

Trabajo de revisión

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (pr) en plantas

S. PÉREZ

Agrupación de Plantas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1989

Aprobado en octubre de 1989

INTRODUCCION

Las plantas, a diferencia de otros organismos superiores como los animales, no cuentan con la posibilidad de defensa que ofrece la locomoción; en su evolución han sido dotadas de sistemas y elementos que les permiten resistir la agresión en el lugar, en lucha cuerpo a cuerpo con el agente agresor. Por tal razón es lógico que ellas posean complejos mecanismos para enfrentar la agresión. Se han descrito sofisticados elementos de defensa contra diferentes patógenos en algunas especies de plantas, sin embargo, muy poco se conoce de estos mecanismos y de otros muchos que deben existir en las plantas para enfrentar a los elementos agresores, tanto físicos como químicos o biológicos, que se manifiestan en sus alrededores y lograr mantener el equilibrio necesario para la vida.

Los avances que han tenido las metodologías para el estudio de la biología molecular de plantas, han permitido internarse en la comprensión de las bases moleculares que componen algunos mecanismos de defensa de las plantas contra los stress ambientales. En este sentido, los primeros reportes que

describen el comportamiento molecular de las plantas como respuesta a un patógeno datan de principios de la década de los años 70, con los trabajos de Van Loon y Van Kammen (1970), en los cuales se observó la aparición de proteínas de la planta inducidas por la infección del virus del mosaico del tabaco (TMV).

En el transcurso de dicha década, un grupo de evidencias experimentales relacionaron estas proteínas con un posible mecanismo de defensa de la planta y con la aparición en esta de una "inmunidad inespecífica adquirida" al observarse en la planta agredida un incremento en la resistencia al ataque de un nuevo patógeno (Gianinazzi, 1983; Gianinazzi y Kassanis, 1974; Van Loon, 1977; White, 1979). Cuando se realizaban estas observaciones, a las proteínas de plantas inducidas por el ataque de un patógeno (o de productos químicos que producen semejante tipo de resistencia) se les comenzó a identificar de forma genérica como proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR (del inglés *pathogenesis-related*).

Las proteínas agrupadas dentro de esta definición tan genérica, comprenden un alto número de polipéptidos aparentemente

comunes para diferentes especies de plantas e inducidas de forma similar por diferentes patógenos y con una diversidad grande de funciones. Algunas han sido ya parcialmente identificadas en su función y otras son aún totalmente desconocidas, pero sin duda este conjunto de proteínas desempeña un papel esencial en los mecanismos de defensa de las plantas.

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS PR

En la actualidad existen un gran número de reportes de caracterización de proteínas PR obtenidas en diferentes cultivos e inducidas por diferentes factores.

Factores muy diversos se han encontrado como inductores de proteínas PR, entre estos, muchos patógenos como: virus, viroides, bacterias y hongos; diferentes productos químicos y hormonas vegetales; estados fisiológicos de la planta; daño mecánico y stress osmótico (Ohashi y Matsuoka, 1985; Gianinazzi *et al.*, 1980; Camacho-Henríquez y Sanger, 1982; Gessler y Kuc, 1982; Fraser, 1981; Van Loon, 1976).

Entre los cultivos en que se han reportado hasta el momento proteínas PR se encuentran: tabaco (Van Loon y Van Kammen, 1970); guisantes (Çoutts, 1978); pepino (Tas y Petters, 1977; Wagih y Couth, 1982 b; Gessler y Kuc, 1982); tomate (de Wit y Bakker, 1980; Camacho-Henríquez y Sanger, 1982); frijol (Abu-Jawdah, 1982); amaranto (Redolfi *et al.*, 1982; White *et al.*, 1987); maíz (Nasser *et al.*, 1988); centeno y otras gramíneas (White *et al.*, 1987) y papa (Kombrick, 1988).

Se ha comprobado que para un mismo cultivo diferentes patógenos inducen

proteínas idénticas; en la actualidad muchos esfuerzos están dirigidos a comprobar la homología entre las proteínas (PR) de diferentes cultivos, algunas evidencias de homología están dadas para algunas PR por inmunoidentificación.

Varios métodos se han usado para separar y caracterizar las proteínas comprendidas en el grupo de PR, lo cual ha conducido a diferentes denominaciones de aparentemente las mismas proteínas. Fueron Antoniow *et al.*, 1980, quienes propusieron para las proteínas inducidas, obtenidas por extracción ácida (pH=2,8) de hojas de tabaco infestado por TMV, la nomenclatura actual más difundida: la familia de proteínas de migración más rápida en SDS PAGE, (~ 14 kDa) llamarlas PR-1 y las componentes de esta familia, separadas de acuerdo a su carga eléctrica en PR-1a, PR-1b y PR-1c en orden ascendente de su punto isoeléctrico (P.I.), entonces PR-1a es la más ácida de las PR, luego en orden creciente de peso molecular aparece PR-2, etcétera.

Otro grupo de PR proteínas de menor movilidad electroforética, fueron separadas en seis componentes N, O, P, Q, R y S en orden decreciente de su movilidad electroforética en gel no desnaturizante, por Van Loon (1982). Posteriormente Pierpoint (1986), encontró que los componentes O, P, Q y R en esas condiciones estaban formados cada uno por dos proteínas de similar movilidad electroforética.

Esta clasificación hecha para tabaco infestado con TMV ha servido de referencia para otros sistemas, en los cuales se han encontrado componentes similares en el comportamiento electroforético y con reacción inmunológica cruzada. Por ejemplo, clones de PR-1 de tabaco sirvieron a Cornelissen *et al.*, 1986, para identificar clones cDNA en tomate infestado, los que

fueron denominados como PR-1a, PR-1b y PR-1c; también White (1987) describió proteínas PR en amaranto y gramíneas semejantes a los PR-1 de tabaco. Otros autores han utilizado en diferentes cultivos una nomenclatura y forma de clasificación semejante a la actualmente aceptada en tabaco; así, por ejemplo, en frijol se han descrito cuatro proteínas PR clasificadas como PR-1 a PR-4 en orden decreciente de su movilidad electroforética, en maíz (de Tapia, 1986; Nasser, 1988), en papa (Kombrick, 1988) las proteínas PR aisladas, también han recibido una clasificación semejante.

Se ha reportado un número muy grande de sistemas de inducción, cultivos y formas de extracción empleadas para caracterizar estas proteínas, y por tanto, no es posible hasta el momento hacer una generalización total pues aparentemente existen proteínas que aparecen o no, en dependencia de estos factores. Si bien en un inicio las PR eran obtenidas en extracción a pH ácidos y se buscaban principalmente en el fluido extracelular, hoy dentro del concepto amplio de proteínas producidas por el huésped e inducidas por un patógeno se han reportado proteínas localizadas específicamente dentro de la célula y de carácter básico.

FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS PR

El término *proteínas relacionadas con la patogénesis* fue usado para un grupo de proteínas que se observaron bajo una forma determinada de extracción (extracelular a pH ácido) y cuyo patrón electroforético se reproducía en forma semejante bajo la inducción de diferentes patógenos o factores causantes de stress (Camacho-Henríquez y Sanger, 1982; Gessler y Kuc, 1982), y de las cuales se desconocían sus funciones.

Hoy día, la caracterización funcional de muchas de las proteínas PR ha conducido a pensar que dentro de este término general "relacionadas con la patogénesis" se debían incluir otras proteínas que originalmente se describieron de forma independiente y en sistemas muy específicos, como parte de los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos.

No fue hasta 1987 que se relacionaron algunas actividades biológicas en proteínas inducidas en las plantas de tabaco, vinculadas con la respuesta de hipersensibilidad (HR) a la infección con TMV con algunas de las PR reportadas para tabaco. Legrand *et al.*, 1987 y Kauffmann *et al.*, 1987, encontraron que las PR clasificadas como PR-P y PR-Q de peso molecular 27 500 y 28 500 dalton, presentaban actividad endoquitinasa y coincidían con dos de las cuatro proteínas con esa actividad, aisladas en plantas de tabaco con HR a la infección con TMV. Además, encontraron que las proteínas O, N y PR-2 tenían actividad 1,3 beta glucanasa y que existía reactividad inmunológica cruzada entre ellas. En este mismo trabajo ellos incluyen en el término PR a proteínas con carácter ácido o básico, las cuales se obtienen en HR de la planta a la infección con TMV y que tienen reactividad inmunológica cruzada con las PR anteriormente caracterizadas.

En la tabla 1 se muestran las características y funciones de las principales proteínas de tabaco identificadas como PR.

En los últimos años otros autores han identificado actividades endoquitinasa y 1,3 beta glucanasa en PR proteínas de otros cultivos. En la tabla 2 hemos resumido los reportes de actividades encontradas en proteínas llamadas PR proteínas en los diferentes cultivos.

Tabla 1
 PROTEINAS PR IDENTIFICADAS EN TABACO CON RESPUESTA
 DE HIPERSENSIBILIDAD ANTE TMV (HR)

Nomenclatura	Características		Actividad reportada
	PM	P.I.	
Tabaco PR-S			inhibidor de proteasas (e)
Tabaco PR-R	~ 23 500 (b)	6,8	
Tabaco PR-Q	~ 29 500 (a)	6,0	endoquitinasa (d)
Tabaco PR-P	~ 27 500 (ab)	5,5	endoquitinasa (d)
Tabaco PR-O	40 500 (a)	4,3	1,3 beta-glucanasa (c)
Tabaco PR-N	40 000 (a)	5,0	1,3 beta-glucanasa (c)
Tabaco PR-2	~ 40 000-50 000 (b)		1,3 beta-glucanasa (c)
Tabaco PR-1c	15 600 (a)-14 200 (b)	5,2	No hallado
Tabaco PR-1b	15 500 (a)-14 200 (b)	4,7	No hallado
Tabaco PR-1a	15 800 (a)-14 200 (b)	4,0	No hallado
Tabaco básico PR	33 000 (c)	-	1,3 beta-glucanasa (c)

(a) E. Jamet y B. Frigit (1986)

(b) W.S. Pierpoint (1986)

(c) S. Kauffmann *et al.* (1987)

(d) M. Legrand *et al.* (1987)

(e) M. Richardson *et al.* (1987)

Varios de estos laboratorios (Boller y Vogeli, 1984; Nasser, *et al.* 1989) han reportado la presencia de actividades endoquitinasas y 1,3 beta glucanasas en el espacio intercelular, fundamentalmente proteínas de P.I. < 7 y en proteínas básicas en el interior de la célula (Van den Bulke *et al.*, 1989). Aparentemente es la combinación de estas proteínas la que produce el efecto protector en plantas al ataque de hongos, según los resultados obtenidos *in vitro* por Mauch *et al.*, 1988, y Brockaert *et al.*, 1988.

En la comprensión completa del papel de estas proteínas con actividad quitinasa y glucanasa quedan aún algunas preguntas sin responder. Es fácil entender la acción protectora de quitinasas y glucanasas en la planta ante el ataque de hongos, e incluso

de bacterias (estas quitinasas de plantas muestran también acción lisosima (Kombrirk *et al.*, 1988 y Boller *et al.*, 1983). Sin embargo, ¿por qué se inducen éstas ante infecciones virales, como el caso del TMV en tabaco que induce los PR-Q, PR-P, PR-N, PR-O y PR-2? ¿Cuál es el mecanismo utilizado para la inducción de las PR? ¿Existe un mecanismo inductor único, común para todos los ataques de patógenos y otros agentes estresantes en plantas?

Existen otras aproximaciones en el estudio de los mecanismos de defensa estudiados en las plantas y que dentro de un concepto más general de las proteínas relacionadas con la patogénesis debieran tenerse en cuenta, son aquellos en los cuales está involucrada la síntesis de fitoalexinas.

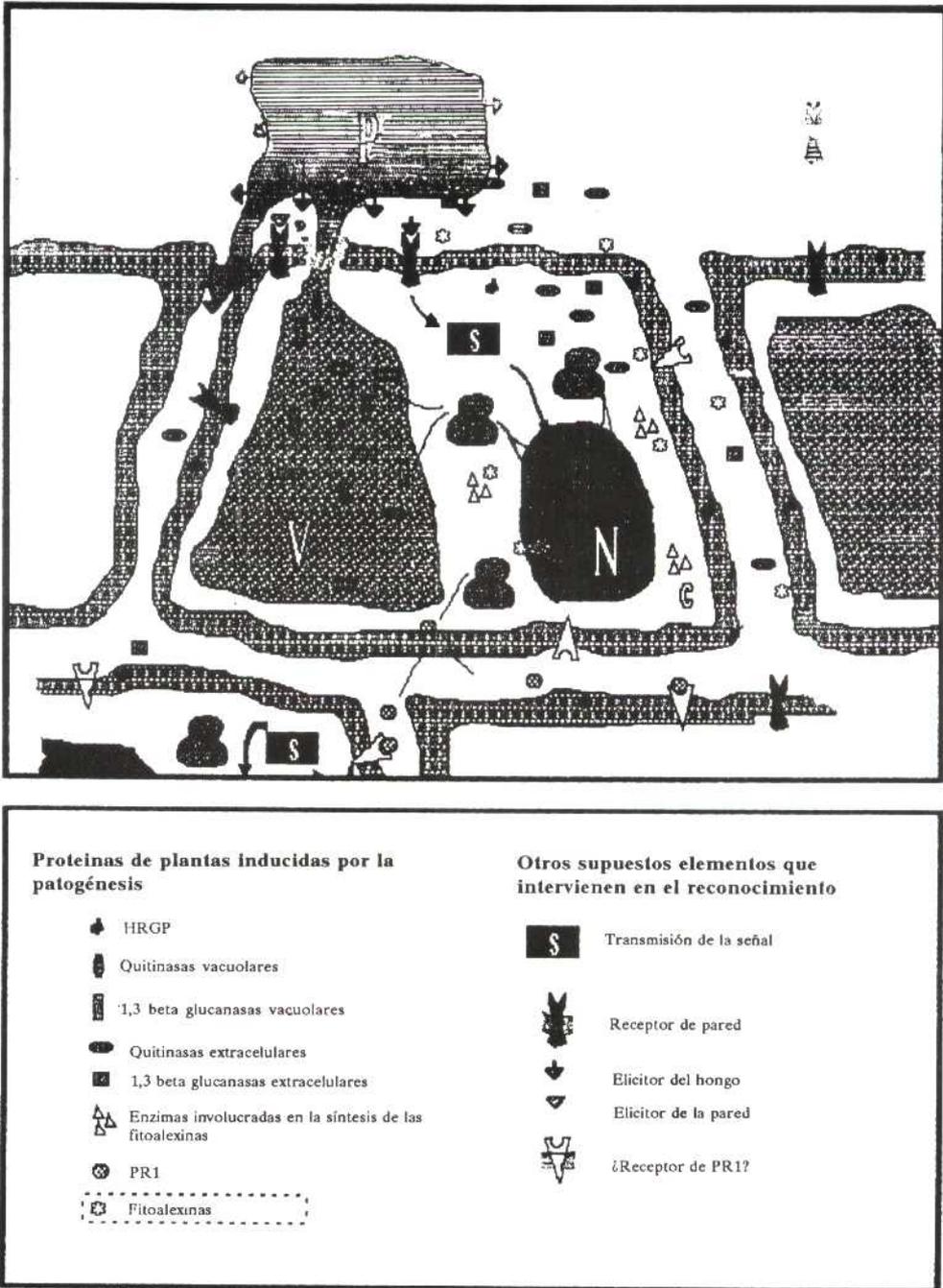


FIG. 1. Mecanismo de defensa de la planta contra los patógenos.

MECANISMOS MOLECULARES DE LA INDUCCION DE LAS PROTEINAS PR

Una de las propiedades fundamentales de las proteínas PR es que son inducibles por diferentes agentes externos. Resulta interesante conocer a qué nivel y en qué forma se produce esa regulación de todo el conjunto de enzimas inducidas. En la búsqueda de respuesta a esta interrogante, la mayor atención ha recaído sobre la PR-1 de tabaco; en este sentido los resultados parecen aún algo confusos. Los experimentos más definitivos se han realizado a partir de la clonación cADN de los ARN mensajeros que codifican para los PR-1, y su utilización como sondas, para seguir la aparición de mRNA específico.

Se ha podido comprobar por Northern Blot, usando PR-1 cADN como sonda, que en plantas sanas no se detectan o están en niveles muy bajos los mRNA o mRNA precursores de PR-1 (Hooft von Huijsduijnen *et al.*, 1986; Matsuoka *et al.* 1988) y que estas proteínas se sintetizan en polirribosomas asociados a membranas como era de esperar para proteínas secretadas al espacio extracelular (Carr, 1985). Los productos de traducción *in vitro* presentan un peso molecular mayor que la proteína madura *in vivo*, lo cual es común a aquellas proteínas procesadas por el

transporte a través de membrana. Los resultados de la inhibición de la síntesis de estas proteínas por antibióticos como la actinomicina D y la alfa amanitina, los cuales son conocidos inhibidores de la transcripción, han dado lugar a hipótesis contradictorias sobre el nivel fundamental en que es regulada la síntesis de las PR (Matsuoka y Ohashi, 1986), sin embargo parece quedar establecido que el nivel de la transcripción es el fundamental, sin descartarse alguna regulación a nivel de traducción.

A pesar de otros resultados contradictorios, las PR-1 al igual que otras proteínas PR (Shinshi *et al.*, 1987) y otro grupo de enzimas que indistintamente están relacionadas con la patogénesis como son las involucradas en la síntesis de fitoalexinas (Ebul y Grisebach 1988; Bell *et al.*, 1984; Cramer *et al.*, 1985) quitininas y glucanasas vacuolares (Mauch *et al.*, 1988) se encuentran reguladas a nivel de transcripción. Esto nos lleva a pensar en la existencia de mecanismos regulatorios generales para estas proteínas y la posibilidad de encontrar secuencias homólogas en la región regulatoria de estos genes. La comparación de la secuencia de los terminales 5' de cada una de estas proteínas en la medida que estas se vayan obteniendo, pudieran dar una luz definitiva sobre este aspecto (figura 2).

```

/-----\
|
|          C---GAA---TTC---G          secuencia consenso para los hsp |
|          |   |||   |||   |          /-----\
| Dmhsp 70 CTCGAATGTTTCGCGAAAAGAGCBBCCGAG;TATAAATA |
|          |   |||   \ \ \   \          \-----/
| PR-1A    CGTGAAATCTTCAAGATTTCTCC..... TATAAATA
|          |-----:-----| -> ? beta Interferon?
|
\-----/

```

FIG. 2. Comparación de la secuencia de parte de la región regulatoria de la PR1a de tabaco, con regiones de genes inducibles por calor y por virus.

SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA PATOGENESIS

El análisis de las secuencias genómicas de las PR-1, -las más estudiadas-, han mostrado muchas semejanzas en la estructura y organización génica de sus componentes. Estos genes están representados en familias donde existen genes funcionales y pseudogenes; ninguno de ellos presenta intrones en su estructura (Pfitzner *et al.*, 1988; Ohshima, 1987). La homología entre PR-1a y PR-1b en la región de proteína madura es mayor que en las regiones del péptido señal, la secuencia correspondiente al péptido señal codifica para 30 a.a. con la hidrofobicidad característica de estas señales de transporte a través de membrana (Matsuoka *et al.*, 1987).

El análisis de la región 5' regulatoria de la expresión del gen en las secuencias genómicas del PR-1a y PR-1b, permitieron caracterizar secuencias tipo TATA y CAAT necesarias para la promoción de la transcripción de genes eucariotas. Otros resultados interesantes fueron encontrados en tres aislamientos diferentes de *N. tabaco*, var. Sansum, var. Xanthi-nc y var. Wisconsin en los cuales se encontraron secuencias muy semejantes (solo difieren por la adición de una base en el centro del palíndromo) con las identificadas en forma consenso para promotores inducidos por el calor (hsp) (Cornelissen *et al.*, 1987; Pfitzner, 1988).

Sin embargo, las proteínas PR no se inducen por el calor; el porqué estos genes no responden al mismo mecanismo de inducción por el calor y si esa secuencia es responsable de la regulación de estos

genes, son interrogantes pendientes de aclaración.

Por otra parte ha sido reportado que secuencias iguales a la región marcada (figura 2), casi perfectamente palindrómica, en la región reguladora del IF-beta son suficientes para la inducción de la transcripción del gen por el virus (Payne *et al.*, 1988). El análisis de todas estas homologías pueden producir muchas especulaciones sobre la regulación de estas proteínas de plantas, pero hasta el momento es necesario realizar nuevos experimentos para dilucidar los mecanismos regulatorios de la síntesis de estas proteínas.

PAPEL DE LAS PR EN LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A LA INFECCION VIRAL

Ohashi *et al.*, 1986, encontraron una correlación directa entre la cantidad de PR-1 en hojas de tabaco de plantas infestadas con TMV y el incremento en la cantidad del virus en estas hojas un día después de la infección. Este resultado le sugirió proponer la existencia de una relación entre la presencia de las PR-1 y la aparición de resistencia adquirida al TMV producto de una infección previa con el virus o la inducción de resistencia en tabaco con agentes químicos.

Recientemente Linthorst *et al.* (1989) encontraron que plantas transgénicas que expresaban constitutivamente proteínas PR-1, proteínas ricas en glicina (GRP) y PR-S, no modificaban la susceptibilidad de estas plantas a la infección con TMV, con lo cual se deduce que al menos es necesario la expresión de alguna otra proteína para que aparezca el fenómeno de resistencia, si

es que en realidad la expresión del fenómeno de la resistencia de las PR-1 está relacionada con la causa del fenómeno de la resistencia, y no son, en realidad una simple consecuencia de la infección.

Por otro lado, es conocido que la expresión de proteína de la cápsida (CP) del TMV de forma constitutiva en plantas de tabaco les confiere resistencia a la infección viral (Powell *et al.*, 1986; Nelson *et al.*, 1987, Carr *et al.*, 1989, determinaron PR-1 en varios clones transgénicos de *N.tabacum* var. Xanthi (NN) y Xanthi nn, expresando el gen de la proteína de la cápsida del TMV y encontraron una correlación entre las plantas que expresan CP constitutivamente y la presencia de niveles bajos de expresión de PR-1 en plantas sanas, para el genotipo NN, no así para el genotipo nn. Muchas otras posibilidades de correlación adicionales pudieran establecerse en estas plantas transgénicas que expresan la CP para vincular la resistencia al TMV con PR-1, sin embargo, la conclusión general de ese trabajo fue que al menos, no es la expresión constitutiva de PR-1 una condición primaria necesaria para manifestar la resistencia al virus.

Como vemos, mucho falta por conocer de los mecanismos que utilizan las plantas para su defensa; hoy está claro que siempre existe una combinación de varias formas diferentes en los mecanismos de defensa que la planta moviliza de forma coordinada en su reacción contra el patógeno, pero para poder dominarlos y directamente modificarlos a voluntad del hombre en forma efectiva es necesario conocer más sobre los mecanismos moleculares de inducción y del papel que desempeñan algunas de las proteínas involucradas en él.

REFERENCIAS

ABU-JAWDAH, Y. (1982). *Change in the soluble patterns of bean leaves upon fungal or viral infections or after chemical injury*. *Phytopathol. Z.* **103**: 272-279.

ANTONIWI, J.F.; C.E. RITTER; W.S. PIERPOINT y L.C. VAN LOON (1980). *Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV*. *J. Gen. Virol.* **47**: 79-87.

AWADE A; M. DE TAPIA; L. DIDIERGEAN y G. BURKARD (1989). *Biological function of bean pathogenesis-related (PR-3 and PR-4) proteins* (en prensa)

BELL, J.N.; R.A. DIXON; J.A. BAILEY; P.M. BOWELL y C.J. LAMB (1984). *Differential induction of chalcone synthesis mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interaction*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 3384-3388.

BOLLER, T.; A. GEHRI; F. MAUCH y V. VOGELI (1983). *Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function*. *Planta* **157**: 22-31.

BOLLER, T; y V. VOGELI (1984). *Vacuolar localization of ethylene-induced chitinase in bean leaves*. *Plant Physiol.* **74**: 442-444.

BROEKAERT, W.F.; J. VAN PARIJS; A.K. ALLEN y W.J. PEUMAND (1988). *Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**: 319-331.

CAMACHO-HENRIQUEZ, A. y H.L. SANGER (1982). *Analysis of acid-extractable tomato leaf proteins after infection with a viroid, two viruses and a fungus and partial purification of the "pathogenesis-related" protein p14*. *Archives of Virology* **74**: 181-196.

CARR, J.P.; D.C. DIXON y D.F. KLESSING (1985). *Synthesis of pathogenesis-related proteins in tobacco is regulated at the level of mRNA accumulation and occurs on membrane-bound polysomes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 7999-8003.

CARR, J.P.; R.N. BEACHY y D.F. KLESSING (1989). *Are the PR-1 proteins of tobacco involved in genetically engineered resistance to TMV?* *Virology* **169**: 470-473.

CORNELISSEN, B.J.C.; R.A.M. HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN; L.C. VAN LOON y J.F. BOL (1986). *Molecular characterization of mRNAs for pathogenesis-related proteins 1a, 1b and 1c induced by TMV infection in tobacco*. *The EMBO J.* **3**: 37-40.

CORNELISSEN, B.J.C.; J. HOROWITZ; J.A.L. VAN KAN; R.B. GOLDBERG y J.F. BOL (1987). *Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group*. *Nuc. Ac. Res.* **15**: 6799-6811.

COUTH R.H.A. (1978). *Alterations in the soluble protein patterns of tobacco and cowpea leaves following inoculation with tobacco necrosis virus*. *Plant Sci. Lett.* **12**: 189-197.

- CRAMER, C.L.; J.N. BELL; T.B. RYDER, J.A. BAILEY; W. SCHUCH; G.P. BOLWELL, M.P. ROBBINS; R.A. DIXON y C.J. LAMB (1985). *Coordinated synthesis of phytoalexin biosynthetic enzymes in biologically-stressed cells of bean (P.vulgaris)* The EMBO Journal. 4: 285-289.
- DE TAPIA, M.; P. BERGMAN; A. AWADE y G. BURKARD (1986). *Analysis of acid extractable bean leaf proteins induced by mercuric chloride treatment and Alfalfa Mosaic Virus infection. Partial purification and characterization.* Plant Science. 45: 167-177.
- DE WIT, P.T.G.M. y J. BAKKER (1980). *Differential changes in the soluble tomato leaf proteins after inoculation with virulent and avirulent races of Cladosporium fulvum.* Physiol. Plant Pathol. 17: 121-130.
- EBEL, J., y H. GRISEBACH (1988). *Defense strategies of soybean against the fungus phytophthora megasperma f.sp. glycinea: a molecular analysis.* T.I.B.S. 13: 23-27.
- EDWARDS, K.; C.L. CRAMER; G.P. BOLWELL; R.A. DIXON; W. SCHUCH y C.J. LAMB. (1985). *Rapid transient induction of phenylalanine ammoniolyase mRNA in elicitor-treated bean cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 6731- 6735.
- FRASER, R.S.S. (1981). *Evidence for the occurrence of pathogenesis-related proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering.* Physiol. Plant Pathology 19: 69-76.
- GESSLER, C. y J. KUC (1982). *Appearance of a host protein in cucumber plants infected with viruses, bacteria and fungi.* J. Exp. Bot. 33: 58-66.
- GIANINAZZI, S; y B. KASSANIS (1974). *Virus resistance in plant by polyacrylic acid.* J. Gen. Virol. 23: 1-9.
- GIANINAZZI, S; P. AHL; A. CORNU y R. SCALLA (1980). *First report of host b-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco.* Physiological Plant Pathology. 16: 337-342.
- GIANINAZZI, S. (1983). "Genetic and molecular aspects of resistance induced by infections or chemicals". In: *Plant-Microbe Interaction, Molecular and Genetic Perspectives*, E.W. Nester and T. Kosuge eds (New York: Macmillan Publishing Co.) Vol. 1 pp. 321- 342.
- HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.A.M.; L.C.VAN LOON y J.F.BOL (1986). *cDNA cloning of six mRNAs induced by TMV infection of tobacco and a characterization of their translation products.* The EMBO Journal 5: 2057-2061.
- JAMET, E. Y B. FRITIG (1986). *Purification and characterization of 8 of the pathogenesis-related proteins in tobacco leaves reacting hypersensitively to Tobacco Mosaic Virus.* Plant Molecular Biology 6: 69-80.
- JOOSTE M.H.A.J. y P.J.G.M. DE WITJS (1989). *Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with Cladosporium fulvum (Syn. Fulvia Fulva) as 1,3-Beta-glucanases and chitinases.* Plant Physiol. 89: 945-951.
- KAUFFMANN, S.; M. LEGRAND; P. GEOFFROY y B. FRITIG (1987). *Biological function of pathogenesis-related proteins: Four PR proteins of tobacco have 1,3 beta-glucanase activity.* The EMBO Journal. 6: 3209-3212.
- KOMBRICK E., M. SCHRODER y K. HAHLBROCK (1987). *Several "pathogenesis related" proteins in potato are 1,3-Beta-glucanases and chitinases.* Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 782-786.
- LEGRAND, M; B. FRITIG y L. HIRTH (1976). *Enzymes of the phenylpropanoid pathway and necrotic reaction of hypersensitive tobacco to TMV.* Phytochemistry 15: 1353-1359
- LEGRAND, M.; S. KAUFFMANN; P. GEOFFROY y B. FRITIG (1987). *Biological function of pathogenesis related proteins: Four tobacco PR proteins are chitinases.* Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 6750-6754.
- LINTHORST, H.J.M.; R.L.J. MEUWISSEN; S. KAUFFMANN y J.F. BOL (1989). *Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, PR5 in tobacco has no effect on virus infection.* The Plant Cell. 1: 285-291.
- MATSUOKA, M. y Y. OHASHI (1986). *Induction of pathogenesis related proteins in tobacco leaves.* Plant Physiol. 80: 505-510.
- MATSUOKA, M.; N. YAMAMOTO; Y. KANO-MURAKAMI; Y. TANAKA; Y. OZEBI; H. HIRANO; H. KAGAWA; M. OSHIMA y Y. OHASHI (1987). *Classification and structural comparison of full-length cDNAs for pathogenesis-related proteins.* Plant Physiol. 85: 942-946.
- MATSUOKA, M.; S. ASOU y Y. OHASHI (1988). *Regulation mechanisms of the synthesis of pathogenesis related proteins in tobacco leaves.* Plant Cell Physiol. 29: 1185-1192.
- MAUCH, F.; L.A. HADWIGER y T. BOLLER (1988a). *Antifungal hydrolases in pea tissue.* Plant Physiol. 87: 325-333.
- MAUCH, F.; B. MAUCH-MANI y T. BOLLER (1988b). *Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of growth by combination of chitinases and 1,3-Beta-glucanases.* Plant Physiol. 88: 936-942.
- NASSER, W.; M. DE TAPIA; S. KAUFFMANN; S. MONTASSE-KOUHSARI y G. BURKARD (1988). *Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases.* Plant Molecular Biology 11: 529-538.

- NASSER, W.; M. DÉ TAPIA y G. BURKARD (1989). *Maize pathogenesis-related proteins: Characterization and cellular distribution of 1,3-Beta-glucanases and chitinases induced by Brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment.* (in press).
- NELSON, R.S.; P. POWELL ABEL y R.N. BEACHY (1987). *Lesion and accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus.* *Virology* **158**: 128-132.
- OHASHI, Y. y M. MATSUOKA (1985). *Synthesis of stress proteins in tobacco leaves.* *Plant Cell Physiol.* **26**: 473-480.
- OHASHI, Y.; T. SHIMOMURA y M. MATSUOKA (1986). *Acquisition of resistance to TMV coincident with induction of pathogenesis-related proteins by TMV infection and chemical treatment in tobacco leaves.* *Ann Phytopath. Soc. Japan* **52**: 626-635.
- OHSHIMA, M.; M. MATSUOKA; N. YAMAMOTO; Y. TANAKA; Y. KANO-MURAKAMI; Y. OZEKI; A. KATO; N. HARADA y Y. OHASHI (1987). *Nucleotide sequence of the PR-1 gene of N. tabacum.* *FEBS letters.* **225**: 243-246.
- PAYNE, G.; T.D. PARKS; W. BURKHART; S. DINCHER; P. AHL; J.P. METRAUX y J. RYALS (1988). *Isolation of genomic clone for pathogenesis-related protein 1a from N. tabacum cv Xanthi-nc.* *Plant Molecular Biology* **11**: 89-94.
- PFITZNER, U.M.; A.J.P. PFITZNER y H.M. GOODMAN (1988). *DNA sequence analysis of PR-1a gene from tobacco: Molecular relationship of heat shock and pathogen responses in plants.* *Mol. Gen. Genet.* **211**: 290-295.
- PIERPOINT W.S. (1986). *The pathogenesis-related proteins of tobacco leaves.* *Phytochemistry* **25**: 1595-1601.
- POWELL ABEL, P.; R.S. NELSON; B. DE; N. HOFFMAN; S.G. ROGERS; R.T. FRALEY y R.N. BEACHY (1986). *Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein.* *Science* **232**: 738-743.
- REDOLFI, P.; M. VECCHIATI y S. GIANINAZZI (1982). *Changes in the soluble leaf protein constitution of Gomphrena globosa during the hypersensitive reaction to different viruses.* *Phytopathol Z.* **103**: 48-54.
- RICHARDSON M.; S. VALDES-RODRIGUEZ y A. BLANCO-LABRA (1987). *A possible function for taumatin and a TMV-induced protein suggested by homology to a maize inhibitor.* *Nature* **327**: 432-434.
- SHOWALTER, A.M.; J.N. BELL; C.L. CRAMER; J.A. BRILEY; J.E. VARNER y C.J. LAMB (1985). *Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 6551-6555.
- TAS, P.W.L. y D. PETTERS (1977). *The occurrence of a soluble protein (E1) in cucumber cotyledons infected with plant viruses.* *Nath. J. Plant Pathol.* **83**: 5-12.
- VAN DEN BULCKE, M.; G. BAUW; C. CASTRESANA; M. VAN MONTAGU y J. VANDEKERCKHOVE (1989). *Characterization of vacuolar and extracellular (1,3) Beta-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2673-2677.
- VAN LOON, L.C.; A. VAN KAMMEN (1970). *Polyacrylamide disk electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. 'Samsun' and 'Samsun' NN. II. Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus.* *Virology* **40**: 199-211.
- VAN LOON L.C. (1976). *Specific soluble leaf proteins of virus-infected tobacco plants are not normal constituents.* *J. Gen. Vir.* **30**: 375-379
- VAN LOON L.C. (1977). *Induction by 2-chloroethyl-phosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins, and systemic resistance in tobacco.* *Virology* **80**: 417-420.
- VAN LOON L.C. (1982). *Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection.* *Active Defense Mechanisms in Plants* (Word, R.K.S., ed.) p.247 Plenum Press.
- WAGIH, E.E.; y R.H.A. COUTTS (1982). *Comparison of virus-elicited and other stresses on the soluble protein fraction of cucumber cotyledons.* *Phytopathol. Z.* **104**: 364-374.
- WHITE, R.F. (1979). *Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to Tobacco Mosaic Virus in tobacco.* *Virology* **99**: 410-412.
- WHITE, R.F.; E.P. RYBICHI; M.B. VON WECHMAR; J.L. PEKKER y J.F. ANTONIWI (1987). *Detection of PR-1 type proteins in Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Gramineae and Solanaceae by immunoelectroblotting.* *Journal of General Virology* **68**: 2043- 2048.