



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Natasha Ruschel Soares

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

**PROCESSOS CELULARES ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS DE DEFESA DE
SOLANUM TUBEROSUM L. CONTRA *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM***

Porto Alegre

2014

Natasha Ruschel Soares

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

**PROCESSOS CELULARES ENVOLVIDOS NAS RESPOSTAS DE DEFESA DE
SOLANUM TUBEROSUM L. CONTRA *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

... aos meus irmãos. Pela amizade, carinho, compreensão e por todas as oportunidades que me dão diariamente de me sentir orgulhosa de vocês durante todos os anos de convívio. Gostaria de pensar que seremos sempre “cúmplices no crime” e, independente de tudo que acontecer, vocês vão sempre ser os maiores amores da minha vida.

... aos meus pais. Por terem, como eles dizem, me criado pro mundo. Por terem sempre apoiado toda e cada escolha que fiz, desde entregar a chupeta para dentista até o momento em que quis sair de casa com 16 anos. Viver a 720 km de distância é difícil todos os dias, alguns mais que outros, mas tenho certeza de que isso tudo só serviu para fortalecer a relação que temos. Além disso, não poderia deixar de agradecer pelo fato de sempre terem colocado a nossa felicidade e conforto em primeiro lugar, antes mesmo de vocês próprios. E, mais ainda, pelos maravilhosos 24 anos que vocês me proporcionaram. Vocês fazem falta perto de mim 36 horas por dia.

... à minha família. Pelo apoio incondicional a cada passo dado, mesmo não entendendo muito bem do que se tratava (Vó: “Mas porque tu não tem férias?”), e pelos longos almoços de domingo que sempre acabam se transformando em janta. E àqueles que me cuidam lá de cima: vocês são a força que me propulsiona adiante e os maiores exemplos de vida que já conheci. “De vocês, jamais esquecerei”.

... aos amigos que, de tão amigos, são família. Entendo que não foi fácil e que perdi muitos acontecimentos na vida de vocês, simplesmente por falta de tempo ou por excesso de compromissos. Quando se trabalha 10 horas por dia, muitas vezes sem finais de semana, não sobra muito tempo pra outras coisas. E vocês não são menos importantes, só faço isso pela segurança que provém da força e compreensão que recebo de vocês. Nada muda o sentimento, “When it’s for real, it’s forever”. Meu “muito obrigada” a uma pessoa em especial que, em tão pouco tempo, se tornou um gigante na minha vida. Tu tens feito muita diferença diariamente, não só pelo convívio, mas por todas as conversas, conselhos, carinho e piadinhas sem graça que tanto me fazem rir. Tu tens me acrescentado muitas coisas boas e a distância vai ser difícil mas tu já está do lado de dentro.

... aos colegas de laboratório, de profissão e de vida. Vocês são o que facilitaram essa etapa meio conturbada da minha vida. Obrigada por, desde o começo, terem feito de tudo pra me fazer bem-vinda, e pela convivência divertida e construtiva durante esses dois anos e meio. Em especial ao Wagner C. F. e a Natane G. que tanto contribuíram para que esta conquista fosse possível: sem a indispensável ajuda de vocês, eu ainda estaria me arrancando os cabelos em frente aos tantos frascos de plantas contaminadas. Aos que ainda residem e aos que um

dia já residiram na Biotec. Vegetal, é como diz aquela música do Leoni: “... e o que vai ficar na fotografia são os laços invisíveis que havia”.

... ao professor Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira por todo o conhecimento compartilhado na sua orientação durante três anos e meio de Iniciação Científica durante a graduação. Carlos, espero ter devidamente empregado tudo que me ensinaste durante nosso convívio de pouco mais de meia década e, mais do que isso, espero ter te deixado orgulhoso. Certamente, nunca almejei nada menos do que isso.

... ao Professor Dr. Marcelo Gravina Moraes por estar sempre tão disponível e disposto a auxiliar e ensinar. És um ótimo educador e foi um privilégio ter compartilhado contigo a sala de aula.

... à PUCRS pela bolsa concedida (Pró-bolsas).

Por último, mas não menos importante...

... aos professores Drs. Leandro Vieira Astarita e Eliane Romanato Santarém, meu orientador e minha co-orientadora de coração. Pela enorme paciência nesses dois anos e meio. Por tentar sempre, da melhor maneira possível, compartilhar o conhecimento e me tornar uma profissional competente. Pelas inúmeras tentativas, ainda durante a graduação, de me introduzir ao Maravilhoso Mundo das Plantinhas. Não importa o quanto eu fale ou escreva, jamais chegaria próximo de dizer o quanto sou grata por tudo o que vocês tem feito por mim contribuindo na aprimoração tanto das técnicas de laboratório quanto de convivência em grupo, torcendo por mim não só nos resultados de bancada mas também nos resultados pessoais. Além de toda a confiança que me foi depositada quando entrei no laboratório numa época de inovações na área de pesquisa, onde estávamos ampliando os horizontes e aventurando novos caminhos. “Nosso adeus não é para sempre”.

RESUMO

A espécie *Solanum tuberosum* é uma das espécies vegetais de maior importância no mundo, sendo a batata o quarto alimento mais consumido. Porém, apesar do uso extensivo de pesticidas, esta cultura ainda é muito afetada por doenças, acarretando grandes perdas econômicas. Uma importante alternativa ao uso de químicos para o manejo das pragas, é o fortalecimento das defesas naturais da planta através da promoção de seus mecanismos de defesa. Neste trabalho foi avaliada a incidência da doença causada por *Pectobacterium carotovorum* e o metabolismo vegetal relacionados à defesa, tal como atividade das enzimas peroxidases (POX) e polifenoloxidasas (PPO), síntese de compostos fenólicos, flavonoides e o acúmulo de ácido salicílico (AS) livre e conjugado. Foram utilizados os indutores de defesa XTH e o Bion[®], bem como o bloqueador da síntese de etileno, AVG (aminoetoxivinilglicina), em plantas de batata cultivadas *in vitro*. O tratamento com Bion[®] não promoveu a resistência vegetal nas plantas inoculadas com *P. carotovorum*. Enquanto o uso do XTH foi eficiente na promoção de resistência das plantas, retardando o progresso da doença causada pela fitobactéria. Em plantas cultivadas na presença de Bion+AVG, foi observado um aumento na atividade de PPO em comparação com o controle, porém a atividade desta enzima é semelhante entre os tratamentos XTH e Bion[®]. Nas plantas do tratamento XTH+AVG a atividade da PPO se mantém semelhante às plantas do controle e do tratamento XTH. A atividade da POX foi promovida pelo tratamento Bion[®] em 24 horas pós-inoculação (hpi), enquanto que os tratamentos XTH+AVG e Bion+AVG induziram a maior atividade desta enzima em 72 hpi. Apesar das diferenças observadas nas atividades de PPO e POX, estas não apresentaram relação com a incidência da doença nas plantas. Em geral, os níveis de AS livre nos tecidos foi 65% maior que o AS conjugado. Em 24hpi, as plantas do tratamento Bion+AVG apresentaram os maiores níveis de AS livre (52,2 µg/g), enquanto os o tratamento XTH e AVG apresentaram os menores níveis de AS (4,87 e 4,82 µg/g, respectivamente).

PALAVRAS-CHAVE: Etileno, SAR, indutor de resistência, AVG, batata, ácido salicílico

ABSTRACT

Solanum tuberosum is one of the most important crops worldwide being the fourth most consumed food. Despite its importance, this crop presents a high susceptibility to a wide range of pathogens, leading to an extensive yield loss. A potential approach for disease control in potato is the understanding of the mechanisms of resistance induction and their relation to strengthening of natural plant defenses. In this work, the effect of defense inducers (XTH and Acibenzolar-S-methyl - Bion®) and ethylene blocker (aminoethoxyvinylglycine – AVG) in the plant metabolism was assessed. Biochemical markers for plant defense, such as POX and PPO enzymes, synthesis of phenolic compounds, flavonoid fraction and salicylic acid accumulation were also evaluated. Bion® resulted in a negative effect upon *P. carotovorum* inoculated plants, whilst XTH delayed disease progression. Plants cultivated in the presence of Bion+AVG showed an increase in PPO activity comparing to the control plants, although its activity was similar between XTH and Bion® plants. POX activity was promoted by Bion® at 24 hpi, however, at 72 hpi plants showed higher POX activity within XTH+AVG and Bion+AVG treated plants, compared with non-treated plants. In general, plants presented free SA levels 65% higher than conjugated one. The highest concentrations of SA (52.2 µg/g) was found in Bion+AVG treated plants, whilst the lowest concentrations (4.8 µg/g) were found in XTH and AVG treated plants.

KEY WORDS: Inducers, ethylene, SAR, AVG, potato, salicylic acid

SUMÁRIO

Capítulo I	8
Introdução	9
Justificativa	20
Hipótese	21
Objetivos	21
Capítulo II	22
Introduction	25
Materials and Methods	27
Results	29
Discussion	31
Literature cited	34
Figures and Tables	37
Capítulo III	42
Conclusão	43
Perspectivas	43
Referências – Capítulo I	44

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

JUSTIFICATIVA

HIPÓTESE

OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

SOLANUM TUBEROSUM L.

A família Solanaceae possui diversas espécies com grande importância econômica, tais como *Solanum lycopersicon* (tomate), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Capsicum annuum* (pimentão), *Solanum melongena* (berinjela) e *Solanum tuberosum* (batata). Entre essas, a batata é o quarto alimento mais consumido no mundo, depois do arroz, do trigo e do milho (1).

É uma planta dicotiledônea, herbácea, que possui o caule dividido em duas partes: uma porção aérea que compreende a fração fotossintética da planta, e uma porção subterrânea representada por tubérculos, com reservas amiláceas, constituindo os principais órgãos de armazenamento de nutrientes e de reprodução da planta.

Dentre as diversas variedades de batata cultivadas no Brasil, a cultivar Ágata vem se destacando no mercado brasileiro. Originária da Holanda, apresenta características comerciais importantes como tuberização precoce, uniformidade e boa aparência dos tubérculos, além de apresentar melhor rendimento agrícola (2). A produção mundial de batata é de aproximadamente 322 milhões de toneladas anuais, ocupando uma área de 18 milhões de hectares. A comercialização movimentada anualmente cerca de US\$ 63 bilhões, sendo os países asiáticos responsáveis por aproximadamente 41% do total da produção (3). Atualmente, no Brasil, são cultivados cerca de 130 mil hectares de batata, produzindo aproximadamente 3,5 milhões de toneladas de tubérculos por ano (4). A produção gaúcha é cerca de 378 mil toneladas de batata, ocupando uma área de aproximadamente 19 mil hectares (4).

O elevado custo de produção da batata, associado a um mercado agrícola com grande variação de preços, representam limitações para a expansão da área cultivada com esta espécie. Dentre os diferentes fatores envolvidos nos custos de produção, estão as grandes perdas devido, principalmente, à susceptibilidade das plantas ao ataque de patógenos. Estes custos levaram a uma crise persistente no segmento de pequenos produtores em todo o sul do país, diminuindo drasticamente tanto o número de bataticultores quanto a área cultivada (5).

A cultura da batata é afetada por muitas doenças, cujos agentes podem ser bacterianos e fúngicos, principalmente necrotróficos. Estes microrganismos são frequentes na maioria das áreas de produção e exigem múltiplas medidas de controle para minimizar as perdas causadas (6). O controle de doenças bacterianas envolve o uso de tubérculos-sementes certificados, cuidado para a minimização de lesões nos tubérculos e desinfestação prévia ao armazenamento. Porém, mesmo adotando cuidados no manejo dos tubérculos, ainda ocorrem grandes perdas na produção.

Uma abordagem atraente visando a diminuição da incidência de doença é a promoção das defesas naturais das plantas. Esta abordagem requer a elucidação dos mecanismos de respostas de defesa, levando ao aumento dos níveis da imunidade inata vegetal e, conseqüentemente, a resistência contra patógenos (7–9). Para tal, as interações entre as plantas e patógenos incompatíveis vêm sendo amplamente estudadas. Nesta situação, embora a planta não desenvolva a doença, o sistema de defesa vegetal é eficientemente ativado e conduz a planta à resistência. Ao passo que, em uma interação compatível, a defesa vegetal pode ser tardiamente ativada ou não ativada, condicionando a doença (10). Por exemplo, a interação de *S. tuberosum* com um patógeno incompatível (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*) prévia à inoculação de um patógeno compatível (*Phytophthora infestans*), levou ao desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade (HR – *hypersensitive response*) e ativação sistêmica de genes de defesa, havendo redução dos sintomas da doença (11).

Muitos trabalhos evidenciam o potencial de microrganismos como indutores bióticos de resistência vegetal. Um bom exemplo é o uso da suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como o filtrado dessa suspensão, na promoção da resistência de plantas de sorgo e milho contra os patógenos *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* (12,13). Suspensões desta levedura também foram eficientes na promoção da defesa de plantas de maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. *passiflora* (13) e de plantas de eucalipto contra *Botrytis cinerea* (13).

PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM

A fitobactéria *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, anteriormente conhecida como *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, é um dos patógenos bacterianos que mais acarreta perdas em muitas culturas (14,15). Esta bactéria é gram-negativa, não-esporeada, anaeróbia facultativa e caracterizada pela produção de grandes quantidades de enzimas pécticas extracelulares (14). Originalmente descrita como causadora de podridão-mole nos bulbos de plantas do gênero *Calla* (copo-de-leite), é também patógeno de plantas como beterraba, aipo, pepino, cenoura, berinjela, cebola, alho, pimenta, tabaco, tomate, nabo e batata (16). Comum em plantas com partes subterrâneas ou rasteiras, ricas em reservas energéticas como o amido, esta bactéria penetra nos tecidos através de aberturas naturais (lenticelas, estômatos ou hidatódios) ou de ferimentos causados tanto por insetos quanto pela senescência natural da planta (17). Os sintomas mais característicos da podridão-mole causada por este fitopatógeno são observados primeiramente no local da infecção. A estrutura torna-se mole, marrom, aguada e viscosa.

Em *S. tuberosum* esta é uma doença sistêmica perpetuada por tubérculos infectados, pois a principal forma de multiplicação é através da propagação vegetativa. Assim que acontece o estabelecimento do patógeno, as folhas tornam-se amareladas e as hastes passam a apresentar pontos de apodrecimento partindo dos nós basais. O progresso da doença é acelerado pela alta temperatura e umidade, além de persistir durante o armazenamento e no solo (16). Ela ataca os tecidos através da secreção de enzimas que degradam a pectina das paredes celulares das células vegetais e da produção de efetores, proteínas que induzem a morte celular (18). As folhas da planta infectada apresentam déficit na fotossíntese, além do comprometimento do crescimento e da formação de novos tubérculos.

INDUTORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

Os critérios aplicados a um agente que promove a proteção da planta, na sua qualificação como indutor abiótico, são: (a) nem o agente, nem o seu derivado metabólico possui atividade antimicrobiana *in vitro* ou em plantas envasadas; (b) o agente modifica a interação planta-patógeno, e portanto, ela se assemelha fenotipicamente a uma interação incompatível, a qual inclui mecanismos relacionados à defesa, induzidos primariamente ou após o desafio; e (c) o agente deve proteger a planta contra patógenos (19).

INDUTOR BION® (ACIBENZOLAR-S-METIL)

O produto comercial Bion® (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) foi lançado na Alemanha em 1996. Atualmente, tem registro em diversos países, inclusive no Brasil, onde é utilizado como ativador da defesa natural de plantas nas culturas de algodão, batata, cacau, citros, feijão, melão e tomate. Ele possui como princípio ativo o S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic (Acibenzolar-S-metílico). Este produto possui como característica ser um análogo sintético do hormônio ácido salicílico e agir ativando a resistência sistêmica adquirida (SAR) nas plantas. Entre os indutores abióticos da SAR, pode-se mencionar também o ácido β -aminobutírico (BABA), o ácido salicílico (AS) e seus respectivos análogos funcionais, como o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) e o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotiólico (acibenzolar-S-metil).

INDUTOR XTH

O indutor XTH é constituído de extratos autoclavados da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Este indutor biótico não é um produto comercial, mas tem sido utilizado com sucesso em experimentos de pesquisa, promovendo o metabolismo de defesa de plantas de batata cv. Ágata (Astarita, *com. pess.*, PI 0805370-7). Estudos prévios demonstram que a

aspersão deste extrato bacteriano em plantas de batata promove o retardo do aparecimento de sintomas de doença causada pela fitobactéria *P. carotovorum*, podendo representar um indutor alternativo para o manejo e redução de doenças bacterianas.

DEFESA VEGETAL

Em comparação com o sistema imune de vertebrados que possui células especializadas e receptores altamente específicos, além dos sistemas inato e adaptativo, a imunidade vegetal é menos complexa, pois as plantas não possuem células móveis e especializadas para defesa (22). Porém, através de inúmeras estratégias, as plantas são capazes de estabelecer respostas patógeno-específicas. Em alguns casos, isto pode resultar em memória imune, e não somente ao indivíduo que sofreu o ataque do patógeno, mas também aos descendentes através de mecanismos epigenéticos (23–25). Sendo assim, a imunidade vegetal é capaz de compartilhar características próximas de sistemas mais complexos.

A seleção natural e a co-evolução com os patógenos levaram as plantas a adaptar seu metabolismo de forma a refinar e a otimizar seus mecanismos de defesa. Uma das estratégias utilizadas pelas plantas após o contato entre o patógeno e a superfície da célula hospedeira é a produção de compostos tóxicos para o patógeno (26). Originalmente, foi utilizado o termo eliciador para denominar os estímulos que induzem a síntese ou acúmulo de produtos antimicrobianos, como fitoalexinas (27,28). Porém, atualmente, este termo tem sido utilizado para referir-se a quaisquer moléculas que estimulem a defesa vegetal, seja o acúmulo de fitoalexinas, ou a indução da morte celular através de reações de hipersensibilidade, ou ainda a síntese de proteínas que inibem enzimas de degradação produzidas por patógenos (27).

A primeira barreira que os patógenos encontram na célula vegetal é a parede celular. Ela funciona como uma camada rígida protetora do protoplasto, composta por polissacarídeos, como celulose, hemicelulose e pectina. A parede celular é uma estrutura dinâmica, constantemente remodelada conforme as exigências de crescimento e desenvolvimento do vegetal (29,30). Nos processos de defesa, a célula pode rapidamente depositar calose adjacente à parede celular, reforçando-a e impedindo a passagem do patógeno para o citoplasma, ou ainda acumular compostos fenólicos, toxinas e polímeros de lignina (31).

Além da barreira física representada pela parede celular, o reconhecimento da presença de patógenos é determinante para a ativação da defesa vegetal. O sistema de reconhecimento de patógenos utiliza receptores localizados tanto no citoplasma quanto na membrana plasmática das células, como os Receptores de Reconhecimento de Padrões (ou PRR – *pattern recognition receptors*), capazes de reconhecer Padrões Moleculares Associados a Patógenos (ou PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*) (32,33). Os PAMPs são estruturas

evolutiveamente conservadas como flagelinas, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, encontradas na superfície celular de microrganismos e que, normalmente, estão relacionadas à sua sobrevivência ou ao hábito de vida e, portanto, não podem ser perdidos sem que haja consequências para o microrganismo (34,35). Em *P. infestans*, foi descrito um PAMP oligopeptídeo de 13 aminoácidos (denominado de Pep13), cujo reconhecimento induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o acúmulo do ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ), bem como a expressão de genes de defesa e a promoção de resposta de hipersensibilidade (36). Este tipo de defesa, desencadeada pelo reconhecimento de PAMPs através de PRRs, inclui a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de cascatas de transdução de sinais, deposição de calose na parede celular, alteração nos níveis hormonais, indução da expressão de genes de defesa e produção de compostos antimicrobianos (37,38), formando a chamada resistência basal ou imunidade desencadeada por PAMP (ou PTI – *PAMP-triggered immunity*) (39,40).

A PTI é eficiente nas etapas iniciais do processo de infecção. Porém, ao longo do tempo, os patógenos desenvolveram estratégias para burlar este sistema, produzindo moléculas efetoras que são transportadas diretamente para o citoplasma da célula vegetal, causando a supressão e/ou modificação da resistência basal. Este transporte pode ser realizado, por exemplo, através do Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS – *type 3 secretion system*), mecanismo comumente utilizado por bactérias gram-negativas como a fitobactéria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae* e as necrotróficas *P. carotovorum* e *Ralstonia solanacearum* (41–43). Por sua vez, através da co-evolução planta-patógeno, o sistema imune vegetal recrutou proteínas de Resistência (ou proteínas R). Estas proteínas R são receptores citoplasmáticos que detectam e reconhecem estas moléculas efetoras (26,35,44) e ativam cascatas de transdução de sinais que podem resultar na morte celular programada via HR (37). Este padrão de resposta é denominado de imunidade desencadeada por efetores (ou ETI – *effector-triggered immunity*) (39,44).

RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA (SAR)

A ativação da resistência do vegetal pode levar a uma imunização sistêmica contra futuras infecções, não só contra o patógeno que provocou a infecção, mas também contra outros patógenos, fenômeno este denominado Resistência Sistêmica Adquirida (ou SAR – *Systemic Acquired Resistance*), termo proposto por A. Frank Ross (45). Este pesquisador observou que a inoculação local do vírus do mosaico do tabaco (TMV – *tobacco mosaic virus*) em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) resultava na proteção local e sistêmica contra o TMV, bem como contra outros patógenos, e que esta resistência poderia durar cerca de 20

dias (45). Além disso, em nível molecular, a ativação da SAR pode promover o aumento na expressão de genes Relacionados à Patogênese (PR - *Pathogenesis Related*), cujas proteínas possuem, em grande parte, propriedades antimicrobianas (46). Apesar dessas proteínas terem sido descritas na década de 1970, a função específica de cada proteína desta família nas respostas de defesa vegetal ainda não é completamente conhecida (47). Ainda assim, estes genes funcionam como marcadores para a ativação da SAR nos vegetais.

Estudos demonstraram que o aumento da expressão de genes PR bem como o aumento da resistência contra patógenos, podem ser induzidos por tratamentos com ácido salicílico (AS) ou seus análogos (47,48), por exemplo, o Acibenzolar-S-metil anteriormente mencionado. Porém, a comprovação de que o AS está relacionado à ativação da SAR só ocorreu na década de 1990 através da publicação de dois estudos (49,50), que demonstraram a correlação entre a resistência sistêmica e o aumento da expressão de PRs e o acúmulo de AS nos tecidos. As pesquisas de Gaffney et al. (1993) confirmaram esta correlação através de estudos utilizando plantas de tabaco geneticamente modificadas. Nestas plantas, foi inserido o gene *nahG* que codifica uma enzima capaz de remover o AS através da sua conversão em catecol (51,52). A redução dos níveis do AS levou à diminuição da expressão de genes PR, dificultando a defesa do vegetal pela incapacidade de ativar a SAR. Por outro lado, a conversão de AS a metil salicilato, composto volátil, transporta a resistência para outros tecidos e para indivíduos próximos ao vegetal (53).

METABOLISMO SECUNDÁRIO RELACIONADO À DEFESA

O metabolismo secundário vegetal possui papel importante na adaptação do vegetal ao meio em que vive. É também importante na interação das plantas com outros organismos, tais como insetos e microrganismos, patogênicos ou não, onde poderão atuar na produção de compostos diretamente ligados à promoção da defesa vegetal (54).

FENILPROPANÓIDES

Esta rota metabólica inclui muitos componentes essenciais na promoção de resistência vegetal. O aumento na atividade de enzimas como peroxidases (POX), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (PAL) tem sido demonstrado como um importante fator na indução de resistência contra *Alternaria solani* em tomate promovido pelo ácido abscísico (55).

A enzima PAL, é uma enzima chave responsável pela transformação da fenilalanina em ácido cinâmico (precursor da via) e pela formação da maior parte dos compostos fenólicos vegetais. A PAL participa também da biossíntese do AS, pois foi demonstrado que sua atividade é altamente induzida durante a interação planta-patógeno e que a inibição desta

enzima resulta no desenvolvimento de doença, mesmo em uma interação incompatível como a interação entre *Arabidopsis* e o oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* (56). Neste caso, a aplicação exógena de AS ou de seus análogos devolvem ao vegetal a sinalização por AS, pois assim é compensada a falta de uma enzima-chave na via de síntese deste composto (57).

As POX também fazem parte da via dos fenilpropanóides. Em relação ao seu papel na defesa vegetal, auxiliam a planta no fortalecimento da parede celular, uma vez que estão envolvidas na síntese de lignina e seus precursores (58). Estas enzimas já foram correlacionadas ao processo de proteção antioxidativa e na produção de intermediários de espécies reativas de oxigênio (59,60). Em plantas de *Arabidopsis* foi observada a redução da explosão oxidativa devido ao silenciamento de genes codificantes para peroxidases, levando à diminuição da resistência vegetal contra fungos e bactérias (61).

A importância das polifenoloxidasas (PPOs) na resistência a doenças consiste na propriedade de oxidar compostos fenólicos a quinonas, as quais são frequentemente mais tóxicas aos microrganismos que os compostos fenólicos originais. Portanto, o aumento na atividade dessas enzimas resulta em altas concentrações de produtos tóxicos participando da resistência a infecções (62,63).

ETILENO (ET)

O etileno é um hormônio gasoso capaz de regular muitos processos fisiológicos nos vegetais como a senescência, o amadurecimento e a abscisão foliar e floral, além de estar envolvido nas respostas a estresses bióticos e abióticos (64). A biossíntese do etileno inicia a partir do aminoácido metionina, tendo o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como precursor imediato convertido a partir de S-adenosilmetionina (SAM) através da ação da enzima ACC sintase (ACS). A conversão do ACC em etileno se dá através de reações catalisadas pela ACC oxidase (ACO) (65).

A ação da enzima ACC sintase pode ser inibida por um composto químico chamado aminoetoxivinilglicina (AVG), mesmo em concentrações de 5 μ M, como foi demonstrado em plantas de tomate (66). Este composto é utilizado em estudos onde se deseja inibir a síntese de etileno, sem que seja necessário o emprego de plantas mutantes. Em plantas de batata, o AVG foi utilizado para inibir a atividade da enzima ACC sintase, resultando no impedimento na produção de etileno. Porém, as plantas inoculadas com uma raça incompatível do patógeno *Phytophthora infestans* continuaram exibindo sinais de HR. Isto sugere que, apesar de haver aumento na síntese deste hormônio durante HR, esta elevação não é a causa da resistência das plantas a esta raça do patógeno (67). Entretanto, o tratamento com AVG em legumes de ervilha desafiadas com *Fusarium solani* induziu a atividade de quitinase e β -1,3-glucanase (68). Petri et al. demonstraram que o AVG melhora significativamente a regeneração de plantas de

damasco *in vitro* (69). Em culturas de batata, o AVG pode ser utilizado em tubérculos no final da época de armazenamento para que seja induzido o brotamento e o alongamento dos brotos (70). Com relação ao papel do ET na defesa vegetal, foi demonstrado que o bloqueio da ACC sintase pelo AVG auxilia na indução da defesa em plantas de batata frente a micotoxinas produzidas pelo fungo *Verticillium albo-atrum*. Neste caso, as toxinas agem ativando a produção de ET, o que, por sua vez, aumenta os sintomas da doença causada pelo fungo (71).

O etileno possui importante atividade na defesa vegetal, porém, pode exercer diferentes funções dependendo do tipo de patógeno e da espécie de planta atacada (72–74). A aplicação do etileno pode tornar plantas de diferentes espécies mais susceptíveis ou mais resistentes ao fungo *Botrytis cinerea* (73). Porém, o aumento da susceptibilidade em resposta ao etileno pode ser devido à indução da senescência dos tecidos, bem como depender do momento em que o etileno é aplicado (antes ou após a inoculação da planta com o patógeno) (73). Na tentativa de determinar o efeito do etileno foram desenvolvidas várias plantas mutantes insensíveis a este hormônio ou que possuíam algum tipo de bloqueio na sua síntese. Os estudos com estes mutantes indicam certa discrepância nas respostas mediadas por etileno diante de diferentes patógenos. Apesar disso, os resultados sugerem que o etileno parece diminuir os sintomas de doenças causados por microrganismos necrotróficos, ao passo que aumenta a susceptibilidade das plantas infectadas por patógenos hemibiotróficos (75).

Em geral, algumas fitoalexinas podem ser induzidas na presença de etileno, embora esta indução dependa da classe da fitoalexina em questão e da via metabólica envolvida. Normalmente, aquelas que derivam da via dos fenilpropanóides são mais fortemente induzidas por etileno em diferentes espécies vegetais (76–78).

ÁCIDO JASMÔNICO

Apesar de exercerem várias funções fisiologicamente importantes, os jasmonatos estão principalmente relacionados à defesa vegetal contra a herbivoria e microrganismos necrotróficos, chegando a regular a expressão de 67-84% dos genes responsivos a lesões em folhas de *Arabidopsis* (75,79). Os jasmonatos são compostos convertidos diretamente de ácido linolênico através da ação da enzima lipoxigenase. Entre os mais estudados, o conjugado AJ-Ile parece ser a forma que possui maior atividade biológica (80), sendo bem caracterizado como molécula sinalizadora.

ÁCIDO SALICÍLICO (AS)

O AS é um composto produzido naturalmente por muitos organismos, dentre os quais os vegetais, onde atua como molécula de sinalização nas respostas de defesa. Uma das rotas

de síntese do AS envolve a formação de benzoato a partir da quebra das cadeias de cinamato (81), através da atividade da enzima PAL. O aumento da atividade da PAL está relacionado a respostas de defesa vegetal após a infecção por patógenos, podendo promover o acúmulo de AS e a consequente indução da SAR (82), sugerindo que a atividade da PAL seria essencial para a formação de precursores do AS.

A síntese do AS é indispensável para a ativação da SAR (52), promovendo tanto a expressão de genes relacionados à defesa (83) quanto interagindo com outros sinais promotores de defesa vegetal (81,84). A ativação da SAR necessita da translocação de um ou mais sinais a partir do local da infecção até tecidos distais para tornar a resposta sistêmica. Segundo Vernooij et al., o AS não é o sinal móvel para ativação da SAR, sendo provavelmente o MeAS (metil salicilato – uma forma conjugada de AS) o sinalizador móvel (85,86). O MeAS acumula-se no tecido infectado e é, então, translocado para tecidos distais, onde será novamente convertido a AS (85,86).

Os níveis constitutivos de AS não dependem apenas da espécie vegetal, mas também do cultivar analisado. Os níveis de AS em tabaco, pepino e *Arabidopsis* são baixos (87), enquanto em arroz, batata e tomate os níveis endógenos constitutivos são altos (88–90). Em plantas com baixos níveis constitutivos, um pequeno aumento na concentração endógena de AS afeta consideravelmente o desenvolvimento de respostas de defesa. Por outro lado, em plantas com altos níveis constitutivos são necessárias alterações na sensibilidade da planta a este hormônio, uma vez que estas plantas naturalmente possuem baixa sensibilidade. Em plantas de batata, por exemplo, o AS foi necessário para a indução de resistência contra o patógeno hemibiotrófico *P. infestans*, uma vez que as plantas geneticamente transformadas para expressão de *NahG* não foram capazes de resistir ao patógeno, mesmo com aplicação exógena de ácido araquidônico (91,92). Além disso, plantas que expressavam *NahG* apresentaram maior susceptibilidade em interações compatíveis com o patógeno devido a falhas na indução dos genes *PR* e na deposição de calose (91). Os altos níveis de AS endógeno em batatas influencia fortemente a expressão do gene *PR1* fazendo com que tenha alta expressão basal constitutiva (92), sendo confirmado pela baixa expressão deste gene em plantas de batata com baixos níveis de AS devido a expressão do gene *NahG*.

CROSSTALK

Além do importante papel individual dos hormônios etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico na defesa vegetal, a ação conjunta desses compostos é ainda mais importante, pois fortalece e amplifica as possibilidades de resposta das plantas. Neste sentido, há inúmeros relatos de uma forte ligação entre a defesa mediada por ET e AJ, como, por exemplo, no

estabelecimento da interação entre plantas e rizobactérias. Nesse caso, a interação entre ET, AJ e AS relativa à colonização de raízes vegetais por rizobactérias não-patogênicas parece estar bem estabelecida (93,94). Durante este processo, ocorre a ativação do gene *NPR1* levando à promoção de Resistência Sistêmica Induzida (ISR) independente do acúmulo de AS e da expressão de *PR1*, envolvendo componentes da sinalização por AJ e ET (95). Neste sentido, a indução da expressão de uma PR-5 específica de raiz em *Arabidopsis* pode ser obtida pela aplicação exógena de ACC (precursor de ET), mas não por AS ou AJ (96). A sinalização mediada por AJ e ET está relacionada, principalmente, às respostas de defesa contra insetos e microrganismos necrotróficos, enquanto que a sinalização por AS está associada à defesa contra patógenos biotróficos e à ativação da SAR. Isto representa a resposta diferencial da planta ao agente agressor. Sendo assim, a promoção da SAR pode elevar a suscetibilidade vegetal frente ao ataque de patógenos necrotróficos (97). Foi relatado que a biossíntese de AJ e a expressão de genes responsivos ao ET podem ser inibidos ou reduzidos em resposta ao acúmulo de AS na indução e estabelecimento da SAR (98).

Schenk et al. monitoraram a expressão gênica de *Arabidopsis* em resposta a diferentes estímulos através de *microarray*, e observaram que aproximadamente metade dos genes que eram induzidos por ET, eram também induzidos por AJ (99). Contudo, poucas evidências existem sugerindo interações antagônicas entre estes hormônios. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que ET e AS atuam juntos na indução de alguns genes de defesa, como por exemplo, o *NPR1*. Porém, alguns resultados sugerem que a via de sinalização comandada por ET também pode afetar negativamente respostas dependentes de AS: o nível basal de mRNA de *PR1* parece ser significativamente elevado em plantas mutantes *ein2* (mutantes insensíveis ao etileno) (100).

Com relação à interação entre ET e AS, estudos demonstram haver interação tanto sinérgica quanto antagônica entre ambos os hormônios (75,102). Em tomate, o desenvolvimento dos sintomas de doença causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* necessita de ET e de AS, sendo o acúmulo de AS dependente da síntese de ET (101). Mesmo em interações antagônicas, existem componentes regulatórios comuns a ambas as vias de sinalização, pois na sua atuação contra patógenos necrotróficos, o AJ pode também induzir SAR. Esta indução resulta em reações locais de hipersensibilidade, tornando o tecido desfavorável ao desenvolvimento do patógeno (75,102). Contudo, parece que o AJ não contribui de forma decisiva para a resistência vegetal, a não ser que sua indução ocorra anteriormente à infecção (74,103).

JUSTIFICATIVA

Devido à importância da cultura da batata e perdas de produção estimadas em mais de o elevado número de perdas devido ao ataque de patógenos, é relevante avaliar estratégias capazes de minimizar estas perdas, desenvolvendo ferramentas que possam auxiliar no manejo da lavoura.

Uma abordagem alternativa ao manejo convencional da lavoura com pesticidas químicos é a indução das defesas naturais das plantas, levando ao aumento da resistência contra patógenos.

Esta promissora abordagem utilizando indutores de resistência bióticos e abióticos, que são produtos não-tóxicos, vem estimulando as pesquisas visando conhecer os aspectos bioquímicos e moleculares envolvidos na promoção da resistência às doenças. Neste sentido, tem sido demonstrado nas interações planta-patógeno que a indução da resistência sistêmica adquirida (SAR) resulta na ativação de diferentes mecanismos bioquímicos para defesa, entre os quais podem ser citados o aumento da atividade de enzimas como peroxidases e polifenoloxidasas, além do acúmulo de proteínas PR e de fitoalexinas.

O uso com sucesso da indução de resistência para o controle de doenças vegetais depende, em grande parte, do conhecimento referente aos mecanismos celulares ativados em resposta a presença de patógenos ou de compostos com capacidade de promover processos de defesa, levando a redução da severidade de doenças causadas por fitopatógenos sem comprometer o crescimento das plantas. O presente projeto visa avaliar a importância do etileno nas respostas de defesa de *Solanum tuberosum* tratadas com indutores de resistência.

HIPÓTESE

A promoção do metabolismo de defesa em plantas de *Solanum tuberosum*, mediada pelos indutores Acibenzolar-S-metil e XTH, é dependente de etileno.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

→ Avaliar a contribuição do hormônio etileno nos mecanismos de defesa de plantas de *Solanum tuberosum* cultivadas na presença dos indutores de resistência Acibenzolar-S-metil e XTH e desafiadas com o fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as respostas de defesa de *S. tuberosum* cultivadas *in vitro* na presença de aminoetoxivinilglicina (AVG) e tratadas com os indutores Acibenzolar-S-metil e/ou XTH;
- Determinar o progresso da incidência da doença em plantas inoculadas com o patógeno *Pectobacterium carotovorum*;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos: atividade enzimática (PPO e POX), a produção e acúmulo de ácido salicílico, de compostos fenólicos e da fração flavonoide;
- Relacionar as alterações metabólicas promovidas pelos indutores Acibenzolar-S-metil e XTH às modificações na defesa da planta contra a fitobactéria patogênica *P. carotovorum*.

Defense responses of *Solanum tuberosum* plants infected with *Pectobacterium carotovorum* and treated with ethylene blocker (AVG) and inducers.

*O manuscrito será submetido para a revista Phytopathology, cujo fator de impacto é 2,42.

Instruções para os autores:

http://apsjournals.apsnet.org/userimages/ContentEditor/1173286505152/phyto_author_instructions.pdf

1 **Defense responses of *Solanum tuberosum* plants infected with *Pectobacterium***
2 ***carotovorum* and treated with ethylene blocker (AVG) and inducers.**

3 Natasha Ruschel Soares¹, Wagner Calegari Fagundes¹, Natane Girelli¹, Eliane Romanato
4 Santarem¹, Leandro Vieira Astarita^{1*}

5

6 ¹Laboratory of Plant Biotechnology, School of Biosciences, Pontifícia Universidade Católica do
7 Rio Grande do Sul, Ipiranga Avenue, 6681, Building 12A, CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS,
8 Brazil.

9

10 *Corresponding author:

11 Leandro Vieira Astarita, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio
12 Grande do Sul, Ipiranga Avenue, 6681, Building 12A, CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

13 Tel.: +55 51 3353 4148

14 E-mail: astarita@pucrs.br

15

16 **ABSTRACT**

17 *Solanum tuberosum* presents high susceptibility to a wide range of pathogens, resulting
18 in extensive yield losses. A potential approach for disease management is the enhancement of
19 plant resistance, strengthening plants natural defenses. The aim of this work was to evaluate
20 potato defense in response to *Pectobacterium carotovorum* infection in plants treated with
21 inducers (XTH and Acibenzolar-S-methyl - Bion®) and an ethylene blocker
22 (aminoethoxyvinylglycine - AVG). For this purpose, biochemical markers for plant defense,
23 such as peroxidases (POX) and polifenoloxidase (PPO) enzymes, synthesis of phenolic and
24 flavonoid compounds and salicylic acid accumulation were assessed. Bion® resulted a
25 deleterious effect upon *P. carotovorum* inoculated plants, whilst XTH was effective on delaying
26 plant disease progression. Plants cultivated in the presence of Bion+AVG showed an increase
27 in PPO activity in comparison to the control plants. PPO activity was similar between plants
28 treated with XTH and Bion®. POX activity was induced by Bion® at 24 hpi, whereas, at 72 hpi,
29 higher POX activity was observed in XTH+AVG and Bion+AVG treatments, compared with non-
30 treated plants. Overall, plants presented 65% higher level of free SA levels than the conjugated
31 one. Highest concentrations of SA (52.2 µg/g) was found in Bion+AVG treated plants, whilst the
32 lower concentrations (4.8 µg/g) were found in plants treated with XTH and AVG treatments.

33 **KEY WORDS:** Defense inducers, SAR, potato, salicylic acid

INTRODUCTION

Potato crops are infected by several bacterial pathogens that cause important economic losses. The necrotrophic Enterobacteriaceae *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (formerly *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), is one of the most economically relevant pathogens of this crop. It is characterized for causing soft-rot and blackleg, two of the most devastating diseases in worldwide potato production. As the bacteria feed on dead tissue, they secrete enzymes that degrade plant cell wall leading to necrosis throughout the whole plant, being characterized as a necrotrophic bacterial pathogen (1). An attractive approach in disease management is based on induction of natural defense mechanisms by applying resistance inducers. This approach has been widely studied and requires the elucidation of plant defense mechanisms in order to promote plant defense without compromising its growth. Amongst the inducers, the compound Acibenzolar-S-methyl (ASM), a synthetic salicylic acid analogue, is one of the most extensively tested compounds in different field conditions and plant-pathogen interactions (2). This inducer protects plants mostly against biotrophic pathogens through systemic resistance. Another category, biotic inducers, is represented by living organisms, highly conserved parts of them or their metabolites, which are able to induce a local or systemic plant defense response (3). These responses are often sufficient to hamper pathogen invasion.

Activation of plant resistance can lead to a systemic immunization against future infections, phenomenon named Systemic Acquired Resistance (SAR). Induction of systemic resistance in *S. tuberosum* against *Phytophthora infestans* was observed when plants were exposed to a mixture containing cell wall fragments of the oomycete (3). Likewise, the previous interaction between *S. tuberosum* and an incompatible pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* has led to the development of a hypersensitive response, the systemic activation of defense genes and the reduction of disease symptoms caused by *P. infestans* (4). A filtrate of *Saccharomyces cerevisiae* has also been used as biotic inducers to control diseases in a few species, such as potato and tomato, in order to reduce the number of fungicide applications (5). In a similar study, inoculation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in potato leaves induced hypersensitive response as well (6). This result has led to the development of an extract constituted of an *X. axonopodis* autoclaved culture, which was named XTH and was shown to be efficient as biotic inducer (PI 0805370-7).

Through signaling molecules like salicylic acid (SA), SAR induces metabolic and structural modifications in uninfected tissues, such as the production of reactive oxygen species (ROS), phytoalexin biosynthesis, thickening of cell wall, accumulation of pathogenesis-related proteins and alterations of enzyme activities, such as peroxidases (POX), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenoloxidases (PPO). SA is essential for SAR activation and plant defense against pathogens (8) promoting the expression of pathogen-related genes as well as interacting with other defense promoting signals (9). The increase in PAL activity is directly related to defense responses after pathogen infection, either promoting SA accumulation or inducing SAR, suggesting the importance of PAL activity in the production of SA precursors. SA has been shown to play an essential role in the activation of SAR

71 in potato plants against *P. infestans*. However, considering the high SA basal levels in potato, this
72 hormone may not guarantee a constitutive resistance in healthy plants (10).

73 Secondary metabolism plays an important role in the plant adaptation and promotion of plant
74 defense. Phenolic compounds correspond to the main plant defense metabolites produced by the
75 phenylpropanoid pathway. They have a direct toxic effect on pathogens and are precursors for the
76 synthesis of antimicrobial products catalyzed by polyphenoloxidases, as well as participate in the lignin
77 production, leading to the cell wall thickening. The relation between soluble phenols and the activity of
78 PPO, POX and PAL in potato defense against *P. carotovorum* was demonstrated by Ngadze et al. (11).
79 Peroxidases are also essential for defense as they are involved in the synthesis of lignin precursors. They
80 are also associated with antioxidative protection process and are associated with production of ROS
81 intermediates (12). The reduction of oxidative burst in *Arabidopsis* plants, due to peroxidases silenced
82 genes, led to decrease in fungi and bacteria resistance (13). In potato plants, POX and PPO activity have
83 been observed to increase after inoculation with *Ralstonia solanacearum*, which was correlated to the
84 age of the plants, where the oldest leaves were more resistant (6). The importance of PPO enzymes in
85 plant resistance consists in their ability of oxidizing phenolic compounds into quinones, which are
86 frequently more toxic than the original phenolics. Therefore, the increase in their activity results in high
87 concentrations of toxic products that contributes to infection resistance. The overexpression of PPO in
88 tomato tissues has resulted in a significant increase in resistance against *Pseudomonas syringae* pv.
89 *tomato* (14). Moreover, the synthesis of toxic phenols by PPO and phytoalexins play an important role in
90 the defense of potato plants against *P. infestans* (15).

91 Ethylene (ET) is also essential in plant defense, even though it can have different functions
92 depending on the type of pathogen and the plant species (16). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
93 (ACC) is converted to ethylene through a reaction catalyzed by the ACC synthase, reaction that can be
94 blocked by a chemical named aminoethoxyvinylglycine (AVG), even with concentrations as low as 5 μ M,
95 as demonstrated in tomato plants (17). This compound is used in studies where suppression of ET
96 pathway without involving mutant plants is assessed. It has been demonstrated that plant defense was
97 induced when the ACC synthase was blocked by AVG in potato plants treated with *Verticillium albo-*
98 *atrum* (18). Nevertheless, ethylene seems to lessen disease symptoms caused by necrotrophic
99 microorganisms, whereas it increases susceptibility in plants infected by hemibiotrophic and biotrophic
100 microorganisms (19).

101 There is a crosstalk between plant hormones in the promotion of defense, like the connection
102 between jasmonic acid (JA) and ET. The JA/ET signaling is related to plant defense against insects and
103 necrotrophic microorganisms, while SA signaling is more related to defense against (hemi)biotrophic
104 pathogens and SAR activation. Moreover, it has been suggested that ET signaling pathway may affect
105 negatively SA-dependent responses. Even in antagonistic interactions, there are common regulatory
106 components to both signaling pathways, as JA is able to induce SAR when plants are infected by
107 necrotrophic pathogens (19). In tomato plants, symptom development of the disease caused by

108 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* requires both SA and ET, and SA accumulation in infected
109 plants is dependent on ET synthesis (20).

110 The aim of the present work was to evaluate the role of ethylene in the plant defense
111 mechanism. For this purpose, *in vitro* potato plants were used and the medium culture was
112 supplemented with biotic inducer (XTH) and a synthetic inducer (ASM), as well as AVG. Plants were
113 infected with *P. carotovorum* in order to analyze disease development and secondary metabolism, such
114 as enzymatic activity (PPO and POX) and production of phenolic compounds and salicylic acid.

115

MATERIALS AND METHODS

116 **Plant Material.** Potato tubers cv. Agata were kindly supplied by the Brazilian Agricultural Research
117 Corporation (Canoinhas, SC, Brazil). The tubers were disinfested in ethanol 70% for 1 min, followed by
118 sodium hypochlorite (2% active chloride) for 20 min and fungicide Ridomil Gold MZ (3 g/L; Syngenta
119 S.A.) for 20 min. Disinfested tubers were submerged in gibberellic acid (GA₃; 25 mg/L) for 30 min for
120 dormancy loss. Then, tubers were transferred to trays with filter paper and maintained at 25±2°C and
121 16h photoperiod for about 15 days, until shoot development. Healthy shoot containing tubers were
122 transferred to plastic pots (8 L) filled with organic soil. Pots were maintained in greenhouse for
123 approximately 4 weeks, when the stem nodes were removed for the establishment of the *in vitro*
124 cultures. Stem nodes (ca. 4 cm), without leaves and petioles, were disinfested in 70% ethanol for 1 min,
125 sodium hypochlorite (1% active chloride) for 15 min and fungicide Ridomil Gold MZ 4 g/L for 20 min.
126 Under aseptic conditions, nodal segments (ca. 2 cm) were excised from the stems and cultivated on
127 basal medium for shoot growth consisting of MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 6 g/L agar and 5
128 mg/L benzyladenine (BA). The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving for 20 min at 121°C. All
129 cultures were maintained at 25±2°C, under 16 h-photoperiod at 30 μmol.m⁻².s⁻¹ irradiance. Experimental
130 plant material consisted in non-rooted plants with elongated axillary buds (ca. 12 cm length), which
131 were transferred to hormone-free MS medium supplemented with inducers or AVG.

132 **Bacterial pathogen.** The pathogen species used in this work was *Pectobacterium carotovorum* (material
133 kindly provided by Dr. Valmir Duarte from the Agronomic School of UFRGS, Brazil). It was cultivated in LB
134 (Luria-Bertani) liquid medium at 26°C for 16-20 hours in an orbital shaker (100 rpm). Cultures were
135 centrifuged (2.500 *xg*) for 10 minutes and supernatants were discarded. The pellets were resuspended,
136 washed with sterile distilled water three times, and cell concentration was adjusted for 10⁸ – 10⁹ cfu/mL
137 (OD_{600nm} = 1.0) (6). Bacterial suspension was inoculated in the base of the main stem of the cultivated
138 plant with the help of a histological needle submerged in the suspension. The disease incidence was
139 evaluated by the blackleg symptoms over time.

140 **Inducers of plant defense and ethylene inhibitor.** Autoclaved extracts of *Xanthomonas axonopodis* pv
141 *citri* were used as plant elicitor. This bacterium was cultivated in LB liquid medium for 48 hours at 26°C
142 in an orbital shaker. The procedure for centrifuging and washing the pellets was the same as previously
143 described and the cell concentration was adjusted for 10⁸ – 10⁹ cfu/mL (OD_{600nm} = 1.0) (6). Then, the cell
144 suspension was autoclaved at 121°C, 1 atm for 30 min. This autoclaved suspension, herein referred as
145 XTH (PI 0805370-7), was used as the biotic inducer and it was added to the MS medium (1:2 v/v). The

146 synthetic inducer Acibenzolar-S-methyl (ASM) (Bion 500WG, Syngenta S.A.) was added to the MS
147 medium (40 mg/L) and autoclaved. A standard curve (0; 50; 100; 200 and 300 mg/L) was establish in
148 order to determine the optimum concentration of this compound. Aminoethoxyvinylglycine (AVG) (10
149 μ M) was used for inhibition of ethylene synthesis. The minimum inhibitory concentration of AVG was
150 standardized by a concentration curve (0; 1; 5; 10 and 15 μ M). Ethylene inhibition was determined by
151 modifications in the plant phenotype (shoot growth, inhibition of leave epinasty and necrosis
152 symptoms), which were the parameters for determining the optimum concentration.

153 **Experiment design.** The basal effect of inducers and ethylene blocker on plant growth was evaluated on
154 plants cultivated in MS medium supplemented with inducers and/or AVG, without pathogen
155 inoculation. Plants inoculated with sterile distilled water was used as control. In order to evaluate the
156 effect of inducers and ethylene blocker on disease progression, *in vitro* plants were cultivated for three
157 days on the MS medium supplemented with the inducers XTH or Bion[®] with or without AVG. After this
158 period, plants were inoculated with the pathogen *P. carotovorum*. Control treatments consisted in
159 inoculated plants cultivated on MS medium with no inducers or AVG and each treatment consisted in
160 five plants. Disease incidence was regularly evaluated for 15 days. Each plant represented one
161 repetition. The area under the disease progress curve (AUDPC) was estimated. AUDPC values were
162 normalized and corrected (AUDPC-nc) by dividing the values by the number of days until the final
163 severity reading for each treatment and multiplying the resulting values by the number of days until the
164 final severity evaluation of the experiment (21), as shown below:

$$165 \text{ AUDPC-nc} = \{ \{ \sum [(y_{i+1} + y_i) \times 0,5] * [t_{i+1} - t_i] \} / n \} * c$$

166 Where:

167 y_i = percentage of plants presenting blackleg symptoms (incidence at the i -th observation);

168 t_i = time (in days) after sowing at the i -th observation;

169 n = number of days between the disease onset and the last disease assessment;

170 c = longest period of epidemic duration among the plants evaluated.

171 Changes in the secondary metabolism were evaluated in plants cultivated in MS medium supplemented
172 with inducers (XTH or Bion[®]) and/or AVG. For this purpose, plants were previously cultivated for three
173 days in these treatments before *P. carotovorum* inoculation. The level of salicylic acid was analyzed in
174 plant tissues after pathogen inoculation (6; 12; 24 and 72 hours post-inoculation - hpi). Enzymatic
175 activity assays (PPO and POX) were performed at 24; 72 and 96 hpi and phenolic and flavonoid
176 concentrations were determined at 72 and 96 hpi. Each treatment and time point consisted in three
177 plants and each plant represented one repetition.

178 **Quantification of secondary metabolites and enzymes.** *In vitro* plants (0.5 g of fresh mass) were
179 randomly taken within each treatment and grounded in 5 mL of 80% (v/v) methanol at room
180 temperature. Extracts were filtered and centrifuged at 1,250 xg for 15 min. Total phenolic compounds
181 were analyzed in the supernatant by a colorimetric method as described previously (6). Briefly, 50 μ L of
182 extract was mixed with 2.5 mL Folin-Ciocalteu reagent (ImprintSul Ltda, Brazil) and 0.7 M Na_2CO_3 .
183 Samples were incubated at 25[°]C in the dark for 30 min and absorbance was measured at 765 nm. Gallic

184 acid was used as the standard. The contents of total phenolic compounds were expressed as mg/g of
185 fresh mass (FM). The activities of polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1) and peroxidases (POX; EC
186 1.11.17) enzymes were quantified in extracts obtained from *in vitro* plants (0.5 g) grounded in 5 mL of
187 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), supplemented with 2% (v/v) Triton X-100 and 1% (w/v)
188 polyvinylpyrrolidone. Extracts were filtered and centrifuged at 2,500 xg for 15 min at 5°C, and the
189 supernatant was collected for determination of protein content and enzyme assay. PPO activity was
190 determined using chlorogenic acid as the substrate at 400 nm in a spectrophotometer, according to
191 Poiatti et al. (6). Specific enzyme activity was defined as the change in absorbance min/mg protein. The
192 activity of peroxidases was determined in a spectrophotometer by the oxidation of guaiacol at 420 nm,
193 using the extract described above. The reaction mixture contained 50 mM sodium phosphate buffer (pH
194 6.0), 0.1 M guaiacol as substrate and 10 mM hydrogen peroxide. Specific enzyme activity was expressed
195 as mKatal/mg protein. The protein content in the enzyme extracts was measured by the method of
196 Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard.

197 **Salicylic Acid (SA).** SA extraction protocol was adapted from Marek et al. and Verberne et al. (22,23). *In*
198 *vitro* plants (0.5 g) were macerated in liquid nitrogen and extracted with 1 mL of 90% methanol. Sample
199 was sonicated for 5 min and after centrifugation at 14,000 xg for 10 min, the supernatant was
200 transferred to a microcentrifuge tube. This process was repeated twice. Supernatant was transferred to
201 the same tube and concentrated under air flow. Residue was resuspended with 0.1 M sodium acetate
202 buffer (pH 5.5) and 5% trichloroacetic acid and the mixture was partitioned with ethyl
203 acetate:cyclohexane (1:1 v/v). The partitioning was repeated twice. The organic phase (with free SA)
204 was transferred to the same tube and concentrated. The aqueous phase, with the glucose conjugated
205 SA (salicylic acid 2-*O*- β -D-glucoside), was subjected to acid hydrolysis by adding 8 M HCl and heating at
206 80°C for 2 h. The hydrolyzed fraction was partitioned and concentrated as previously described. The SA
207 recovery rate, after extraction steps, was determined by adding a known amount of SA (internal
208 control). The recovery rate was calculated and used for correcting the extracted SA concentration. SA
209 analysis was performed by HPLC with a LichroCART column (type RP-18 5 μ m) and spectrofluorometric
210 detector operated at an emission wavelength of 407 nm and an excitation wavelength of 305 nm.
211 Sample was eluted with 0.2 M sodium acetate buffer pH 5.5 in 10% methanol at a flow-rate of 0.8
212 mL/min.

213 **Statistical Analysis.** Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and outliers determined by
214 Boxplot were eliminated. Variance homogeneity was verified through a graphical representation of
215 residuals. When necessary, data were transformed using \sqrt{x} . HPLC results from three biological
216 replicates were compared using ANOVA. Means were separated by Duncan Test, $p \leq 0.05$. Statistical
217 analysis was performed using SPSS 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, US.

218

RESULTS

219 In non-inoculated plants, the elicitors XTH and Bion[®], as well as the ethylene blocker (AVG),
220 added to the MS medium, did not cause plant death. However, non-inoculated plants treated with

221 Bion[®], AVG and Bion+AVG presented a visible growth reduction, whereas XTH and XTH+AVG treatments
222 did not present noticeable interference on plant growth (data not shown).

223 *In vitro* potato plants showed high sensitivity to the pathogen *P. carotovorum*, exhibiting disease
224 symptoms and reaching 100% of death at 15 dpi (Fig. 1). Inducers and AVG effects on promoting plant
225 defense are shown in Figure 1. Plants from the control and Bion+AVG treatments, cultivated on inducer-
226 and AVG-free medium and infected with the pathogen *P. carotovorum*, showed the first disease
227 symptoms at 1 dpi (Fig. 1a). Indeed, 40% of the control plants were dead at 9 dpi (Fig. 1b).
228 Hypersensitivity responses were observed in Bion[®] treated-plants, characterized by the darkening in the
229 region of pathogen inoculation (data not shown). Nevertheless, there was no difference in death
230 response between plants cultivated on medium supplemented with Bion[®] (100%), Bion+AVG (100%) or
231 AVG (80%) compared with the control treatment (80%) at 15 dpi. On the other hand, the lowest death
232 percentage ($p < 0.001$) was observed in plants cultivated on treatments with XTH (40%) and XTH+AVG
233 (60%) at 15 dpi (Fig. 1b). Interestingly, there was no difference ($p = 0.561$) on disease symptoms between
234 plants in all treatments at day 15 dpi (Fig. 1a).

235 The mean AUDPC-nc values for *in vitro* plants inoculated with *P. carotovorum* are shown in Table
236 1. The combination of inducer and the ethylene blocker (treatment XTH+AVG) showed the best result on
237 reducing plant death ($p = 0.046$) and disease symptoms ($p = 0.011$), compared to the control. Similarly,
238 addition of AVG and XTH to culture medium was also efficient on delaying progression disease
239 symptoms.

240 PPO activity in the control plants inoculated with the pathogen were constant for all the time
241 points ($p = 0.485$) (Fig. 2a). However, it was increased in Bion+AVG treated plants, compared with the
242 control treatment. Interestingly, XTH, XTH+AVG and AVG did not promote any significant modifications
243 in the PPO activity compared with the control in the time points ($p = 0.061$). PPO activity decreased on 72
244 hpi for all treatments (Fig. 2a).

245 Although all treatments promoted POX activity at 24 hpi, the highest increment (1.89 mKatal/mg
246 protein) was observed in the Bion[®] treatment ($p < 0.001$). Although POX activity decreased at 72 hpi for
247 all treatments, plants cultivated in the presence of the ethylene blocker (AVG, XTH+AVG or Bion+AVG)
248 presented the highest enzyme activities ($p < 0.001$). At 96 hpi, plants treated with XTH+AVG differed from
249 control and AVG ($p = 0.061$) (Fig. 2b).

250 Phenolic and flavonoid compound concentrations are presented in Figure 3. No significant
251 differences were observed in the treatments for neither of the time points (72 and 96 hpi; $p = 0.729$ and
252 $p = 0.051$, respectively). Although, in 96 hpi, Bion[®] treated plants showed the lowest concentrations for
253 phenolic compounds, whilst BION+AVG treated plants showed the highest concentration (Fig. 3a). The
254 highest flavonoid concentration was found in control plants at 72 hpi ($p = 0.035$). In 96 hpi, the lowest
255 levels ($p = 0.049$) occurred in AVG treated plants, comparing to the control (Fig. 3b).

256 In addition to enzymatic and metabolic changes, the treatments caused hormonal alterations
257 such as tissue accumulation of SA. Free SA levels were higher than conjugated SA in all treatments and
258 time points analyzed. Bion[®] treated plants showed a markedly increase in free SA concentration (40.3

259 $\mu\text{g/g FM}$) at 6 hpi ($p=0.016$), compared to the control (Fig. 4a). Posteriorly, this plants presented little
260 variation in free SA throughout the time points. The lowest level of free SA was found in XTH-treated
261 plants at 6 hpi ($4.82 \mu\text{g/g FM}$) and, at 24 hpi Bion+AVG treated plants had the highest levels of free SA
262 ($52.2 \mu\text{g/g FM}$).

263 Regarding conjugated SA, the highest levels were observed at 6 hpi in Bion[®] treated plants (15.6
264 $\mu\text{g/g FM}$), as oppose to control ($8 \mu\text{g/g FM}$) and Bion+AVG ($3.4 \mu\text{g/g FM}$) plants ($p=0.001$). Moreover, at
265 the same time point, XTH treated plants had higher levels of conjugated SA than XTH+AVG treated
266 plants ($p=0.001$). Bion[®] treated plants raised conjugated SA levels until 12 hpi, when plants reached the
267 highest concentration ($23 \mu\text{g/g FM}$). The lowest levels were found in XTH+AVG treated plants at 12 hpi
268 ($1.8 \mu\text{g/g FM}$). At 24 hpi, there was a significant reduction in conjugated SA in AVG treated plants
269 ($p=0.117$).

270

DISCUSSION

271 Elicitors represent an alternative tool for pest management in agrosystems, promoting plant
272 resistance against microorganisms (6). In potato *in vitro* plants, both elicitors (XTH and Bion[®]) and ET
273 blocker (AVG) supplemented to MS medium resulted in neither visible damage nor plant death in non-
274 inoculated plants. This result demonstrates that the concentrations tested were adequate for the
275 assays. However, Bion[®] and/or AVG reduced shoot development and plant growth. The plant activator
276 Bion[®] was registered to treat potato and has been shown to induce SAR in several plant species (cotton,
277 cocoa, citrus, bean, melon and tomato). The negative effect of Bion[®] on biomass accumulation has been
278 already described (cauliflower, wheat, bean) and it can be interpreted in the context of competition
279 between fitness and resistance induction in the absence of pathogens (24).

280 *In vitro* cultivated plants showed similar susceptibility to *P. carotovorum* as previously observed
281 in potted plants cultivated at greenhouse (data not shown). Pathogen-inoculated plants presented the
282 typical blackleg symptoms associated to the reduction in shoot development.

283 Presence of XTH+AVG reduced significantly plant death and symptoms during the disease
284 progression, promoting plant resistance against *P. carotovorum*. Moreover, XTH and AVG delayed the
285 appearance of disease symptoms. On the other hand, the treatments Bion+AVG and Bion[®] were neither
286 effective on delaying plant death nor disease progression, presenting AUDPC-nc values similar to the
287 control. The differences on plant death observed for Bion[®] and XTH treatments might be attributed to
288 distinct mechanisms of action.

289 SAR has been shown to be activated by SA and acts in plant defense against biotrophic
290 microorganisms. The main component of Bion[®] is Acibenzolar-S-Methyl (ASM), a SA analogue. It belongs
291 to the benzothiadiazoles (BTH) chemical group, which acts directly activating SA defense pathway (25).
292 In this scenario, exogenous BTH was able to reduce lesions caused by *Peronospora tabacina* in
293 transgenic tobacco plants expressing *NahG* gene (25), with low SA production. In this regard, Bion[®]
294 could induce SA-independent SAR. Likelihood, exogenous Bion[®] might have more expressive effect on
295 plant resistance against biotrophic microorganisms than against necrotrophic pathogens, such as *P.*
296 *carotovorum*. Potato plants treated with Bion+AVG showed the lowest plant protection against the

297 bacterium. Since plant defense against necrotrophic pathogens involves the synergism between JA and
298 ET (19), we suggest that ET blocker could lead to a reinforce of the defense pathway against biotrophic
299 pathogens induced by Bion[®]. In this study, however, the response against *P. carotovorum*, a
300 necrotrophic pathogen, was hampered since the JA dependent pathway might have been inhibited by
301 excess of SA.

302 The inducer XTH was the most effective in promoting plant resistance against *P. carotovorum*.
303 Our results indicate that its combination with AVG reduced the plant death. This inducer is constituted
304 by autoclaved cell fragments from the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. Composition of the
305 inducer suggests that its perception occurs at the plant cell surface by membrane receptors (PRR –
306 pattern recognition receptors), initiating PTI-type recognition (PAMP-triggered immunity), in which the
307 plant perceives the elicitor, activates its innate immunity and remains in alertness until pathogen attack.
308 XTH effectiveness might be related to the promotion of nonspecific signaling pathways, leading to
309 broader defense responses. It was demonstrated that the application of chitosan (a mycelium extract
310 from *Crinipellis perniciosa*) was similarly effective on protecting tomato plants against *Xanthomonas*
311 *campestris* pv. *vesicatoria* and enhancing chitinase and β -1,3-glucanase activity (26). Furthermore, there
312 are biotic inducers on the market that mimic an incompatible interaction between plants and
313 microorganisms, based on harpin protein and chitosan (27,28). Both molecules are recognized by PRR
314 and trigger plant defense.

315 PPO is an inducible enzyme that oxidizes a wide range of plant phenolics and has been related to
316 defense against pathogens and herbivores (29). This enzyme catalyzes the oxidation of phenolic
317 compounds to quinones, which present more toxic effect directly onto pathogens. In general, control
318 plants showed similar PPO levels along the time points and treatment with XTH or XTH+AVG did not
319 promote PPO activity, compared to the control. The absence of enzymatic activity changes observed in
320 control and XTH-treated plants was also reported for potted potato plants after inoculation with *X.*
321 *axonopodis* or water (6). However, it was shown that PPO activity was promoted when plants were
322 inoculated with *P. carotovorum*. Similar results in PPO promotion were also observed in rice plants
323 inoculated with *Xanthomonas oryzae* (30). Interestingly, PPO activity was significantly induced by Bion[®]
324 and Bion+AVG, in comparison to the control treatment. Tobacco plants treated with acetylsalicylic acid
325 also increased activity of PPO, whilst the treatment with the supernatant of *Pseudomonas fluorescens*
326 had no effect (31). Ours results indicate that although Bion[®] has enhanced PPO activity, this increment
327 does not represent plant resistance to *P. carotovorum*.

328 POX are involved in the synthesis of phenolic compounds, phytoalexins and lignin, key factors in
329 the establishment of plant resistance. This enzyme has also been correlated to the antioxidative
330 protection process in *Arabidopsis* plants and a decrease in resistance in POX-silenced plants was
331 reported (13). Plants treated with Bion[®] showed a drastic increment in POX activity at 24 hpi. After this
332 time point, POX activity in Bion[®] treatment was similar to control. XTH and Bion[®] treatments were
333 similar regarding POX activity at 72 and 96 hpi. On the other hand, POX activity in plants treated with
334 AVG (AVG, XTH+AVG or Bion+AVG) was higher than non-treated plants at 72 hpi, although this increase

335 did not represent changes in disease symptoms. According to Chithrashree et al., pretreatment of rice
336 plants with a rhizobacteria and the latter inoculation with the pathogen *Xanthomonas oryzae* enhanced
337 POX activity (30). Moreover, in tomato plants an increase in POX activity in response to *Fusarium*
338 *oxysporum* and *Pythium* in plants pretreated with *Pseudomonas fluorescens* was reported (13).

339 Synthesis of phenolic compounds is a frontline in plants defense. They present a direct toxic
340 effect over pathogens, including the synthesis of toxic molecules catalyzed by PPO and the subsequent
341 lignin formation for cell wall strengthening. The relation between soluble phenols and PPO, POX, and
342 PAL activity in the defense of potato plants against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* has
343 been already shown (11). Phenolics and phytoalexins are also involved in potato resistance against
344 *Phytophthora infestans* (15). XTH or Bion® treated plants showed similar levels of phenolic compounds,
345 despite AVG presence or time point. However, flavonoid concentration decreased in all treatments
346 (except control) at 72 hpi. AVG led to the reduction of flavonoid levels in AVG and XTH+AVG treated
347 plants at 96 hpi, compared to the control. However, Bion+AVG treated plants showed no difference
348 from control plants. Overall, both phenolic and flavonoid compounds showed higher concentrations at
349 96 hpi than at 72 hpi. This result indicates that potato plant is producing and accumulating phenolic
350 compounds, which might be used as substrate for PPO and POX. Nevertheless, these results indicate
351 that general levels of phenolics and flavonoid are not elucidative in the induced resistance against *P.*
352 *carotovorum*.

353 It has been demonstrated that SA is required for maximal defense responses of potato during
354 pathogen infection, exhibiting high basal level of SA, ranging from 2 to 5 µg/g of fresh matter (32).
355 Although BTH has been reported as activator of SA-dependent responses without SA accumulation
356 (conjugated or free) in plants (25), the highest free SA levels (approximately 52 µg/g FM) were found in
357 plants treated with Bion+AVG at 24 and 72 hpi. The considerable SA increment in plants with Bion+AVG
358 at 24 hpi matches to the initial disease symptoms observed in this plants. The SA effect is modulated by
359 ET that is usually synthesized along with JA when plants are under attack by necrotrophs (33). The
360 antagonistic SA and JA effect in plant defense has already been described, where SA works as a
361 downregulator of JA responses. In tobacco plants, basic *PR* expression induced by methyl-JA (MeJA) was
362 inhibited by the treatment with SA, whilst MeJA treatment inhibited acidic *PR* expression induced by SA
363 (34). On the other hand, ET plays an important role as a modulator of SA and JA responses.
364 Simultaneous induction of JA and ET pathway renders the plant insensitive to future SA-mediated
365 suppression of JA (33).

366 Interestingly, plants treated with AVG showed low levels of free SA, similar to the control plants.
367 This treatment was effective in delaying the disease progression. Considering that ET participates in the
368 defense promotion against biotrophic and necrotrophic pathogens, our results suggest that the lack of
369 ET precluded the activation of a SA-dependent pathway. Therefore, the defense against *P. carotovorum*,
370 a necrotrophic pathogen, was promoted through JA in an ET-independent manner. Although studies
371 with *Arabidopsis* suggest a role for ethylene in disease development during the susceptible response,
372 the importance of ethylene perception to the process remain to be determined (35). Ethylene is a major

373 component of a complex mechanism regulating the spread of necrosis that arises during the latter stage
374 of the susceptible response in tomato leaves. Tomato plants sprayed with AVG (1 mM) showed an
375 inhibition in the burst of ethylene synthesis after infection by *P. syringae* (35) and ethylene, but not SA,
376 is essential for the synthesis of phytoalexin in response to bacterial infection (36).

377 Although XTH presented a good potential in delaying disease progression and plant death in an *in*
378 *vitro* system, we must keep in mind that field conditions bring new challenges and data cannot be easily
379 extrapolated. Inducers represent a new tool for disease and pest control, leading to the development of
380 modern commercial products that can promote plant defense without compromising its growth.
381 However, inducers cannot be used as a stand-alone method for pest management.

382

ACKNOWLEDGEMENT

383 The authors thank Dr. Valmir Duarte for providing the *P. carotovorum* culture used in this study,
384 Embrapa for providing the potato tubers, Syngenta Crop Protection/Brazil for providing Bion®, the
385 Toxicology Institute (InTox/PUCRS) for chromatographic analysis, Programa Pro-Bolsas/PUCRS for the
386 fellowship and the Brazilian agency CNPq, for financial support.

387

LITERATURE CITED

- 388 1. Hogan CS, Mole BM, Grant SR, Willis DK, Charkowski AO. 2013. The type III secreted effector
389 DspE is required early in *Solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell
390 death, and requires Wx(3-6)D/E motifs. PLoS One. 8:1-10.
- 391 2. Walters DR, Boyle C. 2005. Induced resistance and allocation costs: What is the impact of
392 pathogen challenge? Physiol. Mol. Plant Pathol.66:40-4.
- 393 3. Doke N, Ramirez AV, Tomiyama K. 1987. Systemic Induction of Resistance in Potato Plants
394 Against *Phytophthora infestans* by Local Treatment with Hyphal Wall Components of the Fungus. J.
395 Phytopathol. 119:232-239.
- 396 4. Landgraf P, Feussner I, Hunger A, Scheel D, Rosahl S. 2002. Systemic accumulation of 12-oxo-
397 phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. Eur. J. Plant Pathol. 108:279-83.
- 398 5. Piccinin E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*),
399 maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e
400 bacterianos. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 1995.
- 401 6. Poiatti VAD, Dalmas FR, Astarita L V. 2009. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in
402 response to attack by plant-pathogenic bacteria. Biol Res. 42:205-15.
- 403 7. Savio LEB, Astarita LV, Santarém ER. 2011. Secondary metabolism in micropropagated
404 *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. Plant Cell, Tissue, Organ Cult. 108:465-
405 472.
- 406 8. Navarre DA, Mayo D. 2004. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in
407 potato. Physiol. Mol. Plant Pathol. 64:179-88.

- 408 9. Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF. 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat
409 Disease.
- 410 10. Yu D, Liu Y, Fan B, Klessig DF, Chen Z. 1997. Is the High Basal Level of Salicylic Acid Important for
411 Disease Resistance in Potato? *Plant Physiol.* 115:343–9.
- 412 11. Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho TA, van der Waals JE. 2012. Role of Polyphenol Oxidase,
413 Peroxidase, Phenylalanine Ammonia Lyase, Chlorogenic Acid, and Total Soluble Phenols in Resistance of
414 Potatoes to Soft Rot. *Plant Dis.* 96:186–92.
- 415 12. Skelly MJ, Loake GJ. 2013. Synthesis of redox-active molecules and their signaling functions
416 during the expression of plant disease resistance. *Antioxid. Redox Signal.* 19:990–7.
- 417 13. Bindschedler L V, Dewdney J, Blee K a, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, et al. 2006. Peroxidase-
418 dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.* 47:851–
419 63.
- 420 14. Li L, Steffens JC. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results
421 in enhanced bacterial disease resistance. *Planta.* 215:239–47.
- 422 15. Cheynier V, Sarni-Machado P, Quideau S. 2012. Recent Advances in Polyphenol Research - Vol.
423 3. John Wiley & Sons.
- 424 16. Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in
425 plants. *Trends Plant Sci.* 11:184–91.
- 426 17. Saltveit ME. 2004. Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the
427 accumulation of phenolic compounds, and browning of whole and fresh-cut “iceberg” lettuce.
428 *Postharvest Biol. Technol.* 34:75–80.
- 429 18. Mansoori B, Smith CJ. 2005. Elicitation of Ethylene by *Verticillium albo-atrum* Phytotoxins in
430 Potato. *J. Phytopathol.* 153:143–9.
- 431 19. Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic
432 pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–27.
- 433 20. O’Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ. 2001. Ethylene-dependent Salicylic Acid
434 regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J.* 25:315–23.
- 435 21. Zambonato F, Federizzi LC, Pacheco MT, Arruda MP De, Martinelli JA. 2012. Phenotypic and
436 genetic characterization of partial resistance to crown rust in *Avena sativa* L. *Crop Breed Appl.*
437 *Biotechnol.* 12:261–8.
- 438 22. Marek G, Carver R, Ding Y, Sathyanarayan D, Zhang X, Mou Z. 2010. A high-throughput method
439 for isolation of Salicylic Acid metabolic mutants. *Plant Methods.* 6:1–7.
- 440 23. Verberne MC, Brouwer N, Delbianco F, Linthorst HJM, Bol JF, Verpoorte R. 2002. Method for
441 the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material. *Phytochem. Anal.*
442 13:45–50.
- 443 24. Heil M, Hilpert A, Kaiser W, Linsenmair KE. 2000. Reduced growth and seed set following
444 chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs?
445 *J. Ecol.* 88:645–54.

- 446 25. Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Rella MG, et al. 1996. A benzothiadiazole
447 derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10:61–70.
- 448 26. Cavalcanti FR, Resende MLV De, Pereira RB, Costa JDCDB, Carvalho CPDS. 2006. Atividades de
449 quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana.
450 *Pesquisa Agropecuária Bras.* 41:1721–30.
- 451 27. Eden Bioscience Corporation [Internet]. Available from:
452 <http://www.triachem.com/Products/SeedDressing/Messenger ST.pdf>
- 453 28. SafeScience [Internet]. Available from:
454 <http://www.safescience.com/agriculture/elexasmart.html>
- 455 29. Constabel CP, Bergey DR, Ryan CA. 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible
456 tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
457 *USA.* 92:407–11.
- 458 30. Chithrashree A, Udayashankar S, Nayaka MC, Reddy C, Srinivas. 2011. Plant growth-promoting
459 rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by
460 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biol. Control.* 59:114–22.
- 461 31. Schneider S, Ullrich WR. 1994. Differential induction of resistance and enhanced enzyme
462 activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol.*
463 *Mol. Plant Pathol.* 45:291–304.
- 464 32. Coquoz JL, Buchala AJ, Meuwly P, Métraux JP. 1995. Arachidonic acid induces local but not
465 systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora*
466 *infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology.* 85:1113–218.
- 467 33. Ballaré CL. 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals.
468 *Trends Plant Sci.* 16:249–57.
- 469 34. Beckers GJM, Spoel SH. 2006. Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate.
470 *Plant Biol.* 8:1–10.
- 471 35. Zacarés L, López-Gresa MP, Fayos J, Primo J, Bellés JM, Conejero V. 2007. Induction of *p*-
472 coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen
473 *Pseudomonas syringae*. *MPMI.* 20:1439–48.
- 474 36. López-Gresa MP, Torres C, Campos L, Lisón P, Rodrigo I, Bellés JM, et al. 2011. Identification of
475 defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*.
476 *Environ. Exp. Bot.* 74:216–28.

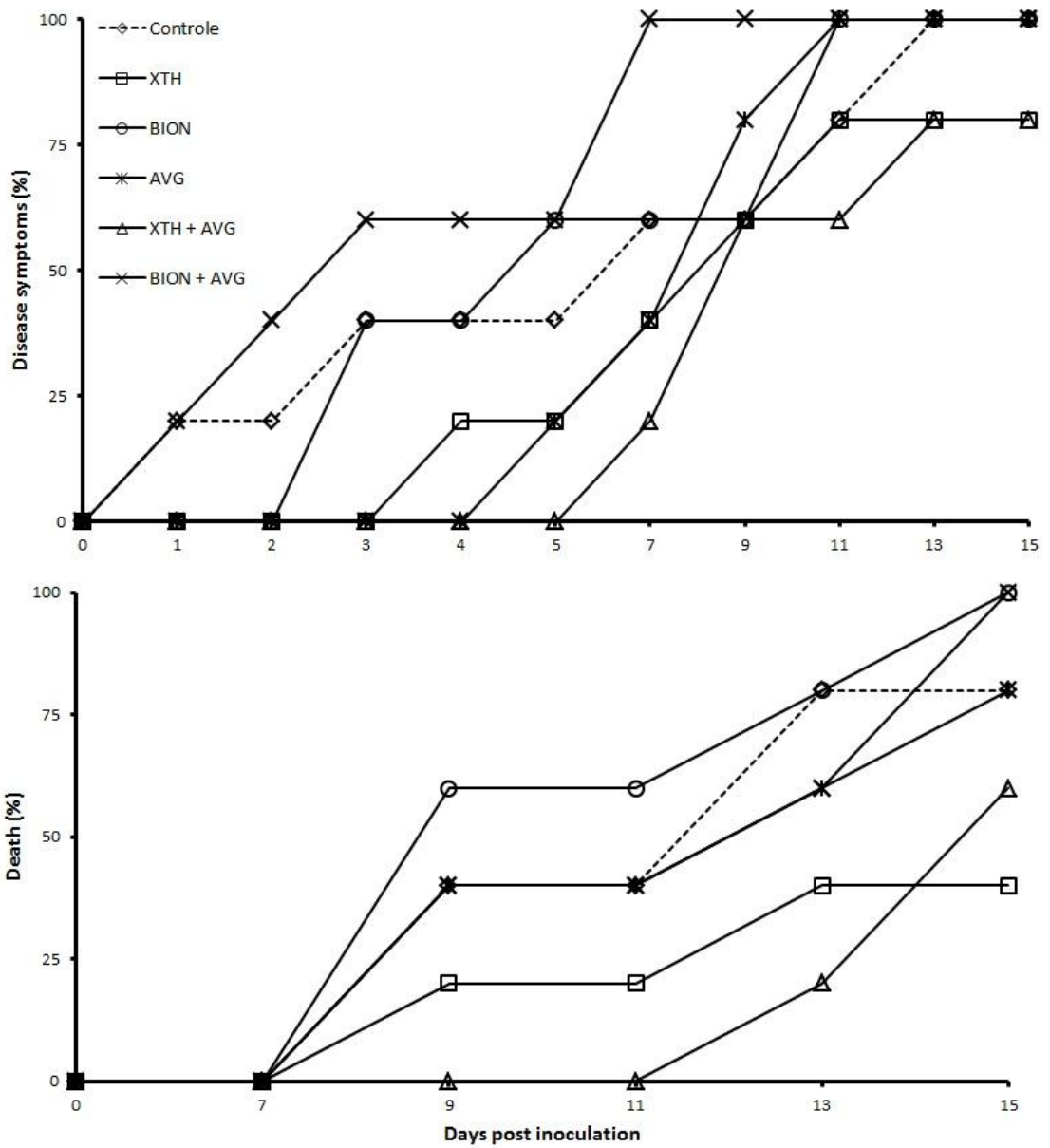
477 FIGURES AND TABLES

478

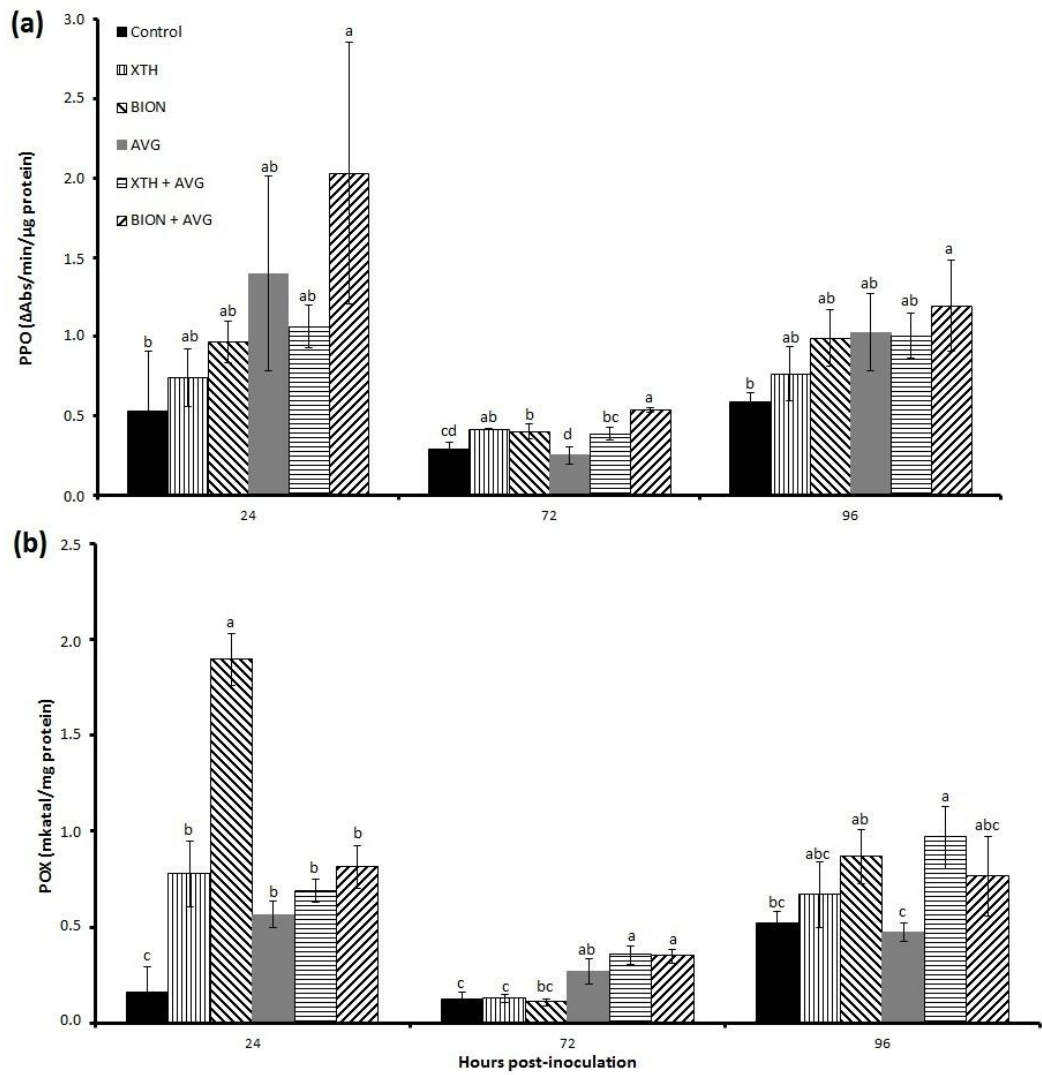
479 **TABLE 1:** Mean AUDPC-nc values of potato plants cultivated *in vitro* and infected with *P. carotovorum*. The
 480 asterisks indicate difference ($p < 0.05$) from the control treatment. Numbers in parenthesis represent standard errors
 481 of the mean.

Treatments	AUDPC-nc	
	Death	Disease symptoms
Control	4420 (1387.13)	9205.35 (1479.20)
XTH	2210 (1477.53)	4952.67 (1344.44) *
Bion®	4710 (736.44)	6732.00 (745.09)
AVG	4975 (887.06)	5438.57 (513.94) *
XTH+AVG	890 (376.96) *	3432.50 (1046.55) *
Bion+AVG	4975 (887.06)	7436.48 (749.38)

482

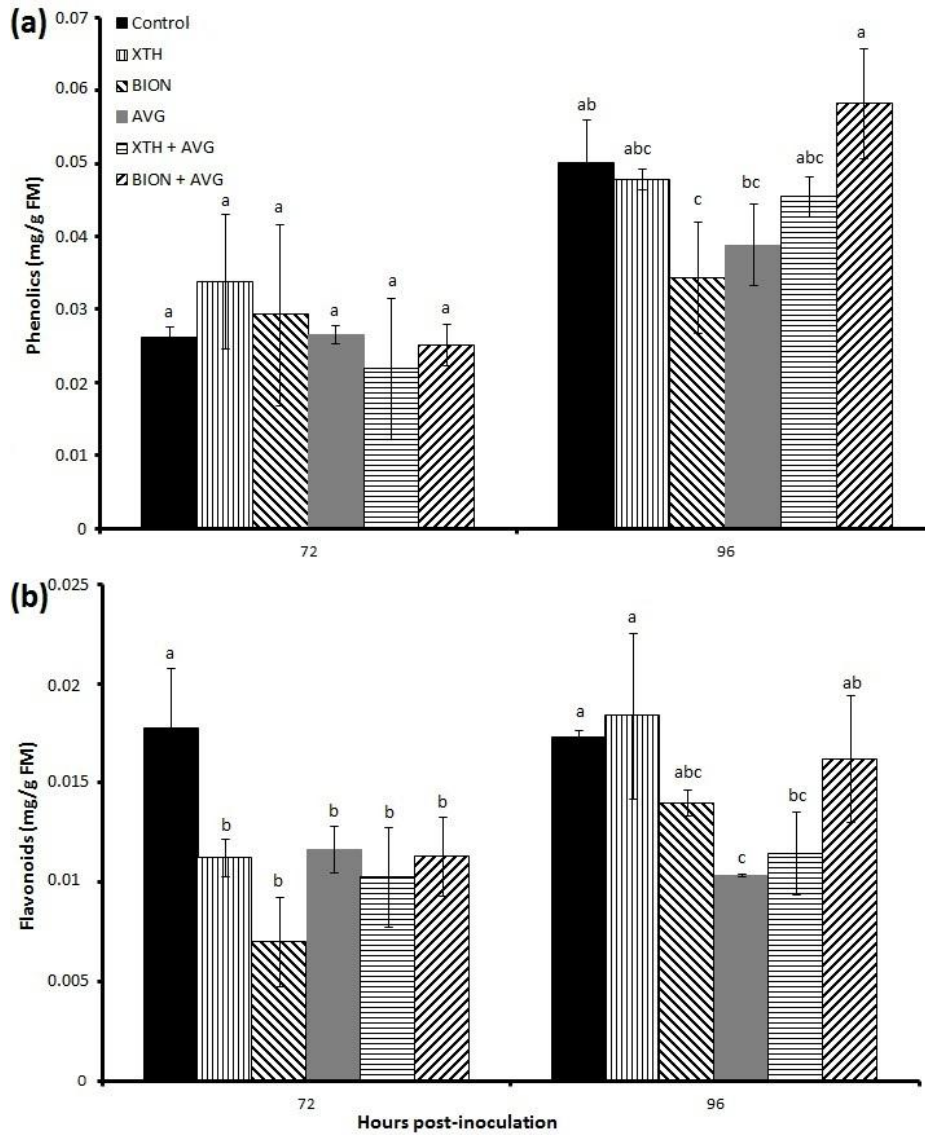


484
 485 **Fig. 1:** Time course of disease progress (a) and death curves (b) of *P. carotovorum* in potato plants cultivated
 486 in vitro.
 487



488

489 **Fig. 2:** Polyphenol oxidase - PPO (a) and Peroxidase - POX (b) activities in potato plants cultivated *in vitro*.
 490 Enzyme activities were determined in plants maintained in different treatments and infected with *P. carotovorum*.
 491 Different letters indicate significant differences within the same time point (Duncan's $p \leq 0.05$). Bars represent the
 492 standard error of the mean.
 493



494

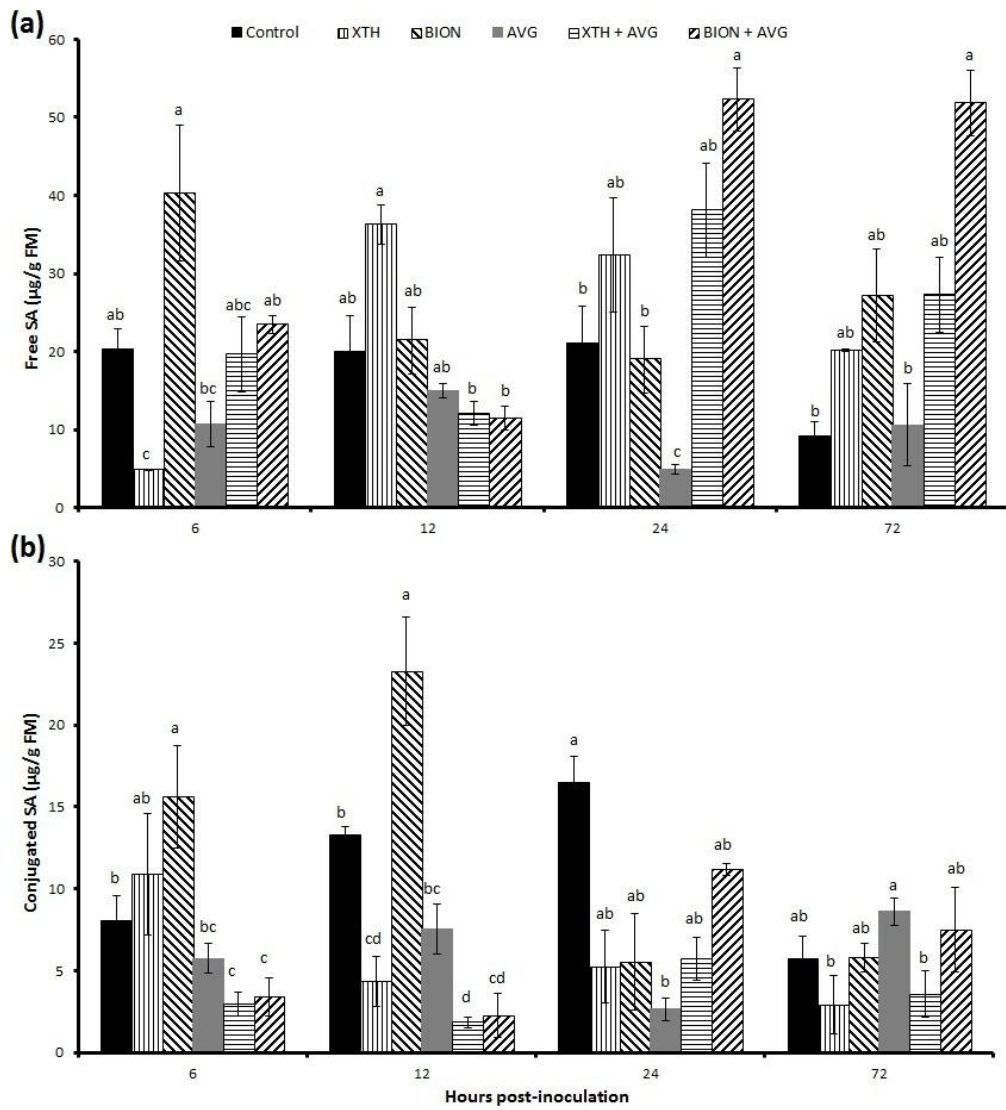
495

496

497

498

Fig. 3: Phenolic (a) and flavonoid (b) content in potato plants cultivated *in vitro*. Analysis were performed in plants maintained in different treatments and infected with *P. carotovorum*. Different letters indicate significant differences within the same time point (Duncan's $p \leq 0.05$). Bars represent the standard error of the mean.



500
 501
 502
 503
 504

Fig. 4: Levels of free (a) and conjugated (b) salicylic acid (SA) in potato plants cultivated *in vitro*. Total SA contents were determined in plants maintained in different treatments and infected with *P. carotovorum*. Different letters indicate significant differences within the same time point (Duncan's $p \leq 0.05$). Bars represent the standard error of the mean.

CAPÍTULO III

CONCLUSÃO

PERSPECTIVAS

CONCLUSÃO

→ O indutor XTH se mostrou eficiente na promoção da resistência em plantas de *S. tuberosum* desafiadas com o fitopatógeno necrotrófico *P. carotovorum*. Considerando que a suplementação com AVG não alterou o nível desta resistência, sugere-se que a defesa promovida pelo indutor é independente de etileno;

→ O indutor Bion® não foi eficiente na promoção da resistência contra *P. carotovorum*. Considerando que a suplementação com AVG não alterou a capacidade de indução desta resistência, sugere-se que a defesa promovida pelo Bion® é independente de etileno;

→ O AVG promoveu o retardo no desenvolvimento de sintomas de doença, mas sem reduzir a porcentagem de morte das plantas;

→ A atividade das enzimas PPO e POX apresentaram poucas diferenças entre os tempos analisados e os tratamentos testados. A avaliação da atividade destas enzimas não foi eficiente para indicar características de defesa nas plantas de *S. tuberosum* cultivadas *in vitro*;

→ Os níveis de ácido salicílico conjugado foram mais baixos que os níveis do livre.

→ O aumento nos níveis de AS livre nas plantas tratadas com Bion+AVG correspondeu ao surgimento dos primeiros sintomas de doença;

→ A síntese de compostos fenólicos totais e sua fração flavonoide não se mostraram bons marcadores para a avaliação da resistência das plantas.

PERSPECTIVAS

Para elucidar os mecanismos envolvidos na defesa de plantas de batata contra *P. carotovorum*, pretende-se avaliar a expressão diferencial de genes marcadores da via dependente de AS, ácido jasmônico e etileno (tais como *PR*, *NPR1*, *ERF1*, *WRKY*, *JAZ1*, *PAL*, entre outros). Desta forma, pode-se determinar separadamente a ação do Bion® e do XTH nas vias de defesa. Além disso, a análise da síntese *de novo* de fitoalexinas nas plantas tratadas com diferentes indutores possibilitaria identificar um marcador metabólico para respostas de resistência.

REFERÊNCIAS – CAPÍTULO I

1. Food and Agriculture Organization F. International Year of Potato. 2008 [accessed 2013 Sep 23]. Available from: <http://www.potato2008.org/en/potato/origins.html>
2. Pineli LO, Moretti CL, Almeida GC, Santos JZ, Onuki ACA, Nascimento ABG. Caracterização química e física de batatas ágata e monalisa minimamente processadas. Ciênc Tecnol Aliment. 2006;26:127–34.
3. Nakano DH, Deleo JPB. Choque de competitividade. Hortifruti Brasil. 2006;6–17.
4. IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas; 2012. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>
5. Fioreze C. Aspectos sócioeconômicos da bataticultura no RS. EMBRAPA - Clima Temperado, Informação Tecnológica. 2003;450–67.
6. Stevenson W, Loria R, Franc G, Weingartner DP. Compendium of potato diseases. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathology Society; 2001.
7. Andreu AB, Guevara MG, Wolski E a, Daleo GR, Caldiz DO. Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. Pest Manag Sci. 2006;62:162–70.
8. Benelli AIH, Denardin ND, Forcelini C a. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. Fitopatol Bras. 2004;29:263–7.
9. Eschen-Lippold L, Landgraf R, Smolka U, Schulze S, Heilmann M, Heilmann I, et al. Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression. New Phytologist. 2012;193:985–96.
10. Resende MLV, Salgado SLM, Chaves ZM. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. Fitopatol Bras. 2003;28:123–30.
11. Landgraf P, Feussner I, Hunger A, Scheel D, Rosahl S. Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. Eur J Plant Pathol. 2002;108:279–83.
12. Lopez AMQ. Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Universidade Estadual Paulista; 1991.
13. Piccinin E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 1995.

14. Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 2002;51:1–12.
15. Yangui T, Sayadi S, Dhouib A. Sensitivity of *Pectobacterium carotovorum* to hydroxytyrosol-rich extracts and their effect on the development of soft rot in potato tubers during storage. *Crop Prot.* 2013;53:52–7.
16. Horst RK. *Westcott's Plant Disease Handbook*. Eighth. Kluwer Academic Publishers; 2013.
17. Chung YS, Goeser NJ, Cai X, Jansky S. The Effect of Long Term Storage on Bacterial Soft Rot Resistance in Potato. *Am J Potato Res.* 2013;90:351–6.
18. Hogan CS, Mole BM, Grant SR, Willis DK, Charkowski AO. The type III secreted effector DspE is required early in *Solanum tuberosum* leaf infection by *Pectobacterium carotovorum* to cause cell death, and requires Wx(3-6)D/E motifs. *PLoS One.* 2013;8:e65534.
19. Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 1997;35:235–70.
20. Savio LEB, Astarita LV, Santarem ER. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2011;108:465–72.
21. Espinoza N, Estrada R, Tovar P, Bryan J, Dodds JH. Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germplasm. 1984 p. 1–22.
22. Spoel SH, Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Rev Immunol.* 2012;12:89–100.
23. Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J. Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* 2012;158:844–53.
24. Rasmann S, de Vos M, Casteel CL, Tian D, Halitschke R, Sun JY, et al. Herbivory in the Previous Generation Primes Plants for Enhanced Insect Resistance. *Plant Physiol.* 2012;158:854–63.
25. Slaughter A, Daniel X, Flors V, Luna E, Hohn B, Mauch-mani B. Descendants of Primed Arabidopsis Plants Exhibit Resistance to Biotic Stress 1. *Plant Physiol.* 2012;158:835–43.
26. Schwessinger B, Ronald PC. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:21.1–21.32.
27. Bent AF, Mackey D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol.* 2007;45:399–436.
28. Bent A. Pathogens Drop the Hint: Don't Forget Phytoalexin Pathways. *Cell Host Microbe.* 2011;9:169–70.

29. Hématy K, Cherk C, Somerville S. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12:406–13.
30. Wolf S, Hématy K, Höfte H. Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:381–407.
31. Hüchelhoven R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol.* 2007;45:101–27.
32. Zipfel C, Felix G. Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8:353–60.
33. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:10–6.
34. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell.* 2006;124:783–801.
35. Nürnberger T, Kemmerling B. Receptor protein kinases - pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 2006;11:519–22.
36. Halim VA, Hunger A, Macioszek V, Landgraf P, Nürnberger T, Scheel D, et al. The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2004;64:311–8.
37. Greenberg JT, Yao N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2004;6:201–211.
38. Komaraiah P, Reddy G V, Reddy PS, Raghavendra AS, Ramakrishna S V, Reddanna P. Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. *Biotechnol Lett.* 2003;25:593–7.
39. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature.* 2006;444:323–9.
40. Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, et al. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature.* 2004;428:764–7.
41. Abramovitch RB, Anderson JC, Martin G. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:601–11.
42. Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006;60:425–49.
43. Mudgett MB. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56:509–31.
44. Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell.* 2006;124:803–14.
45. Ross FA. Systemic Acquired Virus Resistance Infections Induced by Localized in Plants '. *Virology.* 1961;14:340–58.

46. Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2006 Jan;44:135–62.
47. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. 2005;31:105–24.
48. Lopez M, Lopez-Lopez MJ, Martí R, Zamora J, López-sanchez J, Beltrá R. Effect of acetylsalicylic acid on soft rot produced by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in potato tubers under greenhouse conditions. *Potato Res.* 2001;44:197–206.
49. Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I. Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science.* 1990;250:1002–4.
50. Métraux J-P, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, et al. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science.* 1990;250:1004–6.
51. Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, et al. A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science.* 1994;266:1247–50.
52. Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, et al. Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science.* 1993;261:754–6.
53. Ribnicky DM, Shulaev V, Raskin I. Intermediates of Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol.* 1998;118:565–72.
54. Verpoorte R, Memelink J. Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13:181–7.
55. Song W, Ma X, Tan H, Zhou J. Abscisic acid enhances resistance to *Alternaria solani* in tomato seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 2011;49:693–700.
56. Mauch-Mani B, Slusarenko A. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell.* 1996;8:203–12.
57. An C, Mou Z. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *J Integr Plant Biol.* 2011;53:412–28.
58. Guzzo SD. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 2004;
59. Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 2004;9:534–40.
60. Skelly MJ, Loake GJ. Synthesis of redox-active molecules and their signaling functions during the expression of plant disease resistance. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19:990–7.

61. Bindschedler L V, Dewdney J, Blee K a, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J.* 2006;47:851–63.
62. Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry.* 2006;67:2318–31.
63. Thipyapong P, Hunt MD, Steffens JC. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta.* 2004;220:105–17.
64. Abeles F, Morgan P, Saltveit Jr. M. Ethylene in Plant Biology. Second. Academic Press Inc.; 1992.
65. Kende H. Ethylene Biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1993;44:283–307.
66. Saltveit ME. Effect of 1-methylcyclopropene on phenylpropanoid metabolism, the accumulation of phenolic compounds, and browning of whole and fresh-cut “iceberg” lettuce. *Postharvest Biol Technol.* 2004;34:75–80.
67. Gwinn KD, Stelzig DA, Bhatia SK. Differential ethylene production by potato tuber tissue inoculated with a compatible or an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Am Potato J.* 1989;66:417–23.
68. Mauch F, Hadwiger L a, Boller T. Ethylene: Symptom, Not Signal for the Induction of Chitinase and beta-1,3-Glucanase in Pea Pods by Pathogens and Elicitors. *Plant Physiol.* 1984;76:607–11.
69. Petri C, Albuquerque N, Pérez-Tornero O, Burgos L. Auxin pulses and a synergistic interaction between polyamines and ethylene inhibitors improve adventitious regeneration from apricot leaves and *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf tissues. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2005;82:105–11.
70. Hansen J, Woolard D, Ju Z, Warrior P, Petracek PD. Promoting early establishment of potato crops by ethylene inhibitors. *US 2007/0199242 A1*, 2007. p. 1–6.
71. Mansoori B, Smith CJ. Elicitation of Ethylene by *Verticillium albo-atrum* Phytotoxins in Potato. *J Phytopathol.* 2005;153:143–9.
72. Ahn I, Lee S, Suh S. Rhizobacteria-Induced Priming in *Arabidopsis* Is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and NPR1. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2007;20:759–68.
73. Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2006;11:184–91.
74. Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert P, Somerville S. Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2004;40:633–46.

75. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 2005;43:205–27.
76. Chung I, Park MR, Rehman S, Yun SJ. Tissue Specific and Inducible Expression of Resveratrol Synthase Gene in Peanut Plants. *Mol Cells.* 2001;12:353–9.
77. Ishigaki E, Asamizu T, Arisawa M, Kurosaki F. Cloning and expression of calmodulin genes regulating phytoalexin production in carrot cells. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:1308–11.
78. Kamo T, Hirai N, Tsuda M, Fujioka D, Ohigashi H. Changes in the Content and Biosynthesis of Phytoalexins in Banana Fruit. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000;64:2089–98.
79. Reymond P, Bodenhausen N, Poecke R Van, Krishnamurthy V, Dicke M, Farmer E. A Conserved Transcript Pattern in Response to a Specialist and a Generalist Herbivore. *Plant Cell.* 2004;16:3132–47.
80. Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, et al. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol.* 2009;5:344–50.
81. Vlot AC, Dempsey DMA, Klessig DF. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. 2009;
82. Chen Z, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. 2009;:493–6.
83. Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, et al. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature.* 2012;000:1–6.
84. Halim V a, Vess a, Scheel D, Rosahl S. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol.* 2006;8:307–13.
85. Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditzjawhar R, Ward E, et al. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell.* 1994;6:959–65.
86. Park S, Liu P, Forouhar F, Vlot AC, Tong L, Tietjen K, et al. Use of a Synthetic Salicylic Acid Analog to Investigate the Roles of Methyl Salicylate and Its Esterases in Plant Disease Resistance. *J Biol Chem.* 2009;284:7307–17.
87. Verberne MC, Verpoorte R, Bol JF, Mercado-Blanco J, Linthorst HJM. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature.* 2000;18:779–83.
88. Yang Y, Qi M, Mei C. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J.* 2004;40:909–19.
89. Yu D, Liu Y, Fan B, Klessig DF, Chen Z. Is the High Basal Level of Salicylic Acid Important for Disease Resistance in Potato? *Plant Physiol.* 1997;115:343–9.

90. Molina A, Bueno P, Marín MC, Rodríguez-Rosales MP, Belver A, Venema K, et al. Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytol.* 2002;156:409–15.
91. Halim VA, Eschen-lippold L, Altmann S, Birschwilks M, Scheel D, Rosahl S. Salicylic Acid Is Important for Basal Defense of *Solanum tuberosum* Against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2007;20:1346–52.
92. Navarre DA, Mayo D. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2004;64:179–88.
93. Leon-reyes A, Spoel SH, Lange ES De, Abe H, Kobayashi M. Ethylene Modulates the Role of "nonexpressor of pathogenesis-related genes 1" in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling. 2009;149:1797–809.
94. Leon-Reyes A, Du Y, Koornneef A, Proietti S, Körbes AP, Memelink J, et al. Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of Arabidopsis Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. *Mol Plant-Microbe Interact.* 2010;23:187–97.
95. Feys BJ, Parker JE. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Nat Rev.* 2000;16:449–55.
96. Léon-Kloosterziel KM, Verhagen BWM, Keurentjes JJB, VanPelt J a, Rep M, VanLoon LC, et al. Colonization of the *Arabidopsis* rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. *Plant Mol Biol.* 2005;57:731–48.
97. Felton GW, Korth KL. Trade-offs between pathogen and herbivore resistance. *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3:309–14.
98. Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H-S, Nawrath C, Métraux J-P, et al. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* 2003;34:217–28.
99. Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, et al. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *PNAS - Plant Biol.* 2000;97:11655–60.
100. Kunkel BN, Brooks DM. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol.* 2002;5:325–31.
101. O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ. Ethylene-dependent Salicylic Acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J.* 2001;25:315–23.
102. Bari R, Jones JDG. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol.* 2009;69:473–88.

103. Clarke JD, Volko SM, Ledford H, Ausubel FM, Dong X. Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-induced resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2000;12:2175–90.