

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

MECANISMOS DE DEFESA EM PLANTAS DE
***Solanum tuberosum* L. EM RESPOSTA A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS**

Vera Aparecida Dus Poiatti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

PORTO ALEGRE

2007

Dedicatória

Dedico o trabalho aos meus pais José e Therezinha,
ao meu esposo José Roberto e aos meus filhos Marco Antonio e Natalia

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre presente e ter tornado tudo possível.

Aos meus pais, pelos exemplos de coragem, persistência e determinação.

Ao meu esposo, pela colaboração, compreensão e incentivo constantes.

Aos meus filhos, por serem partes da minha verdadeira felicidade e motivos de minha eterna gratidão para com a vida.

Ao professor Leandro Vieira Astarita, pela amizade, confiança, acolhimento e orientação.

À professora Eliane Romanato Santarém, pela amizade e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – PUCRS: Fernando, Calino, Lucas, Luiz Eduardo, Rodrigo, Mariéllen, Renata, Rochele, Janaína, Juliana e Mariana pela ajuda constante.

Aos colegas Guilherme e Adriana, atuais pós-graduandos na UFRGS, que muito contribuíram para a realização do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio F. Pascholati do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ/USP, orientou-me em relação ao método mais apropriado de inoculação de fitobactérias, além de outras informações importantes para o meu trabalho.

Ao Prof. Valmir Duarte (Ph.D. Fitopatologia, Prof. Titular, Depto de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia da UFRGS), que gentilmente nos cedeu as fitobactérias utilizadas nos experimentos.

Aos colegas dos Laboratórios de Biofísica, Genômica, Histologia Vegetal e Microbiologia, pela colaboração, pela amizade e pela acolhida constantes.

À CAPES pela bolsa de estudo e ao CNPQ pelo apoio financeiro ao projeto.

Enfim, foi uma bela jornada em busca de resultados nas minhas pesquisas relacionadas aos mecanismos de defesa nos vegetais. Nesta trajetória, o trabalho em equipe com todos os alunos dentro do laboratório, o contato amigo com o meu orientador, acrescido de suas importantes orientações, foram fundamentais na minha constante motivação para continuar, apesar das dificuldades.

Obrigada a todos

Organização geral da Dissertação

A presente Dissertação está organizada segundo as normas e modelos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), sendo constituída de uma apresentação do tema, a qual aborda os mecanismos de resistência vegetal em resposta ao estresse biótico (enfocando principalmente microrganismos). Os resultados experimentais estão apresentados na forma de artigo científico intitulado “Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to plant pathogenic bacteria”, formatado segundo as normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (<http://www.scielo.br/revistas/pab/iinstruc.htm>).

Os anexos apresentam figuras que foram incluídas na Dissertação no sentido de evidenciar as interações de compatibilidade/incompatibilidade existentes entre as fitobactérias e a cultivar de batata, não fazendo parte do artigo científico.

Sumário

Abreviaturas.....	7
Resumo.....	9
Abstract.....	10
1. Apresentação do tema.....	11
1.1 Caracterização da espécie vegetal.....	11
1.2 Bactérias fitopatogênicas.....	12
1.3 Mecanismos de defesa vegetal.....	13
1.3.1 Defesa bioquímica constitutiva ou pré-formada.....	14
1.3.2 Defesa bioquímica induzida.....	16
1.3.3 Reconhecimento de patógenos pelos vegetais.....	18
1.4 Respostas de defesa vegetal.....	21
1.4.1 Resposta de hipersensibilidade (HR).....	21
1.4.2 Resistência sistêmica adquirida (SAR).....	23
1.5 Sinalização na SAR.....	25
1.6 Enzimas envolvidas nas respostas de defesa vegetal.....	27
2. Hipótese.....	29
3. Objetivos.....	29
4. Referências bibliográficas.....	30
Article: Defense mechanisms of <i>Solanum tuberosum</i> L. in response to plant pathogenic bacteria.....	38
Abstract.....	39
1. Introduction.....	40
2. Materials and Methods.....	43
2.1 Plant material.....	43
2.2 Plant pathogens.....	43
2.3 Tuber infection.....	43
2.4 Leaf infection.....	44

2.5 Enzyme activities.....	44
2.6 Phenolic compounds and quercetin flavonoids.....	44
2.7 Chlorophyll levels in leaves.....	45
2.8 Statistics.....	45
3. Results and Discussion.....	46
3.1 Compatible and incompatible plant responses.....	46
3.2 Multiple inoculations (basal, intermediate and apical leaves).....	48
3.3 Single inoculation (intermediate leaves).....	50
4. Acknowledgements.....	52
5. References.....	53
6. Figures.....	58
7. Tables.....	61
Anexos.....	67
Considerações finais.....	69
Conclusões.....	71

Abreviaturas

AS: ácido salicílico

ASM: acibenzolar-S-metil ou éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico

AB: ácido benzóico

avr: gene de avirulência do patógeno

BA-2H: ácido benzóico 2-hidroxilase (do inglês, benzoic acid 2-hydroxylase)

BABA: ácido β -aminobutírico (do inglês, β -aminobutyric acid)

hpi: horas pós inoculação

HR: resposta de hipersensibilidade ou reação de hipersensibilidade (no inglês HR: hypersensitive response)

INA: ácido 2,6 dicloroisonicotínico (do inglês, 2,6-dichloroisonicotinic acid)

JA-Ile: jasmonato isoleucina

Kat: unidade Katal

LRR: repetições ricas em leucina (do inglês, leucine rich repeats)

MAP: proteína ativadora de mitose (do inglês, mitogen-activated protein)

MeJA: metil jasmonato

NO: óxido nítrico

O₂⁻: íon superóxido

OH⁻: radical hidroxila

PAL: fenilalanina amônia-liase (do inglês, phenylalanine ammonia-lyase)

PAMPs: padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês, pathogen associate molecular pattern)

Pep 13: oligopeptídeo proveniente do fungo *Phytophthora infestans*

POX: peroxidase

PPO: polifenoloxidase (do inglês, polyphenol oxidase)

PR: relacionada à patogênese (do inglês, pathogenesis related)

pv.: classificação taxonômica subespecífica patovar

PVPP: polivinilpirrolidona

QTLs: *locus* de herança quantitativa (do inglês, quantitative trait *locus*)

R: gene de resistência do vegetal

ROS: espécies reativas de oxigênio (do inglês, reactive oxygen species)

SAR: resistência sistêmica adquirida (no inglês, systemic acquired resistance)

ISR: resistência sistêmica induzida (no inglês, induced systemic resistance)

SAGase: ácido salicílico glicosiltransferase (do inglês, salicylic acid glycosyl transferase)

SOD: superóxido dismutase

u.f.c: unidades formadoras de colônias

Resumo

A resistência natural das plantas a doenças é baseada tanto em mecanismos pré-formados quanto em mecanismos induzidos. Esse estudo pretendeu analisar os níveis de compostos fenólicos, incluindo o grupo dos flavonóides e as atividades das enzimas polifenoloxidasas (PPOs) e peroxidases (POX) em *Solanum tuberosum* cv. Ágata, em resposta às inoculações com as bactérias fitopatogênicas incompatíveis *Xanthomonas axonopodis*, *Ralstonia solanacearum*, e compatíveis *Erwinia carotovora*. A compatibilidade das bactérias foi avaliada através da inoculação de tubérculos. Tubérculos infiltrados com *E. carotovora* exibiram sinais de doença e com *R. solanacearum* e *X. axonopodis* não desenvolveram doença. As inoculações nas folhas foram realizadas dependendo do número e das localizações das folhas nos ramos. As inoculações múltiplas foram realizadas nas folhas basais, intermediárias e apicais e as inoculações simples ocorreram nas folhas intermediárias. As folhas inoculadas com as suspensões de *X. axonopodis* e *R. solanacearum* exibiram a resposta de hipersensibilidade (HR) dentro de 24 hpi, enquanto que as folhas inoculadas com *E. carotovora* evidenciaram sintomas de doença. Portanto, o isolado de *R. solanacearum* utilizado nos experimentos não mostrou virulência a esta cultivar de batata. Independentemente do tratamento bacteriano, as folhas basais apresentaram nas inoculações múltiplas, as mais altas atividades das PPOs e das POX e os níveis mais baixos de compostos fenólicos totais e de flavonóides, quando comparadas com as folhas apicais. As folhas basais e as intermediárias inoculadas com *R. solanacearum* e com *X. axonopodis* mostraram um aumento nos níveis de compostos fenólicos totais e de flavonóides. Esses aumentos foram similares ou maiores que os níveis observados nas folhas apicais não inoculadas. De um modo geral, as inoculações múltiplas exibiram os maiores níveis de compostos fenólicos totais e de flavonóides, enquanto que as inoculações simples apresentaram os maiores aumentos nas atividades das PPOs. Contudo, as atividades das POX não apresentaram diferenças significativas entre as inoculações múltiplas e simples. No presente estudo, o metabolismo de defesa nesta cultivar de batata foi estimulado pelas bactérias incompatíveis, indicando a sua posterior utilização como indutoras da defesa da planta contra o ataque subsequente de patógenos compatíveis.

Palavras-chave: resposta de hipersensibilidade, compostos fenólicos, flavonóides, polifenoloxidasas, peroxidases.

Abstract

The natural resistance of plants to disease is based not only on preformed mechanisms, but also on induced mechanisms. The defense mechanisms present in resistant plants may also be found in susceptible ones. This study attempts to analyze phenolic compounds levels, including the flavonoid group and polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POX) activities in *Solanum tuberosum* cv. Agata, in response to inoculation of the incompatible plant pathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia solanacearum*, and the compatible bacteria *Erwinia carotovora*. Bacteria compatibility was evaluated using tubers infiltration. Tubers infiltrated with *E. carotovora* suspensions exhibited disease symptoms. On the other hand, bacteria *R. solanacearum* and *X. axonopodis* did not induce disease. Leaf inoculation was performed depending on the number and location of the leaves on the stem. Multiple-leaf inoculation was performed on basal, intermediate and apical leaves and single inoculations on intermediate leaves. Leaves inoculated with bacterial suspensions of *X. axonopodis* and *R. solanacearum* showed hypersensitive response (HR) within 24 hpi, while leaves inoculated with *E. carotovora* showed disease symptoms. Therefore, the *R. solanacearum* isolate used in the experiments did not exhibit virulence to this potato cultivar. Regardless of the bacterial treatments, multiple-inoculated basal leaves presented higher PPO and POX activities and lower levels of total phenolic compounds and flavonoids, when compared to apical leaves. Basal and intermediate leaves inoculated with *R. solanacearum* and *X. axonopodis* showed an increase in total phenolic compounds and flavonoid levels. These increases were similar or higher than the levels observed in non-inoculated apical leaves. In general, multiple-leaf inoculations showed the highest levels of phenolic compounds and flavonoids, while the single inoculations presented the highest increase in PPO activity. However, with POX activities there were no significant differences between single and multiple-leaf inoculations. In the present study, the plant defense metabolism in this potato cultivar was stimulated by incompatible bacteria, indicating their potential use as inducers for further plant defense against any subsequent attack by compatible pathogens.

Key words: hypersensitive response, phenolic compounds, flavonoids, polyphenol oxidases, peroxidases.

1. Apresentação do tema

1.1 Caracterização da espécie vegetal

Solanum tuberosum L. é uma espécie que pertence à família Solanaceae, com grande importância agrícola e econômica, constituindo a quarta mais importante colheita no mundo (Rauscher *et al.*, 2006). Essa família vegetal apresenta distribuição cosmopolita, sendo concentrada na América do Sul, incluindo cerca de 150 gêneros e 3 000 espécies no mundo e de 32 gêneros com 350 espécies no Brasil. O maior gênero da família é o *Solanum* (Wink, 2003; Souza e Lorenzi, 2005).

A batata é uma planta herbácea, com folhas alternas e compostas (Joly, 1993, Judd *et al.*, 2002). O caule possui duas partes, tendo a parte aérea altura de 50-70 cm, com uma haste principal que se desenvolve diretamente do tubérculo e as secundárias originadas da principal. A parte subterrânea do caule é representada pelos tubérculos, com reservas amiláceas, constituindo os principais órgãos de armazenamento e reprodução vegetativa da planta (Fortes e Pereira, 2003). Desta forma, *Solanum tuberosum* é uma planta perene, que sobrevive de um ano para outro no solo como tubérculo, mas, quando cultivada, comporta-se como uma planta anual.

A principal batata cultivada comercialmente refere-se a *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, sendo que a cultivar Ágata encontra-se entre as cultivares estrangeiras de introdução recente (Pereira, 2003). Esta cultivar é considerada promissora, em função da uniformidade e da boa aparência de seus tubérculos, além de produzir um número elevado de hastes/m² e, portanto, de tubérculos por planta, contribuindo para uma maior produção da cultura. Os brotos de Ágata cultivados em diferentes substratos produzem uma maior quantidade de minitubérculos para serem utilizados como “sementes”, em comparação com outras cultivares, como Monalisa e Asterix (Silva *et al.*, 2006).

1.2 Bactérias fitopatogênicas

Diversas espécies de bactérias fitopatogênicas têm sido utilizadas como ativadoras de respostas de defesa nos vegetais. Para o estudo dos mecanismos de defesa vegetal em *S. tuberosum*, foram utilizadas as bactérias *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Ralstonia solanacearum* isolados de tomate pertencentes a raça 1 (biovar 1) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Erwinia carotovora – Pertence à família Enterobacteriaceae, constituída por bactérias Gram negativas, que possuem a forma de bastonetes, sendo peritríquias (flagelos distribuídos por toda a célula), e responsáveis pela doença denominada de “podridão mole,” nas solanáceas. A sua sobrevivência ocorre no solo por longo tempo, podendo estar associadas aos restos culturais das plantas, ou à rizosfera das plantas hospedeiras (Lopez e Henz, 1998). Esta espécie pode possuir um grande número de hospedeiros, sendo que *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pode ser um patógeno de espécies pertencentes a muitas famílias vegetais, como Amaranthaceae, Anacardiaceae, Asclepiadaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Compositae e outras (Romeiro, 2005). Trata-se de fitobactérias pectolíticas que degradam a pectina presente na lamela média da parede celular do hospedeiro, incidindo em órgãos de reserva como tubérculos, bulbos e frutos. Portanto, esta doença pode provocar perdas consideráveis pelo apodrecimento tanto da batata-semente (antes e após o plantio) quanto das ramas e dos tubérculos no campo ou armazém (Lopes, 1981).

Ralstonia solanacearum – Pertence à família Pseudomonadaceae. Esta espécie é representada por bactérias Gram negativas, que possuem a forma de bastonetes, sendo lofotríquias (possuem um tufo de flagelos). As estirpes de *R. solanacearum* têm sido classificadas em raças, de acordo com a espécie hospedeira, e em biovars, de acordo com a habilidade de utilizar ou oxidar os açúcares maltose, celobiose, lactose e trealose e os álcoois manitol, sorbitol e dulcitol (Hayward, 1991). A biovar 1 (raça 1) e a biovar 2 (raça 3) infectam a batata (Hayward, 1995). São representadas por bactérias responsáveis pela doença denominada “murcha bacteriana” na família Solanaceae, destacando-se as culturas de batata, berinjela, jiló, pimentão, tomate e fumo. Espécies de outras famílias vegetais podem ser hospedeiras como Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Geraniaceae, Musaceae, Myrtaceae e outras (Romeiro, 2005). As bactérias penetram nas plantas através de aberturas naturais como os estômatos, lenticelas, hidatódios,

aberturas florais e também através de ferimentos, sendo que nas regiões tropicais, as bactérias se reproduzem rapidamente e podem viver por longos períodos no solo, infectando as plantas principalmente pelas raízes (Bringel, 2002; Poussiet *et al.*; 2003). Devido ao grande número de hospedeiros, trata-se de um fitopatógeno de baixa especificidade em interações bactéria-planta, porém, responsável pela principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo, devido a colonização dos feixes vasculares e do tecido parenquimatoso que circunda os vasos, com profundas alterações fisiológicas, levando à necrose vascular (Romeiro, 2005). A exsudação do pus bacteriano em plantas de fumo pode contaminar plantas saudáveis, próximas às doentes, sob condições de chuva e vento, sendo responsável por perdas agrícolas significativas em solos com alta umidade (Lopes, 1981).

Xanthomonas axonopodis – Pertence à família Pseudomonadaceae, sendo representada por bactérias Gram negativas, com a forma de bastonetes, sendo monotríquias (possuem apenas um flagelo). São responsáveis por doenças caracterizadas por sintomas como manchas foliares, podridão do talo, podridão dos bulbos e o cancro cítrico (Agrios, 1997). O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, pode ocorrer em todas as espécies e variedades de citros, atacando a maior parte das culturas comerciais como a laranja pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Koller *et al.*; 2006), a lima ácida tahiti (*Citrus aurantifolia* Swingle subsp. *latifolia* (Tanaka)) e outras. Embora o cancro tenha o aspecto de uma típica lesão do filoplano, na verdade, ele se origina de uma infecção sistêmica, provocando lesões nas folhas, frutos e ramos. As bactérias invadem sistemicamente a planta e passam a se multiplicar nos feixes vasculares. Com o progresso da enfermidade, a colonização se estende para o tecido parenquimatoso circunvizinho que sofre alterações e é empurrado para o exterior, rachando o caule e expondo os cancos na forma de lesões salientes (Romeiro, 2005).

1.3 Mecanismos de defesa vegetal

A resistência natural das plantas é baseada tanto em mecanismos pré-formados, quanto em mecanismos induzidos (Kortekamp e Zyprian, 2003). Os mecanismos pré-formados são representados por compostos constitutivos, que estão presentes na forma ativa em plantas saudáveis, ou possuem precursores inativos que rapidamente são ativados em resposta ao estresse ou ao ataque de patógenos (Van Etten *et al.*, 1994). Os mecanismos induzidos envolvem a síntese de

novo de compostos de defesa, representando uma resposta ativa das células da planta após o reconhecimento dos invasores (Siegrist *et al.*, 2000). Apesar da identificação de vários mecanismos fundamentais na resistência a doenças, eles não representam respostas estáticas, mas, sim governadas por fatores externos e pelos estados fisiológicos e do desenvolvimento das plantas (Zeier, 2005).

1.3.1 Defesa bioquímica constitutiva ou pré-formada

Os metabólitos secundários são compostos importantes para a sobrevivência e reprodução das plantas, podendo estar relacionados com a defesa contra herbívoros e microrganismos, além de serem compostos que podem agir como sinalizadores na polinização e dispersão de sementes. Os vegetais da família Solanaceae produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários, sendo que certos gêneros são bem caracterizados pela ausência ou presença desses produtos naturais, o que contribui para sua taxonomia (Verpoort *et al.*, 1999; Wink, 2003). Esses compostos ocorrem nos vegetais, mesmo na ausência de patógenos.

Os compostos fenólicos constituem um grupo importante de metabólitos secundários, apresentando em sua estrutura, um grupo hidroxila funcional em um anel aromático (Arnaldos, 2001). Podem ser representados pelos pterocarpanos (gliceolina), flavonóis (quercetina), isoflavonas, cumarinas, furanocumarinas e outros (Dixon e Paiva, 1995; Harbone, 1999). Ácidos fenólicos como o *p*-cumárico, caféico e ferúlico, são raramente acumulados em altos níveis na forma livre dentro da planta, estando normalmente conjugados a açúcares, como a glicose-salicilato (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005), carboidratos da parede celular, como os ésteres de ferulato (Ascensao e Dubery, 2006), ou ácidos orgânicos (como o ácido clorogênico). Muitos fenilpropanóides com ação antimicrobiana são sintetizados em resposta ao estresse ou ataque de patógenos, como os pterocarpanos (como a gliceolina), flavonóis (como a quercetina), isoflavonas, cumarinas, furanocumarinas e outros compostos (Dixon e Paiva, 1995). Sugere-se que a esterificação de ácidos fenilpropanóides e o *cross-linking* desses ésteres presentes na parede celular da célula hospedeira funcionem como um molde para a deposição de lignina e, portanto, favorecendo sua ligação à matriz de polissacarídeos (de Ascensão, 2003). A lignina é um polímero de fenólicos aromáticos que pode ser formado em resposta a ferimentos e ao ataque de patógenos (Boudet *et al.*, 1995). Há uma forte evidência de que a lignificação é um importante

mecanismo na resistência a doenças. Tem sido observado o aumento dos níveis da lignina em muitas espécies de plantas, a partir de infecções causadas por organismos patogênicos, tais como, fungos, bactérias, vírus e nematódeos (Sticher *et al.*, 1997). Desta forma, plantas de trigo tratadas com inibidores de ligninas, mostraram-se mais suscetíveis à infecção com *Puccinia graminis*, isto porque as ligninas formam uma barreira físico-química contra patógenos e, podem ser sintetizadas em resposta a ferimentos (Boudet, 2000).

Os flavonóides constituem a maior classe dos fenólicos vegetais, sendo que diversos produtos naturais, entre os quais, extratos de plantas medicinais, têm mostrado a capacidade de controlar doenças em plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana direta quanto indireta. Portanto, substâncias como flavonóides e os ácidos ascórbico, cítrico e láctico encontrados em extratos vegetais, podem influenciar o desenvolvimento de bactérias (Motoyama *et al.*, 2003). Além das propriedades antimicrobianas, os flavonóides agem nas plantas como antioxidantes, fotorreceptores e atrativos visuais.

Desta forma, vários compostos podem estar presentes, ou serem rapidamente produzidos a partir de precursores. Van Etten *et al.* (1994), propuseram o termo fitoanticipinas para distinguir os compostos que são rapidamente sintetizados a partir de compostos pré-formados (Osborn, 1996), das fitoalexinas, cujas vias biossintéticas, são ativadas em resposta ao ataque de patógenos, fazendo parte da defesa induzida.

A distribuição dos compostos pré-formados é quase sempre tecido-específica e, em geral, acumulam-se em tecidos mais externos, onde funcionam como barreiras bioquímicas primárias contra patógenos. Patógenos eficientes teriam nesse cenário, a capacidade de contornar o efeito desses compostos (Medeiros *et al.*, 2003). Segundo Roda *et al.* (2003), a superfície da folha de *Nicotiana attenuata* Torr. ex S. Wats. é rica em metabólitos secundários que diminuem os danos causados por herbívoros, patógenos e estresses abióticos. Como exemplos, podem-se destacar a nicotina, que ocorre tanto nos tricomas epidérmicos como no mesófilo foliar, os diterpenos, que ocorrem exclusivamente no mesófilo e, a quercetina, que ocorre nos tricomas e parece ser excretada em toda a superfície da folha. Esses mesmos autores relatam que a composição dos metabólitos secundários nesta espécie muda com o desenvolvimento foliar, em resposta ao ataque de herbívoros e ao estresse ambiental. Em videira, a resistência ao fungo *Plasmopara viticola* é maior nas folhas mais velhas, da base dos brotos, do que nas folhas mais jovens, do ápice dos brotos (Kortekamp e Zyprian, 2003).

Extratos brutos e óleos essenciais de diversas espécies de plantas medicinais podem apresentar atividade eliciadora e antifúngica (Stargalin *et al.*, 1999). Segundo esses autores, extratos brutos de pitanga, cânfora, poejo, romã e cardo santo foram os mais efetivos em induzir o acúmulo da fitoalexina gliceolina, bem como de duas frações fungitóxicas em espécies como erva-cidreira, cânfora e alfavaca.

Além das defesas bioquímicas existem as estruturais, sendo que a primeira linha de defesa da planta contra patógenos é a superfície das folhas. As barreiras estruturais incluem tanto a quantidade quanto a qualidade das ceras e cutícula que recobrem as células epidérmicas, além da estrutura das paredes celulares e a presença de tricomas especializados que inibem a penetração dos patógenos (Agrios, 1997; Kaloshian, 2004).

1.3.2 Defesa bioquímica induzida

Segundo Medeiros *et al.* (2003), o contato entre o patógeno e o protoplasma da célula hospedeira desencadeia reações de síntese de compostos tóxicos para o patógeno. Importante ressaltar que do ponto de vista evolucionário, as plantas desenvolveram um sistema de defesa latente, o qual pode ser ativado, com a finalidade de economizar energia, ao contrário da defesa constitutiva que representa um custo para a planta, uma vez que independente da presença do patógeno, a planta investe seus recursos na produção desses fatores (Di Piero *et al.*, 2005).

A seleção natural e a co-evolução com os patógenos levaram as plantas a selecionarem uma série de mecanismos de defesa. As defesas identificadas em plantas resistentes estão também presentes nas suscetíveis. Provavelmente, a diferença entre resistência e suscetibilidade, pode ser o resultado de uma variação de tempo, autonomia celular ou intensidade das respostas de defesa das plantas (Moraes, 1998).

O reconhecimento rápido de patógenos invasores pelas células vegetais e a indução rápida das respostas de defesa são essenciais para a resistência das plantas. Desta forma, a resistência ocorre quando respostas múltiplas de defesa são ativadas rapidamente e coordenadamente (Yamamizo *et al.*, 2006).

O termo eliciador foi utilizado originalmente para se referir às moléculas e outros estímulos que induziam a síntese ou acúmulo de compostos antimicrobianos (fitoalexinas) nas células da planta. Fitoalexinas constituem um grupo heterogêneo de substâncias pós-formadas, sem

nitrogênio na molécula e que são sintetizadas, primeiramente, nos sítios de infecção dos patógenos. Entre esses compostos, os isoflavonóides, os furanoacetilenos ou os terpenóides parecem ser os mais importantes (Harborne, 1999; Romeiro, 2001). As isoflavonas e isoflavanonas são as fitoalexinas derivadas dos fenilpropanóides melhor caracterizadas (Dixon *et al.*, 2002), sendo que compostos como prenilatos isoflavonóides, cumarinas, 3-desoxiantocianidinas e flavonóis são também fitoalexinas produzidas através da via dos fenilpropanóides em plantas, após o ataque de patógenos (Dixon e Paiva, 1995). Elicidores em solanáceas promovem a síntese de um grande número de sesquiterpenóides como rishitina, lubimina, solavetivona, fituberin e capsidiol (Harborne, 1999). Desta forma, a infecção de tubérculos de batata com o fungo *Phytophthora infestans* causou um aumento transitório nos níveis de transcritos de um precursor da luminina e da rishitina que são fitoalexinas sesquiterpênicas (Yamamizo *et al.*, 2006).

Atualmente, o termo eliciador é utilizado para moléculas que estimulam algum mecanismo de defesa na planta, como o acúmulo de fitoalexinas antimicrobianas, a indução da morte celular (reação de hipersensibilidade) e a síntese de proteínas que inibem as enzimas de degradação produzidas por patógenos (Hahn, 1996). Elicidores, geralmente, são moléculas da superfície de um microrganismo patogênico da planta, as quais, quando aplicadas em plantas hospedeiras ou não hospedeiras, induzirão sintomas de reações de resistência típicas do sistema patógeno-planta estudado (Kortekamp e Zyprian, 2003).

A localização dos receptores do hospedeiro, que reconhecem os eliciadores dos patógenos, não é em grande parte conhecida. Estudos indicam que esses receptores existem na membrana plasmática ou exteriormente a ela, enquanto outros parecem localizar-se no meio intracelular (Hutcheson, 1998).

O reconhecimento do eliciador induz uma série de reações subseqüentes conhecidas como transdução de sinal, ativando a transcrição de genes envolvidos na resistência (Agrios, 1997; Yamamizo *et al.*; 2006). Os eventos de sinalização levam à produção de mensageiros secundários como o peróxido de hidrogênio, proteínas quinases, jasmonatos, ácido salicílico e outros (Leite *et al.*, 1997). Desta forma, podem ser observadas mudanças muito rápidas tanto em células hospedeiras em resposta a interações com patógenos incompatíveis quanto em culturas de células tratadas com vários eliciadores. Essas mudanças, incluem fluxo de íons, com efluxo de íons K^+ e Cl^- e influxo de H^+ e Ca^{++} através da membrana plasmática, com alteração da concentração de

AMP cíclico (cAMP), eventos de fosforilação e desfosforilação envolvendo proteínas reguladoras e a explosão oxidativa (Leite *et al.*, 1997; Low e Shroeder, 1997), que culminam com respostas de resistência. O fluxo de íons e a geração de H₂O₂ que ocorre, provavelmente, pela atividade de NADPH-dependente de oxidase e, a ativação de pelo menos três proteínas-quinases, são partes da via de transdução de sinal que levam à estimulação da expressão gênica de defesa (Halim *et al.* 2004). Em batata, dois genes diferentes de NADPH oxidases foram caracterizados como sendo responsáveis pelas fases da queima oxidativa (Yoshioka *et al.*, 2001). No sistema modelo de células de *Solanum tuberosum* em cultura, uma preparação bruta de eliciadores provenientes do fungo *Phytophthora infestans*, constituída do oligopeptídeo Pep-13, é capaz de ativar a expressão de genes de defesa. Neste caso, ocorre a estimulação da via dos fenilpropanóides, síntese de conjugados do ácido hidroxicinâmico e síntese de oxilipinas específicas, que se acredita possuírem um papel como compostos antimicrobianos.

1.3.3 Reconhecimento de patógenos pelos vegetais

Experimentos realizados por Flor (1955), levaram ao estabelecimento da teoria gene-a-gene, a qual postula que para cada gene de resistência da planta hospedeira, há um gene correspondente no patógeno, que confere virulência ou avirulência.

No modelo clássico gene-a-gene (Fig. 1), plantas resistentes possuem genes *R* que codificam proteínas receptoras que interagem com proteínas eliciadoras de agentes patogênicos, codificadas pelos genes de avirulência *avr*, ativando, em muitos casos, as vias de transdução de sinais, que podem levar às respostas de defesa (Hutcheson, 1998). Neste caso, a resistência poderá ocorrer se o patógeno possuir um gene *avr* e a planta possuir o gene *R* correspondente (Delannoy *et al.*, 2005).

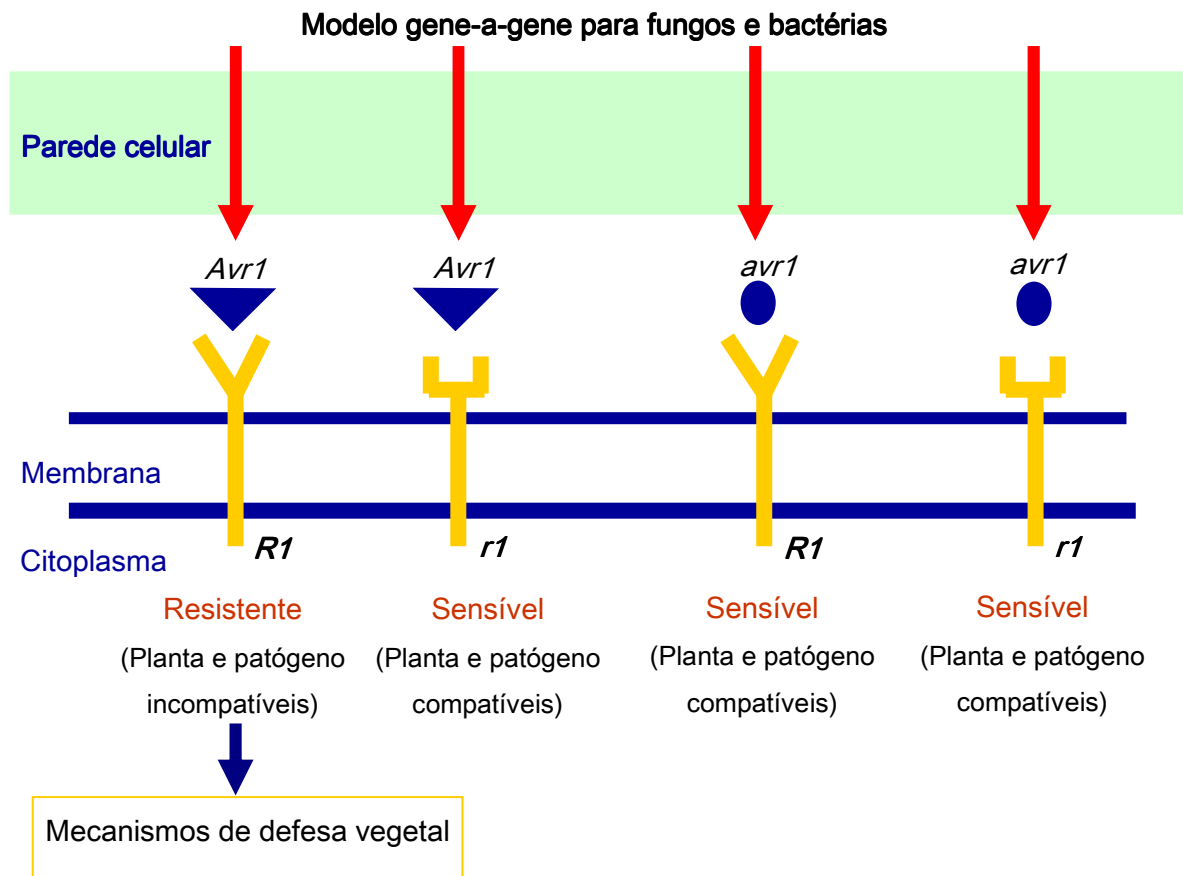


Fig. 1- Modelo gene-a-gene da interação planta-patógeno, segundo a teoria proposta por Flor (1955). *R1* e *r1* representam os receptores da célula vegetal, *Avr1* e *avr1* representam as proteínas eliciadoras do patógeno (Adaptado de Buchanan et al., 2000).

Este tipo de interação planta-patógeno poderá resultar na resistência raça-específica, qualitativa ou monogênica (Kaloshian, 2004; Ruiz *et al.*, 2005; Yamamizo *et al.*, 2006; Rauscher *et al.*, 2006). No entanto, nem toda interação patógeno-planta hospedeira encaixa-se nesse modelo (Medeiros *et al.*, 2003).

Segundo Kaloshian (2004), esse modelo explicaria o fenômeno de forma muito simplificada, porém, constituiria um ponto de partida no estudo de interações planta-patógeno, sendo que a interação direta das proteínas R com suas respectivas proteínas efetoras *avr*, tratar-se-ia de uma exceção, ao invés de regra. Neste caso, a interação da proteína *avr* do patógeno ocorreria com uma proteína alvo na planta hospedeira, cuja mudança conformacional seria importante para a sua ligação com a proteína R e desencadear as respostas de defesa.

O primeiro gene *R* a ser isolado foi o gene *Pto* do tomateiro, que codifica a serina/treonina quinase que confere resistência à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, sendo que Pto-AvrPto constitui-se num modelo característico de interação (Fritig *et al.*, 1998).

Posteriormente, foram isolados quatro genes de resistência adicionais nas plantas, o gene *RPS2* em *Arabidopsis*, que oferece resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* que são portadoras do gene *avrRpt2*; o gene *N* do fumo que confere resistência ao vírus do mosaico do tabaco; o gene *Cf9* do tomateiro que confere resistência ao fungos *Cladosporium fulvum* que são portadores do gene de avirulência *avr9*; o gene *L⁶* do linho que oferece resistência a certas raças de fungos da ferrugem (*Melampsora lini*), portadoras do gene de avirulência *avr6*. Esses genes de resistência são ativados pelos genes de avirulência correspondentes dos patógenos, cujos produtos constituem os eliciadores das respostas de hipersensibilidade (HR) (Agrios, 1997).

Durante a colonização da folha do tomateiro, o fungo *Cladosporium fulvum* secreta muitas proteínas de baixo peso molecular no apoplasto da folha, e muitas dessas proteínas podem funcionar como fatores de avirulência (Avr). A família de genes *Cf* do tomate confere resistência ao fungo através do reconhecimento desses diferentes peptídeos Avr (Rivas e Thomas, 2005).

As proteínas R podem ser intracelulares, envolvidas no reconhecimento dos determinantes AVR virais e bacterianos, como estarem localizadas numa região da membrana plasmática com um domínio extracelular LRR. Exemplos do segundo caso são as proteínas codificadas pelos genes *Cf2* e *Cf9* em tomateiro (Fritig *et al.*, 1998).

Os genes *R* clonados de um grande número de espécies de plantas conferem resistência a diversos grupos de microrganismos, mas, seus produtos exibem notável similaridade, como as repetições ricas em leucina, indicando que o reconhecimento e a ativação das vias de transdução de sinal têm sido conservados durante a evolução (Kaloshian, 2004).

Cerca de onze genes *R* de resistência têm sido introduzidos em *Solanum tuberosum*, a partir da espécie selvagem *Solanum demissum* Lindl., porém, destes, apenas cinco têm sido localizados no mapa genético da batata. Estes genes têm mostrado uma resistência específica de curta duração, contribuindo pouco para a resistência ao fungo *Phytophthora infestans*, que rapidamente desenvolveu novas raças virulentas a todas as cultivares resistentes, até então melhoradas (Bisognin, 2003; Rauscher *et al.*, 2006). Portanto, este tipo de resistência é rapidamente vencido

no campo, quando novas raças de patógenos são originadas por recombinação, mutação ou migração (Pechous, 2001; Yamamizo *et al.*, 2006).

Além da resistência específica ou qualitativa, existe a resistência quantitativa, parcial ou geral, controlada por um determinado número de genes para a resistência das plantas a patógenos (Vleeshouwers *et al.*, 2000; Rausher *et al.*, 2006; Tiffin e Moeller, 2006). Em batata, genes *R* e também os loci de herança quantitativa (do inglês QTLs), têm sido localizados em mapas genéticos. Alguns loci *R* localizam-se juntamente com QTLs de resistência, sugerindo que a resistência quantitativa pode ser o resultado de séries alélicas de genes *R* ou de grupos de famílias de homólogos de genes *R* (Oberhagemann *et al.*, 1999; Grube *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2005). A resistência geral é conferida por genes menores de resistência efetiva a várias raças, podendo ser expressa em diferentes estágios do ciclo do patógeno, desde a infecção até a reprodução e, parece ser o único tipo durável de resistência a queima causada por *P.infestans* (Bisognin, 2003). No sistema de reconhecimento não-específico, as plantas identificam padrões moleculares associados aos patógenos, como as flagelinas e os lipopolissacarídeos, que são eliciadores gerais que levariam às respostas de defesa. Podemos citar como exemplo, o oligopeptídeo Pep-13, seqüência altamente conservada da parede celular da hifa de *Phytophthora infestans*, que age como eliciador de respostas de defesa em várias plantas como na batata e na salsa, em resposta à infecção de várias espécies do gênero *Phytophthora* (Nürnberger e Lipka, 2005; Yamamizo *et al.*, 2006).

1.4 Respostas de defesa vegetal

1.4.1 Resposta de hipersensibilidade (HR)

Uma das mais eficientes formas de defesa das plantas é a resposta de hipersensibilidade (HR – do inglês *hypersensitive response*), caracterizada pela morte celular localizada das células vegetais e a formação de lesões necróticas no sítio de penetração do patógeno (Herbers *et al.*, 1996; Karrer *et al.*, 1998; Kaloshian, 2004). Espécies ativas de oxigênio (ROS – do inglês *reactive oxygen species*), tais como, O_2^- , OH^- e H_2O_2 (Fig. 2), podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso, caracterizando a queima oxidativa. Esse mecanismo representa uma resposta de defesa da planta, após o reconhecimento do patógeno, conduzindo à reação de hipersensibilidade (HR) nas interações incompatíveis (Resende *et al.*, 2003).

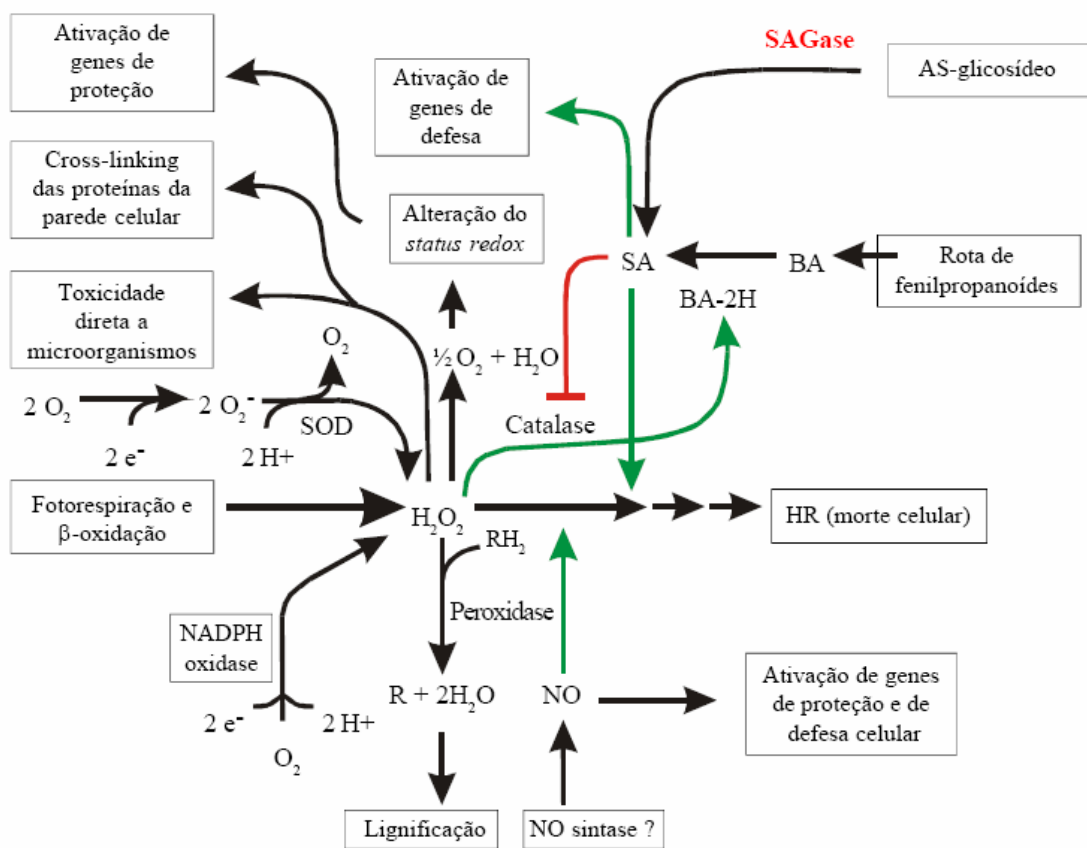


Fig. 2- Interconexões do H₂O₂, óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas (adaptado de Buchanan et al., 2000). SOD (superóxido dismutase), SAGase (AS glicosiltransferase) e BA-2H (ácido benzóico 2-hidrolase).

Esta resposta priva os patógenos biotróficos de nutrientes essenciais e, portanto, contribui para a limitação do crescimento dos patógenos (Zeier, 2005). Os primeiros relatos da produção de O₂⁻ em *Solanum tuberosum* foram feitos por Doke (1983), nas interações incompatíveis com o fungo *Phytophthora infestans*. Em variedades de videiras resistentes ao fungo *Plasmopara viticola*, a primeira reação que pode ser vista é a produção de ânions superóxido, seguido da morte das células infectadas pela oxidação dos radicais livres dos lipídeos da membrana plasmática, das proteínas ou dos ácidos nucleicos (Kortekamp e Zyprian, 2003).

A resposta de hipersensibilidade está associada a alterações estruturais que podem reter compostos antimicrobianos como fenóis e fitoalexinas no sítio de infecção. Uma marca histoquímica de lesões necróticas associadas com a resistência vegetal é a presença de material autofluorescente. A autofluorescência é devida à biossíntese de compostos fenólicos solúveis como as fitoalexinas e compostos ligados à parede celular, responsáveis pelo reforço da parede

pela suberificação e lignificação (Herbers *et al.*, 1996). O acúmulo de proteínas de resistência (PR-proteínas) representa a maior mudança quantitativa na composição de proteínas que ocorre na HR (Fritig *et al.*, 1998).

Respostas de hipersensibilidade relacionam-se também ao aumento da atividade de várias enzimas, tais como: lipoxigenases (LOX), fenilalanina amônia-liases (PALs) (do inglês, *Phenylalanine Ammonia-Lyase*), peroxidases (POX) e polifenoloxidasas (PPOs) (Guzzo, 2004).

Tem-se observado que isolados fitopatogênicos, independentemente do gênero a que pertençam, costumam incitar a resposta de hipersensibilidade em algumas, mas não em todas as plantas não-hospedeiras testadas (Tab. 1), e que certas plantas como o fumo, exibem facilmente resposta hipersensível a fitobactérias incompatíveis, sendo universalmente usadas para o teste de HR. A ocorrência de HR confirma a patogenicidade, uma vez que bactérias saprófitas não levam a essa resposta, portanto, a injeção de bactérias patogênicas no interior dos tecidos da folha de plantas de fumo não-hospedeiras, leva à resposta de hipersensibilidade (Romeiro, 2001).

Tabela 1. Tipos de interações bactéria-planta. Sintomas ou HR (+); ausência de sintomas ou HR (-) (Romeiro, 2001).

Bactérias	Planta	Associação	Sintomas típicos	HR
Fitopatogênica	Hospedeira	Compatível	+	-
Fitopatogênica	Não-hospedeira	Incompatível	-	+
Saprófita	Qualquer	-	-	-

Análises de “microarrays” da expressão gênica indicam que os genes de defesa são ativados mais rapidamente e em níveis mais altos em interações incompatíveis, quando comparados com interações compatíveis (Kaloshian, 2004).

1.4.2 Resistência sistêmica adquirida (SAR)

Uma reação das plantas à infecção por patógenos é a indução de resistência de longa duração e amplo espectro a infecções subseqüentes. Esta resposta de resistência induzida a doenças é conhecida, há muitos anos, como resistência sistêmica adquirida (SAR - do inglês *systemic acquired resistance*) (Ryals *et al.*, 1994). Para a maior parte das plantas, a resistência a

um determinado patógeno resulta da indução dos mecanismos de defesa no sítio de infecção, nas partes circunvizinhas e em partes distantes não infectadas (Yu *et al.*, 1997). Com o estabelecimento da SAR, as plantas resistindo com sucesso ao patógeno, podem tornar-se resistentes, não somente à subsequente infecção do patógeno original, mas à infecção de uma variedade de outros patógenos (Navarre e Mayo, 2004).

O fenômeno de indução de resistência sistêmica ou resistência sistêmica adquirida foi conceituado como sendo a ativação de um estado de resistência contra doenças, induzido sistemicamente em plantas, pela infecção localizada por fitopatógenos, ou em resposta a tratamentos com diferentes agentes abióticos. Entre eles, podemos citar o ácido β -aminobutírico (BABA), o ácido salicílico (AS) e os respectivos análogos funcionais como o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) e o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM) (Herbers *et al.*, 1996; Guzzo, 2004). Além disso, a SAR pode ser induzida por diferentes moléculas, como carboidratos, glicoproteínas, proteínas e lipídeos (Ricci *et al.*, 1993; Hahn *et al.*, 1996). Essas moléculas podem ser originadas de lipopolissacarídeos extracelulares de bactérias, glicoproteínas da parede celular de fungos patogênicos, carboidratos da parede celular de fungos não patogênicos e outros (Hahn e Albershein, 1978; Koch *et al.*, 1998; Coventry e Dubery, 2001). Neste sentido, Wulff e Pascholati (1999), realizaram a purificação parcial e caracterização bioquímica de um eliciador glicoprotéico presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de induzir a síntese de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo.

Em *Solanum tuberosum*, a SAR pôde ser induzida por componentes da parede celular das hifas do fungo *Phytophthora infestans*, como o oligopeptídeo Pep-13 (Halim, 2004), ocorrendo queima oxidativa local e sistêmica. Desta forma, o tratamento local com o eliciador nos folíolos das folhas compostas da planta, induziu queima oxidativa local, subsistêmica, isto é, em outros folíolos não tratados das mesmas folhas, além de sistêmica (Park *et al.*, 1998; Vleeshouwers *et al.*, 2000). Em tecidos distantes do sítio de inoculação de folhas de *Arabidopsis* com o patógeno avirulento *Pseudomonas syringae*, a SAR desenvolveu-se mais efetivamente nas folhas mais jovens e esta resposta foi associada com forte acúmulo do ácido salicílico (Zeier, 2005).

Nas interações com fitopatógenos incompatíveis onde a planta resiste à agressão, o sistema de defesa vegetal é eficientemente ativado, conduzindo à resistência. Contudo, esse sistema é tardiamente ativado ou não ativado em interações compatíveis, condicionando a doença (Resende

et al., 2003). Desta forma, a inoculação das bactérias avirulentas *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* nas folhas de *Solanum tuberosum*, levou ao desenvolvimento de necroses e ativação sistêmica de genes de defesa, com a redução dos sintomas da doença, após a infecção subsequente com o patógeno virulento *Phytophthora infestans* (Landgraf *et al.*, 2002).

Foi verificado que a indução ou o aumento da expressão dos genes relacionados ou genes marcadores da SAR, leva à codificação de proteínas com atividades diversas, que agem em conjunto, para restringir a invasão do patógeno (van Loon e van Strein, 1998). Entre essas proteínas estão aquelas relacionadas com a patogênese (PR-proteínas) e enzimas do metabolismo secundário vegetal (Fritig *et al.*, 1998). As PR-proteínas são agrupadas em 14 famílias sendo que, entre elas, algumas possuem atividade conhecida. Segundo Hammerschmidt *et al.* (2001), a importância dessas proteínas está no fato de que algumas delas possuem uma intensa atividade antifúngica e antimicrobiana, sugerindo um papel dessas proteínas na SAR.

Tanto em fumo como em *Arabidopsis*, pouca ou nenhuma expressão das PRs está presente na ausência de indução de origem exógena. Contudo, foi encontrada uma quantidade significativa de PR-1 nas folhas de *Solanum tuberosum*, independente de ocorrer indução por eliciadores, sendo que esse processo pode estar relacionado com a presença de altos níveis basais de ácido salicílico (Navarre e Mayo, 2004).

1.5 Sinalização na SAR

As respostas de defesa das plantas aos patógenos incluem vias de sinalização que dependem de moléculas como o ácido salicílico, o ácido jasmônico e o etileno. Essas vias não são independentes umas das outras, mas, ao invés disso, uma complexa rede de comunicação entre elas resulta na modulação dessas defesas (Kaloshian, 2004; Navarre e Mayo, 2004; van Loon *et al.*, 2006). Estudos recentes sugerem que ocorre um interrelacionamento considerável entre as vias de sinalização dependentes do ácido salicílico e ácido jasmônico/etileno, sendo descritos efeitos inibitórios, neutros e aditivos entre eles (Landgraf *et al.*, 2002).

O ácido salicílico (AS) tem sido proposto como um sinal que leva à SAR devido ao aumento considerável da sua concentração após a infecção do patógeno. O nível endógeno de AS aumentou tanto localmente quanto sistemicamente em plantas de fumo, inoculadas localmente com vírus (TMV), o que é consistente com o seu papel como um sinal na SAR (Yu *et al.*, 1997;

Siegrist *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2003). O papel mediador do AS na sinalização tem sido melhor caracterizado em *Arabidopsis*, fumo e pepino, mas, pouco se sabe em plantas que possuem altos níveis basais deste sinalizador, como na batata e no arroz. Sugere-se que, embora a planta de batata apresente altos níveis constitutivos de AS, alterações nos níveis de AS livre pode tornar os tecidos responsivos a este sinalizador (Landgraf *et al.*, 2002; Navarre e Mayo, 2004). O AS é um produto do metabolismo dos fenilpropanóides, tendo o ácido benzóico como precursor (Fig.3) (Hammerschmidt e Kuc, 1995).

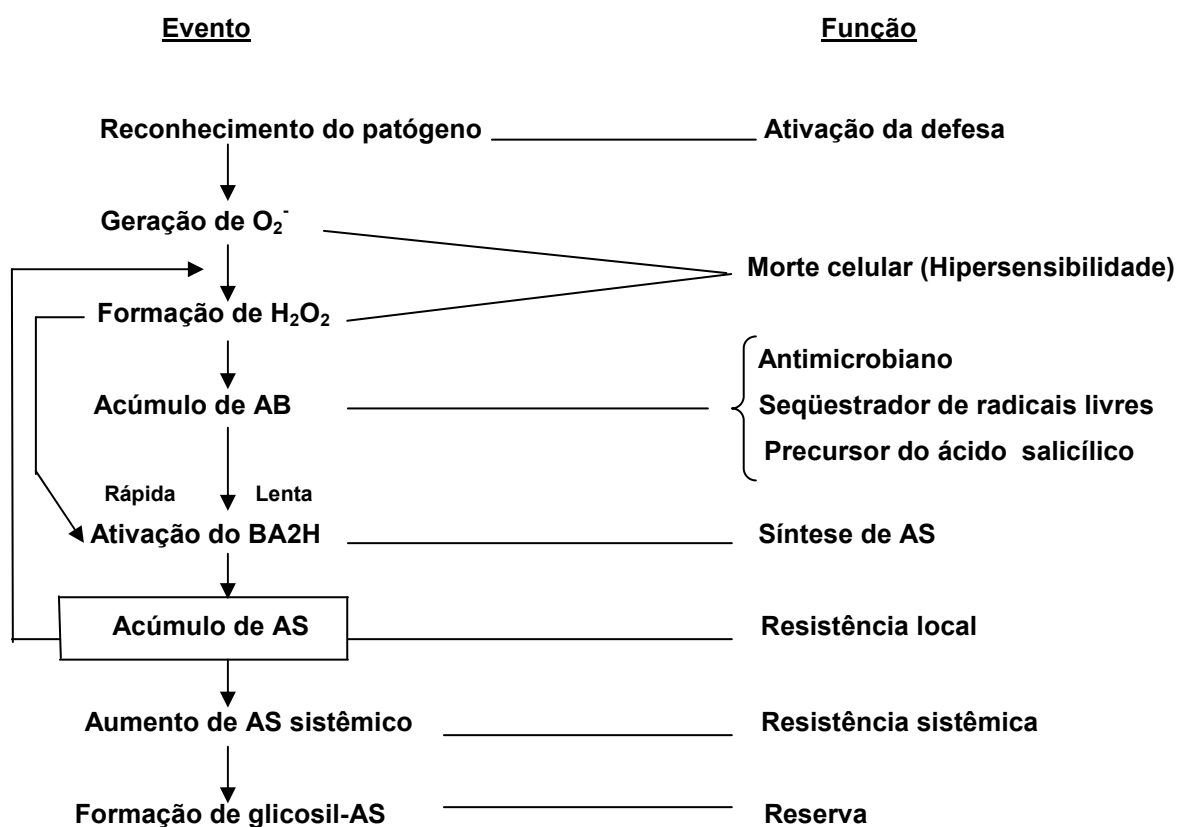


Fig.3 - Modelo proposto da via de defesa contra patógenos mediada pelo AS em plantas de fumo. AS (ácido salicílico), AB (ácido benzóico), BA2H (ácido benzóico 2-hidrolase), O₂⁻ (ânion superóxido) (Modificado de León *et al.*, 1995).

A evidência mais indicativa que o AS é um sinal na SAR é proveniente de experimentos usando tabacos transgênicos e *Arabidopsis* que expressam o gene *NahG* que codifica um aumento da enzima AS hidroxilase, em *Pseudomonas putida* (Yasuda *et al.*, 2003). Esta enzima catalisa a

conversão de AS em catecol, que não é ativo na indução da SAR. Essas plantas geneticamente transformadas não acumulam AS em resposta à infecção por patógenos e são incapazes de induzir a resistência sistêmica como resposta a patógenos como vírus, bactérias ou fungos (Gaffney *et al.*, 1993; Lawton *et al.*, 1995). Plantas de *S.tuberosum* transformadas expressando o gene *NahG* tiveram a expressão de PR-1 mais baixa, sugerindo que o alto nível basal de AS era responsável pela sua expressão na ausência de eliciadores (Navarre e Mayo, 2004).

O AS e análogos ativos inibem especificamente a atividade da catalase. Como a catalase converte a H_2O_2 a H_2O e O_2 , a sua inibição resultaria em acúmulo de espécies reativas de oxigênio que poderiam agir como mensageiros secundários na indução dos genes SAR. Consistente com esta idéia, inibidores da catalase não relacionados com o AS, como o próprio peróxido de hidrogênio, pode induzir a expressão dos genes SAR. Dessa maneira, a inibição da catalase deve ter efeitos diretos na redução do crescimento do patógeno (Ryals *et al.*, 1994).

O etileno é um hormônio vegetal volátil, de múltiplas funções fisiológicas e que pode ser produzido nas respostas de defesa causadas por estresses bióticos e abióticos (Buchanan *et al.*, 2000). Embora muitos resultados experimentais indiquem que este hormônio não está diretamente envolvido na sinalização da SAR (Sticher *et al.*, 1997), ele pode induzir à expressão de algumas proteínas PR, como a β -1,3-glucanase e a quitinase. Além disso, o etileno pode levar a um reforço estrutural da parede celular através da lignificação e acúmulo de proteínas ricas em hidroxiprolina (Sticher *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1999).

1.6 Enzimas envolvidas nas respostas de defesa vegetal

A enzima PAL, é uma enzima chave responsável pela transformação da fenilalanina em ácido cinâmico e pela formação da maior parte dos fenóis vegetais (Vardapetyan *et al.*, 2003; Camacho-Cristóbal *et al.*, 2002).

As peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7) podem estar envolvidas em vários processos relacionados à defesa, como a síntese de lignina que é depositada nas paredes celulares das células vegetais e nas papilas, interferindo no crescimento e no desenvolvimento dos patógenos (Agrios, 1997). Em videiras resistentes ao fungo *Plasmopara viticola*, a atividade das peroxidases aumentou 10-12 horas após a inoculação (hpi), e este aumento foi observado somente nas células circunvizinhas à área de infecção, sendo que, em seguida, ocorreu a deposição de compostos

fenólicos oxidados. As variedades resistentes são caracterizadas tanto por uma alta atividade basal destas enzimas, comparado com variedades suscetíveis, como por um rápido aumento na atividade enzimática, durante as primeiras 24 hpi. A resistência das folhas mais velhas da base dos ramos parece estar relacionada com um aumento de atividade enzimática, especialmente da POX (KorteKamp e Zyprian, 2003).

A importância das polifenoloxidasas (PPOs) (EC 1.14.18.1 ou EC 1.10.3.2) na resistência a doenças consiste na propriedade de oxidar compostos fenólicos a quinonas, as quais são frequentemente mais tóxicas aos microrganismos que os fenóis originais. Um aumento na atividade dessas enzimas resulta em altas concentrações de produtos tóxicos e, portanto, em níveis maiores de resistência a infecções (Agrios, 1997). No reino vegetal, as PPOs localizam-se predominantemente nas membranas dos tilacóides dos plastídeos (Gandia-Herrero *et al.*, 2005). A ação dessas enzimas ocorre somente quando há descompartimentalização, após ferimentos ou ataque de insetos, sendo que as quinonas são altamente reativas, podendo reagir entre si ou entre outras substâncias do tecido lesado, formando compostos marrons ou escuros (Mazzafera e Robinson, 2000). Esses pigmentos marrons resultam de reações de polimerização e condensações entre proteínas e polifenóis (González *et al.*, 1999).

2. Hipótese

As respostas de defesa bioquímica presentes em *S. tuberosum* cv. Ágata podem variar conforme a espécie de bactéria fitopatogênica e a idade foliar, indicando a ocorrência de susceptibilidade ou de resistência do vegetal.

3. Objetivos

Objetivo geral

- Analisar os mecanismos de defesa bioquímica de *Solanum tuberosum* L. cv. Ágata em resposta a bactérias fitopatogênicas.

Objetivos específicos

- Analisar as respostas de hipersensibilidade, modificações nos níveis de compostos fenólicos e flavonóides e as atividades das enzimas polifenoloxidasas e peroxidases em plantas de *S. tuberosum* inoculadas com as bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.
- Avaliar as respostas de defesa de *S. tuberosum* em diferentes interações planta-patógeno;
- Comparar as respostas de defesa em diferentes estágios de desenvolvimento foliar.

4. Referências bibliográficas

- Agrios, G.N. How plants defend themselves against pathogens. **Plant Pathology**, 4th ed., Academic Press, San Diego, 1997, 635 p.
- Arnaldos, T. L.; Muñoz R.; Ferrer, M. A.; Calderón, A. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.
- Bisognin, D. A. M. **Melhoramento da Batata para Resistência a Doenças**. In: O Cultivo da Batata na Região Sul do Brasil. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Distrito Federal, 2003, p. 69-79.
- Boudet, A. M.; Lapierre, C.; Grima-Pettenati, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **The New Phytologist**, v. 129, p.203-236, 1995.
- Boudet, A. M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 81-96, 2000.
- Bringel, J. M. M. Caracterização Bioquímica, Patogênica e Molecular de Isolados de *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 de Batata e Berinjela, 2002. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração: Fitopatologia. Piracicaba – São Paulo.
- Buchanan, B.B; Grissem, W.; Jones, R.L. Biosynthesis of Hormones and Elicitor Molecules. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Rockville, Maryland, 2000, p. 1367.
- Camacho-Cristóbal, J. J.; Anzellotti, D.; González-Fontes, A. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 997-1002, 2002.
- Coventry, H. S.; Dubery, I. A. Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p. 149-158, 2001.
- De Ascensao, A. R. F. D. C.; Dubery, I. A. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 679-686, 2003.
- Delannoy, E.; Lyon, B. R.; Marmey, P.; Jalloul, A.; Daniel, J. F.; Montillet, J. L.; Essenberg, M.; Nicole, M.; Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.63-82; 2005.
- Di Piero, R. M.; Kuhn, O. J.; Pascholati, S. F. **Indução de Resistência e a Produtividade de Culturas**. In: Cavalcanti, L. S. et al. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos, Piracicaba, Fealq, 2005, cap. 12, p. 239-255.
- Dixon, R. A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.S. and Wang, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 371-390, 2002.

- Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p. 1085-1087, 1995.
- Doke, N. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. **Physiological Plant Pathology**, v. 23, p. 359-367, 1983.
- Flor, H. H. Host-parasite interaction in *Flax Rust* – Its genetics and other implications. **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1955.
- Fortes, G. R. L.; Pereira, J. E. S. **Classificação e Descrição Botânica**. In: O Cultivo da Batata na Região Sul do Brasil. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Distrito Federal, 2003, p. 69-79.
- Fritig, B.; Heitz, T.; Legrand M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 16-22, 1998.
- Gaffney, T.; Friedrich, L.; Vernooij, B.; Negretto, D.; Nye, G.; Uknes, S.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v. 261, p. 754-756, 1993.
- Gandia-Herrero, F.; Jiménez-Atiénzar, M.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J. Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6825-6830, 2005.
- González, E. M.; Ancos, B.; Cano, M. P. Partial characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4068-4072, 1999.
- Grube, R.C.; Radwanski, R. R.; Jahn, M. Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. **Genetics**, v. 155, p. 873-887, 2000.
- Guzzo, S.D. Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Resistência Sistêmica Adquirida em Cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*, 2004. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura para obtenção do título de Doutor em Ciências na Universidade de São Paulo.
- Hahn, M. G.; Albersheim, P. Host-pathogen interactions-XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Pathology**, v. 62, p. 107-111, 1978.
- Hahn, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Phytopathology**, v. 34, p. 387-412, 1996.
- Halim, V. A.; Hunger, A.; Macioszek, V.; Landgraf, P.; Nürnberger, T.; Scheel, D.; Rosahl, S.; The oligopeptide elicitor PEP-13 induces salicylic acid-dependent and-independent defense reactions in potato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 311-318, 2004.
- Hammerschmidt, R; Kuc, J. **Induced Resistance to Disease in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995, 182 p.

- Hammerschmidt, R.; Métraux, J.P.; van Loon, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced to plant diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p.1-6, 2001.
- Harborne, J. B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 335-367, 1999.
- Hayward, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v.29, p. 65-87, 1991.
- Hayward, A. C. *Pseudomonas solanacearum*. In: Singh, U.S.; Singh, R. P.; Kohmoto, K. (Ed.). Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Genetic and Molecular bases. Oxford: Pergamon, v. 1 Prokariotes, 1995, p. 139-151.
- Herbers, K.; Meuwly, P.; Frommer, W. B.; Métraux, J-P.; Sonnewald, V. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. **The Plant Cell**, v. 8, p. 793-803, 1996.
- Hutcheson, S.W. Current concepts of active defenses in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 59-90, 1998.
- Jacobs, A. K., Dry, I. B.; Robinson, S. P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with Etefon. **Plant Pathology**, v. 48, p. 325-336, 1999.
- Joly, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. Editora Nacional, 11. ed. São Paulo,1993, p. 777.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachussets, USA, 2002, p. 576.
- Kaloshian, I. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 12, p. 2419-2438, 2004.
- Karrer, E.E.; Beachy, R.N.; Holt C.A. Cloning tobacco genes that elicit the hypersensitive response. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 681-690, 1998.
- Koch, W.; Wagner, C.; Seitz, U. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. **Planta**, v. 206, p. 523-532, 1998.
- Koller, O. C.; Oliveira, R. B. L.; Nunes, D. S.; Dal Soglio, F. D.; Panzenhagen, N. V.; Sartori, I. A.; Manteze, F. Chemical control of *Citrus* canker in young plants managed in conventional and organic systems. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, 2006.
- KorteKamp, A.; Zyprian, E. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using *in vitro* plants. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p. 1393-1400, 2003.
- Landgraf, P.; Feussner, I.; Hunger, A.; Scheel, D.; Rosahl, S. Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 279-283, 2002.
- Lawton, K.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Delaney, T.; Kessmann, H.; Staub, T.; Ryals, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of

- systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal**, v. 10, p. 71-82, 1996.
- Leite, B.; Roncatto, L. D. B.; Pascholati, S. F.; Lambais, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 235-280, 1997.
- Léon, J.; Lawton, M.A.; Raskin I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1673-1678, 1995.
- Lopes, C. A. Doenças bacterianas da batata. **Informe Agropecuário**, v. 7, n. 76, p. 40-42, 1981.
- Lopes, C. A.; Henz, G. P. Podridões-moles das hortaliças causadas por bactérias. **Comunicado Técnico da Embrapa Hortaliças**, n.8, 1988.
- Lorenc-Kukula, K.; Jafra, S.; Oszmiński, I.; Szopa, J. Ectopic expression of anthocyanin 5-o-glucosyltransferase in potato tubers causes increased resistance to bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 272-281, 2005.
- Low, S. P.; Schoeder, A. T. **Signal transduction pathways of the oxidative burst**. In: Stacey, G.; Keen, N. Plant Microbe Interactions. New York: Chapman & Hall, cap. 3, p. 53-75, 1997.
- Mazzafera, P.; Robinson, S. P. Characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4068-4072, 1999.
- Medeiros, R.B.; Ferreira, M.A.S.V.; Dianese J.C. **Mecanismos de Agressão e Defesa nas Interações Planta-Patógeno**, Edições Universidade de Brasília (UNB), Brasília, 2003, p.289.
- Moraes, M. G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, v.6, p. 261-284, 1998.
- Motoyama, M.M.; Shwan-Estrada, K.R.F.; Stargalin, J.R.; Fiori A.C.G.; Scapim C.A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.25, n.2, p.509-512, 2003.
- Navarre, D. A.; Mayo, D. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 179-188, 2004.
- Nürnbergger, T.; Lipka, V. Non-host resistance in plants: new insight into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 3, p. 335-345, 2005.
- Oberhagemann, P.; Chatot-Balandras, C.; Schafer-Pregl, R.; Wegener, D.; Palomino, C.; Salamini, F.; Bonnel, E.; Gebhardt, C. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 399-415, 1999.
- Osborn, A.E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **Plant Cell**, v. 8, p. 1821-1831, 1996.

- Park, H-J.; Doke, N.; Miura, Y.; Kawakita, K.; Noritake, T.; Komatsubara, H. Induction of a sub-systemic oxidative burst by elicitor-stimulated local oxidative burst in potato plant tissues: a possible systemic signaling in systemic acquired resistance. **Plant Science**, v. 138, p. 197-208, 1998.
- Pechous, S. W. Purification and Characterization of Lipoxygenase Isozymes from Potato Tubers: Mechanistic aspects of Lipoxygenase in Disease resistance, 2001. A Thesis in Plant Physiology submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy at the Pennsylvania State University.
- Pellegrini, L.; Rohfritsch, O.; Fritig, B.; Legrand, M. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. **Plant Physiology**, v. 106, p. 877-886, 1994.
- Pereira, A. S. **Melhoramento Genético**. In: O Cultivo da Batata na Região Sul do Brasil. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Distrito Federal, 2003, p. 69-79.
- Poussiet, S.; Thoquet, P.; Trigalet-Demery, D.; Barthet, S.; Meyer, D.; Arlat, M.; Trigalet, A.; Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 991-1003, 2003.
- Rauscher, G. M.; Smart, C. D.; Simko, I.; Bonierbale, M.; Mayton, H.; Greenland, A.; Fry, W. E. Characterization and mapping of *R_{Pi-ber}*, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. **Theory Applied Genetics**, v.112, n. 4, p. 674-687, 2006.
- Resende, M.L.V.; Salgado, S.L.M.; Chaves, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.123-130, 2003.
- Ricci, P.; Panabieres, F.; Bonnet, P.; Maia, N.; Ponchet, M.; Devergne, J. C.; Marais, A.; Cardin, L.; Milat, M. L.; Blein, J. P. **Proteinaceous elicitors of plant defense responses. Oligosaccharide elicitors: Structure and recognition**. In: International Conference of European Foundation for Plant Pathology, 2, Strasbourg, 1993. Proceedings, Dordrecht: Kluwer Academic, 1993, p. 121-135.
- Rivas, S.; Thomas, C. M.; Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 395-436, 2005.
- Roda, A. L.; Oldhan, N. J.; Svatos A.; Paldwin, I. J. Allometric analysis of the induced flavonols on the leaf surface of wild tobacco (*Nicotiana attenuata*). **Phytochemistry**, v. 62, p. 527-536, 2003.
- Romeiro, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001, 279 p.
- Romeiro, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa , Viçosa, MG, 2005, 417 p.
- Ruiz, R. A. C.; Herrera, C.; Ghislain, M.; Gebhardt, C. Organization of phenylalanine ammonia lyase (PAL), acid *PR-5* and osmotin-like (OSM) defence-response gene families in potato genome. **Molecular Gen Genomics**, v. 274, p. 168-179, 2005.
- Ryals, J.; Uknes, S.; Ward, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1109-1112, 1994.

- Schilmiller, A. L.; Howe, G.A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 369-377, 2005.
- Siegrist, J.; Orober, M.; Buchenauer H. β -aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 95-106, 2000.
- Silva, E. C.; Giusto, A. B.; Sousa Dias, J. A. C. Production of potato minituber by sprouts grown in several substrate combinations. **Horticultura Brasileira**, n. 2, v. 24, 2006.
- Souza, V. C.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática**: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa, São Paulo, 2005, p. 640.
- Stargalin, J. R.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Cruz, M. E. S.; Nosaki, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 11, p. 16-21, 1999.
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.
- Taiz, L.; Zeiger E. **Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal**. In: Fisiologia Vegetal, Editora Artmed, Porto Alegre, 2004, p.719.
- Tiffin, P.; Moeller, D. A. Molecular evolution of plant immune system genes. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 12, 2006.
- Van Etten, H.D.; Mansfield, J.W.; Bauley, J.A.; Farmer, E.E. Two classes of plant antibiotics: “phytoalexins” versus “phytoanticipins”. **Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.
- Van Loon, L. C.; van Strein, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.
- Van Loon, L. c.; Geraats, B. P. J.; Linthorst, H. J. M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 184-191, 2006.
- Vardapetyan, H. R.; Kirakosyan, A. B.; Oganessian, A. A.; Penesyan, A. R.; Alfermann, W. A. Effect of various elicitors on lignan biosynthesis in callus cultures of *Linum austriacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 3, p. 297-300, 2003.
- Verpoort, R.; van der Heijden, R; ten Hoopen, H.J.G. and Memelink, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 467-479, 1999.
- Vleeshouwers, V. G. A. A.; van Dooijeweert, W.; Govers, F.; Kamoun, S.; Colon, L. T. Does Basal PR Gene Expression in *Solanum* Species contribute to non-Specific resistance to *Phytophthora infestans*? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35-42, 2000.
- Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.
- Wulff, N. A.; Pascholati, S. F. Partial Characterization of *Sorghum* phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 428-435, 1999.

- Yamamoto, C.; Kuchimura, K.; Kobayashi, A.; Katou, S.; Kawakita, K.; Jones, J. D. G.; Doke, N.; Yoshioka, H. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feed-back confers potato blight resistance. **Plant Physiology**, v. 140, p. 681-692, 2006.
- Yasuda, M.; Nishioka, H.; Nakashita, H.; Yamaguchi, I.; Yoshida, S. Pyrazolecarboxylic acid derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v. 67, n.12, p. 2614- 2620, 2003.
- Yoshioka, H.; Sugie, K.; Park, .J.; Maeda, H.; Kawakita, K. Induction of plant GP91 P Phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid and salicylic acid in potato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 725-736, 2001.
- Yu, D.; Liu, Y.; Fan, B.; Klessig, D. F.; Chen, Z. Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? **Plant Physiology**, v. 115, p. 343-349, 1997.
- Zeier, J. Age-dependent variations of local and systemic defense responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p. 30-39, 2005.

Article

Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to plant pathogenic bacteria

Vera Aparecida Dus Poiatti, Fernando Rostirolla Dalmas, Leandro Vieira Astarita

Laboratório de Biotecnologia Vegetal – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga 6681 prédio 12C sala 253 – Porto Alegre/RS – Brasil

Abstract

The natural resistance of plants to disease is based not only on preformed mechanisms, but also on induced mechanisms. The defense mechanisms present in resistant plants may also be found in susceptible ones. This study attempts to analyze phenolic compounds, including the flavonoid group and polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POX) activities in *Solanum tuberosum* cv. Agata, in response to inoculation of the incompatible plant pathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis* and *Ralstonia solanacearum*, and the compatible bacteria *Erwinia carotovora*. Bacteria compatibility was evaluated using tubers infiltration. Tubers infiltrated with *E. carotovora* suspensions exhibited disease symptoms. On the other hand, bacteria *R. solanacearum* and *X. axonopodis* did not induce disease. Leaf inoculation was performed depending on the number and location of the leaves on the stem. Multiple-leaf inoculation was performed on basal, intermediate and apical leaves and single inoculations on intermediate leaves. Leaves inoculated with bacterial suspensions of *X. axonopodis* and *R. solanacearum* showed hypersensitive response (HR) within 24 hpi, while leaves inoculated with *E. carotovora* showed disease symptoms. Therefore, the *R. solanacearum* isolate used in the experiments did not exhibit virulence to this potato cultivar. Regardless of the bacterial treatments, multiple-inoculated basal leaves presented higher PPO and POX activities and lower levels of total phenolic compounds and flavonoids, when compared to apical leaves. Basal and intermediate leaves inoculated with *R. solanacearum* and *X. axonopodis* showed an increase in total phenolic compounds and flavonoid levels. These increases were similar or higher than the levels observed in non-inoculated apical leaves. In general, multiple-leaf inoculations showed the highest levels of phenolic compounds and flavonoids, while the single inoculations presented the highest increase in PPO activity. However, with POX activities there were no significant differences between single and multiple-leaf inoculations. In the present study, the plant defense metabolism in this potato cultivar was stimulated by incompatible bacteria, indicating their potential use as inducers for further plant defense against any subsequent attack by compatible pathogens.

Key words: hypersensitive response, phenolic compounds, flavonoids, polyphenol oxidases, peroxidases.

1. Introduction

The natural resistance of plants to disease is based not only on preformed mechanisms, but also on induced mechanisms. The preformed defense is represented by constitutive compounds, such as phytoanticipins (Van Etten *et al.*, 1994), while induced mechanisms may be represented by compounds such as phytoalexins, which are synthesized *de novo* after recognition of invading pathogens (Nicholson and Hammerschmidt, 1992; Siegrist *et al.*, 2000). The induced mechanisms are associated with local changes at the site of pathogen infection, such as hypersensitive response (HR), which represents one of the most efficient forms of plant defense (Fritig *et al.*, 1998; Kortekamp and Zyprian, 2003). HR is characterized by cell death at the site of infection and necrotic lesion formation following inoculation with avirulent fungal, bacterial or viral pathogens (Herbers *et al.*, 1996; Lamb and Dixon, 1997; Karrer *et al.*, 1998; Kaloshian, 2004; González *et al.*, 2006). Moreover, the HR induced by bacterial attack exhibits tissue dehydration, which might cause a decrease in growth or long-term survival within the plant tissue (Greenberg, 1997). This response can lead not only to the accumulation of antimicrobial compounds, such as phenolic compounds and phytoalexins, but also to an increase in enzyme activity, such as peroxidases (Kortekamp and Zyprian, 2003) and polyphenol oxidases (Agrios, 1997).

Phenolic compounds represent an important group of secondary metabolites, widely distributed in plants (Arnaldos, 2001), which participate in resistance to pathogens due to their antimicrobial activity (Sudhakar *et al.*, 2007). These compounds can be represented by pterocarpan (glyceollin), flavonols (quercetin), isoflavons, coumarins, furanocoumarins and others (Dixon and Paiva, 1995; Harbone, 1999). Phenylpropanoid compounds are essential to the resistance to *Cochliobolus heterostrophus* in maize plants harboring the *rhm* gene (Nicholson and Hammerschmidt, 1992). Similarly, maize and sorghum plants resistant to *Peronospora sorghi* present quantitative and qualitative differences in their phenolic constituents (Anwar, 1995) and *Theobroma cacao* plants with high levels of these compounds are resistant to *Crinipellis pernicioso* (Nojosa *et al.*, 2003). The resistance of *Arabidopsis* leaves in response to attack by pathogens such as *Pseudomonas syringae* and *Pythium sylvaticum* is related to the presence of the aromatic compound camalexin (Bednarek *et al.*, 2005). In the same way, catechin synthesis in strawberry plant leaves, in response to inoculation with a non-pathogen isolate of *Alternaria*

alternata, is able to inhibit hyphae penetration of the virulent pathogen and the consequent occurrence of symptoms of the disease (Yamamoto *et al.*, 2000).

Flavonoids are the largest class of phenolics and show antimicrobial and antioxidant properties (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005). Isoflavans and isoflavanones are the best characterized phenylpropanoid derived phytoalexins (Dixon *et al.*, 2002). Compounds such as prenilats isoflavonoids, coumarins, 3-deoxyanthocyanidins and flavonols are also phytoalexins produced in plants after pathogen attack (Dixon and Paiva, 1995). Most of the known legume phytoalexins are isoflavonoids, and the most common compounds are the isoflavanone kievitone, the isoflavan vestitol and the pterocarpans (Harborne, 1999). The phytoalexins 3-deoxyanthocyanidins in *Sorghum* sp. (Field *et al.*, 2006) and sakuranetin and naringenin in rice (*Oryza sativa* L.) (Jwa *et al.*, 2006), are produced from the flavonoid pathway after pathogen attack. The inducible accumulation of pterocarpans phytoalexins, the glyceollins, in *Glycine max* is one of the major defense mechanisms implicated in providing resistance against attempted infection by *Phytophthora sojae* [Kauf. and Gerde.] (Abbasi and Graham, 2001).

The polyphenol oxidase enzymes (PPOs) (EC 1.14.18.1 or EC 1.10.3.2) are widely distributed within the plant and act as oxygen scavengers and in the defense against stress (Ali *et al.*, 2006). The induction of PPO F in tomato in susceptible responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Alternaria solani* implicates PPO in disease resistance (Thipyapong and Steffens, 1997). The over-expression of PPO in tomato leads to significantly increased resistance to *P. syringae* pv. tomato in compatible interactions (Li and Steffens, 2002). PPO activity is induced to even higher levels in chickpea leaves (*Cicer arietinum* L.) after inoculation with *Ascochyta rabei* (Khirbat and Jalali, 1998), and in regions distal from lesions implying that PPO may also contribute to the hypersensitive response. Polyphenol oxidases act in disease resistance by hydroxylizing monophenols to *o*-diphenols and oxidizing these compounds to quinones that are frequently more toxic to the microorganisms than the original phenolic compounds (Mazzafera and Robinson, 2000; Gandia-Herrero *et al.*, 2005). Quinones are highly reactive intermediate whose secondary reactions are responsible for much of the oxidative browning that accompanies plant senescence, wounding and response to pathogens (Thipyapong *et al.*, 2004). The peroxidase enzymes (POX) (EC 1.11.1.7) are related to vegetable defense through the lignin synthesis, covalent insolubilization of hydroxyproline rich proteins and the cross-linking of the ester of ferulic and *p*-coumaric acids, increasing the cell wall resistance and

interfering in the growth and development of the pathogen (Bradley *et al.*, 1992; Agrios, 1997; Kortekamp and Zyprian, 2003; Ascensao and Dubery, 2006). Plant peroxidases (class III peroxidases) are involved in a broad range of physiological processes all along the plant life cycle. These multifunctional enzymes can build a rigid cell wall or produce ROS to make it more flexible; they can prevent biological and chemical attacks by raising physical barriers or by counterattacking with a large production of ROS. In their regular catalytic cycle, peroxidases catalyse the reduction of H₂O₂ by taking electrons to various donor molecules such as phenolic compounds and auxins (Passardi *et al.*, 2005).

Nicholson and Hammerschmidt (1992) observed that the lignification induced in cucumber by the POX activity, constituted one of the most important defense responses in systemic acquired resistance. In grapevine, further inducible barriers beside the HR are formed at the infection site to prevent the *Plasmopara viticola* fungus from intruding into neighbouring tissues. Several cell-wall bound enzymes, like peroxidases, have been shown to contribute to the reinforcement of the cell wall. In resistant varieties, there is not only a higher basal activity of these enzymes, but also a rapid increase in enzyme activity within 24 hours post-inoculation, when compared to susceptible ones (KorteKamp and Zyprian, 2003). In cotton infected with *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* the increase in total POX activity during HR was associated with anionic isoforms and in transcriptional activities of class III POX genes (Dellano *et al.*, 2004).

The aim of this study was to analyze the defense mechanisms in *Solanum tuberosum* in response to plant bacterial pathogens. The occurrence of hypersensitive response and changes in the levels of total phenolic compounds and flavonoids were analyzed together with polyphenol oxidases and peroxidases activities.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Seeds of *Solanum tuberosum* cv. Agata were provided by potato growers (São Francisco de Paula, RS). Plants were grown in pots with organic soil in a greenhouse. Seven to ten-week-old plants exhibiting 12-14 leaves were used for experiments. Leaves were numbered according to their time of appearance. Leaves located at the base of the stem were numbered 1 to 4, intermediate leaves were numbered 5 to 8 and apical leaves were numbered 9 to 12.

2.2 Plant pathogens

Cultures of phyto-bacteria were provided by Dr. Valmir Duarte (Laboratory of Phytopathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Ralstonia solanacearum* race 1 (biovar 1) were grown in liquid LB medium at 28 °C for 48h with shaking. The cultures were centrifuged (Falcon tubes) at 1,250g for 10min at 10 °C. The supernatants were discarded, and the pellets were re-suspended in 3 mL of sterile distilled water. The bacteria were washed three times. In the final step, the pellet was re-suspended in 3 mL of sterile distilled water and the bacterial concentration was adjusted to $10^8 - 10^9$ cfu/mL ($OD_{600} = 0.3-0.4$) (Romeiro, 2001). The suspensions were immediately used for inoculation of leaves and potato tubers.

2.3 Tuber infection

Tubers were infected in order to evaluate the bacterial compatibility/incompatibility. Potato tubers were washed and immersed in sodium hypochloride 0.5% active chloro for 15min and rinsed in sterile water three times. Bacterial suspensions were inserted with sterile toothpicks into the tubers parenchyma to the depth of about 5 mm. Three series of five tubers were used for each kind of bacteria and control infiltrations were performed with sterile distilled water. The tubers were incubated at 25 °C inside sterile Magenta boxes. They were sliced horizontally 48 hours and 30 days after inoculation and the visible defense reactions or the disease symptoms were analyzed.

2.4 Leaf infection

Experiments consisted of multiple and single inoculations, which were performed depending on the number of leaves and their location on the stems. Multiple inoculation in each plant consisted of inoculation of bacterial suspensions in four leaves located at the stem base, four leaves at the intermediate level and four leaves at apical positions. Single inoculation comprised only of inoculation in four leaves located at the intermediate position of the stems.

About 20-25 μL of the bacterial suspensions were inoculated on the abaxial surface of leaflets using a 300 μL syringe without a needle (Zeier, 2005). Inoculations were performed by infiltration of the suspensions at two points between veins of the terminal leaflets. Plants infiltrated with sterile distilled water were used as control. In all experiments, before and after infiltration, plants were incubated for 48h at room temperature and high relative humidity (80%) (Romeiro, 2001). The experiments employing multiple and single inoculations were replicated three and nine times, respectively.

2.5 Enzyme activities

Leaf samples (0.5 g) were ground in 5 mL of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), containing 1% Triton X-100 (v/v) and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (1:6 w/v). Extracts were filtered and centrifuged at 2,500g for 15min at 5 °C, and the supernatants were used for enzyme assays. Polyphenol oxidase activity was determined spectrophotometrically using chlorogenic acid as substrate at 400 nm. The enzyme activity unit was defined as the change in absorbance. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{protein}$ (González et al., 1999). Peroxidase activity was determined spectrophotometrically by the oxidation of guaiacol at 420 nm. The reaction mixture contained 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.1M guaiacol as substrate and 10 mM hydrogen peroxide. The enzyme activity unit was expressed in $\text{mkatal}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}\text{protein}$, (symbol: kat) corresponding to the quantity of enzyme activity that transform 1 $\text{mol}.\text{s}^{-1}$ of substrate (Randhir et al., 2002). Protein was determined according to Bradford (1976), with bovine serum albumin as a standard.

2.6 Phenolic compounds and quercetin flavonoids

Leaf samples (0.5 g) were ground in 10 mL of 80% methanol (1:20m/v). The extracts were filtered and centrifuged at 1,250g for 15min at 15 °C. Phenolic compounds were assessed by the colorimetric technique using Folin-Ciocalteu reagents (ImprintSul Ltda) and 20% Na_2CO_3 .

Absorbancy (765 nm) was determined after 30min incubation at 25 °C in the dark (Arnaldos *et al.*, 2001). Gallic acid was used as standard. Levels of the quercetin flavonoid were determined spectrophotometrically at 415 nm, using the reaction with 96% alcohol, 10% aluminum nitrate and 1 M potassium acetate (Mattos, 2000). Quercetin was used as standard.

2.7 Chlorophyll levels in leaves

Leaves (0.2 g) were ground in 20 mL 80% acetone and 100 mg CaCO₃. Extracts were used to determine the chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll levels. Absorbancy for chlorophyll a (663 nm), for chlorophyll b (645 nm) and for total chlorophyll (652 nm) was determined in a spectrophotometer and their concentrations were calculated as described by (Whitham *et al.*, 1971).

2.8 Statistics

Mean values are shown for phenolic, flavonoids, chlorophyll contents and enzyme activities. Data were analyzed using one-way ANOVA and multivariate general linear model procedures. Differences between means were separated by Tukey *post-hoc* test, with the significance level of $p \leq 0.05$ (software SPSS version 11.5). When necessary, data were transformed by $\sqrt{x+0.5}$, in order to obtain homogeneity of variance.

3. Results and Discussion

3.1. Compatible and incompatible plant responses

Tubers infiltrated with suspensions of *Erwinia carotovora* exhibited visible disease symptoms up to 48 hpi (hours post-inoculation). The disease spread rapidly and was well characterized by darkness and soft rot, indicating the susceptibility of the Agata cultivar. According to Romeiro (2005), these bacteria produce pectinases that cause degradation of the pectin present in the middle layer of the cell wall, affecting reserve organs such tubers, bulbs and fruits.

Tubers inoculated with *Ralstonia solanacearum* showed brown spots (characterizing cellular death), but they did not develop disease. The absence of disease symptoms and the occurrence of HR indicate the resistance of Agata cultivar to the bacterial isolate. Therefore, the *R. solanacearum* isolate used in the experiments did not exhibit virulence to this potato cultivar. Kelman (1954) comments that the virulence in *R. solanacearum* isolates depends on the growing conditions and that there are morphological differences between the kinds of colonies and the virulence levels on a tetrazolium chloride medium. *R. solanacearum* may undergo a spontaneous phenotypic conversion from a wild-type pathogenic to a non-pathogenic form. This phenomenon is often associated with mutation in *phcA*, which is a key virulence regulatory gene and represents an alternative adaptative strategy, which provides some degree of diversity (Poussier *et al.*, 2003). Thus, this pathogen exhibits great variation and most of the isolates easily lose pathogenicity in growth medium, which may be correlated with the variation of the colony (Kelman and Sequeira, 1965). In this case, the defense responses observed in this cultivar may be related to the growth conditions of the pathogen. The virulence levels are related to the presence and to the quantity of extracellular mucopolysaccharide (EPS), the main component of the bacterial capsule (Stanier *et al.*, 1986). Sequeira and Graham (1977) inoculated tobacco plants with capsuled and non-capsuled isolates of the pathogen. They observed that the virulent isolate brought on the disease and the avirulent one brought on a local hypersensitive reaction. On the other hand, some sources of resistance to bacterial wilt have been found in several host plants, including potato (Lopes and Quezado-Soares, 1994), though varieties showing high resistance in a particular location may not survive in other environmental conditions or after infected by other strains of the pathogen (Kelman *et al.* 1994).

On the other hand, tubers inoculated with suspensions of *X. axonopodis* did not exhibit any HR signal nor disease symptom in inoculated sites, confirming that potato is a non-host plant, as this species represents a *Citrus* pathogen. Similarly, control treatments did not present any defense signals after inoculations (data not shown – Anexos).

Single and multiple inoculations of leaves with bacterial suspensions of *X. axonopodis* and *R. solanacearum* led to hypersensitive response (HR) at 24 hpi (Fig. 1), and leaves inoculated with *Erwinia carotovora* showed disease symptoms (Fig. 2). HR is characterised by necrosis at the site of the infection (Herbers *et al.*, 1996; Karrer *et al.*, 1998; Kaloshian, 2004; González *et al.*, 2006), with drying of the affected area and impaired growth of the pathogens (Greenberg, 1997; Zeier, 2005). Cell death in HR is related to the process of oxidative burst that occurs following recognition of the pathogen, due to the production of reactive oxygen species (ROS), such as O_2^- and OH^\cdot and H_2O_2 , which lead to the defense responses (Léon *et al.*, 1995; Resende *et al.*, 2003). Thus, HR occurs in interactions where there is incompatibility between the pathogens (avirulents) and the host plant and interactions between the pathogens and non-host plants (Goodman and Novacky, 1994; Herbers *et al.*, 1996; Fritig *et al.*, 1998; Romeiro, 2001).

The inoculation of the avirulent bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicula* into *Solanum tuberosum* leaves led to the development of necrosis and systemic activation of the defense genes (Landgraf *et al.*, 2002). The HR seen on the leaves of the Agata cultivar was accompanied by biochemical defense responses, depending on the type of experiment performed, that is, whether the inoculation was single or multiple, as well as each plant-pathogen interaction.

The visible defense responses characterized by local necrosis may be followed by biochemical changes in cells surrounding necrotic lesions, the zone of localized acquired resistance (Fritig *et al.*, 1998), which lead to *de novo* synthesis of compounds, such as phytoalexins (Nicholson and Hammerschmidt, 1992). Moreover, accumulation of phenolic compounds and their oxidation by increased PPO and POX enzyme activities are also related to plant defense (Agrios, 1997; Ascensao and Dubery, 2003; González *et al.*, 2006).

3.2 Multiple inoculations (basal, intermediate and apical leaves)

The mechanical lesion (control treatments) caused by the inoculation process on the leaf tissue, provoked changes in the PPO activity. Independently of the leaf age, PPO activity was characterized by significant differences between evaluated treatments. There was a significant increase in PPO activity when the bacteria *R. solanacearum* and *E. carotovora* (96 hpi) were inoculated, while there was a significant increase in POX activity with *R. solanacearum* (48 and 96 hpi) and with *E. carotovora* (48 hpi) (Table 1). However, basal leaves did not show a significant increase in PPO and POX activities after bacterial inoculation. It could be explained by the highest constitutive levels of these enzymes, when compared to intermediate and apical leaves.

On the other hand, there was a significant increase in the levels of phenolic compounds on the leaves inoculated with the bacteria *X. axonopodis* and *R. solanacearum*, while the highest flavonoid levels were found with *R. solanacearum*. These responses were more accentuated at 96 hpi in both bacteria, independently of the leaf age (Fig. 3 A, B). Leaves inoculated with *E. carotovora* presented the lowest levels of phenolic compounds.

Independently of the treatments used, when leaf age is taken into consideration, the plants from the Agata cultivar had the same response pattern, in which the apical leaves (the youngest), had significantly higher levels of total phenolic compounds and flavonoids and lower levels of PPO and POX activities, when compared to the basal leaves (Table 2).

The suspensions with *R. solanacearum* and *X. axonopodis* produced an increase in the levels of phenolics and flavonoids in all the inoculated leaves. Accordingly, the inoculation of the intermediate and basal leaves with incompatible bacteria led to an increase in the levels of phenolic compounds equivalent to, or greater than the constitutive levels found in the younger leaves of the non-inoculated plants.

These results indicated that the incompatible bacteria acted as inducers of the defense metabolism in this cultivar, suggesting the use of these pathogens in order to promote an increase in defense responses in potato, minimizing the effects of a later infection by compatible bacteria.

Phenolic concentration depends on the stage of leaf development (Lavola *et al.*, 1998). In general, young leaves contain higher amounts of phenolics which decrease with leaf maturation (Manetas, 2006). The production of the aromatic metabolite, phytoalexin camalexin, in *Arabidopsis*, is dependent on the leaf age and is accumulated in larger amounts in younger than in

older leaves (Zeier, 2005). During compatible or incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato and the oomycota *Pythium sylvaticum*, in *Arabidopsis*, (Bednarek *et al.*, 2005), young leaves accumulated about seven times more camalexin than old leaves.

On the other hand, the basal leaves showed greater PPO and POX enzyme activity. PPO clearly plays a role in the resistance of tomato to *P. syringae*. Plants possessing PPO downregulated by antisense expression show significantly higher susceptibility to this pathogen in both compatible and incompatible interactions (Thipyapong *et al.*, 2004). PPO activity is induced to even higher levels in leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) after inoculation with *Ascochyta rabei* (Khirbat and Jalali, 1998) and in regions distal from lesions, implying that this enzyme may also contribute to hypersensitive response.

Many hypotheses surround the possible function of PPOs in plants. Roles in the phenylpropanoid pathway (i.e., coumarate 3-hydroxylase), the Mehler reaction, electron cycling, oxygen regulation and plant defense have been proposed (Thipyapong *et al.*, 2004). It is interesting to note the association of PPO expression with programmed cell death. Thus, expression of PPO during senescence or wounding could be expected to promote cell death and to generate an environment that would discourage adventitious colonization by pathogens (Thipyapong *et al.*, 1997).

Heightened POX activity (48 hpi) in the basal leaves inoculated with compatible bacteria was insufficient to inhibit the development of the disease. Nevertheless, with multiple inoculations, independently of the leaf age, the increase in enzymatic activity in leaves inoculated with *E. carotovora* (48 hpi) was similar to those increases seen after inoculation with *R. solanacearum* at both times. Nicholson and Hammerschmidt (1992) noted that, in cucumber, lignification occurred by POX activity constituted one of the most important systemic acquired resistance defense responses. Kortekamp and Zyprian (2003) report that in grapevines resistant to the fungus *Plasmopara viticola*, there occurs a higher basal level or fast enhancement of peroxidase activity during the first 24 hpi, when compared to susceptible varieties. Furthermore, the resistance seen in relation to leaf age, where the older leaves from the base of the branches were more resistant, appears to be related to an increase in enzymatic activity, especially POX. This accumulation of POX at high levels in old leaves does not occur passively over time, but is instead regulated differentially in old versus young leaves by the plant (Barto and Cipollini, 2005).

Total peroxidase activity increased during *A. thaliana* leaf expansion as well as in the senescent tissues, with a stronger increase at the end of the leaf expansion (Abarca *et al.*, 2001). POX catalyzes the peroxidative degradation of indolylacetic acid and other growth regulators (Barz and Köster, 1981) and exhibits a cell wall cross-linking activity, promoting an increase in the resistance of cell walls, interfering against the pathogen attack (Agrios, 1997; Ascensao and Dubery, 2006). Leaf senescence is associated with cell wall stiffening and cross-linking. Moreover, plant peroxidases (class III) create a highly toxic environment by massively producing ROS (oxidative burst), which results in adverse growth conditions for microorganisms. Thus, these multifunctional enzymes can prevent biological and chemical attacks by raising physical barriers or by counterattacking with a large production of ROS (Passardi *et al.*, 2005).

When untreated leaves (intact leaves) were analyzed, the leaf soluble proteins and chlorophyll contents (Table 3), showed a lower concentration in basal leaves than in apical leaves. Low levels of proteins and chlorophyll in the leaves indicate a process of senescence. During senescence, leaf cells undergo drastic metabolic sequential degeneration of cellular structures, starting with the chloroplast (Gan and Amasino, 1997). Normally, leaf ontogeny includes an early phase of increasing photosynthetic rates when the leaf is actively expanding, a mature phase with maximal rates, and a senescence phase with declining photosynthetic rates (Miller *et al.*, 2000). Chlorophyll catabolism and protein and RNA degradation occur in parallel with the loss of photosynthetic activity in senescent chloroplasts (Himmelblau and Amasino, 2001). Declines in total protein concentrations with leaf age are often associated with degradation of rubisco, the predominant stromal protein (Hörtensteiner and Feller, 2002). The senescence process has also been associated with an increase in the oxidative stress, as revealed by hydrogen peroxide accumulation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities, such as superoxide dismutases, catalases, peroxidases and the ascorbate-glutathione cycle enzymes (Cabello *et al.*, 2006).

3.3 Single inoculation (intermediate leaves)

Treatments in intermediate leaves showed a significant increase in polyphenol oxidase activity when leaves were inoculated with *Ralstonia solanacearum* (96 hpi) and *Xanthomonas axonopodis* (48 and 96 hpi) (Fig. 4A), suggesting that PPO may represent a plant defense response against incompatible bacteria. The significant increase in peroxidase activity occurred

when leaves were inoculated with *Erwinia carotovora* (48 hpi) (Fig. 4 B). In the same way, with the multiple inoculations, the increase in POX activity failed to prevent the development of the disease, spreading from the inoculated sites of the intermediate leaves to the adjacent non-inoculated leaves. Therefore, independently of the type of inoculation used, the plants inoculated with *E. carotovora* were unable to offer defense capable of deterring the invasion of the pathogen, confirming the susceptibility of this potato cultivar to this pathogen.

The increase in the levels of total phenolic compounds and flavonoids were less significant when compared to those that occurred with multiple inoculations. The highest increase in flavonoids was observed when leaves were inoculated with *X. axonopodis* (48 and 96 hpi) (Table 4). Therefore, the highest levels of phenolic compounds and flavonoids were found with multiple inoculations treatments, while the highest PPO enzymatic activity was seen in the experiments consisting of a single inoculation (Table 5). Multiple inoculations with *R. solanacearum* and *X. axonopodis* (48 and 96 hpi) showed a significant increase in phenolic compounds and flavonoid levels, while the single inoculations with these bacteria led to an increase in PPO activity (Table 6). With regard the POX activity, there was no significant difference comparing the two types of treatments.

The data suggest that the defense responses, which vary in accordance with the type of treatment, may be related to systemic acquired resistance (SAR) mechanisms.

The defense mechanisms existing in resistant plants may be also found in susceptible ones. The difference between resistance and susceptibility depends on the cell autonomy and the timing and intensity of defense responses (Moraes, 1998). Thus, when these responses occur in a fast and coordinated manner (Yamamizo *et al.*, 2006), they result in resistance against pathogens.

Resistance or susceptibility in *S. tuberosum* cv. Agata led to defense responses that differed qualitatively and quantitatively, depending on leaf age, type of inoculation performed (single or multiple) and the plant-pathogen interaction. Therefore, the disease resistance mechanisms do not represent static responses, but, depend on external factors, as well as the physiological state and development of the plants (Zeier, 2005).

4. Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira (Laboratório de Biofísica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), Dr. Valmir Duarte (Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Dr. Sérgio F. Pascholati (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo). We also thank CAPES for the fellowship.

5. References

- Abarca, D.; Martin, M.; Sabater, B. Differential leaf stress responses in young and senescent plants. **Plant Physiology**, v. 113, p. 409-415, 2001.
- Abbasi, P.A. and Graham, T.L. Age-related regulation of induced isoflavonoid responses in soybean lines differing in inherent elicitation competency. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 143-152, 2001.
- Agrios, G.N. **How plants defend themselves against pathogens**. Plant Pathology, 4th ed., Academic Press, San Diego, 1997, 635 p.
- Anwar, M. N.; Majumder, S. K.; Shetty, H. S. Changes in phenolic acids in sorghum and maize leaves infected with *Peronoclespora sorghi*. **Indian Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 21-26, 1995.
- Arnaldos, T. L.; Muñoz R.; Ferrer, M. A.; Calderón, A. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 315-322, 2001.
- Barto, E. K.; Cipollini, D. Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*. **Oecologia**, v. 146, p. 169-178, 2005.
- Barz, W.; Köster, J.; **Turn over and degradation of secondary (natural) products**. In: The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise. New York: Academic Press, 1981, v. 7, p. 457-479.
- Berdnarek, P.; Schneider, B.; Svatos, A.; Oldham, N.J.; Hahlbrock, K. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1058-1070, 2005.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- Bradley, D. J.; Kjellbom, P.; Lamb, C. J. Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein – a novel, rapid defense response. **Cell**, v.70, p. 21-30, 1992.
- Cabello, P.; Agüera, E.; de la Haba, P. Metabolic changes during natural ageing in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves: expression and activity of glutamine synthetase isoforms are regulated differently during senescence. **Physiologia Plantarum**, v. 128, p. 175-185, 2006.
- De Ascensao, A. R. F. D. C.; Dubery, I. A. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 679-686, 2003.
- Dellano, E.; Marmey, P.; Penel, C.; Nicole, M. Les peroxidases végétales de classe III. **Acta Botanica Gallica**, p. 353-380, 2004.

- Dixon, R. A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.S. and Wang, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 371-390, 2002.
- Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p. 1085-1087, 1995.
- Field, B.; Jordan, F. and Osbourn, A. First encounters - deployment of defence-related natural products by plants. **The New Phytologist**, v. 172, p.193-207, 2006.
- Fritig, B.; Heitz, T.; Legrand M. Antimicrobial Proteins in Induced Plant Defense. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 16-22, 1998.
- Gandia-Herrero, F.; Jiménez-Atiénzar, M.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F.; Escribano, J. Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6825-6830, 2005.
- Gan, S.; Amasino, R. M. Making sense of senescence. **Plant Physiology**, v. 113, p. 313-319, 1997.
- González, J.; Reyes, F.; Salas, C.; Santiago, M.; Codriansky, Y.; Coliheuque, N.; Silva, H. *Arabidopsis thaliana*: A model host plant to study plant-pathogen interaction using chilean field isolates of *Botrytis cinerea*. **Biological Research**, v.39, p. 221-228, 2006.
- Goodman, R. N.; Novacky, A. J. **The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon**. St. Paul-MN: APS Press, 1994, 244 p.
- Greenberg, J. T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 525-545, 1997.
- Harborne, J. B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 335-367, 1999.
- Herbers, K.; Meuwly, P.; Frommer, W. B.; Métraux, J-P.; Sonnewald, V. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. **The Plant Cell**, v. 8, p. 793-803, 1996.
- Himelblau, E.; Amasino, R. M. Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during senescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1317-1323, 2001.
- Hörtenstein, S.; Feller, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 927-937, 2002.
- Jwa, N.S.; Agrawal, G.K.; Tamogami, S.; Yonekura, M.; Han, O.; Iwahashi, H. and Rakwal, R. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 261-273, 2006.
- Kaloshian, I. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 12, p. 2419-2438, 2004.
- Karrer, E.E.; Beachy, R.N.; Holt C.A. Cloning tobacco genes that elicit the hypersensitive response. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 681-690, 1998.

- Kelman, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium chloride medium. **Phytopathology**, v.44, p. 693-695, 1954.
- Kelman, A.; Sequeira, L. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 55, p. 304-309, 1965.
- Kelman, A.; Hartman, G. L.; Hayward, D. C. **Introduction**. In: Hayward, A. C.; Hartman, G. L.; (Ed) Bacterial wilt: the disease and the causative agent *Pseudomonas solanacearum*. Willingford: CAB International, 1994, p. 1-7.
- Khirbat, S. K.; Jalali, B. L. Polyphenol oxidase and bound phenol content in leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) after inoculation with *Ascochyta rabei*. **Legume Research**, v. 21, p. 198-200, 1998.
- Kortekamp, A.; Zyprian, E. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using *in vitro* plants. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p. 1393-1400, 2003.
- Lamb, C.; Dixon, R. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p.251-275, 1997.
- Landgraf, P.; Feussner, I.; Hunger, A.; Scheel, D.; Rosahl, S. Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 279-283, 2002.
- Lavola, A.; Julkunen-Tiitto R.; Roininen, H. and Aphalo, P. 1998. Host-plant preference of an insect herbivore mediated by UV-B and CO₂ in relation to plant secondary metabolites. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p. 1-12, 1998.
- Léon, J.; Lawton, M.A.; Raskin I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1673-1678, 1995.
- Lopes, C. A.; Quezado-Soares, A. M. Evidence of the stability of the resistance of the potato cultivar Achat to bacterial wilt in Brazil. *Bacterial Wilt Newsletter*, p. 6-7, 1994.
- Lorenc-Kukula, K.; Jafra, S.; Oszmiński, I.; Szopa, J. Ectopic Expression of Anthocyanin 5-O-Glucosyltransferase in Potato Tubers Causes Increased Resistance to Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 272-281, 2005.
- Manetas, Y. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? **Flora**, v. 201, p. 163-177, 2006.
- Mattos, L. M. **Métodos de análises de flavonóides e antioxidantes de própolis**, 2000. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Mazzafera, P.; Robinson, S. P. Characterization of polyphenol oxidase activity in raspberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4068-4072, 1999.
- Miller, A.; Schlagnhauser, C.; Spalding, M.; Rodermeil, S. Carbohydrate regulation of leaf development: prolongation of leaf senescence in Rubisco antisense mutants of tobacco. **Photosynthesis Research**, v. 63, p. 1-8, 2000.
- Moraes, M. G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia Vegetal**, v.6, p. 261-284, 1998.

- Nicholson, R. L.; Hammerschmidt, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 369-389, 1992.
- Nojosa, G. B; Resende, M. L.; Aguilar, M. A.; Bezerra, K. M. T.; Anher, D. E. Phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible cocoa clones against *Crinipellis pernicios*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, 2003.
- Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army Knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 255-265, 2005.
- Randhir, R.; Shetty, P.; Shetty, K. L- Doppa and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1247-1256, 2002.
- Resende, M.L.V.; Salgado, S.L.M.; Chaves, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.123-130, 2003.
- Romeiro, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG Brasil, 2001, 279 p.
- Romeiro, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG Brasil, 2005, 417 p.
- Siegrist, J.; Orober, M.; Buchenauer H. β -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco mosaic virus depends on the accumulation of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 95-106, 2000.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L.; Painter, P. R. The Microbial World, 5th ed. New Jersey: Prentice Hall, 689 p., 1986.
- Sequeira, L.; Graham, T. L. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by the potato lectin. **Physiological Plant Pathology**, v.11, p. 43-53, 1977.
- Sudhakar, N.; Nagendra-Prasad, D.; Mohan, N. and Murugesan, K. Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against *Cucumber mosaic virus* by using ozone. **Journal of Virological Methods**, v. 139, p. 71-77, 2007.
- Thipyapong, P.; Joel, D. M.; Steffens, J. C. Differential Expression and Turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. **Plant Physiology**, v. 113, p. 707-718, 1997.
- Thipyapong, P.; Steffens, J. C. Tomato polyphenol oxidase: Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. **Plant Physiology**, v. 115, p. 409-418, 1997.
- Thipyapong, P.; Hunt, M. D.; Steffens, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, p. 105-117, 2004.
- Thurston, H. D. Relationship of general resistance: Late Blight of Potato. **Phytopathology**, v. 61, p. 620-626, 1971.
- Van Etten, H.D.; Mansfield, J.W.; Bauley, J.A.; Farmer, E.E. Two classes of plant antibiotics: “phytoalexins” versus “phytoanticipins”. **Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.

- Whitham, F. H.; Blaydes, D. F.; Devlin, R. M. **Experiments in Plant Physiology**. 1st ed., New York: D. van Nostrand Company, 1971, p. 55-58.
- Yamamizo, C.; Kuchimura, K.; Kobayashi, A.; Katou, S.; Kawakita, K.; Jones, J. D. G.; Doke, N.; Yoshioka, H. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feed-back confers potato blight resistance. **Plant Physiology**, v. 140, p. 681-692, 2006.
- Yamamoto, M.; Nakatsura, S.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S.; (+)- Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. **Phytopathology**, v. 90, n. 6, p. 595-600, 2000.
- Zeier, J. Age-dependent variations of local and systemic defense responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p. 30-39, 2005.

6. Figures

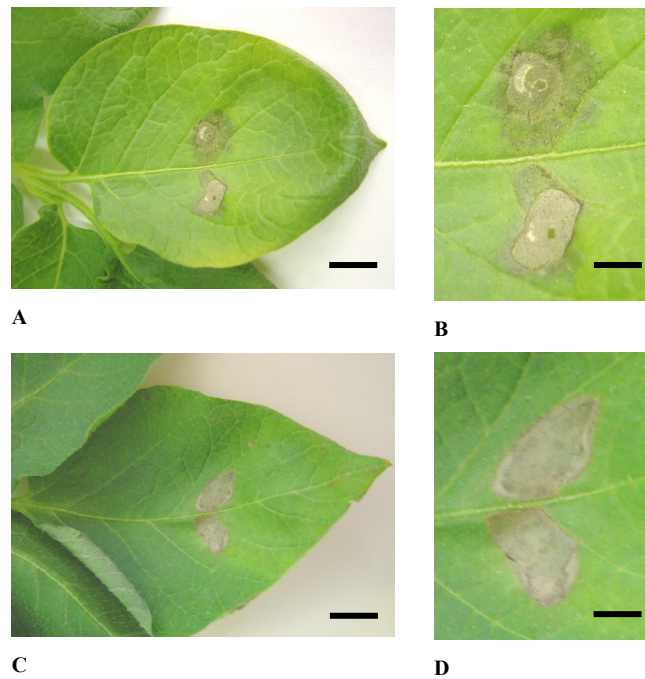


Figure 1. Hypersensitive response in the adaxial surface of the terminal leaflets of intermediate leaves infiltrated with bacterial suspensions. A, leaflet and B, detail of the leaflet infiltrated with *Xanthomonas axonopodis*; C, leaflet and D, detail of the leaflet infiltrated with *Ralstonia solanacearum*. Photographs were taken 96 hours post-inoculation. (Bars A and C represent 1 cm, Bars B and D represent 0.5 cm).

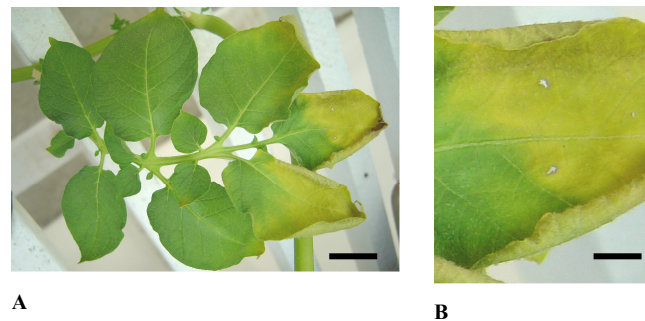


Figure 2. Disease symptoms in an intermediate leaf infiltrated with *Erwinia carotovora*. A, whole leaf; B, detail of the apical infiltrated leaflet. Photograph was taken 30 days post-inoculation. (Bar A represents 3 cm; Bar B represents 1.5 cm)

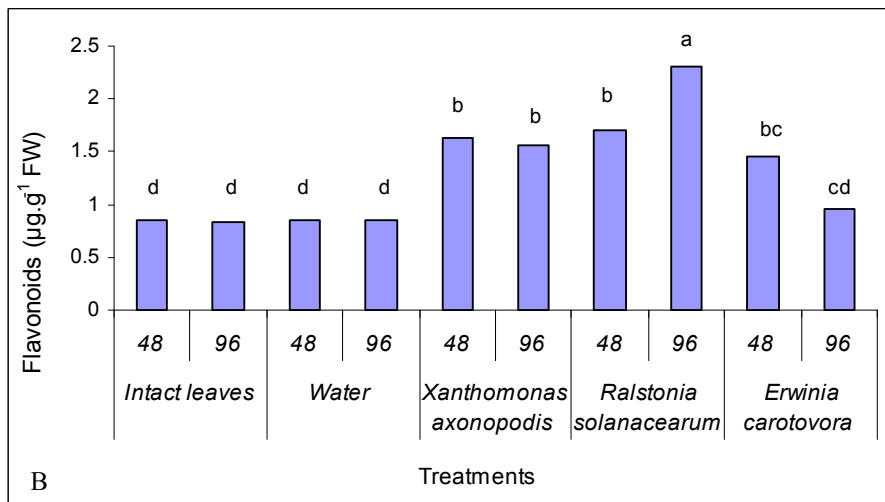
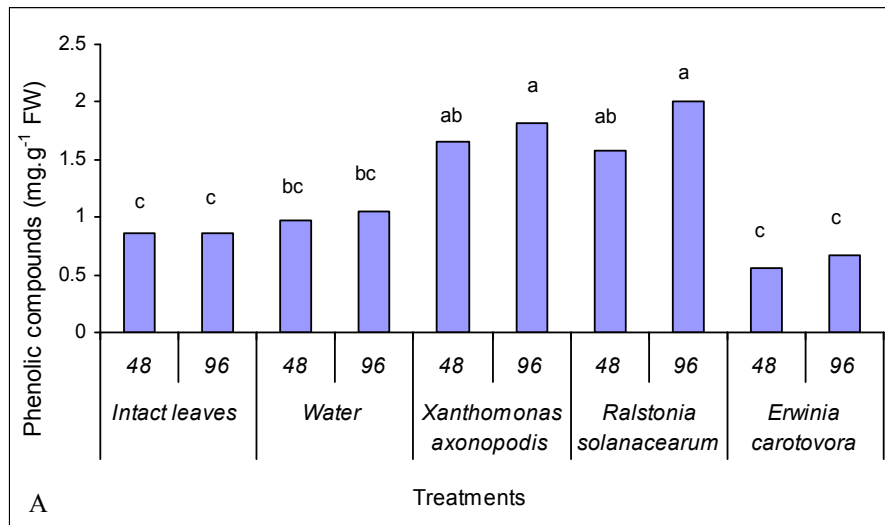


Figure 3. *S. tuberosum* leaves analyzed after multiple inoculation with bacterial suspensions (48 and 96 hpi - hours post-inoculation). A, Phenolic compounds and B, flavonoid contents. The different letters indicate means significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated three times with similar results.

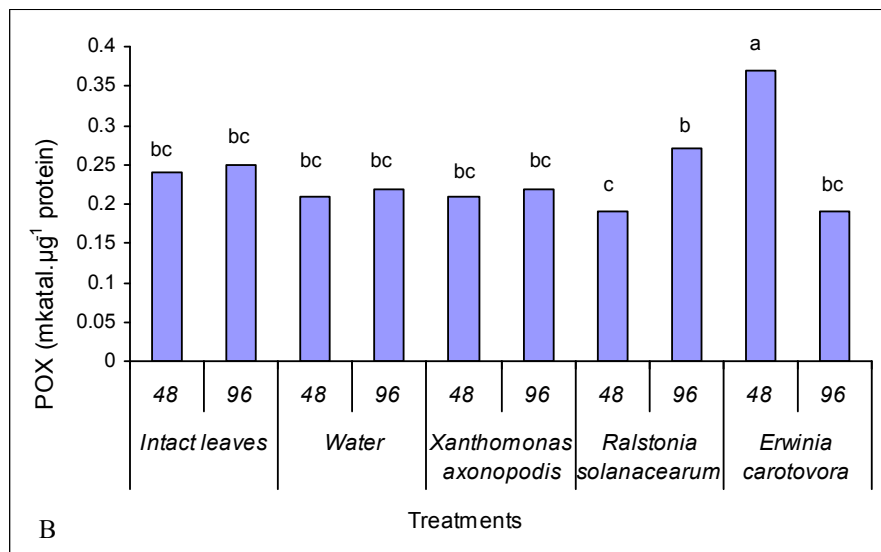
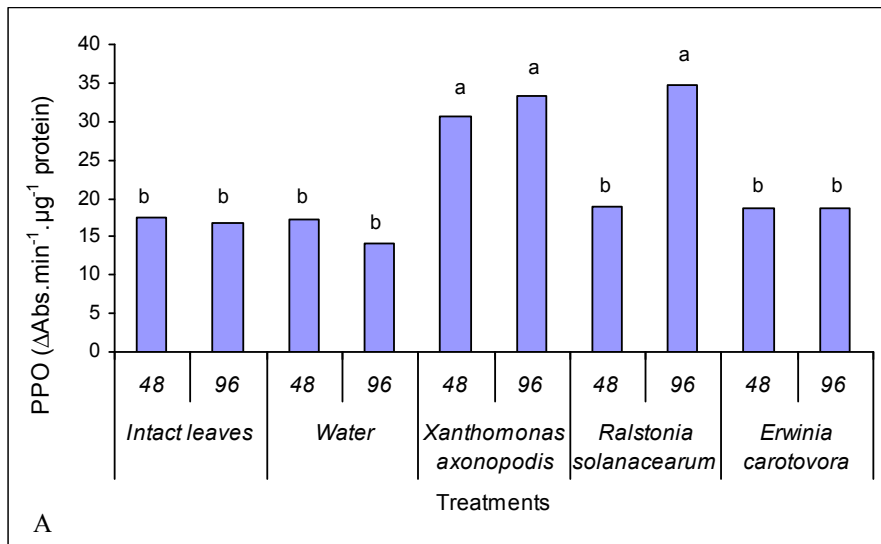


Figure 4. *S. tuberosum* leaves analyzed after single inoculation with bacterial suspensions (48 and 96 hpi - hours post-inoculation). A, Polyphenol oxidase and B, peroxidase activities. The different letters indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated nine times with similar results.

7. Tables

Table 1. *S. tuberosum* leaves analyzed after multiple inoculation. Polyphenol oxidases (PPO) and peroxidases (POX) activities analyzed after inoculation of bacterial suspensions. Enzyme assays were performed 48 hpi and 96 hpi. Different letters in columns indicate significant differences between means (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated three times with similar results. Hours post-inoculation (hpi).

Treatments	hpi	PPO	POX
		($\Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1} protein$)	($mkatal \cdot \mu g^{-1} protein$)
Intact leaves	48	19.59 ab	0.25 bcd
	96	18.06 bc	0.26 bcd
Water	48	17.33 bc	0.18 d
	96	10.75 d	0.20 cd
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	48	14.43 cd	0.22 bcd
	96	13.13 d	0.18 d
<i>Ralstonia solanacearum</i>	48	17.33 bc	0.30 ab
	96	22.75 a	0.37 a
<i>Erwinia carotovora</i>	48	21.48 ab	0.30 ab
	96	22.36 a	0.25 bcd

Table 2. *S. tuberosum* leaves were analyzed after multiple inoculation. Polyphenol oxidase and peroxidase activities, phenolic compounds and flavonoid levels analyzed at different leaf ages, independently of the treatments used. Means were a group independently of the time (48 or 96 hpi - hours post-inoculation). The different letters in columns indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated three times with similar results.

Leaf location	PPO <i>($\Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1} protein$)</i>	POX <i>($mkatal \cdot \mu g^{-1} protein$)</i>	Phenolics <i>($mg \cdot g^{-1} FW$)</i>	Flavonoids <i>($\mu g \cdot g^{-1} FW$)</i>
Basal	24.77 a	0.30 a	1.05 b	1.22 b
Intermediate	17.05 b	0.25 b	1.16 ab	1.25 ab
Apical	11.35 c	0.20 c	1.40 a	1.43 a

Table 3. *S. tuberosum* intact leaves analyzed at different leaf ages. Polyphenol oxidase and peroxidase activities, protein and chlorophyll levels were analyzed. Means were agroup independently of the time (48 or 96 hpi - hours post-inoculation). The different letters in columns indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated three times with similar results.

Leaf location	PPO <i>($\Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1} protein$)</i>	POX <i>($mkatal \cdot \mu g^{-1} protein$)</i>	Protein <i>($mg \cdot g^{-1} FW$)</i>	Total Chlorophyll <i>($mg \cdot g^{-1} FW$)</i>
Basal	24.47 a	0.31 a	1.8 c	11.72 c
Intermediate	16.84 b	0.25 b	2.32 b	16.01 b
Apical	10.89 c	0.21 c	2.87 a	19.43 a

Table 4. *S. tuberosum* leaves were analyzed after single inoculation. Phenolic compounds and flavonoids analyzed after inoculation with bacterial suspensions (48 and 96 hpi - hours post-inoculation). The different letters in columns indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated nine times with similar results.

Treatments	hpi	Phenolics (<i>mg .g⁻¹ FW</i>)	Flavonoids (<i>μg .g⁻¹ FW</i>)
Intact leaves	48	0.86 abc	0.8 cd
	96	0.75 c	0.8 cd
Water	48	0.88 abc	0.4 f
	96	0.77 bc	0.8 cd
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	48	0.87 abc	1.4 a
	96	1.08 abc	1.3 ab
<i>Ralstonia solanacearum</i>	48	1.13 ab	0.5 ef
	96	0.93 abc	1.0 bc
<i>Erwinia carotovora</i>	48	0.96 abc	0.7 de
	96	1.20 a	1.0 bc

Table 5. *S. tuberosum* leaves analyzed after multiple and single inoculations treatments. Polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POX), phenolic compounds and flavonoids were analyzed independently of bacterial treatment. The different letters in columns indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated three and nine times on multiple and single and inoculations, respectively, with similar results. Hours post-inoculation (hpi).

Inoculation	hpi	PPO ($\Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1} protein$)	Phenolic compounds ($mg \cdot g^{-1} FW$)	Flavonoids ($\mu g \cdot g^{-1} FW$)	POX ($mkatal \cdot \mu g^{-1} protein$)
Single	48	22.62 ab	0.99 b	0.83 b	0.25 a
	96	29.23 a	1.07 b	1.10 b	0.22 a
Multiple	48	16.70 b	1.20 ab	1.54 a	0.27 a
	96	19.64 b	1.49 a	1.59 a	0.28 a

Table 6. *S. tuberosum* leaves analyzed after multiple and single inoculations treatments. Polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POX), phenolic compounds and flavonoids were analyzed. The different letters in columns indicate significant differences (ANOVA, Tukey $p \leq 0.05$). Independent experiments were repeated three and nine times on multiple and single and inoculations, respectively, with similar results. Hours post-inoculation (hpi).

Inoculation	Hpi	Treatments	PPO ($\Delta Abs \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ protein)	Phenolic compounds ($mg \cdot g^{-1} FW$)	Flavonoids ($\mu g \cdot g^{-1} FW$)	POX ($mkatal \cdot \mu g^{-1}$ protein)
Single	48	Intact leaves	17.48 de	0.86 cde	0.78 efg	0.24 cd
		Water	17.24 de	0.87 cde	0.40 g	0.21 cd
		<i>Xanthomonas axonopodis</i>	30.70 abc	0.87 cde	1.40 bc	0.21 cd
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	19.035 de	1.13 bcde	0.45 g	0.19 d
		<i>Erwinia carotovora</i>	18.64 de	0.96 bcde	0.71 fg	0.37 ab
	96	Intact leaves	16.84 de	0.75 de	0.80 defg	0.25 bcd
		Water	14.15 de	0.77 de	0.77 efg	0.21 cd
		<i>Xanthomonas axonopodis</i>	33.28 ab	1.08 bcde	1.31 bcd	0.21 cd
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	34.61 a	0.93 bcde	0.98 cdef	0.27 bcd
		<i>Erwinia carotovora</i>	18.63 de	1.19 abcd	1.03 cdef	0.19 d
Multiple	48	Intact leaves	17.48 de	0.86 cde	0.78 efg	0.24 cd
		Water	18.03 de	0.92 bcde	0.75 fg	0.17 d
		<i>Xanthomonas axonopodis</i>	12.79 de	1.52 a	1.66 b	0.19 d
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	14.44 de	1.60 ab	1.68 b	0.29 abcd
		<i>Erwinia carotovora</i>	22.86 bcd	0.49 e	1.28 bcde	0.33 abc
	96	Intact leaves	16.84 de	0.75 de	0.80 defg	0.25 bcd
		Water	9.12 e	0.96 bcde	0.79 defg	0.19 d
		<i>Xanthomonas axonopodis</i>	13.90 de	1.83 a	1.72 b	0.21 cd
		<i>Ralstonia solanacearum</i>	22.13 cd	1.86 a	2.26 a	0.40 a
		<i>Erwinia carotovora</i>	22.87 bcd	0.77 de	0.79 defg	0.24 cd

Anexos

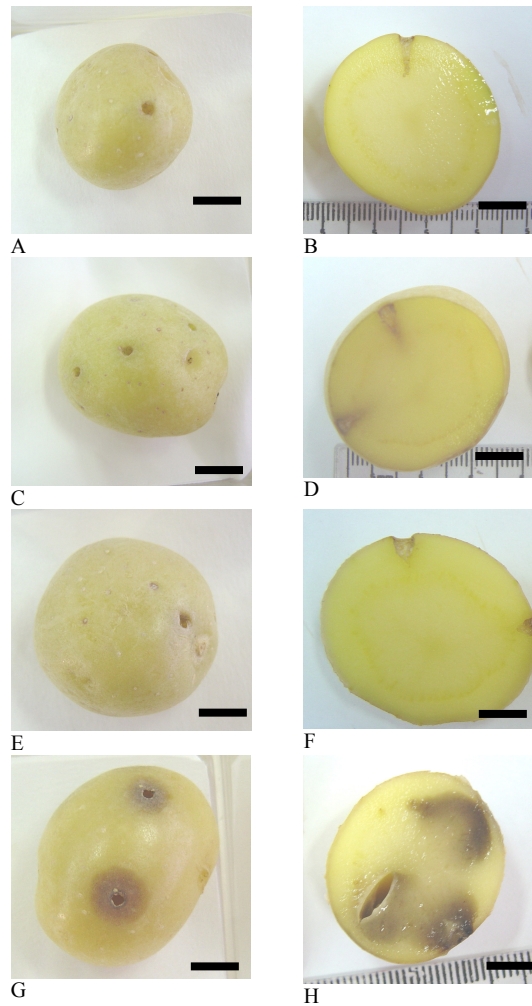


Figure 1. Tubers of *S. tuberosum* treated with different bacterial suspensions (48 hpi - hours post-inoculation). Whole tubers (left) and transverse slices (right). A-B, infiltrated with distilled water; C-D, infiltrated with *Ralstonia solanacearum*; E-F, infiltrated with *Xanthomonas axonopodis*; G-H, infiltrated with *Erwinia carotovora*. (Bars A, C-H represent 1cm; Bar B represents 0.5cm)

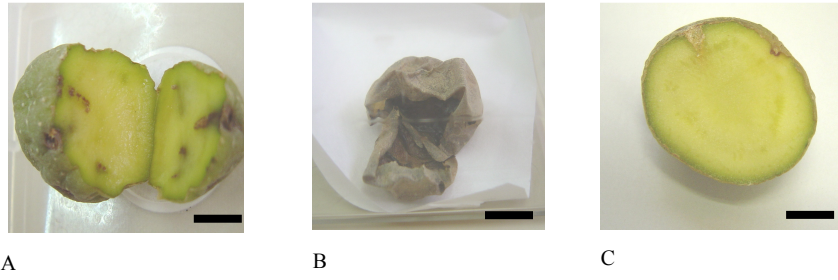


Figure 2. Tubers of *S. tuberosum* 30 days post-inoculation with *Ralstonia solanacearum* (A), *Erwinia carotovora* (B) and *Xanthomonas axonopodis* (C). (Bars represent 1cm).

Considerações finais

O presente estudo visou analisar as respostas de defesa em *S. tuberosum* a bactérias fitopatogênicas compatíveis e incompatíveis.

Considerando-se a ocorrência de HR, as respostas de defesa observadas nos tubérculos da cultivar Ágata evidenciaram a incompatibilidade tanto com *R. solanacearum* quanto com *X. axonopodis*. Porém, comparando-se as respostas dos tubérculos com as folhas inoculadas com *X. axonopodis*, houve expressivas diferenças. Nos tubérculos não ocorreu reação visível de defesa com esta bactéria, enquanto que nas folhas, se observou formação de HR. As diferenças nas respostas visíveis de defesa entre tubérculos e folhas podem ser explicadas através da síntese e do acúmulo de compostos provenientes do metabolismo secundário, variando conforme o tecido e o órgão considerado.

Nas inoculações com *E. carotovora*, tanto os tubérculos quanto as folhas apresentaram sintomas de doença (podridão-mole, clorose e murcha), indicando a susceptibilidade desta cultivar de batata.

A HR nas folhas foi acompanhada de respostas bioquímicas de defesa, dependendo do tipo de experimento realizado, considerando-se a inoculação simples ou múltipla e a interação planta-patógeno.

Independentemente dos experimentos realizados, as folhas apresentaram sempre um mesmo padrão de respostas, onde as folhas apicais apresentaram níveis constitutivos mais elevados de compostos fenólicos e flavonóides quando comparadas com as folhas basais. Dentre as bactérias utilizadas nos experimentos, observou-se que *R. solanacearum* e *X. axonopodis* promoveram o aumento de fenólicos e de flavonóides nas inoculações múltiplas e o aumento das atividades das PPOs nas inoculações simples. Entretanto, o aumento dos níveis de fenólicos e flavonóides nas folhas basais e intermediárias inoculadas com *X. axonopodis* e com *R. solanacearum* foram equivalentes ou maiores que os níveis constitutivos apresentados pelas folhas jovens não inoculadas. Os resultados indicam que estas fitobactérias atuaram como indutoras do metabolismo de defesa nesta cultivar.

Em relação a *X. axonopodis*, sugere-se a sua utilização para promover o aumento das respostas de defesa em batata, no sentido de minimizar os efeitos de uma posterior infecção com bactérias ou fungos compatíveis. Porém, a utilização de *R. solanacearum* vivas como indutoras

pode não se constituir uma estratégia muito segura, por apresentarem grande variação de virulência dependendo do meio de cultivo. Além disso, dependendo da cultivar utilizada e das condições ambientais, pode ocorrer o desenvolvimento de doença ou da resistência.

Desta forma, uma abordagem interessante seria a identificação de moléculas tanto em *X. axonopodis* quanto em *R. solanacearum* que funcionem como eliciadoras. Neste sentido, após a identificação e o isolamento dos eliciadores, é necessária a determinação de suas concentrações e métodos de aplicação no vegetal, visando à estimulação das defesas. Da mesma forma, são necessários estudos para verificar o custo metabólico das plantas em resposta aos eliciadores, visando não comprometer o crescimento e a produtividade vegetal.

CONCLUSÕES

- No presente estudo observou-se que as respostas de defesa às fitobactérias incompatíveis e compatíveis em *S. tuberosum* cv. Ágata foram distintas, em relação à ocorrência de respostas de hipersensibilidade, e às alterações nos níveis de compostos fenólicos solúveis totais, flavonóides e atividades das enzimas polyphenol oxidases e peroxidases.

- Esta cultivar de batata apresentou resistência ao isolado da bactéria *R. solanacearum*, não desenvolvendo a doença. A virulência em isolados de *R. solanacearum* pode depender das condições de cultivo, sendo que pode haver diferenças morfológicas entre os tipos de colônias e níveis de virulência. Desta forma, a maioria dos isolados pode perder facilmente a patogenicidade quando em meio de cultura, sendo este fenômeno correlacionado com a variação da colônia. Isto pode explicar a resistência apresentada em relação às respostas de hipersensibilidade e ao aumento das respostas bioquímicas de defesa, porém, pode se tratar de uma cultivar com resistência ao isolado do patógeno.

- A cultivar não é hospedeira a *X. axonopodis*, por se tratar de um patógeno das espécies de *Citrus*, porém, a planta reconheceu a presença do patógeno. Este reconhecimento culminou com o desenvolvimento de respostas de hipersensibilidade nas folhas e aumento nos níveis dos compostos e das atividades das enzimas relacionadas à defesa vegetal.

- Nas inoculações de tubérculos com suspensões de *E. carotovora*, ocorreram os sintomas da doença caracterizados pela podridão-mole, indicando a susceptibilidade ao patógeno, característica das interações compatíveis. Nas inoculações simples das folhas, o aumento da atividade da POX não foi suficiente para impedir o desenvolvimento da doença, que se espalhou dos locais de inoculação nas folhas intermediárias, às folhas adjacentes não inoculadas. Essa resposta também confirmou a suscetibilidade ao patógeno nesta cultivar de batata. As folhas apicais (não inoculadas), porém, não desenvolveram a doença.

- A HR nas folhas inoculadas com *X. axonopodis* e com *R. solanacearum* foi acompanhada de respostas bioquímicas de defesa, dependendo do tipo de experimento realizado, considerando-se as inoculações simples ou múltiplas e a interação planta-patógeno. As respostas de defesa às fitobactérias variaram em relação aos níveis de compostos fenólicos e flavonóides e em relação às atividades enzimáticas da PPO e da POX em cada tipo de experimento, sugerindo a existência de mecanismos relacionados com a resistência sistêmica adquirida (SAR).

- Independentemente dos tratamentos realizados na inoculação múltipla, os níveis de compostos fenólicos totais e flavonóides e as atividades da PPO e da POX variaram em relação à idade das folhas inoculadas. As folhas basais (ou mais velhas) apresentaram as maiores atividades enzimáticas e os níveis mais baixos de compostos fenólicos e flavonóides, em relação às folhas apicais (ou mais jovens). Porém as folhas basais e as intermediárias inoculadas com *R. solanacearum* e com *X. axonopodis* mostraram um aumento nos níveis de compostos fenólicos e de flavonóides similares ou maiores que os níveis observados nas folhas apicais não inoculadas.