



Universidad Aut3noma de Barcelona

Facultat de bioci3ncies

Dise1o y caracterizaci3n
de p3ptidos
espec3ficamente
dirigidos al bloqueo de
la formaci3n del
apresorio en el hongo
fitopat3geno *Magnaporthe*
oryzae

Diseño y caracterización de péptidos específicamente dirigidos al bloqueo de la formación del apresorio en el hongo fitopatógeno *Magnaporthe oryzae*

Doctorado en Biología y Biotecnología Vegetal

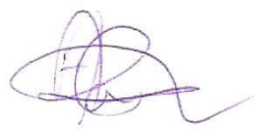
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y
ECOLOGÍA

Facultad de Biociencias

Barcelona 2015



Dra. Belén López García
(Directora de la tesis)



Aarón Rebollar Álvarez
(Autor de la tesis)



Dra. Soledad Martos
(Tutora de la tesis)

Agradecimientos

Bueno, pues llegados a este momento quiero hacer una parada para agradecer a todas las personas sin las que la realización de esta tesis no hubiese sido posible.

En primer lugar, la persona más importante para que esto haya llegado a buen puerto es mi directora de tesis **Belén López**. Quiero agradecerle la oportunidad que me dio en un principio, la cual siempre he agradecido y valorado hasta el extremo. Pero además a raíz de que se complicase todo nunca se dio por vencida y se implicó a pesar del esfuerzo. Sin ella todo esto no hubiese llegado a buen puerto.

A la **Dra Blanca San Segundo** y la **Dra María Coca** por acogernos en su grupo y por el material e instrumentación para la realización de la tesis. Además de por la impagable formación científica que obtuve de ellas durante de estos años de seminarios y lab meetings.

Después quiero agradecer a mis padres y mi familia en general (excepto mi hermano) porque siempre me han apoyado y se han sentido orgullosos de mi.

También quiero agradecer a las personas del CRAG y a sus servicios en lo que han colaborado en cualquier parte de la tesis.

A todas y cada una de las personas del **lab rosa**:

Sonia por el cariño con el que me trató desde el primer día (literalmente). Siempre he dicho que nos parecemos mucho en el carácter. Espero se lo tome como un halago jeje.

Lidia a pesar de su rechazo reiterado a casarse conmigo. Ahora que la veo como una madre aún me gusta más :)

El Señor, por todos los videos de futbol que vimos. Además él sigue insistiendo en que "me salvó" al llegar al laboratorio.

A **Mireia**, ya que considero una gran suerte el haber tenido oportunidad de conocerla. Además de todos los ratos en el "rincón del lamento" y todos los chistes de mal gusto.

A **Rosany** muy especialmente, por lo bien que se ha portado siempre conmigo y el cariño que me ha demostrado todos y cada uno de los ratos que hemos compartido. Por lo bien que me lo pasaba siempre estando con ella. También por la complicidad que siempre hemos tenido y que siempre he valorado.

A **Patricia** por todos los viernes en la estación de ferros. Por el gangnam style en el ascensor.

Si esta tesis tuviese algo de justicia tendría 30 páginas de agradecimientos exclusivamente dedicadas a **Cris**. Lamentablemente no se me ocurre ningún adjetivo para describir lo feliz que fui los 3 años que pude convivir casi a diario con ella. Supongo que es verdad eso de que hay cosas que solo se pueden decir con la viola.

Mauricio por su especial sentido del humor y los partidos en el Camp Nou.

A **Pep** por los partidos de tenis y los ratos de "chicos" e **Izar** por los infinitos ratos hablando del veganismo y de la vida en general, la eché mucho de menos. A **Raquel** y **Marcel** por todos los chistes y las bromas del lab.

Al "**Macho lab**" y el "**No gracias**" sean lo que sean esas cosas.

Y por supuesto a amigos de otros laboratorios del CRAG:

Maria Jose (Chiqui). Por ser la dulzura que le falta a mi humor ácido. Por los miles de ratos en los bajos fondos de Barcelona (como el Cosmos). Por las charlas, las confesiones, los ole ole, los unicornios y la complicidad. No me extraña que a todo el mundo le caiga bien. Y sobre todo por el ratito que fuimos novios en fallas.

Yo siempre he creído que **Agnese** va a cambiar el mundo, es una corazonada. No tengo muy claro aún como lo hará pero me muero de ganas de verlo. Además le quiero agradecer por lo bien que me lo he pasado con ella y lo bien que me ha tratado siempre sin excepción. A poca gente la describo como buenas personas.

A todo el grupo de los virus en general con **María y Lluís** y muy especialmente a **Ares** por todos los cafés que nos tomamos, los llenados de puntas, la limpieza de zonas comunes, las conversaciones y sobre todo la resistencia para no ser absorbidos por "otros grupos". Por los 3 años que estuvimos uno enfrente del otro jeje.

De los "Ralstonia" a **Freddy** y a **Crina**. Ya cuesta encontrar buenas personas, pero encontrar dos en el mismo grupo ya me parece una casualidad a recalcar.

Bueno, habría mucha más sobre la que escribir pero diré algunos nombres esperando no olvidar a nadie para no alargar esto. **Marçal, María Corujo, Jose, Silvia, Mariana, Pablo, Elena, Jorge (Puñalote), Lucio, Pol, Lieke, la gente del máster etc...**

Resumen

La piriculariosis del arroz, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae*, es la enfermedad que más pérdidas genera devastando miles de hectáreas de cultivo anualmente. Los tratamientos antifúngicos frente a esta enfermedad suelen ser de poca utilidad y se vuelven ineficaces en poco tiempo debido a la alta tasa de variación del hongo. Además, dentro del contexto legislativo actual a nivel europeo, se está restringiendo cada vez más la utilización de compuestos antifúngicos de amplio espectro debido a los posibles daños que pueden ocasionar sobre el ecosistema y la salud humana. Una alternativa prometedora al uso de los antifúngicos convencionales son los péptidos antimicrobianos, y más concretamente los péptidos dirigidos capaces de bloquear un proceso esencial para la infección del patógeno. Un paso fundamental en el proceso infectivo del hongo *M. oryzae* es la formación del apresorio, cuya finalidad es romper la superficie foliar y así penetrar en el mesófilo de la hoja. El desarrollo de compuestos capaces de bloquear específicamente este proceso sin afectar al ciclo vital del hongo constituiría una estrategia ventajosa en el control de la piriculariosis, *a priori* no tóxica para otros organismos incluido el ser humano. En este trabajo, hemos abordado este objetivo mediante dos aproximaciones, el cribado de una biblioteca combinatoria de péptidos y la modificación de secuencias de AMPs naturales mediante diseño racional. Gracias al conocimiento que se tiene sobre la secuencia y el modo de acción de los péptidos antimicrobianos, hemos diseñado una serie de péptidos capaces de controlar el desarrollo de la piriculariosis mediante inhibición específica de la formación del apresorio en *M. oryzae*, pero sin afectar a la viabilidad celular. Nuestros resultados indican que péptidos pequeños, como el heptapéptido PAF104, son capaces de reprimir la expresión de los genes *MoMSB2* y *MoMST11*, implicados en la ruta de señalización de la MAPK Pmk1 imprescindible para la formación del apresorio en *M. oryzae*. Además, demostramos un comportamiento diferencial frente a distintas estructuras infectivas (i.e., apresorio, estructuras similares al apresorio e hifopodios), lo que apoya la idea propuesta por otros investigadores de que los mecanismos moleculares que regulan estas estructuras no son exactamente iguales. Mediante microscopía confocal mostramos que el tratamiento del hongo con MgAPI16 da lugar a apesorios aberrantes y no funcionales. En conclusión la principal aportación de esta investigación es el diseño de una serie de péptidos sintéticos, los heptapéptidos diseñados *de novo* PAF104, MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47, y el péptido MgAPI16 derivado del péptido antimicrobiano natural CecA, capaces de controlar el desarrollo de la piriculariosis en arroz mediante la inhibición específica de la formación del apresorio. Este trabajo contribuye por tanto al diseño de estrategias de control en protección vegetal basadas en péptidos dirigidos, las cuales deberían ser sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

Rice blast caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* is the most devastating rice disease, causing losses and ravaging thousands of hectares every year. Antifungal treatments are often ineffective and become useless soon due to the high fungus variation rate. Furthermore, within the current legislative framework at European level, it is increasingly restricting the use of broad-spectrum antifungal compounds because of the potential damage that can cause to the ecosystem and human health. One promising alternative to conventional antifungal compounds are the use of antimicrobial peptides, and in particular the target-orientated peptides able to block an essential infective process. A basic step on the development of rice blast diseases is the formation of appressoria, necessary to break the leaf surface and penetrate the mesophyll. To develop novel compounds able to block this process without affecting the life cycle of the fungus could be a promising alternative to control rice blast diseases, *a priori* no toxic to other organisms including humans. In this work, we board this objective by performing two approaches, the screening of a peptide combinatorial library and the rational design of natural known antimicrobial peptides. We have design a set of peptides able to control the infection caused by *M. oryzae* by specific inhibition of appressorium formation, but without a lytic effect. Our results show that small peptides, such as the heptapeptide PAF104, represses the gene expression of *MoMSB2* and *MoMST11*, involved in the Pmk1 MAPK pathway essential to *M. oryzae* appressorium formation. Moreover, the designed peptides showed a differential effect on some infective structures (i.e., appressoria, appressorium-like structures and hyphopodia), supporting that the molecular regulation of these structures is different, an idea previously proposed by other researchers. By confocal microscopy we showed that the appressoria treated with MgAPI16 present aberrant physical and not functional structures. As a conclusion, the main contribution of this work is the design of a set of synthetic peptides, *de novo* designed heptapeptides PAF104, MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47 and the peptide MgAPI16 derived from the natural antimicrobial peptide Cecropin A, which are able to control rice blast development through the specific inhibition of the appressorium formation in *M. oryzae*. Therefore, this work contributes to the design of novel strategies based in targeted-orientated peptides for plant protection, which should be environmentally friendly.

Introducción general	1
1. El arroz.....	3
1.1 Importancia comercial y alimenticia del arroz.	4
1.2 Principales causas de pérdidas en el cultivo del arroz	5
2. <i>Magnaporthe oryzae</i>	10
2.1 Ciclo infeccioso de <i>Magnaporthe oryzae</i>	11
2.2 Regulación de la formación del apresorio.....	15
2.3 Estructuras similares al apresorio	21
3. Estrategias de control de la piriculariosis.....	22
3.1 Estrategias de prevención	23
3.2 Biotecnología vegetal	24
3.3 Fungicidas.....	25
3.4 Inducción de la respuesta de defensa de la planta.....	27
3.5 Control biológico	29
3.6 Fungicidas “low-risk”	31
4. Péptidos antimicrobianos como estrategia alternativa de control.....	32
4.1 Descripción general de péptidos antimicrobianos y clasificación.....	32
4.2. Aplicación de péptidos antimicrobianos en protección vegetal	43
4.3 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos	44
4.4 Péptidos capaces de bloquear un proceso esencial para la infección del patógeno....	48
Objetivos	51
Capítulo 1: PAF104, un péptido sintético capaz de controlar la piriculariosis en arroz bloqueando la formación del apresorio en <i>Magnaporthe oryzae</i>	55
Resumen.....	57
Capítulo 2: Identificación de inhibidores de la formación de apresorio en <i>Magnaporthe oryzae</i> mediante el cribado de una biblioteca combinatoria de péptidos.....	71
Resumen.....	73

Capítulo 3: Un nuevo péptido derivado de la Cecropina A actúa como inhibidor específico del apresorio en <i>Magnaporthe oryzae</i>	85
Resumen.....	87
Discusión general	107
Conclusiones	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119

Introducción general

1. El arroz

El arroz (*Oryza sativa*) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas (Poaceae). Es una planta herbácea con tallo cilíndrico, nudoso y glabro. Presenta hojas planas, envainadoras y con limbo lineal, mientras que su sistema radicular es fibroso y fasciculado. Las flores son blanquecinas y su semilla, comestible, es uno de los alimentos más importantes en el mundo. Presenta un genoma diploide que se reparte en 12 cromosomas ($2n=2x=24$) teniendo un tamaño aproximado de 430Mpb. Además de su importancia comercial como alimento, como se describe en el apartado 1.1, el arroz es utilizado como planta modelo en estudios de genómica funcional en cereales. Esto se debe a que su genoma, de tamaño relativamente pequeño en comparación a otras especies de cereales, fue el segundo en ser secuenciado dentro de las plantas, tan solo por detrás de *Arabidopsis thaliana*. Posee mapas genéticos y físicos de alta densidad, colecciones de germoplasma, mutantes, protocolos efectivos de transformación y una elevada sintenia con otras especies de gramíneas (Goff et al 2002, Sallaud et al 2003, Tyagi et al 2004, Yu et al 2002).

Existen más de 20 especies dentro del género *Oryza* (Figura 1), pero de ellas solo dos son cultivadas: ***Oryza glaberrima*** que se cultiva principalmente en África y ***Oryza sativa*** que se encuentra principalmente en Asia.



Figura 1 Diferentes variedades de arroz cultivadas en el mundo

Dentro de la especie *Oryza sativa* existen 3 subespecies:

- ***O. sativa ssp. japonica***: Es originaria de regiones templadas o subtropicales (Japón, China, etc). Es la subespecie más tolerante a ligeras bajadas de temperatura. Las hojas son de un color verde intenso y rectas, mientras que sus granos son más redondeados. La subespecie *japonica* es la más cultivada y consumida en Europa.

- *O. sativa ssp. indica*: Es propia de zonas tropicales y subtropicales de Asia (India, Tailandia). No resiste bien las bajas temperaturas. Sus hojas suelen ser largas e inclinadas de color verde pálido y los granos son largos y estrechos.
- *O. sativa ssp. javanica*: Esta subespecie se cultiva en la isla de Java y otras islas de Indonesia. Sus hojas son más anchas que en la subespecie japónica y los granos son largos, anchos y aristados.

1.1 Importancia comercial y alimenticia del arroz.

El arroz es uno de los alimentos más consumidos en el mundo. Es el segundo cereal más cultivado, después del trigo, y constituye la fuente más importante de calorías y proteínas para el 50% de la población mundial. El cultivo del arroz está muy centralizado en el continente asiático, donde es el alimento más importante y debido a su clima favorable se puede llegar a conseguir de dos a tres cosechas por año. Según la FAO la producción mundial de arroz en 2014 fue de 744,7 millones de toneladas y se estima un ligero aumento durante este año 2015 (<http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>). De esos 744,7 millones, aproximadamente el 91% se produjeron en Asia (674,4 millones de toneladas). El segundo productor después de Asia es Brasil con 12,4 millones de toneladas, mientras que en Europa se produjeron 4 millones de toneladas durante el año 2014.

A nivel de Europa, España es el segundo productor solo superado por Italia. Es un cultivo especialmente importante en la región oriental de la península, donde se producen al año unas 750.000 toneladas, de las cuales 240.000 son consumidas en nuestro país.

Se estima que en el 2030 la demanda en el cultivo del arroz habrá aumentado de un 20% a un 30% en todo el mundo. Sin embargo, debido a la limitación de agua y de tierra cultivable, se hace necesario un cambio en las estrategias de producción, con el fin de incrementar el rendimiento, así como la obtención de variedades con un valor nutricional más elevado (Khush 2005, Wilson and Talbot 2009). Los avances en el campo de la biología molecular de plantas y la biotecnología han jugado un papel relevante en el desarrollo de estas estrategias. Un hito importante en la biotecnología del arroz es la obtención del arroz dorado o "*Golden Rice*", una variedad de arroz transgénico que contiene 2 genes de la ruta de síntesis del licopeno [fitoenosintasa (*psy*) y fitoenodesaturasa (*crt 1*) (www.goldenrice.org). Así se consigue que la planta produzca β caroteno (provitamina A), el cual es almacenado en el endospermo (Ye et al 2000). En el 2005 se cambió el

gen *psy* del narciso (*Narcissus*) por el del maíz (*Zea mays*) obteniendo el "Golden Rice 2", el cual acumula 23 veces más β -caroteno (Paine et al 2005). Gracias al desarrollo del *Golden Rice* se pretende paliar la carencia de vitamina A en regiones del mundo con dietas más pobres (Tang et al 2009).

1.2 Principales causas de pérdidas en el cultivo del arroz

1.2.1 Factores abióticos

Existen diversos factores abióticos que causan pérdidas en la cosecha del arroz fundamentalmente relacionados con la climatología y las condiciones del suelo de cultivo. Entre los principales factores cabe destacar la sequía e inundación, la alta salinidad del suelo, los cambios bruscos de temperatura (en particular el arroz es muy sensible a las temperaturas bajas), y la carencia de nutrientes esenciales como el fósforo o el zinc. Actualmente existe una gran demanda de cultivares de arroz tolerantes al estrés abiótico, lo que conduciría a extender las áreas cultivables y aumentar la productividad del cultivo.

Muchos factores influyen en la tolerancia al estrés abiótico lo que dificulta enormemente el desarrollo de cultivares de arroz tolerantes mediante la mejora vegetal convencional. En los últimos años, gracias a los progresos en fisiología, biología molecular y genética de plantas y la aplicación de nuevas tecnologías, se han identificado gran número de QTLs, genes, proteínas y rutas metabólicas involucradas en la tolerancia al estrés abiótico (Grennan 2006, Lafitte et al 2004, Mizoi and Yamaguchi-Shinozaki 2013). Por ejemplo, se conoce la implicación de diversas fitohormonas en la adaptación de las plantas al estrés, como es el caso del ácido abscísico (ABA) que participa en la respuesta de la planta ante el estrés hídrico (sequía y salinidad) (Kim et al 2014b) y los brasinoesteroides que están implicados en la respuesta de la planta a las bajadas de temperatura (Krishna 2003).

En este aspecto la ingeniería genética se presenta como una estrategia efectiva para el desarrollo de cultivares tolerantes al estrés abiótico. Numerosas investigaciones se centran en la transformación de plantas con genes candidatos para conseguir tolerancia al estrés abiótico, e.g. genes que codifican para proteínas LEA o aquaporina que confieren resistencia a la sequía (Chandra et al 2004, Lian et al 2004). En el caso de la resistencia al frío, se han conseguido plantas de arroz que crecen mejor a bajas temperaturas mediante la sobreexpresión del gen *AOX1* que codifica para la oxidasa alternativa 1. Estas plantas tienen tasas de crecimiento similares a las silvestres en condiciones favorables de temperatura, y sin embargo siguen

creciendo en condiciones de frío (Li et al 2014). Otro ejemplo es que mediante la modificación del elemento de respuesta a hambre de fósforo (*PHR1*) en arroz se consiguen plantas más eficientes en la captación de fósforo del suelo, lo cual permitiría el cultivo del arroz en suelos empobrecidos (Ruan et al 2015).

1.2.2 Factores bióticos

Según el instituto internacional de investigación en arroz (IRR) un 37% de las pérdidas en la producción del arroz se deben a enfermedades causadas por diferentes plagas: insectos, bacterias, hongos, y virus (<http://irri.org/rice-today/where-rice-pests-and-diseases-do-the-most-damage>). A continuación se describen brevemente algunas de las plagas más importantes. El apartado 2 de esta introducción está dedicado en profundidad al hongo *Magnaporthe oryzae*.

Insectos:

- *Sitophilus oryzae* (Gorgojo del arroz) (Figura 2). Insecto del orden Coleoptera. La hembra horada el grano de arroz y deposita dentro sus huevos. Las larvas provocan los mayores daños vaciando el grano de arroz y generando grandes pérdidas en la cosecha. Es una de las principales plagas del arroz tanto en campo como en almacén, pudiendo atacar a cualquier cereal.
- *Chilo suppressalis* (Barrenador del arroz). Insecto del orden Lepidoptera. Las larvas perforan el tallo de la planta y se alojan en el interior donde se van alimentando. Constituye una de las plagas más importantes en los arrozales del Delta del Ebro y en la Albufera de Valencia.

Bacterias:

- *Xanthomonas oryzae*. Es el organismo responsable del "*bacterial blight*" o bacteriosis vascular de arroz, una de las enfermedades más devastadoras del arroz en Asia. Se caracteriza por la aparición de unas manchas blanquecinas en las puntas de las hojas en plantas jóvenes.
- *Erwinia chrysanthemi*. Produce las enfermedades conocidas como "*soft rot*" o podredumbre blanda y "*wilt disease*" o marchitamiento en multitud de especies vegetales. Como su nombre sugiere los frutos muestran síntomas de ablandamiento, similares a los que se aprecian cuando realizan su senescencia programada.
- *Burkholderia glumae*. Causante del "*grain rot*" o añublo bacterial del arroz (Figura 2). Se caracteriza por un marchitamiento de la vaina y la superficie de la hoja. También suelen aparecer lesiones en las semillas o directamente panículas vacías.

- *Pseudomonas fuscovaginae*. Bacteria fluorescente artífice de la enfermedad conocida como "sheath brown rot" o en castellano pudrición bacteriana de la vaina. Al igual que otras bacterias, causa síntomas de senescencia en la vaina foliar de la hoja del arroz.

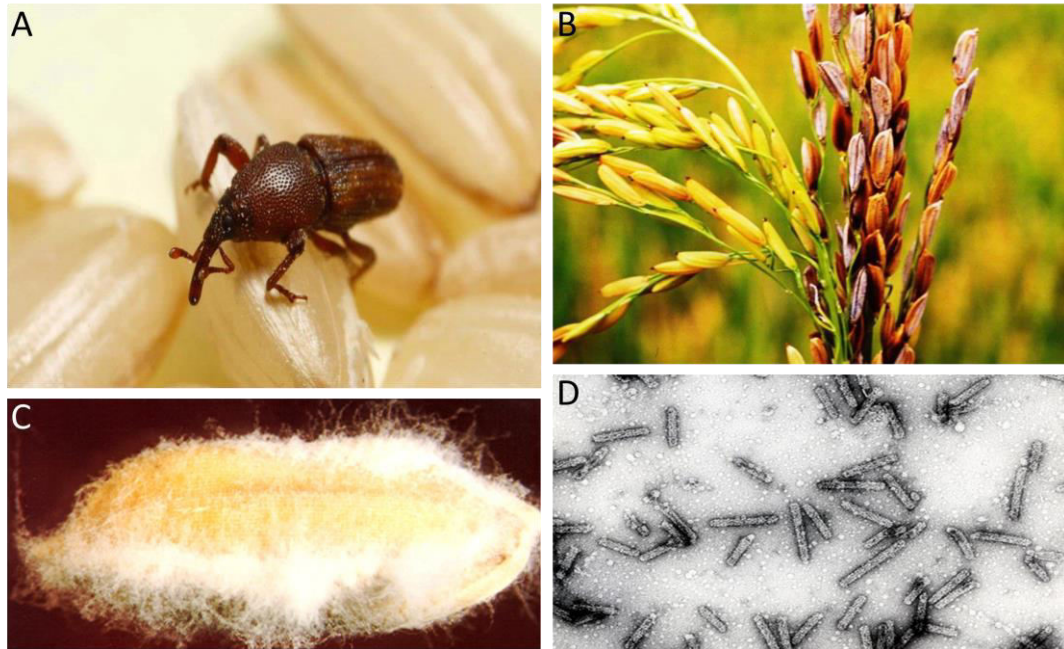


Figura 2. Distintos organismos patógenos del arroz. (A) El insecto *Sitophilus oryzae* o gorgojo del arroz; (B) Síntomas del añublo del arroz causado por la bacteria *Burkholderia glumae*; (C) Hongo *Fusarium verticilloides* creciendo sobre una semilla de arroz; (D) El virus baciliforme RTBV.

Hongos:

Aunque se conocen cerca de una veintena de especies fúngicas patógenas de arroz, las dos más importantes en cuanto a efecto y pérdidas generadas son *Fusarium verticilloides* y *Magnaporthe oryzae*.

- *Fusarium verticilloides* (*Gibberella moniliformis*). Es un hongo ascomiceto, filamentososo causante de la enfermedad del arroz llamada "bakanae" o "foolish seedling" en inglés (Figura 2). Las plantas afectadas son estériles dando lugar a panículas vacías. Además, esta enfermedad se caracteriza por un alargamiento desregulado de los tallos de la planta, lo cual ocasiona que la planta se doble y acabe cayendo. El hongo produce un superávit de ácido giberélico el cual, en la planta, es una hormona encargada de promover el crecimiento. Es una enfermedad devastadora en Asia, África y América del Norte donde puede acabar con cosechas enteras. El impacto económico más significativo de esta enfermedad es la capacidad del hongo de producir fumonisin, una micotoxina que afecta a

animales y humanos pudiendo producir lesiones en el cerebro, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y carcinoma (Brown et al 2005, Chuturgoon et al 2014, Domijan and Abramov 2011).

- *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). Es un hongo ascomiceto, filamentoso, de esporas relativamente grandes, causante de la enfermedad del "rice blast" o en castellano piriculariosis o quemado del arroz. Recibe este nombre debido a las lesiones que provoca en las hojas, similares a quemaduras. Es la enfermedad más importante del arroz generando elevadas pérdidas en el cultivo. El trabajo de esta tesis está centrado en este patógeno del arroz y se sirve de la interacción *O. sativa* - *M. oryzae* como modelo para diseñar estrategias de control que puedan ser aplicables a otros organismos. Por ello se le dedica un apartado propio a continuación.

Virus:

A pesar de que las enfermedades causadas por virus tienen un menor impacto en la producción del arroz, cabe mencionar algunas de ellas como el Tungro del arroz, una enfermedad viral causada por un complejo viral (el virus baciliforme RTBV (Figura 2) y el virus esférico del Tungro del arroz RTSV), la enfermedad causada por el virus de la hoja blanca del arroz (RHBV), y la enfermedad causada por el virus del moteado amarillo del arroz (RYMV).

En cuanto a las estrategias de protección de los cultivos a la acción de patógenos, mencionar que desde el 2014 en la Unión Europea es obligatorio el **control integrado** (Directiva 2009/128). El concepto de control integrado surgió en Estados Unidos hace más de 20 años y se ha ido extendiendo progresivamente. Dentro del control integrado se contempla la aplicación combinada de diferentes técnicas y/o estrategias que persiguen un menor impacto medioambiental. Existen métodos físicos como son la esterilización por vapor de agua del suelo de cultivo o la solarización del mismo que eliminan hongos y microorganismos presentes en el suelo antes del cultivo, reduciendo así la probabilidad de infección (Mejía and Albertó 2013). Otras estrategias de prevención son la selección de variedades resistentes y/o la rotación y diversidad de cultivos. En cuanto al control clásico mediante plaguicidas y pesticidas, algunos de los productos recomendados en el cultivo del arroz según la FAO son el insecticida γ -HCH (Lindane) y fungicidas de la familia de los triazoles como el Triciclazol (<http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s09.htm>). En los últimos años se han establecido normativas a nivel internacional más exigentes en cuanto al registro de nuevos productos fitosanitarios y al límite máximo de residuos (LMR) de plaguicidas. En algunos casos se ha prohibido la utilización de algunos productos químicos debido al efecto negativo sobre la salud

humana y el medio ambiente. La directiva 2009/128 del Parlamento Europeo establece que cada estado miembro debe utilizar planes de acción nacionales encaminados a reducir el uso de productos fitosanitarios y promover otras formas de control alternativas. En España, este plan de acción viene reflejado en el Real Decreto 1311 publicado en 2012.

Una estrategia alternativa de control sería la **inducción de las respuestas de defensa** de la planta como estrategia de control alternativa al uso de plaguicidas y pesticidas. Básicamente consiste en aplicar un compuesto, también denominado elicitador, que actúa induciendo los mecanismos de defensa naturales de la planta. De esta forma la planta es capaz de contrarrestar los efectos producidos por la infección del patógeno. Como veremos en más detalle en el apartado 3, algunos ejemplos de elicitadores utilizados en el control de enfermedades en arroz son el quitosano (quitina) y el probenazole (Bautista-Baños et al 2003, Bautista-Baños et al 2006, Umemura et al 2009, Yoshioka et al 2001). Otra estrategia que está teniendo un gran impacto en los proyectos de I+D+i de centros de investigación públicos y empresas privadas del sector agrario es el biocontrol. Esta estrategia consiste en la utilización de organismos como agentes de **control biológico** (ACBs). Algunos ejemplos más estudiados son el uso de hongos del género *Trichoderma* para controlar distintas enfermedades bacterianas y fúngicas (Benítez et al 2004, Khalili et al 2012), bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas* u otras rizobacterias PGPR frente a una gran variedad de organismos eucariotas (Beneduzi et al 2012, Nagarajkumar et al 2005, Usharani et al 2014) o la utilización de algunos insectos enemigos naturales de importantes insectos plaga (Wu et al 2013). Actualmente existen en el mercado diferentes productos basados en ACBs, e.g. TRIANUM-G (Koppert) basado en una cepa de *Trichoderma harzianum*, Cilus Plus (Química Massó) basado en una cepa de *Bacillus velezensis*, NOFLY (Futureco Bioscience) basado en el hongo *Isaria fumosorosea*. Por último mencionar la utilización de **compuestos antimicrobianos** de baja toxicidad entre los que destacan extractos naturales de plantas, péptidos antimicrobianos naturales, u otro tipo de compuestos clasificados como “*low risk*” (Cowan 1999, Kiran et al 2010, López-García et al 2012, Meng et al 2010, Montesinos et al 2012). Esta alternativa es ventajosa frente a los plaguicidas tradicionales debido a su bajo o nulo impacto sobre el ecosistema. En este trabajo de investigación nos centraremos en los péptidos antimicrobianos, tanto naturales como sintéticos, a los cuales dedicaremos un apartado completo más adelante (ver apartado 4). De todas estas formas de control hablaremos con detalle en el apartado 3 donde veremos de forma más específica distintos métodos de control del hongo *M. oryzae* causante de la piriculariosis del arroz.

2. *Magnaporthe oryzae*

Magnaporthe oryzae es un hongo filamentoso perteneciente al Filo Ascomycota causante de la enfermedad de la piriculariosis o "quemado del arroz". En el año 2002 fue definido como una especie independiente de *Magnaporthe grisea* (Couch and Kohn 2002). Morfológicamente no se aprecian diferencias entre ambos aislados. Se considera *M. grisea* a la especie capaz de infectar a los individuos del género *Digitaria*, mientras que *M. oryzae* infecta a la planta del arroz (*Oryza sativa*) y a plantas relacionadas, como pueden ser los miembros de la subfamilia Panicoideae (a los que comúnmente se denomina con el término no taxonómico de Mijo). Para la identificación de ambos aislados se utilizan diferencias en varias bases de tres genes bien conservados que codifican para las proteínas actina, β -tubulina y calmodulina (Couch and Kohn 2002). Se postula que el origen de la cepa de *Magnaporthe* capaz de infectar arroz, se produjo en un único punto situado en el valle de Yangtze en China, hace tan solo unos 7000 años aproximadamente (Wilson and Talbot 2009).

La piriculariosis es una de las enfermedades del arroz más importante tanto a nivel económico como nutricional, produciendo pérdidas de millones de hectáreas a lo largo del mundo especialmente en Asia. La enfermedad es particularmente dura en zonas templadas, con temperaturas relativamente constantes y muy húmedas, donde puede producir epidemias devastadoras y altamente recurrentes (Talbot 2003). Se han reportado epidemias de piriculariosis en países como China (donde se perdieron 5,7 millones de hectáreas entre los años 2001 y 2005) Vietnam, Corea y EEUU.

En general, el hongo infecta la hoja de la planta, produciendo unas manchas con un centro necrotizado y borde clorótico (Figura 3), aunque también es capaz de infectar el tallo, los nudos y la panícula. Se ha descrito la infección radicular, al menos a nivel de laboratorio, pero aún no está claro si este tipo de infección puede darse en condiciones reales de cultivo en campo (Sesma and Osbourn 2004).

El hongo posee reproducción tanto sexual como asexual. La reproducción sexual, al igual que en el resto de ascomicetos, lleva a un proceso de meiosis del cual resultarán ascosporas. La reproducción asexual se da a través de conidios. Estos conidios, tienen forma de lágrima y están compuestos por 3 células, separadas por dos septos (Figura 3). Cada célula posee un único núcleo y cada una lleva asociada una función concreta en el proceso de germinación e infección.



Figura 3. (A) Conidio del hongo *Magnaporthe oryzae*. (B) Panícula de arroz infectada. (C) Manchas producidas por la pirculariosis sobre la superficie de la hoja del arroz.

En el año 2005, Dean y colaboradores secuenciaron el genoma de *M. oryzae*, formado por aproximadamente 38Mb agrupadas en 7 cromosomas (Dean et al 2005). Del análisis del genoma, 11.109 genes codificantes fueron predichos, de los cuales 1.546 pertenecen a su secretoma, que le sirve principalmente en su función infectiva. Esto es un número significativamente más alto que las especies saprófitas cercanas al hongo de las cuales se tienen datos. Este dato indica una gran importancia del metabolismo secundario, con un gran número de genes que codifican para enzimas extracelulares que son utilizadas para degradar materia orgánica de otros organismos, tales como xilasas, glucanasas, quitinasas, etc. El genoma de *M. oryzae* también codifica para putativos efectores cuya finalidad es suprimir el sistema defensivo y perturbar el metabolismo de la planta hospedadora. Dentro de estos efectores o PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), destacar 3 familias de polipéptidos ricos en cisteína y una familia proteica similar al péptido inductor de necrosis del patógeno *Phytophthora infestans* (Collemare et al 2008). Además, se han identificado los genes que codifican para una gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptors*), así como para proteínas involucradas en 3 rutas de señalización MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) involucradas en el proceso de infección del hongo (ver apartado 2.2).

2.1 Ciclo infectivo de *Magnaporthe oryzae*

El ciclo infectivo del hongo *M. oryzae* es fundamentalmente foliar, aunque como ya hemos dicho es capaz de avanzar a través de los tejidos de la planta e infectar tallos y panículas. El primer paso del proceso infectivo consiste en la **adhesión** del conidio a la superficie de la hoja (Figura 4). La espora al ser hidratada segrega por la parte apical un compuesto mucilaginoso que sirve de anclaje, un paso imprescindible para llevar a cabo el proceso de germinación (Hamer et al 1988). Durante la **germinación**, el tubo germinativo emerge de la parte apical de la espora, crece a lo largo de la hoja y, si las condiciones son óptimas, se inicia la formación del apresorio.

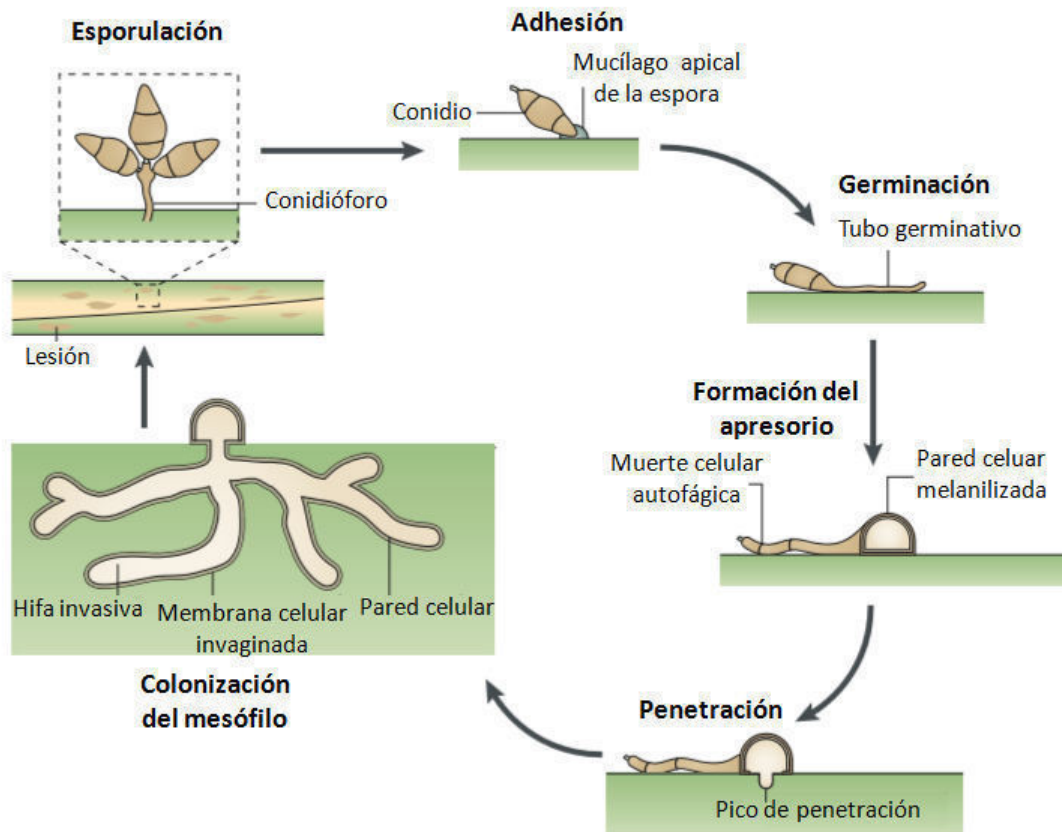


Figura 4. Esquema del ciclo infeccioso de *M. oryzae* (adaptado de Wilson and Talbot 2009)

La **formación del apresorio** se produce a partir de las 4-6h después de entrar en contacto la espóra con la superficie de la hoja. El apresorio es una estructura invasiva con forma de cúpula utilizada por el hongo para penetrar la superficie de la hoja e infectar las células vegetales (Figura 4 y 5A). Se ha descrito que la formación del apresorio se induce por señales externas percibidas por el hongo. La que parece tener más importancia es la hidrofobicidad de la superficie de la hoja, debida principalmente a la presencia de ceras que la recubren. Tanto es así que se puede inducir la formación de apresorio en el laboratorio haciendo que la espóra se ancle a una superficie sintética altamente hidrófoba como el teflón (politetrafluoroetileno) o el poliestireno. Además de la hidrofobicidad, el hongo es capaz de percibir la presencia de monómeros de cutina de la hoja de la planta. Los monómeros que se han descrito como más importantes son el ácido cis-9,10-epoxi-18-hidroxi-octadecanoico o el 1,16-hexadecanodiol, los cuales son utilizados como inductores *in vitro* de la formación del apresorio (Gilbert et al 1996, Talbot 2003). Se ha reportado la importancia del sistema endosomal y autofagia en la germinación y el desarrollo del apresorio (He et al 2012, Veneault-Fourrey et al 2006, Weber et al 2001). Al inicio de la germinación, uno de los tres núcleos de la espóra migra hacia el tubo germinativo donde se produce la mitosis; entonces, uno de los núcleos hijo vuelve hacia la espóra mientras que el otro

continúa hacia el ápice del tubo germinativo donde tendrá lugar la maduración del apresorio. Además, pequeñas vacuolas de la célula apical de la espora se mueven a través del tubo germinativo y del apresorio incipiente. Cuando el apresorio se ha formado, se produce un proceso de autofagia, muerte celular programada, que resulta en la degradación de los 3 núcleos que quedan ahora en el conidio junto con el resto del contenido de la espora.

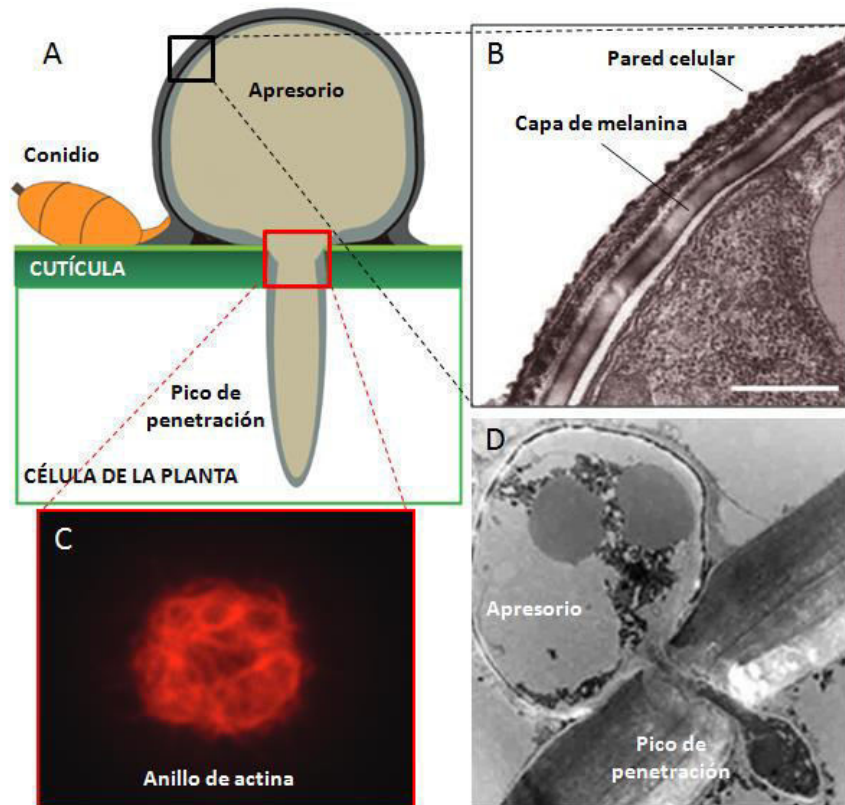


Figura 5 (A) Esquematación del apresorio de *M. oryzae* (Dagdas 2012). (B) Capa de melanina (Wilson and Talbot 2009). (C) Anillo de actina que constriñe el apresorio, marcado con RFP (*Red Fluorescent Protein*) (Dagdas 2012). (D) Pico de penetración introduciéndose en la superficie foliar (Ryder et al. 2013)

Durante **la maduración del apresorio**, la pared celular del extremo del tubo germinativo se endurece debido a la acumulación de quitina y deposición de una capa de melanina entre la membrana plasmática y la pared celular, generando así una capa impermeable que impide la fuga de osmolitos (Figura 5B). Se sabe que los mutantes carentes de la capacidad de formar melanina son no patogénicos (De Jong et al 1997). El apresorio se recubre de esta pared celular endurecida dando lugar al apresorio maduro (aproximadamente después de 24h) excepto una pequeña zona en la parte inferior de la estructura donde se formará el "*penetration peg*" o pico de **penetración** (Figura 5A). En este punto, el apresorio contiene una gran vacuola central, que sirve como almacenamiento de reservas lipídicas que se irán gastando durante el desarrollo, y el único núcleo que no ha sido degradado proporciona la información genética. Entonces el apresorio empieza a

acumular agua debido a la movilización a esa zona de solutos compatibles con su metabolismo, principalmente el glicerol. Esa acumulación de agua incrementa la turgencia dentro del apresorio generando una elevada presión (hasta 8 MPa) capaz de romper la cutícula y el epitelio de la hoja y poder entrar en el mesófilo (Figura 5D). En torno a la formación del pico de penetración se forma un anillo de actina que constriñe la zona para centralizar la presión en una área pequeña de la superficie foliar; la formación de este anillo esta mediada por 4 septin guanosin trifosfatasa (Dagdas et al 2012) (Figura 5C). La diferenciación de la pared celular también lleva unida una explosión oxidativa, la cual es imprescindible para la maduración del apresorio y la penetración; se postula que estas especies reactivas del oxígeno son necesarias para que se produzca el entrecruzamiento de proteínas en la pared celular durante la maduración del apresorio (Wilson and Talbot 2009) y regulan la formación del anillo de actina mediado por septinas (Ryder et al 2013). Se apunta a que la GTPasa MoRho3 es la responsable de la regulación de la formación de especies reactivas del oxígeno en *M. oryzae* (Wilson and Talbot 2009, Zheng et al 2007).

Una vez formado el pico de penetración, el único núcleo presente en el apresorio migra por éste donde sufre varias rondas de mitosis con el fin de ir desarrollando la hifa, además de ser la fuente de todo el material genético que se requerirá durante la infección de la planta. Las hifas del hongo se ramifican a través del tejido vegetal (crecimiento vegetativo) produciéndose **la colonización del mesófilo** y dando lugar a las lesiones típicas de la piriculariosis. Durante esta etapa se produce un crecimiento biotrófico mediante el cual el hongo se ramifica en el interior del mesófilo siendo rodeado por la membrana plasmática invaginada de las células de la planta. En esta invasión temprana del tejido, las células del hongo se especializan en la captación de alimento de las células colindantes. Durante este crecimiento biotrófico el hongo viaja de célula en célula a través de los plasmodesmos; de hecho se ha descrito que el hongo es incapaz de entrar en las células de guardia de los estomas donde no existen plasmodesmos (Kankanala et al 2007). Solo más adelante, cuando ya las lesiones en la hoja de la planta son muy evidentes, el hongo cambia hacia un patrón de alimentación necrotrófico. Por esto el hongo *M. oryzae* es considerado un hongo hemibiotrófico (Wilson and Talbot 2009). A partir de esas lesiones y en condiciones de alta humedad, el hongo empieza a esporular de forma profusa, y gracias al viento o a la lluvia, la enfermedad se propaga entre las plantas colindantes del cultivo, comenzando así un nuevo ciclo infectivo.

Como decimos esta forma de infección foliar es la más típica de todas, pero se ha descrito también la infección radicular del hongo (Sesma and Osbourn 2004). Durante la infección radicular no se forma apresorio, en su lugar el hongo desarrolla una estructura más simple

conocida como hifopodio, aunque se sabe que comparte requisitos genéticos comunes con el apresorio (Tucker et al 2010). El hifopodio contacta con la superficie de la raíz y el hongo va entrando lentamente por el conducto vascular de este órgano. Comparada con la infección foliar, la infección radicular es más lenta, entre 1 o 2 días de retardo. Una característica importante de este tipo de infección es que es absolutamente biotrófica. El hongo crece tanto intracelular como intercelularmente y va nutriéndose a expensas de las células del organismo hospedador y también es rodeado por una membrana celular invaginada como en el caso de la fase biotrófica de la infección foliar (Marcel et al 2010). Es interesante, que durante el crecimiento biotrófico en la infección foliar, el frente de infección va "deteniéndose" continuamente. Esto es debido a que el hongo no avanza hasta que la célula hospedadora no muere y se traslada hacia otra célula colindante (Kankanala et al 2007). En cambio en la infección radicular el avance es continuo y el hongo no va matando a las células de la planta durante su camino. Así el hongo avanza asintóticamente por la raíz probablemente con la finalidad de alcanzar tejidos superiores disparando en la menor medida posible el sistema inmune de la planta (Marcel et al 2010). Posiblemente, el hongo utiliza esta estrategia de infección para poder usar el suelo como reservorio durante las épocas de rotación de cultivos, aunque lo cierto es que esta forma de infección solo ha sido observada bajo condiciones de laboratorio (Tucker et al 2010).

2.2 Regulación de la formación del apresorio

Como hemos comentado anteriormente, la formación del apresorio es un proceso complejo regulado por múltiples señales externas, tales como la hidrofobicidad, los monómeros de cutina y las ceras presentes en la superficie de la hoja. En efecto, la adición exógena de monómeros de cutina induce la formación de apresorio aún si la superficie sobre la que ha germinado es hidrofílica. Todas estas señales externas son percibidas por receptores del hongo y se transmiten a través de distintas rutas moleculares haciendo que el conidio tome o no la decisión de formar el apresorio. En los últimos años, los componentes moleculares implicados en la regulación del apresorio y la patogenicidad han sido identificados y extensamente revisados por diferentes investigadores (Hamel et al 2012, Jin et al 2013, Lengeler et al 2000, Li et al 2012, Wilson and Talbot 2009). Como describiremos brevemente a continuación, en *M. oryzae* hay 3 principales rutas de señalización implicadas en la formación y maduración del apresorio: la ruta dependiente del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y las rutas mediadas por las MAP quinasa (MAPK) Pmk1 y Mps1 (Figura 6). Como ha ocurrido con otras rutas, muchos de los componentes moleculares se

han identificado por homología con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Chen and Thorner 2007, Correia et al 2010, Zhao et al 2007)

2.2.1 Receptores

Varias proteínas han sido caracterizadas en *M. oryzae* como sensores capaces de reconocer las señales externas que inducen la formación del apresorio. A nivel de membrana se identificó un receptor acoplado a proteínas G, **Pth11**, el cual responde ante determinadas características de la superficie de la hoja, como la dureza, la hidrofobicidad, la presencia de monómeros de cutina, etc (DeZwaan et al 1999, Li et al 2012). Este receptor Pth11 está implicado en la activación de las rutas de señalización mediadas por AMPc y la MAPK Pmk1 a través de un complejo heterotrimérico proteína G. Este complejo está formado por la subunidad α , codificada por los genes *MAGA*, *MAGB* Y *MAGC*, la subunidad β , codificada por el gen *MGB1*, y el regulador negativo Rgs1. En general, las proteínas G sirven de traductores entre los receptores de la superficie celular y efectores intracelulares.

La proteína **Mpg1** es una hidrofobina fúngica de la clase I secretada por *M. oryzae* implicada en el desarrollo del apresorio (Talbot et al 1996). Mpg1 recubre el conidio generando una capa muy hidrofóbica que le proporciona cierta resistencia al agua y ayuda al anclaje en la superficie de la hoja. Esta proteína también actúa como sensor de ciertos estímulos externos como la hidrofobicidad (Soanes et al 2002).

MoMsb2 y **MoSho1** son otros dos receptores involucrados en los procesos infectivos del hongo *M. oryzae* como la conidiación y la formación del apresorio (Liu et al 2011b). En otros hongos fitopatógenos, estos receptores también participan en varios procesos relacionados con la infección, como en el hongo *Ustilago maydis* donde juegan un papel clave durante la diferenciación del apresorio (Lanver et al 2010). Sus ortólogos en levadura están implicados en la regulación de rutas involucradas en diferentes procesos como la respuesta a estrés osmótico y el crecimiento vegetativo (Cullen et al 2000, Cullen et al 2004, Yang et al 2009). Liu y colaboradores demostraron que el mutante $\Delta MoMsb2$ forma significativamente menos apresorio y es incapaz de infectar la planta del arroz aunque su conidiación es normal (Liu et al 2011b). En cambio, en el mutante $\Delta MoSho1$ no está afectada la formación de apresorio aunque sí la conidiación y presenta virulencia ligeramente reducida. En *M. oryzae*, MoMsb2 participa en el reconocimiento de monómeros de cutina de la superficie foliar, como el 1,16 hexadecanodiol, induciendo la formación del apresorio. MoSho1 en cambio responde a los alcoholes primarios,

principal componente de las ceras superficiales de la hoja, las cuales también tienen cierta implicación en la hidrofobicidad de la superficie foliar.

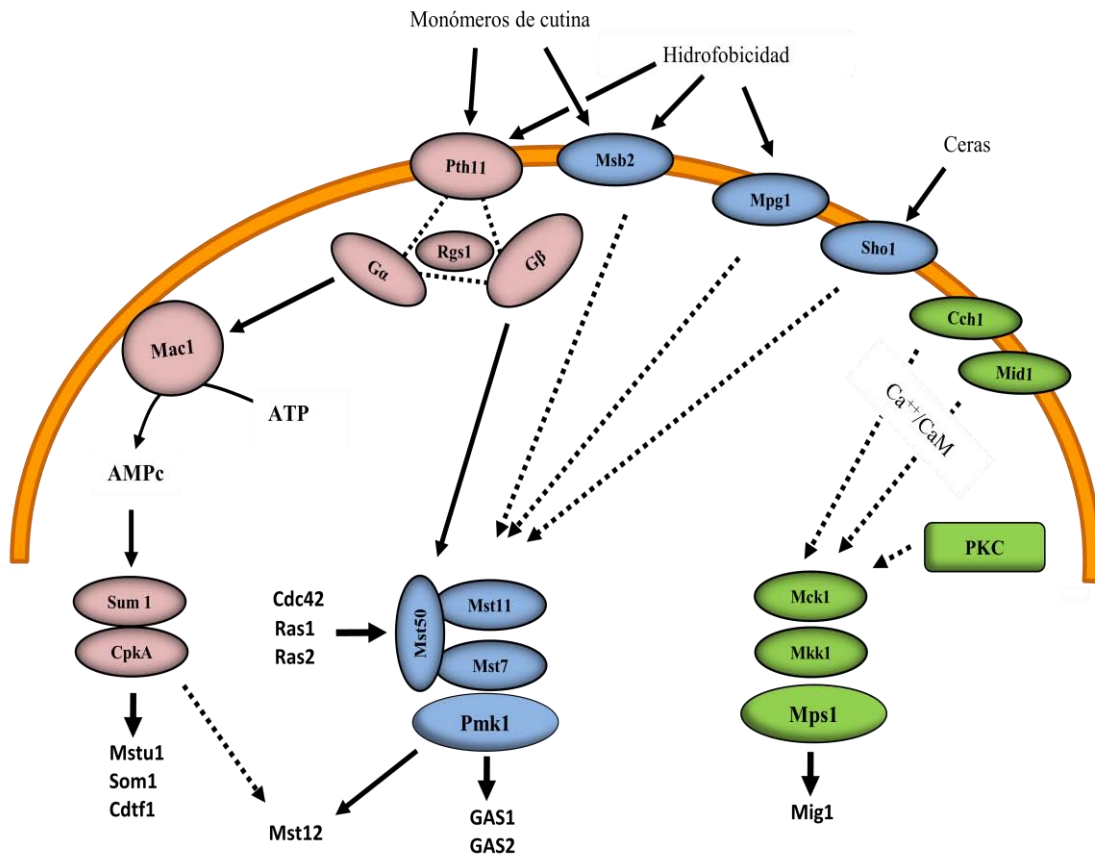


Figura 6 Representación esquemática de las 3 rutas de señalización implicadas en la formación de apresorio en el hongo *M. oryzae*

2.2.2 Ruta del Adenosín monofosfato cíclico (AMPc)

La ruta de señalización del **AMPc** está implicada en la iniciación del proceso de formación del apresorio mediante el reconocimiento de señales externas. El hongo produce AMPc a través de la adenilato ciclasa **Mac1**. Un mutante $\Delta mac1$ es defectivo en la formación del apresorio y no patogénico (Choi and Dean 1997). Sin embargo, la adición exógena de AMPc revierte el fenotipo silvestre, induciendo la formación de apresorio; este efecto inductor se produce incluso en superficies hidrofílicas que en condiciones normales serían no inductivas.

La adenilato ciclasa Mac1 es regulada por la subunidad α de la proteína G (**G α**) acoplada al receptor Pth11. Como hemos comentado, en *M. oryzae* se han identificado 3 genes *MAGA*, *MAGB* y *MAGC* que codifican para G α . Sin embargo, previos estudios mostraron que mutantes $\Delta magA$ o $\Delta magC$ no tienen un efecto en el crecimiento vegetativo ni en la formación del apresorio,

mientras que la disrupción del gen *MAGB* reduce significativamente el crecimiento vegetativo, conidiación, formación del apresorio y patogenicidad (Fang and Dean 2000, Liu and Dean 1997). El regulador negativo **Rgs1** es capaz de interactuar con la subunidad $G\alpha$ bloqueando la formación del apresorio en condiciones no favorables. Mutantes Δ *rgs1* son capaces de formar apresorio en superficies hidrofílicas no inductoras (Liu et al 2007). Sin embargo, cómo la señalización mediada por proteína G regula la ruta del AMPc, así como otras rutas implicadas en la infección por *M. oryzae* como la ruta MAPK Pmk1, es una pregunta que aún no tiene una respuesta clara a nivel molecular. En el 2010, se identificó y caracterizó a nivel funcional un nuevo gen relacionado con la patogenicidad de *M. oryzae*, **MoRIC8** (Li et al 2010). Análisis por sistemas doble híbrido han revelado que la proteína MoRic8 es capaz de unirse a la subunidad $G\alpha$ MagB sugiriendo que MoRic8 podría actuar como un regulador de la señalización por proteína G en la ruta de la adenilatociclasa.

El AMPc formado por la adenilatociclasa interactúa con **Sum1**, la subunidad reguladora de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), liberando y activando así la subunidad catalítica, la cual es codificada por el gen **CPKA** (Mitchell and Dean 1995). Esta subunidad catalítica activa a su vez a diferentes factores de transcripción implicados en la formación del apresorio, como son **Mstu1**, **Som1** y **Cdtf1** (Li et al 2012). La activación constitutiva de CpkA en el mutante carente de la actividad reguladora Sum1, induce la formación de apresorio en mutantes Δ *mac1* o en superficies hidrofílicas (Adachi and Hamer 1998). Sin embargo, el mutante Δ *cpkA* aún forma apresorio, aunque de pequeño tamaño y no funcional, reduciendo su capacidad infectiva (Lengeler et al 2000, Wilson and Talbot 2009, Xu et al 1997). Esto se debe a que el papel de la ruta de la adenilatociclasa incide más en el desarrollo del apresorio aumentando su turgor y viabilidad que en la formación del apresorio en el sentido estricto del término. Además, se ha identificado en *M. oryzae* el gen *CPK2* que codifica también para otra subunidad catalítica de PKA y que puede tener funciones complementarias a CpkA.

Para terminar con la ruta de señalización del AMPc comentaremos su implicación en la degradación de cutina por cutinasas del hongo. Se sabe que la degradación enzimática de la cutina de la superficie foliar ayuda al apresorio a romper la cutícula de la planta y entrar en el mesófilo, además de desprender monómeros de cutina que inducirán la formación de apresorio en conidios circundantes. En el hongo *M. oryzae* se conocen dos cutinasas llamadas Cut1 y Cut2. Se sabe que el gen CUT1 no interviene en el proceso de infección, sin embargo los mutantes Δ *cut2* tienen disminuida su virulencia. Al añadir exógenamente AMPc se consigue que los niveles de virulencia de Δ *cut2* sean restaurados alcanzando los de la cepa silvestre. Los resultados sugieren

que Cut2 está regulado de alguna forma por la PKA aunque no se conoce el mecanismo concreto (Skamnioti and Gurr 2007).

2.2.3 Ruta de la MAP quinasa Pmk1

El gen **PMK1** codifica para una proteína análoga de las quinasas Fus3 y Kss1 de *S. cerevisiae*. Pmk1 está presente en toda la hifa del hongo, pero solo se activa al ser fosforilada por la proteína **Mst7** (MAPKK) la cual solo es activa si es previamente fosforilada por la proteína **Mst11** (MAPKKK). Estas dos proteínas son homólogas a las quinasas Ste7 y Ste11 de *S. cerevisiae*. Los 3 genes *PMK1-MST7-MST11* son imprescindibles para la formación del apresorio. El mutante $\Delta pmk1$ es incapaz de formar apresorio, por tanto incompetente a la hora de infectar a la planta de arroz ni formar las típicas lesiones foliares relacionadas con la enfermedad (Xu and Hamer 1996). En un mutante $\Delta mst11$ donde se exprese un alelo activo del gen *MST7* provoca, como es esperable, que se revierta la formación de apresorio, pero se ha visto que estos apresorios son más pequeños que en el organismo silvestre. La proteína Mst11 tiene en su secuencia un motivo SAM que es conocido por permitir la unión con otras proteínas que presenten este motivo o a secuencias de RNA. Concretamente en este caso Mst11 interactúa con **Mst50** (análogo de Ste50 en *S. cerevisiae*) el cual hace las funciones de andamio molecular facilitando el acceso de unos miembros de la ruta con otros (Park et al 2006). Se sabe que Mst50 no se une en absoluto con Pmk1 y muy débilmente con Mst7 (Zhao et al 2005). Además, los mutantes $\Delta mst50$ o las cepas que tienen truncado el motivo SAM de Mst50 son incapaces de formar apresorio y por tanto son no patogénicos (Park et al 2006). Mst50 también presenta un dominio carboxi-terminal de unión a proteínas del tipo Ras (Zhao et al 2007). En *M. oryzae* existen dos proteínas de este tipo que intervienen en la formación de apresorio, llamadas Ras1 y Ras2. Ambas se sabe que juegan un papel en la regulación de la formación de apresorio, en la ruta de Pmk1 a nivel de Mst11 y Mst50. La importancia de Mst50 va más allá de la formación del apresorio, de hecho participa como regulador en otras rutas de señalización importantes para el hongo (Park et al 2006). Un ejemplo importante es la interacción de Mst50 con Cdc42, lo cual lo relaciona también con el ciclo celular del hongo (Zhao et al 2005, Zhao et al 2007). De hecho cada día se están descubriendo más procesos del hongo que están influidos de forma indirecta por esta ruta de señalización (Jin et al 2013, Zhou et al 2014).

Esta ruta MAP quinasa está relacionada con la ruta del AMPc a través del complejo proteína G. En este caso **Mgb1**, la subunidad β , es la responsable de activar la cascada de la MAPK Pmk1 interactuando con Mst50, y permitiendo que se una a Mst11 y Mst7. Como vimos el complejo trimérico es activado por el cambio de conformación del receptor Pth11, el cual actúa como

sensor de estímulos externos como la hidrofobicidad y la presencia de monómeros de cutina. Mutación en el gen *MGB1* da lugar a una reducción de conidiación, defectos en la formación del apresorio e incapacidad de penetrar o crecer de forma invasiva en las hojas de arroz (Nishimura et al 2003). La cascada de la MAP quinasa Pmk1 también puede ser activada por otros receptores como la hidrofobina Mpg1 y la mucina MoMsb2, implicados en el reconocimiento de monómeros de cutina e hidrofobicidad, y el sensor MoSho1 que responde a las ceras presentes en la superficie de la hoja.

En cuanto a los genes regulados por Pmk1, mencionar dos genes homólogos ***GAS1*** y ***GAS2*** que se expresan de forma específica durante la formación del apresorio (Xue et al 2002). Hay que señalar que aunque aquí nos hemos centrado en su papel en el desarrollo del apresorio, la MAPK Pmk1 participa en varios procesos importantes para la infección por parte del hongo. De hecho Pmk1 activa el factor de transcripción **Mst12** implicado en la penetración de la superficie foliar y el crecimiento invasivo dentro del mesófilo (Zhao et al 2007). Este factor de transcripción también es un posible punto de conexión entre la ruta Pmk1 y AMPc ya que se ha sugerido que Mst12 puede estar involucrado en la señalización por AMPc regulando la internalización del apresorio (Park et al 2002)

2.2.3 Ruta de la MAPK Mps1

Esta ruta de señalización no está implicada en la formación de apresorio explícitamente sino en su maduración y funcionalidad. Sobre todo se encarga de la formación del "penetration peg", el cual es necesario para que el hongo entre en el mesófilo foliar y continúe con el proceso de infección (Figura 5). Esta ruta, formada por la MAPK **Mps1**, la MAPKK **Mkk1** y la MAPKKK **Mck1**, es comparable a la ruta de integridad celular estudiada en *S. cerevisiae*. La proteína Mps1 es homóloga a Stl2 de la levadura, mientras que Mck1 está relacionada con Bck1. Las mutaciones en los genes *MCK1* y *MPS1* llevan a un fenotipo autolítico y donde la conidiación está muy reducida, debido a la incapacidad de formar la pared celular de forma apropiada (Wilson and Talbot 2009). De hecho Mps1 es responsable directo de la acumulación de α 1-3glucano en la pared celular, inducido por la presencia del monómero de cutina 1,16-hexadecanodiol en el medio (Fujikawa et al 2009). La activación de la ruta Mps1 se da mediante el aumento de Ca^{2+} a través de los canales de Calcio **Cch1** y **Mid1** o directamente por la kinasa Pkc (Wilson and Talbot 2009).

Mps1 activa varios factores de transcripción entre los que destaca **Mig1**, el cual es imprescindible para que el hongo sea capaz de infectar a la planta. En *S. cerevisiae* el homólogo de Mig1 es la proteína Rlm1, que es a su vez activada por Stl2. Los mutantes $\Delta mig1$ son incapaces de infectar

incluso si se inocula en hojas de arroz que ya han sufrido heridas y por tanto no se requiere el proceso de penetración foliar. Esto hace suponer que esta ruta molecular juega un papel en el crecimiento invasivo del hongo, y no solo en la funcionalidad del apresorio a la hora de horadar la superficie foliar (Wilson and Talbot 2009). Además inesperadamente, los mutantes $\Delta mig1$ al contrario que $\Delta mps1$ no muestran un fenotipo autolítico y no muestra problemas en la formación de pared celular. La hipótesis más probable, aunque aún no plenamente confirmada, es que el factor de transcripción Mig1 está involucrado en la supresión de la defensa de la planta frente a la infección fúngica. Sin embargo el mecanismo concreto mediante el cual suprime esta línea defensiva es aún desconocido (Mehrabi et al 2014).

Otros factores de transcripción que parece son activados por Mps1 son los homólogos de Swi4 y Swi6 de *S. cerevisiae*. En la levadura, estos dos factores están implicados en la integridad de la pared celular, lo que concuerda con la dificultad de los mutantes $\Delta mps1$ para formar pared celular y por lo tanto formar un apresorio plenamente maduro y funcional.

2.3 Estructuras similares al apresorio

Como se ha descrito en el apartado 2.1, a partir del tubo germinativo que emerge de la espora se forma el apresorio, una estructura muy especializada para llevar a cabo la infección. Este proceso se produce después de 4-6h de interacción de la espora con la superficie de la hoja. Recientemente, Kong y colaboradores demostraron que el hongo puede formar unas estructuras similares al apresorio que denominaron **ALS** (del inglés *appressorium-like structures*) en los extremos de las hifas (Kong et al 2013). A nivel morfológico los apresorios y las ALS son muy similares. Ambos están melanizados, entre la pared celular y la membrana plasmática, excepto en la parte inferior donde se formará el pico de penetración y ambos incrementan su turgor y se abomban en forma de cúpula. Parece que las ALS son ligeramente más alargadas, 1,4 veces la longitud del apresorio, y parecen más coloreadas tras la tinción con calcoflúor. Existen sin embargo diferencias temporales en su desarrollo; el apresorio está completamente melanizado aproximadamente a las 8h desde que el conidio llega a la superficie hidrófoba, y tarda en torno a 11-12h en estar completamente maduro. Sin embargo, las ALS no presentan melanización hasta pasadas 12h y se observa maduración completa después de unas 24h.

A nivel molecular se ha demostrado que las rutas de señalización comentadas previamente están también involucradas en el desarrollo del apresorio a partir de los extremos de las hifas. Mutantes $\Delta pmk1$ y $\Delta cpkA$ son incapaces de formar ALS, indicando que ambas rutas son esenciales. Sin

embargo, diversas evidencias sugieren que los mecanismos moleculares involucrados en la formación de ambas estructuras infectivas no son idénticos. Como vimos en el apartado dedicado a la vía de señalización dependiente de AMPc, el mutante $\Delta cpkA$ forma apresorios, aunque más pequeños por la falta de turgor y no viables. Este hecho sugiere que la CpkA interviene principalmente en la viabilidad del apresorio (sobre todo en el incremento de su presión interna) y no tanto en su formación, mientras que en las ALS la función de la CpkA es indispensable. En el genoma de *M. oryzae* existe otro gen que codifica para la subunidad catalítica de la PKA, el gen *CPK2*, de forma que la proteína Cpk2 podría compensar la carencia de la actividad proteín-kinasa CpkA. El hecho de que el mutante $\Delta cpkA$ no forme ALS indica que Cpk2 es más eficiente en compensar la falta de CpkA en la formación de apresorio que en la formación de ALS (Kong et al 2013), constituyendo una evidencia más de que el proceso de formación de las ALS es muy similar, pero no idéntico al del apresorio.

Otra diferencia importante entre estas dos estructuras, es que mientras que las ALS parecen menos sensibles a la adición de inductores externos como el AMPc y los monómeros de cutina, son más sensibles a la adición de ceras (Kong et al 2013). Además, el mutante $\Delta chs7$, que carece de la quitin-sintasa Chs7, no es capaz de formar apresorio a partir del tubo germinativo del conidio, pero en cambio, sí que forma apresorio en los extremos de las hifas (Kong et al 2012). Estos resultados sugieren que la composición de la pared celular de ambas estructuras es distinta, explicando así también la diferente intensidad de tinción con calcoflúor.

En cuanto a la funcionalidad de las ALS a la hora de llevar a cabo el proceso de infección se ha demostrado que son menos eficaces en penetrar en la superficie foliar debido a que su presión interna no es tan alta como en el apresorio. Se ha postulado que las diferencias en la composición de la pared celular de ambas estructuras hace que la pared de las ALS no esté tan especializada para el incremento y mantenimiento de la presión interna como lo están las del apresorio (Kong et al 2013).

3. Estrategias de control de la piriculariosis

En este apartado hablaremos de las distintas estrategias utilizadas en el control de patógenos en cultivos vegetales, haciendo especial hincapié en el caso del hongo *M. oryzae*. En la actualidad se promueve la utilización combinada de diferentes estrategias, denominado el **control integrado**, el cual persigue un menor impacto medioambiental. Como se ha comentado en el apartado 1, según la Directiva 2009/128, en la Unión Europea es obligatorio el control integrado desde el año 2014.

En muchas ocasiones la legislación promueve y/o prohíbe el uso de unas u otras técnicas debido principalmente al efecto negativo que tienen sobre la salud humana y el medio ambiente. Por ejemplo, en toda Europa está prohibido el cultivo de plantas transgénicas con fines de producción, y cada vez existen normas más restrictivas para el uso de fungicidas comerciales por motivos de toxicidad cruzada sobre seres humanos u otras especies. Actualmente se está promoviendo la búsqueda de nuevas estrategias de control alternativas, que por un lado incrementen la producción y por otro sean sostenibles y respetuosas con los seres humanos y el medio ambiente.

3.1 Estrategias de prevención

Las estrategias de prevención son aquellas que se utilizan antes de que se dé la infección y pretenden dificultar que esta se produzca. Dado que en el caso de *M. oryzae* no existe un tratamiento completamente efectivo o satisfactorio para frenar la infección una vez que esta se ha producido, las estrategias de prevención tienen más importancia. De hecho contra la enfermedad de la piriculariosis las estrategias preventivas suelen ser la manera más efectiva de disminuir pérdidas en la producción.

La prevención de la piriculariosis comienza por el cultivo de variedades resistentes. Existen variedades que se sabe son más resistentes a la infección por el hongo, como es el caso de *O. sativa* ssp. *japonica* cultivar Saber, mientras que otras son más sensibles como por ejemplo *O. sativa* ssp. *japonica* cultivar Maratelli. Dependiendo pues, de que variedad sea cultivada podemos conseguir reducir las pérdidas debidas al hongo independientemente de otras estrategias de control utilizadas de forma simultánea. Por otro lado, se pueden obtener variedades de arroz resistentes mediante la utilización de la biotecnología, concepto que desarrollaremos en el apartado 3.2.

También es importante el manejo fitotécnico del cultivo. Normalmente se recomienda una densidad de plantas no superior a 150 por m². Esto ayuda a reducir el trasvase de esporas entre plantas por el contacto foliar. Aunque esto no reduce a cero la posibilidad de contagio, ya que las esporas pueden ser transportadas por el viento, sí reduce la incidencia de la infección en el cultivo. Otros cuidados preventivos a la hora del cultivo son la destrucción de rastrojos y malas hierbas y la nivelación adecuada del cultivo (Carreres 2005).

Otro aspecto a tener en cuenta es la cantidad de nitrógeno con la que se abona. El nitrógeno favorece la infección del hongo, por lo que se recomienda no abonar en exceso y hacerlo de

forma tardía (Long et al 2000, Pantoja et al 1997). Sin embargo las variedades de arroz de alto rendimiento, las cuales se suelen sembrar en monocultivo, requieren concentraciones de nitrógeno elevadas. Esto hace que sean más susceptibles a la infección y es una de las causas de que se haya incrementado tanto la incidencia y severidad de la piriculariosis desde el nacimiento de la revolución verde. Es importante también que la cantidad de fósforo y potasio en el abonado estén equilibradas. La cantidad de agua inundando el cultivo también es un factor relevante. En casos de incidencia de la enfermedad se recomienda aumentar la lámina de agua y retrasar la retirada del agua en la maduración en cultivos muy vigorosos y con excesiva paja (Carreres 2005).

Por último, mencionar que las semillas pueden actuar como reservorios de forma que el patógeno puede infectar la plántula durante los primeros estadios del desarrollo. Con el fin de prevenir la infección foliar en estos estadios es necesario desinfectar las semillas mediante bien tratamientos físicos (tratamientos térmicos controlados) o aplicando algún compuesto antifúngico (triciclazol) antes de ser sembradas.

3.2 Biotecnología vegetal

La biotecnología aplicada a la protección de plantas frente a enfermedades representa una alternativa atractiva para la agricultura, complementando así técnicas clásicas de mejora genética dirigidas a la obtención de cultivos resistentes. Otros métodos de mejora tradicionales como puede ser la hibridación sexual cruzada no siempre son posibles, así que la utilización de variedades transgénicas resistentes podría ser una opción útil en este tipo de casos (Grover and Gowthaman 2003, Punja 2001).

Desde mediados de los años ochenta donde se publicaron los primeros trabajos de obtención de plantas resistentes a virus vegetales mediante transformación genética (Abel et al 1986, Fitchen and Beachy 1993), se han descrito numerosas estrategias para obtener plantas resistentes frente a un patógeno concreto o un grupo de patógenos mediante la introducción de un gen. Muchos de éstos se centran en el control de la piriculariosis del arroz (Chujo et al 2014, Qian et al 2014, Wu et al 2014).

Una estrategia es la introducción de un gen que codifique para una **proteína con acción directa sobre el patógeno**. Se ha descrito resistencia frente a patógenos mediante transformación de genes que codifican un producto tóxico para el patógeno, como por ejemplo enzimas hidrolíticas como poligalacturonasas o quitinasas (Kouzai et al 2012). También existen casos de la expresión exógena de un gen que codifica para un péptido antimicrobiano confiriendo resistencia a la

planta. Un ejemplo es la Cecropina A (Tabla 1) la cual fue aislada de la polilla *Hyalophora cecropia* y confiere resistencia al arroz frente a una amplio espectro de microorganismos (Bundo et al 2014, Campo et al 2008, Coca et al 2006). Una variante de esta estrategia es la producción transgénica de proteínas que intervienen indirectamente en el desarrollo del patógeno. Un ejemplo es la proteína RIP (α -momorcharina) que se expresa en semillas de *Momordica charantia* o Melón amargo. Esta proteína elimina residuos de adenina en el RNA mitocondrial 28S impidiendo así la síntesis de proteínas. Se ha visto que introduciendo este gen exógeno en la planta del arroz se consigue resistencia frente al *M. oryzae* (Qian et al 2014).

Otra estrategia es la expresión de **genes que** de alguna forma regulan **las respuestas de defensa de la planta**, como por ejemplo la expresión de genes R (de resistencia) implicados en la respuesta hipersensible (HR) de la planta (Punja 2001). En el caso concreto de *M. oryzae* se ha visto que la sobreexpresión de genes R no es duradera y no parece una estrategia de obtención de plantas resistentes eficaz (Huang et al 2014, Jeon et al 2013, Valent and Chumley 1994). Esto es debido sobre todo a la gran variedad de razas de *M. oryzae* que existen y de su rápida tasa de mutación. Además, se han logrado plantas transgénicas de arroz que expresan el gen AtNPR1, el cual está implicado en la regulación de varios genes de defensa mediados por ácido salicílico (SA) en *Arabidopsis thaliana*. En arroz se conoce una ruta defensiva análoga a la regulada por AtNPR1, por lo que su expresión actúa confiriendo resistencia a la planta frente a distintos patógenos, entre ellos *M. oryzae* (Quilis et al 2008). Otro ejemplo de obtención de plantas resistentes mediante la expresión de un gen implicado en la regulación de la respuesta defensiva del arroz es el factor WRKY47 (Wei et al 2013). Los factores de transcripción WRKY (el nombre viene de la secuencia de 4 aminoácidos característica de estas proteínas) están implicados en la respuesta del arroz frente a patógenos. También se han obtenido plantas transgénicas de arroz que producen altos niveles de elicitores específicos (e.g. H₂O₂, ácido salicílico o etileno) implicados en modular la respuesta de defensa de la planta, consiguiendo así resistencia frente al patógeno (Helliwell et al 2013).

3.3 Fungicidas

Se entiende por fungicidas aquellas sustancias utilizadas para matar o impedir el crecimiento de hongos y mohos. Anteriormente los fungicidas se caracterizaban por su amplio espectro de acción y su gran eficacia frente al crecimiento de hongos. Sin embargo, conforme se ha ido avanzando en la caracterización del modo de acción de los fungicidas así como en los mecanismos moleculares implicados en el crecimiento de los patógenos y su proceso infectivo, se tiende a encontrar

fungicidas cada vez más específicos frente a un hongo en concreto. Por tanto, los fungicidas pueden clasificarse en compuesto de amplio espectro o generales y fungicidas específicos en función de su modo de acción (revisión general de los diferentes tipos de fungicidas actualizada por la organización “*Fungicide Resistance Action Committee, FRAC*”, FRAC Code List 2015, <http://www.frac.info/>).

En el caso de *M. oryzae* los fungicidas de amplio espectro más utilizados son de la familia de los imidazoles como el Procloraz, y los triazoles como el Triciclazol, Tebuconazol o el Triflumizol (http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/pyricularia_oryzae_del_%20arroz.htm (Carreres 2005). Estos compuestos interfieren en la síntesis del ergosterol, un componente esencial de la membrana celular del hongo. Su mecanismo de acción es la inhibición del enzima C14 α -desmetilasa acoplada al citocromo P450 y que transforma lanosterol en ergosterol. La falta de ergosterol altera la fluidez y permeabilidad de la membrana, inhibiendo así el crecimiento y la replicación celular del hongo. Aunque el efecto final es el mismo, el mecanismo de inhibición de los imidazoles y triazoles es diferente. En algunos casos se produce también la acumulación de otros esteroides. Otros fungicidas utilizados son de la familia de las estrobilurinas (QoIs), como la Azoxiestrobina, los cuales inhiben la respiración mitocondrial de las células de los hongos patógenos (Kunova et al 2013), o el Citronela, un monoterpeno que afecta al factor de necrosis alfa (*TNF- α*) e inhibe la formación de esporas, la germinación y el crecimiento del hongo (Aguar et al 2014).

Una de las dianas para la caracterización de fungicidas específicos frente a *M. oryzae* es la síntesis de melanina que como hemos visto es imprescindible para la formación del apresorio y por tanto, la infección de este patógeno. Entre este tipo de fungicidas, destacar Piroquilon y Ftalida que afectan a la ruta de síntesis de la melanina por lo que inhiben la infección foliar del hongo (Liao et al 2001). Otro fungicida que actúa al mismo nivel en *M. oryzae* es el Triciclazol. Aunque es un fungicida de amplio espectro que actúa sobre varios tipos de hongos inhibiendo el crecimiento aéreo de las hifas y la conidiación, en *M. oryzae* actúa a nivel de la síntesis de melanina (Kunova et al 2013). Estos tres fungicidas son del tipo MBI-R, es decir actúan como inhibidores de la hidroxinaftaleno reductasa. Por el contrario, los inhibidores tipo MBI-D como el carpropamid actúan inhibiendo el enzima dehidratasa en lugar de la reductasa.

En cuanto a la aplicación de los fungicidas frente a *M. oryzae*, se recomienda utilizar dos métodos distintos. El primero consiste en aplicar el fungicida sobre las plántulas de arroz justo después de la germinación. El segundo es el esprayado de todo el cultivo cuando se están empezando a formar las panículas, en este caso se realizan una o dos aplicaciones. Esta segunda técnica se

centra en evitar que la enfermedad se propague a las panículas. Aunque estas dos estrategias son las utilizadas, ninguna de las dos es considerada de gran eficacia contra este hongo. El control de la piriculariosis mediante fungicidas resulta ineficaz en parte debido a la facilidad de adaptación que tiene el hongo y a la aparición de resistencias. Se han caracterizado aislados de *M. oryzae* resistentes al fungicida Azoxiestrobina (Avila-Adame and Koller 2003) o al fungicida carpropamid (Takagaki et al 2004). Considerando la dificultad en el control de la piriculariosis por la aparición de resistencias, así como la toxicidad inespecífica de los fungicidas utilizados que pueden ocasionar daños a la salud humana y al medio ambiente, es importante el control integrado, la utilización combinada de diferentes estrategias con el fin de reducir en cierta medida la cantidad de fungicida aplicada.

3.4 Inducción de la respuesta de defensa de la planta

Una de las formas de control de patógenos vegetales más respetuosas con el medio ambiente es la inducción del sistema inmune de la propia planta. Las plantas, en su carrera evolutiva frente a los patógenos que las atacan, han desarrollado un sistema de defensa complejo para protegerse frente a ellos. Hay dos ramas o vías del sistema inmune de las plantas que han sido ampliamente estudiadas y revisadas por diferentes autores (Jones and Dangl 2006, Nurnberger et al 2004). La primera línea de defensa o resistencia basal se basa en el reconocimiento de estructuras moleculares evolutivamente conservadas en la inmensa mayoría de los patógenos. Estas moléculas son denominadas MAMPs (del inglés *microbe-associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a microbios) o PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos). Los PAMPs son moléculas con una función enzimática o estructural indispensable para el microorganismo, por ejemplo el lipopolisacárido y la flagelina bacterianos y la quitina de las paredes fúngicas. Esto hace que sean estructuras sometidas a bajas tasas de cambio evolutivo. El reconocimiento de estos PAMPs por parte de receptores de la planta (PRR) desencadena la resistencia basal llamada **PTI** (del inglés **PAMPs-triggered Immunity**, inmunidad inducida por PAMPs). Además la planta también es capaz de reconocer productos que se producen por la acción del microorganismo sobre la propia planta, a estas estructuras se les denomina MIMPs (del inglés *microbe-induced molecular patterns*, patrones moleculares inducidos por microbios) (Bent and Mackey 2007). Un ejemplo son los monómeros de cutina que se desprenden de las paredes de las células de la planta. La ventaja del reconocimiento de MIMPs frente al reconocimiento de PAMPs es que aunque un microorganismo modifique evolutivamente sus PAMPs puede seguir siendo reconocido por los MIMPs que genera

al intentar atacar a la planta. Durante el proceso evolutivo los patógenos han diseñado moléculas concretas que les permiten superar este primer nivel de respuesta inmune de la planta. Estas moléculas son denominadas factores de virulencia (*Avr*) o más comúnmente "efectores" que son introducidos por distintos medios dentro la célula de la planta donde bloquean la PTI. Así hacen que la planta sea susceptible a la infección. A su vez, las plantas han diseñado una respuesta de defensa secundaria basada en el reconocimiento de estos efectores. A este tipo de respuesta de defensa se le llama **ETI** (del inglés *Effector-Triggered Immunity*, inmunidad inducida por efectores) o formalmente conocida como resistencia gen a gen. De forma resumida, las plantas tienen una serie de genes R que codifican para proteínas capaces de interactuar de forma específica con los factores *Avr* (Bergelson et al 2011). La mayoría de genes R codifican para proteínas polimórficas NB-LRR que contienen un dominio de unión a nucleótidos (NB) y un dominio rico en leucinas (LRR). La resistencia mediada por proteínas NB-LRR es efectiva frente a patógenos biótrofos obligados o hemibiótrofos, pero no frente a patógenos que matan al huésped durante la colonización (necrótrofos). Tanto la PTI como la ETI conllevan ciertas respuestas defensivas que se dividen de forma general en dos: respuestas de defensa rápidas y respuestas de defensa tardías. Dentro del primer grupo se encuentran el movimiento de iones a través de la membrana plasmática y señalización por Ca^{2+} , la activación de las cascadas MAPK, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de óxido nítrico (NO), la fortificación de la pared celular, la producción de lipoxigenasas y fitoalexinas, y la respuesta hipersensible (Song and Goodman 2001). Como respuestas de defensa tardías podemos destacar la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) (Van Loon and Van Strien 1999) las cuales son unas proteínas con función defensiva generadas por la planta ante el ataque de un patógeno.

La estrategia de control de patógenos por medio de la inducción de la respuesta inmunitaria de la planta se basa en utilizar PAMPs, MIMPs, efectores o moléculas que la planta reconozca como análogas a éstas, para conseguir que la planta desencadene su respuesta inmune y esté en una situación de "alerta", preparada para contrarrestar la infección del patógeno. Estos compuestos capaces de inducir las respuestas de defensa se denominan **elicitors**. Uno de los ejemplos clásicos es el quitosán (quitina) que es un homopolisacárido de N-acetil-glucosamina el cual está presente en la cutícula de los artrópodos y en las paredes de los hongos (Bautista-Baños et al 2006, Bautista-Baños et al 2003). En el caso del patosistema arroz - *M. oryzae* se ha visto que la aplicación de quitosán genera resistencia a la piriculariosis (Fujikawa et al 2009, Kishimoto et al 2010). Otros compuestos que actúan como elicitors induciendo las respuestas de defensa a nivel sistémico en arroz son las fitohormonas. Por ejemplo, el tratamiento de plantas de arroz con ácido salicílico o brasinoesteroides confiere resistencia frente a *M. oryzae* debido a la inducción

de las respuestas de defensa (Jiang et al 2012, Nakashita et al 2003). La aplicación de ácido jasmónico sobre la planta de arroz induce la síntesis de un sesquiterpeno que presenta actividad antifúngica (Taniguchi et al 2014).

Activar y mantener las respuestas de defensa activadas supone un gasto energético y, por tanto una situación desfavorable en la planta (Helliwell and Yang 2013). Mediante biotecnología se han abordado diferentes estrategias con el fin de inducir la activación de las respuestas de defensa en la planta en el momento concreto en el que se necesitan, como la obtención de plantas transgénicas que expresan genes de interés bajo el control de un promotor inducible por el ataque del patógeno. Un ejemplo concreto es la sobreexpresión del enzima *OsACS2* en arroz de forma que la planta presenta unos niveles más altos de etileno de forma inducible y la expresión de genes de defensa especialmente en respuesta a la infección por patógeno (Helliwell et al 2013).

El modo de acción de algunos fungicidas de nueva generación actualmente en el mercado se basa en la activación de las respuestas de defensa como es el caso del **Probenazole**. Se ha descrito que el probenazole actúa a través de la acumulación de ácido salicílico en la planta induciendo la respuesta de defensa (Umemura et al 2009, Yoshioka et al 2001), aunque el mecanismo mediante el cual lo hace aún no está bien caracterizado (Noutoshi et al 2012). El probenazole se utiliza de forma profiláctica para proteger el arroz de enfermedades causadas por hongo y bacterias.

3.5 Control biológico

El control biológico es una estrategia de defensa en pleno desarrollo basada en la utilización de un organismo capaz de controlar de alguna forma la enfermedad causada por un patógeno, consiguiendo así reducir el impacto de la enfermedad sobre el cultivo. Existen distintas maneras mediante las cuales el agente de biocontrol (ACB) puede afectar al patógeno reduciendo su virulencia. A continuación describiremos brevemente los organismos de biocontrol en función del modo de acción, haciendo énfasis en los ejemplos para el caso de *M. oryzae*.

Depredadores. El organismo se alimenta preferentemente del patógeno que nos interesa controlar, disminuyendo así su población y haciendo que sean menos dañinos para el cultivo. Los hongos de género *Trichoderma* se caracterizan por ser micófitos (Ojha and Chatterjee 2011, Steyaert et al 2003). Concretamente la especie *Trichoderma hamatum* se ha utilizado en el control de *M. oryzae* (Studholme et al 2013).

Parasitoides. El organismo introducido se alimenta de forma externa o interna de los recursos del patógeno. Así limitan la estabilidad y la importancia de la plaga. El parasitismo puede involucrar la producción de enzimas extracelulares, como quitinasas y proteasas, que lisan la pared celular del patógeno. Un ejemplo de organismo parasitoide de *M. oryzae* es el micovirus chrysovirus 1-B que afecta al desarrollo y crecimiento vegetativo del hongo consiguiendo controlar la piriculariosis (Urayama et al 2014).

Antagonistas. En este caso el organismo compite directamente con el patógeno por algún recurso o nutriente e impide que la población de éste aumente de forma óptima. Es importante que el recurso por el que compitan ambas especies no sea un recurso que venga del cultivo, ya que en ese supuesto estaríamos introduciendo una nueva plaga. Se han identificado bacterias antagonistas, como muchas rizobacterias PGPR, cuyo modo de acción es la competencia por hierro a través de la producción de sideróforos. A nivel de laboratorio, se han seleccionado cepas de *Lysobacter enzymogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus polymyxa* y *Streptomyces sindeneusis* como antagonistas de *M. oryzae* (Karthikeyan and Gnanamanickam 2008, Mathioni et al 2013, Zarandi et al 2009). Sin embargo, un estudio realizado por Yang J.H. y colaboradores indicó que no existe correlación entre la presencia de especies antagonistas de *M. oryzae* y su utilidad como método de biocontrol (Yang et al 2008). Por tanto, la tarea de encontrar una especie idónea para el control de un patógeno concreto no resulta tan directa como la selección de organismos antagonistas de su ambiente.

Inductores de la resistencia sistémica. Es un organismo que por sus características desencadena la respuesta de defensa haciendo que la planta esté preparada o “en alerta” para contrarrestar el ataque del patógeno, disminuyendo así las probabilidades de ser infectada. Es el mismo caso que hemos visto en el apartado anterior pero donde la defensa es disparada por otro organismo. Por ejemplo, el ascomiceto parasitario mutualista del arroz *Harpophora oryzae* dispara las defensa sistémica de la planta, consiguiendo así que la planta este previamente preparada frente a un ataque de *M. oryzae* (Su et al 2013). Otros ejemplos son las bacterias *Pseudomonas fluorescens* Aur 6 and *Chryseobacterium balustinum* Aur 9 que también promueven la respuesta defensiva de la planta confiriéndole resistencia frente a la piriculariosis (Lucas et al 2009).

Secretores de agentes antimicrobianos. En este caso el organismo que introducimos secreta sustancias antimicrobianas que atacan al organismo patógeno causando la muerte o inhibiendo el crecimiento o el desarrollo de la infección. Un ejemplo es el hongo *Streptomyces globisporus* JK-1 que produce compuestos antifúngicos que inhiben la germinación, la formación de apresorio y el crecimiento micelar de *M. oryzae* (Li et al 2011).

Las ventajas que ofrece el control biológico frente a otro tipo de estrategias más convencionales es un menor impacto sobre el ecosistema haciendo que la agricultura sea más sostenible en el tiempo. La idea en la que se basa el control biológico es que ambas poblaciones, el agente de biocontrol y el patógeno, lleguen a un equilibrio como el que ocurriría en condiciones naturales. Sin embargo, existe también el contrapunto de que la introducción de un organismo de un ecosistema diferente puede dar lugar a un desequilibrio poblacional en el otro sentido, lo cual supondría un impacto para el medio ambiente.

3.6 Fungicidas “*low-risk*”

Se entiende por fungicidas de baja toxicidad (*low-risk*) a compuestos con actividad antifúngica que no afecten a otros organismos incluidos a los seres humanos. Debido a la legislación en el tema de fungicidas cada vez más restrictiva, la caracterización y aplicación en la agricultura de este tipo de compuestos está teniendo cada vez un mayor impacto. Dentro de los compuestos *low-risk* se engloban en su mayoría compuestos naturales, con una gran relevancia de los extractos naturales de plantas. En concreto, en el control de la piriculariosis se han aislado compuestos específicos de origen natural como por ejemplo la ent-10-oxodespresina, un terpeno aislado de las hojas de arroz que impide la germinación de la espora y formación del tubo germinativo en el hongo *M. oryzae* (Inoue et al 2013). Otros ejemplos son el ácido hidroxilínoleico que inhibe el crecimiento vegetativo del hongo (Yara et al 2008) o la decusina, una cumarina perteneciente a las benzopironas aislada de la planta *Angelica gigas* y que tiene gran capacidad inhibiendo la germinación de las esporas de *M. oryzae* (Yoon et al 2011).

Dentro de este apartado de compuestos fungicidas con baja toxicidad destacamos los péptidos antimicrobianos (AMPs). Los AMPs son péptidos de pequeño tamaño presentes en todos los organismos como barrera defensiva. Se ha avanzado mucho en el conocimiento de AMPs debido a sus prometedoras expectativas como agentes antimicrobianos. Existen varios ejemplos de utilización de péptidos antimicrobianos en el control de la piriculariosis, ya sean naturales como el péptido AFP (Tabla 1) (Moreno et al 2006) o sintéticos como Hcm1 (Che et al 2011). En el siguiente apartado comentaremos en detalle qué son los péptidos antimicrobianos y su potencial utilización en agricultura.

4. Péptidos antimicrobianos como estrategia alternativa de control

4.1 Descripción general de péptidos antimicrobianos y clasificación

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son un grupo de péptidos evolutivamente conservados que forman parte de los mecanismos de defensa de múltiples organismos, desde procariontes hasta animales pluricelulares como los seres humanos (Auvynet and Rosenstein 2009, López-García et al 2012, Zasloff 2002). Los primeros AMPs se identificaron en los organismos procariontes; ya en 1939 se aislaron las gramicidinas de *Bacillus brevis* con actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* frente a un amplio rango de bacterias gram-positivas (Dubos 1939a, Dubos 1939b). Más tarde, durante la segunda mitad del siglo pasado, se determinó que algunas sustancias antimicrobianas producidas por distintos organismos eucariotes también tenían naturaleza proteica. Un estudio crucial en la historia de los AMPs fue en 1981 el aislamiento de dos pequeños AMPs catiónicos procedentes de insectos, las cecropinas A y B (Steiner et al 1981). Desde entonces, se han caracterizado un gran número de pequeñas proteínas y AMPs naturales, en general de menos de 50 aminoácidos, con propiedades anfipáticas. La mayoría de los AMPs tienen carga neta positiva a pH fisiológico debido a su alto contenido en residuos de arginina y lisina (Marcos and Gandia 2009), aunque también se han reportado en los últimos años algunos AMPs aniónicos (Harris et al 2009). Existen ejemplos de AMPs en todos los reinos taxonómicos, como las defensinas en animales y plantas (Lay et al 2012) las cecropinas en insectos (Ren et al 2012), el péptido AFP en hongos (Hagen et al 2007) o los lantibióticos en bacterias (Dischinger et al 2014, Kindrachuk et al 2013). La gran cantidad de datos sobre AMPs ha propiciado el desarrollo de diferentes bases de datos, como son 'Antimicrobial Peptide Database' (<http://aps.unmc.edu/AP/main.html>) (Wang et al 2009b), 'CAMP: Collection of Anti-Microbial Peptides' (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/>) (Waghu et al 2014), y la base de datos específica de AMPs de origen vegetal "PhytAMP database" (phytamp.pfba-lab-tun.org) (Hammami et al 2009).

Los AMPs pueden subdividirse en diferentes grupos en base a su origen, composición y estructura. Según características estructurales los AMPs se clasifican en péptidos lineales, péptidos con estructuras globulares estabilizadas por puentes disulfuro, péptidos con aminoácidos no usuales y modificaciones post-traduccionales como los lantibióticos, etc. Existen péptidos ricos en algún aminoácido concreto. Este es el caso de los péptidos ricos en prolina como

las apidaecinas de abejas y PR-39 (Tabla 1) de cerdos; los péptidos de plantas shepherin I y II tienen alto contenido en glicina y son de los pocos AMPs de plantas sin cisteínas; indolicidinas (Tabla 1) son ricas en triptófano o hitatinas en histidina; una gran mayoría de AMPs (e.g. defensinas, AMPs de plantas y AFP de hongos) contienen cisteínas con enlaces disulfuro dando lugar a estructuras compactas y estables a condiciones adversas y la degradación por proteasas. Además, atendiendo a su origen los AMPs se dividen en dos grandes grupos, los péptidos de origen natural y los sintéticos.

4.1.1 Péptidos antimicrobianos naturales

Los péptidos antimicrobianos naturales son los que ya existen formando parte del proteoma de un organismo concreto o conservado en varios filos. Estos péptidos son directamente aislados y secuenciados para conocer los residuos aminoacídicos que lo componen así como su estructura secundaria y su conformación tridimensional si la tuviese.

Péptidos antimicrobianos lineales

En su mayoría, este grupo de péptidos presentan una estructura secundaria en hélice- α . En solución acuosa estos péptidos suelen estar desestructurados, pero adquieren su conformación secundaria al interactuar con una membrana anfipática o un sistema que simula una membrana. Entre el 30-50% de los péptidos antimicrobianos conocidos y estudiados a día de hoy pertenecen a esta categoría. Esto es debido a que son péptidos relativamente fáciles de sintetizar, lo cual favorece que sean caracterizados en el laboratorio. Dentro de los AMPs lineales vamos a destacar la familia de las **cecropinas** (Tabla 1) que originalmente fueron aislados de la mariposa nocturna *Hyalophora cecropia*, aunque se han encontrado análogos en otras especies de insectos. Las cecropinas tienen entre 35-37 residuos y se dividen en 3 grandes subgrupos A, B y D (Steiner et al 1981). Estructuralmente hablando las cecropinas presentan una hélice- α anfipática en el extremo amino-terminal (Nt) básico, una secuencia central corta y flexible rica en glicinas y prolinas, y una hélice- α hidrofóbica en su extremo carboxi-terminal (Ct). Esta estructura es responsable de la actividad frente a bacterias (como *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*) y hongos (como *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*), confiriendo al péptido la capacidad de perturbar la membrana y formar canales iónicos dependientes de voltaje (Christensen et al 1988, Fu et al 2004, Lee et al 2013). Concretamente, en este estudio utilizaremos la Cecropina A (CecA), un AMP de 37 aminoácidos con actividad antimicrobiana reportada frente a numerosos hongos y bacterias (De Lucca et al 1997, Giacometti et al 2003, Steiner et al 1981). Recientemente se ha descrito la actividad antiinflamatoria de CecA y su modo de acción sobre las membranas biológicas (Lee et al 2015a). CecA no es un péptido hemolítico y

es tóxico frente a células de mamíferos a concentraciones muy superiores a la concentración MIC a la que inhibe el crecimiento de los microorganismos. La **melitina** (Tabla 1) es un péptido de 26 aminoácidos que es el constituyente principal del veneno de las abejas. Su estructura secundaria consta de 2 hélices- α con un extremo Nt hidrofóbico y un extremo Ct hidrofílico. Se une a membranas anfipáticas formando poros y afectando el flujo de iones. Aunque se ha mostrado su potencial aplicación en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Zhang et al 2014), la melitina es altamente tóxica y hemolítica en células de mamíferos. Otros AMPs lineales identificados en insectos son la **drosocina** y las **apidaecinas** (Tabla 1), péptidos ricos en prolina cuyo mecanismo de acción parece ser diferente al de la mayoría de AMPs identificados. En ambos casos, los péptidos sintetizados con los esteroisómeros D de los aminoácidos naturales no son activos, lo que indirectamente implica un proceso de reconocimiento estereoselectivo (Casteels and Tempst 1994). Ambos péptidos interactúan de forma específica con la proteína bacteriana de choque térmico DnaK; sin embargo no unen la proteína equivalente en humanos (Otvos et al 2000).

Junto con los insectos, otra importante fuente de péptidos antimicrobianos son los anfibios. *Xenopus laevis* segrega en la piel el péptido antimicrobiano **magainina** (Tabla 1) (Zasloff 1987). Las magaininas 1 y 2 (péptidos de 23 aminoácidos) presentan actividad frente a gran variedad de bacterias, hongos y protozoos mediante la formación de poros en sus membranas, pero no son tóxicas frente eritrocitos humanos (Yang et al 2000). Esta propiedad no hemolítica podría deberse a una interacción péptido-colesterol en las membranas de mamíferos que inhibe la formación de estructuras del péptido responsables de la lisis (Wieprecht et al 1999).

En mamíferos también se han identificado péptidos lineales como la **lactoferricina**, las **histatinas** y las **cathelicidinas** (Tabla 1). Estos últimos constituyen una familia ampliamente estudiada con péptidos de entre 12 y 80 residuos aunque la mayoría tienen entre 25-30 (Zanetti 2004). Muchas cathelicidinas presentan estructura en hélice- α , como LL-37/hCAP18 (aislada de humanos) (Bals et al 1998) y CRAMP (aislada de ratón) (Gallo et al 1997); otras son ricas en prolina y arginina, haciendo poco probable la estructura secundaria, como es el caso de PR-39 aislada del intestino de cerdo (Chan and Gallo 1998, Veldhuizen et al 2014). Las cathelicidinas, a diferencia de otros muchos AMPs, retienen la actividad a altas concentraciones de sal y su mecanismo de acción no está únicamente relacionado con la formación de canales (Boman et al 1993, Chan and Gallo 1998). Se ha demostrado la implicación de LL-37 en la respuesta inmune e inflamatoria en humanos (Bàbolewska and Brzezinska-Blaszczyk 2015, Lee et al 2015b). La lactoferricina B es un fragmento peptídico de 25 aminoácidos del dominio Nt de la lactoferrina bovina, liberado tras digestión con pepsina y que tiene propiedades antimicrobianas frente a un amplio rango de

microorganismos (Wakabayashi et al 2006). Estudios de resonancia magnética nuclear han revelado que la estructura tridimensional de lactoferricina B es una hoja β antiparalela y que los residuos hidrofílicos y positivos rodean a la superficie hidrofóbica, sugiriendo interacciones del péptido con la membrana biológica (Hwang and Vogel 1998).

Tabla 1 Secuencias de algunos de los péptidos antimicrobianos naturales de diferentes orígenes

Cecropina A	KWKFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVIGSAKAI
Cecropina B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL
Melitina	GIGAVLKVLTTLGLPALISWIKRKRQQ
Drosocina	GKPRPYSRPTSHRPIRV
Magainina 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVALKAL
PR-39(15-mer)	RRRPRPPYLPRRPP
Indolicidina	ILPWKWPWWPWRR
Lactoferricina B	FKCRRWQWRMKKLGAPSIITCVRRAF
Histatina 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY
Defensina α hNP-1	VVCACRRALCLPRERRAGFCRIRRGRHLCRR
Defensina β	DHYNCVSSGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCK
AFP (<i>A. giganteus</i>)	ATYNGKCYKDNICKYKAQSGKTAICKCYVKKCPRDGAKCEFDSEYKGYKCYC
Tionina V	RVCRRRSAGFKGLCMSDHNAQVCLQEGWGGGNC DGVMRQCKCIRQC
Dm-AMP1	ELCEKASKTWSGNCNGTGHCDNQCKSWEAAHGACHVRNGKHMCFCYFNC
Heveina	EQCGRQAGGKLCFPNNLCCSQWGWCGSTDEYCS PDHNCQSNCKD
Ib-AMP1	QWGRCCGWGPGRRYCVRWC
MiAMP2	DPQTECQQCQRRCRQQ-ESGPRQQQYCYRRCKEICEEEEEYN
Snakina-2	YSYKKIDCGGACAARCLSSRPLCNACGTCCARCNCVPPGTSGNTE TCPCYASLTTHGNKRKCP

Péptidos globulares con puentes disulfuro

Estos AMPs presentan estructuras relativamente más complejas que los péptidos lineales y es esta estructura la que dicta su actividad biológica. Una de las familias más importantes son las defensinas, como las α -defensinas y β -defensinas en mamíferos (Tabla 1) (Brogden et al 2003, Ganz 2004, Lehrer 2004), las defensinas de insectos (Zhang and Zhu 2009), y las defensinas de plantas (García-Olmedo et al 1998). Las defensinas se agrupan en varias clases estructurales, según sus puentes disulfuro, estructura y homología de secuencia (Zhao and Lu 2014). Las **α -defensinas**, aisladas de humanos, conejos, cerdos y ratas, son altamente catiónicas y consisten en 29-35 aminoácidos con una distribución de residuos de cisteína conservada. Las **β -defensinas**, aisladas a partir de neutrófilos bovinos, son péptidos similares a las α -defensinas pero con diferente distribución de puentes disulfuro. Consisten en 38-42 residuos y son principalmente antibacterianos. En sus formas monoméricas, todas las α - y β -defensinas contienen tres hebras β antiparalelas entrecruzadas por 3 ó 4 puentes disulfuro. Tanto las **defensinas de insectos** como

las de plantas son más largas que las α - y β -defensinas de vertebrados y tienen una estructura α helicoidal.

Dentro de este tipo de péptidos globulares destacar los AMPs de plantas cuya característica general es que son péptidos catiónicos de pequeño tamaño con propiedades anfipáticas y ricos en cisteína (López-García et al 2012, Padovan et al 2010, Sels et al 2008). Como hemos comentado antes, las **defensinas de plantas** son muy similares a las defensinas identificadas en insectos. Se han identificado miembros de esta familia en todo tipo de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas y se han encontrado en todo tipo de tejidos desde hojas, raíces, flores o semillas. Son péptidos de 45-55 aminoácidos con 8 cisteínas unidas por puentes disulfuro. Su estructura tridimensional está formada por 3 láminas- β y una hélice- α formando un tipo de estructura característica llamada $\beta\alpha\beta\beta$. Presentan actividad antimicrobiana frente a una gran cantidad de hongos y levaduras (Carvalho and Gomes 2009). Las **tioninas** (Tabla 1) son una familia de péptidos de aproximadamente 5KDa, de 45 a 48 aminoácidos, que presentan un tipo de estructura denominada plegamiento- γ (gamma) con dos dominios, el brazo vertical formado por helices- α y el horizontal constituido por dos láminas- β antiparalelas (Ji et al 2015, Stec 2006). Son activas frente a una gran variedad de hongos patógenos y especies bacterianas, aunque son ineficaces frente a géneros concretos como *Pseudomonas*, *Ralstonia* o *Erwinia* (Slusarenko et al 2000, Titarenko et al 1997). Además de su implicación en los mecanismos de defensa de las plantas, diversas evidencias sugieren un papel para algunas tioninas y defensinas en la adaptación de las plantas al estrés abiótico (Carvalho and Gomes 2009, Jung et al 2005). Otra familia de AMPs vegetales son las **snakinas**. Los primeros miembros que se aislaron fueron snakin-1 (63 aminoácidos) y snakin-2 (66 aminoácidos) (Marmioli and Maestri 2014). Presentan estructuras análogas a las de las proteínas GAST y GASA de Arabidopsis (Porto and Franco 2013) y son similares a algunas proteínas animales como los venenos hemotóxicos de las serpientes. Actualmente se han predicho ortólogos de snakinas en otras plantas, por ejemplo maíz (ZmGASA-like), arroz (GAST1), y tomate (RSI-1) (*PhytAMP*, phytamp.pfba-lab-tun.org) (Nahirñak et al 2012). Son básicas y contienen 12 motivos de cisteína que son estabilizados por 6 puentes disulfuro. A pesar de las grandes variaciones a nivel de secuencia, todas las snakinas presentan rangos de acción antimicrobiana muy similares inhibiendo hongos filamentosos y bacterias a concentraciones inferiores a 10 μ M. Destacar también los péptidos **tipo Knottina** que presentan una estructura característica de “nudo” formada por un puente disulfuro que pasa a través de un macrociclo formado por otros 2 disulfuros (<http://knottin.cbs.cnrs.fr/>). Esta estructura puede ser utilizada en la industria farmacéutica y agroquímica para el desarrollo de futuros compuestos antimicrobianos. Dentro de esta familia de péptidos tipo Knottina mencionar algunos miembros

del subgrupo ciclótidos, que al contrario que la mayoría de los AMPs conocidos presentan carga negativa. Además de su actividad antimicrobiana, algunos péptidos tipo Knottina, en particular los ciclótidos, y algunas defensinas de plantas y tioninas muestran actividad en el control de enfermedades causadas por insectos (Gruber et al 2007). En algunos casos el péptido se une a las membranas epiteliales perforándolas (Barbeta et al 2008), pero en otras ocasiones el péptido actúa como un inhibidor de la digestión impidiendo el crecimiento del insecto (Carvalho and Gomes 2009). Además mencionar otros AMPs de plantas como los péptidos **tipo Heveina** (Tabla 1) con dominios ricos en glicina y cisteína (Slavokhotova et al 2014), el péptido **Mi-AMP1** (Tabla 1) aislado de *Macadamia integrifolia* cuya estructura son 8 láminas- β dispuestas en forma de barril (McManus et al 1999), la familia de péptidos **Mi-AMP2** también aislados de *M. integrifolia* y con algunos miembros con carácter aniónico (Marcus et al 1999), y la familia de péptidos **Ib-AMPs** identificados en semillas de *Impatiens balsamina* y que constituyen los AMPs más pequeños encontrados hasta la fecha en plantas con tan solo 20 aminoácidos (Nawrot et al 2014).

Finalmente, mencionar en este apartado los AMPs ricos en cisteína procedentes de ciertos hongos que se han denominado **AFP** (del inglés *antifungal protein*) (Kovacs et al 2011, Lee et al 1999, Martinez-Ruiz et al 1997, Vila et al 2001). Estos péptidos AFP presentan actividad frente a una gran variedad de hongos filamentosos, aunque no tienen efecto sobre el crecimiento de células de mamífero, levaduras y eubacterias. Además, son muy estables frente a la desnaturalización térmica y la proteólisis. La proteína AFP secretada por el hongo *Aspergillus giganteus* ha sido resulta estructuralmente (Campos-Olivas et al 1995). Es una proteína pequeña, de 51 aminoácidos y rica en residuos lisina y tirosina, 6 y 12 respectivamente, lo cual le confiere un carácter básico. Su estructura es muy compacta, con 8 cisteínas formando 4 puentes disulfuro. Se conocen proteínas homólogas a AFP en otros hongos, siendo la más semejante la proteína PAF (*P. chrysogenum antifungal protein*) del hongo *Penicillium Chrysogenum* (Kaiserer et al 2003, Marx et al 1995).

Péptidos con modificaciones post-traduccionales

El tercer tipo de péptidos de esta clasificación son los péptidos que sufren modificaciones una vez el péptido ya ha sido sintetizado. Existen varios tipos de modificaciones, desde glicosilaciones o halogenaciones hasta inclusión de D-aminoácidos u otros aminoácidos no proteogénicos (Zaslhoff 2002). Una ventaja de este tipo de compuestos es que las enzimas biológicas están frecuentemente adaptadas para funcionar con aminoácidos proteogénicos, así que este tipo de péptidos suele ser más difícil de degradar por otras bacterias.

El caso más conocido son las **bacteriocinas**, péptidos producidos por bacterias gram-positivas que tienen actividad frente a otros procariontes (Gabrielsen et al 2014, Lohans and Vederas 2014, Snyder and Worobo 2014). Dentro de las bacteriocinas, la clase I está constituida por los lantibióticos, AMPs de menos de 4 kDa a las que se les introduce postraduccionalmente el aminoácido no proteogénico Lantionina. El más famoso de los lantibióticos es la nisina que debido a su actividad antimicrobiana es usado como conservante en la industria alimentaria (Arthur et al 2014, Hansen and Sandine 1994). Otros AMPs no ribosómicos son los **lipodepsipéptidos cíclicos** que contienen enlaces éster además de los enlaces amida, como por ejemplo las syringomicinas producidas por *Pseudomonas syringae* (Bender et al 1999)

4.1.2 Péptidos antimicrobianos sintéticos

En muchos casos, se ha estudiado el modo de acción de péptidos naturales a través de péptidos sintéticos, así como las características estructurales y relevancia de determinados aminoácidos en la función antimicrobiana y su especificidad. Por ejemplo, se han empleado péptidos sintéticos para establecer la secuencia primaria de las cecropinas y determinar los pasos involucrados en su biosíntesis (Merrifield et al 1994). Mediante el estudio con péptidos sintéticos análogos a las cecropinas de insectos y la cecropina P1 de mamífero se ha estudiado la diferente especificidad frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas (Gazit et al 1995). A partir de estudios estructurales de interacción de un hexapéptido derivado de la lactoferrina B (**LfcinB₄₋₉**) (Tabla 2) unido a micelas de SDS se determinó un papel importante para los dos residuos de triptófano localizados más profundamente en la micela que los residuos de arginina y glutamina (Schibli et al 1999).

Modificación de péptidos naturales

La síntesis química de péptidos nos permite obtener nuevas secuencias peptídicas a partir de la modificación de péptidos naturales con el fin de mejorar sus propiedades antimicrobianas (e.g. mayor potencia, ampliar o reducir el espectro de acción,...) y/o evitar algunas de las propiedades no deseables (e.g. toxicidad a células no diana, susceptibilidad a la degradación, presencia de epítopos que disparen reacciones inmunes, baja solubilidad...) (Ng-Choi et al 2014). Un ejemplo muy característico es la síntesis de péptidos híbridos a partir de la secuencia de péptidos naturales para incrementar su actividad antimicrobiana, como por ejemplo los **péptidos híbridos** cecropina-melitina (Andreu et al 1992, Ferre et al 2006) o fusiones de cecropina, magainina II y LL-37 (Fox et al 2012) (Tabla 2). También se puede incrementar su actividad introduciendo en el extremo N-terminal motivos de unión a metales pesados, lo cual incrementa su actividad antimicrobiana (Libardo et al 2014). Una manera de incrementar el efecto del péptido es

disminuir su degradación. El péptido **MB39** (Tabla 2) es un derivado de la Cecropina B (Tabla 1) más resistente a la degradación por proteasas, así que su efecto es más prolongado (Owens and Heutte 1997). Se puede conseguir también esta resistencia a la degradación utilizando D-aminoácidos ya que las proteasas celulares han evolucionado hacia el reconocimiento de las formas L. Esto es lo que se hizo por ejemplo con la lactoferrina B (Wakabayashi et al 1999) o el péptido M33 (Falciani et al 2012). Otra de las razones comunes de modificación de péptidos naturales es la reducción de cualidades indeseables. Frecuentemente se pretende que el péptido no sea tóxico para animales superiores ni humanos. Por ejemplo el péptido **GI24** (Tabla 2) derivado de la catelicidina PAMP-36 (Lv et al 2014) o los péptidos **piceain 1 y 2** derivados a partir de la proteína EF087003.1 de *Picea sitchensis* (Liu et al 2011a) (Tabla 2). En base a que un componente importante en el modo de acción de muchos AMPs es la interacción electrostática entre el péptido y el microorganismo (como veremos más adelante), otra de las características no deseables de los AMPs es su inactivación en medios de alta fuerza iónica. Para ello se sabe que es especialmente interesante aumentar la hidrofobicidad del péptido mediante la introducción de aminoácidos apolares. Se ha descrito que este efecto se puede conseguir sustituyendo las His y Trp del péptido por los aminoácidos no proteogénicos β -naftilalanina y β -bifenilalanina (Yu et al 2011). Esta estrategia fue puesta en práctica para el diseño del péptido **D-Nal-Pac-525** (Tabla 2), que es un derivado de un fragmento de la histatina 5 (Tabla 1), con capacidad de acción en altas concentraciones de sal (Wang et al 2009a). Otra estrategia consiste en el diseño de secuencias cíclicas, por ejemplo defensinas cíclicas (Yu et al 2000). También se puede favorecer la actividad del péptido en concentraciones de sales no fisiológicas mediante la adición de puentes disulfuro dentro de la molécula, como por ejemplo se ha hecho con las protegrinas (Harwig et al 1996). Se puede modificar la secuencia de un péptido natural para evitar que el péptido actúe de forma lítica sobre la membrana del organismo y efectúe una función en una diana intracelular. En este caso Arias y colaboradores modificaron la secuencia de la Tritrpticina, cambiando los 3 Trp centrales por 5-hidroxitriptófano. Así consiguieron que el péptido perdiese su modo de acción lítica pero sin disminuir su MIC. Esto hace pensar que el péptido está internalizándose y afectando a una diana intracelular (Arias et al 2015). Este es uno de los objetivos de este trabajo, identificar péptidos capaces de bloquear un proceso específico del proceso infeccioso del patógeno pero sin afectar a la viabilidad del mismo.

Péptidos sintéticos *de novo*

Otra fuente importante de péptidos sintéticos es la síntesis *de novo* de péptidos con posible actividad antimicrobiana y que no existen en la naturaleza. Una estrategia para la síntesis *de novo* es el **diseño racional**, es decir la utilización de los conocimientos previos en cuanto a la secuencia

de los péptidos naturales y sus características estructurales con la idea de diseñar secuencias peptídicas que presenten las características que buscamos (Marcos et al 2008, Zeitler et al 2013). Se han sintetizado una serie de péptidos teniendo en cuenta la distribución de carga e hidrofobicidad de los péptidos naturales, como por ejemplo **ESF1** (Tabla 2) que mimetiza la distribución de cargas y estructura en hélice- α anfipática encontrada en las magaininas (Powell et al 1995). En ocasiones una alternativa es la modificación de aminoácidos concretos para hacer desaparecer secuencias reconocibles por proteasas, aumentando así el efecto la vida media del péptido y por tanto su efecto (Ong et al 2014). Por ejemplo Kim y colaboradores diseñaron los péptidos **GNU6** y **GNU7** (Tabla 2) que pueden mantenerse estables durante al menos 12 horas en presencia de las proteasas tripsina, quimotripsina y aureolisina (Kim et al 2014a). En algunos casos se diseñan péptidos cuyo efecto es sinérgico al ser aplicados junto a otro compuesto como un antibiótico u otro péptido. Por ejemplo los péptidos **δ -Fm**, **δ -Fmscr** y **Ud** que tienen baja actividad antibacteriana pero al ser combinados con rifampicina o kanamicina aumentan 34 veces su actividad (Anantharaman et al 2010).

Tabla 2 Secuencias de algunos péptidos antimicrobianos sintéticos de interés

MB39	HQPKWKVFKKIEKVGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKALG
Cecropina-melitina	KWKLLKKIGAVLKLV
CM11	KWKLFFKKILKVL
Pep3	WKLFFKKILKVL
CA(1-8)M(1-18)	KWKLFFKIGIGAVLKVLTTGLPALIS
CecropinaA-magainina2	KWKLFFKIGIGKFLHSAKKE
MsrA1	MALEHMKWKLFFKIGIGAVLKVLTTGLPALKLTK
CAMEL 0 (cecropina- maigainina)	KWKLFFKIGAVLKVL
GI24	GRFRRLRKKTRKRLKKIGKVLKWI
ESF1	MASRAAGLAARLARLALRAL
D4E1	FKLRAKIKVRLRAKIKL
ESF39A	GTGATGGTGATGGTGATG
Piceain 1	KSLRPRCWIKIKFRCKSLKF
Piceain 2	RPRCWIKIKFRCKSLKF
Lfcin B ₄₋₉	RRWQWR
PAF26	RKKWFW
PAF42 (D-aminoácidos)	WRKKWFW
PAF102	GHRKKWFWAGPARRKKWFWAGPAWRKKWFW
BP100	KKLFFKKILKYL
PAC-522	KWRRWVRWI
GNU6	RIIRPIIQIIKQKIR
GNU7	RLLRPLLQLLKQKLR

La segunda estrategia consiste en el uso de la química combinatoria. La principal característica de las **bibliotecas combinatoriales de péptidos** (SCL, del inglés *synthetic combinatorial library*) es la

posibilidad de evaluar de una manera rápida gran cantidad de péptidos con gran diversidad química, pudiendo introducir aminoácidos naturales L, sus estereoisómeros D, e incluso otros aminoácidos no naturales (Blondelle and Houghten 1996, Houghten et al 1991). Se define una SCL como una colección ordenada de péptidos o mezcla de péptidos y que representa la diversidad de secuencias de péptidos de un tamaño o propiedad concreta. Las SCLs pueden dividirse en bibliotecas genéricas o parciales. Ese orden intrínseco de la biblioteca permite identificar la función biológica individual de una secuencia en concreto. En las bibliotecas genéricas se suele determinar la longitud del péptido y los aminoácidos utilizados de forma que engloban una gran diversidad química con el fin de aumentar la probabilidad de identificar compuestos con la propiedad de interés. Las SCLs parciales se originan alrededor de un compuesto (del inglés *lead compound*) previamente identificado y cuya finalidad es la optimización de ese compuesto líder. Para la identificación de las secuencias activas presentes dentro de las posibles combinaciones que ofrece la SCL existen 2 estrategias independientes o también denominados procesos de deconvolución: el proceso iterativo y el rastreo posicional. El proceso iterativo consiste en identificar sucesivamente los aminoácidos más apropiados para cada posición mediante ciclos de ensayo, selección y síntesis. Las primeras SCLs diseñadas para este tipo de estrategia constaban de 6 posiciones y en cada una de ellas se utilizaban los 20 aminoácidos proteogénicos (Houghten et al 1991, Houghten et al 1992). La segunda estrategia de deconvolución es el rastreo posicional en el cual las secuencias activas se identifican en un único ensayo (Pinilla et al 1992). Una biblioteca en formato de rastreo posicional se divide en tantas sub-bibliotecas como número de aminoácidos contenga la secuencia; cada sub-biblioteca contiene una posición definida y está compuesta por tantas mezclas como aminoácidos diferentes se incluyan, siendo el resto de las posiciones ocupadas por una mezcla equimolar de todos los compuestos utilizados. Esta estrategia tiene como ventaja frente al proceso iterativo la rapidez; por el contrario la principal limitación de una SCL en rastreo posicional es que al aumentar el número de posiciones en el péptido y/o la variabilidad de los aminoácidos utilizados aumenta el número de mezclas a evaluar y/o la complejidad de las mismas. Es necesario llegar a un compromiso entre la longitud del péptido, es decir el número de mezclas a evaluar, y la concentración efectiva de cada uno de los péptidos definidos dentro de la mezcla a evaluar. Si se pretenden evaluar los 20 aminoácidos naturales, normalmente se suelen utilizar SCLs diseñadas para hexapéptidos, lo cual da lugar a 120 mezclas a evaluar. Con el fin de diseñar péptidos de mayor longitud sin aumentar de forma inabarcable el número de mezclas, las estrategias a seguir son reducir el número de aminoácidos a evaluar y/o las posiciones del péptido que se desean optimizar. Un ejemplo de interés es la obtención del péptido BP100 (Tabla 2) a partir de la optimización de dos posiciones del decapeptido sintético BP76 y la modificación del extremo Nt

(Badosa et al 2007). Otro ejemplo es el diseño de una biblioteca utilizando solamente 7 aminoácidos (K, L, V, F, S, Q, y P) frente a *Candida albicans* (Hong et al 1998).

Como hemos comentado, una ventaja de la síntesis de péptidos es aumentar la diversidad química presente en la naturaleza. De igual forma, para el diseño de SCLs podemos utilizar D-aminoácidos u otros aminoácidos no naturales con el fin de aumentar la diversidad química e incrementar su estabilidad ya que son menos susceptibles a la degradación (Blondelle et al 1994, Midura-Nowaczek and Markowska 2014, Ong et al 2014). Existen muchos ejemplos de SCLs que utilizan D-aminoácidos u otros aminoácidos no naturales (López-García et al 2002, Pinilla et al 1998, Poreba et al 2014, Reed et al 1997, Roychoudhury et al 1998). El péptido antimicrobiano **PAF26** (Tabla 2) fue obtenido utilizando una SCL de hexapéptidos en formato de rastreo posicional sintetizada con los esteroisómeros D de los 20 aminoácidos naturales frente al crecimiento del patógeno postcosecha *Penicillium digitatum* (López-García et al 2002). PAF26 presenta potente actividad antifúngica y reducida toxicidad frente a bacterias y células de mamíferos (López-García et al 2002, López-García et al 2007). A partir de la secuencia del péptido PAF26 utilizado como péptido líder se identificaron una amplia colección de hexa- y hepta-péptidos ricos en triptófanos, denominados PAFs (López-García et al 2002, Muñoz et al 2007). Entre ellos destacar el péptido **PAF42D** (Tabla 2) que corresponde a la secuencia de PAF26 con un triptófano adicional en su extremo Nt. Mencionar que en este trabajo hemos identificado un péptido derivado de PAF26, el heptapéptido sintético **PAF104**, que corresponde a la secuencia de PAF42D pero sintetizado con L-aminoácidos. Como veremos en el capítulo 1, PAF104 inhibe de forma específica la formación de apresorio en el hongo *M. oryzae*, el objetivo fundamental de esta investigación.

A pesar de su elevado coste, diferentes investigaciones han reportado su utilización tanto en el campo de la medicina como en la agricultura y la industria alimentaria. Por ejemplo, se han utilizado para la identificación de antagonistas de receptores, inhibidores de enzimas, estudios de interacción proteínas-ligandos, identificación de inhibidores del crecimiento de microorganismos, etc (Fleeman et al 2015, Hensler et al 2006, Khan and Vulfson 2003, Lindell and Scherkenbeck 2005, López-García et al 2002, Vilar et al 1998). En la mayoría de los casos aplicados a la agricultura, el ensayo de SCL se han llevado a cabo con el fin de obtener péptidos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, existen pocos ejemplos en la literatura de ensayos dirigidos a bloquear una función específica del patógeno (Bishop-Hurley et al 2002, Rudolph et al 2003). En parte de este trabajo hemos utilizado una SCL genérica de hexapéptidos en formato de rastreo posicional con el fin de seleccionar péptidos capaces de

bloquear un proceso específico relacionado con la infección del microorganismo, como es la formación del apresorio.

4.2. Aplicación de péptidos antimicrobianos en protección vegetal

Como hemos comentados, los AMPs son una alternativa prometedora a los plaguicidas y antibióticos convencionales debido a sus ventajosas propiedades: son antibióticos naturales, tienen un efecto rápido inhibiendo el crecimiento de un amplio espectro de patógenos, muestran baja toxicidad frente al organismo huésped y reducida probabilidad en la aparición de resistencias. Además algunos AMPs, como los que presentan estructuras globulares con puentes disulfuro, son estables a la degradación por proteasas, al calor y a pH extremos. Existen muchos ejemplos en la literatura sobre la aplicación de AMPs en protección vegetal. Normalmente este tipo de aplicaciones se basan en la expresión trasgénica del gen que codifica para un AMP. La sobreexpresión de genes endógenos de la propia planta no ha demostrado incrementar los niveles de resistencia de forma importante, sobre todo frente a los patógenos más agresivos, como muestran experimentos llevados a cabo en *A. thaliana* (De Coninck et al 2010, Epple et al 1997). Sin embargo, la expresión de genes exógenos ya sean de otras plantas o de otro tipo de organismos ha dado mejores resultados de protección (López-García et al 2012). Uno de los primeros ejemplos de la potencial utilidad de los péptidos líticos en agricultura fueron las cecropinas. Se han llevado a cabo diferentes estrategias para la expresión de genes que codifican para cecropinas en diferentes plantas como patata, tabaco y arroz aunque los resultados en cuanto a la resistencia a la infección han sido muy diversos (Hightower et al 1994, Jan et al 2010, Oard and Enright 2006, Okamoto et al 1998, Sharma et al 2000). Respecto al patosistema que nos ocupa este trabajo *M. oryzae* – arroz, se ha demostrado que la acumulación de la Cecropina A en arroz confiere resistencia al ataque por *M. oryzae* (Coca et al 2006). Uno de los primeros ejemplos de protección en condiciones de campo fue reportado en plantas de patata que expresaban el gen que codifica para la proteína antifúngica de alfalfa (alfAFP). Estas plantas mostraban un nivel de resistencia a *Verticillium dahliae* similares a los obtenidos tras el tratamiento químico habitual (Gao et al 2000).

Alternativamente a la utilización de péptidos naturales, se han transformado plantas con genes que codifican AMPs sintéticos. Plantas de patata que expresan el gen *MsrA1* que codifica para la quimera cecropina-melitina (tabla 2) fueron resistentes a diferentes patógenos bacterianos y

fúngicos (Osusky et al 2000). Otros ejemplos significativos son la expresión de los péptidos derivados de Cecropina B SB-37 y Shiva-1 con toxicidad reducida sobre los protoplastos de la planta (Jaynes et al 1993), la expresión del gen *MsrA3* que codifica un análogo de temporina A en patata (Osusky et al 2004), y la producción de péptidos sintéticos *de novo* como D4E1 y ESF39A (Tabla 2) (Cary et al 2000, Newhouse et al 2007, Rajasekaran et al 2005).

Sin embargo el proceso de utilización de estas estrategias conlleva el problema de la legislación europea en contra del cultivo de transgénicos (Montesinos et al 2012), con lo que se deben buscar aplicaciones alternativas. Una de ellas es la aplicación directa de estos péptidos sobre el cultivo de igual forma como se hace actualmente con los fungicidas y plaguicidas convencionales. Una de las limitaciones es el elevado coste que conlleva la obtención de AMPs mediante síntesis química. Gracias a los avances en los procedimientos biotecnológicos, diferentes investigaciones abordan su producción mediante el uso de plantas o bacterias como biofactorías. En este sentido el uso de plantas suele tener ventajas añadidas como la adición de modificaciones postraduccionales o la sensibilidad de los microorganismos frente al AMP (Faye and Gomord 2010, Twyman et al 2003). En los últimos años, se han publicado estudios relacionados con el uso de plantas como biofactorías para producir AMP a gran escala de forma más rentable (Company et al 2014, Holásková et al 2015). Un ejemplo es la producción de cecropina A en semillas de arroz (Bundo et al 2014). En este caso se utilizó el promotor B1 y B4 de la glutelina así como la secuencia de terminación KDEL para conseguir que la cecropina A viaje a través del retículo endoplasmático y se acumule en los cuerpos proteicos de la semilla.

4.3 Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos

Hasta hace unos años se pensaba que la actividad antimicrobiana de los AMPs estaba directamente relacionada con la permeabilización celular de sus microorganismos diana. El carácter catiónico y anfipático de la mayoría de AMPs favorece la interacción e inserción de estos péptidos en las bicapas lipídicas pudiendo alterar las funciones biológicas de las membranas y en último término conducir a la lisis celular. Sin embargo, estudios realizados en los últimos años indican claramente que el mecanismo de acción de los AMPs no es solo consecuencia de la permeabilización celular. Algunos AMPs son capaces de penetrar en la célula independientemente de la permeabilización, donde pueden afectar a muy diversas dianas del patógeno (Marcos et al 2012, Marcos and Gandia 2009, Wang et al 2015). Estos mecanismos de acción no líticos se han reportado en gran cantidad de AMPs tanto naturales como sintéticos y en algunos casos están unidos a una baja toxicidad frente al organismo no diana, una propiedad

deseable y beneficiosa para los compuestos antimicrobianos de nueva generación. Estos mecanismos no son excluyentes entre sí; de hecho se ha determinado que para algunos AMPs se pueden dar ambos modos de acción en función de la concentración del péptido (Brogden 2005).

A continuación desarrollaremos ambos mecanismos de acción centrándonos en las dos familias de péptidos utilizadas en este estudio, por un lado las **cecropinas** cuyo mecanismo de acción principal es la lisis celular y en segundo lugar los péptidos sintéticos de la familia **PAF** para los cuales se ha demostrado su capacidad de internalización en la célula sin causar la permeabilización de la misma.

4.3.1 Permeabilización de la membrana celular

El mecanismo de acción basado en la lisis celular fue inicialmente atribuido a los AMPs y es el mejor estudiado. Como hemos comentado, la citotoxicidad de algunos AMPs se debe a la interacción y disrupción de las membranas biológicas seguido por la lisis celular. Algunas características comunes en los AMPs, como pueden ser la anfipaticidad y la carga positiva, están muy conservadas entre distintos grupos taxonómicos precisamente porque favorecen esta unión y permeabilización de la membrana. Es una forma de acción muy inespecífica, y es la razón por la cual tantos AMPs tienen un espectro de acción tan amplio.

Uno de los péptidos que usan este tipo de acción lítica es la **Cecropina A**. Según el modelo del modo de acción de la Cecropina A, el péptido presenta 4 estados diferenciales (Gregory et al 2008). En solución acuosa, la cecropina se encuentra en forma desestructurada (Figura 7A). En contacto con la membrana la Cecropina A aprovecha el ambiente anfipático para adquirir su estructura secundaria en hélice- α (Figura 7B). El tercer estado sería en forma de barril generando poros en la membrana (Figura 7C). Estructuralmente el poro se produce cuando 6 hélices se orientan dejando su zona hidrófila hacia el exterior y la hidrófoba hacia el interior de la membrana. La probabilidad de que una molécula se una o separe de la membrana, así como que una molécula ya unida forme poro es proporcional a una constante de reacción que es dependiente de la concentración de péptido (Gregory et al 2008). Además parece que la Cecropina A tiene preferencia al atacar células septadas ya que tiene más facilidad para unirse a superficies curvadas. De hecho cuando se une a células septadas comienza formando poros precisamente en la zona donde se encuentra el septo (Rangarajan et al 2013). El cuarto estado es cuando la cecropina queda unida a la membrana de la vesícula ya lisada (Figura 7D) (Gregory et al 2008).

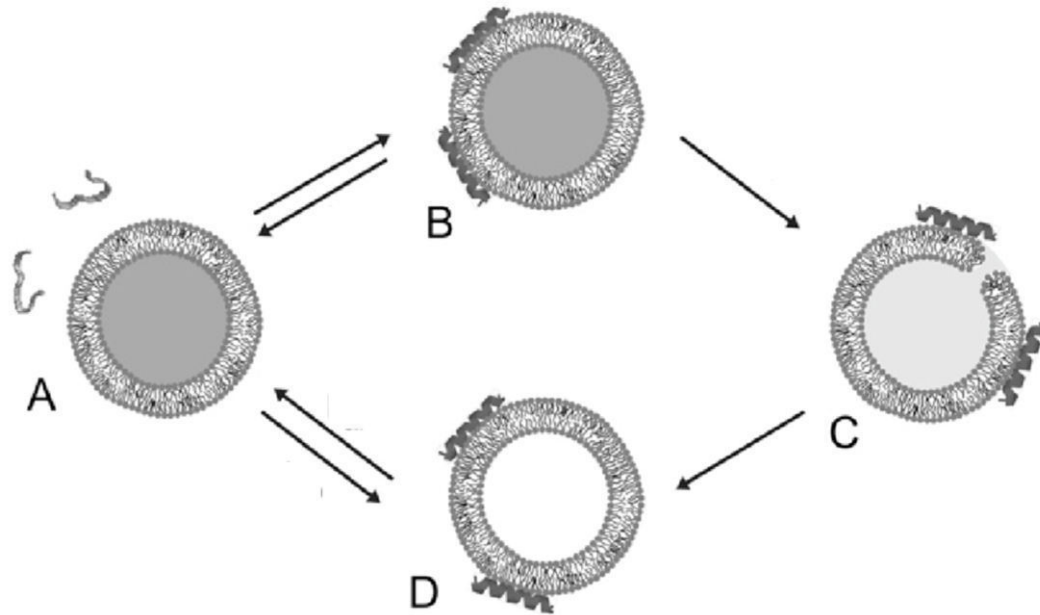


Figura 7 Modelo de interacción de la Cecropina A con la membrana (Modificado de Gregory et al. 2008). A Moléculas en dilución acuosa. B Moléculas unidas a la membrana conformándose en hélice- α . C Formación del poro en la membrana. D Moléculas adheridas a la membrana de la vesícula ya vacía.

4.3.2 Mecanismos no líticos

Mediante el uso de péptidos marcados fluorescentemente y la microscopía confocal, se ha demostrado que algunos AMPs, tanto naturales como sintéticos, son capaces de traslocarse a través de la membrana celular (Lobo et al 2007, Muñoz et al 2006, Park et al 1998, van der Weerden et al 2010). La mayoría de estos AMPs tiene características similares a los péptidos CPP, del inglés cell-penetrating peptide (Marcos et al 2012). Estos CPP son péptidos de pequeño tamaño que entran en las células eucariotas de manera no disruptiva y sin aparente citotoxicidad. Su función es favorecer el tránsito de moléculas a través de la membrana de la célula. Por homología a los CPP, la internalización de los AMPs puede darse por traslocación directa o por endocitosis a endosomas y vacuolas. En la **traslocación directa** el péptido atraviesa la membrana sin gasto de energía mediante su carácter hidrófobo y aprovechando la carga eléctrica de la cara exterior de la membrana. Por el contrario, en el proceso de **endocitosis** el péptido entra en la célula envuelto en una invaginación de la membrana que lo rodea, proceso que conlleva gasto de energía y está altamente regulado. El mecanismo preciso por el cual un AMP se internaliza no está claro. Se sabe que ambos procesos pueden acontecer simultáneamente y el balance entre ambos depende de la concentración del péptido, factores de la célula, y la unión a componentes específicos de la membrana. Además los mecanismos utilizados varían en función del péptido del que se trate (Marcos et al 2012).

Como ejemplo hablaremos del modo de actuación del péptido **PAF26** el cual, como ya comentamos, es un péptido sintético seleccionado por su actividad antifúngica frente a *Penicillium digitatum* (López-García et al 2002). Un estudio completo en su modo de acción mostró que es internalizado por células fúngicas a concentraciones subinhibitorias (1 μM) sin destruir la membrana ni alterar la composición de la pared celular y que esta internalización es necesaria para la muerte celular (Figura 8) (Muñoz et al 2006, Muñoz et al 2012a, Muñoz et al 2012b). Sin embargo a concentraciones más altas (3 μM y 15 μM) el péptido ejerce una acción lítica rompiendo la pared celular, lisando la membrana y causando una desorganización de los septos de la hifa. Además, se ha demostrado que el péptido trimérico PAF102 (Tabla2) formado por 3 unidades de heptapéptidos PAFs unidos entre sí por la secuencia AGPA se internaliza de forma activa dentro de la célula donde ejerce un efecto similar a PAF26 pero a concentraciones más bajas (López-García et al 2015).

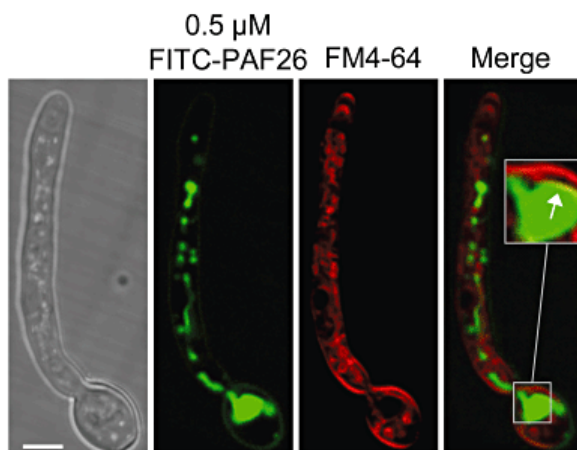


Figura 8 Internalización del péptido FITC-PAF26 (en verde) a concentraciones subinhibitorias en *Neurospora crassa*. En rojo se muestra la tinción con el fluoróforo FM4-64 específico de membranas (Muñoz et al 2012b).

Otros ejemplos de AMPs que se internalizan en la célula sin lisis son la defensina NaD1 (van der Weerden et al 2010), la buforina II derivada de la histona H2A (Park et al 2000) o la defensina 1 de *Pisum stivum* (Lobo et al 2007) que es capaz de migrar hasta el núcleo celular.

Una vez dentro de la célula, el AMP puede atacar alguna función intracelular indispensable para el organismo patógeno. Diferentes estudios han mostrado la interacción de los AMPs con receptores de membrana (Breukink et al 1999, Schneider et al 2010), con chaperonas celulares (Kragol et al 2001, Sun et al 2008), y con ácidos nucleicos favorecido por la naturaleza catiónica de la mayoría de AMPs. Se conocen ejemplos de AMPs que inducen la apoptosis celular programada en la célula diana (Leiter et al 2005, Morton et al 2007). Algunos son la melitina de los insectos, o la lactoferrina de los humanos. En estos casos se ha visto que la mutación de genes que promueven la apoptosis aumenta la resistencia al péptido. Otros péptidos como la defensina de plantas

RsAPF2 disparan la producción interna de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Maurya et al 2011). Otra forma que utilizan los AMPs para producir la muerte de la célula es variar la homeostasis interna del ión calcio (Ca^{2+}). El calcio libre en el citosol es utilizado por la célula como mensajero secundario en la señalización celular. Por ejemplo la defensina de plantas MsDef1 bloquea canales de calcio tipo L en los mamíferos (Allen et al 2008) y se ha observado que el PAF de *P. chrysogenum* quebranta la homeostasis de Ca^{2+} en *N. Crassa* (Binder et al 2010). Otros AMPs ejercen una actividad ribonucleasa dentro de la célula diana. Esto hace que el patrón de expresión del proteoma de célula se desorganice lo que lleva a su muerte. Un ejemplo es la RNAsa de cacahuete AhPR-10 que mata células en las hifas de hongos susceptibles (Chadha and Das 2006). En el caso del péptido sintético PAF26, un estudio transcriptómico en *S. cerevisiae* identificó diferentes componentes y rutas intracelulares que modulan la sensibilidad del péptido sugiriendo que PAF26 tiene dianas intracelulares (Carmona et al 2012, López-García et al 2010). Sin embargo el mecanismo concreto por el cual éste y muchos otros AMPs provocan muerte intracelular es aún desconocido y requiere de una caracterización más profunda de cada caso concreto.

Una ventaja de los mecanismos de acción no líticos respecto al mecanismo de acción basado en lisis celular es su especificidad. Los AMPs cuyo mecanismo de acción se basa en la lisis de la membrana celular presentan un rango de acción más amplio que los que actúan sobre dianas internas más concretas. Sin embargo, los mecanismos no líticos de los que hemos hablado ejercen su efecto sobre funciones muy generales de la organización interna de la célula, como por ejemplo señalización por Ca^{2+} , inducción de especies reactivas de oxígeno o interacción con ácidos nucleicos, que además siempre implican la muerte del organismo afectado.

4.4 Péptidos capaces de bloquear un proceso esencial para la infección del patógeno.

Dentro de los modos de acción no líticos, un caso concreto es la interacción con algún componente o el bloqueo de algún proceso esencial para que se produzca la infección del patógeno pero que no conlleve la muerte del microorganismo (Thines et al 2004). Se pueden diseñar péptidos altamente específico que afecten un proceso o molécula que solo se encuentre en un organismo concreto, asegurándose así que no interfiere con otros organismos. Esto hace que el péptido pueda ser aplicado para frenar una enfermedad sin riesgo de dañar la salud humana, animal o cultivo que se pretende proteger. Además, hace que sea más sostenible en

términos ecológicos, pues no genera un impacto agresivo sobre el ecosistema del patógeno y el huésped. Otra ventaja es el hecho de que estos tratamientos tan específicos suelen requerir menos concentración del péptido, con lo cual también son más rentables económicamente. Por tanto, la identificación de péptidos dirigidos se ha propuesto como una estrategia de protección vegetal sostenible y respetuosa con la salud pública y el medio ambiente. Un ejemplo de esta idea es el diseño de la proteína AZP (*artificial zinc-finger protein*) que es capaz de bloquear de forma específica el virus del rizado amarillo de tomate (Mori et al 2013, Takenaka et al 2007). Esta proteína se une de forma específica y con gran afinidad a una región de 19 pb del virus entre las que se encuentra su punto de replicación. Así el virus afectado por este péptido es incapaz de replicarse y continuar con su proceso infeccioso. Otro ejemplo sería el de diseño de péptidos que se unen específicamente a la superficie de la zoospora del oomiceto *Phytophthora capsici*, causante de la enfermedad llamada tristeza o seca del pimiento (Bishop-Hurley et al 2002). Al unirse a la superficie de la espora está no puede recibir señales del entorno para guiarse de forma efectiva, impidiendo que se complete el ciclo vital de *P. capsici*.

En el caso concreto del bloqueo de la formación de apresorio se han identificado varios compuestos capaces de realizar esta función. Por ejemplo el factor α , una feromona de apareamiento de *S. cerevisiae* es capaz de inhibir la formación de apresorio en la cepa MATI-2, mientras que la cepa MATI-1 no se ve afectada (Beckerman et al 1997). Sin embargo, este factor ejerce su efecto inhibitorio a una concentración de 300 μ M, unas 10000 veces más que la concentración a la que ejerce su efecto fisiológico en *S. cerevisiae*. Beckerman y colaboradores observaron que el factor α actuaba en las etapas iniciales de la ruta de formación del AMPc, seguramente a la altura de un receptor (Beckerman et al 1997). Se ha descrito también que las moléculas hidrófobas de pequeño tamaño tienen características que afectan a la formación de apresorio, actuando a nivel de reconocimiento de superficies hidrófobas. Por ejemplo, las glisopreninas purificadas de un cultivo de *Clonostachys rosea* inhiben la formación de apresorio en *M. oryzae*, siendo la glisoprenina C la más activa (Sterner et al 1998, Thines et al 1997). A pesar de inhibir la formación del apresorio, estas glisopreninas no mostraron capacidad de control de la piriculariosis en la planta del arroz. Otros compuestos lipófilos que actúa inhibiendo la formación de apresorio de forma específica afectando al reconocimiento de la superficie hidrófoba son los neobulgarones, derivados de antraquinonas diméricas aisladas de *Neobulgaria pura* (Eilbert et al 2000a). Se ha demostrado que la adición de los inductores AMPc o 1,16-hexadecanodiol en una superficie hidrófila anula el efecto inhibitorio en la formación de apresorio de los neobulgarones y las glisopreninas. A parte de estos compuestos lipófilos, muchos ácidos grasos micelares extraídos de hongos superiores han demostrado su capacidad para interferir con

la formación de apresorio, los ácidos grasos monoinsaturados de 16,18 o 20 carbonos parecen ser especialmente activos (Eilbert et al 1999). También se han encontrado inhibidores de la formación de apresorio de forma específica a nivel de la inhibición de la formación de AMPc extraídos del basidiomiceto *Resupinatus leightonii* (Eilbert et al 2000b). Se ha observado que algunos antibióticos podrían tener un efecto específico en la formación del apresorio. La Roxitromicina afecta a la formación de apresorio actuando sobre el gen de división celular 27 de *M. oryzae* MoCDC27 (Ishii et al 2013). Respecto a secuencias peptídicas, Correa y colaboradores demostraron que el tratamiento del hongo *Uromyces appendiculatus* con péptidos RGD (péptidos que contienen el motivo Arg-Gly-Asp) podría resultar en la inhibición de la formación del apresorio (Correa et al 1996). Además, se ha identificado un hendecapéptido producido por *Glomerella cingulata* capaz de inhibir la formación del apresorio del mismo hongo (Al-Samarrai et al 2002). Sin embargo hasta donde nosotros sabemos no existe en la literatura previa a nuestros trabajos, un péptido enfocado a la inhibición específica de la formación de apresorio en *M. oryzae*.

Objetivos

Partiendo de la idea descrita en el apartado 4.4, en este trabajo nos hemos centrado en la identificación de péptidos capaces de bloquear un proceso específico relacionado con la infección del hongo *M. oryzae* en arroz, en concreto la formación del apresorio. Como hemos comentado, el apresorio es una estructura especializada requerida para la internalización del hongo en la planta y así producir la infección de la misma. Además, hemos introducido como una característica del cribado, la ausencia de inhibición del crecimiento de microorganismos como un paso previo a la caracterización de péptidos dirigidos con toxicidad reducida o nula.

En una primera parte del estudio hemos trabajado con la familia de **péptidos sintéticos PAFs**, de los cuales hemos hablado antes, así como de la utilización de una biblioteca combinatoria de hexapéptidos, con el fin de identificar péptidos con las propiedades deseadas (capítulo 1 y 2). En segundo lugar, se ha caracterizado la actividad inhibitoria del apresorio del **péptido natural Cecropina A**, así como la identificación mediante diseño racional de nuevos péptidos derivados de cecropina A que mantengan la actividad inhibitoria del apresorio pero no afecten al crecimiento del microorganismo (capítulo 3). La idea es que estos péptidos evitarán el desarrollo de la piriculariosis en arroz bloqueando específicamente la formación del apresorio sin afectar al ecosistema.

Capítulo 1

**PAF104, un péptido sintético capaz de controlar
la piricularisis en arroz bloqueando la formación
del apresorio en *Magnaporthe oryzae***

Resumen

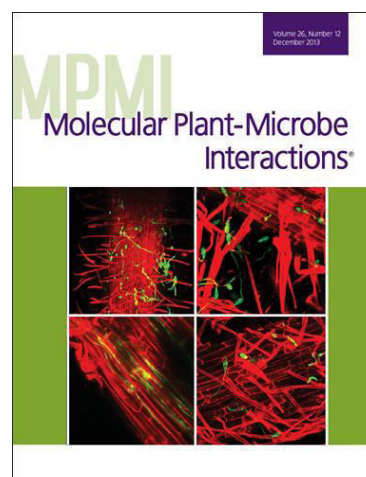
Magnaporthe oryzae es el patógeno más devastador del cultivo del arroz y la principal causa de pérdidas en la cosecha en todo el mundo. Existe por tanto una clara necesidad del control adecuado de la piriculariosis del arroz causada por este hongo. En este trabajo, el péptido sintético PAF104 ha sido caracterizado por su actividad como inhibidor de la formación del apresorio en superficies hidrofóbicas. El crecimiento y la capacidad de conidiación no parecen verse afectadas por PAF104, indicando una ausencia de toxicidad frente al conidio. La adición del monómero de cutina 1,16-hexadecanodiol no interfiere con el efecto inhibitorio de PAF104 en superficies hidrofóbicas en condiciones *in vitro*. Por otro lado, la inhibición de la formación del apresorio por efecto de PAF104 es anulada por la adición de AMPc exógeno. Nuestros resultados indican que PAF104 afecta a la ruta de la MAP kinasa Pmk1 reprimiendo la expresión de los genes *MoMSB2*, que codifica un receptor de membrana, y *MST11*, que codifica para la MAPKKK de la ruta de Pmk1. La patogenicidad de *M. oryzae* se redujo tras el tratamiento con PAF104 que bloquea de forma específica la formación de apresorio, un proceso esencial para la infección de las hojas. PAF104 se postula como un compuesto de referencia para el desarrollo de nuevos fungicidas específicos con características mejoradas.

Trabajo publicado:

Rebollar A. and López-García B. (2013)

PAF104, a synthetic peptide to control rice blast disease by blocking appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*.

Molecular Plant-Microbe Interactions **26**: 1407-1416.



Una de las figuras de este trabajo ha dado lugar a la portada del volumen 26 de MPMI

PAF104, a Synthetic Peptide to Control Rice Blast Disease by Blocking Appressorium Formation in *Magnaporthe oryzae*

Aarón Rebollar and Belén López-García

Department of Molecular Genetic, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, CRAG Building, Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) 08193 Barcelona, Spain

Submitted 20 April 2013. Accepted 22 May 2013.

***Magnaporthe oryzae* is the most devastating pathogen of rice and the main cause of crop losses worldwide. The successful management of blast disease caused by this fungus is a clear necessity. The synthetic peptide PAF104 has been characterized by its inhibition of *M. oryzae* appressorium formation on hydrophobic surfaces. Growth and the ability of conidia to germinate was not affected by PAF104, indicating the lack of toxicity on fungal conidia. The addition of the cutin monomer 1,16-hexadecanediol does not interfere with the inhibitory effect of PAF104 on in vitro hydrophobic surfaces. On the other hand, inhibition of appressorium formation by PAF104 was nullified by the exogenous addition of cAMP. Our results suggest that PAF104 affects the Pmk1 pathway by repression of the gene expression of *MoMSB2*, which encodes a sensing surface protein, and the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase *MST11*. The pathogenicity of *M. oryzae* was reduced after PAF104 treatment specifically blocking appressorium formation. Our results support PAF104 as a promising compound to control rice blast disease by blocking a specific target related to appressorium formation, a process essential for infection of rice leaves. Moreover, PAF104 is proposed as a lead compound to develop novel specific fungicides with improved properties.**

Rice (*Oryza sativa*) is the staple food for a large part of the world's population. The blast disease caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* (anamorph *Pyricularia grisea*) is one of the most devastating diseases of cultivated rice (Dean et al. 2012; Wilson and Talbot 2009). Managing rice blast requires the integration of many strategies, such as cultural strategies for prevention, use of resistant varieties, biological control, and chemical fungicides (Brent and Hollomon 2007; Wang and Valent 2009). However, the control of rice blast disease by the development of resistant varieties harboring a resistance (*R*) gene is not completely successful due, in part, to the high degree of pathogenic variability of *M. oryzae* and the large number of fungal races encountered in the field population (Ebbole 2007). Currently, chemical treatment with fungicides is the most

commonly used method to control rice blast disease, including probenazole, which acts via activation of natural defense mechanisms in susceptible rice plants. However, *M. oryzae* isolates that overcome chemical fungicides have been characterized, e.g., the development of a population resistant to carpropamid, which is a dehydratase inhibitor in melanin biosynthesis (MBI-D), or to strobilurin-related Qo inhibitors, which inhibit respiration (Avila-Adame and Koller 2003; Takagaki et al. 2004). In addition to the loss of effectiveness, negative long-term repercussions on human health and the environment have resulted in restrictions on the use of some important fungicides (Brent and Hollomon 2007). The legislation on the use of fungicides is becoming more restricted; many chemical fungicides are being reviewed for safety and efficacy and it's possible some of them may be deregistered as dangerous to humans or the environment (U.S. Environmental Protection Agency, The Center for Health and Wellness, European Food Safety Authority websites). This scenario has propelled the search for, one or both, alternative disease management strategies or safer antifungal agents that could substitute or decrease the quantity of fungicides currently in use (Brent and Hollomon 2007; Knight et al. 1997; Ragsdale 2000). One important requirement for new fungicides is the selectivity of their mode of action, being more pathogen-specific and with lower unspecific toxicity. Specific compounds could be identified by screening for molecules that specifically block infection-related processes more than they inhibit vegetative hyphal growth.

M. oryzae infect all foliar tissues. Moreover, *M. oryzae* infection of the panicle can lead to complete loss of grain. This fungus is a very effective hemibiotrophic pathogen that passes through a set of well-defined developmental steps during leaf infection, including the formation of a specialized structure called the appressorium, which is required to penetrate the host surface (Ebbole 2007; Khang et al. 2010; Wang and Valent 2009; Wilson and Talbot 2009). Although *M. oryzae* has traditionally been considered a foliar pathogen, more recently, it has been shown that this fungus colonizes rice roots (Campos-Soriano and San Segundo 2009; Sesma and Osbourn 2004). The different stages involved in the pre-penetration phase of *M. oryzae*, i.e., adhesion, conidia germination and appressorium formation, and maturation have been extensively studied (Campos-Soriano and San Segundo 2009; Liu et al. 2011; Tucker et al. 2010; Wilson and Talbot 2009). Inhibitors of these specific developmental stages could be of great interest as substitutes for fungicides currently in use, and they could also contribute to general knowledge about the plant infection process of *M. oryzae*. In particular, the identification of compounds effective for inhibition of signaling pathways involved in *M.*

Corresponding author: Belén López-García;
E-mail: belen.lopez@cragenomica.es

*The e-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates that two supplementary figures and one supplementary table are published online and that Figures 5, 6, and 7 appear in color online.

oryzae appressorium formation is of special interest. In this regard, the current fungicides tricyclazole (MBI-R) and carpropamid (MBI-D) act to block host penetration by inhibiting melanization of the appressorium (Fungicide Resistance Action Committee website, FRAC Code List 2013).

Appressorium development is a complex morphogenetic process regulated by multiple external signals, such as surface hydrophobicity, hardness, cutin monomers, and leaf waxes, and different transduction pathways, including mitogen-activated protein (MAP) kinases Pmk1 and Mps1 and cAMP-dependent signaling pathways (Hamel et al. 2012; Jin et al. 2013; Lengeler et al. 2000; Wilson and Talbot 2009). While cAMP signaling controls surface recognition and the initiation of appressorium formation, late stages of appressorium formation, penetration, and infectious growth are regulated by the Pmk1 and Mps1 MAP kinase pathways (Wilson and Talbot 2009). In addition to these important pathways, several proteins have been characterized in *M. oryzae* as critical sensors to recognize different external signals, including the hydrophobin Mpg1, the G protein-coupled receptor Pth11, and the recently identified proteins MoMsb2 (a surface mucin protein) and MoSho1 (a membrane sensor) (DeZwaan et al. 1993; Liu et al. 2011; Talbot et al. 1993).

Antimicrobial peptides (AMP) have emerged as promising compounds with important biotechnological applications in plant disease protection. Numerous natural and synthetic AMP have been identified based on their direct inhibiting effect on the growth of a broad range of microorganisms (López-García et al. 2012b; Marcos et al. 2008; Zasloff 2002). The fast and efficient action of AMP against microbes, their low risk of resistance emergence, and low toxicity to nontarget cells have made them a promising alternative to common antibiotics and fungicides in the fight against pathogen infection (Hancock and Sahl 2006; López-García et al. 2012b; Marcos et al. 2008; Montesinos et al. 2012).

A collection of small cationic tryptophan-rich AMP, the so-called PAF peptides, have been generated and characterized by their potent antifungal activity against several microorganisms (López-García et al. 2002; Muñoz et al. 2007). Some of these peptides show reduced toxicity against bacteria and they are not cytotoxic to human red blood cells. The lead peptide PAF26 is a synthetic hexapeptide that was previously identified by a combinatorial screening against the filamentous fungus *Penicillium digitatum* (López-García et al. 2002). This peptide is not toxic to human cells (López-García et al. 2007). A complete study on its mode of action showed that the peptide is internalized by fungal cells at subinhibitory concentrations and this cell-penetration is required for cell death (Muñoz et al. 2012). A transcriptome study on *Saccharomyces cerevisiae* has identified cell components and intracellular pathways that modulate its sensitivity, suggesting that PAF26 has intracellular targets (Carmona et al. 2012; López-García et al. 2010). Together with PAF26, a set of D-amino acid-hexapeptides,

including PAF34D, with different profiles of antimicrobial activity was identified (López-García et al. 2002). Moreover, the elongation of the PAF26 sequence allowed us to identify a set of D-amino acid-heptapeptides, in particular, PAF42D, that show remarkably more activity against the phytopathogen *M. oryzae* (Muñoz et al. 2007).

In this work, we have identified a synthetic PAF26-derived peptide called PAF104, which specifically reduces the appressorium formation of *M. oryzae* on a hydrophobic polystyrene surface and on rice leaves. The peptide does not affect the germination and vegetative growth of the fungus, indicating the lack of toxicity on fungal conidia. Moreover, the fungus treated with PAF104 shows reduced pathogenicity on rice, i.e., PAF104 reduces the development of the rice blast disease by blocking the appressorium formation of *M. oryzae*.

RESULTS

PAF104 inhibits appressorium formation in *M. oryzae*.

We initially investigated whether some of the short PAF peptides have a specific effect on appressorium formation in *M. oryzae*. Table 1 shows the amino acid sequences of the PAF peptides tested, in which peptides synthesized with either all L- or all D-amino acids are included. An assay was set up to quantify the appressorium formation after peptide treatment (described below). Using this assay, the heptapeptide sequence WRKKWFW was found to show a remarkable inhibition activity on appressorium formation in both the L- and D-amino acid peptides (Fig. 1A). Considering the advantage of using a peptide synthesized with natural L-amino acids in a future potential application to control rice blast disease, we selected the peptide PAF104 for further study. The inhibitory activity of PAF104 on appressorium formation in germinating *M. oryzae* conidia is illustrated in Figure 1B.

To characterize the appressorium-blocking activity of PAF104 in more detail, we studied the effect of different concentrations of the peptide on the appressorium formation of two *M. oryzae* isolates, PR9 and Guy11. We evaluated the effect of PAF104 at an initial stage of the appressorium formation, i.e., 6 h after conidia germination, when the appressorium is differentiated from the tip of the germ tube. We observed a reduction of appressorium formation that correlated with an increase of peptide concentration for both isolates (Fig. 1C). A low concentration of PAF104 (5 μ M) showed a light effect on appressorium formation after a 6-h incubation. Approximately 50% of conidia of the PR9 isolate developed appressorium at 10 μ M of PAF104, and more than 80% of conidia were unable to develop appressorium in the presence of 30 μ M of PAF104. Evaluation of the inhibitory activity of PAF104 at a later stage when the mature appressorium is observed, i.e., 24 h after inoculation of conidia on a hydrophobic surface, shows similar results. For example, 85 and 25% of developed mature appressoria were observed after 24 h of incubation with 5 and 20 μ M of PAF104, respectively (Fig. 1C).

Several compounds have been described as inducers of appressorium formation on hydrophilic surfaces on which germinating conidia failed to develop appressoria, such as the cutin monomers 1,16-hexadecanediol or a regulator of appressorium morphogenesis cAMP (Wilson and Talbot 2009). In this work, the effect of these inducers on the inhibitory activity of PAF104 was evaluated. *M. oryzae* was placed on a hydrophilic (Fig. 2A) or hydrophobic surface (Fig. 2B), along with PAF104 alone or in the presence of either cAMP or 1,16-hexadecanediol. Appressorium formation was quantified at 6 h postinoculation in different conditions, as previously described. The results shown in Figure 2 correspond to a representative assay with the Guy11 isolate (similar results were obtained with

Table 1. Peptide amino acid sequences analyzed in this study

Peptide	Sequence ^a
PAF26D	AcNH-rkkwfw-CONH ₂
PAF26L	NH ₂ -RKKWFW-COOH
PAF34D	AcNH-rkwlfw-CONH ₂
PAF34L	AcNH-RKWLFW-CONH ₂
PAF42D	AcNH-wrkkwfw-CONH ₂
PAF104 (PAF42L)	NH ₂ -WRKKWFW-COOH

^a Following standard rules, D-stereoisomers of amino acids are noted in lowercase and L-stereoisomers in uppercase. Where indicated, the peptides are acetylated at the N terminus (AcNH-) and amidated at the C terminus (-CONH₂).

the PR9 isolate; data not shown). Our data confirm that appressorium formation was induced by the addition of 2.4 mM cAMP or 10 μ M 1,16-hexadecanediol on hydrophilic surfaces (Fig. 2A). Moreover, the addition of 1,16-hexadecanediol did not affect the appressorium inhibition activity of PAF104, although the formation of appressoria was restored after the addition of cAMP. The same behavior also occurs on hydrophobic surfaces as shown in Figure 2B. Around 30% of *M. oryzae* conidia developed appressoria on a hydrophobic sur-

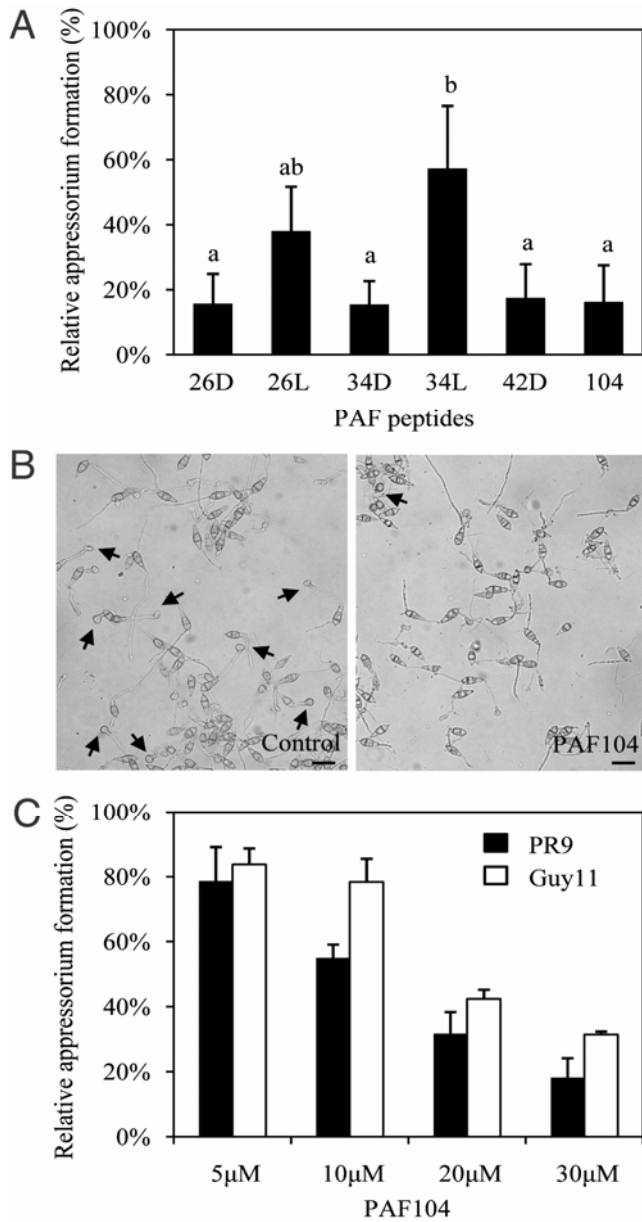


Fig. 1. Effect of PAF peptides on *Magnaporthe oryzae* appressorium formation on a hydrophobic surface. **A**, Relative appressorium formation in *M. oryzae* PR9 treated with PAF peptides. Appressorium formation was visualized after 6 h of incubation with 30 μ M of each peptide at 28°C. Bars labeled with the same letter do not differ at the 95% confidence (Tukey's honestly significant difference procedure). **B**, The effect of 20 μ M of PAF104 on the appressorium formation in *M. oryzae* PR9. Pictures were taken after 6 h of incubation with 30 μ M of each peptide. Arrows indicate some appressoria. Bar = 25 μ m. **C**, Relative appressorium formation in *M. oryzae* PR9 (black bars) and Guy11 (white bars) isolates after 6 h of incubation with different concentrations of PAF104. Results in A and C are shown as mean values \pm standard deviation of the percentage of appressorium observed relative to the appressorium formed in the absence of peptide.

face after treatment with 20 μ M PAF104. This inhibition was not affected by the addition of 10 μ M 1,16-hexadecanediol. However, the inhibitory activity of PAF104 can be overridden by cAMP. The addition of 2.4 mM cAMP restored appressorium formation to almost the same level of the control sample without peptide treatment.

PAF104 changes gene expression of the surface sensor *MSB2* and the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase *MST11* involved in the *Pmk1* pathway.

The results described above suggest that PAF104 may act upstream of the sites of action of cAMP, explaining the fact that its inhibition activity can be bypassed by this signaling molecule. In order to examine the effect of PAF104 on appressorium formation at the molecular level, representative genes involved in sensing surface signals and regulating appressorium formation through different pathways were selected (Supplementary Table S1; Fig. 3). Expression changes of selected genes were determined by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) after peptide treatment (Fig. 4). These data show no important expression changes of genes involved in the activation of the cAMP pathway as *MAC1* or *PTH11*. Interestingly, the expression of the gene *MoMSB2* encoding a surface mucin protein was 4.5 times more repressed than control levels after exposure to 5 μ M of PAF104. At a higher concentration of the peptide (20 μ M), the

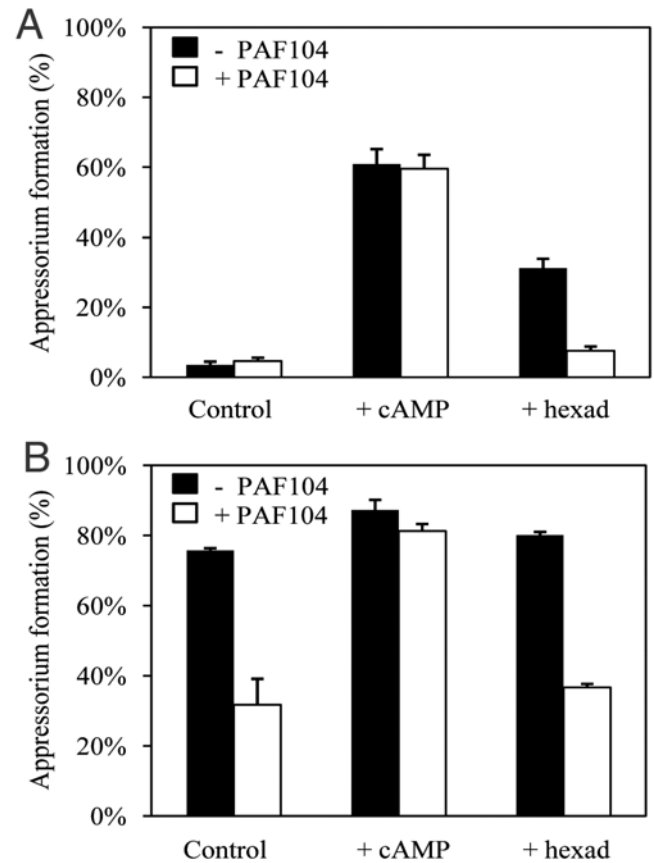


Fig. 2. Effect of two inducers of *Magnaporthe oryzae* appressorium formation on the inhibitory activity of PAF104. Conidia of *M. oryzae* Guy11 isolate were incubated alone (black bars) or with 20 μ M PAF104 (white bars) and in the absence or presence of either 2.4 mM cAMP or 10 μ M 1,16-hexadecanediol for 6 h on a **A**, hydrophilic or **B**, hydrophobic surface. Results are shown as mean values \pm standard deviation of the percentage of conidia of *M. oryzae* Guy11 that form appressorium in each condition.

repression of *MoMSB2* was confirmed, although this effect was not concentration-dependent. The relative expression of *MoMSB2* was similar at both peptide concentrations; log₂ was (-2.146 ± 0.110) at 5 μM PAF104 and (-1.891 ± 0.174) at 20 μM. The protein MoMsb2, recently characterized in *M. oryzae* by Liu and co-workers (2011), plays an important role in sensing surface hydrophobicity and cutin monomers. Our qPCR analysis also revealed a minor repression of *MoSHO1*, a gene encoding another sensor of external signals; in particular, MoSho1 recognizes rice leaf waxes (Liu et al. 2011). These authors show that MoMsb2 and MoSho1 may function upstream from the Pmk1 pathway. Consistently with their results, the expression of the MEK kinase *MST11* was also found to be repressed in our analysis, although the *PMK1* expression level does not change after peptide treatment.

PAF104 has no effect on adhesion, conidial germination, or mycelial growth.

The first steps of the *M. oryzae* infection cycle are adhesion of fungal conidia to the host surface and conidial germination. In this work, an adhesion assay on a hydrophobic polystyrene surface was conducted to evaluate if PAF104 reduced the number of conidia attached to the surface. A similar number of conidia of PR9 attached to the polystyrene surface after treatment with PAF104 (5 and 20 μM) compared with the control treatment without peptide. The percentage of attached conidia after treatment with 20 μM PAF104 was 93.4 ± 8.8 (mean ± standard deviation [SD]), considering 100% for control samples; the data was calculated as mean ± SD from three independent experiments. In addition, the number of germinated conidia was quantified after peptide treatment and compared with that of the control treatment; the percentage of germinated conidia was 91.4 ± 1.3 for samples treated with 20 μM PAF104 versus 92.7 ± 0.6 for the control. Our results showed that conidial germination remained unaffected at concentra-

tions at which appressorium inhibition was observed, i.e., 20 μM PAF104.

Next, the effect of PAF104 on growth and development of *M. oryzae* mycelium was examined. The vegetative growth of *M. oryzae* PR9 isolate in liquid culture was unaffected by concentrations of PAF104 as high as 64 μM (Supplementary Fig. S1).

Overall, these results indicate a specific effect of PAF104 on appressorium formation, i.e. the peptide reduces the ability of *M. oryzae* to form appressoria but does not affect either the adhesion of the conidia to hydrophobic surfaces, germination, or vegetative mycelial growth of the fungus *M. oryzae*.

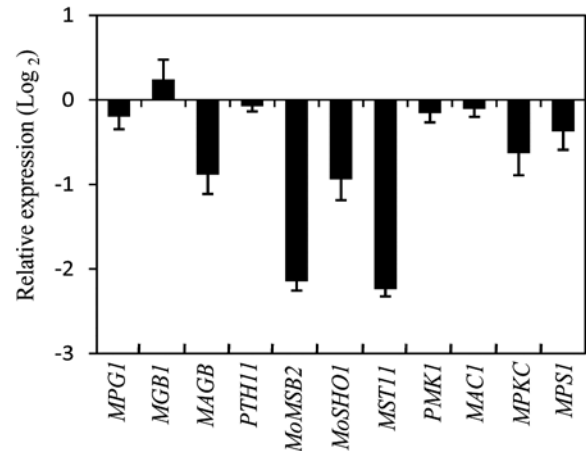


Fig. 4. Real time quantitative polymerase chain reaction analysis of gene expression changes after treatment with 5 μM PAF104. The panel shows the mean relative expression ± standard deviation (y axis) of each individual gene after 6 h of peptide treatment, as compared with the control treatment without peptide. The *EF1α* gene was used as constitutive reference gene.

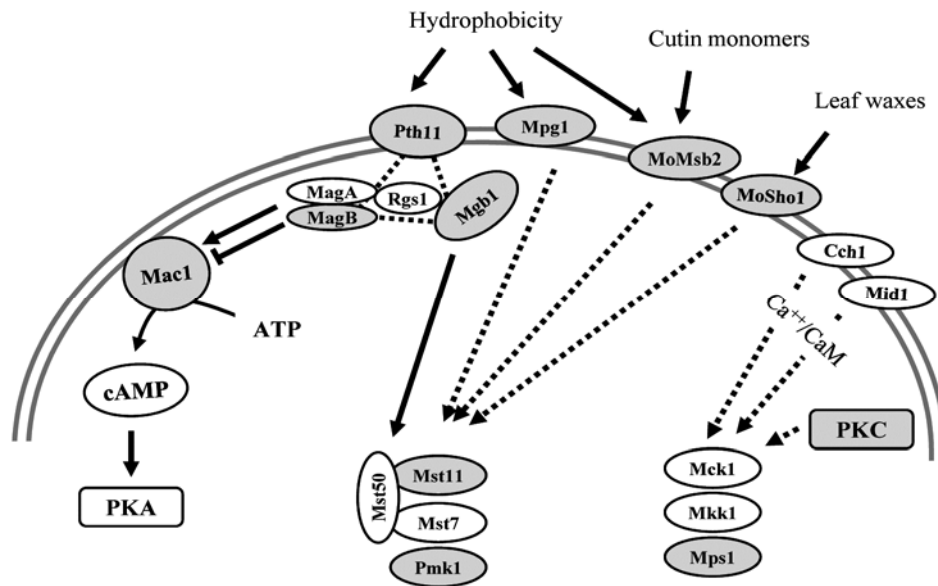


Fig. 3. Schematic view of the cyclic AMP (cAMP) response pathway and the Pmk1 and Mps1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways required for appressorium development in *Magnaporthe oryzae* (modified from Wilson and Talbot [2009] and Hamel and associates [2012]). cAMP signaling molecules are accumulated by adenylate cyclase Mac1 and allow the activation of the protein kinase A (PKA). The cAMP signaling pathway seems to be regulated by the Gα-subunit proteins MagA and MagB, and the regulator of G protein signaling Rgs1 interacts with MagA during appressorium initiation. Activation of the Pmk1 pathway involves the Gβ-subunit protein Mgb1. Crosstalk with the cAMP pathway may occur through MagB. The G protein-coupled receptor Pth11 plays a role as the receptor for the cAMP response pathway and, perhaps, also the Pmk1 MAPK cascade. In addition to Pth11, the fungus response to environmental signals to induce appressorium formation by different proteins, including the hydrophobin Mpg1, the surface mucin protein MoMsb2, and the membrane sensor MoSho1. Activation of the Mps1 pathway may occur through calcium channel proteins (Cch1 or Mid1) or protein kinase C (PKC). Solid lines denote interactions supported by experimental evidence. Dotted lines indicate tentative interactions that require further experimental testing. The proteins encoded by the genes included in the expression analysis are colored in gray.

PAF104 reduces the rice blast disease caused by *M. oryzae*.

The effect of PAF104 on appressorium formation and hyphal growth was examined in planta. For this, two *M. oryzae* strains expressing the green fluorescent protein (*gfp*) gene were used. As previously published, expression of the *gfp* gene did not affect the viability and pathogenicity of the *M. oryzae* transformants that were used in this work (Campos-Soriano and San Segundo 2009; Sesma and Osbourn 2004). First, the inhibitory effect of PAF104 on these GFP transformants was tested, showing a similar effect as on the wild-type fungal strains PR9 and Guy11. For example, at 20 μ M PAF104, the percentage of appressoria observed relative to control was $(42.2 \pm 2.0)\%$ and $(41.9 \pm 9.8)\%$ for Guy11 and *gfp*-Guy11 isolates, respectively. Detached leaves of rice cv. Senia were inoculated with fungal conidia as described below and were visualized by confocal microscopy at 6 h postinoculation (Fig. 5A; Supplementary Fig. S2). By 6 h postinoculation, a large number of green fluorescent germinating conidia formed appressoria were observed on the surface of rice leaves inoculated with either *gfp*-PR9 or *gfp*-Guy11 (Fig. 5Aa and b, e and f, respectively).

Next, we evaluated the effect of PAF104 on appressorium formation on the rice leaf surface. When drops of the conidial suspension were placed onto detached leaves along with 20 μ M peptide, the number of appressoria observed was clearly reduced. As within the artificial hydrophobic polystyrene surface, the peptide is able to greatly reduce appressorium for-

mation of the two fungal isolates assayed here, *M. oryzae* PR9 isolate (Fig. 5Ac and d) and Guy11 isolate (Fig. 5Ag and h).

The inoculation with both *gfp*-expressing *M. oryzae* isolates gave rise to a macroscopically visible lesion at 3 days after inoculation. Consistent with the confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis, disease severity was reduced after PAF104 treatment compared with fungal infection without treatment (Fig. 5B). To further investigate whether inhibition of appressorium formation could be correlated with reduced pathogenicity, blast resistance assays were conducted on young detached leaves of rice cv. Senia plants. Symptoms caused by inoculation with *M. oryzae* conidia in the presence or the absence of PAF104 was followed over time. Lesions caused by the fungus *M. oryzae* were observed at 3 days after inoculation; Figure 6A shows a representative assay with the Guy11 isolate. Under the same experimental conditions, a reduction in disease severity was observed when the fungus was treated with 20 μ M PAF104 as compared with the nontreated fungus. Similar results were obtained with the PR9 isolate (data not shown). Leaf lesions were also observed by light and fluorescence microscopy, which allowed in planta detection of the fungal mycelium. As depicted in the inset of Figure 6A, the lesions produced by inoculation with nontreated fungus showed bright GFP fluorescence. When the fungus was treated with PAF104, almost no blast disease lesions were visualized. We further quantified plant disease in leaves by determining the percentage of the leaf area affected by blast lesions

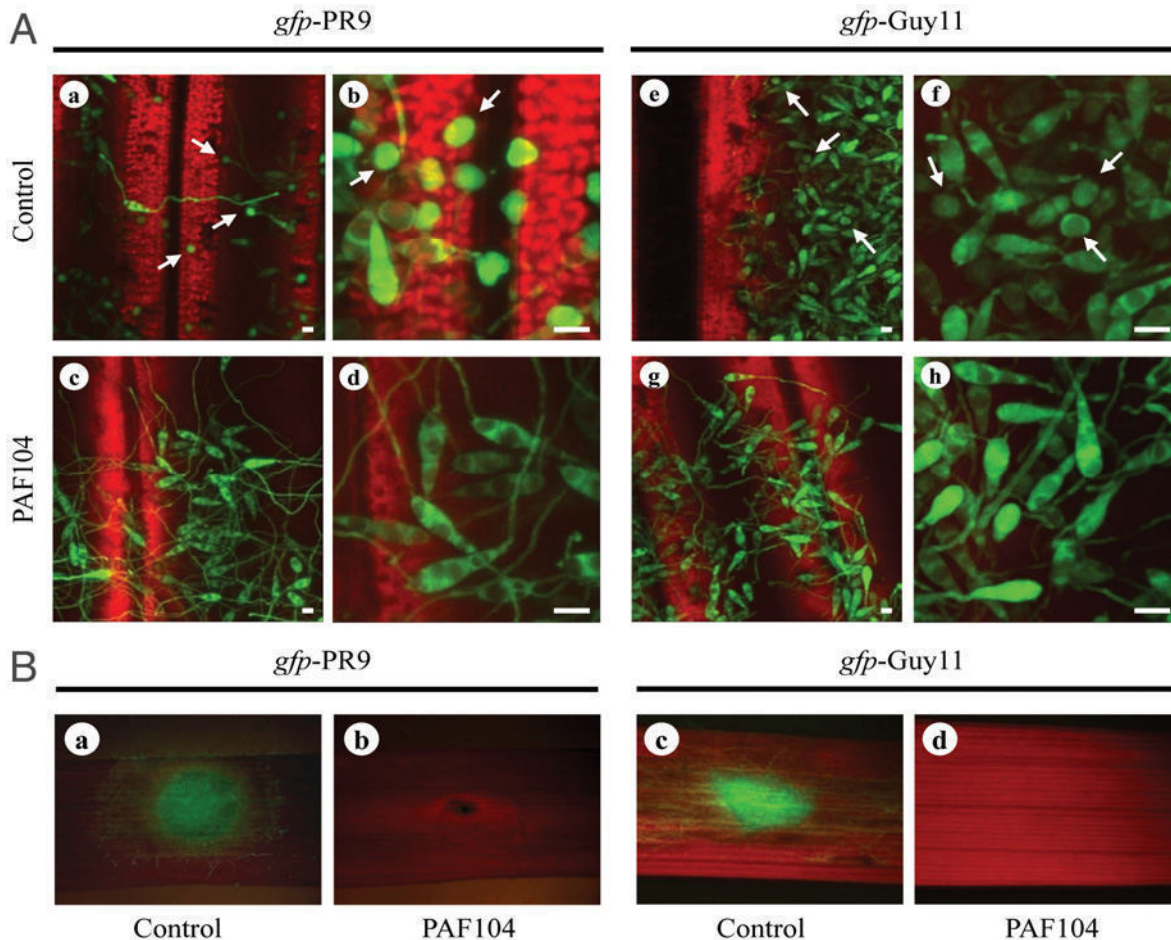


Fig. 5. Appressorium formation and infection development on rice leaves inoculated with conidia of the *gfp*-expressing *Magnaporthe oryzae* PR9 and Guy11 isolates. **A**, Confocal laser scanning microscopy of rice leaves 6 h after inoculation with fungus in the absence (a and b, e and f) or in the presence (c and d, g and h) of 20 μ M PAF104. Appressoria have formed at the penetration sites in the absence of peptide (arrows in a, b, e and f). **B**, Representative infection sites observed by fluorescent microscopy 3 days after inoculation with *M. oryzae* *gfp*-PR9 (a and b) and *gfp*-Guy11 (c and d) isolates alone (control) or treated with 20 μ M PAF104.

(Fig. 6B). In agreement with visual inspections of infected leaves, this analysis confirmed that the development of the infection caused by *M. oryzae* on rice leaves was significantly reduced by PAF104 treatment.

PAF104 does not affect rice root colonization of *M. oryzae*.

M. oryzae has been reported to colonize rice roots under laboratory conditions (Campos-Soriano and San Segundo 2009; Sesma and Osbourn 2004). In order to evaluate if PAF104 affect root colonization, confocal microscopical observations of roots inoculated with *M. oryzae* (*gfp*-PR9) treated or not with peptide were conducted. Conidia germinated on the rice root surface (Fig. 7). No differences were observed in root

colonization when the fungus is treated with PAF104 relative to that of nontreated conidia. In fact, at 30 h after inoculation, the fungus had penetrated epidermal root cells (Fig. 7, arrows in c and f) independently of the peptide treatment.

DISCUSSION

Important research efforts are being addressed to develop novel specific fungicides with lower unspecific toxicity in order to avoid some of the drawbacks of current fungicides. The identification and application of target-oriented antifungal compounds has been proposed as an environmentally sustainable strategy to control phytopathogen diseases (Brent

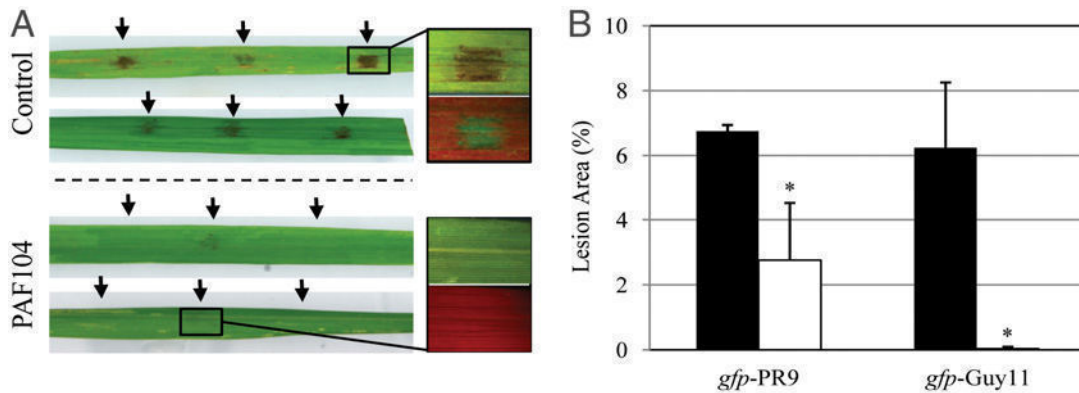


Fig. 6. Resistance to infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice cv. Senia plants. **A**, A representative experiment of infection of detached leaves with *gfp*-expressing *Magnaporthe oryzae* Guy11 isolate. Detached leaves were infected with a fungal solution adjusted to 5×10^6 conidia per milliliter from the isolate *gfp*-Guy11 nontreated (control) or treated with $20 \mu\text{M}$ PAF104. Pictures were taken at 3 days after inoculation. Leaf lesions were also observed by light and fluorescent microscopy (inset images). **B**, Percentage of leaf area affected by blast lesions at 3 days postinoculation was determined using image analysis software Assess v. 2.0 for plant disease quantification. Results are shown as mean values \pm standard deviation of one representative experiment for each fungal isolate from at least two experiments with similar results. For both isolates, the treated sample differs from the control sample at the 95% confidence (analysis of variance).

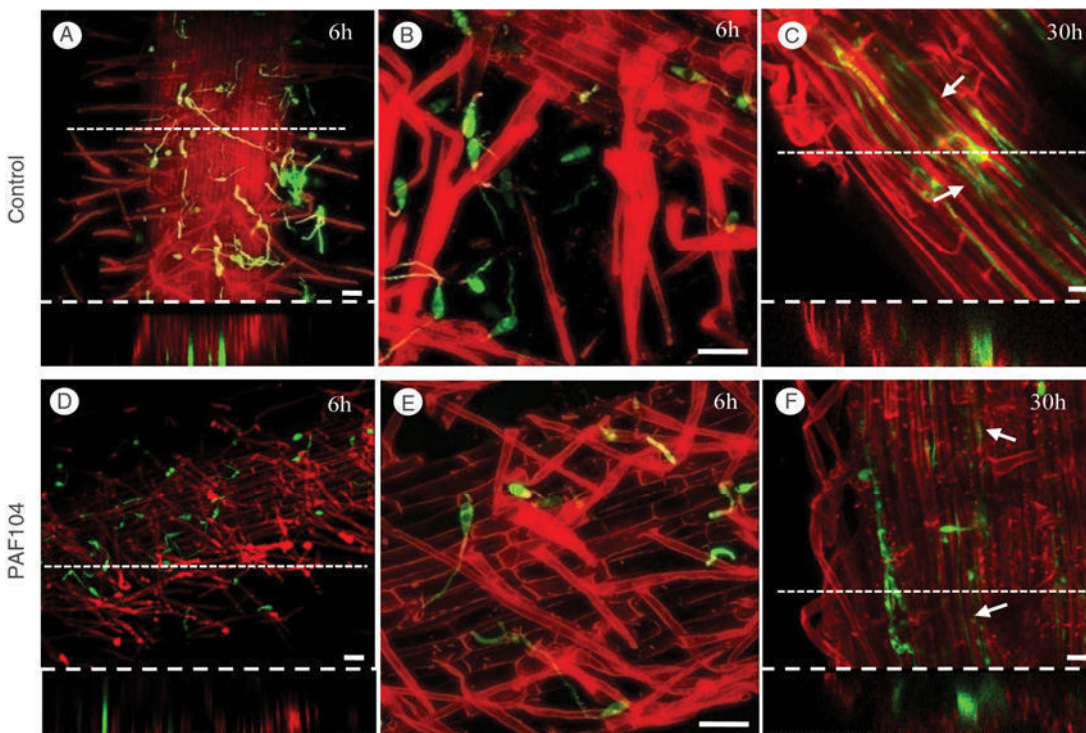


Fig. 7. Confocal laser scanning microscopy of rice roots inoculated with the *gfp*-expressing **A** to **C**, *Magnaporthe oryzae* PR9 alone or **D** to **F**, treated with $20 \mu\text{M}$ PAF104 and stained with propidium-iodide to visualize the roots. Fungal conidia and hyphae in contact with rice roots 6 h after inoculation (**A**, **B**, **D**, and **E**). Hyphae growing along the rice root 30 h after inoculation (**C** and **F**); some epidermal cells have already been penetrated (arrows). Bar = $10 \mu\text{m}$. The dotted white lines in **A**, **C**, **D**, and **F** indicate the *xz* axis presented in the lower parts of panels.

and Hollomon 2007; Knight et al. 1997; Ragsdale 2000). Current chemical fungicides that inhibit conidial germination and mycelial growth normally have broad-spectrum activity and, probably, high relative toxicity. In this study, we have identified a small synthetic peptide, PAF104, that is effective for reducing the development of *M. oryzae* diseases on rice. Although PAF104 inhibited appressorium formation of *M. oryzae*, the ability of conidia to germinate and grow was not affected, suggesting that the peptide was not toxic to fungal conidia. In this regard, it has been proposed that compounds blocking a specific target required in infection are more pathogen-specific and, thus, will have low unspecific toxicity (Thines et al. 2004). PAF104 belong to the PAF series peptides previously characterized by their antifungal activity against several filamentous fungi but reduced toxicity against nontarget bacteria and yeast cells (López-García et al. 2002) and with low hemolysis compared with the lytic peptide melittin (Muñoz et al. 2007). Moreover, no cytotoxicity to human keratinocytes has been shown for one of these PAF peptides (PAF26) (López-García et al. 2007). Together with these previously published data regarding the toxicity of PAF peptides with primary sequence similarity, the results reported in this work suggest the lack of unspecific toxicity of PAF104. On the other hand, the peptide PAF42D, with analogous sequence to PAF104, showed growth-inhibitory activity against the phytopathogen *M. oryzae* with a MIC (minimum inhibitory concentration) value of 16 μ M (Muñoz et al. 2007). The growth inhibitory activity of PAF42D might be attributed to their possible higher resistance to protease degradation due to the D-amino acids sequence and the peptide ends modification by N-terminal acetylation and C-terminal amidation. However, the stability of PAF104 or PAF42D to protease degradation has not yet been tested. Similar experiments with another PAF peptide (PAF19) show that the peptide synthesized with L-amino acids is more susceptible to protease degradation than the peptide synthesized with D-amino acids (López-García et al. 2000). Further analyses of the unspecific toxicity and stability toward digestion by protease of PAF104 are needed.

Our experiments show a clear correlation between inhibition of appressorium formation by PAF104 in vivo (Fig. 5) and infection severity (Fig. 6). However, the peptide was not able to completely block appressorium formation on in vitro hydrophobic surfaces at the concentration used in in vivo appressorium formation and infection assays (i.e., 20 μ M; Fig. 1C). The formation of nonfunctional appressorium or the activation of host resistance in response to peptide treatment might explain these results. In favor of the formation of nonfunctional appressorium, appressorium-like structures developed by hyphal tips were observed after treatment with PAF104 for 24 h (data not shown). Previous studies have shown that these appressorium-like structures have lower efficiency in plant penetration than appressoria formed by germ tubes (Kong et al. 2013).

On the other hand, the fungus is able to germinate and grow on the leaf surface, which is consistent with the lack of germination and growth inhibition by PAF104 in vitro. These data emphasize that PAF104 may not have unspecific toxicity, as noted above. Previous works suggested that chemical components present in rice leaves, such as cutin monomers including 1,16-hexadecanediol, may interfere with the inhibitory effect of some antifungal compounds (Oh and Lee 2000). Our data show that the addition of 1,16-hexadecanediol does not affect the inhibitory activity of PAF104 on in vitro hydrophobic surfaces, and consequently, this peptide blocks appressorium formation on rice leaves. Of interest, PAF104 is not able to block the colonization of *M. oryzae* on rice root under

laboratory conditions. However, there is no evidence of infection of rice plants through *M. oryzae* colonization of roots in the field.

Currently, with the advent of high-throughput technologies, plant pathologists have made significant progress in understanding plant-pathogen interactions using model organisms such as *M. oryzae* (Kawahara et al. 2012; Liu et al. 2010; Mathioni et al. 2011; Soanes et al. 2012; Tucker et al. 2010; Wang and Valent 2009). This knowledge is useful to characterize the mode of action of different potential appressorium inhibitors. Our RT-qPCR analysis revealed the repression of *MoMSB2* and *MST11* gene expression. The transmembrane mucin protein Msb2 has been characterized as a surface sensor to induce appressorium formation in *Ustilago maydis* and *M. oryzae* (Lanver et al. 2010; Liu et al. 2011). Our results regarding the repression of the *MoMSB2* gene expression by PAF104 suggest that the peptide might act in blocking the recognition of external signals, i.e. hydrophobicity and cutin monomers, required to induce appressorium formation. This hypothesis is consistent with the results obtained after the addition of the cutin monomer 1,16-hexadecanediol; that is, the PAF104 inhibition of appressorium formation cannot be nullified by the addition of this inductor. Moreover, the proposed mode of action of PAF104 is consistent with the idea that its inhibitory activity was bypassed by the addition of cAMP.

Liu and coworkers (2011) showed that the activation of Pmk1 was reduced in *Mommsb2* mutants, suggesting that *MoMsb2* may function upstream from the Pmk1 pathway in *M. oryzae*, but *PMK1* expression was not affected in these mutants. According to these previous results, our data show that *PMK1* expression level does not change after peptide treatment, although PAF104 represses the expression of *MST11*. It has been demonstrated that mutants blocked in the Mst11-Mst7-Pmk1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade fail to form appressoria and are nonpathogenic (Hamel et al. 2012; Zhao et al. 2005). Whether PAF104 treatment affects the activation of Pmk1 remains to be seen, and future research is being focused on the characterization of its mode of action in more detail.

On the other hand, we show that the expression level of the MAPK gene *MPS1* does not change after PAF104 treatment. The *mps1* mutant has been characterized as significantly reduced in aerial hyphal growth and conidiation (Xu et al. 1998). The absence of *MPS1* expression change by PAF104 is consistent with our results showing that the peptide does not affect the germination or vegetative mycelial growth of the fungus *M. oryzae*.

Taken together, these results indicate that small peptides, such as PAF104, regulate genes at the transcriptional level. Transcriptional control mediated by small interfering peptides (siP) affecting the functionality of specific transcription factors has been demonstrated (Lee and Mapp 2010; Seo et al. 2011; Yun et al. 2008). These siP share some properties of cell-penetrating peptides, such as their cationic charge and their ability to cross cellular membranes in a nondisruptive way and gain access to different cellular compartments. This translocation capability is being demonstrated for an increasing number of AMP (Henriques et al. 2006; Marcos et al. 2008). Although the cell-permeation properties of PAF104 remain to be demonstrated, the penetrating properties of the lead peptide PAF26 have been previously published (Muñoz et al. 2012).

The results presented here suggest that PAF104 could be a promising compound with potential application for the control of rice blast disease by blocking a specific target related to appressorium formation, a process essential for infection of rice leaves. It has been postulated that fungi are less likely to develop resistance against compounds that do not interfere with

its vegetative growth (Thines et al. 2004). In addition to environment-friendly compounds, another restriction to applying a novel compound as a fungicide to control crop diseases is the fact that it must be economically viable for the farmer. One interesting advantage of the potential application of a peptide in plant protection is the ability to produce this compound in high amounts to reduce the cost of further application. The protein nature of PAF104 makes feasible the design of synthetic genes for its heterologous production through biotechnology. Moreover, a PAF104 specific inhibitory effect is also likely to be advantageous for developing new fungicides. The short sequence length of PAF104 favors structure and activity studies in a holistic approach to enhance their stability or to use as a lead compound to develop novel compounds with improved properties.

MATERIALS AND METHODS

Strain and growing conditions.

Two isolates of *M. oryzae* were used in this study for in vitro appressorium-inhibition assays, namely PR9 (CIRAD collection, Montpellier, France) and Guy11 (Centre for Plant Biotechnology and Genomics, Universidad Politécnica de Madrid, Spain). For the leaf- and root-infection assays, *M. oryzae* PR9 and Guy11 isolates that constitutively produce the GFP protein were used (*gfp*-PR9 and *gfp*-Guy11; provided by A. Sesma and B. San Segundo, respectively). The fungus was grown on oatmeal agar (Difco, Detroit) at 28°C under a 16-h light and 8-h dark photoperiod. Conidia were collected from 11- to 13-day-old culture with sterile water, were filtered through miracloth, and were titrated with a Neubauer chamber.

Synthetic peptides.

Peptides (Table 1) were purchased at >90% purity from GenScript Corporation (Piscataway, NJ, U.S.A.). They were synthesized by solid-phase methods using *N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl chemistry. Stock solutions of each peptide were prepared in sterile milliQ-water, and peptide concentrations were determined by measuring the molar extinction coefficient (ϵ) at 280nm for the Trp residue is 5,600 M⁻¹ cm⁻¹).

Appressorium formation inhibition assay.

Development of appressoria in *M. oryzae* conidia was monitored on the hydrophobic surface of nontreated polystyrene 24-well microtiter plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). Drops (8 μ l) of a conidial suspension adjusted to 3 \times 10⁵ to 5 \times 10⁵ conidia per milliliter were placed on the hydrophobic surface and 2 μ l of peptides were then added to reach different final concentrations from 5 \times stock solutions. As positive control, the same volume of sterile water was added to some drops.

The plates were sealed and stored at 28°C in dark conditions. Pictures of five random fields for every drop were taken with an Olympus Stereoscope microscope SZX16 after 6 and 24 h of incubation, and the percentage of conidia induced to form appressorium was determined by microscopic examination of at least 100 conidia per replicate. The data were shown as the relative percentage of appressorium formed after peptide treatment compared with the appressoria formed in control samples. At least three independent experiments were carried out with each fungal isolate.

To identify possible sites of inhibition on appressorium formation, additional assays were conducted by the addition of known inductors for *M. oryzae* appressorium development. For that, we added 2.4 mM cAMP (Sigma-Aldrich, St. Louis) or 10 μ M 1,16-hexadecanediol (Sigma-Aldrich), in order to evaluate the effect of these inductors on the inhibition activity of the peptide PAF104 after 6 h of incubation. In addition to the

hydrophobic polystyrene plates mentioned above, we used cell-treated polystyrene plates (Costar, Corning Inc., Corning, NY, U.S.A.) as hydrophilic surface.

RNA isolation and analysis of gene expression by RT-qPCR.

Drops (10 μ l) of PR9 conidial suspension (10⁶ spores per milliliter) were incubated without or with 5 μ M and 20 μ M of PAF104 as described above on the hydrophobic surface of square polystyrene petri dishes (Deltalab, Barcelona, Spain). After 6 h of incubation, fungal material (about 2 \times 10⁶ conidia) was collected and immediately frozen in liquid nitrogen and lyophilized. RNA extraction was performed using the Maxwell 16 LEV simplyRNA purification kit (Promega, Madison, WI, U.S.A.). RNA quality was determined using an Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.). RT-qPCR analyses were carried out in 96-well optical plates in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) according to the following thermal profile: activation step (95°C for 10 min), amplification step (45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s) and an additional cycle of dissociation curves to ensure a unique amplification. The reaction mixture contained 10 μ l of 2 \times SYBR Green Master mix reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, U.S.A.), 2 μ l of cDNA sample, and 400 μ M of each gene-specific primer in a final volume of 20 μ l. Three technical repeats of each one of at least three independent biological replicates were conducted. The elongation factor 1 α was used in this assay as reference gene (Skamnioti and Gurr 2007). The relative expression software tool (Multiple Condition Solver REST-MCS v2) was used to determine the relative quantification of target genes normalized to the reference gene (Pfaffl et al. 2002).

Conidia adhesion on polystyrene and germination assays.

The effect of PAF104 on conidia adhesion was assayed as previously described but with minor modifications (Stanley et al. 2002). Briefly, the fungal conidia-peptide mixtures were prepared as described above on a hydrophobic surface, but the plates were incubated for 1 h at 28°C in dark conditions. After incubation, images of the different drops were taken with the Olympus Stereoscope microscope SZX16 under a 4 \times objective. After adding 1 ml of distilled water to wash the non-adhered conidia, another set of images was taken. The number of conidia in each image was counted and the percent adhesion was calculated by dividing the number of conidia remaining after the wash by the number before washing.

To assess the influence of PAF104 on germination of *M. oryzae*, conidia suspensions (10⁶ conidia per milliliter) were incubated with 20 μ M of PAF104 in a final volume of 10 μ l. After a 4-h incubation at 28°C, the percentage of conidia that had germinated was determined by direct microscopic counts.

Growth inhibition assay.

In vitro antifungal activity of the peptide PAF104 was determined using a microtiter plate assay as previously described (López-García et al. 2012a). The fungus was grown on sterile 96-well plate (Costar) in a final volume of 100 μ l of PDB (potato dextrose broth; Difco) diluted to half (50% PDB), containing 0.003% (wt/vol) chloramphenicol to avoid bacterial growth. The assay mixture contained 40 μ l of a fungal suspension at 6 \times 10⁴ conidia per milliliter, 50 μ l of PDB, and 10 μ l of a 10 \times peptide solution. As a control for fungal growth, 10 μ l of sterile milliQ-water was added to the mixture instead of peptide. The plate was incubated at 28°C, and fungal growth was determined by measuring optical density at 492 nm in a Spectra-Max M13 (Molecular Devices, Menlo Park, CA, U.S.A.)

microplate reader. The mean and SD were calculated for each treatment. The experiment was repeated at least three times.

Inoculation of rice leaves with *M. oryzae* conidia.

The commercial *japonica* rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Senia was used to evaluate appressorium formation on leaves. The rice plants were cultivated at 28°C under an 18-h light and 6-h dark photoperiod in the greenhouse. The second leaf of rice seedlings at the three-leaf stage was placed into plate dishes with 1% (wt/vol) bacto agar (Difco) containing 2 µg of kinetin per milliliter.

The *M. oryzae* *gfp*-PR9 and *gfp*-Guy11 isolates were used for the leaf infection assay. Infection experiments were carried out using the detached leaf assay described by Coca and associates (2004) with minor modifications. Conidial suspensions at 1×10^6 to 5×10^6 conidia per milliliter were incubated with 20 µM PAF104 or with sterile milliQ-water (for comparison purposes) for 30 min. Tween-20 was added to the treated conidia for a final concentration of 0.025% (vol/vol). Drops (10 µl) of the conidial suspension were placed onto detached leaves. Inoculated leaves were maintained in the dark in a chamber under high-humidity conditions at 28°C for 24 h and the drop was removed. Then, leaves were kept at 28°C and high-humidity conditions under a 16-h photoperiod for the required time.

Rice leaves were subjected to CLSM analysis using a Leica SP5II spectral vertical confocal microscope at 6 h after inoculation with fungal conidia. Visualization of the *gfp*-expressing *M. oryzae* strains was carried out using excitation at 488 nm and emission at 505 to 530 nm.

Disease symptoms were visualized after 3 days of inoculation. Pictures of the inoculated leaves were taken with a Nikon camera D7000. Leaf lesions were also observed by light and fluorescent microscopy, using an Olympus Stereoscope microscope SZX16. At least two independent experiments were carried out for each fungal isolate, and in each experiment, at least three leaves were inoculated. Lesion areas were quantified by Image Analysis Software, Assess 2.0, for plant disease quantification (Lamari 2008).

Inoculation of rice roots with *M. oryzae* conidia.

Infection studies of root tissues were done by direct application of 100-µl conidia suspension at 10^6 conidia per milliliter onto root tissues of 3-day-old seedlings. Inoculated seedlings were allowed to continue to grow for the required period of time. *M. oryzae*-infected roots were stained with propidium iodide (0.2 g/ml) for 3 min and were subjected to CLSM analysis as previously described (Campos-Soriano and San Segundo 2009). Visualization of propidium iodide stained roots was carried out using excitation and emission at 543 nm and 560 to 615 nm, respectively. Transverse sections of rice roots were made and microscopical examinations of the infected root were carried out at different times after inoculation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Coca, B. San Segundo, and J. Marcos for their helpful comments during the course of this investigation and for their critical reading of the manuscript. The fungal strains used in this study were kindly provided by D. Tharreau from CIRAD, Montpellier, France (PR9 isolate), A. Sesma from Centre for Plant Biotechnology and Genomics, Universidad Politécnica de Madrid, Spain (GFP-Guy11 isolate), and B. San Segundo from CRAG, Barcelona (GFP-PR9 isolate). The PAF peptides were kindly provided by J. F. Marcos from IATA, CSIC, Spain. B. López-García is a recipient of a research contract from the 'Ramón y Cajal' program (MICINN, Spain). This work was supported by grant AGL2010-16847 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain). We thank the Generalitat de Catalunya (Xarxa de Referència en Biotecnología and SGR 09626) for substantial support.

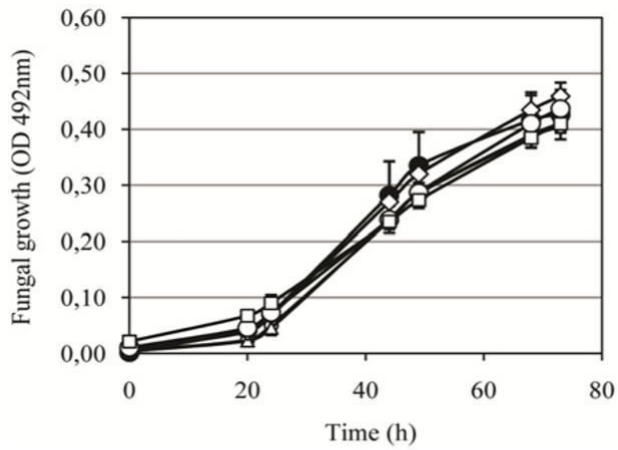
LITERATURE CITED

- Avila-Adame, C., and Koller, W. 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Curr. Genet.* 42:332-338.
- Brent, K. J., and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph No. 1. 2nd revised ed. Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium.
- Campos-Soriano, L., and San Segundo, B. 2009. Assessment of blast disease resistance in transgenic PRms rice using a *gfp*-expressing *Magnaporthe oryzae* strain. *Plant Pathol.* 58:677-689.
- Carmona, L., Gandía, M., López-García, B., and Marcos, J. F. 2012. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 correlates with endogenous nitric oxide (NO) production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417:56-61.
- Coca, M., Bortolotti, C., Rufat, M., Peñas, G., Eritja, R., Tharreau, D., Martínez del Pozo, A., Messeguer, J., and San Segundo, B. 2004. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol. Biol.* 54:245-259.
- Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430.
- DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B., and Sweigard, J. A. 1999. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrates cues. *Plant Cell* 11:2013-2030.
- Ebbole, D. J. 2007. Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:437-456.
- Hamel, L-P., Nicole, M-C., Duplessis, S., and Ellis, B. E. 2012. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: Distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell* 24:1327-1351.
- Hancock, R. E. W., and Sahl, H. G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24:1551-1557.
- Henriques, S. T., Melo, M. N., Castanho, M. A. R. B. 2006. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they? *Biochem. J.* 399:1-7.
- Jin, Q., Li, C., Li, Y., Shang, J., Li, D., Chen, B., Dong, H. 2013. Complexity of roles and regulation of the PMK1-MAPK pathway in mycelium development, conidiation and appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Gene Expr. Patterns* 13:133-141.
- Kawahara, Y., Oono, Y., Kanamori, H., Matsumoto, T., Itoh, T., and Minami, E. 2012. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLoS One* 7:e49423. Published online.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymbek, K., Kang, S., and Valent, B. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* 22:1388-1403.
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., Powell, K. A., Schulz, M. A., Spinks, C. A., Worthington, P. A., and Youle, D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:349-372.
- Kong, L.-A., Li, G.-T., Liu, Y., Liu, M.-G., Zhang, S.-J., Yang, J., Zhou, X.-Y., Peng, Y.-L., Xu, J.-R. 2013. Differences between appressoria formed by germ tubes and appressorium-like structures developed by hyphal tips in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 56:33-41.
- Lamari, L. 2008. Assess 2.0: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification. APS Press, St. Paul, MN, U.S.A.
- Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A., and Kahmann, R. 2010. Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 22:2085-2101.
- Lee, L. W., and Mapp, A. K. 2010. Transcriptional switches: Chemical approaches to gene regulation. *J. Biol. Chem.* 285:11033-11038.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:746-785.
- Liu, J. L., Wang, X. J., Mitchell, T., Hu, Y. J., Liu, X. L., Dai, L. Y., and Wang, G. L. 2010. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Mol. Plant Pathol.* 11:419-427.
- Liu, W. D., Zhou, X. Y., Li, G. T., Li, L., Kong, L. G., Wang, C. F., Zhang, H. F., and Xu, J. R. 2011. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS Pathog.* 7:e1001261. Published online.
- López-García, B., González-Candelas, L., Pérez-Payá, E., and Marcos, J. F. 2000. Identification and characterization of a hexapeptide with activ-

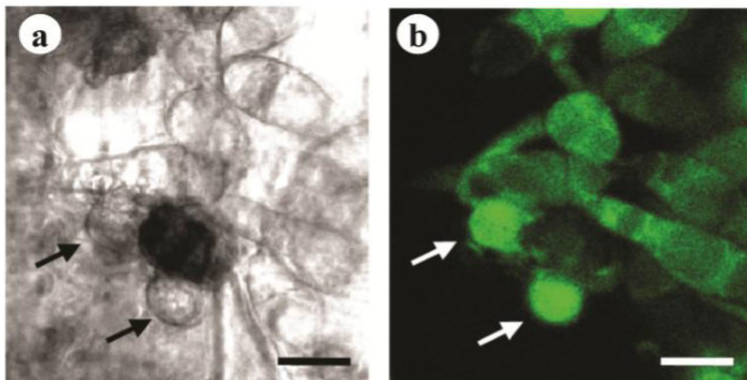
- ity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:837-846.
- López-García, B., Pérez-Payá, E., and Marcos, J. F. 2002. Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2453-2460.
- López-García, B., Ubhayasekera, W., Gallo, R. L., and Marcos, J. F. 2007. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356:107-113.
- López-García, B., Gandía, M., Muñoz, A., Carmona, L., and Marcos, J. F. 2010. A genomic approach highlights common and diverse effects and determinants of susceptibility on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to distinct antimicrobial peptides. *BMC Microbiol.* 10:289-305.
- López-García, B., Hernández, M., and San Segundo, B. 2012a. Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 55:62-67.
- López-García, B., San Segundo, B., and Coca, M. 2012b. Antimicrobial peptides as a promising alternative for plant disease protection. Pages 263-294 in: *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. K. Rajasekaran, J. W. Cary, J. M. Jaynes, and E. Montesinos, eds. American Chemical Society, Washington, DC.
- Marcos, J. F., Muñoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S., and López-García, B. 2008. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:273-301.
- Mathioni, S., Belo, A., Rizzo, C., Dean, R., and Donofrio, N. 2011. Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and *in vitro* stresses. *BMC Genomics* 12:49-68.
- Montesinos, E., Badosa, E., Cabrefiga, J., Planas, M., Feliu, L., and Bardaji, E. 2012. Antimicrobial peptides for plant disease control. from discovery to application. Pages 235-261 in: *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. K. Rajasekaran, J. W. Cary, J. M. Jaynes, and E. Montesinos, eds. American Chemical Society, Washington, DC.
- Muñoz, A., López-García, B., Pérez-Payá, E., and Marcos, J. F. 2007. Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:172-177.
- Muñoz, A., Gandía, M., Harries, E., Carmona, L., Read, N. D., and Marcos, J. F. 2012. Understanding the mechanism of action of cell-penetrating antifungal peptides using the rationally designed hexapeptide PAF26 as a model. *Fungal Biol. Rev.* 26:146-155.
- Oh, H. S., and Lee, Y. H. 2000. A target-site-specific screening system for antifungal compounds on appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* 90:1162-1168.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36. Published online.
- Ragsdale, N. N. 2000. The impact of the food quality protection act on the future of plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:577-596.
- Seo, P. J., Hong, S. Y., Kim, S-G., and Park, C-M. 2011. Competitive inhibition of transcription factors by small interfering peptides. *Trends Plant Sci.* 16:541-549.
- Sesma, A., and Osbourn, A. E. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431:582-586.
- Skamnioti, P., and Gurr, S. J. 2007. *Magnaporthe grisea* Cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *Plant Cell* 19:2674-2689.
- Soanes, D. M., Chakrabarti, A., Paszkiewicz, K. H., Dawe, A. L., and Talbot, N. J. 2012. Genome-wide transcriptional profiling of appressorium development by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* 8:e1002514. Published online.
- Stanley, M. S., Callow, M. E., Perry, R., Alberte, R. S., Smith, R., and Callow, J. A. 2002. Inhibition of fungal spore adhesion by zosteric acid as the basis for a novel, nontoxic crop protection technology. *Phytopathology* 92:378-383.
- Takagaki, M., Kaku, L., Watanabe, S., Kawai, K., Shimizu, T., Sawada, H., Kumakura, K., Nagayama, K. 2004. Mechanism of resistance to carboxamide in *Magnaporthe grisea*. *Pest Manag. Sci.* 60:921-926.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Hamer, J. E. 1993. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 5:1575-1590.
- Thines, E., Anke, H., and Weber, R. W. S. 2004. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycol. Res.* 108:14-25.
- Tucker, S. L., Besi, M. I., Galhano, R., Franceschetti, M., Goetz, S., Lenhart, S., Osbourn, A., and Sesma, A. 2010. Common Genetic pathways regulate organ-specific infection-related development in the rice blast fungus. *Plant Cell* 22:953-972.
- Wang, G.-L., and Valent, B. 2009. *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer Science and Business Media, New York.
- Wilson, R. A., and Talbot, N. J. 2009. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:185-195.
- Xu, J-R., Staiger, C.J., and Hamer, J. E. 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase *Mps1* from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:12713-12718.
- Yun, J., Kim, S-G., Hong, S., and Park, C-M. 2008. Small interfering peptides as a novel way of transcriptional control. *Plant Signal. Behav.* 3:615-617.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G., and Xu, J-R. 2005. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 17:1317-1329.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

- The Center for Health and Wellness website: www.fda.org
 European Food Safety Authority: www.efsa.europa.eu
 Fungicide Resistance Action Committee website: www.frac.info
 United States Environmental Protection Agency: www.epa.gov



Supplementary Fig. S1. Effect of different concentrations of PAF104 on the in vitro growth of *Magnaporthe oryzae* PR9 in 50% potato dextrose broth liquid medium. Results are shown as mean values of optical density (OD) at 402 nm \pm SD over time (in hours) for control samples in the absence (black circles) and presence of 8 μ M (white triangle), 16 μ M (white diamonds), 32 μ M (white circle), and 64 μ M (white square) of peptide.



Supplementary Fig. S2. Confocal laser scanning microscopy of rice leaves inoculated with conidia of the *gfp*-expressing *Magnaporthe oryzae* PR9 isolate. Bright field (a) and green fluorescence (b) images were taken 6h after inoculation. Arrows indicate the formed appressoria. Bar = 10 μ m

Supplementary Table S1. Oligonucleotide primer sequences used for each target and reference gene in this study

Gene		Protein	Sequence 5' – 3'
<i>EF1α</i>	MGG_03641	Elongation factor 1 α	F ^a : 5' - CAAGAACGTGTCCGTCAAG - 3' R: 5' - CCATAGGAGGGTCGTTCTT - 3'
<i>MPG1</i>	MGG_10315	Hydrophobin-like protein	F: 5' - CTCATTCTTGTCTTTTCCCG - 3' R: 5' - AACGGTCTTGAGGGAGAACAT - 3'
<i>MoMSB2</i>	MGG_06033	Surface mucin protein	F: 5' - AGGTTCCCTACTACGGTCCC - 3' R: 5' - GTGGCAGAAGTGTGGGAG - 3'
<i>MoSHO1</i>	MGG_09125	Membrane sensor	F: 5' - TGATTCCGGGTGTCTTCGTT - 3' R: 5' - CCGACAAGCGCAACATGATA - 3'
<i>PTH11</i>	MGG_05871	G protein-coupled receptor	F: 5' - TCGGTGACGTCCATACAGG - 3' R: 5' - TCGCTGGCGAGACGGTCT - 3'
<i>MGB1</i>	MGG_05201	G protein β subunit	F: 5' - AGTTTCAGGCAGGCTGCTT - 3' R: 5' - TGTCGCCACGGGTGATGT - 3'
<i>MAGB</i>	MGG_00365	G protein α subunit	F: 5' - CGAGGACGAGACGGTCAA - 3' R: 5' - ACCTCGAGTTGCAGATGGA - 3'
<i>MAC1</i>	MGG_09898	Adenylate cyclase	F: 5' - CGGTTCTCAAGGAGGGTTC - 3' R: 5' - CTGCACAGCATTTCGAGCC - 3'
<i>MPKC</i>	MGG_08689	Protein kinase C	F: 5' - TTCAGCAGTCGCCTTTCAGA - 3' R: 5' - GCTCGTCCGCCAGAAATGG - 3'
<i>PMK1</i>	MGG_09565	MAPK	F: 5' - CTCATTCAACGTAAGCGAGCA - 3' R: 5' - AGAGCAAACGACTCCATAAGC - 3'
<i>MPS1</i>	MGG_04943	MAPK	F: 5' - AGAAAATCCTAGCCAAGCGCG - 3' R: 5' - AATGTTACGGTGGCCTCGGAA - 3'
<i>MST11</i>	MGG_14847	MEK kinase	F: 5' - AGACGGGCGGGCATAAATG - 3' R: 5' - CACCATCGGCCACTTGAATT - 3'

^a F: forward primer; R: reversed primer

Capítulo 2

Identificación de inhibidores de la formación de apresorio en *Magnaporthe oryzae* mediante el cribado de una biblioteca combinatoria de péptidos.

Resumen

La piriculariosis causado por *Magnaporthe oryzae* es una de las enfermedades más devastadoras del arroz. Una de las etapas más importantes en el ciclo infeccioso de *M. oryzae* es la formación de una estructura en forma de cúpula llamada apresorio. El propósito del presente estudio fue la identificación de nuevos péptidos antimicrobianos para el control de la piriculariosis bloqueando la formación de apresorio a través del escrutinio de una biblioteca combinatoria de péptidos. Como resultado de este escrutinio, un conjunto de 29 péptidos fueron identificados, sintetizados y comparados con el péptido previamente identificado PAF104. Los péptidos MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47 muestran mayor actividad inhibitoria del apresorio de *M. oryzae*. Nuestros resultados sugieren que estos péptidos presentan un efecto diferencial sobre la formación de dos estructuras distintas: los apresorios y unas estructuras similares a apresorios. Los ensayos antimicrobianos frente a *M. oryzae* y otros microorganismos muestran baja o nula toxicidad de estos péptidos, demostrando su especificidad en el bloqueo de la formación de apresorio. Como conclusión destacar que el resultado de esta investigación puede ser de interés en el desarrollo de nuevos péptidos específicamente dirigidos para su uso en protección vegetal.

Trabajo publicado:

Rebollar A., Marcos J.F., and López-García B. (2014)

Screening of a synthetic peptide combinatorial library to identify inhibitors of the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*.

Biochemical and Biophysical Research Communications **454**: 1-6.



Screening of a synthetic peptide combinatorial library to identify inhibitors of the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*



Aarón Rebollar^a, Jose F. Marcos^b, Belén López-García^{a,*}

^a Centro de Investigación en Agrigenómica (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallés) 08193, Barcelona, Spain

^b Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) – CSIC, Apartado de Correos 73, Burjassot 46100, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2014

Available online 18 October 2014

Keywords:

Rice-blast
Appressoria
Oryza sativa
Antimicrobials

ABSTRACT

The rice blast disease caused by *Magnaporthe oryzae* is one of the most devastating diseases of cultivated rice. One of the most important stages in the infective cycle of *M. oryzae* is the formation of the dome-shaped structure called appressorium. The purpose of the present study was to identify novel peptides to control the rice blast disease by blocking the appressorium formation through screening of a synthetic peptide combinatorial library. As result of the screening, a set of 29 putative bioactive peptides were identified, synthesized and assayed in comparison with the previously identified peptide PAF104. The peptides MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47 showed improved inhibitory activity on the *M. oryzae* appressorium formation. Our data show that these peptides have a differential effect on two developmental structures: appressoria and appressorium-like structures. Antimicrobial assays against *M. oryzae* and other non-target microorganisms showed a weak or no toxicity of these peptides, demonstrating their specific activity blocking the appressorium formation. Therefore, the outcome of this research would be useful in the development of novel target-oriented peptides to use in plant protection.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Plant infectious diseases caused by phytopathogenic fungi produce an important reduction of plant yield across many crop species, and require the continued use of fungicides for control. However, there are several problems associated to their use, such as the limited spectrum of action, the emergence of resistant fungal isolates and the negative impact on human health and the environment [1]. To substitute for or complement current fungicides, more pathogen-specific compounds with lower unspecific toxicity could be identified by screening for molecules which specifically block infection-related processes rather than inhibit vegetative hyphal growth. The identification and application of these target-oriented molecules has been proposed as an environmentally friendly alternative to avoid some drawbacks of current fungicides [1,2].

Natural and synthetic antimicrobial peptides (AMPs) have emerged as promising compounds to use in plant protection as alternative to fungicides [3–5]. The diversity available through combinatorial chemistry provides a powerful tool to identify novel peptides targeted to specific crop protection problems. “Non-defined” synthetic combinatorial libraries (SCL) enable the high-throughput

(HTP) assay of millions of compounds without sequence restrictions in relatively short time [6]. In most cases, the primary peptide screens are cell-based assays of *in vitro* growth inhibition, which enables the HTP formats required for the analysis of compound libraries [7,8]. Indeed, the library used in this work was previously assayed against the phytopathogen *Penicillium digitatum*, identifying several peptides called PAFs [7]. However, few examples of peptide screens targeted to specific pathogen functions have been applied to plant pathogens [9–11].

This work focuses on the screening of a peptide library to identify inhibitors of an essential infection process of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, a devastating rice pathogen [12]. *M. oryzae* passes through a set of well-defined developmental stages to successfully invade and infect host plants: adhesion to plant surface and germination, appressorium differentiation and maturation, penetration and invasive growth. Multiple external signals and several transduction pathways, including Pmk1 and Mps1 mitogen-activated protein kinases (MAPK) and cAMP-dependent signaling pathways, regulate this developmental process [12–16].

We have previously characterized the heptapeptide PAF104 as an inhibitor of appressorium formation in *M. oryzae* that affects the expression of genes coding for components of the Pmk1 pathway [17]. PAF104 was identified as a derivative of PAF26, and both peptides resulted from combinatorial screens to find

* Corresponding author at: Futureco Bioscience, S.A., 08799 Olèrdola, Barcelona, Spain.

E-mail address: crag.blg@gmail.com (B. López-García).

inhibitors of fungal growth [7,18]. The purpose of this study was the improvement of the properties of PAF104 through combinatorial chemistry by screening of a “non-defined” hexapeptide library specifically against appressorium formation. As a result of the screening, the improved peptides MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47 have been identified.

2. Materials and methods

2.1. Microbial strains and growth conditions

M. oryzae isolate PR9 (CIRAD collection, Montpellier, France) was used for the *in vitro* appressorium inhibition assays. The fungus was grown on complete medium at 25 °C under 16 h/8 h (light/dark) photoperiod. The composition of complete medium (CM) is minimal medium (MM, 6 g/l NaNO₃, 0.52 g/l KCl, 0.52 g/l MgSO₄·7H₂O, 1.52 g of KH₂PO₄, 0.001% thiamine, 0.1% trace elements supplemented with 10 g/l D-glucose) supplemented with 2 g/l peptone, 1 g/l yeast extract, and 1 g/l casamino acids. Conidia were collected from 11 to 13 days-old culture with sterile water, filtered through miracloth and titrated with a Neubauer chamber.

Other microorganisms used were a fungal strain of *Fusarium proliferatum* isolated from rice and the laboratory strain of *Escherichia coli* (DH5 α). *F. proliferatum* was cultured in potato dextrose agar (PDA) plates at 25 °C and conidia were collected as described above. *E. coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C to exponential phase, diluted to the appropriate concentration, and used in the antimicrobial assays.

2.2. Peptide library and individual synthetic peptides

The synthesis of the library used in this work was described previously [7]. Peptide mixtures were dissolved in 5% dimethylsulfoxide (DMSO). Individual peptides (Table 1) were purchased at >90% purity from GenScript Corporation (New Jersey, USA) and dissolved in sterile milliQ-water.

2.3. Appressorium formation assay

Development of *M. oryzae* appressoria on hydrophobic surface was monitored by microscopic examination as previously described [17]. Briefly, 8 μ l-drops of a conidial suspension adjust to 5 \times 10⁵ conidia/mL were placed on the hydrophobic surface and then 2 μ l of each mixture of peptide library or sequence-defined peptides were added to reach different final concentrations from 5 \times stock solutions. In the assay of the peptide library, two concentrations of peptide mixtures were assayed (0.5 mg/ml and 1 mg/ml), and the same volume of 5% DMSO was added to some drops as mock to confirm that it did not significantly affect the appressorium formation.

Pictures of 5 random fields of every drop were taken with an Olympus Stereoscope microscope SZX16 and the percentage of conidia induced to form appressorium was determined by microscopic examination for at least 100 conidia per replicate. The percentage of appressorium formation after each peptide treatment was calculated as the number of appressoria formed relative to the number in control samples without peptide. At least two independent experiments were carried out.

2.4. *In vitro* germination and antimicrobial activity assays

The percentage of *M. oryzae* germinated-conidia after peptide treatment was determined as previously described [17]. Briefly, conidia suspensions (10⁶ conidia/mL) were incubated with 20 μ M of each peptide and, after 4 h incubation at 28 °C, germinated and non-germinated conidia were quantified by direct microscopic counts.

Table 1

Amino acid sequences of the peptides obtained of the analysis of the library.

Peptide	Sequence
PAF26	NH ₂ -RKKWFW-COOH
PAF104	NH₂-WRKKWFW-COOH
#21	NH ₂ -WRKKW <u>E</u> W-COOH
#22	NH ₂ -WRKKW <u>G</u> W-COOH
#23	NH ₂ -WRKKW <u>H</u> W-COOH
#24	NH₂-WRKKW<u>I</u>W-COOH
#25	NH ₂ -WRKKW <u>M</u> W-COOH
#26	NH ₂ -WRKKW <u>P</u> W-COOH
#27	NH ₂ -WRKKW <u>T</u> W-COOH
#28	NH ₂ -WRKKW <u>V</u> W-COOH
#29	NH ₂ -WRKKW <u>W</u> W-COOH
#30	NH ₂ -WRKK <u>E</u> FW-COOH
#31	NH ₂ -WRKK <u>F</u> EW-COOH
#32	NH ₂ -WRKK <u>G</u> W-COOH
#33	NH ₂ -WRKK <u>H</u> W-COOH
#34	NH ₂ -WRKK <u>I</u> W-COOH
#35	NH ₂ -WRKK <u>M</u> W-COOH
#36	NH ₂ -WRKK <u>P</u> W-COOH
#37	NH ₂ -WRKK <u>T</u> W-COOH
#38	NH ₂ -WRKK <u>V</u> W-COOH
#39	NH ₂ -WRKK <u>W</u> W-COOH
#40	NH₂-WRKK<u>R</u>FW-COOH
#41	NH ₂ -WRKK <u>E</u> W-COOH
#42	NH ₂ -WRKK <u>G</u> W-COOH
#43	NH ₂ -WRKK <u>H</u> W-COOH
#44	NH ₂ -WRKK <u>I</u> W-COOH
#45	NH ₂ -WRKK <u>M</u> W-COOH
#46	NH ₂ -WRKK <u>P</u> W-COOH
#47	NH₂-WRKK<u>R</u>TW-COOH
#48	NH ₂ -WRKK <u>V</u> W-COOH
#49	NH ₂ -WRKK <u>W</u> W-COOH

Residues differential to those of heptapeptide PAF104 are underlined. Peptides selected for further studies are in bold letter.

In vitro antifungal activities of the peptides were determined using a microtiter plate assay as previously described [19,20]. The assay mixture contained 2.5 \times 10⁴ conidia/ml in a final volume of 100 μ L of PDB (Potato Dextrose Broth, Difco, Detroit, USA) diluted one half (50% PDB) or one fifth (20% PDB) for *M. oryzae* or *F. proliferatum*, respectively. Peptides were added in a 10 μ L volume from a 10 \times peptide solution to reach different final concentrations. The assay mixture contained 30 μ g/ml chloramphenicol per well to avoid bacterial contamination. 96-well plates were incubated at 25 °C and growth was determined by measuring optical density (OD) at 492 nm in a SpectraMax M13 (Molecular Devices, CA, USA) microplate reader at different times. In all the experiments, three replicates were prepared and the mean and standard deviation (SD) were calculated for each treatment.

A solution killing assay was performed to determine survival of the bacterium *E. coli* after peptide treatment. Bacterium in exponential phase growth was suspended to 10⁶ cells/ml in 20% LB, different concentrations of peptides were added and samples were incubated at 37 °C. At different incubation times, serial 10-fold dilutions of cells were prepared and aliquots of 10 μ L of each sample were dotted on peptide-free LB agar plates to determine viability.

3. Results and discussion

3.1. Screening of a PS-SCL for inhibition of appressorium formation in *M. oryzae*

The PS-SCL represent 47 millions of peptides and consisted of six sub-libraries as previously described [7,20]. Each sub-library

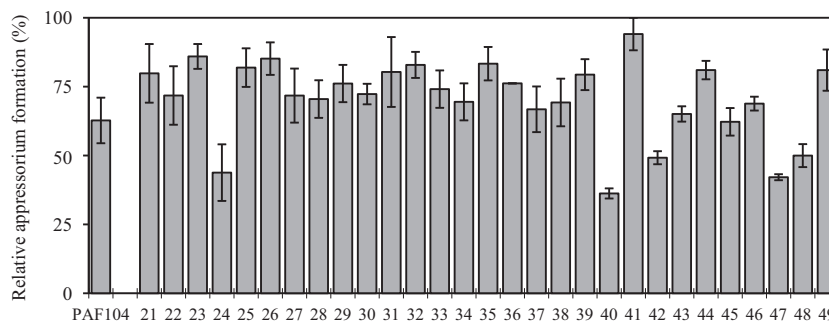


Fig. 1. Effect of the peptides labeled in the x-axis on the *in vitro* appressorium formation in *M. oryzae* on a hydrophobic surface. The panel shows the mean relative appressorium formation \pm SD after 6 h of treatment with 10 μ M of peptide.

is composed of 19 complex mixtures, each one specifying one of the natural amino acids (except cysteine) at each one of the peptide position. The assay of the peptide mixtures provides information about the most important amino acid residue at each position of the peptide. In this work, the PS-SCL was tested for the *in vitro* inhibition of appressorium formation in *M. oryzae* (Fig. S1). Clear differences were observed between the different mixtures that composed each sub-library, suggesting that inhibitory activity is due to individual peptide(s) present in the mixture.

The so-called deconvolution process of the library consisted in selecting the putative relevant amino acid residues for each position. In our case, very similar (and significant) activities were observed between mixtures within position 3, indicating that no clear-cut assignment could be made at this position of the peptide. Based on the data from the screening of the PS-SCL at both concentrations 0.5 mg/ml (Fig. S1) and 1 mg/ml (data not shown), the initially selected residues for the other positions were: glutamic acid, asparagine and arginine at position 1; arginine at position 2; alanine, phenylalanine, and arginine at position 4; glutamic acid, glycine, histidine, methionine, proline, threonine, valine and tryptophan at position 5; and alanine and glutamic acid at position 6 (colored in black in Fig. S1).

3.2. Selection of sequence-defined peptides and assay of their appressorium inhibitory activity

We have previously characterized a synthetic heptapeptide (WRKKWFW, PAF104) that reduced the appressorium formation in *M. oryzae* [17]. PAF104 was identified as a derivative sequence of the lead hexapeptide PAF26 (RKKWFW) [18] which was previously identified by the screening against the growth of the filamentous fungus *P. digitatum* of the same PS-SCL used in this study [7]. Considering the amino acid sequence of these peptides, we used the data from the screening of the PS-SCL (Fig. S1) to rationally design a set of 29 heptapeptides that are derived from the PAF104 sequence (Table 1).

Unexpectedly, the mixtures corresponding to tryptophan at position 4 and phenylalanine at position 5 (Fig. S1) (numbering as in PAF26, which correspond to positions 5 and 6 of PAF104, see Table 1) showed only a limited inhibition of appressorium formation at the lowest concentration used (i.e. 0.5 mg/ml). This discrepancy is likely related to the different activities that were assayed in the screening of the PS-SCL: inhibition of fungal growth to identify PAF26/PAF104 [7,18] versus inhibition of appressorium formation (this work). Thus, these positions were combinatorialized, whereas the other five positions 1, 2, 3, 4, and 7 were conserved in the primary structure of PAF104, due to the promising inhibitory activity on appressorium formation of this heptapeptide [17]. Residues selected for substitutions have chemical properties representative of the active mixtures. The residues used in position

5 were phenylalanine (as hydrophobic amino acid) and arginine (as positively charged), that correspond to two of the three most active peptide mixtures at position 4 of the combinatorial library (Fig. S1). For position 6, the residues selected were isoleucine, methionine, proline and valine (as hydrophobic amino acids), histidine, threonine and tryptophan (as polar amino acids), glutamic acid (as negatively charged) and glycine (due to its high activity in position 5 of the combinatorial library). As a result of our focused deconvolution process, we selected 29 heptapeptide sequences with potential inhibitory activity of appressorium formation (Table 1, numbered #21 to #49). The peptides are divided in three series depending of the residue used in position 5 of PAF104: tryptophan (from #21 to #29), phenylalanine (from 130 to #39) and arginine (from #40 to #49).

The set of 29 individual peptides (Table 1) were assayed against the appressorium formation of *M. oryzae* on a hydrophobic surface and PAF104 was used as a reference control (Fig. 1). From this screening, we selected the peptides #24, #40 and #47 (called MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47 from now on) with improved inhibitory activity on the appressorium formation of *M. oryzae* than PAF104.

3.3. Comparative appressorium inhibition activities of selected peptides with PAF104

Firstly, we evaluated the effect of different concentrations of the selected peptides MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47, in comparison with PAF104, at an initial stage of the appressorium formation, i.e. 6 h after conidia germination when the appressorium is differentiated from the tip of the germ tube. We observed a reduction of appressorium formation that correlated with an increase of peptide concentration for all the peptides tested (Fig. 2), as previously

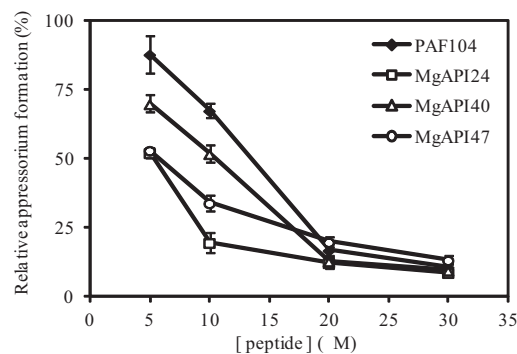


Fig. 2. Relative appressorium formation in *M. oryzae* after 6 h of incubation with different concentrations of PAF104 (black diamond), MgAPI24 (white square), MgAPI40 (white triangle) or MgAPI47 (white circle). Results are shown as mean values \pm SD of one representative experiment from at least three experiments with similar results.

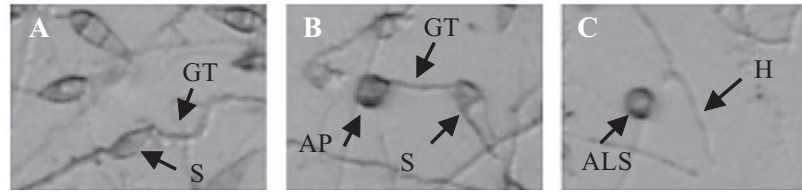


Fig. 3. Microscopic visualization of the morphologically distinct structures of *M. oryzae* observed after incubation 24 h on hydrophobic surfaces: germinated spore (A), melanized appressoria formed at the tip of germ tubes (B), and appressorium-like structures at hyphal tips (C). Arrows point to (S) spores, (GT) germ tubes, (AP) appressoria and (ALS) appressorium-like structures.

published for PAF104 [17]. At low concentration of peptides (5 μ M and 10 μ M), the novel peptides showed an improved activity over PAF104, thus fulfilling one of the objectives of the present study.

To characterize the appressorium blocking activity in more detail, we studied the inhibitory activity of the selected peptides at a later stage when the mature appressorium is already formed. At this stage, careful visualization of microscopic images showed morphologically distinct structures after 24 h inoculation of conidia on hydrophobic surface: spores that are able to germinate but not to form appressoria, appressoria from germ tubes, and appressorium-like structures at hyphal tips (Fig. 3). As previously reported, in addition of melanized appressoria formed at the tip of germ tubes (AP), *M. oryzae* is able to develop appressorium-like

structures at hyphal tips (ALS) [21,22]. In this work, all these structures were observed after 24 h incubation of *M. oryzae* in the absence or presence of the four peptides (PAF104, MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47). At first sight, all peptides reduce the amount of AP formed although increase the number of ALS structures observed. Therefore, both structures (AP and ALS) were quantified separately in samples treated with different concentrations of peptides PAF104, MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47 (Fig. 4 and Table S1). Our data show that all peptides have a similar inhibitory profile at this maturation stage. At increasing concentration of peptides, we observed a clear reduction on the amount of mature AP developed from germ tube. However, peptide treatment induced the formation of ALS from hyphal tips. For example, after 24 h

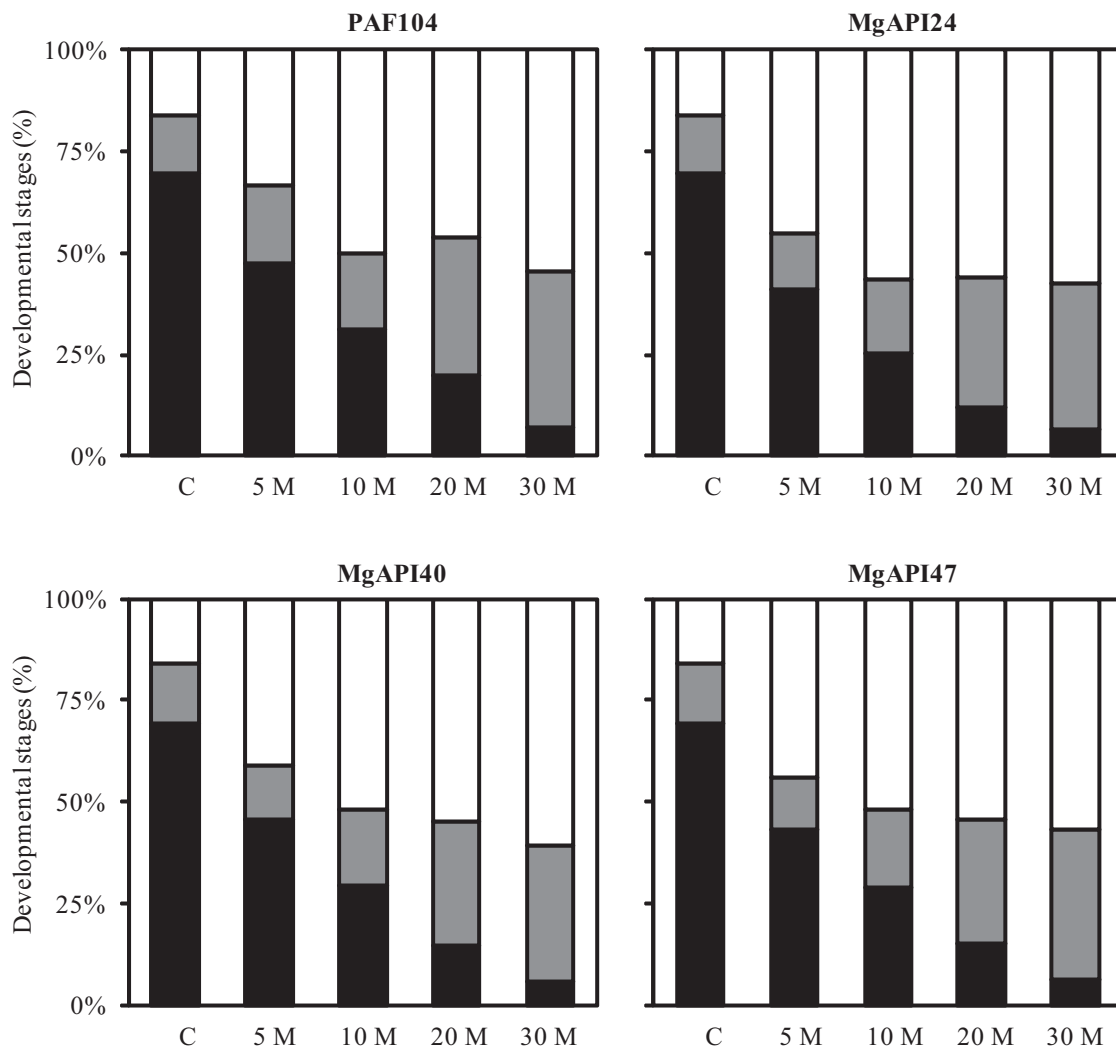


Fig. 4. Quantification of different developmental stages after 24 h incubation of *M. oryzae* on a hydrophobic surface in the absence (C) or presence of increasing concentrations of PAF104, MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47. The developmental stages are appressoria (black), appressorium-like structures (gray) and germinated spore (white).

Table 2Percentage of growth of *F. proliferatum* treated with peptides.

		% Growth ^a		
		24 h	48 h	72 h
PAF104	50 μ M	63.1 \pm 25.9	73.9 \pm 21.0	88.6 \pm 19.8
	75 μ M	5.1 \pm 1.9	49.4 \pm 1.7	86.1 \pm 11.7
MgAPI24	50 μ M	105.5 \pm 13.2	103.0 \pm 15.5	108.5 \pm 16.8
	75 μ M	6.7 \pm 2.4	12.5 \pm 0.1	56.0 \pm 2.1
MgAPI40	50 μ M	35.7 \pm 8.9	60.3 \pm 4.8	82.2 \pm 4.6
	75 μ M	3.6 \pm 2.0	52.6 \pm 4.0	95.8 \pm 4.7
MgAPI47	50 μ M	137.3 \pm 9.1	103.0 \pm 15.5	108.5 \pm 16.8
	75 μ M	49.7 \pm 11.1	67.3 \pm 5.7	88.7 \pm 2.0

^a Data are shown as mean values \pm SD from one representative experiment with three replicates.

treatment with 30 μ M of peptides, around 6% and 36% of conidia develop AP and ALS, respectively, compared with 69.5% and 14.4% of AP and ALS formed without peptide treatment. Our data show a differential effect on AP and ALS, supporting previous evidences that the formation of both developmental structures involve different molecular mechanisms [21].

We have previously published that PAF104 reduced the pathogenicity of *M. oryzae* on rice although it was not able to completely block appressoria *in vitro* [17]. One possible explanation is the formation of non-functional appressorium structures. As reported, the ALS structures are less efficient than mature AP in penetration of barley leaves [21]. Our present results regarding the reduction of AP and induction of ALS after peptide treatment support this possible explanation.

3.4. Growth inhibition activity profiles of heptapeptides

The previous assays based on the 24 h incubation of fungus with peptides indicated no inhibition on conidial germination and mycelial growth, as previously published for PAF104 [17]. To further confirm this, the number of germinated conidia was quantified after peptide treatment and compared with that of control treatment; for example, the percentage of germinated conidia was 91.6 \pm 0.8 for sample treated with 20 μ M MgAPI24 versus 92.7 \pm 0.6 for control. Our data showed that conidial germination remained unaffected at concentrations at which appressorium inhibition was observed.

In addition, we tested the effect of different concentrations of peptides on the mycelia growth of *M. oryzae* and another filamentous fungus *F. proliferatum*. In these assays, no or very limited inhibition activity against *M. oryzae* and *F. proliferatum* was observed for the different peptides tested, even at the maximum peptide concentration used (Fig. S2 and Table 2). Looking in more detail, we only observed limited growth inhibition of *F. proliferatum* after 24 h of incubation at 75 μ M of peptides (Table 2). However, the effect of peptides on the fungal growth was negligible at longer incubation times (until 72 h), with the unique exception of MgAPI24. MgAPI24 was the peptide showing higher antifungal activity against *F. proliferatum* along the time; after 72 h incubation with 75 μ M of MgAPI24, the fungus was able to grow around 50% relative to growth in absence of peptide.

The antimicrobial activity of peptides was also determined against the bacterium *E. coli*. Similarly, a limited effect was observed on bacterial growth after short incubation time (2 h) for peptides PAF104 and MgAPI24 at 75 μ M although no inhibition activity was observed at longer incubation time (4 h) (Fig. S3).

Finally, it would be very important to reinforce the specific effect of the selected peptides on the appressorium formation. All the four peptides (PAF104, MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47) have limited inhibitory potency of the growth of the microorganisms

tested. Due to their lower antimicrobial activity, our studies advice selection of MgAPI47, over PAF104, MgAPI24 and MgAPI40, as promising compound to control rice blast disease by specifically blocking appressorium formation and without toxicity to non-target organisms.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Coca and Dr. B. San Segundo for their helpful comments during the course of this investigation. *M. oryzae* PR9 isolate was kindly provided by Dr. Tharreau from CIRAD, Montpellier, France. This work was supported by grant AGL2010-16847 and BIO2012-34381 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Spain).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.145>.

References

- [1] K.J. Brent, D.W. Hollomon, Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed? FRAC Monograph No. 1, second revised ed., Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium, 2007.
- [2] P.P. Reddy, Recent advances in crop protection, Springer, India, 2013.
- [3] B. López-García, B. San Segundo, M. Coca, Antimicrobial peptides as a promising alternative for plant disease protection, in: K. Rajasekaran, J.W. Cary, J.M. Jaynes, E. Montesinos (Eds.), Small Wonders: Peptides for Disease Control, American Chemical Society, Washington, DC, 2012, pp. 263–294.
- [4] J.F. Marcos, A. Muñoz, E. Pérez-Payá, S. Misra, B. López-García, Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection, *Annu. Rev. Phytopathol.* 46 (2008) 273–301.
- [5] E. Montesinos, E. Badosa, J. Cabrefiga, M. Planas, L. Feliu, E. Bardaji, Antimicrobial peptides for plant disease control. From discovery to application, in: K. Rajasekaran, J.W. Cary, J.M. Jaynes, E. Montesinos (Eds.), Small Wonders: Peptides for Disease Control, American Chemical Society, Washington, DC, 2012, pp. 235–261.
- [6] S.E. Blondelle, C. Pinilla, C. Boggiano, Synthetic combinatorial libraries as an alternative strategy for the development of novel treatments for infectious diseases, in: G.A. Morales, B.A. Bunin (Eds.), Methods in Enzymology: Combinatorial Chemistry, Part B, Academic Press, San Diego, 2003, pp. 322–344.
- [7] B. López-García, E. Pérez-Payá, J.F. Marcos, Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 2453–2460.
- [8] J.D. Reed, D.L. Edwards, C.F. Gonzalez, Synthetic peptide combinatorial libraries: a method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi, *Mol. Plant Microbe Interact.* 10 (1997) 537–549.
- [9] S.L. Bishop-Hurley, S.A. Mounter, J. Laskey, R.O. Morris, J. Elder, P. Roop, C. Rouse, F.J. Schmidt, J.T. English, Phage-displayed peptides as developmental agonists for *Phytophthora capsici* zoospores, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3315–3320.
- [10] H.Y. Park, H.C. Park, M.Y. Yoon, Screening for peptides binding on *Phytophthora capsici* extracts by phage display, *J. Microbiol. Methods* 78 (2009) 54–58.
- [11] C. Rudolph, P.H. Schreier, J.F. Uhrig, Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 4429–4434.

- [12] R.A. Wilson, N.J. Talbot, Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*, *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (2009) 185–195.
- [13] L.P. Hamel, M.C. Nicole, S. Duplessis, B.E. Ellis, Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers, *Plant Cell* 24 (2012) 1327–1351.
- [14] D.J. Ebbole, *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions, *Annu. Rev. Phytopathol.* 45 (2007) 437–456.
- [15] J.R. Xu, J.E. Hamer, MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, *Genes Dev.* 10 (1996) 2696–2706.
- [16] X. Zhao, Y. Kim, G. Park, J.R. Xu, A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*, *Plant Cell* 17 (2005) 1317–1329.
- [17] A. Rebollar, B. López-García, PAF104, a synthetic peptide to control the rice blast disease by blocking the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 26 (2013) 1407–1416.
- [18] A. Muñoz, B. López-García, E. Pérez-Payá, J.F. Marcos, Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2007) 172–177.
- [19] B. López-García, M. Hernández, B. San, Segundo, Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens, *Lett. Appl. Microbiol.* 55 (2012) 62–67.
- [20] B. López-García, W. Ubhayasekera, R.L. Gallo, J.F. Marcos, Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 107–113.
- [21] L.A. Kong, G.T. Li, Y. Liu, M.G. Liu, S.J. Zhang, J. Yang, X.Y. Zhou, Y.L. Peng, J.R. Xu, Differences between appressoria formed by germ tubes and appressorium-like structures developed by hyphal tips in *Magnaporthe oryzae*, *Fungal Genet. Biol.* 56 (2013) 33–41.
- [22] W. Liu, S. Xie, X. Zhao, X. Chen, W. Zheng, G. Lu, J.R. Xu, Z. Wang, A homeobox gene is essential for conidiogenesis of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 23 (2010) 366–375.

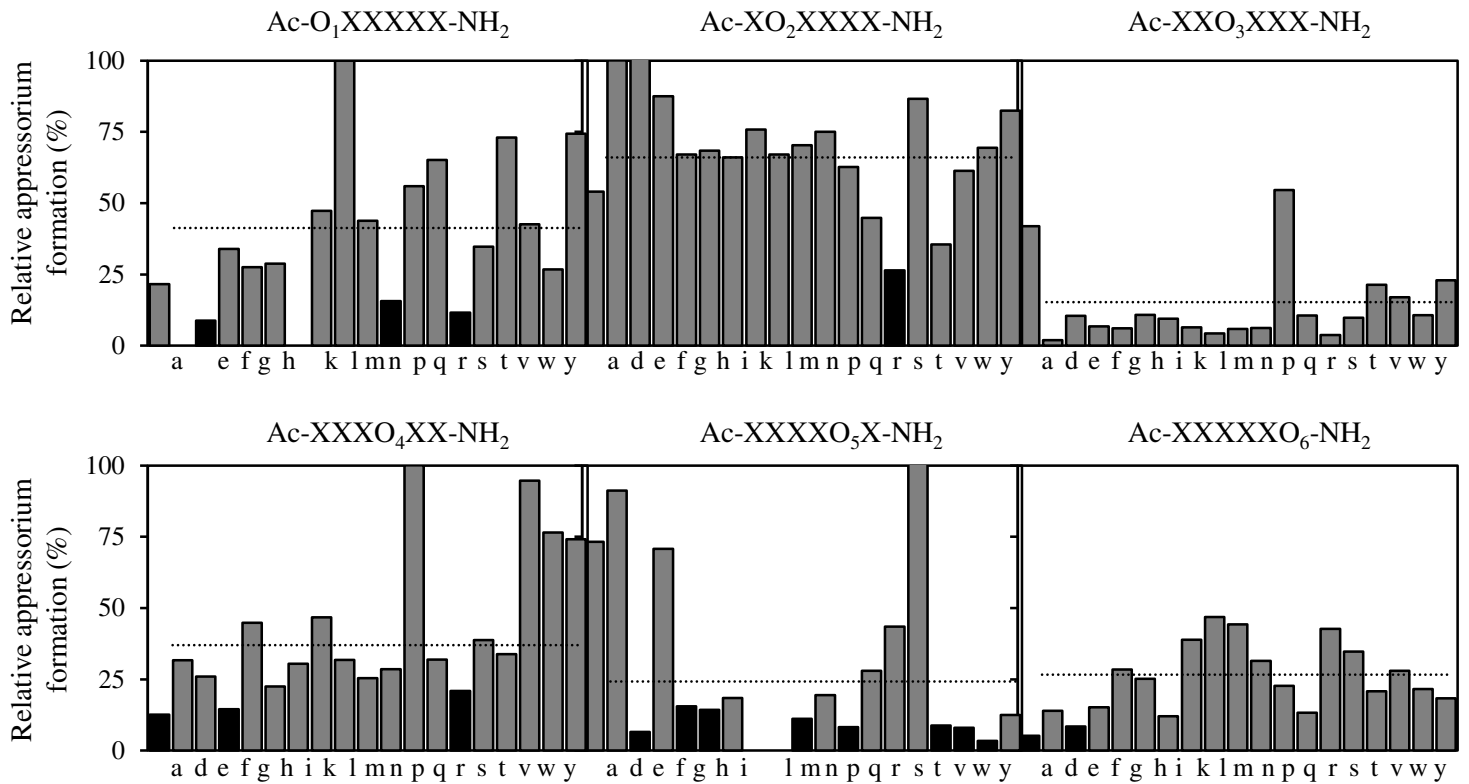


Figure S1. Activity of the synthetic combinatorial library on the *in vitro* appressorium formation in *M. oryzae* on a hydrophobic surface. Each graph represents the activity of each sub-library wherein each position of the peptide is defined by the D-amino acid labelled on the x-axis. Appressorium formation was visualized after 6h of incubation with each peptide mixture at 0.5 mg/ml of final concentrations. Results are shown as the percentage of appressorium observed relative to the appressorium formed in the absence of peptide considered as 100%. The dotted line within each graph represents the average of the activities of mixtures showing more than 10% inhibition at 0.5 mg/ml.

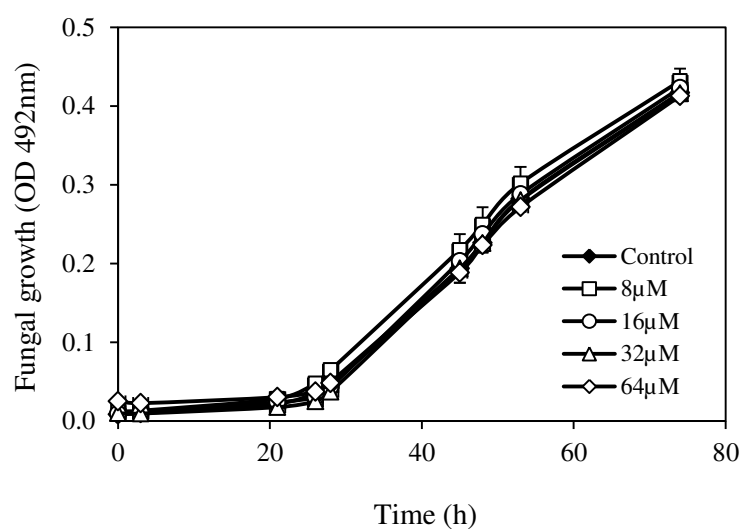


Figure S2. Effect of different concentrations of MgAPI24 on the *in vitro* growth of *M. oryzae* PR9 in 50% PDB liquid medium. Results are shown as mean values of optical density (OD) at 402 nm \pm SD over time (in hours) for control samples in the absence (black diamond) and presence of 8 μ M (white square), 16 μ M (white circle), 32 μ M (white triangle), and 64 μ M (white diamonds) of peptide.

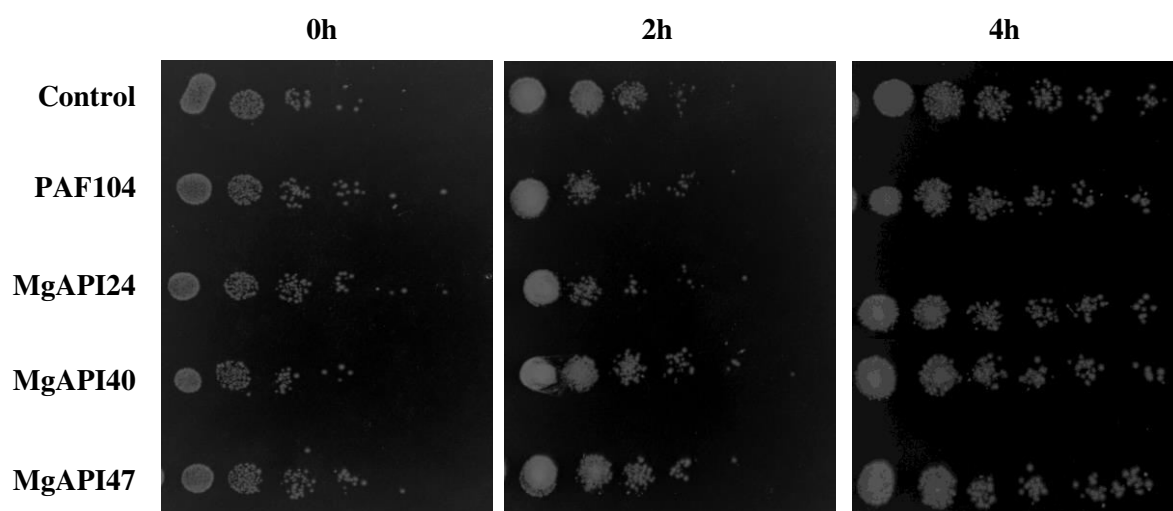


Figure S3. Effect of peptides PAF104, MgAPI24, MgAPI40 and MgAPI47 on the viability of *E. coli*. Shown results correspond to 10 μ l drops of serial 10-fold dilutions of cells previously treated with 75 μ M of each peptide for 0h, 2h and 4h of incubation.

Table S1. Effects of different treatments on development of appressoria (AP) and appressorium-like structures (ALS) by the *M. oryzae* PR9 strain.

		Percentage of different developmental stages (%)		
		Appressoria (AP)	Appressorium-like structures (ALS)	Germinated spores
Control		69.5 ± 1.5	14.4 ± 0.4	16.2 ± 1.2
PAF104	5 µM	47.3 ± 1.0	19.0 ± 3.3	33.6 ± 2.6
	10 µM	31.3 ± 2.0	18.8 ± 2.9	49.9 ± 1.9
	20 µM	14.9 ± 1.5	40.5 ± 2.8	44.6 ± 1.3
	30 µM	7.1 ± 1.6	38.4 ± 3.1	54.5 ± 2.0
MgAPI24	5 µM	41.2 ± 1.9	13.4 ± 2.6	45.3 ± 4.4
	10 µM	25.3 ± 0.6	18.2 ± 0.6	56.6 ± 1.3
	20 µM	12.1 ± 1.3	31.7 ± 1.3	56.2 ± 0.8
	30 µM	6.4 ± 2.0	36.1 ± 1.8	57.5 ± 3.0
MgAPI40	5 µM	45.7 ± 3.0	13.4 ± 2.5	40.9 ± 3.0
	10 µM	29.6 ± 3.0	18.4 ± 2.5	52.0 ± 4.0
	20 µM	14.9 ± 1.0	30.2 ± 2.6	54.9 ± 2.9
	30 µM	5.7 ± 1.2	33.8 ± 0.4	60.5 ± 1.5
MgAPI47	5 µM	43.4 ± 1.6	12.6 ± 2.0	44.0 ± 3.7
	10 µM	28.9 ± 2.5	19.3 ± 0.8	51.8 ± 1.7
	20 µM	15.0 ± 1.4	30.9 ± 0.5	54.1 ± 1.4
	30 µM	6.3 ± 2.1	36.7 ± 2.0	57.0 ± 1.2

Data are shown as mean values ± SD from one representative experiment with three replicates.

Capítulo 3

Un nuevo péptido derivado de la Cecropina A
actúa como inhibidor específico del apresorio en
Magnaporthe oryzae

Resumen

Magnaporthe oryzae causa importantes pérdidas en todo el mundo y es considerado uno de los patógenos de arroz más dañinos. La búsqueda de un nuevo tipo de compuestos antifúngicos se centra en su especificidad y en la desaparición de la toxicidad cruzada con otras especies. En este trabajo hemos caracterizado la actividad en el bloqueo de la formación de apresorio en *M. oryzae* por parte del péptido antimicrobiano natural Cecropina A y su derivado MgAPI16. Estos péptidos son capaces de controlar el desarrollo de la piriculariosis en plantas de arroz. Varias evidencias indican que ambos péptidos presentan diferentes modos de acción. La adición de distintos inductores de la formación de apresorio previamente descritos interfiere con el efecto inhibitorio de MgAPI16 pero no así con el de la Cecropina A. Además, MgAPI16 muestra una alta especificidad inhibiendo la formación de apresorio sin ejercer un efecto lítico sobre las membranas biológicas. Mediante microscopía confocal de fluorescencia, hemos observado, que MgAPI16 se une preferentemente al tubo germinal y el apresorio, causando la formación de estructuras aberrantes no funcionales. Los resultados de este trabajo sugieren que MgAPI16 bloquea específicamente la formación de apresorio y podría ser un compuesto prometedor con potencial aplicación para el control de la enfermedad de la piriculariosis del arroz.

Trabajo enviado para su publicación a *Phytopathology* en Abril 2015

Rebollar A. and López-García B.

A novel Cecropin A-derived peptide as specific inhibitor of appressoria in *Magnaporthe oryzae*

Phytopathology

A novel Cecropin A-derived peptide as specific inhibitor of appressoria in *Magnaporthe oryzae*

Journal:	<i>Phytopathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rebollar, Aarón; Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Department of Molecular Genetic Lopez Garcia, Belen; Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Department of Molecular Genetic
Keywords:	Disease control and pest management

ABSTRACT

Magnaporthe oryzae causes crop losses around the world and is considered one of the most harmful pathogens in rice. The search for new type of antifungal compounds focuses on specificity in order to avoid toxicity to non-target species. In this work, we have characterized the activity of blocking appressorium formation in *M. oryzae* by the natural antimicrobial peptide Cecropin A and its derived peptide MgAPI16. These peptides are able to control the development of blast disease in rice plants. Several evidences indicate the different mode of action of both peptides. Addition of described appressorium formation inductors interferes with the inhibitory effect of MgAPI16 but not with Cecropin A. Moreover, antimicrobial activity assays showed a weak or no toxicity of MgAPI16 against bacteria and fungi indicating high specificity inhibiting the appressorium formation. By fluorescence confocal microscopy, we observed a preferential binding of MgAPI16 to germinal tubes and appressoria causing the formation of aberrant non-functional appressorium structures. Based on our results, MgAPI16 is proposed as a target-orientated peptide that specifically blocks appressorium formation and control rice blast disease, being a promising compound with potential application in plant protection.

Keywords: rice blast, appressorium, *Oryza sativa*

INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa*) is an important crop in the world and staple food for many countries. One of the major declines in rice production is the blast disease caused by the fungus *Magnaporthe oryzae* (Wilson and Talbot 2009). Different strategies are required for rice blast management, such as cultural strategies for prevention, resistant varieties, biological control, and chemical fungicides (Wang and Valent 2009). But even with the integration of these techniques rice blast disease is still difficult to control, largely because *M. oryzae* presents a high pathogenic variability and a large number of fungal races (Ebbole 2007, Maciel et al. 2013, Park et al. 2008). Nowadays, the use of some chemical fungicides is being restricted due the long-terms repercussions in environment and human health. The legislation on the use of fungicides is becoming more restricted; many chemical fungicides are being reviewed for safety and efficacy and some of them may be deregistered as dangerous to humans or the environment (U.S. Environmental Protection Agency, The Center for Health and Wellness, European Food Safety Authority websites).

An obligatory feature of novel low risk fungicides is pathogen specificity, which will avoid unspecific toxicity and prevents undesirable effects on the environment. More pathogen-specific fungicides could be identified by the screening for molecules which specifically block infection-related processes such as the appressorium formation, an essential developmental stage in the pre-penetration phase of some phytopathogenic fungi. Appressorium development in *M. oryzae* is a complex morphogenetic process regulated by multiple external signals (surface hydrophobicity, hardness, cutin monomers, and leaf waxes), and different transduction pathways (Pmk1 and Mps1 MAPK and cAMP-dependent signaling pathways) (Hamel et al. 2012, Lengeler et al. 2000, Wilson and Talbot 2009). In previous works, we have identified small synthetic peptides able to control rice blast disease by blocking the appressorium formation in *M. oryzae* (Rebollar and López-García 2013, Rebollar et al. 2014). The proposed mode of action for one of these peptides, PAF104, is affecting the Pmk1 pathway by repression of the gene expression of *MoMSB2*, which encodes a sensing surface protein, and the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase *MST11* (Rebollar and López-García 2013). Our previous results further support the hypothesis that peptides blocking a specific target have lower unspecific toxicity and suggest that the application of target-oriented antifungal compounds might be an environmentally sustainable strategy for plant protection.

One promising alternative to the classic chemical fungicides are antimicrobial peptides (AMPs), peptides broadly distributed in nature as innate defense molecules in all organisms (Brogden et al. 2003, López-García et al. 2012, Zasloff 2002). The first family of antibacterial peptides clearly related

to a bacteria-induced immunity in animals were cecropins in insects (Steiner et al. 1981). Cecropin A (CecA) is a linear and cationic peptide isolated from the hemolymph of *Hyalophora cecropia* which antimicrobial activity has been extensively reported against numerous pathogenic bacteria and fungi (De Lucca et al. 1997, Giacometti et al. 2003, Lee et al. 2015, Steiner et al. 1981). Moreover, several reports have shown that the transgenic expression of genes encoding CecA enhance pathogenic resistance in plants (Bundó et al. 2014, Coca et al. 2006).

The fact that CecA display cytotoxic activity against a wide range of microorganisms suggests the lack of specificity of this peptide. An approach to identify more pathogen-specific peptides is the modification of known AMP sequences by residue substitution and/or reduction of size (Cavallarín et al. 1998, Ferre et al. 2006, López-García et al. 2007, Marcos et al. 2012). This rational design allows us to obtain new peptides with the favorable characteristics of the natural peptide but avoiding undesirable secondary effects.

In this work, we have identified a synthetic CecA-derived peptide called MgAPI16 with ability to control rice blast diseases by specifically blocking the appressorium formation of *M. oryzae*. Moreover, the effect of this target-oriented peptide has been deeply studied and compared with the lead peptide CecA.

MATERIALS AND METHODS

Microbial strains.

M. oryzae isolate PR9 (kindly provided by Dr. Tharreau, CIRAD, Montpellier, France) was grown on complete medium at 25°C under 16h/8h (light/dark) photoperiod for 11-13 days as previously described (Rebollar et al. 2014). A fungal strain of *Fusarium proliferatum* isolated from rice was cultured in potato dextrose agar (PDA) plates at 25°C for 7 days. The laboratory strain of *Escherichia coli* (DH5α) was grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C to exponential phase.

Synthetic peptides.

Peptides (Table 1) were purchased at >90% purity (GenScript, USA). Peptide MgAPI16 was also synthesized labeled with tetramethyl-rhodamine at the N terminus (TMR-MgAPI16). Peptide solutions were prepared in sterile milliQ-water at the appropriate concentration.

Appressorium formation assay.

Development of *M. oryzae* appressoria was monitored by microscopic examination as previously described (Rebollar and López-García 2013). Briefly, 8 µl-drops of a conidial suspension adjust to 5×10^5 conidia/mL and 2 µl of 5x peptide solutions (or sterile water as control) were placed on a hydrophobic surface. Pictures of 5 random fields of every drop were taken with an Olympus Stereoscope microscope SZX16 after 6h and 24h of incubation and the percentage of appressorium was determined by microscopic examination for at least 100 conidia per replicate. The data were shown as the relative percentage of appressorium formed after peptide treatment compared to the appressoria formed in control samples without peptide. At least three independent experiments were carried out.

To evaluate the effect of appressorium development inductors on the inhibitory activity of the peptides, 2.4 mM cAMP (Sigma-Aldrich) or 10 µM 1,16-hexadecanediol (Sigma-Aldrich) were added in determined assays. For that, we used cell-treated polystyrene plates as hydrophilic surface.

Growth inhibition assay.

In vitro antifungal activity of the peptides was determined using a microtiter plate assay as previously described (Rebollar et al. 2014). Fungus at 2.5×10^4 conidia/ml was grown in a 96-well plate in a final volume of 100 µl of 50% PDB with 10 µl of a 10x peptide solution (or sterile milliQ-water as a control for fungal growth). The plate was incubated at 28°C, and fungal growth was determined by measuring optical density (OD) at 492nm in a SpectraMax M13 (Molecular Devices, USA) microplate reader. For bacteria, 10^5 cells/ml were grown in 20% LB medium for 6h at 37°C and bacterial growth was determined by measuring OD at 590nm. In each antimicrobial experiment, the mean and standard deviation (SD) of three replicates were calculated for each treatment and were repeated at least three times.

***In vivo* plant infection assays.**

For these experiments, the commercial *japonica* rice cultivar Senia was used. Three weeks-old plants were sprayed with 1 ml of 10^5 conidia/ml suspension of *M. oryzae* PR9 with 0,5% Tween20 (Sigma-Aldrich) and 20 µM final concentration of the appropriate peptide (or sterile miliQ-water for the control).

Plants were kept in high-humidity conditions into a plastic bag for 24h, then were released to a normal atmosphere and maintained at 28°C with 80% humidity and 16h/8h (light/dark) photoperiod. Pictures were taken 7 days post-infection with a Nikon camera D7000 and lesion areas were quantified by image analysis software Assess v.2.0.

Interaction peptide-fungi assay.

To characterize the interaction of the peptide MgAPI16 with fungal cells, a *M. oryzae* Guy11 isolate that constitutively produce the GFP protein was used (*gfp-M. oryzae*; kindly provided by Dr. Sesma). Fungus at 10^5 conidia/ml was treated with 10 μ M of labeled peptide (TMR-MgAPI16) in a polystyrene hydrophobic plate and incubated at 28°C in dark conditions. The appressorium formation stages were visualized at different times using Olympus FV1000 confocal laser scanning microscope (Tokyo, Japan), using excitation at 488 nm and emission at 505 to 530 nm for visualization of *gfp-M. oryzae* and excitation at 543 nm and emission at 575 nm for TMR-MgAPI16.

RESULTS

In vitro inhibition of appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* by CecA and its derived peptide MgAPI16.

Firstly, the effect of the antimicrobial peptide CecA on the *M. oryzae* appressorium formation *in vitro* was evaluated. Incubation of the fungus with the peptide in a hydrophobic surface for 6h revealed that there was a negative concentration-dependent effect in the appressorium formation (Fig. 1A). Control conditions allowed a percentage of appressorium formation of $85.5\% \pm 6.8$ (mean \pm SD), but the appressorium formation decreased significantly with 10 μ M of CecA ($36.4\% \pm 3.8$). Moreover, the relative appressorium formation at high concentration of the peptide (i.e. 30 μ M) was one tenth of the control values ($7.9\% \pm 0.2$).

Table 1. Amino acid sequences of the peptides used in this study

Peptide	Sequence
CecA	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK
#1 MgAPI16	KWKLFKKIEKVGQNIRDG
#2	GQNIRDGIIKAGPA
#3	GPAVAVVGQATQIAK

For further characterization, we evaluated the blocking activity of CecA after 24h incubation, when the mature appressorium is already formed. At this stage, in addition of melanized appressoria formed at the tip of germ tubes (AP), we observed that *M. oryzae* is able to develop appressorium-like structures at hyphal tips (ALS), as previously reported (Kong et al. 2013, Rebollar et al. 2014). Both structures (AP and ALS) were quantified after 24h incubation with different concentrations of CecA (Fig. 1B). Results show that the amount of mature AP decrease at increasing concentrations of peptide, in similar levels than when fungus was incubated in presence of CecA for 6h (Fig. 1A). However, ALS frequency slightly increases at higher CecA concentrations, i.e., 33.8%, 31.2% and

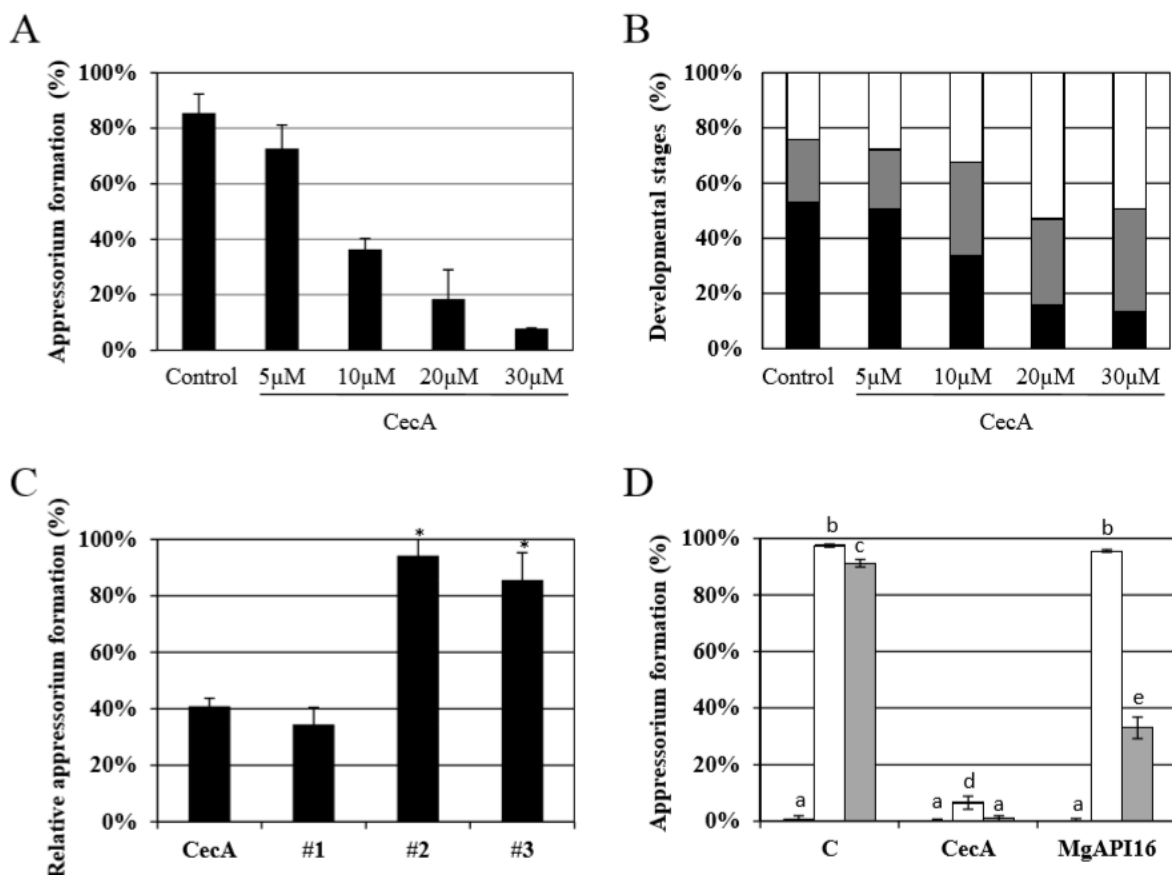


Fig. 1. Inhibitory activity of CecA and derived peptides on *Magnaporthe oryzae* PR9 appressorium formation. (A) Appressorium formation of fungi treated with increasing concentrations of CecA for 6h at 28°C. (B) Quantification of different fungal developmental stages after 24h incubation with increasing concentrations of CecA. The developmental stages are appressoria (black), appressorium-like structures (grey) and germinated spore (white). (C) Relative appressorium formation (referred to control condition considered as 100%) after 6h incubation with 10 µM of CecA and its derived peptides at 28°C. Asterisks denote statistically significant differences ($p < 0.01$, ANOVA). (D) Effect of two appressoria inducers on the inhibitory activity of CecA and MgAPI16. Conidia of *M. oryzae* PR9 were incubated alone (black), or with 2.4 mM cAMP (white) or 10 µM 1,16-hexadecanediol (grey) and in the absence or presence of 20 µM of each peptide on a hydrophilic surface for 6h at 28°C. Different letters denote statistically significant differences ($p < 0.01$, ANOVA).

36.9% of conidia are able to form ALS at 10 μ M, 20 μ M and 30 μ M, respectively, while only the 22.8% of conidia form ALS in control conditions.

In a further approach, three CecA-derived peptides were synthesized based on its primary structure (Table 1) and their effect on appressorium formation was compared with CecA (Fig. 1C). Peptides #2 and #3 barely reduce *M. oryzae* appressorium formation, but 10 μ M of peptide #1 performs equal or slightly better than the same concentration of CecA. This result supports the idea that appressorium inhibitory effect of CecA lays in the N-terminal site of the peptide. For further studies the peptide #1 was selected and renamed as MgAPI16.

Appressorium formation inductors overpass the inhibitory effect of MgAPI16

Some substances have been reported as *M. oryzae* appressorium formation inductors due their implication in one or more pathways involved on appressorium development, such as 1,16-hexadecanediol (a cutin monomer of the plants cell wall) and cAMP (a regulator of appressorium morphogenesis) (Wilson and Talbot 2009). We evaluated the effect of these inductors on the inhibitory activity of CecA and MgAPI16 on a hydrophilic surface (Fig. 1D). Hydrophobicity is one of most important signals sensed by the conidia to trigger the appressorium formation. Our results show that the fungus cannot form appressoria in hydrophilic conditions without the inductors. Otherwise *M. oryzae* treated with CecA is unable to form appressoria even if it is supplemented with exogenous inductors. This result is consistent with the mode of action of CecA, i.e. forming channels in the membrane (Christensen et al. 1988), killing the fungus and making it impossible to generate appressoria. However, fungus treated with the peptide MgAPI16 was capable to develop appressorium when is supplemented with cAMP (93.5%) or 1,16-hexadecanediol (47.6%). This assay points that MgAPI16 inhibitory effect is due to the interference with some cellular mechanism, which could be much more specific than the membrane rupture.

Application of CecA or MgAPI16 reduces the blast disease in rice plants.

An infection assay on *japonica* rice plants cv. Senia was developed to evaluate if *M. oryzae* treated with CecA or MgAPI16 is still able to infect rice plants. Fig. 2A shows representative leaves from the infected plants. Under the same experimental conditions, a clear reduction of the infection symptoms was observed when the fungus was treated with each peptide.

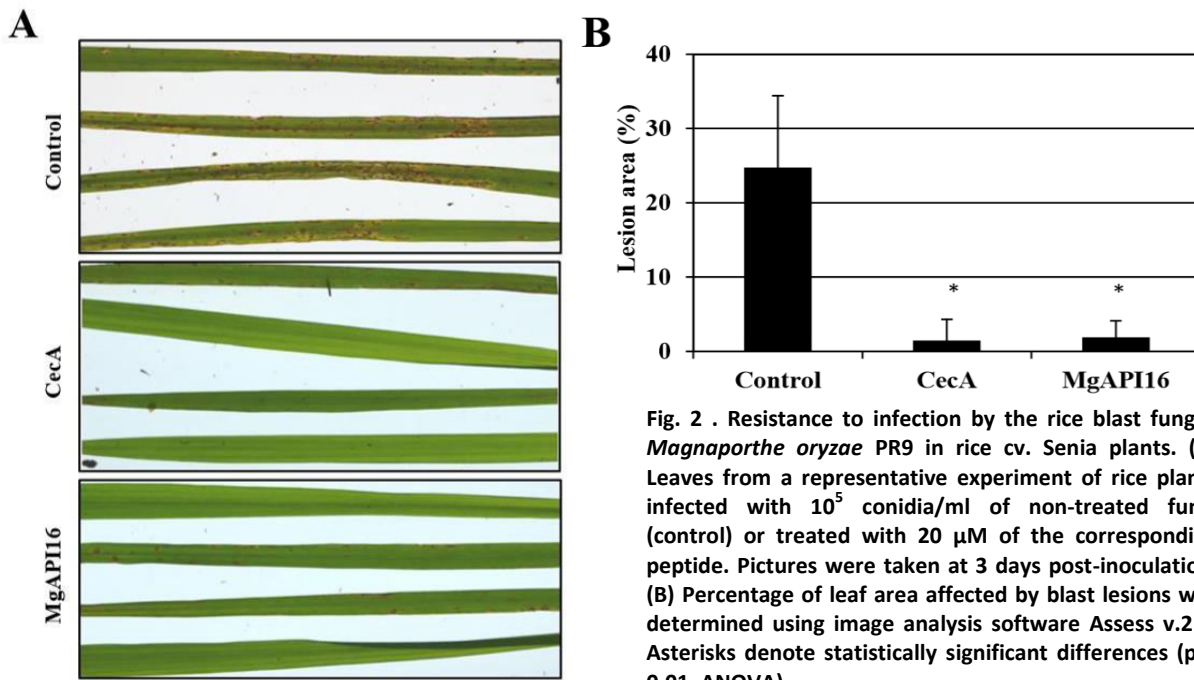


Fig. 2 . Resistance to infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* PR9 in rice cv. Senia plants. (A) Leaves from a representative experiment of rice plants infected with 10^5 conidia/ml of non-treated fungi (control) or treated with $20 \mu\text{M}$ of the corresponding peptide. Pictures were taken at 3 days post-inoculation. (B) Percentage of leaf area affected by blast lesions was determined using image analysis software Assess v.2.0. Asterisks denote statistically significant differences ($p < 0.01$, ANOVA).

Plant disease was also quantified by determining the percentage of the leaf area affected by blast lesions (Fig. 2B). In control conditions, the fungus infected around 25% of the leaf surface ($24.7\% \pm 9.6$) (mean \pm SD) at 7 days post-inoculation. However, CecA and MgAPI16 treatments significantly reduce the percentage of infected surface ($1.4\% \pm 2.8$ and $1.9\% \pm 2.2$ respectively) in agreement with eyesight perception. This result is consistent with our previous data of reduction of appressorium formation by the peptides *in vitro*, which prevent to start the infection. Our data also show that both peptides have similar efficacy inhibiting appressorium formation and controlling blast disease development.

Growth inhibitory activity profile of MgAPI16 and CecA

In order to characterize a specific target-oriented peptide which interferes with the appressorium formation in *M. oryzae*, the toxic effect of MgAPI16 was tested against two representative

microorganisms and compared with the antimicrobial activity of CecA (Fig. 3). Grown of *Escherichia coli* DH5 α isolate was measured after incubation with different concentrations of each peptide (from 0.5 μ M to 5 μ M) at 37°C (Fig. 3A). Results showed that bacterium is unable to grow at high concentrations of CecA (2 μ M and 5 μ M); even the lesser tested concentration, i.e. 0.5 μ M, lightly reduced the viability of the bacterium. By contrast, MgAPI16 seems harmless to the bacterium even at high concentrations.

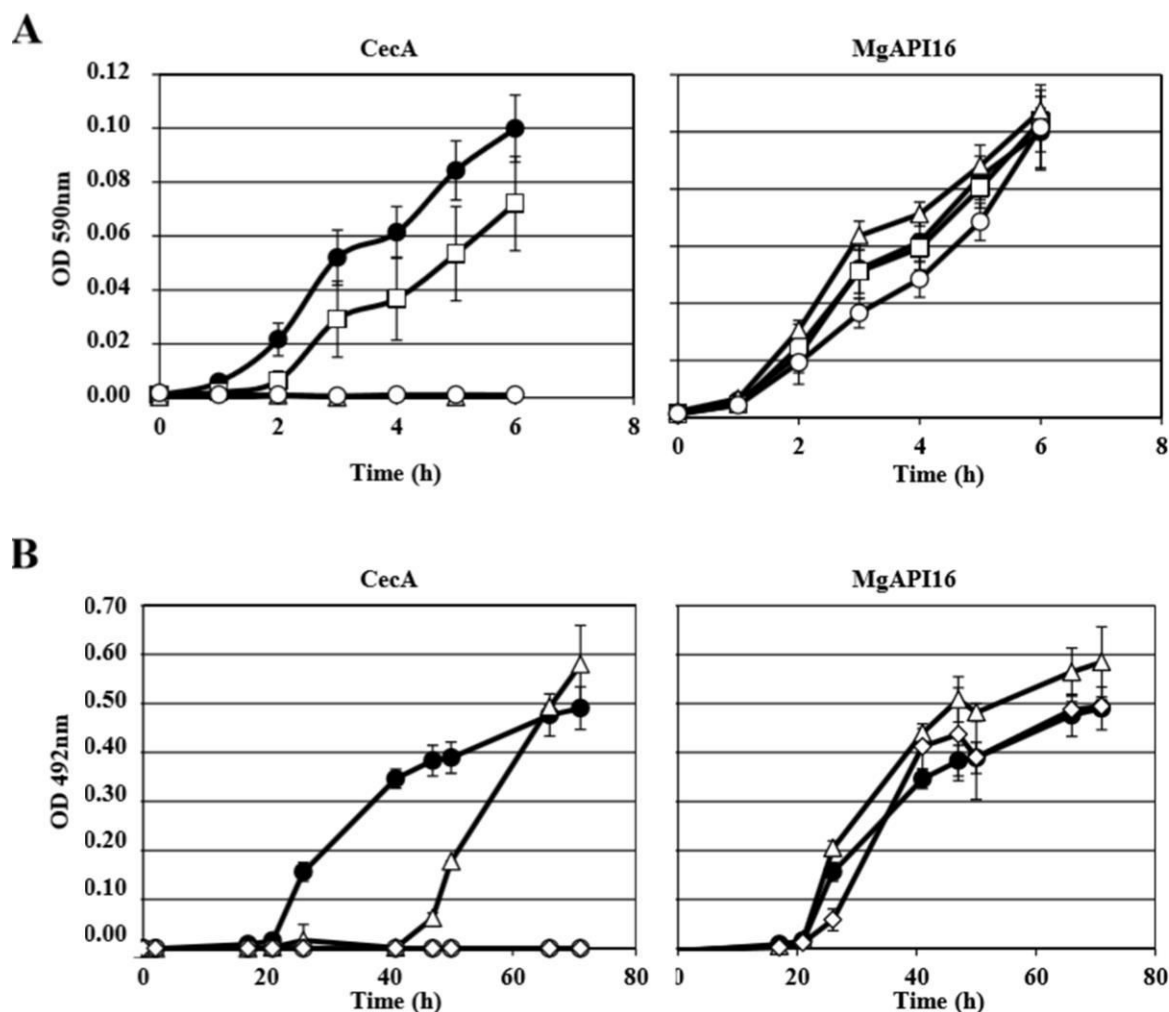


Fig. 3 . Effect of different concentrations of CecA and MgAPI16 on the *in vitro* growth of *Escherichia coli* DH5 α strain (A) and *Fusarium proliferatum* (B). *E.coli* was grown in 20% LB medium for 6h at 37°C and *F. proliferatum* was grown in 20% PDB medium for 72h at 28°C. Curves show the increase of OD at 590 nm (A) or 492 nm (B) over time (in hours) for control sample in the absence (black circle) and presence of 0.5 μ M (white square), 2 μ M (white triangle), 5 μ M (white circle), and 10 μ M (white diamond) of CecA or MgAPI16.

A similar experiment was performed in the eukaryotic organism *Fusarium proliferatum* (Fig. 3B). In these assays, CecA inhibited the fungal growth with a minimum inhibitory concentration of 5 μ M of peptide. Treatment with 2 μ M CecA delayed fungal growth around 40h but at the end of the assay,

i.e. 72h, fungus was able to grow similar than control conditions. On the other hand, no inhibitory activity was observed for the peptide MgAPI16 at the tested concentrations.

Preferential binding of MgAPI16 to fungal hyphae and appressorium structure

Considering previous data regarding the no toxicity of MgAPI16 on microorganisms, this peptide was selected for further studies. In an attempt to know MgAPI16 mode of action, *gfp*-expressing *M. oryzae* conidia were incubated on hydrophobic condition with MgAPI16 labeled with tetramethylrhodamine (TMR-MgAPI16). The interaction of TMR-MgAPI16 with *gfp*-*M. oryzae* was followed by live-cell imaging using fluorescence confocal microscopy (Fig. 4). At the first stages of the conidia development, the red signal from the peptide located at the surface of the conidia with a high preference for conidia tip (Fig. 4A, panels a-d). In further developmental stages, when spores were perfectly germinated and the hyphae were growing up, the peptide was located surrounding the emerging germ tubes and hyphae (Fig. 4A, panels e-h). These results indicate a preferential binding of the peptide where performs its inhibitory effect on appressorium formation. After 6h of incubation, although appressoria number was severely reduced, TMR-MgAPI16 preferentially bound at the surface of formed appressoria (Fig. 4A, panels i-l). Moreover, germinal tubes and hyphae treated with MgAPI16 showed high number of vacuoles along themselves and close to the appressoria (Fig. 4B, solid arrow). By confocal microscopy, we also observed that most of appressoria did not present the classic dome-shape structure after 6h treatment with MgAPI16; treated appressoria presented aberrant physical structure, they showed tips or clearly shape deficiencies (Fig. 4B, dashed arrow).

DISCUSSION

Nowadays, we are within a new legal and ecological framework in which the traditional fungicides do not meet all the imposed requirements. One problem refers to their toxicity to other species of the ecosystem. Current chemical fungicides are focused to kill fungal microorganisms, and frequently they present broad-spectrum activity showing toxicity to other organisms. The application of target-oriented antifungal compounds may be an environmentally sustainable strategy to control phytopathogenic diseases. Even more interesting could be the idea of a very specific compound that only affects the infective stage of the pathogen. During *M. oryzae* infective phase, conidia sense the hydrophobicity and the cutin composition of the rice leaf, triggering the formation of the appressorium, a specialized structure for the cleavage of the leaf cuticle allowing the mesophyll

invasion. However, if the conditions for infection are not suitable, conidia will germinate and become fungal hyphae. Therefore, blocking exclusively the appressorium formation could prevent rice infection without causing a toxic undesirable effect on surrounding organisms.

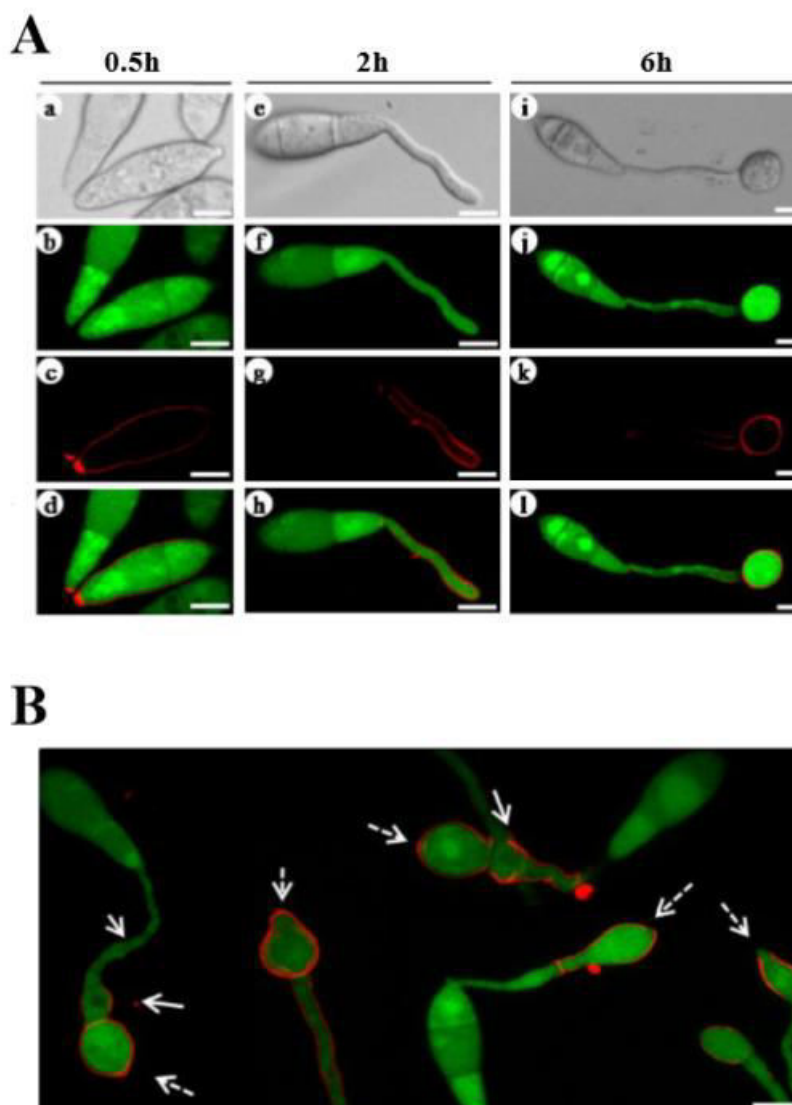


Fig. 4. Confocal fluorescence microscopy analysis of the interaction of TMR-MgAPI16 (shown in red) with *gfp-M. oryzae* (shown in green). Fungus treated with 10 μ M TMR-MgAPI16 was visualized at different times (0.5h, 2h, and 6h). (A) Panels show light microscopic images (a, e, i), excitation of GFP protein (b, f, j), excitation of TMR label (c, g, k) and merge of fluorescent images (d, h, l). (B) Morphological abnormalities resulting of treatment of *M. oryzae* with TRM-MgAPI16. Treated hyphae show a high level of vacuolization (solid arrows) and malformations in the appressorium development (dashed arrows) after 6h treatment. Bar = 5 μ m.

Initially, we have characterized the appressorium inhibitory activity of a well known antimicrobial peptide Cecropin A (CecA). The peptide inhibits the formation of appressoria (AP) although looks like increases the formation of appressorium-like structures (ALS). In a previous work, we have

demonstrated a similar behavior for other short peptides (Rebollar et al. 2014), suggesting that a possible secondary effect of the inhibition of AP structures would be the formation of ALS, a less efficient structure to penetrate into the plant (Kong et al. 2013). Our data support the idea that the formation of both developmental structures involve different molecular mechanisms (Kong et al. 2013).

In this work, we have also identified a novel CecA-derived peptide (MgAPI16) with similar appressoria inhibitory activity than CecA but without antimicrobial activity against the microorganisms tested. CecA is a lytic peptide whose channel-forming properties resides in its double α -helix structure linked by a flexible hinge region (Christensen et al. 1988, Fu et al. 2004, Lee et al. 2013). The non-antimicrobial peptide MgAPI16 corresponds with the first 18 amino acids of the N-terminal region of CecA, losing the ability to form the helix-hinge-helix structure. This fact supports that the typical structure of CecA is important for its high antimicrobial activity. Many CecA derived peptides have been designed in order to increase antimicrobial properties (Cavallarín et al. 1998, Ferre et al. 2006, Fox et al. 2012, Fu et al. 2004). But, in our knowledge, this is the first report of a CecA-derived peptide targeted to block a specific pathogenic step, i.e. appressorium formation, but without antimicrobial activity.

Our results obtained for CecA and MgAPI16 after the addition of appressorium inductors clearly suggest their different mode of action. The appressorium inhibitory activity of CecA is due mainly to its lytic activity, being the fungus unable to form appressorium even after the addition of an inductor. However, the inhibitory activity of MgAPI16 was bypassed by the addition of cAMP that restored the appressorium formation at the same level of the control sample. By contrast, *M. oryzae* partially overcomes MgAPI16 inhibition effect after the addition of 1,16-hexadecanediol, suggesting that this peptide may affect the fungal ability to recognize external signal such as hydrophobicity and cutin monomers.

By fluorescence confocal microscopy, we observed that TMR-MgAPI16 preferentially binds to the germinal tubes and appressoria, whose cell wall presents different composition of polysaccharides; specifically, they are rich in α 1,3-glucan which is not observed in the conidia cell wall (Fujikawa et al. 2009). Whether the different composition of cell wall, or the presence of a specific receptor, would explain the preferential binding of MgAPI16 remains to be elucidated.

It has been reported the importance of the endosomal system and the autophagy in the appressorium formation in *M. oryzae* (He et al. 2012, Veneault-Fourrey et al. 2006, Weber et al. 2001). During germination and appressorium development, small vacuoles in the apical cell of conidia move into the germ tube and nascent appressorium, as our confocal microscopic images

shown. However, the appressoria formed after MgAPI16 incubation did not present the classic dome-shape structure (Fig. 4). The clear reduction of blast disease symptoms on rice plants after peptide treatment suggests that these aberrant appressoria are not able to perform the infection process.

Taking together, the results present in this report suggest that MgAPI16 specifically block appressorium formation and could be a promising compound with potential application for the control of rice blast disease. This is the first step to develop new kind of target-oriented antifungal compounds without toxicity to other organisms, such as beneficial microorganisms or host plants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Coca, Dr. San Segundo and Dr. Marcos for their helpful comments during the course of this investigation. This work was supported by grant AGL2010-16847 from MICINN, Spain.

REFERENCES

- Brogden K.A., Ackermann M., Mccray P.B., Tack B.F. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* 22:465-478
- Bundó M., Montesinos L., Izquierdo E., Campo S., Mieulet D., Guiderdoni E., Rossignol M., Badosa E., Montesinos E., San Segundo B., Coca M. 2014. Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *BMC Plant Biology* 14:102-114
- Cavallarín L., Andreu D., San Segundo B. 1998. Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:218-227
- Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D. 1988. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5072-5076
- Coca M., Peñas G., Gómez J., Campo S., Bortolotti C., Messeguer J., San Segundo B. 2006. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a *cecropin A* gene in transgenic rice. *Planta* 223:392-406
- De Lucca A.J., Bland J.M., Jacks T.J., Grimm C., Cleveland T.E., Walsh T.J. 1997. Fungicidal activity of Cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother* 41:481-483

- Ebbole D.J. 2007. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 45:437-456
- Ferre R., Badosa E., Feliu L., Planas M., Montesinos E., Bardají E. 2006. Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Appl Environ Microbiol* 72:3302-3308
- Fox M.A., Thwaite J.E., Ulaeto D.O., Atkins T.P., Atkins H.S. 2012. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. *Peptides* 33:197-205
- Fu H.M., Bjorstad A., Dahlgren C., Bylund J. 2004. A bactericidal cecropin-A peptide with a stabilized alpha-helical structure possess an increased killing capacity but no proinflammatory activity. *Inflammation* 28:337-343
- Fujikawa T., Kuga Y., Yano S., Yoshimi A., Tachiki T., Abe K., Nishimura M. 2009. Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol Microbiol* 73:553-570
- Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Lukasiak J., Scalise G. 2003. Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* 24:1315-1318
- Hamel L.P., Nicole M.C., Duplessis S., Ellis B.E. 2012. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell* 24:1327-1351
- He M., Kershaw M.J., Soanes D.M., Xia Y., Talbot N.J. 2012. Infection-associated nuclear degeneration in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* requires non-selective macro-autophagy. *Plos One* 7:e33270-
- Kong L.A., Li G.T., Liu Y., Liu M.G., Zhang S.J., Yang J., Zhou X.Y., Peng Y.L., Xu J.R. 2013. Differences between appressoria formed by germ tubes and appressorium-like structures developed by hyphal tips in *Magnaporthe oryzae*. *Fung Gen Biol* 56:33-41
- Lee E., Jeong K.-W., Lee J., Shin A., Kim J.-K., Lee J., Lee D., Kim Y. 2013. Structure-activity relationships of cecropin-like peptides and their interactions with phospholipid membrane. *BMB Rep* 46:282-287
- Lee E., Shin A., Kim Y. 2015. Anti-inflammatory activities of cecropin A and its mechanism of action. *Arch Insect Biochem Physiol* 88:31-44

- Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Souza C., Harashima T., Shen W.C., Wang P., Pan X.W., Waugh M., Heitman J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:746-785
- López-García, B., San Segundo, B., and Coca, M. 2012. Antimicrobial Peptides as a Promising Alternative for Plant Disease Protection. In K Rajasekaran, JW Cary, JM Jaynes, and E Montesinos, eds, *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 263-294
- López-García B., Ubhayasekera W., Gallo R.L., Marcos J.F. 2007. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochem Biophys Res Commun* 356:107-113
- Maciel J.L.N., Ceresini P.C., Castroagudin V.L., Zala M., Kema G.H.J., McDonald B.A. 2013. Population Structure and Pathotype Diversity of the Wheat Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 Years After Its Emergence in Brazil. *Phytopathology* 104:95-107
- Marcos, J.F., Gandía, M., Harries, E., Carmona, L., and Muñoz, A. 2012. Antifungal peptides: exploiting non-lytic mechanisms and cell penetration properties. In K Rajasekaran, JW Cary, JM Jaynes, and E Montesinos, eds, *Small Wonders: Peptides for Disease Control*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 337-357
- Park S.Y., Milgroom M.G., Han S.S., Kang S., Lee Y.H. 2008. Genetic Differentiation of *Magnaporthe oryzae* Populations from Scouting Plots and Commercial Rice Fields in Korea. *Phytopathology* 98:436-442
- Rebollar A. and López-García B. 2013. PAF104, a synthetic peptide to control the rice blast disease by blocking the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:1407-1416
- Rebollar A., Marcos J.F., López-García B. 2014. Screening of a synthetic peptide combinatorial library to identify inhibitors of the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* 454:1-6
- Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., Boman H.G. 1981. Sequence and specificity of two anti-bacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292:246-248
- Veneault-Fourrey C., Barooah M., Egan M., Wakley G., Talbot N.J. 2006. Autophagic Fungal Cell Death Is Necessary for Infection by the Rice Blast Fungus. *Science* 312:580-583

Wang, G.-L. and Valent, B. 2009. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease.

Wang, G.-L. and Valent, B., eds. Springer Science and Business Media B.V., New York.

Weber R.W.S., Wakley G.E., Thines E., Talbot N.J. 2001. The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. Protoplasma

216:101-112

Wilson R.A. and Talbot N.J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by

Magnaporthe oryzae. Nat Rev Microbiol 7:185-195

Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415:389-395

Discusión general

El arroz es la principal fuente de alimento para gran parte de la población mundial. Sin embargo, la piriculariosis del arroz causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* constituye una de las enfermedades más devastadoras y persistentes en el cultivo del arroz. Esta enfermedad, también denominada “el quemado del arroz”, es capaz de destruir suficientes plantas para alimentar a más de 60 millones de personas al año dando lugar a importantes pérdidas nutricionales y económicas. Actualmente, la forma más común de control se basa en la utilización de fungicidas aunque no es muy efectiva debido en parte a la facilidad de adaptación que tiene el hongo y a la aparición de resistencias. Además, la actual legislación Europa es cada vez más restrictiva en cuanto al uso de fungicidas de amplio espectro debido a las repercusiones negativas que pueden tener para el consumo humano y el medio ambiente.

En este escenario se hace necesario buscar nuevas alternativas para el control de la piriculariosis que sean respetuosas con otros organismos no diana y en general con el medio ambiente. Una de las opciones más prometedoras es el uso de **péptidos antimicrobianos (AMPs)**, ya que debido a sus características pueden ejercer un control eficiente sobre cualquier tipo de patógeno sin generar resistencias y con poca persistencia en el ecosistema. La principal desventaja de este tipo de péptidos es que generalmente presentan un amplio rango de acción frente a gran cantidad de organismos, debido al modo de acción basado en la unión y lisis de las membranas biológicas. Esta cualidad choca con la actual tendencia de buscar compuestos cada vez más específicos.

En el presente trabajo se ha pretendido diseñar *de novo* AMPs dirigidos, es decir, péptidos cuyo modo de acción no resida en la lisis de la membrana y afecten en cambio a una etapa muy concreta del proceso de infección del hongo, en este caso la formación de apresorio en *M. oryzae*. Para la obtención de estas secuencias hemos utilizado dos aproximaciones, el cribado de una biblioteca combinatoria de péptidos (SCL) y la modificación de secuencias de AMPs naturales mediante diseño racional.

Dentro de la primera aproximación, caracterizamos el efecto del **péptido sintético PAF104** sobre la formación de apresorio en *M. oryzae* (Capítulo 1). El péptido PAF104 es un heptapéptido derivado de PAF26, el cual fue previamente sintetizado con los datos obtenidos del escrutinio de una biblioteca combinatoria de hexapéptidos frente a patógenos fúngicos como *Penicillium digitatum* (López-García et al 2002). En este trabajo vemos que PAF104 reduce la formación de apresorio en *M. oryzae* de forma significativa, controlando así el desarrollo de la infección foliar del hongo.

En segundo lugar utilizamos esta misma biblioteca con el fin de identificar péptidos derivados de PAF104 con características mejoradas a nivel de inhibición de la formación de apresorio, y por tanto del control de la piriculariosis (Capítulo 2). Con esta estrategia cribamos 47 millones de secuencias de hexapéptidos y las caracterizamos frente a su capacidad de inhibición de apresorio. Los resultados obtenidos nos dieron idea de qué aminoácidos tenían un peso más importante en cada posición y observamos que la posición 3 del péptido era la menos relevante ya que apenas variaba en su actividad independientemente de que aminoácido ocupase esa posición. Las otras posiciones si mostraban cambios importantes en cuanto a su actividad en función del aminoácido presente. Basándonos en estos datos, seleccionamos los aminoácidos: Glu, Asp y Arg para la posición 1, Arg en la posición 2, Ala, Phe y Arg en la posición 4, Glu, Gly, His, Met, Pro, Thr, Val, Trp para la posición 5 y finalmente Ala y Glu para la posición 6. Curiosamente Trp en la posición 4 y Phe en la posición 5 (que equivaldrían a la posición 5 y la 6 en el heptapéptido PAF104) no mostraban gran actividad frente a la inhibición de apresorio. Sin embargo, estos aminoácidos fueron seleccionados en el cribado de esta biblioteca frente a la inhibición de crecimiento de *P. digitatum*, identificándose el péptido PAF26. Una posible explicación es que ambos aminoácidos son hidrófobos, los cuales son más efectivos en la lisis de membranas anfipáticas (Marcos and Gandia 2009), lo cual era conveniente en el ensayo de inhibición de crecimiento de *P. digitatum* pero no lo es en la inhibición del apresorio en *M. oryzae*. A partir de estos resultados y teniendo en cuenta la secuencia del péptido PAF104, llevamos a cabo la síntesis de 29 péptidos que fueron ensayados independientemente por su capacidad en la inhibición de la formación del apresorio. De estos 29 péptidos, se seleccionaron **MgAPI24**, **MgAPI40** y **MgAPI47** con mayor actividad en comparación con PAF104, lo cual era uno de los objetivos de este trabajo.

Como hemos demostrado a lo largo de este trabajo, los 4 péptidos PAF104, MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47 reducen significativamente la formación del apresorio de *M. oryzae*. Sin embargo, el hongo sigue siendo capaz de crecer y formar conidios de forma normal completando sin problemas su ciclo vital. Esto indica que estos péptidos no son tóxicos para el hongo y que tienen un efecto muy específico inhibiendo la formación de apresorio. Además, estos péptidos presentan toxicidad reducida o nula frente a otro hongo fitopatógeno, *Fusarium proliferatum*, y la bacteria *Escherichia coli*. Resultados previos con péptidos de la familia PAFs han mostrado la carencia de toxicidad frente otros microorganismos, como levaduras y bacterias (López-García et al 2002), y células de mamíferos (López-García et al 2007, Muñoz et al 2007).

Mediante el análisis de expresión de genes implicados en la regulación de la formación del apresorio en *M. oryzae*, demostramos que PAF104 reprime la expresión de los genes ***MoMSB2*** y ***MoMST11***, ambos implicados en la ruta de señalización de la MAPK Pmk1. Msb2 es un receptor de membrana que responde a señales externas como la hidrofobicidad y los monómeros de cutina. Los resultados sugieren que PAF104 reprime la expresión del receptor Msb2 y por tanto bloquea el reconocimiento de estas señales externas. Esto es consistente con la ineffectividad del 1,16-hexadecanodiol a la hora de promover la formación de apresorio en presencia de PAF104. El 1,16-hexadecanodiol es un monómero de cutina descrito como inductor de la formación del apresorio en *M. oryzae* incluso en ausencia de una superficie hidrófoba. Experimentos adicionales con los mutantes $\Delta msb2$ de *S. cerevisiae* confirman estos resultados. Se ha demostrado que el gen *MSB2* regula el crecimiento filamentoso en levadura y que mutantes $\Delta msb2$ presentan un defecto en el crecimiento invasivo en agar (Cullen et al 2004). Como se observa en la figura 9, el tratamiento de la cepa salvaje de *S. cerevisiae* BY4741 con el péptido PAF104 o MgAPI24 da lugar a un fenotipo similar al mutante $\Delta msb2$ respecto al crecimiento invasivo. Similares resultados fueron observados tras el tratamiento con MgAPI40 y MgAPI47 (datos no mostrados). Estos experimentos apoyan el hecho de que PAF104 reprime la expresión del gen *MoMSB2*, y sugieren que el modo de acción de los heptapéptidos MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47 puede ser al mismo nivel. Además, PAF104 reprime la expresión de *MoMST11* que codifica para la MAPKKK de la cascada MAPK Mst11-Mst7-Pmk1. Se ha demostrado que mutantes que tienen bloqueada esta ruta no forman apresorio y son por tanto no patogénicos (Hamel et al 2012, Zhao et al 2005). En nuestros resultados se observa que el tratamiento con PAF104 no afecta los niveles de expresión del gen *PMK1*; sin embargo la expresión reducida de *MoMSB2* y *MoMST11* podrían afectar a la fosforilación y activación de la kinasa Pmk1, como se ha demostrado en los mutantes *Momsb2* (Liu et al 2011b).

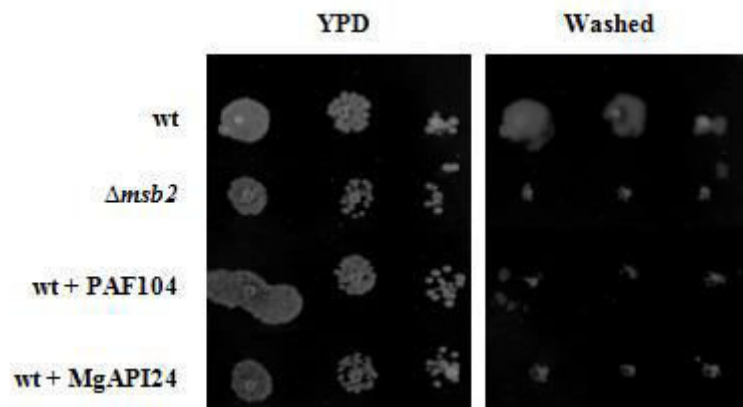


Figura 9 Efecto de los péptidos PAF104 y MgAPI24 sobre la adhesión al medio de la levadura *S. cerevisiae* BY4741 en comparación con el mutante deletereo $\Delta msb2$

Los resultados mostrados en el trabajo publicado en *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Rebollar and López-García 2013) muestran una clara correlación entre la inhibición del apresorio por PAF104 *in vivo* y la severidad de la infección en hojas de arroz. Sin embargo, PAF104, así como los otros 3 péptidos identificados a partir del ensayo de la biblioteca, no son capaces de eliminar totalmente la formación de apresorio. Como posteriormente demostramos en el trabajo publicado en *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Rebollar et al 2014), aunque estos péptidos reducen la formación del apresorio, son capaces de inducir la formación de estructuras no infectivas similares al apresorio (**ALS**, del inglés “*appressorium-like structures*”). Estas ALS, que se forman a partir de los extremos de las hifas, comparten aspecto y regulación molecular similar con los apresorios aunque no idénticos (Kong et al 2013). Además PAF104 tampoco es capaz de inhibir en condiciones de laboratorio la infección radicular del hongo mediante hifopodios, aunque este tipo de infección solo ha sido observada en condiciones *in vitro* (Sesma and Osbourn 2004). Este comportamiento diferencial de los 4 heptapéptidos sintéticos frente a distintas estructuras infectivas, junto con el efecto específico del péptido PAF104 sobre la ruta MAPK Pmk1, soporta la idea de que los mecanismos moleculares que regulan la formación del apresorio, las estructuras ALS y los hifopodios son diferentes (Kong et al 2013, Marcel et al 2010, Tucker et al 2010).

La segunda aproximación consiste en la **modificación de la secuencia de un péptido antimicrobiano natural, la Cecropina A (CecA), mediante diseño racional** (Capítulo 3). La estructura terciaria de la CecA consistente en 2 hélices- α unidas por una secuencia flexible es responsable de la internalización en las bicapas lipídicas y la formación de poros causando la lisis celular y por tanto, la muerte del microorganismo. Esto le confiere un gran espectro de acción frente a multitud de microorganismos. Sin embargo esta es una cualidad indeseable a la hora de diseñar un compuesto con aplicaciones fitosanitarias, ya que al tratar al patógeno también se está afectando al ecosistema de éste. Nuestros datos señalan que la CecA es efectiva a la hora de inhibir la formación del apresorio *in vitro* en *M. oryzae* y eliminar la infección foliar en planta. Al igual que observamos para los heptapéptidos identificados, CecA también induce la formación de ALS. Estos datos sugieren que un efecto secundario de la inhibición del apresorio podría ser la formación de las estructuras ALS, las cuales son menos eficientes en infectar la planta (Kong et al 2013). Sin embargo, y a diferencia de lo observado con los heptapéptidos identificados, la CecA inhibe el crecimiento de microorganismos como *E. coli* y *F. proliferatum*. Se ha descrito que la capacidad de lisis de CecA reside en su estructura terciaria consistente en 2 estructuras en hélice- α unidas por una región flexible lo que le

permite la formación de poros en la membrana (Christensen et al 1998, Fu et al 2004, Gregory et al 2008, Lee et al 2013). Con idea de disrumpir la capacidad de lisis de la CecA, hemos diseñado tres péptidos derivados que abarcaban la región N-terminal, la región central y la región C-terminal de la cecropina. Nuestros resultados demuestran que el péptido MgAPI16, que corresponde a los 18 primeros aminoácidos de la región N-terminal de la CecA, inhibe la formación de apresorio a niveles similares o ligeramente superiores a los del péptido natural. Por contra MgAPI16 no presenta actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos evaluados posiblemente debido a la incapacidad de formar la característica estructura hélice-giro-hélice; estos resultados son consistentes con el hecho de que esta estructura terciaria es importante para la formación de poros y lisis celular. En muchos trabajos se han diseñado péptidos derivados de la CecA para mejorar distintas cualidades antimicrobianas (Cavallarín et al 1998, Ferre et al 2006, Fox et al 2012, Fu et al 2004) pero este es el primer trabajo, del cual tenemos conocimiento, del diseño de un péptido derivado de la CecA con el objetivo de bloquear una proceso infectivo concreto pero careciendo de actividad antimicrobiana.

Los resultados de microscopia confocal muestran que el péptido MgAPI16 marcado con tetrametilrodamina (TMR) tiene preferencia de unión por las regiones del tubo germinativo y la superficie del apresorio, zonas ricas en 1,3-glucano (Fujikawa et al 2009). Una mayor avidez por esta composición de polisacáridos de la pared celular o la presencia de un receptor específico, podrían ser dos posibles explicaciones de la unión preferente de MgAPI16 aún por investigar.

Los resultados obtenidos tras la adición de AMPc, un inductor de la formación de apresorio, apoyan el diferente modo de acción de la CecA y el péptido derivado MgAPI16. La inhibición del apresorio de CecA se debe a su actividad lítica, siendo el hongo incapaz de formar apresorio incluso tras la adición de AMPc. Sin embargo, la adición de AMPc es capaz de soslayar el efecto inhibitorio de MgAPI16. Como hemos visto en la introducción, la ruta del AMPc está implicada en la formación de apresorio. Diversos estímulos externos pueden inducir la activación de la ruta a través de receptores acoplados a proteínas G de forma que se produce AMPc capaz de activar la proteína quinasa A. Los resultados obtenidos tras la adición exógena de AMPc parecen señalar que MgAPI16 tiene su efecto aguas arriba de la formación de AMPc o bien actúa sobre otra ruta implicada en la formación del apresorio. Similares resultados fueron observados para el heptapéptido PAF104 cuyo efecto inhibitorio de la formación del apresorio es sobrepasado por la adición de AMPc. En este trabajo hemos

demostrado la implicación de PAF104 en la ruta de la MAPK Pmk1 que es disparada entre otras señales por la presencia de monómeros de cutina en el medio. Los similares resultados observados por la adición del monómero de cutina 1,16-hexadecanodiol sobre el efecto en el bloqueo del apresorio de los péptidos MgAPI16 y PAF104 sugieren que el modo de acción de MgAPI16 podría también estar afectando la capacidad de reconocimiento de monómeros de cutina por parte del conidio.

En resumen, y considerando todos los resultados obtenidos en este trabajo, podemos proponer una serie de péptidos sintéticos capaces de bloquear de forma específica la formación del apresorio en *M. oryzae*, como los heptapéptidos diseñados *de novo* **PAF104**, **MgAPI24**, **MgAPI40** y **MgAPI47**, así como el péptido derivado del AMP natural CecA **MgAPI16**. El tratamiento con estos péptidos reduce considerablemente el desarrollo de la piriculariosis en arroz sin afectar al desarrollo ni el ciclo vital del hongo ni de otros microorganismos que pudiesen estar en su ecosistema. Nuestro trabajo supone un primer paso importante en el desarrollo de un nuevo tipo de péptidos dirigidos a un fin concreto como productos con potencial aplicación fitosanitaria. Aunque estos péptidos han sido desarrollados para inhibir la formación del apresorio en *M. oryzae* causante de la piriculariosis, también podrían ser evaluados para el control de otras enfermedades en las cuales la infección se produzca a través de la formación del apresorio.

Conclusiones

1. PAF104 inhibe la formación de apresorio y por tanto la infección de la hoja de arroz sin afectar al crecimiento del hongo ni de otros microorganismos, lo que lo convierte en un potencial compuesto para el control de la piriculariosis de forma específica.
2. Se ha confirmado la eficacia de la química combinatoria y el diseño racional en la identificación de péptidos dirigidos a bloquear una diana específica, en este caso la formación del apresorio de *M. oryzae*. Mediante el cribado de una biblioteca combinatoria de hexapéptidos y del diseño racional se han obtenido una serie de péptidos derivados de PAF104 (MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47) con mayor eficiencia en el bloqueo de la formación de apresorio en *M. oryzae*.
3. PAF104 reprime la expresión de los genes *MoMSB2* y *MST11* que forman parte de la ruta de la MAPK Pmk1 involucrada en la formación del apresorio. Los resultados obtenidos con el mutante $\Delta msb2$ de *S. cerevisiae* sugieren que el modo de acción de los péptidos MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47 es similar al observado para PAF104.
4. El comportamiento diferencial de los 4 heptapéptidos sintéticos (PAF104, MgAPI24, MgAPI40 y MgAPI47) frente a distintas estructuras infectivas apoyan la idea de que los mecanismos moleculares que regulan la formación del apresorio, las estructuras ALS y los hifopodios son diferentes, mientras que señala la alta especificidad del péptido en el bloqueo del apresorio.
5. Se ha caracterizado la actividad del péptido antimicrobiano natural CecA sobre el hongo *M. oryzae*. Mediante diseño racional, se ha identificado el péptido MgAPI16 que corresponde a la región N-terminal de la CecA con capacidad de inhibir la formación del apresorio a niveles similares o ligeramente superiores a los del péptido natural y controlar el desarrollo de la piriculariosis en plantas de arroz.
6. La ausencia de actividad antimicrobiana de MgAPI16 frente a diferentes microorganismos es consistente con el hecho de que la actividad lítica de CecA reside en su estructura terciaria con dos hélices- α unidas por una región flexible lo que le permite la formación de poros en la membrana y la lisis celular.

7. Mediante microscopía confocal se observó que el péptido TMR-MgAPI16 tiene preferencia de unión por las regiones del tubo germinativo y la superficie del apresorio. El tratamiento con TMR-MgAPI16 da lugar a apresorios con alteraciones morfológicas lo que podría explicar la ausencia de infección del hongo en la planta.

BIBLIOGRAFÍA

- Abel P.P., Nelson R.S., De B., Hoffmann N., Rogers S.G., Fraley R.T., and Beachy R.N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco Mosaic Virus coat protein gene. *Science* **232**:738-743.
- Adachi K. and Hamer J.E. (1998) Divergent cAMP signaling pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **10**:1361-1374.
- Aguiar R.W.d., Ootani M.A., Ascencio S.r.D., Ferreira T.P.S., dos Santos M.M., and dos Santos G.R. (2014) Fumigant Antifungal Activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* Essential Oils and Citronellal against Three Fungal Species. *The Scientific World Journal* **2014**:492138-
- Al-Samarrai T.H., Sullivan P.A., Templeton M.D., and Farley P.C. (2002) Peptide inhibitors of appressorium development in *Glomerella cingulata*. *FEMS Microbiology Letters* **209**:203-207.
- Allen A., Snyder A.K., Preuss M., Nielsen E.E., Shah D.M., and Smith T.J. (2008) Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta* **227**:331-339.
- Anantharaman A., Rizvi M.S., and Sahal D. (2010) Synergy with Rifampin and Kanamycin Enhances Potency, Kill Kinetics, and Selectivity of De Novo-Designed Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:1693-1699.
- Andreu D., Ubach J., Boman A., Wahlin B., Wade D., Merrifield R.B., and Boman H.G. (1992) Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Letters* **296**:190-194.
- Arias M., Jensen K.V., Nguyen L.T., Storey D.G., and Vogel H.J. (2015) Hydroxy-tryptophan containing derivatives of tritrpticin: Modification of antimicrobial activity and membrane interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**:277-288.
- Arthur T.D., Cavera V.L., and Chikindas M.L. (2014) On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiology* **9**:235-248.
- Auvynet C. and Rosenstein Y. (2009) Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *Febs Journal* **276**:6497-6508.
- Avila-Adame C. and Koller W. (2003) Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current Genetics* **42**:332-338.
- Bàbolewska E. and Brzezinska-Blaszczyk E. (2015) Human-derived cathelicidin LL-37 directly activates mast cells to proinflammatory mediator synthesis and migratory response. *Cellular Immunology* **293**:67-73.
- Badosa E., Ferre R., Planas M., Feliu L., Besalu E., Cabrefiga J., Bardaji E., and Montesinos E. (2007) A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* **28**:2276-2285.

- Bals R., Wang X., Zasloff M., and Wilson J.M. (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* **95**:9541-9546.
- Barbeta B.L., Marshall A.T., Gillon A.D., Craik D.J., and Anderson M.A. (2008) Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:1221-1225.
- Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M.G., Hernández-López M., Barka E.A., Bosquez-Molina E., and Wilson C.L. (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* **25**:108-118.
- Bautista-Baños S., Hernández-López M., Bosquez-Molina E., and Wilson C.L. (2003) Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* **22**:1087-1092.
- Beckerman J.L., Naider F., and Ebole D.J. (1997) Inhibition of Pathogenicity of the Rice Blast Fungus by *Saccharomyces cerevisiae* a-Factor. *Science* **276**:1116-1118.
- Bender C.L., Alarcón-Chaidez F., and Gross D.C. (1999) *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**:266-292.
- Beneduzi A., Ambrosini A., and Passaglia L.M. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* **35**:1044-1051.
- Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C., and Codón A.C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **7**:249-260.
- Bent A.F. and Mackey D. (2007) Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Review of Phytopathology* **45**:399-436.
- Bergelson J., Kreitman M., Stahl E.A., and Tian D. (2011) Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* **292**:2281-2285.
- Binder U., Chu M., Read N.D., and Marx F. (2010) The Antifungal Activity of the *Penicillium chrysogenum* Protein PAF Disrupts Calcium Homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **9**:1374-1382.
- Bishop-Hurley S.L., Mounter S.A., Laskey J., Morris R.O., Elder J., Roop P., Rouse C., Schmidt F.J., and English J.T. (2002) Phage-displayed peptides as developmental agonists for *Phytophthora capsici* zoospores. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:3315-3320.
- Blondelle S.E. and Houghten R.A. (1996) Novel antimicrobial compounds identified using synthetic combinatorial library technology. *Trends in Biotechnology* **14**:60-65.
- Blondelle S.E., Takahashi E., Weber P.A., and Houghten R.A. (1994) Identification of antimicrobial peptides by using combinatorial libraries made up of unnatural amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**:2280-2286.

- Boman H.G., Agerberth B., and Boman A. (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity* **61**:2978-2984.
- Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl H.G., and de Kruijff B. (1999) Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **286**:2361-2364.
- Brogden K.A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**:238-250.
- Brogden K.A., Ackermann M., Mccray P.B., and Tack B.F. (2003) Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**:465-478.
- Brown D.W., Cheung F., Proctor R.H., Butchko R.A.E., Zheng L., Lee Y., Utterback T., Smith S., Feldblyum T., Glenn A.E., Plattner R.D., Kendra D.F., Town C.D., and Whitelaw C.A. (2005) Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* **42**:848-861.
- Bundo M., Montesinos L., Izquierdo E., Campo S., Mieulet D., Guiderdoni E., Rossignol M., Badosa E., Montesinos E., San Segundo B., and Coca M. (2014) Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *Bmc Plant Biology* **14**:102-
- Campo S., Manrique S., Garcia-Martinez J., and Segundo B.S. (2008) Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal* **6**:585-608.
- Campos-Olivas R., Bruix M., Santoro J., Lacadena J., Martínez del Pozo A., Gavilanes J.G., and Rico M. (1995) NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry* **34**:3009-3021.
- Carmona L., Gandía M., López-García B., and Marcos J.F. (2012) Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to the cell-penetrating antifungal peptide PAF26 correlates with endogenous nitric oxide (NO) production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**:56-61.
- Carreres R. (2005) Enfermedades del arroz, técnicas de cultivo y control químico. *Vida Rural* **214**:53-57.
- Carvalho A.D. and Gomes V.M. (2009) Plant defensins-Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* **30**:1007-1020.
- Cary J.W., Rajasekaran K., Jaynes J.M., and Cleveland T.E. (2000) Transgenic expression of a gene encoding a synthetic antimicrobial peptide results in inhibition of fungal growth *in vitro* and *in planta*. *Plant Science* **154**:171-181.
- Casteels P. and Tempst P. (1994) Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**:339-345.
- Cavallarín L., Andreu D., and San Segundo B. (1998) Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:218-227.

- Chadha P. and Das R.H. (2006) A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. *Planta* **225**:213-222.
- Chan Y.R. and Gallo R.L. (1998) PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *Journal of Biological Chemistry* **273**:28978-28985.
- Chandra B.R., Zhang J., Blum A., vid Ho T.H., Wu R., and Nguyen H.T. (2004) HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* **166**:855-862.
- Che Y.Z., Li Y.R., Zou H.S., Zou L.F., Zhang B., and Chen G.Y. (2011) A novel antimicrobial protein for plant protection consisting of a *Xanthomonas oryzae* harpin and active domains of cecropin A and melittin. *Microbial Biotechnology* **4**:777-793.
- Chen R.E. and Thorner J. (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1773**:1311-1340.
- Choi W.B. and Dean R.A. (1997) The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls Appressorium formation and other aspects of growth and development. *The Plant Cell* **9**:1973-1983.
- Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., and Mauzerall D. (1988) Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* **85**:5072-5076.
- Christensen T.M., Nielsen J.E., Kreiberg J.D., Rasmussen P., and Mikkelsen J.D. (1998) Pectin methyl esterase from orange fruit: characterization and localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta* **206**:493-503.
- Chujo T., Miyamoto K., Ogawa S., Masuda Y., Shimizu T., Kishi-Kaboshi M., Takahashi A., Nishizawa Y., Minami E., Nojiri H., Yamane H., and Okada K. (2014) Overexpression of Phosphomimic Mutated OsWRKY53 Leads to Enhanced Blast Resistance in Rice. *Plos One* **9**:e98737-
- Chuturgoon A.A., Phulukdaree A., and Moodley D. (2014) Fumonisin B1 modulates expression of human cytochrome P450 1b1 in human hepatoma (Hepg2) cells by repressing Mir-27b. *Toxicology Letters* **227**:50-55.
- Coca M., Peñas G., Gómez J., Campo S., Bortolotti C., Messeguer J., and San Segundo B. (2006) Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a *cecropin A* gene in transgenic rice. *Planta* **223**:392-406.
- Collemare J., Billard A., Böhnert H., and Lebrun M.H. (2008) Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS–NRPS in pathogenicity. *Mycological Research* **112**:207-215.
- Company N., Nadal A., Ruiz C., and Pla M. (2014) Production of Phytotoxic Cationic α -Helical Antimicrobial Peptides in Plant Cells Using Inducible Promoters. *Plos One* **9**:e109990-
- Correa A., Staples R.C., and Hoch H.C. (1996) Inhibition of thigmostimulated cell differentiation with RGD-peptides in *Uromyces germings*. *Protoplasma* **194**:91-102.

- Correia I., Alonso-Monge R., and Pla J. (2010) MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future Microbiology* **5**:1125-1141.
- Couch B.C. and Kohn L.M. (2002) A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* **94**:683-693.
- Cowan M.M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**:564-582.
- Cullen P.J., Sabbagh W., Graham E., Irick M.M., van Olden E.K., Neal C., Delrow J., Bardwell L., and Sprague G.F. (2004) A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes & Development* **18**:1695-1708.
- Cullen P.J., Schultz J., Horecka J., Stevenson B.J., Jigami Y., and Sprague G.F. (2000) Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**:1005-1018.
- Dagdas Y.F., Yoshino K., Dagdas G., Ryder L.S., Bielska E., Steinberg G., and Talbot N.J. (2012) Septin-Mediated Plant Cell Invasion by the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* **336**:1590-1595.
- De Coninck B.M.A., Sels J., Venmans E., Thys W., Goderis I.J.W.M., Carron D., Delaure S.L., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., and Mathys J. (2010) *Arabidopsis thaliana* plant defensin AtPDF1.1 is involved in the plant response to biotic stress. *New Phytologist* **187**:1075-1088.
- De Jong JC., McCormack B., Smirnoff N., and Talbot N.J. (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**:244-
- De Lucca A.J., Bland J.M., Jacks T.J., Grimm C., Cleveland T.E., and Walsh T.J. (1997) Fungicidal activity of Cecropin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**:481-483.
- Dean R.A., Talbot N.J., Ebbole D.J., Farman M.L., Mitchell T.K., Orbach M.J., Thon M., Kulkarni R., Xu J.R., Pan H., Read N.D., Lee Y.H., Carbone I., Brown D., Oh Y.Y., Donofrio N., Jeong J.S., Soanes D.M., Djonovic S., Kolomiets E., Rehmeyer C., Li W., Harding M., Kim S., Lebrun M.H., Bohnert H., Coughlan S., Butler J., Calvo S., Ma L.J., Nicol R., Purcell S., Nusbaum C., Galagan J.E., and Birren B.W. (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**:980-986.
- DeZwaan T.M., Carroll A.M., Valent B., and Sweigard J.A. (1999) *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *The Plant Cell* **11**:2013-2030.
- Dischinger J., Basi Chipalu S., and Bierbaum G. (2014) Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology* **304**:51-62.
- Domijan A.M. and Abramov A.Y. (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis--implication to mechanism of cell toxicity. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **43**:897-904.

- Dubos R.J. (1939a) Studies on a bacterial agent extracted from a soil *bacillus*: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. *The Journal of Experimental Medicine* **70**:1-10.
- Dubos R.J. (1939b) Studies on a bacterial agent extracted from a soil *bacillus*: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice. *The Journal of Experimental Medicine* **70**:11-17.
- Eilbert F., Anke H., and Sterner O. (2000a) Neobulgarones A-F from cultures of *Neobulgaria pura*, new inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *J Antibiot* **53**:1123-1129.
- Eilbert F., Engler-Lohr M., Anke H., and Sterner O. (2000b) Bioactive Sesquiterpenes from the Basidiomycete *Resupinatus leightonii*. *Journal of Natural Products* **63**:1286-1287.
- Eilbert F., Thines E., Sterner O., and Anke H. (1999) Fatty Acids and Their Derivatives as Modulators of Appressorium Formation in *Magnaporthe grisea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**:879-883.
- Epple P., Apel K., and Bohlmann H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* **9**:509-520.
- Falciani C., Lozzi L., Pollini S., Luca V., Carnicelli V., Brunetti J., Lelli B., Bindi S., Scali S., Di Giulio A., Rossolini G.M., Mangoni M.L., Bracci L., and Pini A. (2012) Isomerization of an Antimicrobial Peptide Broadens Antimicrobial Spectrum to Gram-Positive Bacterial Pathogens. *Plos One* **7**:e46259-
- Fang E.G. and Dean R.A. (2000) Site-directed mutagenesis of the magB gene affects growth and development in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**:1214-1227.
- Faye L. and Gomord V. (2010) Success stories in molecular farming a brief overview. *Plant Biotechnology Journal* **8**:525-528.
- Ferre R., Badosa E., Feliu L., Planas M., Montesinos E., and Bardají E. (2006) Inhibition of plant-pathogenic bacteria by short synthetic cecropin A-melittin hybrid peptides. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3302-3308.
- Fitch J.H. and Beachy R.N. (1993) Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annual Review of Microbiology* **47**:739-763.
- Fleeman R., LaVoi T.M., Santos R.G., Morales A., Nefzi A., Welmaker G.S., Medina-Franco J.L., Giulianotti M.A., Houghten R.A., and Shaw L.N. (2015) Combinatorial Libraries As a Tool for the Discovery of Novel, Broad-Spectrum Antibacterial Agents Targeting the ESKAPE Pathogens. *Journal of Medicinal Chemistry* **58**:3340-3355.
- Fox M.A., Thwaite J.E., Ulaeto D.O., Atkins T.P., and Atkins H.S. (2012) Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. *Peptides* **33**:197-205.
- Fu H.M., Bjorstad A., Dahlgren C., and Bylund J. (2004) A bactericidal cecropin-A peptide with a stabilized alpha-helical structure possess an increased killing capacity but no proinflammatory activity. *Inflammation* **28**:337-343.

- Fujikawa T., Kuga Y., Yano S., Yoshimi A., Tachiki T., Abe K., and Nishiruma M. (2009) Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Molecular Microbiology* **73**:553-570.
- Gabrielsen C., Brede D.A., Nes I.F., and Diep D.B. (2014) Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:6854-6862.
- Gallo R.L., Kim K.J., Bernfield M., Kozak C.A., Zanetti M., Merluzzi L., and Gennaro R. (1997) Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *Journal of Biological Chemistry* **272**:13088-13093.
- Ganz T. (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* **327**:539-549.
- Gao A.G., Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J.H., and Rommens C.M.T. (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* **18**:1307-1310.
- García-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M., and Rodríguez-Palenzuela P. (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**:479-491.
- Gazit E., Boman A., Boman H.G., and Shai Y. (1995) Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**:11479-11488.
- Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., D'Amato G., Silvestri C., Del Prete M.S., Lukasiak J., and Scalise G. (2003) Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A-melittin peptide CA(1-7)M(2-9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides* **24**:1315-1318.
- Gilbert R.D., Johnson A.M., and Dean R.A. (1996) Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **48**:335-346.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R.L., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchinson D., Martin C., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J.P., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S.P., Colbert M., Sun W.L., Chen L.L., Cooper B., Park S., Wood T.C., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y.S., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalima T., Oliphant A., and Briggs S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp japonica). *Science* **296**:92-100.
- Gregory S.M., Cavanaugh A., Journigan V., Pokorny A., and Almeida P.F. (2008) A Quantitative Model for the All-or-None Permeabilization of Phospholipid Vesicles by the Antimicrobial Peptide Cecropin A(). *Biophysical Journal* **94**:1667-1680.
- Grennan A.K. (2006) Abiotic Stress in Rice. An "Omic" Approach. *Plant Physiology* **140**:1139-1141.
- Grover A. and Gowthaman R. (2003) Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants. *Current Science* **84**:330-340.

- Gruber C.W., Cemazar M., Anderson M.A., and Craik D.J. (2007) Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. *Toxicon* **49**:561-575.
- Hagen S., Marx F., Ram A.F., and Meyer V. (2007) The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:2128-2134.
- Hamel L.P., Nicole M.C., Duplessis S., and Ellis B.E. (2012) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *The Plant Cell* **24**:1327-1351.
- Hamer J.E., Howard R.J., Chumley F.G., and Valent B. (1988) A Mechanism for Surface Attachment in Spores of A Plant Pathogenic Fungus. *Science* **239**:288-290.
- Hammami R., Ben Hamida J., Vergoten G., and Fliss I. (2009) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research* **37**:D963-D968.
- Hansen J.N. and Sandine W.E. (1994) Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **34**:69-93.
- Harris F., Dennison S.R., and Phoenix D.A. (2009) Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein and Peptide Science* **10**:585-606.
- Harwig S.S.L., Waring A., Yang H.J., Cho Y., Tan L., and Lehrer R.I. (1996) Intramolecular Disulfide Bonds Enhance the Antimicrobial and Lytic Activities of Protegrins at Physiological Sodium Chloride Concentrations. *European Journal of Biochemistry* **240**:352-357.
- He M., Kershaw M.J., Soanes D.M., Xia Y., and Talbot N.J. (2012) Infection-Associated Nuclear Degeneration in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* Requires Non-Selective Macro-Autophagy. *Plos One* **7**:e33270-
- Helliwell E.E. and Yang Y.(2013) Molecular Strategies to Improve Rice Disease Resistance. In *Rice Protocols, Methods in Molecular Biology*. Human Press, pp.285-309
- Helliwell E.E., Wang Q., and Yang Y. (2013) Transgenic rice with inducible ethylene production exhibits broad-spectrum disease resistance to the fungal pathogens *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Plant Biotechnology Journal* **11**:33-42.
- Hensler M.E., Bernstein G., Nizet V., and Nefzi A. (2006) Pyrrolidine bis-cyclic guanidines with antimicrobial activity against drug-resistant Gram-positive pathogens identified from a mixture-based combinatorial library. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**:5073-5079.
- Hightower R., Baden C., Penzes E., and Dunsmuir P. (1994) The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Cell Reports* **13**:295-299.
- Holásková E., Galuszka P., Frébort I., and Tufan M. (2015) Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances* doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.007:

- Hong S.Y., Oh J.E., Kwon M.y., Choi M.J., Lee J.H., Lee B.L., Moon H.M., and Lee K.H. (1998) Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**:2534-2541.
- Houghten R.A., Appel J.R., Blondelle S.E., Cuervo J.H., Dooley C.T., and Pinilla C. (1992) The use of synthetic peptide combinatorial libraries for the identification of bioactive peptides. *Biotechniques* **13**:412-421.
- Houghten R.A., Pinilla C., Blondelle S.E., Appel J.R., Dooley C.T., and Cuervo J.H. (1991) Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* **354**:84-86.
- Huang J., Si W., Deng Q., Li P., and Yang S. (2014) Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Bmc Genetics* **15**:45-45.
- Hwang P.M. and Vogel H.J. (1998) Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemistry and Cell Biology* **76**:235-246.
- Inoue Y., Sakai M., Yao Q., Tanimoto Y., Toshima H., and Hasegawa M. (2013) Identification of a novel casbane-type diterpene phytoalexin, ent-10-oxodepressin, from rice leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**:760-765.
- Ishii A., Kumasaka M., Nagashima Y., Nakajima Y., Kuramochi K., Sugawara F., Narukawa M., and Kamakura T. (2013) A Eukaryotic Molecular Target Candidate of Roxithromycin: Fungal Differentiation as a Sensitive Drug Target Analysis System. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**:1539-1547.
- Jan P.S., Huang H.Y., and Chen H.M. (2010) Expression of a Synthesized Gene Encoding Cationic Peptide Cecropin B in Transgenic Tomato Plants Protects against Bacterial Diseases. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:769-775.
- Jaynes J.M., Nagpala P., Destefanobeltran L., Huang J.H., Kim J.H., Denny T., and Cetiner S. (1993) Expression of a cecropin-B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Science* **89**:43-53.
- Jeon J., Choi J., Lee G.W., Dean R.A., and Lee Y.H. (2013) Experimental Evolution Reveals Genome-Wide Spectrum and Dynamics of Mutations in the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Plos One* **8**:e65416-
- Ji H., Gheysen G., Ullah C., Verbeek R., Shang C., De Vleeschauwer D., Höfte M., and Kyndt T. (2015) The role of thionins in rice defence against root pathogens. *Molecular Plant Pathology*
- Jiang C.J., Shimono M., Sugano S., Kojima M., Liu X., Inoue H., Sakakibara H., and Takatsuji H. (2012) Cytokinins Act Synergistically with Salicylic Acid to Activate Defense Gene Expression in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**:287-296.
- Jin Q., Li C., Shang J., Li D., Chen B., and Dong H. (2013) Complexity of roles and regulation of the PMK1-MAPK pathway in mycelium development, conidiation and appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Gene Expression Patterns* **13**:133-141.
- Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**:323-329.

- Jung H., Kim K., and Hwang B. (2005) Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic Arabidopsis against pathogen and environmental stresses. *Planta* **221**:361-373.
- Kaiserer L., Oberparleiter C., Weiler-Görz R., Burgstaller W., Leiter E., and Marx F. (2003) Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch Microbiol* **180**:204-210.
- Kankanala P., Czymmek K., and Valent B. (2007) Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *The Plant Cell* **19**:706-724.
- Karthikeyan V. and Gnanamanickam S.S. (2008) Biological control of Setaria blast (*Magnaporthe grisea*) with bacterial strains. *Crop Protection* **27**:263-267.
- Khalili E., Sadravi M., Naeimi S., and Khosravi V. (2012) Biological control of rice brown spot with native isolates of three Trichoderma species. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**:297-305.
- Khan J.A. and Vulfson E.N. (2003) Combinatorial chemistry in food research. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **6**:569-574.
- Khush G.S. (2005) What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol* **59**:1-6.
- Kim H., Jang J.H., Kim S.C., and Cho J.H. (2014a) De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**:121-132.
- Kim H., Lee K., Hwang H., Bhatnagar N., Kim D.Y., Yoon I.S., Byun M.O., Kim S.T., Jung K.H., and Kim B.G. (2014b) Overexpression of PYL5 in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression. *J Exp Bot* **65**:453-464.
- Kindrachuk J., Jenssen H., Elliott M., Nijnik A., Magrangeas-Janot L., Pasupuleti M., Thorson L., Ma S., Easton D.M., Bains M., Finlay B., Breukink E.J., Georg-Sahl H., and Hancock R.E. (2013) Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: Lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate Immunity* **19**:315-327.
- Kiran B., Lalitha V., and Raveesha K.A. (2010) Screening of seven medicinal plants for antifungal activity against seed borne fungi of Maize seed. *African Journal of Basic & Applied Sciences* **2**:99-103.
- Kishimoto K., Kouzai Y., Kaku H., Shibuya N., Minami E., and Nishizawa Y. (2010) Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *The Plant Journal* **64**:343-354.
- Kong L.A., Yang J., Li G.T., Qi L.L., Zhang Y.J., Wang C.F., Zhao W.S., Xu J.R., and Peng Y.L. (2012) Different Chitin Synthase Genes Are Required for Various Developmental and Plant Infection Processes in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plos Pathogens* **8**:e1002526-

- Kong L.A., Li G.T., Liu Y., Liu M.G., Zhang S.J., Yang J., Zhou X.Y., Peng Y.L., and Xu J.R. (2013) Differences between appressoria formed by germ tubes and appressorium-like structures developed by hyphal tips in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* **56**:33-41.
- Kouzai Y., Mochizuki S., Saito A., Ando A., Minami E., and Nishizawa Y. (2012) Expression of a bacterial chitosanase in rice plants improves disease resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell Rep* **31**:629-636.
- Kovacs L., Viragh M., Tako M., Papp T., Vagvoelgyi C., and Galgoczy L. (2011) Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP). *Peptides* **32**:1724-1731.
- Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B.A., Hoffmann R., and Otvos L.Jr. (2001) The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40**:3016-3026.
- Krishna P. (2003) Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**:289-297.
- Kunova A., Pizzatti C., and Cortesi P. (2013) Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Management Science* **69**:278-284.
- Lafitte H.R., Ismail A., and Bennett J. (2004) Abiotic stress tolerance in rice for Asia: progress and the future. In *New directions for a diverse planet: Proceedings for the 4th International Crop Science Congress*, The Regional Institute Ltd, pp. Published in CD-ROM
- Lanver D., Mendoza-Mendoza A., Brachmann A., and Kahmann R. (2010) Sho1 and Msb2-Related Proteins Regulate Appressorium Development in the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* **22**:2085-2101.
- Lay F.T., Mills G.D., Poon I.K.H., Cowieson N.P., Kirby N., Baxter A.A., van der Weerden N.L., Dogovski C., Perugini M.A., Anderson M.A., Kvensakul M., and Hulett M.D. (2012) Dimerization of Plant Defensin NaD1 Enhances Its Antifungal Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **287**:19961-19972.
- Lee D.G., Shin S.Y., Maeng C.Y., Jin Z.Z., Kim K.L., and Hahm K.S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **263**:646-651.
- Lee E., Jeong K.W., Lee J., Shin A., Kim J.K., Lee J., Lee D.G., and Kim Y. (2013) Structure-activity relationships of cecropin-like peptides and their interactions with phospholipid membrane. *BMB Reports* **46**:282-287.
- Lee E., Shin A., and Kim Y. (2015a) Anti-Inflammatory activities of cecropin A and its mechanism of action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **88**:31-44.
- Lee M., Shi X., Barron A.E., McGeer E., and McGeer P.L. (2015b) Human antimicrobial peptide LL-37 induces glial-mediated neuroinflammation. *Biochemical Pharmacology* **94**:130-141.

- Lehrer R.I. (2004) Primate defensins. *Nature Reviews Microbiology* **2**:727-738.
- Leiter E., Szappanos H., Oberparleiter C., Kaiserer L., Csernoch L., Pusztahelyi T., Emri T., Posci I., Salvenmoser W., and Marx F. (2005) Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:2445-2453.
- Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Souza C., Harashima T., Shen W.C., Wang P., Pan X.W., Waugh M., and Heitman J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:746-785.
- Li C.R., Liang D.D., Xu R.F., Li H., Zhang Y.P., Quin R.Y., Li L., Wei P.C., and Yang J.B. (2014) Overexpression of an alternative oxidase gene, OsAOX1a, improves cold tolerance in *Oryza sativa* L. *Genetics and Molecular Research* **12**:5424-5432.
- Li G., Zhou X., and Xu J.R. (2012) Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae*. *Current Opinion in Microbiology* **15**:678-684.
- Li Q.L., Jiang Y.H., Ning P., Zheng L., Huang J.B., Li G.Q., Jiang D.H., and Hsiang T. (2011) Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control* **58**:139-148.
- Li Y., Yan X., Wang H., Liang S., Ma W.B., Fang M.Y., Talbot N.J., and Wang Z.Y. (2010) MoRic8 Is a Novel Component of G-Protein Signaling During Plant Infection by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**:3117-3131.
- Lian H.L., Yu X., Ye Q., Ding X.S., Kitagawa Y., Kwak S.S., Su W.A., and Tang Z.C. (2004) The Role of Aquaporin RWC3 in Drought Avoidance in Rice. *Plant and Cell Physiology* **45**:481-489.
- Liao D., Basarab G.S., Gatenby A.A., Valent B., and Jordan D.B. (2001) Structures of trihydroxynaphthalene reductase-fungicide complexes: implications for structure-based design and catalysis. *Structure* **10**:19-27.
- Libardo M.D., Cervantes J.L., Salazar J.C., and ngeles-Boza A.M. (2014) Improved Bioactivity of Antimicrobial Peptides by Addition of Amino-Terminal Copper and Nickel (ATCUN) Binding Motifs. *ChemMedChem* **9**:1892-1901.
- Lindell S.D. and Scherckenbeck E. (2005) Prospects for combinatorial chemistry in the agrosociences. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **8**:555-562.
- Liu H., Suresh A., Willard F.S., Siderovski D.P., Lu S., and Naqvi N.I. (2007) Rgs1 regulates multiple Ga subunits in *Magnaporthe* pathogenesis, asexual growth and thigmotropism. *The EMBO Journal* **26**:690-700.
- Liu R., Mu L., Liu H., Wei L., Yan T., Chen M., Zhang K., Li J., You D., and Lai R. (2011a) Two antimicrobial and nematocidal peptides derived from sequences encoded *Picea sitchensis*. *Journal of Peptide Science* **17**:627-631.
- Liu S. and Dean R.A. (1997) G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:1075-1086.

- Liu W.D., Zhou X.Y., Li G.T., Li L., Kong L.G., Wang C.F., Zhang H.F., and Xu J.R. (2011b) Multiple Plant Surface Signals are Sensed by Different Mechanisms in the Rice Blast Fungus for Appressorium Formation. *Plos Pathogens* **7**:e1001261-
- Lobo D.S., Pereira I.B., Fragel-Madeira L., Medeiros L.N., Cabral L.M., Faria J., Bellio M., Campos R.C., Linden R., and Kurtenbach E. (2007) Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* **46**:987-996.
- Lohans C.T. and Vederas J.C. (2014) Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins. *J Antibiot* **67**:23-30.
- Long D.H., Lee F.N., and TeBeest D.O. (2000) Effect of Nitrogen Fertilization on Disease Progress of Rice Blast on Susceptible and Resistant Cultivars. *Plant Disease* **84**:403-409.
- López-García B., Gandía M., Muñoz A., Carmona L., and Marcos J.F. (2010) A genomic approach highlights common and diverse effects and determinants of susceptibility on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to distinct antimicrobial peptides. *BMC Microbiology* **10**:289-305.
- López-García B., Harries E., Carmona L., Campos-Soriano L., López J.J., Manzanares P., Gandía M., Coca M., and Marcos J.F. (2015) Concatemerization increases the inhibitory activity of short, cell-penetrating, cationic and tryptophan-rich antifungal peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s00253-015-6541-1:1-11.
- López-García B., Pérez-Payá E., and Marcos J.F. (2002) Identification of novel hexapeptides bioactive against phytopathogenic fungi through screening of a synthetic peptide combinatorial library. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2453-2460.
- López-García B., San Segundo B., and Coca M.(2012) Antimicrobial Peptides as a Promising Alternative for Plant Disease Protection. In *Small Wonders: Peptides for Disease Control,ACS Symposium Series*.American Chemical Society, pp.263-294
- López-García B., Ubhayasekera W., Gallo R.L., and Marcos J.F. (2007) Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **356**:107-113.
- Lucas J.A., Solano B.R., Montes F., Ojeda J., Megias M., and Manero F.J.G. (2009) Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research* **114**:404-410.
- Lv Y., Wang J., Gao H., Wang Z., Dong N., Ma Q., and Shan A. (2014) Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36. *Plos One* **9**:e86364-
- Marcel S., Sawers R., Oakelev E., Angliker H., and Paszkowski U. (2010) Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* **22**:3177-3187.
- Marcos J.F. and Gandía M. (2009) Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opinion on Drug Discovery* **4**:659-671.
- Marcos J.F., Gandía M., Harries E., Carmona L., and Muñoz A.(2012) Antifungal peptides: exploiting non-lytic mechanisms and cell penetration properties. In *Small Wonders:*

- Peptides for Disease Control, ACS Symposium Series*. American Chemical Society, pp.337-357
- Marcos J.F., Muñoz A., Pérez-Payá E., Misra S., and López-García B. (2008) Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annual Review of Phytopathology* **46**:273-301.
- Marcus J.P., Green J.L., Goulter K.C., and Manners J.M. (1999) A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *The Plant Journal* **19**:699-710.
- Marmioli N. and Maestri E. (2014) Plant peptides in defense and signaling. *Peptides* **56**:30-44.
- Martinez-Ruiz A., Martínez d.P., Lacadena J., Mancheño J.M., Oñaderra M., and Gavilanes J.G. (1997) Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1340**:81-87.
- Marx F., Haas H., Reindl M., Stöffler G., Lottspeich F., and Redl B. (1995) Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**:167-171.
- Mathioni S.M., Patel N., Riddick B., Sweigard J.A., Czymmek K.J., Caplan J.L., Kunjeti S.G., Kunjeti S., Raman V., Hillman B.I., Kobayashi D.Y., and Donofrio N.M. (2013) Transcriptomics of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* in Response to the Bacterial Antagonist *Lysobacter enzymogenes* Reveals Candidate Fungal Defense Response Genes. *Plos One* **8**:e76487-
- Maurya I.K., Pathak S., Sharma M., Sanwal H., Chaudhary P., Tupe S., Deshpande M., Chauhan V.S., and Prasad R. (2011) Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides* **32**:1732-1740.
- McManus A.M., Nielsen K.J., Marcus J.P., Harrison S.J., Green J.L., Manners J.M., and Craik D.J. (1999) MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a greek key a-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins 1. *Journal of Molecular Biology* **293**:629-638.
- Mehrabi R., Ding S., and Xu J.R. (2014) MADS-Box Transcription Factor Mig1 Is Required for Infectious Growth in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryotic Cell* **7**:791-799.
- Mejía S. and Albertó E. (2013) Heat treatment of wheat straw by immersion in hot water decreases mushroom yield in *Pleurotus ostreatus*. *Revista Iberoamericana De Micología* **30**:125-129.
- Meng S., Xu H.L., and Wang F.S. (2010) Research Advances of Antimicrobial Peptides and Applications in Food Industry and Agriculture. *Current Protein & Peptide Science* **11**:264-273.
- Merrifield R.B., Merrifield E.L., Juvvadi P., Andreu D., and Boman H.G. (1994) Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Ciba Found Symp* **186**:5-20.
- Midura-Nowaczek K. and Markowska A. (2014) Antimicrobial Peptides and Their Analogs: Searching for New Potential Therapeutics. *Perspectives in Medicinal Chemistry* **6**:73-80.

- Mitchell T.K. and Dean R.A. (1995) The Camp-Dependent Protein-Kinase Catalytic Subunit Is Required for Appressorium Formation and Pathogenesis by the Rice Blast Pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **7**:1869-1878.
- Mizoi J. and Yamaguchi-Shinozaki K.(2013) Molecular approaches to improve rice abiotic stress tolerance. In *Rice Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Science+Business Media, LLC, pp.269-283
- Montesinos E., Badosa E., Cabrefiga J., Planas M., Feliu L., and Bardaji E.(1-1-2012) Antimicrobial Peptides for Plant Disease Control. From Discovery to Application. In *Small Wonders: Peptides for Disease Control, ACS Symposium Series*. American Chemical Society, pp.235-261
- Moreno A.B., Martínez del Pozo A., and San Segundo B. (2006) Biotechnologically relevant enzymes and proteins - Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**:883-895.
- Mori T., Takenaka K., Domoto F., Aoyama Y., and Sera T. (2013) Inhibition of Binding of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Rep to its Replication Origin by Artificial Zinc-Finger Protein. *Mol Biotechnol* **54**:198-203.
- Morton C.O., dos Santos S.C., and Coote P. (2007) An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Molecular Microbiology* **65**:494-507.
- Muñoz A., Gandía M., Harries E., Carmona L., Read N.D., and Marcos J.F. (2012a) Understanding the mechanism of action of cell-penetrating antifungal peptides using the rationally designed hexapeptide PAF26 as a model. *Fungal Biology Reviews* **26**:146-155.
- Muñoz A., López-García B., and Marcos J.F. (2006) Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**:3847-3855.
- Muñoz A., López-García B., Pérez-Payá E., and Marcos J.F. (2007) Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**:172-177.
- Muñoz A., Marcos J.F., and Read N.D. (2012b) Concentration-dependent mechanisms of cell penetration and killing by the de novo designed antifungal hexapeptide PAF26. *Molecular Microbiology* **85**:89-106.
- Nagarajkumar M., Jayaraj J., Muthukrishnan S., Bhaskaran R., and Velazhahan R. (2005) Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Microbiological Research* **160**:291-298.
- Nahirňak V., Almasia N.I., Hopp H.E., and Vazquez-Rovere C. (2012) Snakin/GASA proteins: Involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signaling & Behavior* **7**:1004-1008.

- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto S., Yamaguchi I., and Yoshida S. (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant Journal* **33**:887-898.
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., and Gozdzicka-Józefiak A. (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol* **59**:181-196.
- Newhouse A.E., Schrodt F., Liang H.Y., Maynard C.A., and Powell W.A. (2007) Transgenic American elm shows reduced Dutch elm disease symptoms and normal mycorrhizal colonization. *Plant Cell Reports* **26**:977-987.
- Ng-Choi I., Soler M., Güell I., Badosa E., Cabrefiga J., Bardaji E., Montesinos E., Planas M., and Feliu L. (2014) Antimicrobial peptides incorporating non-natural amino acids as agents for plant protection. *Protein and Peptide Letters* **21**:357-367.
- Nishimura M., Park G., and Xu J.R. (2003) The G-beta subunit MGB1 is involved in regulating multiple steps of infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology* **50**:231-243.
- Noutoshi Y., Ikeda M., Saito T., Osada H., and Shirasu K. (2012) Sulfonamides identified as plant immune-priming compounds in high-throughput chemical screening increase disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **31**:245-
- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., and Piater L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**:249-266.
- Oard S.V. and Enright F.M. (2006) Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Cell Rep* **25**:561-572.
- Ojha S. and Chatterjee N.C. (2011) Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. in biocontrol of fusarial wilt of tomato. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **44**:771-782.
- Okamoto M., Mitsuhashi I., Ohshima M., Natori S., and Ohashi Y. (1998) Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant and Cell Physiology* **39**:57-63.
- Ong Z.Y., Wiradharma N., and Yang Y.Y. (2014) Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews* **78**:28-45.
- Osusky M., Osuska L., Hancock R.E.W., Kay W.W., and Misra S. (2004) Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research* **13**:181-190.
- Osusky M., Zhou G., Osuska L., Hancock R.E.W., Kay W.W., and Misra S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology* **18**:1162-1166.
- Otvos L.Jr., O I, Rogers M.E., Consolvo P.J., Condie B.A., Lovas S., Bulet P., and Blaszczyk-Thurin M. (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**:14150-14159.

- Owens L.D. and Heutte T.M. (1997) A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:525-528.
- Padovan L., Scocchi M., and Tossi A. (2010) Structural Aspects of Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein & Peptide Science* **11**:210-219.
- Paine J., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., and Drake R. (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* **4**:482-487.
- Pantoja A, Fischer A, Correa Victoria F, Sanint L. R, Ramirez A, Tascón E, and Gacía E (1997). Manejo integrado de plagas en arroz eds. International Center of Tropical Agriculture. Cali, Colombia
- Park C.B., Kim H.S., and Kim S.C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**:253-257.
- Park C.B., Yi K.S., Matsuzaki K., Kim M.S., and Kim S.C. (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* **97**:8245-8250.
- Park G., Xue C., Zhao X., Kim Y., Orbach M., and Xu R.J. (2006) Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **18**:2822-2835.
- Park G., Xue C., Zheng L., Lam S., and Xu J.R. (2002) MST12 Regulates Infectious Growth But Not Appressorium Formation in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:183-192.
- Pinilla C., Appel J.R., Blanc P., and Houghten R.A. (1992) Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques* **13**:901-905.
- Pinilla C., Appel J.R., Campbell G.D., Buencamino J., Benkirane N., Muller S., and Greenspan N.S. (1998) All-d peptides recognized by an anti-carbohydrate antibody identified from a positional scanning library1. *Journal of Molecular Biology* **283**:1013-1025.
- Poreba M., Kasperkiewicz P., Snipas S.J., Fasci D., Salvesen G.S., and Drag M. (2014) Unnatural amino acids increase sensitivity and provide for the design of highly selective caspase substrates. *Cell Death Differ* **21**:1482-1492.
- Porto W.F. and Franco O.L. (2013) Theoretical structural insights into the snakain/GASA family. *Peptides* **44**:163-167.
- Powell W.A., Catranis C.M., and Maynard C.A. (1995) Synthetic antimicrobial peptide design. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**:792-794.

- Punja Z.K. (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23**:216-235.
- Qian Q., Huang L., Yi R., Wang S., and Ding Y. (2014) Enhanced resistance to blast fungus in rice (*Oryza sativa* L.) by expressing the ribosome-inactivating protein alpha-momorcharin. *Plant Science* **217–218**:1-7.
- Quilis J., Peñas G., Messeguer J., Brugidou C., and Sansegundo B. (2008) The *Arabidopsis* *AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact* **21**:1215-1231.
- Rajasekaran K., Cary J.W., Jaynes J.M., and Cleveland T.E. (2005) Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotechnology Journal* **3**:545-554.
- Rangarajan N., Bakshi S., and Weisshaar J.C. (2013) Localized Permeabilization of *E. coli* Membranes by the Antimicrobial Peptide Cecropin A. *Biochemistry* **52**:10-
- Rebollar A. and López-García B. (2013) PAF104, a synthetic peptide to control the rice blast disease by blocking the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**:1407-1416.
- Rebollar A., Marcos J.F., and López-García B. (2014) Screening of a synthetic peptide combinatorial library to identify inhibitors of the appressorium formation in *Magnaporthe oryzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **454**:1-6.
- Reed J.D., Edwards D.L., and Gonzalez C.F. (1997) Synthetic peptide combinatorial libraries: A method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:537-549.
- Ren X.Y., Kong Q.J., Wang H.L., Yu T., Tang Y.J., Zhou W.W., and Zheng X.D. (2012) Control of apple blue mold by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **35**:761-767.
- Roychoudhury S., Blondelle S., Collins S., Davis M., McKeever H., Houghten R., and Parker C. (1998) Use of combinatorial library screening to identify inhibitors of a bacterial two-component signal transduction kinase. *Mol Divers* **4**:173-182.
- Ruan W., Guo M., Cai L., Hu H., Li C., Liu Y., Wu Z., Mao C., Yi K., Wu P., and Mo X. (2015) Genetic manipulation of a high-affinity PHR1 target cis-element to improve phosphorous uptake in *Oryza sativa* L. *Plant Molecular Biology* **87**:429-440.
- Rudolph C., Schreier P.H., and Uhrig J.F. (2003) Peptide-mediated broad-spectrum plant resistance to tospoviruses. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* **100**:4429-4434.
- Ryder L.S., Dagdas Y.F., Mentlak T., Kershaw M.J., Thornton C.R., Schuster M., Chen J., Wang Z., and Talbot N.J. (2013) NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **19**:3179-3184.

- Sallaud C., Meynard D., van Boxtel J., Gay C., Bes M., Brizard J.P., Larmande P., Ortega D., Raynal M., Portefaix M., Ouwerkerk P.B.F., Rueb S., Delseny M., and Guiderdoni E. (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics* **106**:1396-1408.
- Schibli D.J., Hwang P.M., and Vogel H.J. (1999) Structure of the antimicrobial peptide tritrypticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry* **38**:16749-16755.
- Schneider T., Kruse T., Wimmer R., Wiedemann I., Sass V., Pag U., Jansen A., Nielsen A.K., Mygind P.H., Ravents D.S., Neve S., Ravn B., Bonvin A.M.J.J., De Maria L., Andersen A.S., Gammelgaard L.K., Sahl H.G., and Kristensen H.H. (2010) Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science* **328**:1168-1172.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B.M.A., Cammue B.P.A., and De Bolle M.F.C. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**:941-950.
- Sesma A. and Osbourn A.E. (2004) The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* **431**:582-586.
- Sharma A., Sharma R., Imamura M., Yamakawa M., and Machii H. (2000) Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Letters* **484**:7-11.
- Skamnioti P. and Gurr S.J. (2007) Magnaporthe grisea Cutinase2 Mediates Appressorium Differentiation and Host Penetration and Is Required for Full Virulence. *The Plant Cell* **19**:2674-2689.
- Slavokhotova A.A., Naumann T.A., Price N.P.J., Rogozhin E.A., Andreev Y.A., Vassilevski A.A., and Odintsova T.I. (2014) Novel mode of action of plant defense peptides hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases. *Febs Journal* **281**:4754-4764.
- Slusarenko A., Fraser R S, and Van Loon L. C. (2000).Mechanisms of Resistance to Plant Diseases eds.Kluwer Academic Publishers.Dordrecht
- Snyder A.B. and Worobo R.W. (2014) Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:28-44.
- Soanes D.M., Kershaw M.J., Cooley R.N., and Talbot N.J. (2002) Regulation of the MPG1 hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**:1253-1267.
- Song F. and Goodman R.M. (2001) Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**:1-11.
- Stec B. (2006) Plant thionins the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* **63**:1370-1385.
- Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H., and Boman H.G. (1981) Sequence and specificity of 2 anti-bacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**:246-248.

- Sterner O., Thines E., Eilbert F., and Anke H. (1998) Glisoprenins C, D and E, new inhibitors of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, from cultures of *Gliocladium roseum*. 2. Structure determination. *J Antibiot* **5**:228-231.
- Steyaert J.M., Ridgway H.J., Elad Y., and Stewart A. (2003) Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **31**:281-291.
- Studholme D.J., Harris B., Le Cocq K., Winsbury R., Perera V., Ryder L., Ward J.L., Beale M.H., Thornton C.R., and Grant M. (2013) Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture-insights from genomics. *Frontiers in Plant Science* **4**:258-
- Su Z.Z., Mao L.J., Li N., Feng X.X., Yuan Z.L., Wang L.W., Lin F.C., and Zhang C.L. (2013) Evidence for Biotrophic Lifestyle and Biocontrol Potential of Dark Septate Endophyte *Harpophora oryzae* to Rice Blast Disease. *Plos One* **8**:e61332-
- Sun J.N.N., Li W.S., Jang W.S., Nayyar N., Sutton M.D., and Edgerton M. (2008) Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by *Candida albicans* Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. *Molecular Microbiology* **70**:1246-1260.
- Takagaki M., Kaku K., Watanabe S., Kawai K., Shimizu T., Sawada H., Kumakura K., and Nagayama K. (2004) Mechanism of resistance to carpropamid in *Magnaporthe grisea*. *Pest Management Science* **60**:921-926.
- Takenaka K., Koshino-Kimura Y., Aoyama Y., and Sera T. (2007) Inhibition of tomato yellow leaf curl virus replication by artificial zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Symposium Series* **51**:429-430.
- Talbot N.J. (2003) On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* **57**:177-202.
- Talbot N.J., Kershaw M.J., Wakley G.E., de Vries O.M.H., Wessels J.G.H., and Hamer J.E. (1996) *MPGI* Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **8**:985-999.
- Tang G., Qin J., Dolnikowski G.G., Russell R.M., and Grusak M.A. (2009) Golden Rice is an effective source of vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition* **89**:1776-1783.
- Taniguchi S., Miyoshi S., Tamaoki D., Yamada S., Tanaka K., Uji Y., Tanaka S., Akimitsu K., and Gomi K. (2014) Isolation of jasmonate-induced sesquiterpene synthase of rice: Product of which has an antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Plant Physiology* **171**:625-632.
- Thines E., Anke H., and Weber R.W.S. (2004) Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycological Research* **108**:14-25.
- Thines E., Eilbert F., Sterner O., and Anke H. (1997) Glisoprenin A, an inhibitor of the signal transduction pathway leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea* on hydrophobic surfaces. *FEMS Microbiology Letters* **151**:219-224.

- Titarenko E., López-Solanilla E., García-Olmedo F., and Rodríguez-Palenzuela P. (1997) Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *Journal of Bacteriology* **179**:6699-6704.
- Tucker S.L., Besi M.I., Galhano R., Franceschetti M., Goetz S., Lenhert S., Osbourn A., and Sesma A. (2010) Common Genetic Pathways Regulate Organ-Specific Infection-Related Development in the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell* **22**:953-972.
- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., and Fischer R. (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**:570-578.
- Tyagi A.K., Kuhurana J., Kuhurana P., Raghuvanshi S., Gaur A., Kapur A., Gupta V., Kumar D., Ravi V., Vij S., Kuhurana P., and Sharma S. (2004) Structural and functional analysis of rice genome. *J Genet* **83**:79-99.
- Umemura K., Saotou J., Iwata M., Uozumi N., Koga J., Kawano T., Koshihara T., Anzai H., and Mitomi M. (2009) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance in rice plants. *Plant J* **57**:463-472.
- Urayama S.i., Sakoda H., Takai R., Katoh Y., Minh Le T., Fukuhara T., Arie T., Teraoka T., and Moriyama H. (2014) A dsRNA mycovirus, Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-B, suppresses vegetative growth and development of the rice blast fungus. *Virology* **448**:265-273.
- Usharani G, Kanchana D, and Jayanthi M (2014). *Pseudomonas fluorescens* on biocontrol of *Rhizoctonia solani* in rice eds.LAP LAMBERT Academic Publishing.New York
- Valent B. and Chumley F.G.(1994) Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. In Rice Blast Disease. In *Rice Blast Disease*, University Press, Cambridge, pp.111-134
- van der Weerden N.L., Hancock R.E.W., and Anderson M.A. (2010) Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *Journal of Biological Chemistry* **285**:37513-37520.
- Van Loon L.C. and Van Strien E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**:85-97.
- Veldhuizen E.J.A., Schneider V.A.F., Agustiandari H., van Dijk A., Tjeerdsma-van Bokhoven J.L.M., Bikker F.J., and Haagsman H.P. (2014) Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of PR-39 Derived Peptides. *Plos One* **9**:e95939-
- Veneault-Fourrey C., Barooah M., Egan M., Wakley G., and Talbot N.J. (2006) Autophagic Fungal Cell Death Is Necessary for Infection by the Rice Blast Fungus. *Science* **312**:580-583.
- Vila L., Lacadena V., Fontanet P., Martínez del Pozo A., and San Segundo B. (2001) A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**:1327-1331.

- Vilar M., Carbonell T., and Pérez-Payá E. (1998) Combined chemical and biomedicine: a new strategy in the development of antibiotics. *Rev Esp Quimioter* **11**:287-294.
- Waghu F.H., Gopi L., Barai R.S., Ramteke P., Nizami B., and Idicula-Thomas S. (2014) CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research* **42**:D1154-D1158.
- Wakabayashi H., Matsumoto H., Hashimoto K., Teraguchi S., Takase M., and Hayasawa H. (1999) N-Acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of Lactoferricin B showing improved antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**:1267-1269.
- Wakabayashi H., Yamauchi K., and Takase M. (2006) Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal* **16**:1241-1251.
- Wang C.W., Yip B.S., Cheng H.T., Wang A.H., Chen H.L., Chen J.W., and Lo H.J. (2009a) Increased potency of a novel d- β -naphthylalanine-substituted antimicrobial peptide against fluconazole-resistant fungal pathogens. *FEMS Yeast Research* **9**:967-970.
- Wang G.S., Li X., and Wang Z. (2009b) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* **37**:D933-D937.
- Wang G., Mishra B., Lau K., Lushnikova T., Golla R., and Wang X. (2015) Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals* **8**:123-150.
- Weber R.W., Walkey G.E., Thines E., and Talbot N.J. (2001) The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* **216**:101-112.
- Wei T., Ou B., Li J.B., Zhao Y., Guo D.S., Zhu Y.Y., Chen Z.L., Gu H.Y., Li C.Y., Qin G.J., and Qu L.J. (2013) Transcriptional Profiling of Rice Early Response to *Magnaporthe oryzae* Identified OsWRKYs as Important Regulators in Rice Blast Resistance. *Plos One* **8**:e59720-
- Wieprecht T., Beyermann M., and Seelig J. (1999) Binding of antibacterial magainin peptides to electrically neutral membranes: thermodynamics and structure. *Biochemistry* **38**:10377-10387.
- Wilson R.A. and Talbot N.J. (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* **7**:185-195.
- Wu G., Wang J., Yang Y., Dong B., Wang Y., Sun G., Yan C., Yan F., and Chen J. (2014) Transgenic rice expressing rice stripe virus NS3 protein, a suppressor of RNA silencing, shows resistance to rice blast disease. *Virus Genes* **48**:566-569.
- Wu S.F., Sun F.D., Qi Y.X., Yao Y., Fang Q., Huang J., Stanley D., and Ye G.Y. (2013) Parasitization by *Cotesia chilonis* Influences Gene Expression in Fatbody and Hemocytes of *Chilo suppressalis*. *Plos One* **8**:e74309-
- Xu J.R. and Hamer J.E. (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes & Development* **10**:2696-2706.

- Xu J.R., Urban M., Sweigard J.A., and Hamer J.E. (1997) The CPKA gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**:187-194.
- Xue C., Park G., Choi W., Zheng L., Dean R.A., and Xu J.R. (2002) Two Novel Fungal Virulence Genes Specifically Expressed in Appressoria of the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell* **14**:2107-2119.
- Yang H.Y., Tatebayashi K., Yamamoto K., and Saito H. (2009) Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *Embo Journal* **28**:1380-1391.
- Yang J.H., Liu H.X., Zhu G.M., Pan Y.L., Xu L.P., and Guo J.H. (2008) Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *Journal of Applied Microbiology* **104**:91-104.
- Yang L., Weiss T.M., Lehrer R.I., and Huang H.W. (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical Journal* **79**:2002-2009.
- Yara A., Yaeno T., Montillet J.L., Hasegawa M., Seo S., Kusumi K., and Iba K. (2008) Enhancement of disease resistance to *Magnaporthe grisea* in rice by accumulation of hydroxy linoleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **370**:344-347.
- Ye X., Al Babili S., Kloti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., and Potrykus I. (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm [see comments]. *Science* **287**:303-305.
- Yoon M.Y., Kim Y.S., Ryu S.Y., Choi G.J., Choi Y.H., Jang K.S., Cha B., Han S.S., and Kim J.C. (2011) In vitro and in vivo antifungal activities of decursin and decursinol angelate isolated from *Angelica gigas* against *Magnaporthe oryzae*, the causal agent of rice blast. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **101**:118-124.
- Yoshioka K., Nakashita H., Kleesig D.F., and Yamaguchi I. (2001) Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *Plant J* **25**:149-157.
- Yu H.Y., Tu C.H., Yip B.S., Chen H.L., Cheng H.T., Huang K.C., Lo H.J., and Cheng J.W. (2011) Easy Strategy To Increase Salt Resistance of Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**:4918-4921.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K.S., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., Cao M., Liu J., Sun J., Tang J., Chen Y., Huang X., Lin W., Ye C., Tong W., Cong L., Geng J., Han Y., Li L., Li W., Hu G., Huang X., Li W., Li J., Liu Z., Li L., Liu J., Qi Q., Liu J., Li L., Li T., Wang X., Lu H., Wu T., Zhu M., Ni P., Han H., Dong W., Ren X., Feng X., Cui P., Li X., Wang H., Xu X., Zhai W., Xu Z., Zhang J., He S., Zhang J., Xu J., Zhang K., Zheng X., Dong J., Zeng W., Tao L., Ye J., Tan J., Ren X., Chen X., He J., Liu D., Tian W., Tian C., Xia H., Bao Q., Li G., Gao H., Cao T., Wang J., Zhao W., Li P., Chen W., Wang X., Zhang Y., Hu J., Wang J., Liu S., Yang J., Zhang G., Xiong Y., Li Z., Mao L., Zhou C., Zhu Z., Chen R., Hao B., Zheng W., Chen S., Guo W., Li G., Liu S., Tao M., Wang J., Zhu L., and Yang H. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**:79-92.
- Yu Q., Lehrer R.I., and Tam J.P. (2000) Engineered salt-insensitive alpha-defensins with end-to-end circularized structures. *Journal of Biological Chemistry* **275**:3943-3949.

- Zanetti M. (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology* **75**:39-48.
- Zarandi M.E., Bonjar G.H.S., Dehkaei F.P., Moosavi A.A., Farokhi S.R., and Aghighi S. (2009) Biological Control of Rice Blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in Greenhouse. *American Journal of Applied Sciences* **6**:194-199.
- Zasloff M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* **84**:5449-5453.
- Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389-395.
- Zeitler B., Herrera Diaz A., Dangel A., Thellmann M., Meyer H., Sattler M., and Lindermayr C. (2013) De-Novo Design of Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Plos One* **8**:e71687-
- Zhang H., Zhao B., Huang C., Meng X.M., Bian E.B., and Li J. (2014) Melittin Restores PTEN Expression by Down-Regulating HDAC2 in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Plos One* **9**:e95520-
- Zhang Z.T. and Zhu S.Y. (2009) Drosomycin, an essential component of antifungal defence in *Drosophila*. *Insect Molecular Biology* **18**:549-556.
- Zhao L. and Lu W. (2014) Defensins in innate immunity. *Current Opinion in Hematology* **21**:37-42.
- Zhao X., Kim Y., Park G., and Xu J.R. (2005) A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Regulating Infection-Related Morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **17**:1317-1329.
- Zhao X., Mehrabi R., and Xu J.-R. (2007) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. *Eukaryotic Cell* **6**:1701-1714.
- Zheng W., Chen J., Liu W., Zheng S., Zhou J., Lu G., and Wang Z. (2007) A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Eukaryotic Cell* **6**:2240-2250.
- Zhou X., Zhao X., Xue C., Dai Y., and Xu J.R. (2014) Bypassing both surface attachment and surface recognition requirements for appressorium formation by overactive ras signaling in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**:996-1004.