

# DESARROLLO DE UNA ALTA PROTECCIÓN FRENTE A HONGOS Y OOMYCETES EN PLANTAS MEDIANTE GENES INVOLUCRADOS EN LA INHIBICIÓN DE PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS

**Ingrid Hernández Estévez, Roxana Portieles Álvarez, Yussuan Silva, Merardo Pujol Ferrer, Osvaldo Oliva Borbón y Orlando Borrás-Hidalgo<sup>1</sup>**

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Ave 31 entre 158 y 190. Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162. Fax: 273 1779. Teléfono: 271 6022 Ext. 3151

Otra entidad participante: Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT)

<sup>1</sup> Autor de correspondencia. Correo electrónico [orlando.borras@cigb.edu.cu](mailto:orlando.borras@cigb.edu.cu)

**Dr. Orlando Borrás Hidalgo** (18%). Participó en el diseño y ejecución de toda la investigación, así como en la escritura de las publicaciones que avalan la propuesta.

**MSc. Ingrid Hernández Estévez** (17%). Análisis de función del gen de la PGIP.

**MSc. Roxana Portieles Álvarez** (17%). Análisis de función del gen de la NmIMSP.

**MSc. Yussuan Silva** (16%). Participó en el diseño y ejecución de las evaluaciones de resistencia a enfermedades en condiciones de casas verdes.

**MSc. Merardo Pujol Ferrer** (16%). Participó en el diseño de la investigación.

**MSc. Osvaldo Oliva Barbón** (16%). Ejecución de las evaluaciones de resistencia a enfermedades en condiciones de casas verdes.

## RESUMEN

Las enfermedades producidas por hongos y oomycetes constituyen las mayores limitantes en la producción de cultivos de interés agrícola en Cuba y el resto del mundo. Buscar alternativas a través de herramientas biotecnológicas para el control de este tipo de enfermedades constituye el mayor reto de los investigadores relacionados con el tema. Las plantas en la naturaleza están expuestas a estrés biótico y resisten a la infección de los patógenos mediante la activación rápida del sistema de inmunidad innato. Una activación eficiente de la respuesta de resistencia depende de la detección o inhibición rápida de patrones moleculares conservados en muchos tipos de patógenos. Los patrones moleculares asociados a patógenos como las proteasas y las poligalacturonasas constituyen mecanismos de patogenicidad utilizados por los patógenos en los inicios de la infección para vencer las defensas iniciales de la planta. El presente trabajo muestra el uso de inhibidores de proteasas y poligalacturonasas de patógenos para la resistencia de amplio espectro a enfermedades producidas por hongos y oomycetes en plantas. La expresión de un inhibidor de poligalacturonasas en plantas de tabaco permitió obtener por primera vez altos niveles de resistencia a patógenos en condiciones de campo. Por otra parte, se identificó, caracterizó y analizó la función de un nuevo inhibidor de proteasa de patógenos. Este inhibidor confirió altos niveles de resistencia a oomycetes patógenos de plantas. Los resultados del trabajo fueron publicados en revistas de alto factor de impacto como *Frontiers in Plant Science* y *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Se presentó en eventos nacionales e internacionales y tiene el reconocimiento de importantes especialistas internacionales en la temática.

## COMUNICACIÓN CORTA

### Resultados y discusión

Durante la evolución, las plantas desarrollan estrategias que les permiten reconocer a los patógenos que las invaden y desencadenar una defensa efectiva. De la misma forma, los patógenos poseen mecanismos que les posibilitan evadir y/o suprimir las respuestas defensivas de la planta. Las plantas son resistentes a la mayoría de los microorganismos patógenos mediante un mecanismo de defensa basal, denominado sistema de inmunidad innata. Esta respuesta inmune se activa después del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs), los cuales incluyen proteínas, enzimas, péptidos, carbohidratos y lípidos. En esencia, existen dos líneas de acción del sistema inmune de las plantas.

La primera, utiliza receptores o inhibidores de los PMAPs. La segunda, actúa mayormente dentro de la célula y emplea las proteínas polimórficas con sitio de unión a nucleótidos y repeticiones de leucina (NBSLRR), codificadas por la mayoría de los genes de resistencia (R). Diversos autores explican el sistema

inmune de las plantas a través de un modelo denominado "ZIG-ZAG". En la fase uno, los PMAPs son detectados por receptores o neutralizados por inhibidores del hospedante, con la activación de una inmunidad inducida por los PMAPs (IIP), lo que puede detener la nueva colonización de la planta por el patógeno. En la segunda fase, un efector determinado, es específicamente reconocido por una de las proteínas NBS-LRR, lo que trae como resultado una inmunidad activada por efectores (IAEs).

Es importante señalar que la resistencia mediada por PMAPs es la más estable en el tiempo y de amplio espectro, lo cual la hace más atractiva para la búsqueda de una resistencia más eficiente. En el trabajo se muestran los resultados del empleo de dos mecanismos que contribuyen a la resistencia a enfermedades mediada por inhibidores de PMAPs, los cuales confieren una resistencia de amplio espectro frente a hongos y oomycetes patógenos de plantas.

#### *Proteína inhibidora de poligalacturonasas (PvPGIP2).*

Las paredes celulares de plantas constituyen la primera línea de defensa contra los microorganismos. La mayoría de los microorganismos patógenos producen enzimas que degradan la pared celular (EDPC) que son especialmente importantes para estos patógenos que carecen de estructuras de penetración especializadas. Entre los diferentes EDPC producidas por los hongos, las poligalactorunasas (PG) juegan un papel importante en las etapas iniciales de las enfermedades. Las proteínas inhibidoras de las PG (PIPG) son proteínas bien caracterizadas que reconocen las PG de microorganismos e interfieren con la degradación de las paredes celulares de plantas durante el ataque de patógenos.

Ellas no solo inhiben a las PG y retardan la hidrólisis de las pectinas sino que también favorecen la acumulación de oligogalacturónidos (OG), una clase de patrones moleculares asociados a daños que como los PMAPs, activan el sistema de inmunidad innata de las plantas. En el trabajo se evaluó si la proteína inhibidora de PG (PvPGIP2) de *Phaseolus vulgaris* protege al tabaco contra un importantes patógenos como el hongo *Rhizoctonia solani* y los oomycetes *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. Se propone que el uso de la PvPGIP2 es una herramienta poderosa de ingeniería de amplio espectro para la resistencia a enfermedades.

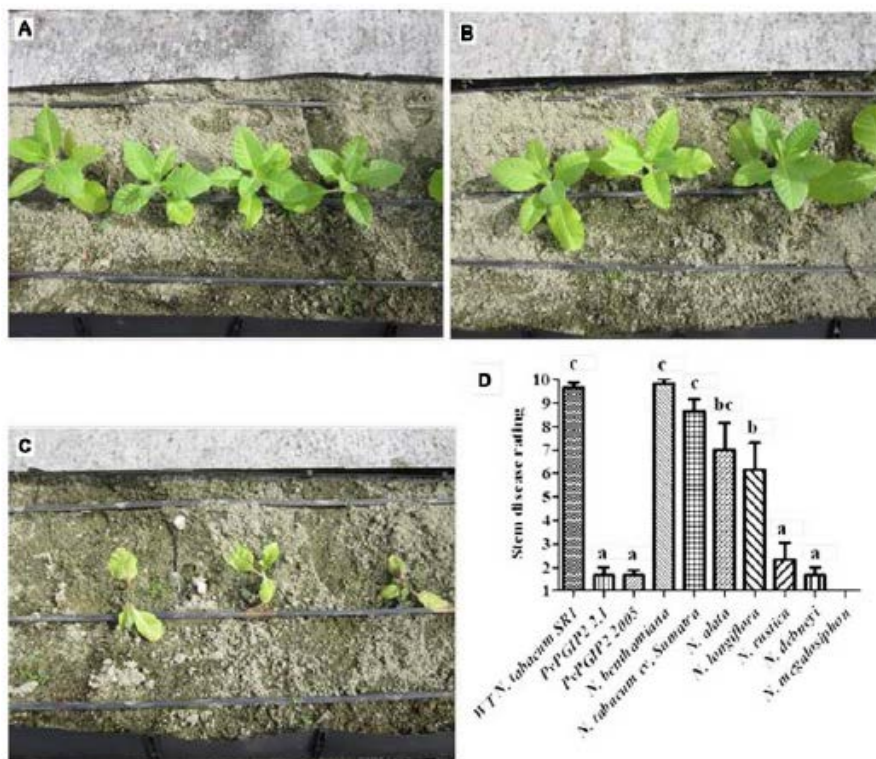
**Tabla 1.** Reacción de plantas de tabaco expresando la PvPGIP2 frente a *Rhizoctonia solani* en condiciones naturales y de casas verdes.

Nombre del genotipo	Incidencia de la Enfermedad (%) <sup>a</sup>			
	Muerte de las plántulas		Pudrición del tallo	
	CV	CN	CV	CN
<i>Nicotiana tabacum</i> SR1 expresando <i>Pvpgip2</i> línea 2.1	16.3	2.3	14.2	1.8
<i>Nicotiana tabacum</i> SR1 expresando <i>Pvpgip2</i> línea 2005	15.8	1.9	17.2	1.1
<i>Nicotiana tabacum</i> SR1	42.4	27.8	52.8	24.4
Coefficiente de Variación (%)	6.2	1.1	7.1	2.1

<sup>a</sup> Arcoseno- porcentaje transformado de la incidencia de la enfermedad, N=50 CV: casas verdes, CN: condición natural

Bajo condiciones de casas verdes, los síntomas principales causados por *R. solani* en el control fueron lesiones pequeñas en el tallo. Las lesiones expandidas por el tallo causaron que el tejido se tornara carmelita y muriera. Los síntomas de la enfermedad fueron severos en los controles y muy limitados y menos visibles en las líneas de tabaco expresando la PvPGIP2 (Tabla 1). Por otra parte, el desarrollo de los síntomas coincide con un incremento en la biomasa del hongo en las raíces colonizadas en las plantas controles mientras no ocurrió un incremento significativo de la biomasa del hongo en las líneas transgénicas. Unido a esto, bajo condiciones de casas verdes las dos líneas de tabaco transgénico que expresan el PvPGIP2 fueron extraordinariamente resistentes al patógeno oomicetes *P. parasitica* var. *Nicotianae* (Figura 1).

Después de dos semanas de la inoculación aparecieron síntomas leves de la enfermedad en las plantas controles mientras no se detectaron síntomas en las plantas transgénicas. Sin embargo, a las 5 semanas después de la inoculación se observaron síntomas severos de la enfermedad en las plantas controles (marchitez de la hoja y podredumbre del tallo). Por otro lado las líneas transgénicas que expresan la PvPGIP2 permanecieron sanas con un nivel de resistencia similar a especies de *Nicotiana* que naturalmente muestran una alta resistencia a *P. parasitica* var *nicotianae*.



**Figura 1.** Evaluación de plantas de tabaco expresando la PvPGIP2 frente a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Fenotipo de plantas de la línea transgénica PvPGIP2 2.1 (A), PvPGIP2 2005 (B), y el control (C) en un suelo altamente infectado después de 10 días de plantadas. Evaluación comparativa de plantas de las dos líneas homocigóticas de tabaco expresando la PvPGIP2 y genotipos de referencia del género *Nicotiana* a través del grado de resistencia a la enfermedad en condiciones de casas verdes (D). Las barras representan el valor de la media con el error estándar ( $N = 50$ ).

Los experimentos también se llevaron a cabo en el campo durante la temporada de frío y humedad cuando el moho azul del tabaco causado por *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* constituye un problema significativo en Cuba. Las plantas transgénicas mostraron altos niveles de resistencia comparable con especies de *Nicotiana* que de forma natural tienen altos niveles de resistencia a *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*. Se muestra que la expresión del gen PvPGIP2 en tabaco confiere a las plantas transgénicas una fuerte resistencia contra hongos y oomycetes, tanto en casa verdes como en el campo.

Los oomycetes son un grupo de microorganismos eucarióticos que incluye alguno de los más importantes patógenos de plantas. Entre ellos, miembros del género *Phytophthora* causa enormes pérdidas económicas en especies cultivadas así como daños al medio ambiente en ecosistemas naturales. De esta forma es posible diseñar una resistencia a enfermedades en cultivos de plantas usando las proteínas inhibidoras de PG como herramienta genética.

### *Proteína inhibidora de proteasas de patógenos (NmIMSP)*

Uno de los principales grupos de proteínas inducidas después de la interacción planta-patógeno son los inhibidores de proteasas. Estas proteínas están localizadas en las semillas o tubérculos y se inducen en órganos vegetativos como las hojas y las raíces. Se han observado dos funciones de estas proteínas: i) regulación de proteasas endógenas de la planta y ii) inhibición de proteasas exógenas de microorganismos patógenos de plantas.

En el trabajo, se utilizó la tecnología de SuperSAGE para identificar la regulación de genes durante la interacción *N. megalosiphon* - *P. parasitica* var. *nicotianae* enfocándonos en los genes que codifican para inhibidores de proteasas microbiales, que eran inducidos durante la interacción. Entre estos, un ADN complementario que codifica para un inhibidor de proteasa microbiana, designado como *NmIMSP* fue altamente inducido y asociado con la defensa de *N. megalosiphon* a *P. parasitica* var. *nicotianae*. La expresión del gen *NmIMSP* fue mayor y constante en el transcurso del tiempo en hojas. El análisis de función por silenciamiento mostro que el gen *NmIMSP* compromete la resistencia de *P. parasitica* var. *nicotianae* en *N. megalosiphon* cuando es silenciado lo cual indica la importancia de este en la defensa contra este importante patógeno (Tabla 2).

**Tabla 2.** Caracterización de la severidad de la enfermedad producida por *P. parasitica* var. *nicotianae* en *Nicotiana megalosiphon* después del silenciamiento del gen *NmIMSP* una semana post-inoculación como la media del grado de afectación en el tallo de las plantas.

<i>N. megalosiphon</i> no silenciada	Grado de lesión en el tallo *		
	pTV: <i>NmPDS</i>	pTV: <i>NmIMSP</i>	<i>N. tabacum</i> cv. 'Sumatra'
1	1	3.2 ± 0.1	9.8 ± 0.1

\* Valores son la media de 15 réplicas y el ± representa la desviación estándar. La escala para evaluar el nivel de afectación de la enfermedad es de 1 a 10, donde 1 es altamente resistente y 10 altamente susceptible. Como control fue incluida la variedad *N. tabacum* cv. 'Sumatra' altamente susceptible a la enfermedad. *N. megalosiphon* es una especie altamente resistente a la enfermedad.

Otra fuerte evidencia que soporta la función del gen *NmIMSP* en la defensa de las plantas es que al ser expresado en altos niveles en *N. benthamiana* se logra una alta resistencia contra *P. parasitica* var. *nicotianae* y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* bajo condiciones de casas verdes (Figura 2). Estudios filogenéticos, que incluyen una colección de 25 proteínas mostraron que *NmIMSP* pertenece a un subgrupo de IMSP de *Nicotiana*. Específicamente, el *NmIMSP* tuvo una alta homología con miembros de IMSP de *N. tabacum*, incluyendo un IMSP (número de accesión: X67076.1) inducido durante la interacción del virus del mosaico del tabaco y *N. tabacum* cv. Samsun NN. Sin embargo, las plantas de *N. tabacum* cv. Samsun NN

y *N. benthamiana* son altamente susceptibles a *P. parasitica* var. *nicotianae* y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*.

Las pocas diferencias de amino ácidos entre el IMSP de los miembros de *Nicotiana* no es probablemente la clave que proporciona un aumento en la resistencia en la especie susceptible *N. benthamiana* contra estos oomycetes. Probablemente, la expresión IMSP presente en plantas *N. tabacum* cv. Samsun NN y *N. benthamiana* no es suficiente o es retardada para vencer a estos patógenos.

De esta forma, la sobre expresión del IMSP en estas especies pudo conferir alta protección contra *P. parasitica* var. *nicotianae* y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* respectivamente. Como se pudo apreciar este gen es importante en la defensa contra *P. parasitica* var. *nicotianae* y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* y podría ser explotado en estrategias de desarrollo durable de resistencia en plantas mediante biotecnología.

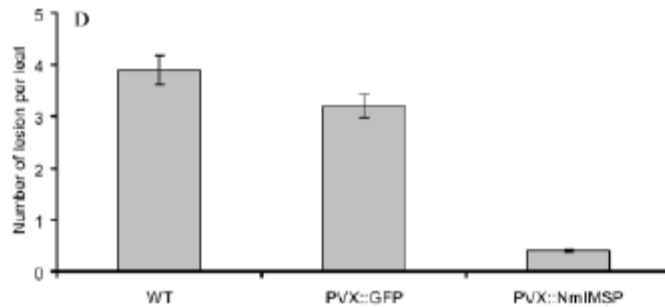
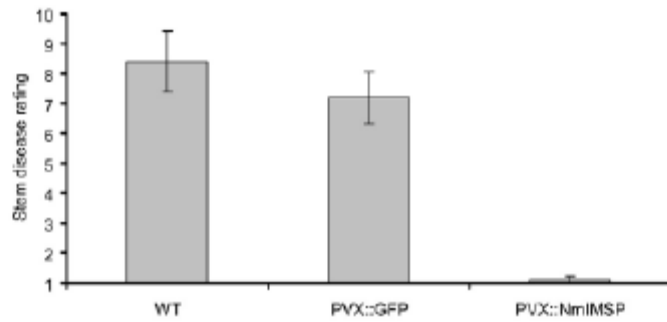
A



B



C



**Figura 2.** Evaluación en casas verdes de plantas de *N. benthamiana* expresando el gen *NmIMSP* inoculadas con *Ppn* y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*. Fenotipo de plantas controles y *N. benthamiana* expresando la *NmIMSP* interactuando con *Ppn* (A) y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* a los 10 días post-inoculación (B). A) PVX::GFP, B) control, C) PVX::NmIMSP. Evaluación cuantitativa de la resistencia de *N. benthamiana* a *Ppn* (C) y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* (D). Las barras representan los valores de la media (N=50; +/- SE).

La familia Solanácea es conocida por la gran cantidad de plantas de importancia económica a escala mundial que agrupa, dentro de las cuales están la Papa, Tabaco, Tomate y Pimientos entre otras. Muchos son los factores que inciden de forma negativa en los rendimientos finales y la producción de estas plantas. Las enfermedades producidas por hongos y oomycetes constituyen la principal limitante en la producción de estos cultivos. En Cuba cuantiosos recursos son empleados anualmente para el control de las enfermedades, lo cual constituye un serio problema en la actualidad, para lo cual se han destinado muchos esfuerzos desde el punto de vista práctico y científico para contrarrestarla. Sin embargo, la solución en muchas ocasiones no está en nuestras manos y las enfermedades constituyen una amenaza latente para nuestras producciones. De esta forma, el trabajo muestra la posibilidad del uso de estos genes para conferir una alta resistencia a patógenos, a través de la inhibición de patrones moleculares asociados a patógenos, aspecto de mucha importancia para los mejoradores genéticos, con el fin de conseguir resistencia de amplio espectro a enfermedades y con estabilidad.



## Descripción científico-técnica detallada del resultado

### Novedad científica del trabajo

- Identificación, caracterización molecular y análisis de función de un nuevo inhibidor de proteasa de patógenos el cual confiere altos niveles de resistencia a patógenos de plantas. (Silva *et al.* 2013)
- Análisis de función de una PGIP la cual confiere altos niveles de resistencia a patógenos de plantas. (Borrás-Hidalgo *et al.* 2013)

### Importancia práctica principal del trabajo

Incrementar niveles de resistencia a patógenos de plantas de importancia económica mediante el empleo de los genes que codifican para el inhibidor de proteasa y la poligalacturonasa dentro de los programas de mejora genética.

### Publicaciones

- Borrás-Hidalgo O, Caprari C, Hernandez I, De Lorenzo G, F Cervone. A gene for plant protection: expression of a bean polygalacturonase inhibitor in tobacco confers a strong resistance against fungi and oomycetes. *Frontiers in Plant Science*, 3: 268. doi: 10.3389/fpls.2012.00268, 2012. **Nature Publishing Group, Impact Factor: 12.53**, Thomson ISI, SCOPUS.
- Silva Y, Portieles R, López Y, Pujol M, Terauchi R, Matsumura H, Serrano M, and Borrás-Hidalgo O. Expression of a microbial serine proteinase inhibitor gene enhances the tobacco defense against oomycete pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 84: 99-106, 2013. **Impact Factor: 2.0**, Thomson ISI, SCOPUS.

### Presentaciones en eventos científicos

- **VI Seminario Internacional de Sanidad Vegetal - 2008, Habana, Cuba.** Identification, molecular characterization and functional analysis of genes involved in tobacco resistance to biotic factors (Oral).
- **VII Taller Internacional de Biotecnología Vegetal - 2009, Ciego de Avila, Cuba.** Understanding and manipulating tobacco disease resistance (Oral).
- **Congreso Habana-Habanos - 2009, Habana, Cuba.** Entendiendo y manipulando la resistencia a enfermedades en el tabaco (Oral).
- **Congreso Biotecnología Habana - 2011, Habana, Cuba.** New insight related with tobacco disease resistance. (Oral).

### Distinciones

- 2005, Empleo con éxito de la genómica funcional en el aislamiento de genes relacionados con la resistencia a factores bióticos y abióticos en plantas. **Trabajo premiado como Logro Institucional Anual del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.**

### Avales:

- Aval del Instituto de Investigaciones del Tabaco.

- Aval del Prof. Jean Pierre Mettraux, Director del Laboratorio de Ciencias de las Plantas de la Universidad de Fribourg, Suiza.
- Los artículos que avalan la propuesta en las revistas *Frontiers in Plant Science* y *Physiological and Molecular Plant Pathology* se encuentran en el tope del **BioMedLib**.

## Referencias Bibliográficas

- (1) Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-3402.
- (2) Benchabane M, Schlüter U, Vorster J, Goulet MC, Michaud D. Plant cystatins. *Biochimie* 2010;92: 1657-1666.
- (3) Benedetti,M., Leggio,C., Federici,L., De Lorenzo,G., Pavel,N.V., and Cervone,F. (2011). Structural Resolution of the Complex between a Fungal Polygalacturonase and a Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein by Small-Angle X-Ray Scattering. *Plant Physiology* 157, 599-607.
- (4) Borrás-Hidalgo O, Thomma BPHJ, Collazo C, Chacon O, Borroto CJ, Ayra C, Portieles R, López Y, Pujol M. EIL2 transcription factor and glutathione synthetase are required for defense of tobacco against tobacco blue mold. *Mol Plant Microbe Interact* 2006; 19: 399-406.
- (5) Borrás-Hidalgo, O., Thomma, B.P.H.J., Collazo, C., Chacon, O., Borroto, C.J., Ayra, C., Portieles, R., Lopez, Y., and Pujol, M. (2006). EIL2 transcription factor and glutathione synthetase are required for defense of tobacco against tobacco blue mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 399-406.
- (6) Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107, 9452-9457.
- (7) Casasoli, M., Federici, L., Spinelli, F., Di Matteo, A., Vella, N., Scaloni, F., Fernandez-Recio, J., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2009). Integration of evolutionary and desolvation energy analysis identifies functional sites in a plant immunity protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 7666-7671.
- (8) Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS. Inhibition of plant pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:1320-1324.

- (9) Csinos AS. Stem and root resistance to tobacco black shank. *Plant Dis* 1999; 83: 777-780.
- (10) Csinos, A. (1999). Stem and Root Resistance to Tobacco Black Shank. *Plant Disease* 777-780.
- (11) De Lorenzo, G., Brutus, A., Savatin, D.V., Sicilia, F., and Cervone, F. (2011). Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS Letters* 585, 1521-1528.
- (12) De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., and Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39, 313-335.
- (13) Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K.A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., and Cervone, F. (2003). The crystal structure of PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 10124-10128.
- (14) Dunaevsky YE, Elpidina EN, Vinokurov KS, Belozersky MA. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Mol Biología* 2005; 39: 608-613.
- (15) Dunaevsky YE, Gladysheva IP, Pavlukova EB, Beliakova GA, Gladyshev DP, Papisova AI, Larionova NI, Belozersky MA. The anionic protease inhibitor BWI-1 from buckwheat seeds. Kinetic properties and possible biological role. *Plant Physiol* 1997; 101: 483-488.
- (16) Elliott, P.E., Lewis, R.S., Shew, H.D., Gutierrez, W.A., and Nicholson, J.S. (2008). Evaluation of tobacco germplasm for seedling resistance to stem rot and target spot caused by *Thanatephorus cucumeris*. *Plant Disease* 92, 425-430.
- (17) Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F., and Tsernoglou, D. (2001). Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 13425-13430.
- (18) Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinase induced during hypersensitive reaction of tobacco to Tobacco Mosaic Virus. *Mol Plant Microbe Interact* 1990; 3: 327-333.
- (19) Haq SK, Atif SM, Khan RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch Biochem Biophys* 2004; 431: 145-159.

- (20) Hellens RP, Edwards AE, Leyland NR, Bean S, Mullineaux MP. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 2000; 42:819-832.
- (21) Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999; 11: 2291-2301.
- (22) Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- (23) Joshi BN, Sainani MN, Bastawade KB, Gupta VS, Ranjekar PK. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: A new class of antifungal protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:382-387.
- (24) Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 44, 41-60.
- (25) Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, Hahm KS, Park Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 2860-2872.
- (26) Kim JY, Park SC, Kim MH, Lim HT, Park Y, Hahm KS. Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 921-927.
- (27) Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P., Staskawicz, B., Jones, J.D., and Zipfel, C. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology* 28, 365-369.
- (28) Leckie, F., Mattei, B., Capodicasa, C., Hemmings, A., Nuss, L., Aracri, B., De Lorenzo, G., and Cervone, F. (1999). The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed b-strand/b-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. *EMBO Journal* 18, 2352-2363.
- (29) Lionetti, V., Francocci, F., Ferrari, S., Volpi, C., Bellincampi, D., Galletti, R., D'Ovidio, R., De Lorenzo, G., and Cervone, F. (2010). Engineering the cell wall by reducing de-methyl-esterified homogalacturonan improves saccharification of plant tissues for bioconversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107, 616-621.
- (30) Lorito M, Broadway RM, Hayes CK, Woo SL, Noviello C, Williams DL, Harman GE. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Mol Plant-Microbe Interact* 1994; 7: 525-527.

- (31) Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC. High throughput virus induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J* 2003; 22: 5690-5699.
- (32) Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 2003; 30: 296-303.
- (33) Matsumura H, Yoshida K, Luo S, Kimura E, Terauchi R. High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. *PLoS ONE* 2010; 5: 1-8.
- (34) Mosolov VV, Loginova MD, Fedurkina NV, Benken II. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. *Plant Sci Lett* 1976; 7: 77-80.
- (35) Pernas M, López-Solanilla E, Sánchez-Monge R, Salcedo G, Rodríguez-Palenzuela P. Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol Plant-Microbe Interact* 1999; 12: 624-627.
- (36) Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene functions by silencing. *Plant J* 2001; 25: 237-245.
- (37) Ryan CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 1990; 28: 425-449.
- (38) Schlüter U, Benchabane M, Munger A, Kiggundu A, Vorster J, Goulet MC, Cloutier C, Michaud D. Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. *J Exp Bot* 2010; 61: 4169-4183.
- (39) Senthilkumar R, Cheng CP, Yeh KW. Genetically pyramiding protease inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol J* 2010; 8: 65-75.
- (40) Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1194-1199.
- (41) Sullivan, M.J., Melton, T.A., and Shew, H.D. (2005). Fitness of Races 0 and 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Disease* 1220-1228.
- (42) Valdes-Rodriguez S, Cedro-Tanda A, Aguilar-Hernandez V, Cortes-Onofre E, Blanco-Labra A, Guerrero-Rangel A, Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant Physiol Biochem* 2010; 48: 469-475.

- (43) Valueva TA, Mosolov VV. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* 2004; 69: 1305-1309.
- (44) Valueva TA, Revina TA, Gvozdeva EL, Gerasimova NG, Ozeretskoykaya OL. Role of proteinase inhibitors in potato protection. *Bioorg Khim* 2003; 29: 499-504.
- (45) Valueva TA, Revina TA, Kladnitskaya GV, Mosolov VV. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora* infected potato tuber. *FEBS Lett* 1998; 426: 131-134.
- (46) Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, van den Elzen PJ, Cornelissen BJ. Pathogeninduced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 1991; 3: 619-628.
- (47) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 9.15-9.16.