiones ambientales (Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016), por lo que el empleo de los vectores VIGS es un mecanismo alternativo al sistema HIGS, como parte de la nueva generación de fungicidas basados en ARNs (Padilla-Roji *et al.*, 2023).

Se ha reportado previamente la aplicación de VIGS para silenciar la expresión de genes de hongos, utilizando al *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) como vehículo VIGS, para expresar ARNs dirigidos a genes asociados al haustorio de *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* (Pst) (Yin *et al.*, 2011). Estos resultados mostraron que el silenciamiento fue más eficiente en las células del haustorio que estaban en mayor contacto con las células del hospedero (Yin *et al.*, 2011). Por otra parte, en plantas de trigo utilizando al BSMV como VIGS, se evaluaron ARNi contra tres genes de *Puccinia triticina* (Pt), el gen *PtCYCI* (cyclophilin), *PtMAPK1* (una proteína quinasa) y *PtCNB* (una unidad reguladora de calcineurina), los cuales participan en la patogenicidad. En este estudio se observó que el silenciamiento de cualquiera de los tres genes blanco produjo una disminución en el tamaño de la lesión ocasionada durante el proceso infectivo (Panwar *et al.*, 2013). Así mismo, el análisis del silenciamiento del efector PstCFEM de *Pst*, empleando BSMV en plantas de trigo, mostraron la reducción en la esporulación, lo que disminuyó significativamente la biomasa del hongo y el área de infección (Bai *et al.*, 2022). En este trabajo, empleando al EuMV-YP como vector VIGS, se observó la disminución del

treatment (Figure 5). Likewise, in plants treated with the O-CHS4 regimen, a significant silencing of 30% in the *CHS4* gene expression was evident (Figure 6). Nevertheless, the exclusive silencing of the *chitin synthase 4* gene proved insufficient to avert the progression of fungal infection, consequently leading to an inability for plant survival or recovery.

This loss of silencing effect could be attributed to the presence of multiple chitin synthases. It has been reported that disruptions in cell wall synthesis can trigger a compensatory response to safeguard fungal cell wall integrity. This response often involves heightened chitin synthesis through alternative chitin synthase members (Kappel *et al.*, 2020). Moreover, processes such as the overexpression of enzymes like deacetylases, which facilitate the conversion of chitin to chitosan, are also implicated (Kappel *et al.*, 2020). Furthermore, it's worth noting that the expression of one or more *chitin synthase* genes can be intricately tied to the developmental stage of the fungus (Roncero *et al.*, 2003; Kappel *et al.*, 2020). For instance, *F. oxysporum* mutants with single *chitin synthase* gene disruptions (1, 2, or 7) exhibited no discernible variations in colony morphology or chitin production when compared to the wild-type strain (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Conversely, the elimination of the *CHS5* gene in *F. oxysporum* strains led to swollen hyphae, demonstrating heightened sensitivity to H₂O₂ (Roncero *et al.*, 2003). This indicates that the loss of activity in a single *chitin synthase* gene can result in significant structural alterations. However, the impact of such loss on virulence or fungal development can vary across interactions. For instance, when an *F. oxysporum* strain with a lethal *CHS5* gene mutation infected tomato plants, it exhibited reduced efficiency in colonizing the tomato vascular system and slower growth (Madrid *et al.*, 2003). Conversely, the analysis of lethal

daño foliar (caída de las hojas y arrugamiento), así como la disminución del tamaño de la lesión por la infección con *Fusarium* sp., como efecto de la presencia del vector VIGS EuMV-YPΔCHS4. Lo anterior nos sugiere que la aplicación de vectores VIGS son alternativas no transgénicas, novedosas y amigables para el medio ambiente, así como para el estudio y análisis de nuevas herramientas contra el combate de patógenos y de plagas de insectos de plantas (Coleman, 2016; Dinolfo *et al.*, 2017; Martín-Udíroz *et al.*, 2004), así mismo, muestra las posibilidades de aplicación de vectores VIGS basados en el EuMV-YP.

Además de las diferencias observadas en la sintomatología de las plantas infectadas con *Fusarium* sp. y tratadas con el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 en comparación con las plantas que solo fueron infectadas con *Fusarium* sp., también se observó el silenciamiento de hasta el 20% en la expresión del gen *CHS4* en las plantas con el tratamiento E-CHS4 (Figura 5) y de 30% de silenciamiento en las plantas con el tratamiento O-CHS4 (Figura 6). Con todo, el silenciamiento de solo el gen de quitina sintasa 4 no fue suficiente para evitar el desarrollo de la infección del hongo y por lo tanto no permitió la supervivencia o recuperación de las plantas.

Este efecto de pérdida de silenciamiento puede estar relacionado con la multiplicidad de las quitinas sintasas, ya que se ha reportado que la perturbación en la síntesis de la pared puede desencadenar una respuesta compensatoria para garantizar la integridad de la pared celular de hongos, principalmente un aumento en la síntesis de quitina a través de otros miembros de las quitina sintasa (Kappel *et al.*, 2020); pero también están involucrados procesos como la sobre-expresión de enzimas como las desacetilasas, que permiten la conversión de quitina a quitosano (Kappel *et al.*, 2020). Además, se ha observado que la expresión de uno o más genes de quitina sintasa está relacionada con

mutant strains of the *CHS1* and *CHS2* genes of *F. oxysporum* didn't yield effects on chitin content or sporulation, and viable mutants of the *CHS3* gene couldn't be obtained (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). In another vein, Cheng *et al.* (2015) demonstrated the expression of *CHS3* constructs that silenced gene expression in *F. graminearum* during its interaction with wheat plants, resulting in a remarkable 61% reduction in infected spikes.

The disruption of the *CHS4* gene didn't induce phenotypic changes in *B. cinerea*. In other species such as *Aspergillus* sp. and *Neurospora crassa*, where *CHS4* has been identified as an enzyme with overlapping function, its removal didn't result in conspicuous morphological shifts in the fungal wall. However, it did lead to a reduction in wall chitin concentration (Din *et al.*, 1996). A divergent scenario is seen in *Saccharomyces cerevisiae*, where the *CHS4* gene's product accounts for 90% of the cell wall chitin production and is also intertwined with the modulation of the sexual cycle (Morcx *et al.*, 2013). Similarly, silencing the *CHS4* gene in *Penicillium chrysogenum* diminished its expression by 91%, subsequently causing reduced colony size and a decreased count of conidia (Liu *et al.*, 2013). In contrast, for fungal species such as *F. oxysporum*, isolating *CHS4* proved challenging. Only through *in silico* analysis using *F. graminearum* data could the existence of one or more *CHS4* genes in *F. oxysporum* be ascertained, along with its connection to *CHS7* (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Thus, the application of VIGS technology for the analysis of multiple or challenging-to-isolate genes obviates the need for complete elimination. This approach allows for the study of essential genes, mutation of which proves lethal (Mascia *et al.*, 2014). In this study, transient silencing of the *Fusarium* sp. *CHS4* gene was achieved using VIGS. This transient silencing permits the examination of its plausible role in the infection process in *N. benthamiana*, and

la etapa de desarrollo del hongo (Roncero *et al.*, 2003; Kappel *et al.*, 2020). Por ejemplo: mutantes de *F. oxysporum* en un solo gen quitina sintasa (1, 2 o 7) no mostraron diferencias en la morfología de las colonias o la producción de quitina comparadas con la cepa silvestre (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Mientras que la eliminación del gen *CHS5* en cepas de *F. oxysporum* mostraron hifas hinchadas e hipersensibles al H₂O₂ (Roncero *et al.*, 2003), demostrando que la pérdida de actividad de un solo gen de quitina sintasa puede generar cambios estructurales importantes, mientras que en otras interacciones está perdida puede no influenciar en la virulencia o desarrollo del hongo: por ejemplo, en plantas de jitomate infectadas con una cepa de *F. oxysporum* con una mutante letal del gen *CHS5*, mostró una disminución en su capacidad para colonizar eficientemente el sistema vascular del jitomate, además de presentar menor tasa de crecimiento (Madrid *et al.*, 2003), mientras que el análisis de cepas mutantes letales de los genes *CHS1* y *CHS2* de *F. oxysporum* no generaron efectos en el contenido de quitina ni en la esporulación, además de que fue imposible obtener una mutante viable del gen *CHS3* (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Por otro lado, Cheng *et al.* (2015), expresaron construcciones del *CHS3* que silenciaron la expresión del gen en *F. graminearum* durante su interacción en plantas de trigo, lo que resultó en un 61% menos de espigas infectadas.

Por otro lado, la interrupción del gen *CHS4* no provocó cambios en el fenotipo de *B. cinerea*, pero en especies como *Aspergillus* sp. y *Neurospora crassa*, donde se ha reportado como una enzima con actividad redundante, su eliminación no produjo cambios morfológicos aparentes en la pared del hongo, pero generó una disminución en la concentración de quitina de la pared (Din *et al.*, 1996). En *Saccharomyces cerevisiae*, por el contrario, el producto del gen *CHS4*, es el responsable de la producción del 90% de la quitina de la pared

it also proposes the potential utilization of EuMV-YP-based VIGS vectors for the analysis of other genes within this gene family.

In both the E-CHS4 and O-CHS4 treatments, noticeable alleviation of symptoms was observed in *Fusarium* sp.-infected plants, irrespective of the timing of VIGS EuMV-YP Δ CHS4 vector inoculation. Prior studies by Villanueva-Alonzo *et al.* (2013) and Luna-Rivero *et al.* (2016) showcased the systemic and uniform movement of the pEuMV-YP: Δ AV1 vector during infection. This trait facilitates the evaluation of gene fragment replication. Thus, the observed silencing of the *Fusarium* sp. CHS4 gene could be attributed to the translocation of RNAi from the infection site in *N. benthamiana* to encompass the entire plant and fungal cells. This systemic movement advantage characterizes VIGS-mediated silencing as distinct from other RNAi strategies in plants, where RNAi can traverse the organism systematically from the site of inoculation (Mascia *et al.*, 2014).

A plethora of studies underscore the bidirectional exchange of RNAs and RNAi across diverse kingdoms during plant-pathogen interactions. This process empowers pathogens to curtail plant defenses while concurrently furnishing plants with up to 60% disease resistance (Mapuranga *et al.*, 2023). The bidirectional nature of this exchange engenders evidence of such phenomena. For instance, Zhang *et al.* (2016) noted that when isolating the fungus *Verticillium dhaliae* from cotton plants, the obtained microRNA sequences primarily aligned with cotton microRNA sequences rather than those of the fungus. This observation implies that these RNAs were transported from cotton to the fungus during the infection process.

Likewise, evidence of the capacity of *B. cinerea* fungal cells to absorb plant exosomes emerged via *in vitro* exposure of the fungus to TET8-GFP-labeled exosomes from *A. thaliana*. The uptake

celular y además está relacionado con el cambio en el ciclo sexual (Morcx *et al.*, 2013). Así mismo, el silenciamiento del gen CHS4 de *Penicillium chrysogenum*, disminuyó 91% de la expresión del gen lo que resultó en la reducción del tamaño de la colonia y del número de conidios (Liu *et al.*, 2013). Por lo contrario, en especies de hongos como *F. oxysporum*, el aislamiento de CHS4 no fue posible y solo mediante análisis *in silico* con datos de *F. graminearum*, se determinó la existencia de uno o más genes CHS4 en *F. oxysporum*, así como su relación con CHS7 (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Por ello, el análisis de genes múltiples o genes difíciles de aislar mediante la tecnología VIGS evita la necesidad de eliminarlos completamente, lo que permite estudiar genes esenciales, cuya mutación es letal (Mascia *et al.*, 2014). En este trabajo, mediante VIGS se observó el silenciamiento transitorio de CHS4 de *Fusarium* sp., lo que permite analizar su posible participación en el proceso de infección en *N. benthamiana* y sugiere la posible aplicación de vectores VIGS basados en EuMV-YP, para el análisis de otros genes pertenecientes a esta familia.

Con respecto a los resultados obtenidos en ambos tratamientos, E-CHS4 y O-CHS4, se observó una disminución de los síntomas en las plantas infectadas con el hongo, independientemente del momento de inoculación con el vector VIGS EuMV-YP Δ CHS4. Previamente, Villanueva-Alonzo *et al.* (2013) y Luna-Rivero *et al.* (2016) demostraron que el vector pEuMV-YP: Δ AV1 se mueve de manera sistémica y uniforme durante la infección, permitiendo la replicación del fragmento del gen a evaluar, por lo que el silenciamiento observado del gen CHS4 de *Fusarium* sp. puede deberse al movimiento de los ARNi del sitio de infección en *N. benthamiana* hacia toda la planta y a las células del hongo. Esta es una ventaja del silenciamiento mediado por VIGS sobre otros enfoques de ARNi en las plantas, donde los ARNi pueden moverse de

of exosomes by fungal cells was confirmed as they were found inside the fungal cells two hours after exposure, persisting until cellular lysis with Triton X-100 (Cai *et al.*, 2018). Additionally, studies have indicated that spraying dsRNA onto barley leaves impeded *F. graminearum* infection by approximately 50% through constructs targeting *AGO* and *DCL* genes. Notably, these genes contribute not only to silencing but also to mycotoxin production and disease progression in *F. graminearum*. This observation highlights fungal pathogens' ability to absorb environmental RNA (Werner *et al.*, 2020).

The achieved results underscore that VIGS technology facilitates gene analysis in plant-fungus interactions without necessitating protocols for fungal transformation or generation of transgenic plants, unlike methodologies such as HIGS (Hua *et al.*, 2018). Moreover, it obviates the reliance on obtaining resistant cultivars and mitigates the risk of instability inherent to dsRNA-based SIGS methodologies (Hua *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

The VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, derived from EuMV-YP, exhibited the capacity to partially suppress the *CHS4* gene amid the *Fusarium* sp. infection in *N. benthamiana* plants. The principal consequence of silencing, brought about by the VIGS EuMV-YPΔCHS4 vector, lay in the alleviation of symptoms. These included diminished leaf drop, reduced lesion size on the stem, and a curbed loss of turgor in the plants. The assessment of this VIGS vector within the context of plant-pathogen interaction illuminates its potential in deciphering gene significance in fungal viability and pathogenicity.

manera sistémica desde el sitio de inoculación hacia todo el organismo (Mascia *et al.*, 2014).

Diversos estudios han demostrado que el intercambio de ARNs y ARNi entre diferentes reinos durante la interacción planta-patógeno, es un proceso bidireccional que permite a los patógenos suprimir la defensa de las plantas, pero que también proporciona a las plantas resistencia a las enfermedades hasta en un 60% (Mapuranga *et al.*, 2023). Al ser un proceso bidireccional entre patógeno y hospedero, es posible encontrar evidencia de estos intercambios, por ejemplo: Zhang *et al.* (2016), reportaron que al aislar el hongo *Verticillium dahliae* de plantas de algodón, obtuvieron secuencias de microARN que eran compatibles principalmente con secuencias de microARN de algodón más que con el hongo, lo que sugiere que estos ARNs se transportaron del algodón al hongo durante el proceso de infección. En otro reporte se demostró la capacidad de las células fúngicas de *B. cinerea* para absorber exomas de plantas, a través de la exposición *in vitro* del hongo con exomas de *A. thaliana* marcados con TET8-GFP (un marcador específico de exomas, similar al observado en mamíferos). Se concluyó que después de dos horas los exomas se encontraban dentro de las células fúngicas y se mantuvieron hasta que éstas fueron lisadas con Tritón X-100 (Cai *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado que la aspersión de ARNs sobre hojas de cebada inhibió cerca del 50% de la infección con *F. graminearum* mediante construcciones cuyo blanco fueron los genes *AGO* y *DCL* (genes que además de participar en el silenciamiento, en *F. graminearum* contribuyen en la producción de micotoxinas y en el desarrollo de la enfermedad en la planta); esto demuestra la capacidad de los patógenos fúngicos para absorber los ARN del ambiente (Werner *et al.*, 2020).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the FORDECYT project titled “Generation of scientific-technological strategies with a multidisciplinary and inter-institutional approach to address the threat posed by ambrosia complexes in the agricultural and forestry sectors of Mexico” (#No. 292399). We would like to acknowledge the doctoral scholarship awarded to Nidia Esther Hau Yama by the National Council of Science and Technology “CONACYT” (CVU: 694530). Our gratitude goes to IQI. Alberto Cortés Velázquez for his assistance with qPCR and to M.C. Bartolomé Chí Manzanero (qepd) for his contributions in caring for the fungus.

CITED LITERATURE

- Bai X, Peng H, Goher F, Islam MA, Xu S, Guo J, Kang Z and Guo J. 2022. A candidate effector protein PstCFEM1 contributes to virulence of stripe rust fungus and impairs wheat immunity. *Stress Biology* 2: 21. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00042-5>
- Baulcombe DC. 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* 2(2): 109–113. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80022-3)
- Baulcombe DC. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431(1): 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
- Becker A and Lange M. 2010. VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15(1): 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.002>
- Bekele D, Tesfaye K and Fikre A. 2019. Applications of virus induced gene silencing (VIGS) in plant functional genomics studies. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology* 7(1): 1–7. <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000229>
- Cai Q, He B, Weiberg A, Buck AH and Jin H. 2019. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLoS Pathogens* 15(12): 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008090>
- Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin FM, Palmquist J, Huang SD and Jin H. 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360(6393): 1126-1129. <https://doi.org/10.1126/ciencia.aar4142>
- Carreras-Villaseñor N, Rodríguez-Haas JB, Martínez-Rodríguez LA, Pérez-Lira AJ, Ibarra-Laclette E, Villafán E, Castillo-Díaz AP, Ibarra-Juárez LA, Carrillo-Hernández ED and Sánchez-Rangel D. 2022. Characterization of two *Fusarium solani* species complex isolates from the ambrosia beetle *Xylosandrus morigerus*. *Journal of Fungi* 8(3): 231. <https://doi.org/10.3390/jof8030231>
- Chen W, Kastner C, Nowara D, Oliveira-Garcia E, Rutten T, Zhao Y, Deising HB, Kumléhn J and Schweizer P. 2016.

Los resultados obtenidos mostraron que la tecnología VIGS permite el análisis de un gen durante la interacción planta-hongo, sin la necesidad de desarrollar protocolos para la transformación de hongos o la generación de plantas transgénicas, como sucede con metodologías como HIGS (Hua *et al.*, 2018), así como evitar la dependencia a la obtención de cultivares resistentes o el riesgo de la inestabilidad que pueden presentar los ARNs en la metodología SIGS (Hua *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

El vector VIGS EuMV-YPΔCHS4, basado en el EuMV-YP, tuvo la capacidad de silenciar parcialmente al gen *CHS4*, durante el proceso infectivo de *Fusarium* sp. en plantas de *N. benthamiana*. El principal efecto del silenciamiento provocado por el vector VIGS EuMV-YPΔCHS4 fue la reducción de síntomas como menor caída de hojas, disminución del tamaño de la lesión en tallo, así como menor pérdida de turgencia en las plantas. La evaluación de este vector VIGS durante la interacción planta- patógeno, demuestra su potencial para estudiar la importancia de los genes en la viabilidad o patogenicidad de los hongos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto FORDECYT “Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México” (#No. 292399). Agradecemos la beca de doctorado otorgada a Nidia Esther Hau Yama (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “CONACYT”, CVU:694530). Agradecemos al IQI. Alberto Cortés Velázquez por su apoyo con el qPCR y al M.C Bartolomé Chí Manzanero (qepd) por su apoyo en el cuidado del hongo.

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



- Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. *Journal of Experimental Botany* 67(17): 4979–4991. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw263>
- Cheng W, Song XS, Li HP, Cao LH, Sun K, Qiu XL, Xu YB, Yang, P, Huang T, Zhang JB, Qu B and Liao YC. 2015. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 13(9): 1335–1345. <https://doi.org/10.1111/pbi.12352>
- Coleman JJ. 2016. The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology* 17(2): 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
- Delgado-Baquerizo M, Guerra CA, Cano-Díaz C, Egidí E, Wang JT, Eisenhauer N, Singh BK and Maestre FT. 2020. The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. *Nature Climate Change* 10(6): 550–554. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0759-3>
- Din AB, Specht CA, Robbins P.W and Yarden O. 1996. Chs-4, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics MGG* 250(2): 214–222. <https://doi.org/10.1007/BF02174181>
- Dinolfo MI, Castañares E and Stenglein SA. 2017. *Fusarium*–plant interaction: state of the art – a review. *Plant Protection Science* 53(2): 61–70. <https://doi.org/10.17221/182/2015-PPS>
- Fernandez-San Millan A, Larraya L, Farran I, Ancin M and Veramendi J. 2021. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts. *Biological Control* 160: 104683. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104683>
- Geoghegan I, Steinberg G and Gurr S. 2017. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. *Trends in Microbiology* 25(12): 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.015>
- Gerard GF, Fox DK, Nathan M and D’Alessio JM. 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Molecular Biotechnology* 8(1):61-77. <https://doi.org/10.1007/BF02762340>
- Ghag SB, Shekhawat UKS, and Ganapathi TR. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal* 12(5): 541–553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Hall TA. 1999. BioEdit a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98. [https://www.academia.edu/2034992/BioEdit\\_a\\_user\\_friendly\\_biological\\_sequence\\_alignment\\_editor\\_and\\_analysis\\_program\\_for\\_Windows\\_95\\_98\\_NT](https://www.academia.edu/2034992/BioEdit_a_user_friendly_biological_sequence_alignment_editor_and_analysis_program_for_Windows_95_98_NT)
- Höfle L, Biedenkopf D, Werner BT, Shrestha A, Jelonek L and Koch A. 2020. Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. *RNA biology* 17(4): 463–473. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1700033>
- Hua C, Zhao JH and Guo HS. 2018. Trans-kingdom RNA silencing in plant–fungal pathogen interactions. *Molecular plant* 11(2): 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.001>
- Kappel L, Münsterkötter M, Sipos G, Rodriguez CE and Gruber S. 2020. Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLoS Pathogens* 16(2): e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320>
- Koch A, Kumar N, Weber L, Keller H, Imani J and Kogel KH. 2013. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(48): 19324–19329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306373110>
- Lange M, Yellina AL, Orashakova S and Becker A. 2013. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. Pp: 1-14. *In: Becker A(ed). Virus-Induced gene silencing: Methods and protocols; Methods in molecular biology, Humana Press. Gieben, Alemania. 975p.* [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-278-0_1)
- Larson TM, Kendra DF, Busman M and Brown DW. 2011. *Fusarium verticillioides* chitin synthases *CHS5* and *CHS7* are required for normal growth and pathogenicity. *Current Genetics* 57(3): 177–189. <https://doi.org/10.1007/s00294-011-0334-6>
- Lenardon MD, Munro CA and Gow NAR. 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 13(4): 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>
- Liu H, Wang P, Gong G, Wang L, Zhao G and Zheng Z. 2013. Morphology engineering of *Penicillium chrysogenum* by RNA silencing of chitin synthase gene. *Biotechnology Letters* 35(3): 423–429. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1099-9>
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luna-Rivero MS, Hernández-Zepeda C, Villanueva-Alonzo H, Minero-García Y, Castell-González SE and Moreno-Valenzuela OA. 2016. Expression of genes involved in the salicylic acid pathway in type h1 thioredoxin transiently silenced pepper plants during a begomovirus compatible interaction. *Molecular Genetics and Genomics* 291(2): 819–830. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1148-x>
- Madrid MP, Di Pietro A and Roncero MIG. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular Microbiology* 47(1): 257–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03299.x>
- Majumdar R, Rajasekaran K and Cary JW. 2017. RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science* 8: 200. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00200>
- Martin-Udrioz M, Madrid MP and Roncero MIG. 2004. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150(10): 3175–3187. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27236-0>
- Mascia T, Nigro F, Abdallah A, Ferrara M, de Stradis A, Faedda R, Palukaitis P and Gallitelli D. 2014. Gene silencing and

- gene expression in phytopathogenic fungi using a plant virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(11): 4291–4296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315668111>
- Mapuranga J, Chang J, Zhang L, Zhang N, Yang W. 2022. Fungal secondary metabolites and small RNAs enhance pathogenicity during plant-fungal pathogen interactions. *Journal Fungi* 20;9(1):4. <https://doi.org/10.3390/jof9010004>
- Morcx S, Kunz C, Choquer M, Assie S, Blondet E, Simond-Côte E, Gajek K, Chapeland-Leclerc F, Expert D and Soulie MC. 2013. Disruption of *Bcchs4*, *Bcchs6* or *Bcchs7* chitin synthase genes in *Botrytis cinerea* and the essential role of class VI chitin synthase (*Bcchs6*). *Fungal Genetics and Biology* 52: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.11.011>
- Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J and Schweizer P. 2010. HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* 22(9): 3130–3141. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077040>
- Pacheco-Arjona JR and Ramirez-Prado JH. 2014. Large-scale phylogenetic classification of fungal chitin synthases and identification of a putative cell-wall metabolism gene cluster in aspergillus genomes. *PLoS ONE* 9(8): e104920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104920>
- Padilla-Roji I, Ruiz-Jiménez L, Bakhat N, Vielba-Fernández A, Pérez-García A and Fernández-Ortuño D. 2023. RNAi Technology: A new path for the research and management of obligate biotrophic phytopathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 24(10): 9082. <https://doi.org/10.3390/ijms24109082>
- Panth M, Hassler SC and Baysal-Gurel F. 2020. Methods for management of soilborne diseases in crop production. *Agriculture* 10(1): 16. <https://doi.org/10.3390/agriculture10010016>
- Panwar V, McCallum B and Bakkeren G. 2013. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. *Plant Molecular Biology* 81(6): 595–608. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0022-7>
- Roncero MIG, Hera C, Ruiz-Rubio M, García-Maceira FI, Madrid MP, Caracuel Z, Calero F, Delgado-Jarana J, Roldán-Rodríguez R, Martínez-Rocha AL, Velasco C, Roa J, Martín-Urdiroz M, Córdoba D and Di Pietro A. 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62(2): 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00043-2)
- RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated development environment for R. Rstudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>
- Sampaio AM, de Sousa Araújo S, Rubiales D and Patto MCV. 2020. *Fusarium* wilt management in legume crops. *Agronomy* 10(8): 1073. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081073>
- Sharma IP and Sharma AK. 2020. *Trichoderma–Fusarium* Interactions: A Biocontrol Strategy to Manage Wilt pp. 167–185. *In: Sharma, A. K and Sharma, P. (eds). Trichoderma: Host pathogen interactions and applications*, Springer nature Singapore. Pantnagar, Uttarakhand, India. 331p. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_9)
- Summerell BA. 2019. Resolving *Fusarium*: Current status of the genus. *Annual Review of Phytopathology* 57(1): 323–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tinoco MLP, Dias BBA, Dall’Astta RC, Pamphile JA and Aragão FJL. 2010. *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC Biology* 8(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-27>
- Van Kammen A. 1997. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science* 2(11): 409–411. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01128-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01128-X)
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, López-Ochoa LA, Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-García Y and Moreno-Valenzuela OA. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters* 35(5): 811–823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>
- Wang M, Weiberg A, Dellota E, Yamane D and Jin H. 2017. *Botrytis* small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology* 14(4): 421–428. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1291112>
- Wang M, Weiberg A, Lin FM, Thomma BPHJ, Huang H Da and Jin H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* 2(10), 1–10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
- Weiberg A, Bellinger M and Jin H. 2015. Conversations between kingdoms: Small RNAs. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.025>
- Werner BT, Gaffar FY, Schuemann J, Biedenkopf D and Koch AM. 2020. RNA-spray-mediated silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL genes improve barley disease resistance. *Frontiers in Plant Science* 11:476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00476>
- Yin C, Jurgenson JE and Hulbert SH. 2011. Development of a Host-Induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(5): 554–561. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-10-0229>
- Zhang T, Zhao Y-L, Zhao J-H, Wang S, Jin Y, Chen Z-Q, Fang Y-Y, Hua C-L, Ding S-W and Guo HS. 2016. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants* 2(10): 16153. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>
- Zhu C, Liu T, Chang YN and Duan CG. 2019. Small RNA functions as a trafficking effector in plant immunity. *International Journal of Molecular Sciences* 20(11): 2816. <https://doi.org/10.3390/ijms20112816>