

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA POR RIZOBACTÉRIAS E COMUNICAÇÃO NA ROTA DE SINALIZAÇÃO PARA UMA DEFESA REFINADA

Corné M.J. Pieterse, Johan A. Van Pelt, Saskia C.M. Van Wees, Jurriaan Ton, Bas W.M. Verhagen, Karen Léon-Kloosterziel, Shu Hase, Martin De Vos, Vivian Van Oosten, Maria Pozo, Steven Spoel, Sjoerd Van der Ent, Annemart Koornneef, Antônio Chalfun-Junior, Mário Lúcio V. Resende* e L.C. Van Loon.*

Section Phytopathology, Faculty of Biology, Utrecht University, P.O. Box 800.84, 3508 TB Utrecht, The Netherlands

C.M.J.Pieterse@bio.uu.nl; www.bio.uu.nl/~fytopath

**Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, Brasil*

RESUMO

Durante o processo evolucionário, as plantas adquiriram uma sofisticada estratégia defensiva para ‘perceber’ os ataques de patógenos e insetos, traduzindo essa percepção em uma resposta apropriada e de forma adaptativa. A imunidade inata da planta é baseada surpreendentemente na resposta complexa que é altamente flexível nas suas capacidades de reconhecer e responder aos mais diversos invasores. Já faz muito tempo que a planta *Arabidopsis* tem sido utilizada como modelo para estudos moleculares de resistência sistêmica induzida por rizobactérias (RSI). Atualmente, nossa pesquisa é focada em uma questão: Como as plantas são capazes de integrar sinais induzidos por insetos e microorganismos em respostas específicas contra esses invasores? Os sinais de alarmes de ataque, ácido salicílico, jasmônico e etileno são os principais reguladores da defesa das plantas. As rotas de sinalização se intercalam, fornecendo as plantas um grande potencial de regulação para uma defesa refinada. Recentemente, nós descobrimos que a proteína NPR1 funciona com um modulador da comunicação entre as rotas de sinalização do ácido salicílico e do ácido jasmônico, e desse modo, ajuda a planta a ‘decidir’ qual estratégia de defesa tomar, dependendo do tipo de invasor encontrado. Aqui, nós apresentamos uma revisão de nossa pesquisa nos últimos anos.

SUMMARY

RHIZOBACTERIA-INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE AND PATHWAY CROSS TALK TO FINE-TUNE DEFENSE

Evolution has provided plants with sophisticated defensive strategies to “perceive” attack by pathogens and insects, and to translate that “perception” into an appropriate adaptive response. Plant innate immunity is based on a surprisingly complex response that is highly flexible in its capacity to recognize and respond to the invader encountered. In the past years, we explored *Arabidopsis* as a model to study the molecular basis of rhizobacteria-induced systemic resistance (ISR). Currently our research is also focused on the question: how are plants capable of integrating microbial- and insect-induced signals into defense responses that are specifically directed against the attacker? The alarm signals salicylic acid, jasmonic acid and ethylene are major regulators of plant defense. Their signaling pathways cross-communicate, providing the plant with a great regulatory potential to fine-tune its defense reaction. Recently, we discovered that the regulatory protein NPR1 functions as a modulator in cross-talk between SA and JA, thereby helping the plant to “decide” which defensive strategy to follow, depending on the type of attacker encountered. Here, we present an overview of our research of the past years.

INTRODUÇÃO

RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA POR RIZOBACTÉRIA

Estirpes não patogênicas, bactérias colonizadoras da rizosfera são designadas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), porque elas podem estimular o crescimento de plantas (Kloepper et al., 1980). O crescimento resulta principalmente da repressão de patógenos de solo e outros microorganismos prejudiciais (Schippers et al., 1987), mas há também relatos do efeito direto no crescimento (Lynch, 1976; Van Peer & Schippers, 1989). As bactérias fluorescentes, *Pseudomonas* spp., estão entre as mais efetivas PGPR's e tem sido mostrado que são responsáveis pela redução de doenças em solos naturalmente não infestados (Raaijmakers e Weller, 1988). A atividade do controle biológico de estirpes selecionadas de *Pseudomonas* spp. é efetiva sob certas condições de campo (Tuzun & Kloepper, 1995; Wei et al., 1996) e em casas de vegetação comerciais (Leeman et al., 1995b), e podem ser resultantes da competição por nutrientes, competição por ferro com sideróforos e antibiose (Bakker et al., 1991).

Além do efeito antagonístico direto em patógenos de solo, algumas estirpes de PGPR também são capazes de reduzir doenças na parte aérea através de um mecanismo chamado de resistência sistêmica induzida (ISR) (Van Loon et al., 1998). ISR por PGPR tem sido demonstrado em várias espécies de plantas, por exemplo, feijão, cravo, pepino, rabanete, fumo, tomate e a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sendo efetivo contra um amplo espectro de fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus (Van Loon et al., 1998). Fenotipicamente, ISR por PGPR lembra resistência clássica induzida por patógeno, onde partes não infectadas de plantas previamente atacadas por patógenos, tornam-se mais resistentes a futuras infecções. Esse tipo de resistência induzida é freqüentemente chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR) (Ross, 1961).

ISR INDUZIDO POR RIZOBACTÉRIA EM *ARABIDOPSIS*

Para os estudos de ISR induzida por rizobactéria, um modelo baseado em *Arabidopsis* foi desenvolvido. Neste sistema, a estirpe não patogênica da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* WCS417r foi utilizada como agente indutor (Pieterse et al., 1996). Tem sido demonstrado que a estirpe WCS417r é responsável pela ativação de ISR em muitas espécies de plantas, por exemplo, cravo, rabanete, tomate, e feijão (Pieterse et al., 2002) e promove o crescimento de planta em *Arabidopsis* na ausência do patógeno (Pieterse & Van Loon, 1999). A colonização de raízes de *Arabidopsis* pela estirpe WCS417r protege a planta contra diferentes agentes patogênicos, incluindo as bactérias foliares *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000) e *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, o fungo radicular *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*, o fungo foliar *Alternaria brassicicola* e o oomiceto foliar *Peronospora parasitica* (Ton et al., 2002b). A proteção contra esses patógenos é manifestada tipicamente na redução dos sintomas da doença e também na inibição do crescimento dos mesmos. Uma vez que a rizobactéria se mantém localizada nas raízes, e desse modo espacialmente separada do patógeno, conclui-se que o modo de ação de supressão da doença é através da ativação da ISR na planta.

A habilidade em desenvolver ISR em resposta a determinadas estirpes de bactérias da rizosfera tem sido demonstrada em várias espécies de plantas (Van Loon et al., 1998) e parece ser dependente da combinação da interação rizobactéria-hospedeiro. Por exemplo, *Pseudomonas putida* WCS358r e *P. fluorescens* WCS374r agem diferentemente em espécies diferentes: *Arabidopsis* responde a WCS358r, enquanto rabanete e cravo não (Van Peer et al., 1991; Van Peer e Schirppers, 1992; Leeman et al., 1995a; Van Wees et al., 1997). De modo contrário, rabanete responde a WCS374r, enquanto *Arabidopsis* não (Leeman et al., 1995a; Van Wees et al., 1997).

Essa indução de ISR também pode ser de modo diferente em ecótipos de *Arabidopsis*. A maioria dos ecótipos, por exemplo, Columbia e Landsberg *erecta*, respondem ao tratamento com WCS417r, enquanto os ecótipos RLD1 e Wassilewskija não (Van Wees et al., 1997; Ton et al., 1999). Esse resultado sugere que deva existir um reconhecimento específico entre planta e a rizobactéria indutora de ISR para uma indução de ISR, e que a ISR induzida por rizobactéria é geneticamente determinada.

A DIFERENÇA NA EFETIVIDADE DE ISR E SAR

Um dos paralelos entre a ISR induzida por rizobactéria e a SAR induzida por patógeno é que ambos tipos de resistência induzida são efetivas contra um amplo espectro de patógenos de plantas (Kuc, 1982; Van Loon et al., 1998). Para comparar o espectro de efetividade de ISR e SAR, um grande número de patógenos (vírus, bactéria, fungos e oomicetos) de *Arabidopsis* foi testado. A ISR e a SAR em WCS417r foram induzidas por uma estirpe avirulenta do patógeno *Pst* DC3000, sendo efetivo contra a mancha bacteriana e a podridão negra, causadas, respectivamente, pelas bactérias *Pst* DC3000 e *X. campestris* pv. *armoraciae* (Pieterse et al., 1996; Ton et al., 2002b). A murcha de Fusarium, causada pelo fungo *F. oxysporum* f.sp. *raphani* também foi afetada por respostas defensivas ativadas durante ISR e SAR (Pieterse et al., 1996; Van Wees et al., 1997). Além disso, a doença causada por *P. parasitica*, míldio cotonoso, foi inibida em ambos os casos, apesar de que a SAR foi significativamente mais efetiva do que ISR (Ton et al., 2002b). Além desses efeitos similares, existem algumas diferenças claras. Por exemplo, plantas expressando ISR demonstram um aumento na resistência contra infecção pelo fungo *A. brassicicola*, enquanto SAR não é efetiva contra esse patógeno. Contrariamente, a expressão de SAR inibe a multiplicação do vírus do crestamento do nabo e fortemente reduz os sintomas causados por esse vírus, enquanto ISR não tem efeito nenhum (Ton et al., 2002b). Desse modo, o espectro de efetividade de ISR e SAR sobrepõe-se parcialmente, mas também diverge, sugerindo que as respostas defensivas ativadas durante os dois tipos de resistência induzida são no mínimo, diferentes.

ISR E SAR SÃO REGULADAS POR ROTAS METABÓLICAS DISTINTAS

Pesquisas anteriores de mecanismos moleculares envolvidos na SAR induzida por patógeno, demonstram que o início da SAR é acompanhado por aumento local e sistêmico de níveis endógenos de ácido salicílico (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990) e concomitantemente, um aumento de expressão de um grupo enorme de genes (Ward et al., 1991),

incluindo aqueles que traduzem para proteínas relacionadas a patogênese (PR's) (Van Loon & Van Strien, 1999). Várias proteínas PRs possuem atividade antimicrobiana e acredita-se contribuir para a planta atingir o estado de SAR. Contrariamente, plantas transgênicas contendo o gene bacteriano *NahG*, que expressam a enzima salicilato-hidroxilase, foram incapazes de acumular ácido salicílico e são afetadas na SAR (Graffney et al., 1993), demonstrando que o ácido salicílico (AS) é necessário e suficiente para induzir SAR (Ryals et al., 1996). Escrutínios feitos em populações de mutantes de *Arabidopsis*, revelaram uma série de plantas mutantes que aparentam ter o mesmo gene afetado (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995). Esse gene foi denominado *npr1* (não expressor de *PR* genes) ou *nim1* (não imune). Plantas mutantes *npr1* acumularam níveis normais de ácido salicílico depois da infecção, mas diminuíram as suas habilidades de expressar genes *PR* e de responder a SAR, indicando que NPR1 age abaixo do AS na rota metabólica de SAR. O gene *NPR1* codifica uma proteína com repetições do tipo ankyrina, as quais são conhecidas por mediar interações protéicas e estão presentes em proteínas com as mais diversas funções (Cao et al., 1997; Ryals et al., 1997). Existe evidência que sob indução de SAR, NPR1 é translocada para o núcleo, onde ativa a expressão de genes *PR* por interação física com uma subclasse de fatores de transcrição contendo zipper de leucina, que se ligam às seqüências promotoras requeridas para a expressão de genes *PR* induzida por AS (Zhang et al., 1999; Kinkema et al., 2000; Subramaniam et al., 2001).

Pesquisas no mecanismo molecular da ISR induzida por rizobactéria foi inicialmente focada no papel das proteínas PRs, como se o acúmulo dessas proteínas estivesse diretamente correlacionada com a resistência induzida. Entretanto, plantas de rabanetes que tiveram suas raízes tratadas com o indutor de ISR, WCS417r, não acumularam proteínas PR, apesar de que essas plantas demonstraram claramente um aumento na resistência contra murcha de fusarium (Hoffland et al., 1995). De modo similar, plantas de *Arabidopsis* expressando ISR mediada por WCS417r, demonstraram um aumento de resistência contra *F. oxysporum* f.sp. *raphani* e *Pst* DC3000, mas isso não coincidiu com uma ativação dos genes marcadores de SAR, *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* (Pieterse et al., 1996; Van Wees et al., 1997). A determinação de níveis de AS em plantas de *Arabidopsis* expressando ISR, revelou que ISR não é associada com acúmulo de AS (Pietersen et al., 2000). Além disso, ISR mediada por WCS417r, expressou-se normalmente em plantas de *Arabidopsis* não acumuladoras de AS, plantas *NahG* (Pietersen et al., 1996; Van Wees et al., 1997). Com isso, conclui-se que ISR mediada por WCS417r é independente da resposta da resistência por AS, e que a ISR induzida por rizobactéria e SAR induzida por patógeno são reguladas por rotas metabólicas distintas.

DISSECAÇÃO GENÉTICA DA ROTA METABÓLICA DE ISR

Além do AS, os reguladores de crescimento ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) tem sido repetitivamente citados na regulação de respostas primárias de resistência em plantas (Pieterse e Van Loon, 1999; Pieterse et al., 2001; Pieterse et al., 2002). Em muitos casos, a infecção por patógenos microbianos e o ataque por insetos herbívoros é associada com um aumento na produção desses hormônios e a concomitante ativação de um grupo de genes relacionados com a defesa. Além disso, a aplicação exógena desse composto resulta freqüentemente em um aumento do nível de resistência. Para investigar o papel do AJ e ET em ISR induzida por rizobactéria, o mutante de *Arabidopsis* de resposta ao AJ, *jar1*, e o mutante de resposta ao ET, *etr1*, foram testados em suas habilidades de expressar ISR. Ambos os mutantes foram incapazes de demonstrar resistência contra *Pst* DC3000, depois da colonização das raízes por *P. fluorescens* WCS417r (Pieterse et al., 1998), indicando que ISR requer ambos AJ e ET para responder. Além de *etr1*, um outro grupo bem caracterizado de mutantes de *Arabidopsis*, que são afetados em diferentes passos na resposta ISR à rota metabólica de ET foram testados em suas habilidades de expressar ISR. Nenhum dos mutantes desenvolveram ISR contra *Pst* DC3000 (Knoester et al., 1999), indicando que uma rota metabólica intacta do ET é necessária para expressão de ISR.

Para elucidar a seqüência dos eventos de sinalização, a habilidade de indução de resistência do metil jasmonato (MeJA) e do ácido 1-carboxílico-l-aminociclopropano (ACC), o precursor natural do ET, foram testados em plantas selvagens, NahG, *jar1* e *etr1*. Como WCS417r, o MeJA e ACC foram eficazes em induzir resistência contra *Pst* DC3000 e em plantas não acumuladoras de AS, as plantas NahG, sugerindo que ambos indutores ativam a rota ISR independente de AS. Além disso, a proteção induzida por MeJA foi bloqueada em ambos mutantes, *jar1* e *etr1*, enquanto a proteção induzida por ACC foi afetada no mutante *etr1*, mas não em plantas *jar1*. Assim, foi postulado que ISR por WCS417r segue as mesmas rotas metabólicas na qual os componentes das respostas de AJ e ET estão localizados (Pieterse et al., 1998).

Tem sido demonstrado que NPR1 é um importante fator de regulação nas respostas de SAR dependentes de AS (Pieterse & Van Loon, 2004). Para investigar se NPR1 está envolvida na resposta ISR independente de AS, plantas mutantes de *Arabidopsis*, *npr1* foram utilizadas. Surpreendentemente, plantas mutantes *npr1* foram bloqueadas em suas habilidades de expressar ISR induzida por WCS417r, indicando que, como a SAR induzida por patógeno, ISR por rizobactéria é dependente de resposta defensiva (Pieterse et al., 1998). Elucidação da seqüência dos eventos sinalizadores de ISR revelaram que NPR1 age abaixo do AJ e ET na rota

metabólica de ISR. Evidentemente, NPR1 não é unicamente requerida para expressão de genes PR dependentes de AS, que são ativados durante a SAR, mas também na ativação de respostas de defesas dependente de AJ e ET, resultando da ISR por rizobactéria. Isso sugere que NPR1 é capaz de regular diferencialmente a expressão de genes de defesa, dependendo da rota metabólica que está sendo ativada na seqüência acima dela.

IDENTIFICAÇÃO DO LOCUS *ISR1* EM *ARABIDOPSIS*

Para identificar novos componentes da rota metabólica de ISR, uma estratégia genética foi utilizada, testando a habilidade de 10 ecótipos de *Arabidopsis* em expressar ISR contra *Pst* DC3000 (Ton et al., 1999). Desses 10 ecótipos que foram testados, RLD1 e Wassilewskija não desenvolveram ISR depois dos tratamentos nas raízes por WCS417r. O fenótipo da não resposta ao WCS417r foi associado à relativa alta susceptibilidade a *Pst* DC3000, o que foi aparentemente associado a uma maior proliferação do patógeno na folha e ao desenvolvimento de sintomas mais sérios da doença. Análise genética da progênie de um cruzamento de um fenótipo que responde a WCS417r, ecótipo Columbia com em ecótipo RLD1, não responsivo a WCS417r, revelou que tanto o potencial para expressar ISR quanto o relativo alto nível de resistência basal contra *Pst* DC3000 são caracteres monogênicos, características dominantes que estão ligadas geneticamente. O locus correspondente, designado *ISR1* foi mapeado (Ton et al., 1999) e foi demonstrado ser necessário para a ISR contra diferentes patógenos (Ton et al., 2002a).

Interessantemente, os mutantes *jar1* e *etr1*, que são afetados nas respostas ao AJ e ET, respectivamente, mostraram o mesmo fenótipo que os ecótipos RLD1 e Wassilewskija quando eles foram incapazes de expressar a ISR por WCS417r e também apresentaram um aumento na susceptibilidade a infecção por *Pst* DC3000 (Pieterse et al., 1998). Análise dos ecótipos RLD1 e Wassilewskija em resposta ao ET revelaram que os dois ecótipos possuem uma sensibilidade ao ET reduzida, e co-segregam com os alelos recessivos do locus *ISR1* (Ton et al., 2001). Desse modo, foi postulado que o locus *ISR1* de *Arabidopsis* codifica um novo componente da rota metabólica de resposta ao ET e que tem um importante papel na sinalização para resistência a doenças. Atualmente, nós estamos no processo de identificação do gene *ISR1* por clonagem posicional.

O PAPEL DO ÁCIDO JASMÔNICO E DO ETILENO NA ISR

Em *Arabidopsis*, tanto o AJ quanto o ET, ativam um grupo de genes relacionados com defesa e quando aplicados de maneira exógena,

conferem resistência contra *Pst* DC3000 (Pieterse et al., 1998; Van Wees et al., 1999). Com intuito de investigar se ISR é associada com mudanças na expressão gênica de AJ e ET, Van Wees et al. (1999) monitoraram a expressão de um grupo de genes bem caracterizados relacionados com AJ e/ou ET (por exemplo, *LOX1*, *LOX2*, *VSP*, *PDF1.2*, *HEL*, *CHIR-B* e *PAL1*) na planta modelo *Arabidopsis* expressando ISR por WCS417r. Nenhum desses genes testados teve suas expressões alteradas (superexpressadas) na planta indutora, nem localmente nas raízes ou sistematicamente nas folhas. Isso sugere que a resistência alcançada não foi associada com maiores mudanças nos níveis de AJ e ET. De fato, análises local e sistêmica dos níveis de AJ e ET mostraram que ISR por WCS417r não está associada com a produção dessas moléculas sinais (Pieterse et al., 2000). Esse resultado sugere que a dependência de AJ e ET a ISR é baseada no aumento da sensibilidade a esses hormônios, do que a um aumento na produção deles.

Se a dependência de ISR a AJ e ET é baseada em um aumento na sensibilidade a essas moléculas, plantas expressando ISR seriam capazes de reagir mais rápido e de modo mais potente a produção de AJ e ET quando infectadas por patógenos. Essa hipótese é ancorada no resultado de que a expressão de alguns genes de *Arabidopsis* induzidos por AJ e ET (*VSP*, *PDF1.2*, *HEL*) é significativamente aumentada em folhas expressando ISR, depois serem inoculadas com *Pst* DC3000 ou depois da aplicação exógena de MeJA ou do precursor do ET, o ACC, quando comparadas com plantas controle (Van Wees et al., 1999; Hase et al., 2003). Esses resultados sugerem que ISR em *Arabidopsis* é associada com uma expressão inicial de um grupo de genes que respondem ao AJ. A expressão de genes de defesa, que leva a uma rápida ou maior nível de expressão depois da inoculação, aparece como uma ação comum nos diferentes tipos de resistência induzida (Conrath et al., 2002). Isso pode explicar, por um lado, a aparente falta de mudanças na expressão gênica em tecidos induzidos na ausência do patógeno desafiador, enquanto por outro lado, a planta é capaz de reagir mais eficientemente contra um patógeno invasor.

RESISTÊNCIA INDUZIDA É EXPRESSA COMO UM AUMENTO DA RESISTÊNCIA BASAL

Diferente de seus papéis na resistência sistêmica induzida, as moléculas sinais de defesa, AS, AJ, e ET são descritas estarem envolvidas na regulação primária de resposta de defesa. Evidências para o papel do AS, AJ e ET em resistência basal vêm de análises genéticas de plantas mutantes de *Arabidopsis* e transgênicas que são afetadas na biosíntese ou percepção desses compostos. Em muitos casos, os genótipos afetados em sinalização de AS, AJ ou ET, demonstraram um aumento na susceptibilidade ao ataque do patógeno

ou inseto (Dong, 1998; Glazebrook, 2001). AS, AJ e ET estão envolvidos em diferentes magnitudes na resistência basal contra patógenos específicos. Por exemplo, a resistência basal em *Arabidopsis* contra o oomiceto *P. parasitica* e o vírus do crestamento do nabo, parece ser controlada predominantemente por uma rota dependente de AS. Somente plantas NahG não acumuladoras de AS, demonstraram um aumento na susceptibilidade a esses patógenos (Delaney et al., 1994; Kachroo et al., 2000). Contrariamente, a resistência basal contra os fungos patógenos *A. brassicicola* e *B. cinerea* é reduzida somente em mutantes insensíveis ao AJ e ET, e não em plantas NahG (Thomma et al., 1998; Thomma et al., 1999). Interessantemente, a resistência basal contra as bactérias *Pst* DC3000 e *X. campestris* pv. *armoraciae* é afetada em plantas NahG e em mutantes responsivos a AJ e ET (Pieterse et al., 1998; Ton et al., 2002b), sugerindo que a resistência basal contra esse patógenos é controlada por uma combinação de ações do AS, AJ e ET. Comparações de efetividade da SAR dependente de AS e ISR dependente de AJ/ET contra esses diferentes patógenos de *Arabidopsis*, revelaram que SAR é predominantemente eficaz contra patógenos que em plantas não induzidas são resistentes através do mecanismo de resistência basal dependente de AS, enquanto que a ISR é predominantemente efetiva contra patógenos que nas plantas não induzidas são resistentes através das respostas de resistência basal dependente de AJ e ET (Ton et al., 2002b). Desse modo, SAR parece constituir-se em um aumento das defesas dependentes de AS, enquanto ISR parece ser baseada em um aumento das defesas dependentes de AJ e ET.

ANÁLISE DE MUTANTES COM AUMENTO DE SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS (*Eds*)

Devido a essa associação entre a resistência induzida e a resistência basal, nós decidimos utilizar uma coleção de mutantes de *Arabidopsis*, *eds* ('enhanced disease susceptibility'), mutantes susceptíveis ao aumento de doença (resistência basal reduzida) a bactéria patogênica *P. syringae* para identificar novos componentes possíveis de estarem presentes na rota de sinalização de ISR. Para isso, 11 mutantes *eds* foram escrutinados visando seus potenciais em expressar ISR contra *Pst* DC3000. Desses 11 mutantes testados, *eds4*, *eds8* e *eds10*, não responderam a indução a ISR por WCS417r (Ton et al., 2002c). Análises mais detalhadas desses mutantes não responsivos a ISR, *eds*, demonstraram que eles são insensíveis a indução de resistência por MeJA (*eds4*, *eds8*, e *eds10*) ou por ACC (*eds4* e *eds10*). Além disso, *eds4* e *eds8* demonstraram uma reduzida sensibilidade a ET (*eds4*) ou MeJA (*eds8*). Embora bloqueado na proteção induzida por rizobactéria, MeJA e ACC, o mutante *eds10* apresentou resposta normal a MeJA e ACC, sugerindo que esse mutante é afetado abaixo do AJ e ET nas rotas de sinalização de ISR.

Juntos esses resultados demonstram que EDS4, EDS8 e EDS10 são necessários para ISR e agem juntos na resposta a AJ (EDS8), ou na resposta ao ET (EDS4) ou abaixo da resposta ao AJ e ET (EDS10) na rota de sinalização de ISR (Ton et al., 2002c). Pesquisas futuras deverão revelar o papel exato dessas moléculas sinais na expressão de ISR.

A CAÇA POR GENES RELACIONADOS COM ISR

Durante muito tempo, várias metodologias foram iniciadas para identificar genes relacionados com a ISR. Uma dessas, foi o escrutínio de uma população de plantas de *Arabidopsis* que possuíam inserções do elemento transponível (transposon) *DS* com o gene repórter, β -glucuronidase (*GUS*), ligados a um promotor mínimo (Vroemen et al., 1998). Uma dessas linhagens apresentou expressão de *GUS* nas raízes com colonização de WCS417r. Essa expressão local de *GUS* não foi observada depois do tratamento das raízes com *Escherichia coli*, indicando que a indução é específica para *Pseudomonas* (Leon-Kloosterziel et al., 2002). Interessantemente, um padrão similar de expressão foi observado depois do tratamento das raízes com o precursor do ET, o ACC, indicando que essa linhagem contém a inserção do transposon próximo ao gene indutor de ET e a expressão é aumentada na presença da colonização com WCS417r. Existem vários genes possíveis de serem candidatos que estão presentes na região próxima a inserção, e um deles codifica para uma proteína similar a taumatina. Análise da expressão gênica confirmaram que esse gene similar a taumatina possui uma expressão diferenciada (aumento de expressão) em resposta ao tratamento das raízes com WCS417r ou ACC. A análise do papel desse gene similar a taumatina e ISR poderá nos fornecer maiores entendimentos no mecanismo molecular que envolve ISR induzida por rizobactéria.

Utilizando outra metodologia, os padrões de expressão de um grupo grande de genes conhecidos e bem caracterizados relacionados com a defesa em *Arabidopsis*, foram analisados na indução de ISR por WCS417r. Esses genes consistem em genes induzidos por AS, *PR-1*, *PR-2* e *PR-5* e genes induzidos por ET ou AJ, *HEL*, *CHI-B*, *PDF1.2*, *AtVSP*, *LOX1*, *LOX2* e *PAL1*. Entretanto, nenhum desses genes testados teve expressão diferenciada em plantas expressando ISR, nem localmente nas raízes ou sistematicamente nas folhas (Van Wees et al., 1999).

O TRANSCRIPTOMA DA RIZOBACTÉRIA MEDIADO POR ISR

O estado do patógeno induzir SAR é caracterizado pela concomitante ativação de um grupo de genes SAR, que incluem os genes que

codificam as proteínas PRs. Dos muitos genes relacionados com a defesa que foram testados em *Arabidopsis*, nenhum apresentou expressão aumentada em plantas apresentando ISR (Van Wees et al., 1999). Para identificar os genes relacionados com ISR, nós observamos a resposta transcripcional de mais de 8.000 genes de *Arabidopsis* durante ISR induzida por rizobactéria, utilizando para isso microarranjos da Affymetrix (Verhagen et al., 2004). Localmente nas raízes, ISR induzida por *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, promoveu uma alteração substancial na expressão de 97 genes. Entretanto, sistemicamente nas folhas, nenhum dos mais de 8.000 genes testados mostraram uma alteração consistente na expressão em resposta a colonização efetiva das raízes por WCS417r, indicando que o início da ISR em folhas não está associado com mudanças detectáveis de expressão gênica. Depois da inoculação do patógeno foliar bacteriano, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 em plantas induzidas por WCS417r, 81 genes mostraram um padrão de expressão aumentado em folhas expressando ISR, sugerindo que esses genes foram condicionados a responder mais rapidamente e mais fortemente sob o ataque do patógeno. A maioria desses genes possivelmente é regulada por sinalização de AJ e/ou ET. O pré- condicionamento ('priming') é um processo que fornece à planta uma capacidade maior de rápida e efetiva ativação de respostas de defesa celulares que são induzidas somente com o contato com o patógeno. Nos últimos 10 anos, o pré-condicionamento tem sido associado com vários tipos de resistência induzida (Conrath et al., 2002). Uma característica comum dos diferentes tipos de resistência induzida a doenças é que elas apresentam efetividade contra diferentes patógenos. É tentador especular que essa característica de amplo espectro de resistência induzida é baseada em condições do tecido reagir mais efetivamente ao patógeno invasor.

COMUNICAÇÃO NA ROTA DE SINALIZAÇÃO PARA UMA DEFESA REFINADA:

ASSINATURAS DE SINAIS E TROCAS TRANSCRIPCIONAIS DURANTE O ATAQUE DE INSETOS E PATÓGENOS

As plantas são expostas aos mais diferentes invasores, incluindo patógenos microbianos e insetos herbívoros. Para se protegerem, as plantas evoluíram estratégias de defesa para contra-atacar os invasores potenciais. Recentes avanços nas pesquisas em sinalização de defesa mostraram que as plantas são capazes de induzir diferentemente os amplos espectros de mecanismos de defesa, dependendo do tipo invasor encontrado. Os

fitohormônios AS, AJ e ET são importantes fatores na rede da rota de sinalização e estão envolvidos em uma reação de defesa refinada, eventualmente levando a ativação de um ótimo 'mix' de respostas de defesa para resistir ao invasor (Pieterse & Van Loon, 1999; Pieterse et al., 2001). Para entender como as plantas integram os sinais induzidos por patógenos e insetos em respostas de defesa, nós monitoramos a dinâmica de sinalização do AS, AJ e ET em *Arabidopsis* depois do ataque de um grupo de patógenos microbianos e insetos herbívoros com diferentes modos de ataque (De Vos et al., 2004). As plantas de *Arabidopsis* foram expostas à bactéria patogênica foliar (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), ao fungo patogênico foliar (*Alternaria brassicicola*), à lagartas mastigadoras (*Pieris rapae*), tripes (*Frankliniella occidentalis*) ou afídios (*Myzus persicae*). Monitorando a assinatura do sinal na combinação planta – invasor, foi demonstrado que a produção de AS, AJ e ET varia quantitativamente e também no tempo. Uma análise global dos padrões de expressão gênica demonstrou que a característica de assinatura de sinal em cada combinação de cada invasor de *Arabidopsis* é composta em um surpreendente complexo de um grupo de alterações transcricionais, que em todos os casos, genes relacionados ao estresse tiveram expressões alteradas. Comparação desses grupos de genes diferencialmente expressos revelou que mudanças consistentes induzidas por patógenos e insetos com diferentes modos de ataque mostraram uma considerável sobreposição. De todas as mudanças consistentes induzidas por *A. brassicicola*, *P. rapae* e *F. occidentalis*, mais de 50% também foram induzidas por *P. syringae*. De modo notável, embora todos esses quatro invasores estimularam a biossíntese de AJ, a maioria das mudanças em expressão gênica dos genes responsivos ao AJ foram específicas ao invasor. Desse modo, nós demonstramos que AS, AJ e ET têm um papel primário importante no arranjo das respostas de defesa da planta, mas outros mecanismos reguladores como por exemplo, a comunicação entre as rotas ou sinais adicionais induzidos pelos invasores, eventualmente modelam fortemente o complexo dos sinais de defesa específicos para cada invasor.

NPR1 REGULA A COMUNICAÇÃO ENTRE AS ROTAS DE SINALIZAÇÃO DE AS E AJ ATRAVÉS DE UMA NOVA FUNÇÃO NO CITOSOL

Já foi demonstrado que a ativação de SAR reprime a sinalização de AJ em plantas, e desse modo, prioriza a resistência dependente de AS aos patógenos microbianos sobre defesa dependente de AJ contra insetos herbívoros (Pieterse et al., 2001). Além disso, experimentos farmacológicos e genéticos têm demonstrado que AS é um potente repressor de genes induzidos por AJ. Recentemente, nós investigamos o mecanismo molecular do efeito

antagônico do AS na sinalização do AJ (Spoel et al., 2003). Plantas de *Arabidopsis* incapazes de acumular AS produziram 25 vezes mais quantidade de AJ, e demonstraram um aumento de genes responsivos ao AJ, *LOX2*, *PDF1.2* e *VSP* em resposta à infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, indicando que em plantas do tipo selvagem, o acúmulo de AS induzido pelo patógeno está associado com a supressão da sinalização de AJ. Análise do mutante de *Arabidopsis npr1*, que é incapaz de transduzir o sinal do AS, demonstraram que o efeito antagônico do AS na sinalização do AJ requer a proteína reguladora NPR1. A localização nuclear da NPR1, que é essencial para a expressão de genes de defesa mediados por AS, não é necessária para supressão da sinalização do AJ, indicando que a comunicação do AS e AJ é modulada através de uma nova função da NPR1 no citosol (Spoel et al., 2003; Pieterse & Van Loon, 2004).

COMBINANDO ISR E SAR PARA MELHORAR O CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

As doenças de plantas são responsáveis por altas perdas na agricultura. Os métodos convencionais de controle são baseados na aplicação de agentes químicos e melhoramento genético visando à resistência. O uso de agentes químicos e sua presença no solo são altamente perigosos ao meio ambiente, especialmente quando esses químicos são aplicados repetitivamente de modo exagerado no solo para o controle de patógenos. Métodos clássicos de melhoramento dependem da disponibilidade de genes de resistência, os quais freqüentemente tem durabilidade curta. Além disso, essas duas estratégias de controle de doenças estão direcionadas contra um ou um grupo pequeno de patógenos. Resistência induzida é uma forma alternativa atrativa para a proteção de plantas, sendo baseada na ativação de mecanismos de resistência existentes na planta e no efeito contra um amplo espectro de patógenos de plantas (Van Loon et al., 1998). Desse modo, o conhecimento detalhado dos mecanismos moleculares da resistência induzida será importante no desenvolvimento de ações biológicas, duráveis e não danosas ao meio ambiente para proteção das culturas.

Anteriormente, nós demonstramos que a ativação simultânea de ISR e SAR resulta num nível maior de proteção induzida contra *P. syringae* pv. *tomato* (Van Wees et al., 2000). Isso indica que a rota de ISR dependente de AJ e ET e SAR dependente de AS agem de modo independente e aditivo no nível de proteção contra esse patógeno em particular. Além disso, nós fornecemos evidências que ISR e SAR conferem proteção diferenciada contra os mais diferentes tipos de patógenos (Ton et al., 2002b). Então a combinação desses dois tipos de resistência induzida pode proteger a planta contra um espectro complementar de patógenos, e pode até resultar num nível aditivo de

proteção induzida contra patógenos, cuja resistência do respectivo hospedeiro se processe através das rotas dependentes de AJ/ET e AS.

O controle biológico de plantas está ainda engatinhando, devido ao nível de proteção e sua consistência serem gerais e não suficientes para competir com os métodos convencionais de controle de doenças. Uma importante ação para melhorar a eficácia e consistência do controle biológico contra patógenos de solo seria aplicar combinações de microorganismos antagônicos com diferentes meios de ação (De Boer et al., 1999). Além disso, nossos resultados de que a combinação de ISR e SAR confere proteção contra um grande número de patógenos e um aumento dos níveis de proteção contra patógenos bacterianos específicos (Van Wees et al., 2000), nos oferece um grande potencial para integrar ambas formas de proteção de resistência induzida em futuras práticas agronômicas.

AGRADECIMENTOS

Todo esse trabalho aqui descrito é uma revisão das pesquisas que tem sido feitas dentro do setor de Fitopatologia da Universidade de Utrecht e com os nossos colaboradores os quais os nomes aparecem como co-autores na lista de referências bibliográficas.

LITERATURA CITADA

- BAKKER, P.A.H.M.; VAN PEER, R. & SCHIPPERS, B. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. In: TEMPEL, A. (Ed.). Biotic interactions and soil-borne diseases. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Scientific Publishers, p.217-30.
- CAO, H.; BOWLING, S.A.; GORDON, A.S. & DONG, X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6:1583-92.
- CAO, H.; GLAZEBROOK, J.; CLARKE, J.D.; VOLKO, S. & DONG, X. 1997. The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88:57-63.
- CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J. & Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7:210-6.
- DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C. & BAKKER, P.A.H.M. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to

- enhance suppression of fusarium wilt of radish. Eur. J. Plant Pathol. 105:201-10.
- DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.R.; VAN POECKE, R.M.P.; VAN PELT, J.A.; POZO, M.J.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C.; DICKE, M. & PIETERSE, C.M.J. 2004. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. SUBMITTED.
- DELANEY, T.P.; FRIEDRICH, L. & RYALS, J.A. 1995. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6602-6.
- DELANEY, T.P.; UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, D.; GAFFNEY, T.; GUR-RELLA, M.; KESSMANN, H.; WARD, E. & RYALS, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266:1247-50.
- DONG, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Curr. Opinion Plant Biol. 1:316-23.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H. & RYALS, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science 261:754-6.
- GLAZEBROOK, J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. Curr. Opinion Plant Biol. 4:301-8.
- HASE, S.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2003. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 219-26.
- HOFFLAND, E.; PIETERSE, C.M.J.; BIK, L. & VAN PELT, J.A. 1995. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 46:309-20.
- KACHROO, P.; YOSHIOKA, K.; SHAH, J.; DOONER, K.D. & KLESSIG, D.F. 2000. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. Plant Cell 12:677-90.
- KINKEMA, M.; FAN, W. & DONG, X. 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. Plant Cell 12:2339-50.
- KLOPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M. & SCHROTH, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature 286:885-6.
- KNOESTER, M.; PIETERSE, C.M.J.; BOL, J.F. & VAN LOON, L.C. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:720-7.

- KUC, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32:854-60.
- LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBROEK, M.; BAKKER, P.A.H.M. & SCHIPPERS, B. 1995a. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:655-64.
- LEEMAN, M.; VAN PELT, J.A.; HENDRICKX, M.J.; SCHEFFER, R.J.; BAKKER, P.A.H.M., AND SCHIPPERS, B. (1995b). Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology* 85:1301-5.
- LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; VERHAGEN, B.W.M.; KEURENTJES, J.J.B.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2002. Identification of genes involved in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in *Arabidopsis*. In: Schmitt, A. (Ed.). *Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases*, v.25, n.6, p.71-4.
- LYNCH, J.M. (1976). Products of soil microorganisms in relation to plant growth. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:67-107.
- MALAMY, J.; CARR, J.P.; KLESSIG, D.F. & RASKIN, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-4.
- MÉTRAUX, J.-P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-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* 250:1004-6.
- PIETERSE, C.M.J. & VAN LOON, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4:52-8.
- PIETERSE, C.M.J. & VAN LOON, L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:456-64.
- PIETERSE, C.M.J.; TON, J. & VAN LOON, L.C. 2001. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet* 3:ABN 068.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J.A. & VAN LOON, L.C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8:1225-37.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VAN PELT, J.A. & VAN LOON, L.C. 2002. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4:535-44.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J. & VAN LOON, L.C.

1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1571-80.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; TON, J.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.-P. & VAN LOON, L.C. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:123-34.
- RAAIJMAKERS, J.M. & WELLER, D.M. 1998. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:144-52.
- ROSS, A.F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-58.
- RYALS, J.; WEYMANN, K.; LAWTON, K.; FRIEDRICH, L.; ELLIS, D.; STEINER, H.Y.; JOHNSON, J.; DELANEY, T.P.; JESSE, T.; VOS, P. & UKNES, S. 1997. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *Plant Cell* 9: 425-39.
- RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.-Y. & HUNT, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1808-19.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W. & BAKKER, P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* 115:339-58.
- SPOEL, S.H.; KOORNNEEF, A.; CLAESSENS, S.M.C.; KORZELIUS, J.P.; VAN PELT, J.A.; MUELLER, M.J.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.-P.; BROWN, R.; KAZAN, K.; VAN LOON, L.C.; DONG, X.N. & PIETERSE, C.M.J. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15:760-70.
- SUBRAMANIAM, R.; DESVEAUX, D.; SPICKLER, C.; MICHNICK, S.W. & BRISSON, N. 2001. Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19:769-72.
- THOMMA, B.P.H.J.; EGGERMONT, K.; TIERENS, K.F.M. & BROEKAERT, W.F. 1999. Requirement of functional *ethylene-Insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 121:1093-102.
- THOMMA, B.P.H.J.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I.A.M.A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELANG, R.; CAMMUE, B.P.A. & BROEKAERT, W.F. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15107-11.

- TON, J.; PIETERSE, C.M.J. & VAN LOON, L.C. 1999. Identification of a locus in *Arabidopsis* controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:911-8.
- TON, J.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2002a. The *Arabidopsis* *ISR1* locus is required for rhizobacteria-mediated induced systemic resistance against different pathogens. *Plant Biol.* 4:224-7.
- TON, J.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2002b. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:27-34.
- TON, J.; DAVISON, S.; VAN WEES, S.C.M.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2001. The *Arabidopsis* *ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol.* 125:652-61.
- TON, J.; DE VOS, M.; ROBBEN, C.; BUCHALA, A.J.; MÉTRAUX, J.-P.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2002c. Characterisation of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant J.* 29:11-21.
- TUZUN, S. & KLOEPPER, J. 1995. Practical application and implementation of induced resistance. In: KUC, J. (Ed.). *Induced resistance to diseases in plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press, p.152-68.
- VAN LOON, L.C. & VAN STRIEN, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. & PIETERSE, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-83.
- VAN PEER, R. & SCHIPPERS, B. 1989. Plant growth responses to bacterization and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can. J. Microbiol.* 35:456-63.
- VAN PEER, R. & SCHIPPERS, B. 1992. Lipopolysaccharides of plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to fusarium wilt. *Neth. J. Plant Pathol.* 98:129-39.
- VAN PEER, R.; NIEMANN, G.J. & SCHIPPERS, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 91:728-34.
- VAN WEES, S.C.M.; LUIJENDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 1999. Rhizobacteria-mediated induced

- systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* 41:537-49.
- VAN WEES, S.C.M.; DE SWART, E.A.M.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8711-6.
- VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN 'T WESTENDE, Y.A.M.; HARTOG, F. & VAN LOON, L.C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:716-24.
- VERHAGEN, B.W.M.; GLAZEBROOK, J.; ZHU, T.; CHANG, H.-S.; VAN LOON, L.C. & PIETERSE, C.M.J. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:895-908.
- VROEMEN, C.W.; AARTS, N.; IN DER RIEDEN, P.M.J.; VAN KAMMEN, A. & DE VRIES, S.C. 1998. Identification of genes expressed during *Arabidopsis thaliana* embryogenesis using enhancer trap and gene trap *Ds*-transposons. In: Raikhel, N.V. (Ed.). Cellular integration of signal transduction pathways. Berlin, Springer Verlag, p.207-32.
- WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.-P. & RYALS, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-94.
- WEI, G.; KLOPPER, J.W. & TUZUN, S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86:221-4.
- ZHANG, Y.; FAN, W.; KINKEMA, M.; LI, X. & DONG, X. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6523-8.