ATTI *Giornate Fitopatologiche*, 2000, 2, 283-290

# BIOSINTESI DI PROTEINE PR IN GIRASOLE (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) TRATTATO CON ALCUNI INDUTTORI E INOCULATO CON *PLASMOPARA HELIANTHI* NOVOT.

L. TOSI, R. LUIGETTI, A. ZAZZERINI
Dipartimento di Arboricoltura e Protezione delle Piante - Università degli Studi di Perugia
Borgo XX Giugno, 74 - 06121 Perugia - Italy - E-mail: patveg@unipg.it

## RIASSUNTO

Tre induttori, l'acido salicilico (AS), l'acido DL-β-aminobutanoico (BABA) e l'estere S-metilico dell'acido benzo-(1,2,3)-tiadiazolo-7-carbotioico (BTH), sono stati saggiati per valutare la capacità di indurre la biosintesi di proteine PR nell'interazione girasole - *Plasmopara helianthi*. Trattamenti di dischi fogliari con SA e BTH portano alla sintesi di almeno otto proteine, due delle quali PR-1 (17 kD) e PR-5 (24 kD), correlate sierologicamente con le proteine PR del tabacco. Per entrambi gli induttori, le nuove proteine vengono prodotte tra uno e quattro giorni dall'inizio del trattamento. Anche il trattamento al terreno con BTH, in presenza ed in assenza di *P. helianthi*, induce la sintesi della proteina correlata sierologicamentre con la PR-5 del tabacco. Il trattamento con BABA di dischi fogliari, come pure la somministrazione al terreno, non hanno invece indotto biosintesi di nuove proteine rilevabili con le metodiche analitiche impiegate.
**Parole chiave:** acido salicilico, acido DL-β-aminobutanoico, acibenzolar-S-metil, resistenza indotta, girasole.

## .SUMMARY

OCCURRENCE OF PR PROTEINS IN SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) TREATED WITH SOME PLANT ACTIVATORS AND INOCULATED WITH *PLASMOPARA HELIANTHI* NOVOT.

Three plant activators, salicylic acid (SA), DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) and benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S methyl ester (BTH) were tested to evaluate the production of PR proteins in the host-parasite combination sunflower - *Plasmopara helianthi*. At least eight proteins, two of them PR1 (17kD) and PR5 (24kD) serologically linked to the tobacco PR proteins were induced by SA and BTH in sunflower leaf discs. These proteins are induced by both activators in one and four days after the onset of the treatment. Also the treatment with BTH as a soil drench, with and without *P. helianthi*, induces the production of the protein serologically linked to the tobacco PR5 protein. No proteins, induced by BABA treatments of leaf discs as well as soil drench, were detected with the analytical methods used.
**Key words:** salicylic acid, DL-β-amino-n-butyric acid, acibenzolar-S-methyl, induced resistance, sunflower.

## INTRODUZIONE

Studi relativamente recenti hanno evidenziato che l'induzione di resistenza nelle piante verso i patogeni può essere ottenuta con l'uso di sostanze chimiche, sia di origine naturale come l'acido salicilico (White, 1979; Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Kessmann *et al.*, 1994) sia sintetica come l'acido 2, 6-dicloro isonicotinico (INA), gli isomeri dell'acido amminobutirrico e l'estere metilico dell'acido benzo-(1,2,3)-tiadiazolo-7-carbotioico (BTH) (Metraux *et al.*, 1991; Cohen, 1993; Cohen e Gisi, 1994; Cohen *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996/a). Questi prodotti sono in grado di proteggere molte specie vegetali, mono e dicotiledoni, da agenti fungini e batterici sia in condizioni controllate che in pieno campo (Kessmann *et al.*, 1994; Kessmann *et al.*, 1996; Ruess *et al.*, 1996; Gorlach *et al.*, 1996). Ricerche biochimiche hanno in seguito dimostrato che trattamenti con questi composti, analogamente ad attacchi di patogeni e/o a situazioni di stress abiotici di vario tipo, conducono nelle piante alla biosintesi di proteine PR (White, 1979; Cohen *et al.*, 1994, Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996/a; Goerlach *et al.*, 1996).

Recentemente l'induzione di resistenza, con l'uso di BABA (acido DL-β-amino-n-butanoico) e BTH (estere S-metilico dell'acido benzo-(1,2,3)-tiadiazolo-7-carbotioico (CGA 245704) è stata ottenuta per la prima volta nell'interazione girasole - *Plasmopara helianthi* Novot. Entrambi i composti, privi di attività tossica *in vitro* nei confronti del patogeno, proteggono efficacemente le piantine di girasole sia da infezioni radicali che cotiledonari (Tosi *et al.*, 1998; 1999). Produzione di proteine PR è stata dimostrata anche in girasole a seguito di trattamenti con acido salicilico (Jung *et al.*, 1993) e di stress abiotici (Jung *et al.*, 1995); inoltre biosintesi di differenti isoenzimi con attività chitinasica e β-1,3-glucanasica è stata osservata come conseguenza di infezioni peronosporiche (Cachinero *et al.*, 1996).

Scopo del presente lavoro è stato pertanto quello di verificare se trattamenti con i suddetti induttori portino nel girasole, oltre che all'induzione di resistenza, anche alla biosintesi di proteine PR.

## MATERIALI E METODI

**Pianta**

Tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando cotiledoni, foglie vere e/o dischi di foglie prelevati da piantine di girasole (cv Ala) allevate in vasi di plastica (diametro 12 cm) contenenti una miscela sterilizzata di sabbia e torba (1:1, v:v), in ragione di 600 g terreno/vaso. Le piante, fertilizzate con 20-5-10 (N-P-K) una volta per settimana, sono state mantenute in una cella climatica alle seguenti condizioni: temperatura giorno/notte 20/18°C ± 2°C, umidità relativa giorno/notte 60-70%, fotoperiodo di 12 ore di luce (180 $\mu E/m^2s$) per tre settimane.

**Inoculo del patogeno**

L'isolato di *P. helianthi* (razza 1 o razza 'Europea') è stato mantenuto inoculando semi pregerminati della cultivar suscettibile "Ala" ed allevando le piantine in vasi contenenti agriperlite nelle condizioni sopra riportate. Dopo due settimane le piantine venivano poste in ambiente saturo di umidità per favorire la sporulazione del patogeno (Cohen e Sackston, 1973). Successivamente, gli zoosporangi (e zoosporangiofori) venivano raccolti delicatamente da cotiledoni e foglie vere e sospesi in acqua distillata.

L'inoculazione radicale delle piantine, effettuata negli esperimenti successivi, è stata ottenuta irrorando il terreno (20ml/vaso) con una sospensione di zoosporangi (700 zoosporangi/g terreno) cinque giorni dopo la semina.

**Induttori**

Sono stati saggiati i seguenti induttori: acido salicilico (AS), acido DL-β-aminobutanoico (BABA), prodotti dalla ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, U.S.A. ed estere S-metilico dell'acido benzo-(1,2,3)-tiadiazolo-7-carbotioico (BTH), granuli dispersibili al 50% di p.a. (CGA 245704) fornito dalla Novartis.

**Estrazione e ottenimento del fluido di lavaggio intercellulare**

Tutto il materiale vegetale è stato immediatamente analizzato o conservato a -20°C per l'estrazione, e a 4°C, (entro tre giorni) per l'infiltrazione sotto vuoto. Un grammo di materiale vegetale è stato estratto a freddo (4°C), in mortaio con sabbia di mare, con 2 ml di tampone acetato 0,5M, pH 5,2 contenente β-mercaptoetanolo 0,1% (tampone di estrazione) e successivamente centrifugato (10000 rpm, 4°C). Il fluido di lavaggio intercellulare è stato ottenuto infiltrando sotto vuoto un grammo di materiale vegetale con il tampone di estrazione, asciugando accuratamente e centrifugando (3000 rpm) a temperatura ambiente .

**Dialisi**

Tutti i campioni sono stati sottoposti a dialisi contro il tampone di estrazione a concentrazione inferiore (20mM) per un'intera notte a 4°C.

**Elettroforesi su gel in condizioni denaturanti (SDS PAGE)**

L'elettroforesi è stata eseguita su 'slab gel' (0,75 mm) secondo il metodo di Laemmli (1970) utilizzando uno 'stacking gel' al 5% (pH 6,8) e un 'resolving gel' al 12% (pH 8,8) ed analizzando 20 $\mu$l per ciascun campione. Le bande proteiche sono state visualizzate tramite colorazione al nitrato di argento (Blum *et al.*, 1987); il gel è stato fissato in acido tricloroacetico al 20% per due ore ed in etanolo al 50% (2 volte per 30 min), lavato in acqua, sensibilizzato con glutaraldeide al 7% per 30 min, lavato in acqua, incubato con nitrato di argento per 15 min a 37°C, nuovamente lavato in acqua per 1 min ed incubato in formammide (0,035%) contenente carbonato di sodio al 3%. L'elettroforesi su gel in condizioni non denaturanti (NATIVE PAGE) è stata eseguita con lo stessa metodica omettendo il sodiododecilsolfato e impiegando nel 'resolving gel' acrilamide al 10%.

**Analisi 'western'**

Le proteine contenute nel gel sono state elettrotrasferite per 2 ore a 4°C su un foglio di nitrocellulosa (pori 0,45 $\mu$m) in una soluzione tampone contenente tris 25mM, glicina 192mM e metanolo 20% v/v (pH 7,5) ad un voltaggio costante di 200 V. Le proteine fissate su nitrocellulosa sono poi state visualizzate previa incubazione con latte in polvere (5%) per 30 min a temperatura ambiente, quindi con l'anticorpo primario per l'intera notte a 4°C e successive reazioni rispettivamente con l'anticorpo secondario coniugato con una fosfatasi alcalina (Sigma) e con il relativo substrato (reazione colorimetrica) (Sigma). Sono stati utilizzati quattro anticorpi policlonali, da coniglio, ottenuti dalle seguenti proteine PR del tabacco: PR 1b (Kauffmann, 1988), PR O (Kauffmann *et al.*, 1987), PR Q (Legrand *et al.*, 1987) e PR S (Kauffamann *et al.*, 1990) rispettivamente appartenenti alle classi PR-1, PR-2, PR-3 e PR-5. Gli anticorpi per le proteine PR O, PR Q e PR S sono stati utilizzati alla diluizione 1/2000 mentre l'anticorpo per la proteina PR 1b è stato impiegato alla diluizione 1/200.

**Piano sperimentale**

**Esp. 1 - Trattamento con i tre induttori di dischi di foglie di girasole**

I dischi (diametro 1 cm), ottenuti da foglie vere prelevate dal 2° palco di piantine allevate per tre settimane, sono stati posti a galleggiare in piastre Petri (diametro 8 cm) contenenti 25 ml di una soluzione tampone MOPS 20mM (pH 7,5) e addizionate rispettivamente con AS (5mM), con BABA (2000$\mu$g/ml), BTH (70$\mu$g/ml) e solo tampone (testimone). Dieci dischi per piastra sono stati successivamente prelevati ogni 24 ore per sette giorni consecutivi per essere sottoposti alle analisi sopra descritte.

**Esp. 2 - Trattamento al terreno con BABA e BTH di piantine di girasole inoculate con *P. helianthi***

BABA e BTH sono stati distribuiti al terreno in ragione di 30 ml/vaso rispettivamente quattro e due giorni dopo la semina. Per ciascun trattamento, compreso quello testimone con acqua, metà delle piantine è stata successivamente inoculata con *P. helianthi* (5 gg. dopo la semina). Dopo dieci e quindici giorni dalla semina sono stati prelevati dalle piantine rispettivamente i cotiledoni e le prime foglie vere per sottoporre entrambi alle analisi sopra riportate.

**Esp. 3 - Trattamento fogliare con BABA e BTH di piantine di girasole inoculate con *P. helianthi***

BABA e BTH sono stati somministrati, sulle prime foglie vere di piantine di girasole, rispettivamente a 2000$\mu$g/ml (BABA) e 100$\mu$g/ml (BTH) quattordici giorni dopo la semina. Per ciascun trattamento, compreso quello testimone con acqua, metà delle piantine sono state inoculate con *P. helianthi* (5 gg. dopo la semina). Le foglie appartenenti al primo e al secondo palco sono state prelevate diciannove giorni dopo la semina per essere analizzate con le metodiche sopra citate.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti due volte.

## RISULTATI

Esp. 1 - L'intera frazione di proteine solubili in ambiente acido (pH 5,2) dei dischi fogliari trattati con i tre induttori, a 0 e 5 giorni dal trattamento, analizzata con elettroforesi in condizioni denaturanti ha evidenziato che AS e BTH inducono la produzione di almento otto proteine (Fig. 1) con peso molecolare compreso tra 10 e 32 kD, mentre nessuna proteina veniva rilevata a seguito del trattamento con BABA. Analoghi risultati sono stati ottenuti sottoponendo i campioni ad elettroforesi in condizioni non denaturanti e all'estrazione del fluido di lavaggio intercellulare, indicando in quest'ultimo caso che le proteine vengono secrete, almeno in parte, negli spazi intercellulari.

L'analisi SDS PAGE di campioni prelevati ogni giorno per sette giorni dall'inizio del trattamento ha inoltre evidenziato che sia nei dischi fogliari trattati con AS che in quelli trattati con BTH le nuove proteine vengono sintetizzate tra uno e quattro giorni dall'inizio dell'esperimento.

L'analisi 'western', condotta per l'identificazione delle proteine, ha messo in evidenza che nessuno dei quattro anticorpi saggiati reagisce con i campioni ottenuti dai dischi fogliari trattati con BABA, mentre due delle proteine sintetizzate in risposta ai trattamenti con AS e BTH (peso molecolare rispettivamente 17 e 24 kD), risultano sierologicamente correlate rispettivamente alle proteine del tabacco appartenenti alle classi PR-1 (Fig. 2) e PR-5 (Fig. 3). L'analisi dei campioni da dischi fogliari trattati con BTH, estratti giornalmente per sette giorni, ha inoltre permesso di stabilire che le due proteine vengono sintetizzate rispettivamente a partire dal secondo e terzo giorno dall'inizio del trattamento (Figg. 4 e 5). Nessuna reazione è stata osservata utilizzando gli anticorpi per le proteine appartenenti alle classi PR-2 e PR-3.

Esp. 2 - L'analisi elettroforetica in condizioni denaturanti ha mostrato un incremento nella quantità di proteine solubili a pH 5,2, in estratti ottenuti da cotiledoni e foglie vere di piantine di girasole trattate al terreno con BTH, sia in presenza che in assenza del patogeno, rispetto a piante testimone e piante trattate con BABA.

La successiva analisi 'western' di estratti da cotiledoni e foglie vere di piantine trattate al terreno con BTH, sia in presenza che in assenza del patogeno, ha evidenziato che dei quattro anticorpi saggiati solo quello relativo alla proteina appartenente alla classe PR-5 reagiva con una banda proteica di circa 24 kD, corrispondente a quella ottenuta con trattamento dei dischi fogliari (Fig. 6). Nessuno degli anticorpi utilizzati ha invece reagito con estratti da campioni ottenuti da piante testimone e da piante trattate con BABA.

Esp. 3 - L'analisi elettroforetica in condizioni denaturanti e l'analisi 'western' non hanno invece evidenziato biosintesi di nuove proteine quando entrambi gli induttori venivano impiegati in trattamenti fogliari di piantine di girasole sia in presenza che in assenza di *P. helianthi.*

## DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti emerge quanto segue: (1) trattamenti con AS e BTH inducono anche in girasole la biosintesi di almeno otto proteine due delle quali PR-1 (17kD) e PR-5 (24 kD) correlate sierologicamente con le proteine PR del tabacco; (2) per entrambi gli induttori simile è anche il tempo necessario alla rilevazione delle singole proteine nei tessuti fogliari (tra 1 e 4 giorni dall'inizio del trattamento); (3) anche il trattamento al terreno con BTH, in presenza e in assenza del patogeno, induce la sintesi della proteina correlata sierologicamente con la PR-5 del tabacco; (4) in tutti gli esperimenti il trattamento con BABA non ha invece portato alla biosintesi di nuove proteine rilevabili con i metodi analitici utilizzati.

E' interessante rilevare a questo proposito che le analogie di comportamento osservate nei trattamenti con AS e BTH riconfermano che il BTH è un analogo funzionale dell'acido salicilico e che ad esso si sostituisce nell'attivazione del sistema di segnalazione sistemico che porta all'induzione di resistenza, come riportato anche da altri Autori (Lawton *et al.*, 1996a; b; Go-

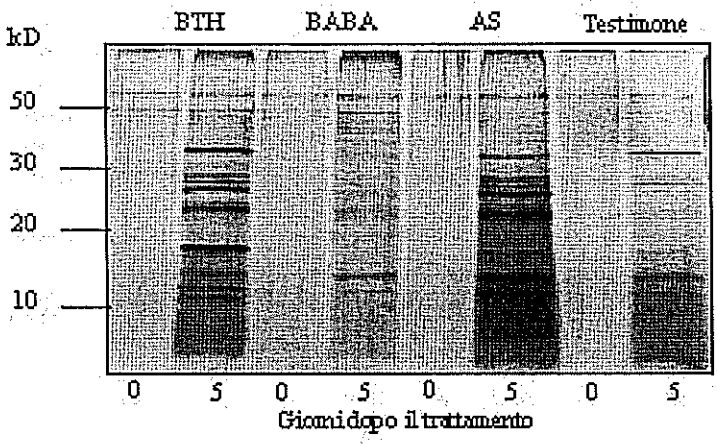


Fig. 1 -Proteine prodotte in dischi di foglie di girasole trattate con BTH, BABA e AS.

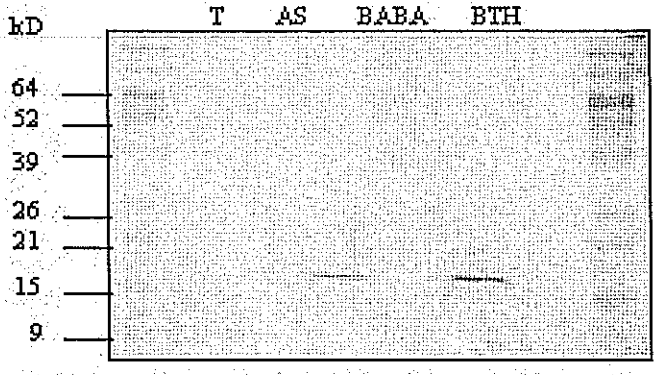


Fig. 2 - Analisi "western" (PR-1) di dischi di foglie di girasole trattati con AS, BABA e BTH.

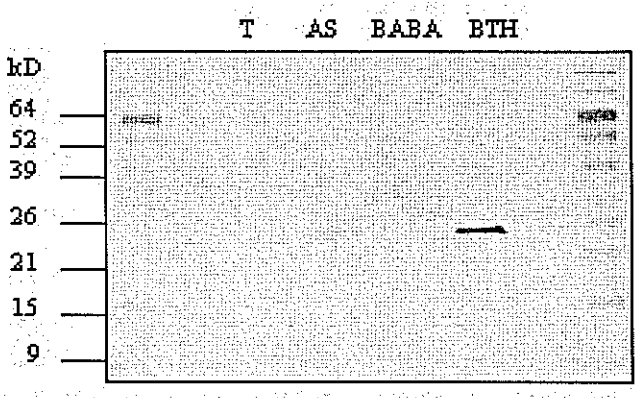


Fig. 3 - Analisi "western" (PR-5) di dischi di foglie di girasole trattati con AS, BABA e BTH.

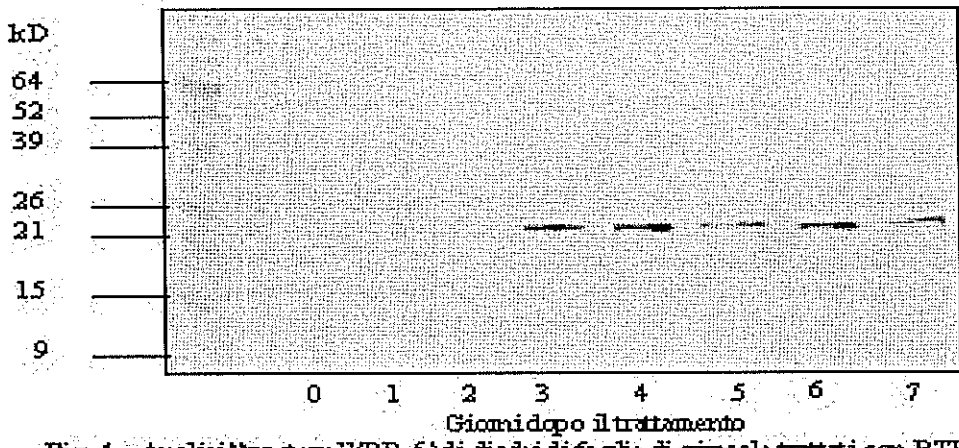


Fig. 4 - Analisi "western" (PR-5) di dischi di foglie di girasole trattati con BTH.

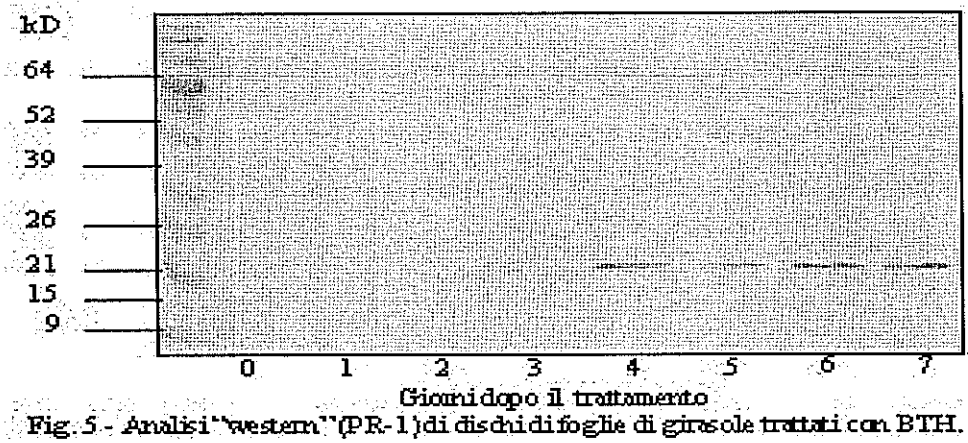


Fig. 5 - Analisi "western" (PR-1) di dischi di foglie di girasole trattati con BTH.

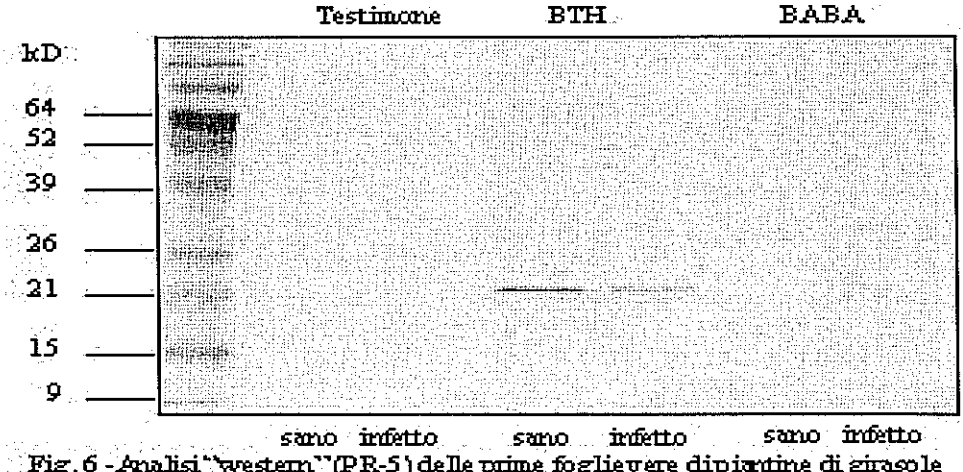


Fig. 6 - Analisi "western" (PR-5) delle prime foglie vere di piantine di girasole trattate con BTH e BABA in assenza (sano) e in presenza di *P. helianthi* (infetto).

erlach *et al.*, 1996). Malgrado Jung *et al.* (1993) abbiano rinvenuto in dischi fogliari di girasole trattati con acido salicilico oltre a proteine correlate sierologicamente con le classi PR-1 e PR-5 anche quelle appartenenti alle classi PR-2 e PR-3, il mancato rilevamento di queste ultime proteine, nel presente lavoro, potrebbe essere imputato all'uso della cv Ala di girasole anziché alla varietà 300 B, impiegata dai sopra citati Autori.

In trattamenti al terreno dove il BTH, a parità di dosaggi, si è dimostrato anche più efficace del BABA nell'indurre resistenza nell'interazione girasole - *P. helianthi* (Tosi *et al.*, 1998; 1999), si è evidenziata la sintesi della sola proteina correlata sierologicamente con la PR-5 del tabacco e non di quella correlata con la PR-1. La produzione di altre proteine PR come pure la PR-1 non può comunque essere completamente esclusa e va tenuto presente che gli anticorpi utilizzati sono stati ottenuti da tabacco per cui la specificità di legame con le proteine del girasole non è molto alta come si evince anche dalla maggiore concentrazione degli anticorpi primari necessaria con il girasole rispetto alle prove con il tabacco (Jung *et al.*, 1993).

Il mancato rilevamento di proteine di nuova sintesi in trattamenti fogliari potrebbe essere imputato, oltre che alle motivazioni appena riportate, anche al fatto di aver eseguito le analisi su foglie più vecchie rispetto a quelle utilizzate negli Esp. 1 e 2 ed anche alla minore concentrazione del BTH impiegato nel trattamento fogliare rispetto a quello utilizzato per trattamento dei dischi fogliari e del terreno ( Kessmann *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda il BABA va rilevato che questo aminoacido, al contrario di quanto osservato in questa interazione ospite-patogeno è invece in grado di indurre la produzione di proteine PR in tabacco (Lothan e Fluhr, 1990) e in pomodoro (Cohen e Gisi, 1994; Cohen *et al.*, 1994).

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Sig. M. Vignaroli per la preziosa collaborazione tecnica, il Prof. Bernard Fritig, Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du Centre National de la Recherche Scientifique et Universitè Louis Pasteur, 12 Rue du Général Zimmer, 67048 Strasbourg, France e il Dr. R. Liguori [Novartis, Protezione piante, 21040 Origgio (VA), Italia] per aver gentilmente fornito rispettivamente gli anticorpi primari e il BTH (CGA 245704). Lavoro eseguito con un contributo M.U.R.S.T. (*ex* quota 60%).

## LAVORI CITATI

BLUM H., BEIER H., GROSS H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gel. *Electrophoresis*, 8, 93-99.

CACHINERO J.M., JORRIN J., TENA M.,1996. Induction of different chitinase and β–1,3-glucanase isoenzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings in response to infections by *Plasmopara halstedii*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 401-405.

COHEN Y., SACKSTON W., 1973. Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Bot.*, 51, 15-22.

COHEN Y, Gisi U., 1994. Systemic translocationof 14 C DL-3-amino-n-butanoic acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 45, 441-456.

COHEN Y., 1993. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acid. *Phytopathology*, 84, 55-59.

COHEN Y., NIDERMAN T., MOSINGER E., FLUHR R., 1994. β-aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.*, 104,59-66.

FRIEDRICH L., LAWTON K., RUESS W., MASNER P., SPECKER N., GUT RELLA M., MEIER B., DINCHER S., STAUB T., UKNES S., METRAUX J.P., KESSMANN H., RYALS J., 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal*, 10, 61-70.

GOERLACH J., VOLTRATH S., KNAUF-BEITER G., HENGY G., BECKHOVE U., KOGEL K.H., OOSTENDORP M., STAUB T., WARD E., KESSMANN H., RYALS J., 1996. Benzothiadiazole, a

novel class of inducers of resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8, 629-643.
JUNG L.J., FRITIG B., HAHNE G., 1993. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins: induction by aspirin (acetyl salicylic acid) and characterization. *Plant Physiol.*, 101, 873-880.
JUNG L.J., MAUREL S., FRITIG B., HAHNE G., 1995. Different pathogenesis-related proteins are expressed in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to physical, chemical and stress factors. *Plant Physiol.*, 145, 153-160.
KAUFFMAMM S., LEGRAND M., FRITIG B., 1990. Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 14, 381-390.
KAUFFMANN S., 1988. Les Proteins PR (pathogenesis-related) du tabac: des protéines impliquées dans les reactions de défense aux agents phytopathogénes. Isolement, propriétés sérologiques et activitiés biologiques. PhD Thesis. University Louis Pasteur, Strasbourg, France.
KAUFFMANN S., LEGRAND M., GEOFFROY P., FRITIG B., 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins. Four PR-proteins of tobacco have 1,3 β glucanase activity. *EMBO Journal*, 6, 3209-3212.
KESSMANN H., OOSTENDORP M., STAUB T., GOERLACH J., FRIEDRICH L., LAWTON K., RYALS J., 1996. Mode of action of a new plant activator. *Brighton Crop Protection Conference*, 8A-4, 961-966.
KESSMANN H., STAUB T., HOFMANN C., MAETZKE T., HERZOG J., WARD E., UKNES S., RYALS J., 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 439-459.
LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
LAWTON K., FRIEDICH L., HUNT M., WEIMANN K., DELANEY T., KESSMANN H., STAUB T. RYALS J., 1996/a. Benzothiadiazole inducesdisease resistance in Arabidopsis by activation of the acquires systemic resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal*, 10, 71-82.
LAWTON K., WEYMANN K., FRIEDRICH L., HUNT M., NEUENSCHWANDER U., STEINER H.Y., MALEK K., UKNES S., RYALS J., KESSMANN H., 1996/b. Systemic acquired resistance signal transduction. *Brighton Crop Protection Conference*, 8A-5, 967-972.
LEGRAND M., KAUFFMANN S., GEOFFROY P. , FRITIG B., 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins. Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* U.S.A., 84, 6750-6754.
LOTHAN T., FLUHR R., 1990. Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethilene pathway for induction. *Plant Physiol.*, 93, 811-817.
MALAMY J., CAR J.P., KLESSING D.F., RASKIN I., 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance responce of tobacco to viral infection. *Science*, 250, 1002-1004.
METRAUX J.P., AHLGOY T., STAUB T., SPEICH A., STEINEMANN A., RYALS J., WARD E., 1991. Induction of resistance in cucumber in responce to 2,6 -dichloroisonicotinic acid and pathogens. *In*: Advances in molecular genentics of plant microbe interactions (Hennecke H., Verma D.P.S. coord.). Vol. 1, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 432-439.
METRAUX J.P., SIGNER H., RYALS E., WARD M., WISS-BENZ M., GAUDIN J., RASCHDORF K., SCHMID E., BLUM W., INVERARDI B., 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250, 1004-1005.
RUESS W., MUELLER K., KNAUF-BEITER G., KUNZ W., STAUB T., 1996. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. *Brighton Crop Protection Conference*, 2A-6, 53-60.
TOSI L., LUIGETTI R., ZAZZERINI A., 1998. Induced resistance against *Plasmopara helianthi* in sunflower plants by DL-β amino-n-butyric acid. *J. Phytopathology*, 146, 295-299.
TOSI L., LUIGETTI R., ZAZZERINI A., 1999. Benzothiadiazole induces resistance to *Plasmopara helianthi* in sunflower plants. *J. Phytopathology*, 147, 365-370.
WHITE R.F., 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99, 410-412.