

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PATRÍCIA FERNANDA DA SILVA VILCHES

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E DA IMUNIDADE DE PLANTAS
DE *SOLANUM TUBEROSUM* (L.) TRATADAS COM RIZOBACTÉRIAS**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

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

Patrícia Fernanda da Silva Vilches

Orientador: Prof. Dr. Leandro Astarita

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Medina da Silva

**Avaliação do crescimento e da imunidade de plantas
de *Solanum tuberosum* (L.) tratadas com rizobactérias**

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

Porto Alegre
2017

Ficha Catalográfica

V699a Vilches, Patrícia Fernanda da Silva

Avaliação do crescimento e da imunidade de plantas de *Solanum tuberosum* (L.) tratadas com rizobactérias / Patrícia Fernanda da Silva Vilches . – 2017.

58 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita.

Co-orientador: Prof. Dr. Renata Medina da Silva.

1. Defesa vegetal. 2. PGPR. 3. Batata. 4. ISR. 5. Streptomyces. I. Astarita, Leandro Vieira. II. Silva, Renata Medina da. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Lúcia Ribeiro da Silva, por todo o apoio e amor dedicados a mim durante todo este período tão conturbado chamado mestrado.

Ao meu marido, Lucas Reichert, por acreditar em mim quando eu mesma não conseguia, pela companhia e ajuda durante os trabalhos e principalmente pela incrível paciência e carinho;

Aos meus amigos que me ajudaram a tornar essa jornada mais leve.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS, por todos os ensinamentos e por todas as risadas na hora da “peleia”; Em especial a Franciele Ortolan, que contribuiu muito nos últimos e importantíssimos momentos.

Ao meu orientador Leandro V. Astarita, à minha coorientadora Renata Medida e à professora Eliane R. Santarém por todos os ensinamentos, atenção e disponibilidade durante toda esta jornada.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é a terceira cultura agrícola mais consumida no mundo, ficando atrás somente do arroz e do trigo. Dentre as diversas doenças que afetam esta cultura, a canela-preta e a podridão-mole, causadas pela fitobactéria *Pectobacterium* spp., levam a importantes perdas na produção. Neste contexto, vários trabalhos vêm explorando o uso de indutores da defesa vegetal como estratégia para o controle de doenças. O uso de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) na agricultura pode promover tanto o crescimento quanto o aumento da defesa das plantas através da indução da resistência sistêmica induzida (ISR). Contudo, ainda são pouco conhecidos os mecanismos envolvidos na promoção da ISR. Este estudo visou selecionar rizobactérias do gênero *Streptomyces* com características de promotoras de crescimento e indutoras da imunidade inata de *Solanum tuberosum*. Para tanto, foram avaliadas: i) a capacidade de isolados de *Streptomyces* produzirem auxina (ácido 3-indolacético), ACC desaminase (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminase) e sideróforos; ii) a capacidade destas rizobactérias em promover o crescimento das plantas; iii) a promoção da resistência em plantas de batata desafiadas com *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* e iv) a expressão de genes relacionados a vias de sinalização de respostas de defesa em *S. tuberosum*, promovida por *Streptomyces* sp e a fitobactéria *P. carotovorum*. Os resultados indicam que o isolado CLV163 apresenta características de PGPR, sendo capaz de produzir auxina e sideróforos, além de promover o aumento da resistência das plantas contra *P. carotovorum*. Contudo, a rizobactéria CLV145, com a maior produção de auxina e sideróforos, causou a diminuição da matéria seca de parte aérea e não promoveu a defesa das plantas. A capacidade dos *Streptomyces* em produzirem ACC desaminase não foi determinante para a promoção de crescimento vegetal. O isolado CLV163 induziu um estado de *priming* nas plantas de *S. tuberosum* L. através da ativação das vias do AS e ET e a sua interação com as plantas de batata não comprometeu o crescimento vegetal.

Palavras chave: Defesa vegetal, PGPR, Batata, ISR, *Streptomyces*

ABSTRACT

Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) are the third most consumed crop in the world, after rice and wheat. Among the diseases affecting potato, the blackleg and tuber soft rot, caused by phyto bacteria *Pectobacterium* spp., lead to significant losses in the yield crop. Several studies have been exploring the use of plant defense inducers as a strategy to control plant diseases. The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture can lead to plant growth and enhancement of plant defense through the promotion of induced systemic resistance (ISR). However, the mechanisms involved in promoting ISR are still poorly understood. This study aimed to screen rhizobacteria of the genus *Streptomyces* with capacity to promote plant growth and induce *Solanum tuberosum* innate immunity. To achieve these objectives, we evaluated: i) the ability of *Streptomyces* isolates to produce auxin (3-indoleacetic acid), ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase) and siderophores; ii) their capacity to promote the growth of potato plants; iii) the induction of resistance in potato plants challenged with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* and iv) the expression of genes related to defense pathways in *S. tuberosum*, promoted by *Streptomyces* and *P. carotovorum*. Results indicated that the CLV163 isolate presents PGPR features, such as high auxin and siderophores production, and promoted plant defense against *P. carotovorum*. Although CLV145 showed the highest auxin and siderophores production, it reduced the shoot dry mass and was inefficient in promoting plant defense. Moreover, the ability of *Streptomyces* in producing ACC deaminase was not critical for promoting plant growth. The CLV163 isolate induced a priming state in potato plants that has occurred through the activation of the AS and ET pathways, and its interaction with *S. tuberosum* plants did not impair the plant growth.

Key words: Plant defense, PGPR, potato, ISR, *Streptomyces*

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC= Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- AIA = Ácido 3- indolacético
- AS = Ácido salicílico
- ChtA = Acidic class II Chitinase*
- DAMP = *Damage-associated molecular pattern molecules*
- ERF = Ethylene Response Factor*
- ET= Etileno
- ETI = *Effector-triggered immunity*
- Hpi = horas pós-inoculação
- HR = *Hypersensitive Response*
- ISR = *Induced Systemic Resistance*
- JA= Ácido jasmônico
- JA-Ile = *Jasmonoyl-L-isoleucine*
- JAZ =Jasmonate Zim-Domain
- LPS = Lipopolissacarídeos
- LRR = *Leucine Rich Repeat domain*
- MAMPs= *Microbial-associated molecular patterns*
- PAL = *Fenilalanina amônia liase*
- PAMPs= *Pathogen-associated molecular patterns*
- PGPR= *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* ou Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
- PR = *Pathogenesis-Related gene*
- PR2= *Endo-1,3-β-glucanase*
- PRR = *Pattern Recognition Receptor*
- PTI= *PAMP-triggered immunity*
- ROS= Espécies reativas ao oxigênio
- SAR= *Systemic Acquired Resistance*

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

	Pág.
Figura 1 - Representação de uma planta de <i>Solanum tuberosum</i>	8
Figura 2 - Sintomas das doenças causadas por <i>Pectobacterium</i> em batata.....	10
Figura 3 - Modelo proposto para a interação entre bactéria e célula vegetal através da ACC desaminase durante o ciclo do etileno.....	19
Figura 4 - Fases típicas do ciclo de vida de <i>Streptomyces</i>	21
Tabela 1 - Exemplos de genes marcadores envolvidos em respostas de defesa vegetal promovidas pelos hormônios Ácido Salicílico, Jasmonato e Etileno.....	17

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 <i>Solanum tuberosum</i> (L.)	8
1.1.1 Cultivar Ágata	9
1.2 Doenças da batata.....	9
1.2.1 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	11
1.3. Defesa vegetal	12
1.3.1 Genes relacionados à defesa vegetal	15
1.4 Rizobactérias.....	18
1.4.1 <i>Streptomyces</i> sp. (actinobactérias)	20
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. HIPÓTESE.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo geral	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. REFERÊNCIAS (CAPÍTULO I)	23
CAPÍTULO II.....	32
ARTIGO CIENTÍFICO	32
CAPÍTULO III.....	56
CONCLUSÕES	57
PERSPECTIVAS.....	57

CAPÍTULO I

Introdução

Justificativa

Hipótese

Objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Solanum tuberosum* L.

A *Solanum tuberosum* (L.) (batata) é uma espécie herbácea de origem Andina pertencente à família Solanaceae. Esta espécie foi levada para a Europa pelos conquistadores espanhóis no século XVI e introduzida comercialmente no Brasil somente no Século XIX^{1,2,3}.

S. tuberosum possui um caule principal (ou primário), originário do tubérculo semente, que origina os caules laterais (ou secundários). As folhas são alternas, compostas e arredondadas. As flores são hermafroditas e estão reunidas em inflorescências do tipo cimeira, seu cálice é gamossépalo, de coloração verde, com textura pilosa, e possuindo corola pentâmera, gamopétala, de coloração branca, rosada, lilás ou azul⁴. Os frutos são do tipo baga, geralmente de coloração verde, com diâmetro que pode variar de 2 a 3 cm. As sementes são reniformes ou ovais achatados, de cor amarela ou castanha. A porção subterrânea do caule possui gemas que dão origem aos estolões, que irão originar os tubérculos em suas extremidades. As raízes podem ser pivotantes, com ramificações laterais, quando originárias da semente verdadeira, ou podem ser adventícias, muito ramificadas e com comprimento de até 50 cm de profundidade, quando oriundas de um tubérculo semente^{4,1}.



Figura 1 – Representação de uma planta de *Solanum tuberosum*⁵

A batata é a terceira cultura agrícola mais consumida no mundo, ficando atrás somente do arroz e do trigo⁶, sua produção anual é de aproximadamente 322 milhões de toneladas, com um mercado mundial estimado de cerca de 63 bilhões de dólares por

ano ⁷. Atualmente, os maiores desafios na produção da batata são o alto custo da produção, a grande variação de preços no comércio e as perdas devido a doenças⁸.

1.1.1 Cultivar Ágata

O cultivar Ágata foi amplamente adotado no Brasil a partir de 1999, tornando-se o principal cultivar de batata plantado no país⁹. Ele foi lançado comercialmente na Holanda em 1990 e é oriundo do cruzamento do cultivar Böhm52/72 com Sirco.

A rápida adoção deste cultivar deveu-se às boas características agronômicas como: uniformidade e boa aparência dos tubérculos, dormência curta, tuberização precoce e potencial culinário (apropriado para pratos cozidos e assados)¹⁰. Contudo, embora apresente muitas qualidades comerciais, este cultivar é suscetível à maioria das doenças descritas para batatas no Brasil¹⁰.

1.2 Doenças da batata

Um dos maiores problemas da produção de batatas são as perdas devido a doenças originadas por diversos agentes etiológicos, pois elas demandam adoção de práticas agrícolas de manejo e uma série de tratamentos com agroquímicos que encarecem a produção, possuem ação limitada e geram resíduos que podem causar danos ao meio ambiente e a saúde humana e animal^{11,12}. Dentre as diversas doenças que atacam a batata, destacamos as doenças fúngicas, como a requeima, causada por *Phytophthora infestans*, e a doença pinta-preta, causada por *Alternaria* spp.¹³, bem como as doenças bacterianas, que causam murchas, sarnas e podridões de tubérculos e hastes¹⁴. Além destes patógenos, a cultura da batata é bastante atacada por vírus que causam o enrolamento das folhas, a redução do crescimento das plantas e a perda de produtividade^{15,14}, e por ataque de nematóides, que provocam a diminuição do crescimento das plantas, a murcha e o amarelecimento das folhas¹⁶.

O gênero *Pectobacterium* é o agente etiológico de uma das principais bacterioses que ataca plantas e tubérculos de batata no Brasil e no mundo. O sintoma mais comum é a Canela-preta, causada pela doença de mesmo nome, caracterizada pela descoloração dos vasos e o surgimento de uma coloração marrom escuro na base do caule, seguindo com um escurecimento total da parte externa (Figura 2A). Este sintoma se manifesta nas partes baixas das plantas, levando a murcha das folhas. Com a intensificação dos sintomas da doença, ocorre a necrose interna dos vasos que deixam a haste oca (Podridão-da-haste). Outro sintoma, que também dá nome à doença, é a Podridão-mole em tubérculos. Esta ocorre devido à formação de porções aquosas e macerados que geram uma consistência mole no tubérculo (Figura 2B). A área afetada pela infecção apresenta coloração que varia de creme a marrom, onde há

uma borda escura que separa o tecido sadio do afetado. O início da podridão do tubérculo é geralmente inodora, contudo, após a maceração dos tecidos, estes exalam um cheiro forte e desagradável devido a proliferação de microrganismos secundários^{1,17}.

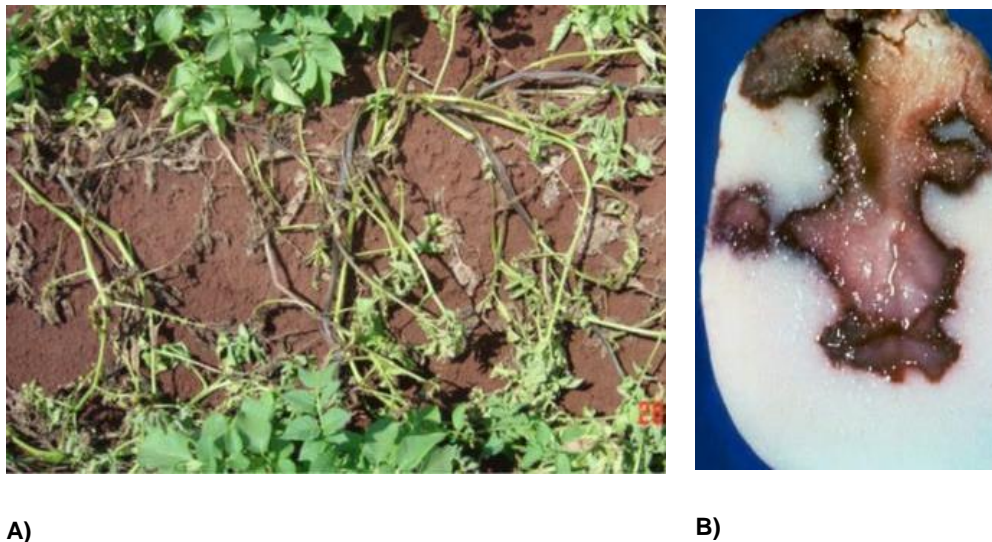


Figura 2 – Sintomas das doenças causadas por *Pectobacterium* em batata. A) Canela-Preta¹⁸; B) Podridão-mole do tubérculo¹⁹.

O controle das doenças bacterianas causadas por *Pectobacterium* em batata envolve cuidados no manejo, tais como evitar o cultivo em altas temperaturas e umidade, o uso de batata semente certificada (tubérculos livres de patógenos), cuidados na irrigação e evitar ferimentos nas plantas. Além do manejo da lavoura, a adoção de algumas práticas no pós-colheita, como proceder a colheita da batata em solo seco, realizar a secagem dos tubérculos antes de embalar ou armazenar o produto em local fresco e ventilado e a pulverização de produtos químicos cúpricos, também leva à uma redução na ocorrência da podridão-mole²⁰.

Contudo, o fato de nenhum destes métodos de controle de doenças bacterianas serem totalmente eficientes, torna oneroso e trabalhoso a atividade de cultivo da batata. Desta forma, uma abordagem promissora para auxiliar no manejo de doenças da lavoura de batata é o uso de indutores do sistema de defesa das plantas, levando ao aumento da resistência vegetal contra microrganismos patogênicos.

1.2.1 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*

O gênero *Pectobacterium* (família *Enterobacteriaceae*) contém espécies de bactérias fitopatogênicas que apresentam como características morfofisiológicas serem, bacilos gram negativos pectolíticos e anaeróbicos facultativos. Elas são amplamente distribuídas pelo mundo e apresentam hospedeiros como a batata, tomate, pimenta, repolho, milho e arroz^{21,22,23}. Estes patógenos podem causar grandes prejuízos no armazenamento de tubérculos de batata, chegando a perdas de até 100%^{24,25}. *Pectobacterium* é geralmente encontrado no solo e na superfície de plantas. A sua entrada nos tecidos dos vegetais ocorre através de ferimentos e aberturas naturais. Uma vez dentro do hospedeiro, permanece nos espaços intercelulares dos tecidos parenquimatosos e eventualmente penetra nos tecidos vasculares^{26,27,28}.

A disseminação da bactéria nas lavouras se dá com eficiência através do uso de tubérculos-semente aparentemente sadios, contendo a bactéria na forma latente, que são assim caracterizadas por não causarem sintomas, pois precisam de condições específicas como temperatura ideal e uma fina película de água sobre a superfície dos tubérculos. Existindo condições favoráveis, como altas temperaturas (acima de 25°C), tubérculos-semente infectados ou a presença de resíduos de tubérculos e de plantas voluntárias contaminadas, esta bactéria pode infectar outras plantas de batata e tubérculos através dos estolões, das lenticelas e de ferimentos causados por insetos e nematóides. A infecção progride, causando sintomas de doença a partir da produção de enzimas pectolíticas, que são exortadas do citoplasma do patógeno em direção ao tecido do hospedeiro. No vegetal, as enzimas irão promover a maceração dos tecidos devido a degradação da lamela média das células, causando a canela preta e a podridão mole^{29,30,28} (Figura 2A, B).

A identificação da *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* foi proposta pelo Dr. Valmir Duarte (Fac. de Agronomia, UFRGS)³¹. Esta subespécie foi identificada a partir de isolados previamente identificados como *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Estudos moleculares demonstraram que essa subespécie, até então não descrita, apresentava perfis genéticos, bioquímicos, fisiológicos e sorológicos diferentes dos esperados para *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Atualmente, a *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* já foi também identificada nos USA, África do Sul, Canadá, Nova Zelândia e Coréia^{31,32,33}. A *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* é uma bactéria altamente agressiva e a principal responsável por causar doenças em culturas de batata, tomate, cebola e crucíferas no Brasil, promovendo o sintoma de canela-preta^{31,34,35,36}.

As moléstias causadas pelo *Pectobacterium* são de difícil controle porque esses patógenos estão amplamente distribuídos no ambiente, em restos culturais, na água e

permanecem protegidos dentro de lenticelas suberizadas ou do sistema vascular, além de não existirem cultivares de batata resistentes a estes patógenos¹.

1.3. Defesa vegetal

As plantas, por serem organismos sésseis, necessitam de sistemas eficientes de percepção e de resposta a estresses bióticos e abióticos. As plantas estão constantemente sendo atacadas por uma grande diversidade de microrganismos, necessitando ativar mecanismos específicos de defesa que levam ao aumento da resistência contra patógenos. Dentre os diversos mecanismos envolvidos na defesa, destacamos o papel dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR, *Pattern Recognition Receptor*), os receptores R citoplasmáticos e a promoção de respostas sistêmicas de defesa, conhecidas como SAR (*Systemic Acquired Resistance*) e ISR (*Induced Systemic Resistance*)^{37,38,39,40}.

Os PRRs são proteínas receptoras localizadas na superfície da membrana plasmática vegetal e podem reconhecer padrões moleculares de algumas estruturas conservadas e comumente encontradas nos microrganismos, chamados de MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) ou PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Como exemplo destes padrões, pode-se citar a quitina presente na parede celular de fungos, além dos lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos (PGN), fatores de *quorum sensing* e a flagelina das bactérias. Os PRRs também podem reconhecer padrões moleculares liberados pelo próprio tecido vegetal após sofrer algum tipo de dano. Estes padrões são denominados de DAMPS (*Damage-Associated Molecular Patterns*) e podem ser peptídeos de plantas ou fragmentos da parede celular liberados durante a infecção ou ferimento⁴¹.

Quando um PRR reconhece um PAMP, ele gera uma resposta imune chamada de PTI (*PAMP-triggered immunity*), que promove alterações fisiológicas nas células vegetais, como o aumento citoplasmático dos níveis de cálcio e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de MAPK (*Mitogen-Associated Protein Kinases*) e CDPKS (*Calcium-Dependent Protein Kinases*)⁴². Estas modificações levam a uma resposta fraca e localizada, que tem como principal função evitar a entrada e a colonização do vegetal por patógenos⁴³.

A coevolução entre planta-patógeno possibilitou que diversos patógenos desenvolvessem a capacidade de suprimir a PTI através da produção de moléculas efetoras. Estas moléculas são proteínas produzidas pelo microrganismo e inseridas no meio intracelular do vegetal, atravessando a parede celular e a membrana plasmática. Nas fitobactérias, a transferência dos efetores é facilitada pelo canal tipo III, enquanto

que nos fungos, o mecanismo de transferência ainda é desconhecido. Uma vez que as moléculas efetoras estão no meio intracelular, elas interferem e ou diminuem as respostas de defesa basais através de inativação dos receptores PRRs e/ou de proteínas que fazem parte da cascata de sinalização de defesa^{44,45,46,47}.

Por outro lado, os vegetais desenvolveram mecanismos para minimizar o efeito dos efetores. As proteínas R presentes no citoplasma das células vegetais (produzidas por genes R - *Resistance genes*) são capazes de reconhecer moléculas efetoras produzidas por patógenos e desencadear respostas de defesa. Em geral, as proteínas R possuem em sua estrutura um domínio de ligação a nucleotídeo (NB - *Nucleotide Binding domain*) e uma região denominada de LRR (*Leucine Rich Repeat domain*). O domínio NB está relacionado a ligação com ATP/ADP ou GTP/GDP, enquanto que o domínio LRR pode interagir com outras proteínas ou outros ligantes⁴⁸.

A resposta imune vegetal desencadeada pela proteína R, após ocorrer o reconhecimento de moléculas efetoras, é denominada de ETI (*Effector-Triggered Immunity*)⁴⁹. A ETI reintegra, acelera e amplifica a resposta PTI, levando a respostas moleculares como a despolarização da membrana plasmática, modificação da atividade do canal iônico, produção de ROS e de compostos antimicrobianos, modulação da transcrição de genes do vegetal e a deposição de lignina e calose na parede celular da planta⁵⁰. Estas modificações levam a resposta de hipersensibilidade (HR, *Hypersensitive Response*), que se caracteriza pela morte celular programada rápida e localizada⁵¹.

Quando ocorrem as respostas de defesa vegetal (por PTI ou ETI), devido à infecção por patógeno, além das reações localizadas, o vegetal pode responder a partir de uma resposta sistêmica, chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR), que é capaz de conferir imunidade ao restante da planta. Esta resistência funciona como uma defesa a infecções subsequentes, podendo durar de semanas até meses, gerando uma resistência de amplo espectro contra patógenos como fungos, bactérias e patógenos virais^{38,52}. Esta imunidade pode ser observada em plantas de tabaco, onde a SAR é capaz de promover a redução dos sintomas de doenças causados pelos fungos *Phytophthora parasítica*, *Cercospora nicotianae* e *Peronospora tabacina*, pelos vírus do mosaico e da necrose de tabaco, bem como pelas bactérias *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* e *Pectobacterium carotovorum*⁵³.

Uma das características da promoção da SAR é o rápido aumento localizado e sistêmico dos níveis de ácido salicílico (AS)⁵⁴. O AS é um hormônio que atua no desenvolvimento vegetal, na senescência, na regulação de várias respostas a estresses abióticos e na resistência contra patógenos⁵⁵. Além do AS, a promoção da SAR está relacionada a produção de proteínas relacionadas à patogênese (*PR*, *Pathogenesis-*

Related proteins). Estas proteínas PR fazem parte do sistema de defesa local e sistêmico, atuando como proteínas antimicrobianas e enzimas que atacam paredes celulares de fungos e bactérias. Podem, ainda, agir reforçando as paredes celulares da planta e atuarem como proteínas de sinalização – ampliando a resposta de defesa sistêmica⁵⁶.

Outra resposta de defesa sistêmica que pode ocorrer em plantas é a resistência sistêmica induzida (ISR), que gera uma resposta muito semelhante à SAR. Contudo, a ISR é desencadeada e mediada por fatores diferentes da SAR.

A ISR foi primeiramente descrita em 1991 por três grupos de pesquisa independentes que observaram a indução do sistema de defesa vegetal por rizobactérias não patogênicas⁵⁷. A ISR é promovida pelo contato da planta com microrganismos não patogênicos, e assim como a SAR, confere um aumento na capacidade de defesa de toda a planta e atua contra um amplo espectro de patógenos. Os mecanismos envolvidos na ISR são distintos de SAR, uma vez que ocorre através da interação entre planta-microrganismo não patogênicos, além de não haver acúmulo de ácido salicílico e de proteínas PR. Como exemplo, a interação entre *P. fluorescens* WCS417r-ISR e plantas de rabanete desafiadas com *F. oxysporum* levou ao desenvolvimento de ISR, não havendo a promoção do acúmulo de proteínas PR⁵⁸. Análises da interação entre *Arabidopsis* e a bactéria benéfica *Pseudomonas putida* WCS358r, demonstram também que a resposta de defesa por ISR é independente da via de AS⁵⁹.

Tendo em vista que a via de AS não é ativada nas respostas ISR, estudos realizados em *Arabidopsis*, tomate e arroz demonstraram que interações destas plantas com microrganismos benéficos ativam vias dependentes de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET)^{60,61,62}. Neste sentido, a ativação destas vias tem se mostrado essenciais na defesa contra patógenos necrotróficos e insetos herbívoros⁶³.

O JA e seus derivados podem ser encontrados em tecidos de plantas e participam de múltiplos processos, como: o alongamento de raízes, abertura de estômatos, senescência, sinalização e defesa vegetal⁶³. O etileno, por sua vez, é um hormônio volátil envolvido em processos como a germinação, amadurecimento, senescência de frutos e na defesa vegetal⁶⁴.

A colonização de raízes de pepino com diferentes cepas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), como *Pseudomonas* e *Serratia*, reduzem os sintomas da antracnose gerados após a inoculação do patógeno *Colletotrichum orbiculare*^{57,65}.

As respostas geradas pela ISR, logo após a interação entre planta-microrganismo não patogênico, são relativamente leves. A defesa promovida pela ISR

é baseada na preparação da planta para um futuro ataque, deixando-a mais eficiente e rápida em suas respostas de defesa. A ISR promove diversas mudanças metabólicas na planta, como o acúmulo de fitoalexinas no local da infecção, lignificação da parede celular, acúmulo de proteínas envolvidas em vias de sinalização de defesa, aumento da sensibilidade celular ao JA e ET, bem como alterações nas atividades das enzimas polifenoloxidasas, peroxidases e fenilalanina amonialiase⁵⁷.

Embora os mecanismos envolvidos na ISR e SAR possam apresentar diferenças, é esperado que exista uma comunicação cruzada entre estas rotas, compartilhando vias de sinalização. Contudo, as vias envolvidas na ISR ainda são pouco conhecidas⁶⁶.

1.3.1 Genes relacionados à defesa vegetal

O sistema imune vegetal vem sendo extensivamente estudado a fim de se compreender quais são os processos celulares e moleculares envolvidos na percepção dos patógenos, bem como as vias de sinalização que, em última análise, levam à resistência da planta. Diversos hormônios vegetais desempenham papéis fundamentais tanto na modulação do crescimento quanto na defesa vegetal. Dentre estes, podemos destacar o ácido salicílico (AS), envolvido na sinalização da defesa contra microrganismos biotróficos, e o ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET), responsáveis pela promoção da defesa contra microrganismos necrotróficos (Tabela 1)⁶⁷.

A sinalização através do AS ocorre a partir de alterações do estado redox do citoplasma celular, que então proporciona a translocação da proteína citoplasmática NPR1 (*NONEXPRESSOR OF PR GENES1*) para o núcleo, que interage com proteínas nucleares membros da família TGA de fatores de transcrição, desencadeando assim a expressão de genes que atuam na defesa vegetal, como os genes relacionados à patogênese (genes *PR*). Além destas respostas nos tecidos próximos ao local de infecção, o AS também promove respostas de defesa em tecidos e órgãos distantes do local de infecção (resposta SAR)^{67,68,38}.

O hormônio JA é responsável pela defesa vegetal contra patógenos necrotróficos, microrganismos não patogênicos e herbívoros⁶⁹. Este hormônio utiliza duas vias de sinalização: a proteína MYC (fator de transcrição) e a ERF (*ETHYLENE-RESPONSE FACTOR*). Quando a planta não está sob ataque, as respostas induzidas por JA são reprimidas através dos repressores JAZ (*JASMONATE ZIM-DOMAIN*), que são proteínas inibidoras que estão presentes no núcleo celular. Este repressor JAZ interage com a proteína COI1 (*CORONATINE INSENSITIVE 1*) e MYC2, acabando assim por inibir a função do MYC2⁷⁰. A proteína COI1 faz parte do complexo SCF (*SKP-CULLIN-F-BOX*) o qual tem a função de perceber o sinal do JA biologicamente ativo,

estando este sob a forma de JA-Ile (*JASMONYL-L-ISOLEUCINE*). Por sua vez o complexo SCF é formado por multiproteínas E3 ligase, que tem a capacidade de catalisar a ubiquitinação de proteínas para serem degradadas no proteossoma. Quando a planta é atacada por patógenos ou sofre algum tipo de ferimento por herbívoros, o JA-Ile é imediatamente produzido no tecido que sofreu a injúria. A maior concentração de JA-Ile promove a interação física entre as proteínas COI1 e JAZ, levando o JAZ à ubiquitinação e subsequente degradação no proteossoma. Quando o JAZ é removido da interação com MYC, para interagir com COI1, este forma homodímeros ou heterodímeros com MYC3 e MYC4. E então o complexo MYC2-MYC3-MYC4 se liga a região *G-box* presente em promotores de genes responsivos ao JA, levando assim a respostas de defesa^{70,71}.

Dentre as diversas respostas promovidas pelo complexo MYC, destaca-se a expressão da proteína Pin2, a qual está diretamente relacionada à defesa vegetal mediada pelo JA. A proteína Pin2 pertence à família de inibidores de proteases (PIs), as quais agem inibindo a degradação de proteínas tóxicas presentes no citoplasma celular. A expressão da Pin2 possibilita que estas proteínas tóxicas permaneçam ativas durante o ataque de herbívoros^{72,73}.

A via de JA por ERF proporciona ao vegetal, defesa contra patógenos necrotróficos e conta com a presença do etileno. Esta segunda via do JA é mediada por fatores de transcrição da família ERF (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*), como o ERF1, ERF96 e ORA59^{67,74}. Os fatores de transcrição ERF1 (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 1*) e ORA59 (*OCTADECANOID RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF 59*) fazem parte da superfamília AP2/ERF (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR*), estando eles presentes na via sinalização do JA/ET, que promove a expressão de genes de defesa. Uma das características da superfamília AP2/ERF é que seus membros possuem de uma a duas regiões com 60 aminoácidos repetidos, que são chamados de domínio AP2/ER, que podem se ligar a região *GCC box* que estão presentes nos promotores dos genes PR induzidos por ácido Jasmônico/Etileno⁷⁴.

Embora os hormônios AS e JA sejam usualmente considerados antagonistas^{67,75}; estes podem não ser antagônicos em órgãos e tecidos distantes do local onde ocorreu a infecção pelo patógeno. Neste caso, podem agir de forma semelhante na promoção da resistência contra diferentes tipos de patógenos⁷⁶. Este efeito pode trazer vantagens para o vegetal, pois assim ele não ficaria totalmente desprotegido do ataque de patógenos, mesmo que a via específica JA antagônica já tenha sido ativada⁷⁵.

Tabela 1. Exemplos de genes marcadores envolvidos em respostas de defesa vegetal promovidas pelos hormônios Ácido Salicílico, Jasmonato e Etileno⁷⁷.

Via de sinalização	Genes marcadores	Funções
Ácido Salicílico	<i>PAL</i>	Fenilalanina amônia-ase: Síntese de compostos fenólicos (AS, flavonóides e fitoalexinas)
	<i>PR-1b</i>	Função desconhecida (resposta de defesa vegetal)
	<i>PR-2</i>	1,3- β -glucanase: Promove a degradação da parede celular de fungos
	<i>PR-5</i>	Taumatina-like: Família de proteínas antifúngicas
Jasmonato/Etileno	<i>ERF1</i>	Fator de transcrição: Ativado por Etileno
	<i>POTLX3</i>	Lipoxigenase: Envolvida na síntese de JA
	<i>PIN2</i>	Inibidora de proteases: Ativado por MYC
	<i>ACS</i>	ACC sintase: Enzima chave da síntese de etileno nas plantas
	<i>THI2.1</i>	Tionina: Peptídeo antimicrobiano
	<i>PDF1.2</i>	Defensina
	<i>JAZ1</i>	Repressor de genes responsivos ao ácido jasmônico

1.4 Rizobactérias

A rizosfera é a região do solo que fica sob influência direta das raízes. Este efeito das plantas sobre o solo deve-se à capacidade dos vegetais em depositar nas raízes até 40% do carbono fixado na fotossíntese, onde torna-se acessível à microbiota da rizosfera⁶⁷. Esta região possui maior densidade de microrganismos (de 10 à 100 vezes) e intensidade de atividade microbiana se comparado ao restante do solo, devido à grande quantidade de açúcares e aminoácidos contidos nos exsudados, nas secreções e na mucilagem liberados pelo vegetal⁷⁸.

As bactérias que colonizam a rizosfera são denominadas de rizobactérias e podem ser classificadas como benéficas, prejudiciais ou neutras para o vegetal⁷⁹. Dentre as benéficas estão as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR, *Plant growth-promoting rhizobacteria*). Elas podem ser encontradas em diferentes climas, estruturas de solo e tipos de vegetais, estando associadas à rizosfera, ao rizoplano (local de contato direto entre raiz e a bactéria) e/ou os espaços intercelulares dos tecidos das raízes^{80,81,82,83}.

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal causado pelas PGPRs podem ser diretos ou indiretos. Os diretos são realizados através da disponibilização de compostos que são sintetizados pela bactéria, como o nitrogênio fixado, a produção de hormônios vegetais, como o ácido 3-indolacético (AIA), a produção de sideróforos e a redução dos níveis endógenos de Etileno, através da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase^{84,85}. Os mecanismos indiretos estão relacionados à diminuição ou à prevenção dos efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos⁷⁹, como a síntese de metabólitos com propriedades antibióticas, síntese de enzimas degradadoras de parede celular de fungos, interferência no sinal *quorum sensing*, produção de compostos orgânicos voláteis, degradação de precursores de etileno e a ativação de ISR⁸⁵. Desta forma, as PGPRs podem promover o crescimento de plantas de soja e milho através da produção de hormônios, como no caso de *Azospirillum brasilense*⁸⁶, ou promover o aumento da resistência de plantas de cravo contra *Fusarium oxysporum*, promovida pela rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* WCS417r⁸⁷.

A auxina é um hormônio vegetal essencial para um grande número de repostas fisiológicas, como o crescimento de raízes e partes aéreas, respostas a estresses e mecanismos de defesa⁸⁸. Além dos vegetais, cerca de 80 % das rizobactérias são capazes de produzir este hormônio, através do metabolismo indólico, à auxina AIA. As bactérias utilizam diferentes vias para a produção do AIA, sendo o aminoácido triptofano utilizado como precursor por grande parte delas^{89,90}.

Além da auxina, o etileno é um importante hormônio modulador de crescimento vegetal, desempenhando também papel na defesa destes organismos. Estresses

bióticos e abióticos podem gerar um aumento nos níveis de etileno endógeno nos vegetais, levando a uma redução no crescimento da planta. Algumas rizobactérias tem a capacidade de reduzir os níveis de etileno nas raízes devido a síntese da enzima denominada de 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACC desaminase), que sequestra o ACC da via de produção do etileno vegetal e converte em amônia e α -cetobutirato (Figura 3), acabando por interromper a via de produção endógena deste hormônio na planta^{91,92}.

As rizobactérias também podem interferir no crescimento vegetal através da produção de sideróforos. Estas são moléculas orgânicas de baixo peso molecular que formam ligações estáveis com o ferro presente no solo. Neste sentido, o elemento ferro é um nutriente fundamental para o desenvolvimento tanto de plantas quanto de bactérias, porém sua forma mais encontrada no solo é o Fe^{3+} , necessitando ser reduzido para a forma Fe^{2+} para ser solubilizado e utilizado pelos organismos. Algumas rizobactérias possuem a capacidade de produzir sideróforos que sequestram e transportam o Fe^{3+} do solo para dentro das células, onde este é reduzido a Fe^{2+} . O vegetal se beneficia da presença destas bactérias pela captação direta do complexo sideróforo-Fe do solo, ou por uma reação de troca de ligantes^{93,94,95}.

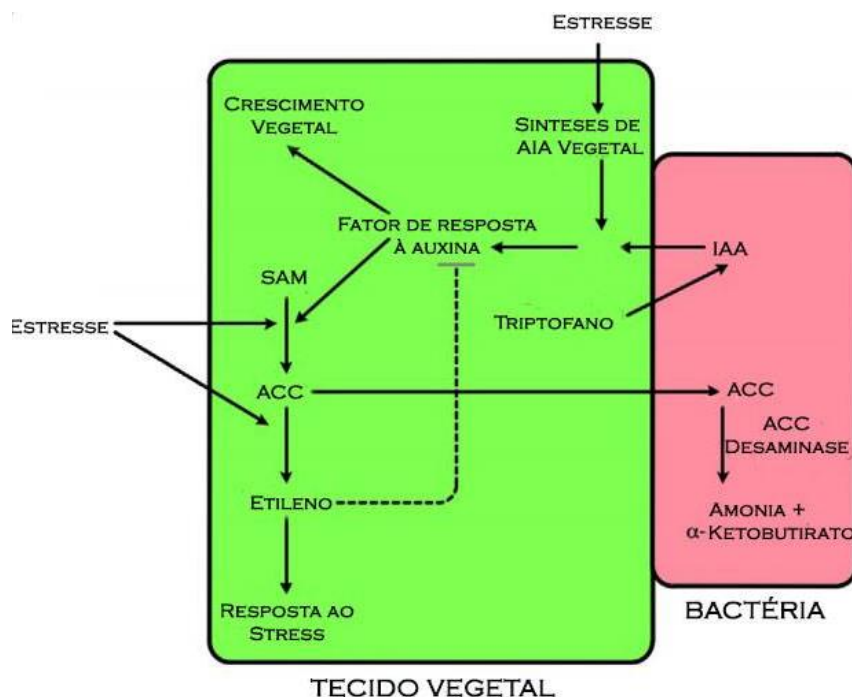


Figura 3 – Modelo proposto para a interação entre bactéria e célula vegetal através da ACC desaminase durante o ciclo do etileno⁹¹.

1.4.1 *Streptomyces* sp. (actinobactérias)

As actinobactérias, também conhecidas como actinomicetos, formam um filo de bactérias Gram-positivas que possuem aspecto filamentosos. Podem ser encontradas em diversos ambientes como água, rochas, animais, plantas e solo. O solo, por sua vez, é o ecossistema onde estes microrganismos são encontrados com maior frequência e abundância, existindo cerca de 10^4 a 10^6 esporos de actinomicetos por grama de solo⁹⁶. Elas desempenham um papel importante na mineralização da matéria orgânica do solo e são as responsáveis por produzirem compostos terpenóides que são os responsáveis pelo odor característico de solo^{96,97,98}.

Um dos principais integrantes dos actinomicetos é o gênero *Streptomyces* (família *Streptomycetaceae*), que é constituído por bactérias aeróbias estritas. Sua morfologia lembra a de fungos filamentosos, apresentando micélio vegetativo e hifas aéreas. Suas hifas possuem o diâmetro aproximado de 0,5 a 0,10 μm e o seu comprimento é indefinido. Também possuem a capacidade de produzir esporos. Devido a estas características seu ciclo de vida também é diferente da maioria das bactérias, possuindo fases de crescimento vegetativo, crescimento aéreo e esporulação (Figura 4)^{99,100}.

Este gênero geralmente é encontrado no solo associado a raízes de plantas. A temperatura ideal para o crescimento de *Streptomyces* pode variar de 25°C a 37°C e o pH do ambiente pode variar de 6,5 a 8,0 sem causar alterações no crescimento da maioria das espécies descritas^{101,102,103}.

Algumas cepas de *Streptomyces* são produtoras de antibióticos, como a estreptomicina e a terramicina, além de hormônio auxina (ácido 3-indolacético, AIA), proteases extracelulares, sideróforos, ACC desaminase e compostos orgânicos voláteis¹⁰⁴. Estas características despertam grande interesse comercial, já que estas bactérias podem ser fonte de novos antibióticos e de produtos promotores de crescimento vegetal. Outra abordagem de uso das *Streptomyces* está relacionada à capacidade destes organismos em induzir o metabolismo de defesa vegetal¹⁰⁴. Estudos realizados por Dalmas e colaboradores, demonstram o potencial de alguns isolados de *Streptomyces* em produzir auxina e promover o crescimento vegetal em plantas de *Araucaria angustifolia*¹⁰⁵. Já o estudo de Salla e colaboradores, mostra que isolados de *Streptomyces* foram capazes de induzir o crescimento vegetal e modular o metabolismo secundário (relacionado a respostas de defesa vegetal - ISR) de plantas de *Eucalyptus* contra *Botrytis cinerea*¹⁰⁶. Da mesma forma, foi demonstrada a capacidade de *Streptomyces* em promover ISR em plantas de carvalho-vermelho, levando à diminuição da severidade da doença causada por *Microsphaera alphitoides*¹⁰⁷.

Neste contexto, investigações de novas linhagens de *Streptomyces* com o intuito de verificar o seu potencial como PGPRs para diferentes espécies de vegetais mostraram-se crescentemente promissoras como alternativas sustentáveis para promoção do crescimento e da defesa vegetal contra patógenos.

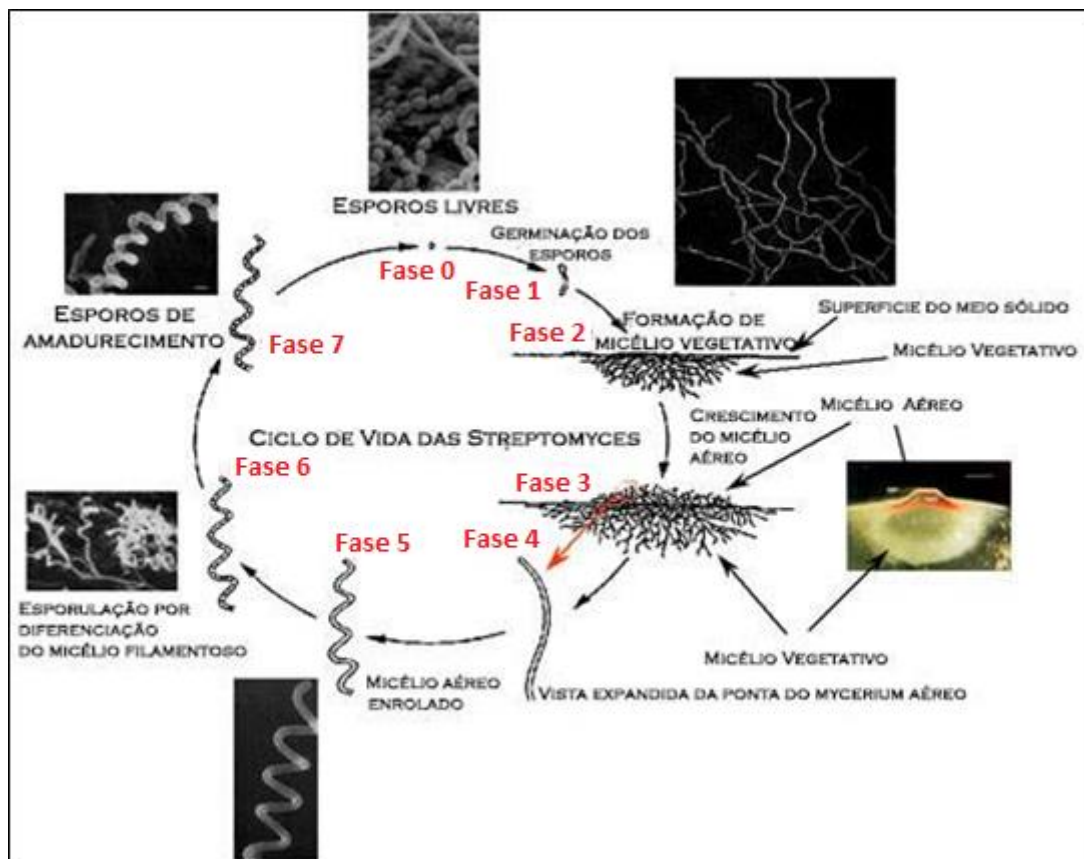


Figura 4 – Fases típicas do ciclo de vida de *Streptomyces*¹⁰⁸.

2. JUSTIFICATIVA

Embora a produção de batatas tenha grande importância mundial, ela é constantemente ameaçada por doenças causadas por diversos patógenos. Os métodos atuais de controle de doenças bacterianas são baseados no manejo e/ou no uso de químicos que podem ser nocivos ao meio ambiente, bem como à saúde humana e animal. Além disso, não existem cultivares de batata resistentes à bactéria *Pectobacterium* spp. e os métodos atualmente disponíveis são dispendiosos e de baixa eficiência para o controle deste patógeno. Esta situação deixa clara a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas, que sejam seguras e de menor custo, para auxiliar no controle eficiente deste patógeno.

Uma abordagem que vem sendo amplamente investigada para o controle de doenças é o uso de PGPRs para a promoção do crescimento e da sanidade vegetal. A

possibilidade de aumentar as defesas dos vegetais através da ISR representa uma nova oportunidade para melhorar o controle de doenças bacterianas. A promoção de ISR pode levar ao aumento das defesas do vegetal como um todo, tornando a planta preparada para se defender de maneira mais eficiente e rápida contra um amplo espectro de patógenos. Contudo, para o desenvolvimento de ferramentas envolvendo o uso de PGPRs, visando o crescimento e o controle de doenças em plantas, é necessário ampliar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na interação planta-PGPR.

3. HIPÓTESE

O presente trabalho propõe a hipótese de que bactérias do gênero *Streptomyces* apresentam características de PGPR em plantas de *Solanum tuberosum*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar isolados de rizobactérias do gênero *Streptomyces* como bactérias promotoras de crescimento e indutoras da imunidade inata de *Solanum tuberosum*.

4.2 Objetivos específicos

1- Caracterizar isolados de rizobactérias do gênero *Streptomyces* como produtores de compostos que interferem no crescimento vegetal: auxina, ACC desaminase e sideróforos;

2- Avaliar a capacidade de isolados de *Streptomyces* na promoção do crescimento de plantas de *S. tuberosum*;

3- Determinar a capacidade de isolados de *Streptomyces* na promoção da resistência de *S. tuberosum* contra a fitobactéria *Pectobacterium corotovorum* subsp. *brasiliensis*;

4- Avaliar a expressão de genes marcadores de vias de respostas de defesa (genes *PR-1b*, *ERF1* e *PIN2*) em plantas de *S. tuberosum* em resposta a isolados de *Streptomyces* e à fitobactéria *Pectobacterium corotovorum* subsp. *brasiliensis*.

5. REFERÊNCIAS (CAPÍTULO I)

1. Pereira, A. da S. & Daniel, J. *O cultivo da batata na região sul do Brasil*. (2003).
2. Hawkes, J. G. in *Potato genetics* 3–42 (1994).
3. Latin America. (2008). Available at: <http://www.fao.org/potato-2008/en/world/latinamerica.html>. (Accessed: 5th November 2015)
4. FILGUEIRA, F. A. R. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. (2003).
5. Potato. *The Funny Potato Family* (2010). Available at: <https://thefunnypotatofamily.wordpress.com/about-the-potato/>. (Accessed: 18th January 2016)
6. CIP – International Potato Center. (2015). Available at: <http://cipotato.org/potato>. (Accessed: 20th October 2015)
7. Nakano DH, D. J. Choque de competitividade. *Hortifruti Brasil* 6–17 (2006).
8. Deleo, J. P. B. & Cardoso, F. Especial batata: Gestão sustentável custos de produção em alta nos últimos anos. *Hortifruti Brasil* 8–17 (2014).
9. Oliveira, P. C. T. de M. N. do P. G. H. da S. M. F. A. C. S. R. F. de. Análise do crescimento da cultivar de batata ‘Ágata’. *Associação Brasileira da Batata* (2003). Available at: http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista08_006.htm. (Accessed: 17th November 2015)
10. Nivap. Netherlands catalogue of potato varieties. 286 (2011).
11. Aittamaa, M. *et al.* Distinguishing bacterial pathogens of potato using a genome-wide microarray approach. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 705–717 (2008).
12. Jardim, I. C. S. F., Andrade, J. de A. & Queiroz, S. C. do N. de. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. *Quim. Nova* **32**, 996–1012 (2009).
13. Lopes, C. A. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. (2016). Available at: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/batata/arvore/CONT000gnc4knh302wx5ok0edacxlnqqvc0v.html>. (Accessed: 16th January 2016)
14. Brisolla, a. D. *et al.* Manejo Integrado das principais doenças e pragas da cultura da batata. *Circ. N 124 - IAPAR* (2002).

15. Lopes, C. A. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. (2016). Available at: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/batata/arvore/CONT000gnc4knh302wx5ok0edacxluyhf3sw.html>. (Accessed: 15th January 2016)
16. Inomoto, M. M. Nematóides em batata. *Batata Show* (2001). Available at: http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista01_012.htm. (Accessed: 15th January 2016)
17. van der Merwe, J. J., Coutinho, T. a., Korsten, L. & van der Waals, J. E. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* **126**, 175–185 (2010).
18. Lopes, C. A., Lima, M. F., Reis, A. & Pinheiro, J. B. DOENÇAS DA BATATA (*Solanum tuberosum* L .). 1–18 (2014).
19. Sueli Correa Marques de Mello, C. F. *Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle. (2008).
20. Agrios, G. Plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 315–8 (2004).
21. Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., Van Veen, J. a. & Van der Wolf, J. M. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathol.* **60**, 999–1013 (2011).
22. Daami-remadi, M., Mahjoub, M. El, Phytopathologie, D. & Chott-mariem, I. S. A. De. First Report of *Pectobacterium carotovorum carotovorum* on Tomato Plants in Tunisia. **2**, 30–35 (2007).
23. Charkowski, A. O. Biology and control of *Pectobacterium* in potato. *Am. J. Potato Res.* 223–229 (2015). doi:10.1007/s12230-015-9447-7
24. Elphinstone, J. G. La Pudricion Blanda y la Pierna Negra de la Papa, *Erwinia* spp. *Boletín de Informacion tecnica* **21**, 1–18 (1987).
25. Lapwood P. T., D. H. . G. A method for assessing the field susceptibility of potato cultivars to blackleg (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*). *Annals of Applied Biology* **104**, 315–320 (1984).
26. Masao Goto. Fundamentals of bacterial plant pathology. *Acad. Press* (1992).
27. Michel C M Perombelon; Arthur Kelman. ECOLOGY OF THE SOFT ROT ERWINIAS. *Ann. Rev. Phytopathol* **18**, 361–87 (1980).
28. Mariano, R. ., Silveira, E. ., Alvarado., I. . & Silva, A. Bactérias Fitopatogénicas Pectinolíticas dos Géneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. *An. da Acad.*

- Pernambucana Ciência Agronômica* **2**, 121–153 (2005).
29. Ban, H. *et al.* Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (aiiA) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease. *Plant Cell Rep.* **28**, 1847–55 (2009).
 30. Pérombelon, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* **51**, 1–12 (2002).
 31. Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J. & De Oliveira, a. M. R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 535–545 (2004).
 32. Lee, D. H., Kim, J. B., Lim, J. A., Han, S. W. & Heu, S. Genetic Diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Isolated in Korea. *Plant Pathol J* **30**, 117–124 (2014).
 33. El Tassa, S. O. M. & Duarte, V. Através de PCR-RFLP do Gene *recA*. *Fitopatol. Bras.* **31**, 23–28 (2006).
 34. Aysan, Y., Karatas, A. & Cinar, O. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Prot.* **22**, 807–811 (2003).
 35. Fiori, M. & Schiaffino, a. Bacterial Stem Rot in Greenhouse Pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sardinia (Italy): Occurrence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Phytopathol.* **152**, 28–33 (2004).
 36. Baz, M. *et al.* Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 303–311 (2012).
 37. Cui, H., Tsuda, K. & Parker, J. E. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 487–511 (2015).
 38. Fu, Z. Q. & Dong, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 839–63 (2013).
 39. Van Loon, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**, 243–254 (2007).
 40. Baena-González, E. Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Mol. Plant* **3**, 300–313 (2010).
 41. Boller, T. & Felix, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu.*

- Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406 (2009).
42. Nicaise, V., Roux, M. & Zipfel, C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* **150**, 1638–1647 (2009).
 43. Liu, W. *et al.* Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant* **6**, 605–20 (2013).
 44. Dangl, J. L., Horvath, D. M. & Staskawicz, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**, 746–51 (2013).
 45. Deslandes, L. & Rivas, S. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* **17**, 644–655 (2012).
 46. Karasov, T. L., Horton, M. W. & Bergelson, J. Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution? *Curr. Opin. Plant Biol.* **18**, 24–30 (2014).
 47. Raffaele, S. *et al.* Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science (80-.)*. **330**, 1540–1543 (2010).
 48. Knepper, C. & Day, B. From Perception to Activation : The Molecular-Genetic and Biochemical Landscape of Disease Resistance Signaling in Plants. (2010).
 49. Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 539–548 (2010).
 50. Buscaill, P. & Rivas, S. Transcriptional control of plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**, 35–46 (2014).
 51. Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329 (2006).
 52. Gruner, K., Griebel, T., Návarová, H., Attaran, E. & Zeier, J. Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* **4**, 252 (2013).
 53. Ryals, J. a *et al.* Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809–1819 (1996).
 54. Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V. & Ton, J. Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* **158**, 844–853 (2012).
 55. Yan, S. & Dong, X. Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**, 64–68 (2014).
 56. Campbell, Neil A.; Reece, J. B. *Biology*. (2005).

57. Pieterse, C. M. J. *et al.* Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 1–29 (2014).
58. Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L. & Van Pelt, J. A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**, 309–320 (1995).
59. Van, W. S. C. *et al.* Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 716–724 (1997).
60. De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P. A. H. M. & Hofte, M. Pseudomonas fluorescens WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against Magnaporthe oryzae Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. *Plant Physiol.* **148**, 1996–2012 (2008).
61. Hase, S. *et al.* Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol.* **57**, 870–876 (2008).
62. Pieterse, C. M. J. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1571–1580 (1998).
63. Pineda, A., Zheng, S.-J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J. & Dicke, M. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci.* **15**, 507–514 (2010).
64. Watkins, C. B. in *Fruit Quality and its Biological Basis* 180–224 (2002).
65. Wei, G., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. Induction of Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by Select Strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Phytopathology* **81**, 1508 (1991).
66. Pieterse, C. M. J. *et al.* RIZOBACTÉRIAS E COMUNICAÇÃO NA ROTA. **13**, 277–295 (2005).
67. Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. M. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 489–521 (2012).
68. Tada, Y. *et al.* Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science (80-.).* **321**, 1–9 (2008).
69. Grennan, A. K. Ethylene Response Factors in Jasmonate Signaling and Defense

- Response. *Plant Physiol.* **146**, 1457–1458 (2008).
70. Kazan, K. & Manners, J. M. MYC2: The Master in Action. *Mol. Plant* **6**, 686–703 (2013).
 71. Susheng Song¹, Tiancong Qi¹, Claus Wasternack², a, D. X. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**, 112–119 (2014).
 72. Dammann, C., Rojo, E. & Sánchez-Serrano, J. J. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant J.* **11**, 773–782 (1997).
 73. War, A. R. *et al.* Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav. Landes Biosci. Plant Signal. Behav.* **710**, 1306–1320 (2012).
 74. Catinot, J. *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96 positively regulates Arabidopsis resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate- and ethylene-responsive defence genes. *Plant. Cell Environ.* n/a-n/a (2015). doi:10.1111/pce.12583
 75. Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. & Wasternack, C. The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy , Antagonism , and Oxidative Stress Leading to Cell Death. **140**, 249–262 (2006).
 76. Spoel, S. H., Johnson, J. S. & Dong, X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18842–18847 (2007).
 77. Derksen, H., Rampitsch, C. & Daayf, F. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* **207**, 79–87 (2013).
 78. Doornbos, R. F. & Loon, L. C. Van. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere . A review. 227–243 (2012). doi:10.1007/s13593-011-0028-y
 79. Schippers, B., Bakker, A. W. & Bakker, P. A. H. M. Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 339–358 (1987).
 80. Freitas, S. S., Melo, A. M. T. & Donzeli, V. P. SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE ALFACE. 61–70 (2003)

81. Ashrafuzzaman, M. *et al.* Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **8**, 1247–1252 (2009).
82. Gholami, A., Shahsavani, S. & Nezarat, S. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination , Seedling Growth and Yield of Maize. 19–24 (2009).
83. Gray, E. J. & Smith, D. L. Intracellular and extracellular PGPR : commonalities and distinctions in the plant – bacterium signaling processes. **37**, 395–412 (2005).
84. Vassilev, N., Vassileva, M. & Nikolaeva, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: Potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 137–144 (2006).
85. Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **4**, 1044–1051 (2012).
86. Cassan, F. D. & Luna, M. V. Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E 109 promote seed germination and early seedling growth , independently or co-inoculated in maize (Zea mays L .) and soybean ... (2009). doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
87. van Peer, R., Niemann, G. J. & Schippers, B. Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by Pseudomonas sp. Strain WCS417r.PDF. *Phytopathology* **81**, 728–734 (1991).
88. Salehin, M., Bagchi, R. & Estelle, M. SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* **27**, 9–19 (2015).
89. Kumar, A. *et al.* Does a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability? *J. Pure Appl. Microbiol.* **9**, 715–724 (2015).
90. Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425–448 (2007).
91. Glick, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **169**, 30–39 (2014).
92. Ahemad, M. & Kibret, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* **26**, 1–20 (2014).

93. Schmidt, W. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytol.* **141**, 1–26 (1999).
94. Neilands, J. B. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723–26726 (1995).
95. Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L. & Suh, J. W. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9621–9636 (2013).
96. Satheeja, S. V. & Jebakumar, S. R. D. Phylogenetic analysis and antimicrobial activities of Streptomyces isolates from mangrove sediment. *Journal of Basic Microbiology* **51**, 71–79 (2011).
97. Ensign, J. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews in Microbiology* **32**, 185–219 (1978).
98. Dennis Claessen, Wouter de Jong, Lubbert Dijkhuizen, H. a B. W. Regulation of Streptomyces development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* **14**, 313–9 (2006).
99. J.Y. Leveau, M. B. *Microbiología Industrial.* (2000).
100. Alexander, M. *Introdution to soil microbe.* (1977).
101. David Hendricks Bergey, Noel R. Krieg, John G. Holt Wilkins, W. &. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* (1984).
102. Flårdh, K. & Buttner, M. J. Streptomyces morphogenetics : dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **7**, (2009).
103. WAKSMAN, S. A. & KUTZNER, H. J. Streptomyces coelicolor Mueller and Streptomyces violaceoruber Waksman and Curtis, two distinctly different organisms. *J. Bacteriol.* **78**, 528–38 (1959).
104. Fialho de Oliveira, M., Germano da Silva, M. & Van Der Sand, S. T. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of Streptomyces sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology* **161**, 565–572 (2010).
105. Dalmas, F. R., Pereira, T. C. B., Bogo, M. R. & Astarita, L. V. Autochthonous Streptomyces regulate the metabolism of seedlings of *Araucaria angustifolia*

- (Coniferales) during root colonisation. *Aust. J. Bot.* **59**, 118–125 (2011).
106. Daros Salla, T., Ramos da Silva, T., Vieira Astarita, L. & Romanato Santar em, E. Streptomyces rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. *Plant Physiol. Biochem.* **85**, 14–20 (2014).
107. Kurth, F. *et al.* Streptomyces-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **27**, 891–900 (2014).
108. About Streptomycetes. Available at: http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/Strepto-E.html. (Accessed: 26th February 2017)

CAPÍTULO II
Artigo Científico

Evaluation of growth and immunity of *Solanum tuberosum* (L.) plants treated with rhizobacteria

P. F. S. Vilches ^a, F. Ortolan^a, R. Medina-Silva^b, L. V. Astarita^{a*}

^aLaboratory of Plant Biotechnology, Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

^bLaboratory of Immunology and Microbiology, Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

* Corresponding author. *E-mail address*: astarita@pucrs.br (L.V. Astarita).

Abstract

Potatoes are the third most consumed crop in the world, after rice and wheat. Among the diseases affecting potato, the blackleg and tuber soft rot, caused by phyto bacteria *Pectobacterium* spp., lead to significant losses in the yield crop. Several studies have been exploring the use of plant defense inducers as a strategy to control plant diseases. The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture can lead to plant growth and enhancement of plant defense through the promotion of induced systemic resistance (ISR). However, the mechanisms involved in promoting ISR are still poorly understood. This study aimed to screen rhizobacteria of the genus *Streptomyces* with capacity to promote plant growth and induce *Solanum tuberosum* innate immunity. To achieve these objectives, we evaluated: i) the ability of *Streptomyces* strains to produce auxin (3-indoleacetic acid), ACC deaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase) and siderophores; ii) their capacity to promote the growth of potato plants; iii) the induced resistance in potato plants challenged with *Pectobacterium carotovorum*; iv) the expression of genes related to defense pathways in *S. tuberosum*, promoted by *Streptomyces* and *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Results indicated that the CLV163 and CLV145 presented high auxin and siderophores production. However, CLV145 reduced the shoot dry mass. The ability of *Streptomyces* CLV09 in producing ACC deaminase was not a critical feature for promoting plant growth. The CLV163 promoted plant defense against *P. carotovorum*. This result suggested an induced priming state in potato plants that has occurred through the activation of the AS and ET pathways, and its interaction with *S. tuberosum* plants did not impair the plant growth.

Key words: Plant protection, PGPR, Potato, ISR

1. Introduction

Potatoes production is constantly affected by diseases caused by several etiological agents. These diseases lead to adoption of agricultural management based on agrochemicals that increases the costs and may impact the environment^{1,2}. Among the pathogens, plants and tubers are frequently attacked by bacteria, such as *Pectobacterium*. This bacterium causes great losses in crops around the world and is responsible for diseases known as black-leg and soft-rot, which are characterized by the rot of stems and tubers^{1,3,4}.

A promising approach to assist in the management of plant diseases is the use of non-pathogenic rhizobacteria for plant protecting and growth. Rhizobacteria can be classified as beneficial, harmful or neutral to the plants⁵. The beneficial rhizobacteria are known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)^{6,7,8} which can promote a primed state for plant defense and induce the plant growth by synthesizing and release compounds, such as auxin (indole-3-acetic acid), siderophores and the enzyme ACC deaminase^{6,9}. In this context, the rhizobacteria *Pseudomonas* and *Serratia* have shown the ability to colonize and protect cucumber roots from *Colletotrichum orbiculare*^{10,11}. The beneficial effect of rhizobacteria was also observed when *Azospirillum brasilense* was inoculated in soybean and corn, promoting the plant growth through the production of hormones¹², or when the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS417r promoted the resistance of carnation plants against *Fusarium oxysporum*¹³. However, the success of rhizobacteria to interact and colonize plant roots is dependent on the compounds released by plants, such as sugars, vitamins, amino acids and mucilage^{14,15}.

Among the rhizobacteria, *Streptomyces* are cosmopolitan soil bacteria^{16,17} widely recognized for their capacity to produce bioactive compounds such as streptomycin, auxin, extracellular proteases, siderophores and volatile compounds¹⁸. This genus is also capable to induce plant growth in *Araucaria angustifolia*¹⁹ and promote the induced systemic resistance (ISR) in *Eucalyptus* against *Botrytis cinerea*²⁰.

The induced defense in plants may be divided in two main responses, the systemic acquired resistance (SAR) and the ISR. Both designate the mechanisms by which plants activate defense strategies, not only in the induction site but also at other places, after being exposed to an inducing agent²¹.

The ISR is triggered by the interaction between non-pathogenic microorganisms and plants, increasing the defense capacity and preparing the plant for a future pathogen attack¹⁰. This resistance is activated by plant hormones such as jasmonic acid (JA) and ethylene (ET), essentials for inducing the defense against necrotrophic pathogens and herbivorous insects^{22,23,24,25}. Unlike the SAR, the development of ISR is independent of accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins, as observed in radish plants treated with *P. fluorescens* WCS417r- and challenged with *F. oxysporum*²⁶. ISR response is also characterized by a salicylic acid-independent pathway¹⁰, as demonstrated in the interaction between *Arabidopsis* and the rhizobacterium *Pseudomonas putida* WCS358r²⁷. Although the mechanisms involved in ISR and SAR may present differences, it is expected a cross-talking between these routes, sharing signaling pathways, as observed in tobacco, where ET perception is essential for the

accumulation of salicylic acid (SA) and SAR development²⁸. Unfortunately, the mechanisms involving ISR responses are still poorly understood²⁹. Recently, it has been reported that the critical steps for priming in *Arabidopsis* are based on specific chromatin modifications on the defense gene promoters and the accumulation of inactive kinases signaling proteins. In addition, the increase in SA and azelaic acid led to a rapid and robust activation of defense and immunity systems³⁰. Moreover, it has been demonstrated that the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 is able to interact and suppress two microRNAs in *Arabidopsis*, leading to plant defense through ISR promotion³¹.

The hormones JA and ET are generally related to ISR promotion. Two signaling pathways are used by JA, a MYC and an ERF (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*). When the plant is attacked by some pathogen or herbivorous, the plant signaling jasmonate-isoleucine (JA-Ile) is immediately produced in the tissue that has suffered the injury. The increased concentration of JA-Ile promotes the derepression of the pathway and allow the MYC complex to bind the G-box region present in JA responsive gene promoters, thus leading to defense responses^{32,33}. The JA path through *ERF* provides the plant defense against necrotrophic pathogens and counts on the presence of ET. This pathway is mediated by *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 1*)^{15,34}, which is part of the AP2/ERF (*APETALA2 / ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) superfamily, and is present in the via JA/ET signaling, that promotes the expression of defense genes. The AP2/ERF superfamily has an AP2/ER domain, which can bind to the GCC box region that is present in the *PR* genes promoters induced by JA/ET³⁴. Mutations in the *PIN* (Ser proteinase inhibitors) genes of tomato resulted in the deficiency of either JA synthesis or JA perception³⁵. *PIN1* and *PIN2* genes are induced by JA through the *JAI1* (*JA-INSENSITIVE MUTANT*)³⁶. Trials with transgenic tomato plants showed that *PIN1* and *PIN2* are expressed downstream of JA and are detected 2 to 4 h after plant wounding. Moreover, their expression persist for more than 24 h and are detected both locally and systemically³⁷.

Salicylic acid is a plant hormone that induces defense against biotrophics. It promotes the translocation of the protein NPR1 (*NONEXPRESSOR OF PR GENES1*) to the nucleus, which eventually interacts with members of the TGA family of transcription factors, thus triggering the expression of genes that act on defense, such as pathogenesis related genes^{15,38,39,40}. Defense responses were efficient in tobacco plants for protecting against the fungi *Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae* and *Peronospora tabacina*, the bacteria *Pseudomonas syringae* and *Pectobacterium carotovorum*, as well as the tobacco mosaic virus and tobacco necrosis virus⁴¹.

This article describes the screening of native *Streptomyces* strains with PGPR features. Aiming to select these rhizobacteria, the capacity to produce growth-enhancing compounds, such as auxin, ACC deaminase and siderophores was evaluated. Moreover, the ability of *Streptomyces* to induce innate immunity in *Solanum tuberosum* challenged with *Pectobacterium carotovorum* and plant gene expression was also investigated.

The results indicated that production of these bacterial metabolites were not crucial for promoting *Solanum tuberosum* growth. However, trials with plants inoculated with *Streptomyces*

and then challenged with the pathogen *Pectobacterium carotovorum*, enabled to assert the occurrence of ISR response and allowed a selection of *Streptomyces* strains with PGPR features. Moreover, the expression of the plant genes *PR1*, *ERF1* and *PIN2*, in response to *Streptomyces* and pathogen, evidenced the occurrence of ISR and suggested that SA and ET pathways were the main route used by this induced response.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Certified potato tubers (cultivar Agata, Basic category G2) were provided by Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda, Andradas/MG/Brazil. For disinfestation, tubers were immersed in sodium hypochlorite (1% active chlorine) for 10 minutes. After, they were immersed in fungicide solution (Ridomil®, 3 g/L) for 10 minutes and washed in sterile distilled water. Disinfested tubers were treated with Gibberellic acid solution (25 mg/L) for 1 hour, to break down the dormancy. Tubers were cultivated in plastic bags (1 L) with organic soil and maintained in a greenhouse without temperature and light control.

2.2. Microorganisms and culture media

Streptomyces cultures were obtained from samples of soil (rhizosphere) collected in native forest (Araucaria Forest, 29°29'18.4"S, 50°12'23.5"W) and agricultural areas (-28664519, -53.605.714).

After cultivation in selective culture medium⁴², *Streptomyces* were isolated by morphological characterization. Pure cultures were stored in glycerol at -80 °C and integrated into the Microorganisms Collection of the Laboratory of Plant Biotechnology (CLV), PUCRS/Brazil. . The *Streptomyces* CLV04, CLV09, CLV16, CLV20, CLV145 and CLV163 were evaluated in this study. These isolates were recovered in ISP4⁹² or ISP2⁹² liquid culture medium. Cultures were grown in orbital shaker (100 rpm), in the light (24h) at 25 ± 2 °C for seven days (at the beginning of the stationary phase). After this period, the bacterial suspension was centrifuged at 2,500 *xg* for 10 min at room temperature. The pellet was washed and resuspended in sterile water. The density of bacterial suspensions was adjusted (OD_{600nm}= 0.5). Cultivated *S. tuberosum* plants were watered with these suspensions.

The phyto bacterium *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* was used as the challenger. This pathogen was kindly provided by Dr. Andreia Mara Rotta de Oliveira, from the Phytopathology Laboratory of Fepagro/RS/Brazil. The bacterium was maintained in glycerol at -80 °C. *P. carotovorum* was grown in LB liquid medium (Luria-Bertani), under agitation (100 rpm) at 25 ± 2 °C, for 16-20 hours in the dark. The bacterial suspension was centrifuged at 2,500 *xg* for 10 min at room temperature. The pellet was washed and resuspended in sterile water. Then, the suspension density was adjusted to 10⁸ CFU mL⁻¹ (OD_{600nm}=0.5) and immediately used to inoculate potato leaves.

2.3. Experiments

The experiments were carried out in four distinct and complementary steps. i) ability of *Streptomyces* in producing secondary compounds such as auxin (indole-3-acetic acid, IAA), siderophores and ACC deaminase; ii) ability of *Streptomyces* in promoting plant growth; iii) capacity of *Streptomyces* in inducing plant defense against the phyto bacterium *P. carotovorum*; iv) expression of plant genes related to salicylic acid (SA), ethylene (ET) and jasmonic acid (JA) pathways.

2.4. Bacterial secondary compounds

Auxin determination

Streptomyces were cultivated for five days in liquid medium ISP2 or ISP4 in orbital shaker (100 rpm), at 25 ± 2 °C in the light (24h). The cultures were centrifuged at 2,500 xg for 15 minutes at room temperature. Auxin was quantified in the supernatant using the Salkowski method with some modifications⁴³ (218 mL of H₃SO₄ dissolved in 182 mL of distilled water, 12 mL of FeCl₃ 1.5 M and 593 mL of distilled water). Subsequently, samples were incubated for 30 minutes in the dark at room temperature. Analyzes were carried out in triplicate using spectrophotometer (530 nm). A commercial IAA (Sigma-Aldrich) was used as standard for establishing the standard curve¹⁹. Auxin was expressed as $\mu\text{g/mL/g}$ cells.

ACC deaminase

The ability of *Streptomyces* to produce ACC deaminase was determined according to method described by Glick and Cattelan, with adaptations^{44,45}. This enzyme is responsible for the cleavage of the plant ethylene precursor, ACC, into ammonia and α -ketobutyrate. Induction of ACC deaminase activity typically includes growing bacterial strains on rich media and then switching the bacteria to minimal medium containing ACC as the sole nitrogen source⁴⁶. *Streptomyces* were initially cultivated in liquid medium ISP2 or ISP4 for seven days under agitation (100 rpm), at 25 ± 2 °C in the light (24h). Then, cultures were centrifuged and the pellet was washed and resuspended ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.5$) in DF medium (Dworkin & Foster medium)⁴⁷ without nitrogen and glucose supplementation (DFm). The DFm suspensions were used for starting new cultures in semisolid medium, according to the treatments i) DF medium complete (DF), ii) DF medium without any nitrogen source (DF-) and iii) DF medium supplemented with ACC (2.4 g/L) as unique nitrogen source (DFacc). All treatments were supplemented with glucose (0.4 %). Treatments were carried out in multiwell culture plates (12 wells) and 1 mL of each treatment medium was added per well. After solidification, 5 μL of the DFm suspension cultures were added per well. Control consisted in water inoculation (5 μL /well). Plates were maintained at 28 °C, in the dark (24h) for 10 days. The ability (presence or absence) for growing was visually evaluated.

Siderophores

In order to determinate the production of siderophores by *Streptomyces*, bacteria were cultivated in liquid medium ISP2 or ISP4 for five days under agitation (100 rpm), at 25 ± 2 °C in

the light (24h). After this period, the density of bacterial suspensions was adjusted ($DO_{600nm} = 0.5$). The universal siderophore assay (CAS/HDTMA-LB plate) was prepared according the cup plate method⁴⁸. The complexes chrome azurol S (CAS) and hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) tightly with ferric iron to produce a blue color. When a strong iron chelator removes iron from the dye complex, the color changes from blue to orange. The bacterial suspension (100 μ L) were added per well (5 mm-well), and plates were incubated at 28 °C for 7 days in dark (24h). Each *Streptomyces* isolate was inoculated in three plates CAS/HDTMA-LB medium with three wells, totalizing 9 samples per bacterium. As negative and positive control, distilled water and Pyrocatechol solution (1 mol) were used, respectively. Measurements were taken considering the diameter of the orange halo zone (mm) after incubation. The results were considered positive when the halo boundary around the well/colony was larger than 2 mm⁴⁹. Data were expressed as mean of the halo boundary.

2.5. *Streptomyces* and plant growth

Young plants of *S. tuberosum* cultivated in greenhouse were splitted in groups of fifteen plants. Plants were watered with 10 ml of *Streptomyces* suspensions (CLVs 04, 09, 16, 20, 145 and 163) at the starting of the experiment and after 15 days. Control consisted in plants watered in the same way as previously described with sterile distilled water. Plant growth was evaluated 30 days after the first *Streptomyces* inoculation. Plants were evaluated considering the shoot and root dry mass increment, shoot length and the number of leaves. Plant material was dried out at 50 °C for 72 hours, or until non variation in mass, for dry mass determination. The growth parameters were expressed as percentage of controls.

2.6. *Streptomyces* and plant resistance

Plants of *S. tuberosum* cultivated in greenhouse were selected and the shoot size was standardized (20 cm in length) before experiments onset. This plants were divided in groups of fifteen and watered with 10 ml of *Streptomyces* suspensions (CLVs 04, 09, 16, 20, 145 and 163) at the starting of the experiment and after 10 days. Control consisted in fifteen standardized plants watered with sterile distilled water. After 15 days of the initial treatment with *Streptomyces*, expanded leaves were detached and placed in sterile Petri dishes (15 x 2.5 cm) with two layers of moistened filter paper (15 ml of sterile distilled water). The petioles were covered with wet cotton in order to reduce the leaf dehydration within the plate. One leaf was placed in each plate. All plates were maintained under light (24h) and controlled temperature (25 ± 2 °C).

Detached leaves were inoculated with *P. carotovorum* in the abaxial surface of the apical leaflet. The suspension was inoculated (100 μ L) using a needleless syringe. Assessments of disease severity were performed along 5 days. Control consisted in plants inoculated with sterile distilled water. The severity of the disease was determined by estimating the leaf area (%) presenting chlorosis (using AxioVision software SE64 Rel. 4.9.1). Each assay consisted in five detached leaves per treatment. Each leaf was detached from one plant and represented one

repetition. The area under the disease progress curve (AUDPC) was also estimated according to the equation described below⁵⁰

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} (y_i + y_{i+1}) / 2 X (t_{i+1} - t_i)$$

Where: y_i = percentage of plants presenting blackleg symptoms (severity at the i -th observation); t_i = time (in days) after sowing at the i -th observation; n = number of days between the disease onset and the last disease assessment.

2.7. Expression of genes

Plants of *S. tuberosum* cultivated in greenhouse were selected and the shoot size was standardized (20 cm in length) before experiments onset. This plants were divided in groups of nine and watered with 10 ml of *Streptomyces* suspension at the starting of the experiment and after 10 days. Control consisted in nine standardized plants watered with sterile distilled water. The *Streptomyces* CLV163 was chosen as the most promisor rhizobacterium and used for watering the plants (10 mL). After 15 days of the treatment with *Streptomyces*, the pathogen *P. carotovorum* was inoculated on the stem, below the first leaf. Leaf samples were collected at 3, 6, 12 and 24h post-inoculation with the pathogen. The treatments were designed as: i) plants watered with CLV163 and inoculated with *P. carotovorum*; ii) plants watered with CLV163 and inoculated with water; iii) plants cultivated without CLV163 and inoculated with *P. carotovorum*; iv) plants cultivated without CLV163 and inoculated with water. Each treatment consisted of nine plants. One leaf from each plant was sampled per time. Each plant consisted in one repetition. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until qRT-PCR analysis.

RNA was extracted from frozen potato leaves following the rapid Trizol-based method^{51,52}. The RNA integrity and quantity were evaluated through agarose gel electrophoresis and fluorometer (Qubit 2.0, Invitrogen, Life Technologies Corporation). Residual genomic DNA was eliminated by treatment with DNase (Turbo DNA-free™ Kit – Ambion®) and cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), following the manufacturer's instructions.

Primers were designed using the Primer3Plus v2.3.6 web interface (<http://primer3plus.com/>). Genes and respective primers used in this study are listed in Table 1. The qRT-PCR analysis was performed in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), using SYBR® Green I (Invitrogen™) as the fluorescent reporter signal and ROX (Invitrogen™) as the passive reference dye. Cycling conditions were: 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, with a final step consisting of a dissociation curve ranging from 60 °C to 95 °C. The specificity of the PCR amplifications was confirmed by sequencing of the amplification products and the formation of primer-dimers was monitored by the presence of a single peak in the melt curve analysis. Target genes were normalized using elongation factor 1-alpha (*EF-1α*) as the internal reference⁵³ and the mean relative gene

expression was calculated according to Pfaffl (2001)³⁹. Estimation of qPCR efficiencies was assessed using the LinRegPCR software version 2014.6.

Table 1 - Genes and primers designed for *S. tuberosum*.

Gene	Abbreviation	*Accession Number	Primers (5'–3')
Pathogenesis-related protein 1	<i>PR-1b</i>	AY050221.1	PR1b-F: TACCAACCAATGTGCAAGCG PR1b-R: TTGTCCGACCCAGTTTCCAA
Ethylene response factor 1	<i>ERF1</i>	NM_001288674.1	ERF1-F: GGTTTAAATGAGCCGGAGCC ERF1-R: CCCC GGCTCTGA ACTTCTAA
Proteinase inhibitor II	<i>PIN2</i>	X99095.1	PIN2-F: GGTACTTGTAAGCGCGATGG PIN2-R: CTGCACAACAGTTGGTGCAT
Elongation factor 1-alpha	<i>EF-1α</i>	AB061263.1	EF1α-F: CTGCACTGTGATTGATGCC EF1α-R: ACCAGCTTCAA AACACCAG

* GenBank® nucleic acid sequence database. National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.8. Statistics

The homogeneity of variances was determined by the Levene's test and when necessary, data were transformed to adjust to the normal distribution. The occurrence of extreme values was determined by BoxPlot test. Means were compared using analysis of variance (ANOVA) complemented by Duncan's t-test, with $p \leq 0.05$. Analyzes were performed using SPSS v17 software.

3. Results and Discussion

The *Streptomyces* isolates analyzed in this survey were able to produce the auxin IAA (Table 2). The highest auxin level was produced by *Streptomyces* CLV145 (131.83 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{g}$), while the lowest level was produced by CLV09 (6.68 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{g}$). Moreover, only the CLV09 was able to produce ACC deaminase (Supplementary Information Figure 2) in the experimental conditions (Table 2).

When the synthesis of siderophores was evaluated by the diffusion method, all *Streptomyces* showed the capacity to produce these chelators (Supplementary Information Figure 1; Table 2). The highest and the lowest diffusion area observed was produced by CLV145 (1.27 cm) and CLV04 (0.30 cm), respectively. The production of siderophores is a common feature in actinomycetes⁵⁴ and many rhizobacteria. They are considered as plant growth inducers due to the ability to make the iron available to plant roots⁵⁵, or even render it unavailable to pathogenic organisms⁵⁴.

S. tuberosum plants inoculated with *Streptomyces* were evaluated in greenhouse conditions for plant growth. The parameters root dry mass ($p=0.31$) and leaves number ($p=0.122$) were not affected by *Streptomyces*. However, the shoot mass ($p=0.025$) and shoot length ($p=0.001$) were affected. The *Streptomyces* CLV16 reduced (10.78%) the root dry mass compared to the control treatment (Figure 1a). While CLV145 and CLV163 did not affect the

growth. However, the CLV145 and CLV163 presented a significant increment in dry mass, compared to CLV16. Unexpectedly, the CLV145 reduced the shoot dry mass (Figure 1b), compared to CLV163. The CLV145 and CLV163 presented high level of both siderophores (1.2 and 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and auxin (131.8 and 96.7 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{g}$, respectively) (Table 2). Although the CLV04 presented low levels of auxin (32.7 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{g}$) and siderophores (Table 2), it did not have a significant negative effect on the root and shoot dry mass production (Figure 1a, b). Regardless of the siderophores levels produced by the isolates, they did not affect the root and shoot growth, compared to the control. It may have occurred because *S. tuberosum* plants were grown in organic commercial soil, which does not present any nutrition restriction for plant growth. This soil probably had no iron restriction, and iron supplementation by siderophores was not critical to plants.

The productive efficiency of *Streptomyces* on plant growth may depend on many factors, such as rhizobacterium and plant species interactions and the soil conditions^{56,14}. Although *Streptomyces* were inoculated in the soil, there was a tendency of shoots to be more affected by the rhizobacteria than the roots. The CLVs 16, 145 and 09 reduced the shoots dry mass in 22.40%, 31.82% and 27.67%, respectively, contrasting to CLV163 that promoted this parameter in 17.93% (Figure 1b). However, all rhizobacteria did not differ from the control. Plants inoculated with CLV163 and CLV09 reduced drastically the shoot length in 86.3% and 85.1%, respectively (Figure 1c). Moreover, regardless of *Streptomyces* evaluated, there were no differences in the number of leaves produced (Figure. 1d). This number ranged from a reduction of 24.19% (CLV145) and an increment of 16.11% (CLV163). These results show that there is a less pronounced effect on the root growth compared to shoot growth, increasing the root/shoot ratio. It has been demonstrated a strong relation between the synthesis of auxin and siderophores in *Streptomyces* and the promotion of seed germination, shoot growth and dry mass increment in wheat⁵⁷. However, auxin produced by bacteria may inhibit the root growth, depending on its concentration. This inhibition was observed in roots of *Solanum nigrum* when endophytic bacteria produced more than 93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of auxin. Whereas low levels of auxin, below 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, promoted the root growth^{58,59}.

Microbial synthesis of IAA has been known for a long time. However, the relationship between plant growth and bacterial IAA has not been completely determined⁶⁰. Approximately 80% of microorganisms isolated from the rhizosphere of various crops are able to produce and release auxins⁵⁵. In a previous study, it has been observed that the all 28 isolated actinobacteria were able to produce auxin, and 11 of them were efficient in promoting the growth of *Arabidopsis*⁶⁰. Our results were similar, since from six *Streptomyces* evaluated, five produced significant levels of IAA, compared to the control.

Although ACC is considered as a plant growth modulator through producing ET⁵⁴, the *Streptomyces* CLV09, the only one that produced ACC deaminase, did not induce a significant difference on plant growth, compared to non-producing ACC deaminase isolates. The modulatory effect of ACC deaminase produced by *Streptomyces* was demonstrated in tomato plants, changing the internal levels of plant ACC⁶¹. Moreover, the effect of ACC deaminase is more

pronounced in plants with elevated ethylene production, under biotic or abiotic stresses^{46,62}, our results might indicate that the experimental plants produced low levels of ACC, or the CLV09 was not able to colonize or interact with plant roots. Taking into account all the results, the production of siderophores and auxin, in this case, were not valuable as parameters for selection of *Streptomyces* with potential PGPR feature. Our data also reinforced that the relationship between actinobacterial metabolites production and plant growth is much more complex and involve other factors, as already reported elsewhere⁶³.

Table 2 - Metabolites produced by *Streptomyces*. Indol-3-acetic acid (IAA), ACC deaminase and siderophores. ACC deaminase is expressed as presence (+) or absence (-). Siderophores production was estimated by the diameter halos formed. Control consisted in culture medium without bacteria. Different letters in columns indicate significant differences (Duncan's test, $p=0.05$). Numbers in parentheses represent standard errors of the mean.

Streptomyces	IAA ($\mu\text{g/mL/g}$)	ACC deaminase	Siderophores (cm)
Control	0.00 e	-	0.00 f
CLV04	32.74 (3.22) d	-	0.30 (0) e
CLV16	65.36 (2.65) c	-	0.33 (0,01) e
CLV20	70.32 (8.93) c	-	0.41 (0,01) d
CLV145	131.83 (5.07) a	-	1.27 (0,03) a
CLV09	6.68 (2.31) e	+	0.62 (0,02) c
CLV163	96.69 (10.00) b	-	0.97 (0,04) b

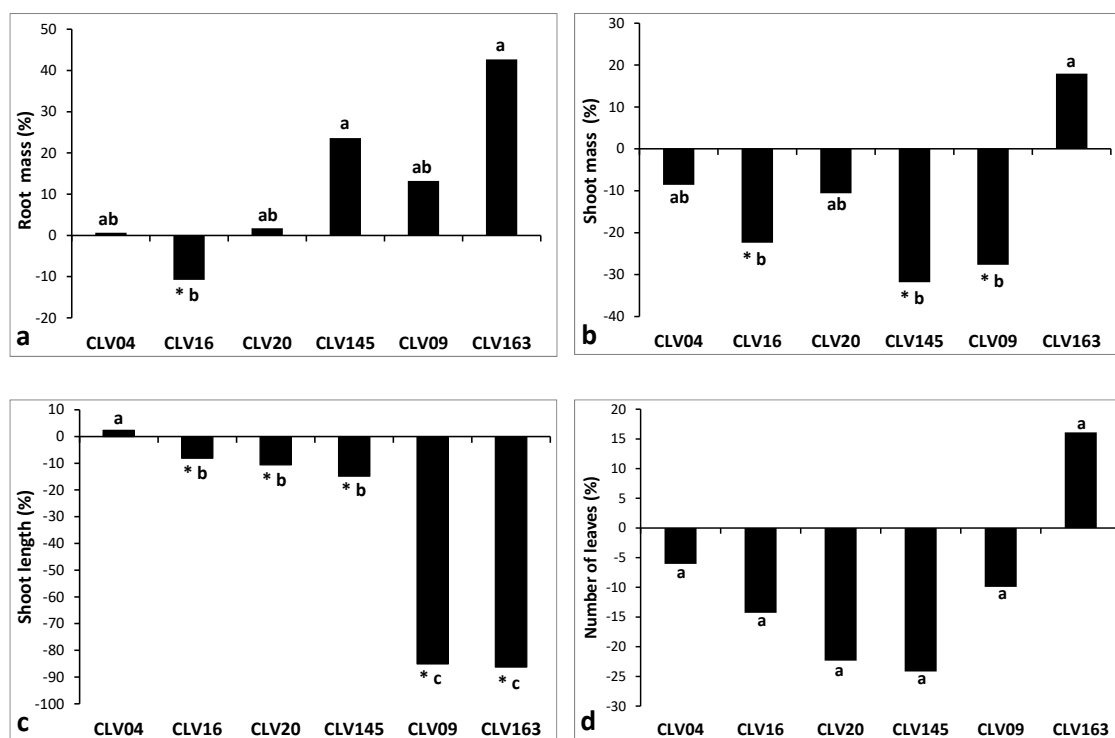


Figure 1 – Growth rate of *Solanum tuberosum* plants inoculated with *Streptomyces* (isolates CLVs 04; 16; 20; 145; 09 and 163). Abscissa axis represents the growth observed in the Control treatment (plants treated with water). All data are expressed as percentage of Control. Plants were evaluated 30 days after initial inoculation. Different letters indicate significant differences between treatments (ANOVA OneWay, Duncan's test; $p \leq 0.05$). Asterisks indicate significant differences between treatments and Control (Student's t-test, $p \leq 0.05$).

The area under the disease progress curve (AUDPC) evaluated the ability of *Streptomyces* in reducing the plant disease caused by *P. carotovorum*. The lowest AUDPC was observed when plants were pretreated with CLV163 (216.57) (Table 3). The reduction in the disease symptoms, promoted by CLV163, was observed two days after pathogen inoculation (Figure 2). At the end of this treatment, plants presented 55.64% of the leaf area with disease symptoms. Plants treated with other CLVs presented leaf area with symptoms varying from 75.43% (CLV09) to 94.78% (CLV16) after 5 days after inoculation. Leaves from the positive and negative controls (solely with, or without pathogen inoculation, respectively), showed 95.62% and 0.00% of the leaf area with symptoms, respectively. The isolates CLV16 and CLV20 presented the highest disease progression (485.11 and 378.27, respectively), and disease symptoms area (94.78% and 92.36%, respectively) (Figure 2). Interestingly, the CLV145 showed an increment in the disease area at the day 2, presenting the largest area of lesion, surpassing the positive control and the isolate CLV16 (Figure 2). However, leaves pretreated with the isolate CLV145 showed 82.32% of the leaf area with disease five days after the pathogen inoculation.

It has already demonstrated the ability of rhizobacteria in inducing plant defense. Rice plants treated with *Pseudomonas fluorescens* and *Chryseobacterium balustinum* showed resistance against the fungus *Pyricularia oryzae* Cav.⁶⁴ Furthermore, the increment on plant

growth and the resistance against *Botrytis cinerea* were observed when plants of *Solanum lycopersicum* were treated with *Bacillus* spp.⁶⁵ Similarly, many *Streptomyces* were able to reduce the disease incidence in plants of *Cucumis melo* L. infected with *Didymella bryoniae*⁶⁶.

In view of these results it is possible to suggest that the isolate CLV163 has promoted a plant systemic defense pathway, since the defense response was faster in relation to the positive control and to the other *Streptomyces*. This result indicates a priming state induced by CLV163. This response is related to a fast and systemic plant defense activation^{67,68,69}. Among the plant defense pathways, the priming is related to ISR promoted by nonpathogenic microorganisms, such as rhizobacteria. It is already known that ISR requires the plant hormones ethylene and jasmonic acid. However, the hormonal cross-talking and specific signaling in the primed ISR response are still unknown³⁰.

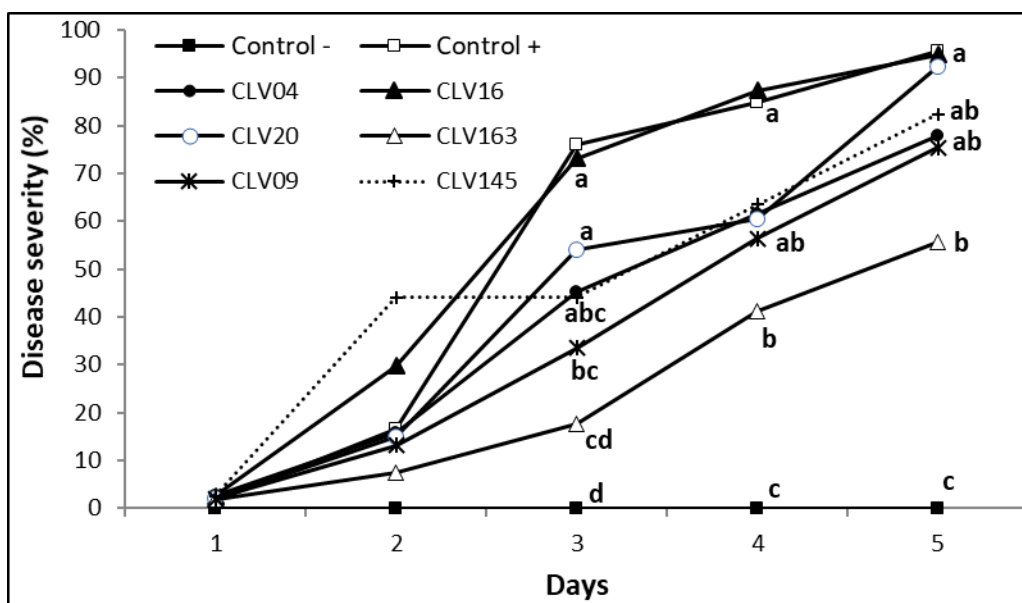


Figure 2 – Disease progression in *S. tuberosum* plants pretreated with six *Streptomyces* isolates and inoculated with *P. carotovorum* after 15 days. Different letters indicate significant differences between treatments within the day (ANOVA OneWay, Duncan's test; $P=0.05$).

Table 3 - Area under the disease progress curve (AUDPC) value in *S. tuberosum* plants. Plants were pretreated with *Streptomyces* and leaves were detached 15 days after this pretreatment. Detached leaves were inoculated with *P. carotovorum*. Control consisted in non-pretreated plants with inoculation (Control +) or non-inoculation (Control -) of pathogen. Different letters in the column indicate significant differences (Duncan's test, $p=0.05$).

Streptomyces	AUDPC
Control -	0.00 c
Control +	477.82 a
CLV04	346.22 ab
CLV16	485.11 a
CLV20	378.27 a
CLV163	216.57 b
CLV09	310.79 ab
CLV145	353.58 ab

There are many reports of priming state promoted by rhizobacteria, such as *Bacillus cereus* and *Pseudomonas putida* LSW17S, promoting an upregulation of genes related to plant defense and ISR^{70,71}. The expression of genes related to SA, JA and ET pathways were analyzed in potato plants treated with the *Streptomyces* CLV163. This isolate was chosen due to its ability to produce IAA and siderophores, promote the increment of root and shoot dry mass and delay the progression of the disease symptoms caused by *P. carotovorum*.

Plants treated with *CLV163+P.carotovorum* or *H₂O+P.carotovorum* showed a significant increment in *PR-1b* expression at 3h (Figure 3a). However, only the treatment *CLV163+P.carotovorum* increased this gene expression over the time. Since the *PR-1b* is related to SA pathway and systemic defense activation⁷², the results suggest that the pretreatment with CLV163 ameliorate the systemic signaling system against pathogen, improving plant defense. The expression of *PR-1b* in plants treated with *H₂O+P.carotovorum* was short and restrict to the beginning of pathogen infection. The plant defense generated by a pathogenic microorganism usually occurs through the activation of the SA pathway⁷³. Moreover, the expression of *PR-1b* in plants treated with *H₂O+H₂O* or *CLV163+H₂O* remained at very low level along the time, maintaining the expression at the basal level.

The expression of the gene *PIN2* is related to jasmonate pathway. In general, plants treated with *H₂O+P.carotovorum* presented an increment in this expression at 3h (Figure 3b). Plants treated with *CLV163+P.carotovorum* showed an increment in *PIN2* expression only 24h after the pathogen inoculation, delaying the JA responses. There was no significant change in *PIN2* expression when plants were treated with *CLV163+H₂O*. *PIN2* is a well-established JA-responsive gene^{74,75,76} and it is repressed by SA pathway. The results suggest an antagonism between the SA and JA signaling pathways in plants treated with *CLV163+P. carotovorum* in the first 6 hours. However, this antagonism was not observed at 24h (Figure 3a, b). Interestingly, the treatment *H₂O+P. carotovorum* showed an increment in both *PR-1b* and *PIN2* expression at 3h. The expression of *ERF1* was faster in the plants treatment *CLV163+P. carotovorum* than in the

treatment $H_2O+P.carotovorum$. Therefore, our results suggest a long-term expression of *PR-1b* and *ERF1* when plants were treated with CLV163+*P. carotovorum* (Figure. 3a, b, c). This data suggest a possible preferential promotion of SA and ET signaling pathway instead of the SA and JA pathways.

It has been reported that non-pathogenic organisms such as *Streptomyces*, activate the ISR pathway, which is dependent on JA/ET⁷⁷. Although the ethylene acts via *ERF*, this gene is also responsive to JA signaling pathway, leading to plant defense against necrotrophic pathogens⁷⁸. The *ERF* is able to signal for ISR via the *NPR1* gene that is a well-known component of the SA pathway⁷⁹. Ethylene signaling acts downstream of the JA pathway but upstream of *NPR1* in ISR activation. Thus, the *NPR1* is required to mount the ISR⁷⁹. According to recent reports, the ISR response is activated by SA and JA pathway instead of JA and ET^{80,81}. In addition, red oak and *Arabidopsis* plants treated with *Streptomyces* showed an upregulation of genes related to both ISR and SAR^{82,83}. These results are in accordance to our finds. The CLV163 lead to an early *PR-1b* upregulation, characterizing a SA-dependent defense pathway, and a later *PIN2* expression (a JA marker), after pathogen inoculation.

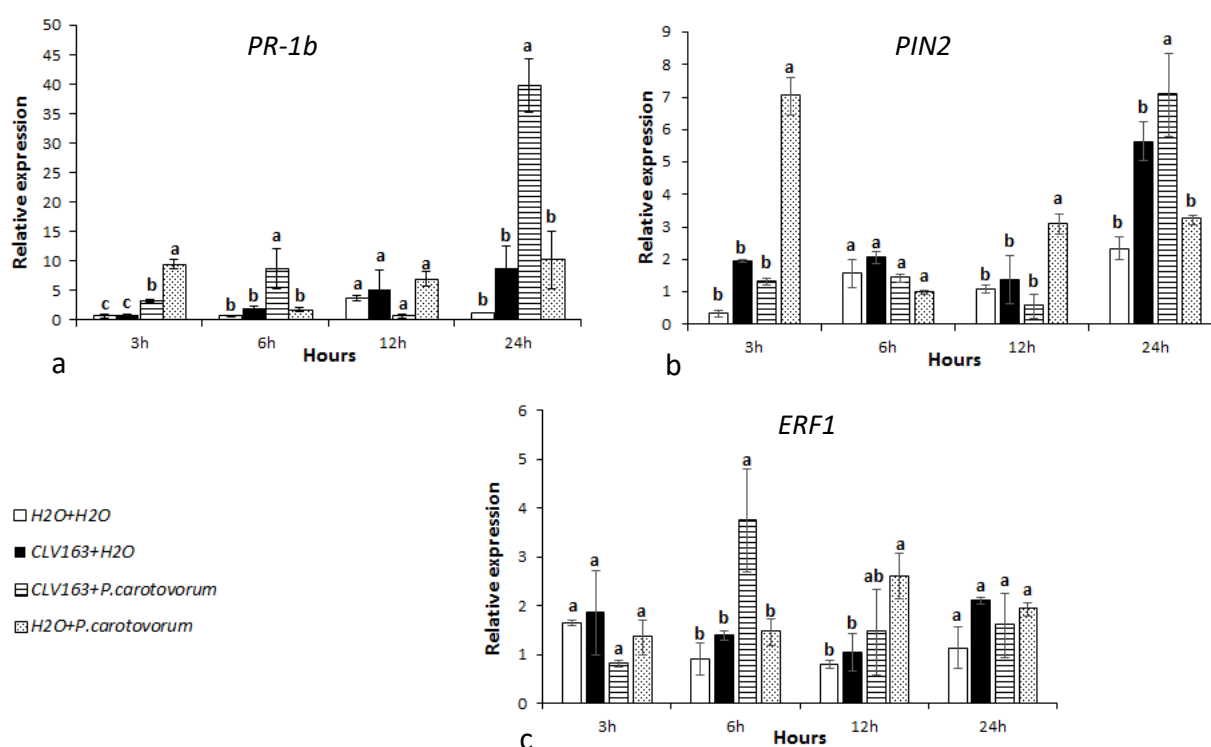


Figure 3 – Relative gene expression *PR-1b*, *PIN2* and *ERF1*. Plants were pretreated with CLV163 and inoculated with *P. carotovorum* after 15 days. Controls consisted in plants treated with water and inoculated with water or the pathogen. Different letters indicate significant differences between treatments within the same hour (ANOVA OneWay, Duncan's test; $p=0.05$).

CLV163 and CLV145 present PGPR features, such as high auxin and siderophores production. However, only the CLV163 showed the ability to interact with *S. tuberosum* inducing plant defense against *P. carotovorum*, without compromising the plant growth. The capacity of

Streptomyces to produce ACC deaminase was not a crucial feature for PGPR selection. In addition, CLV163 induced a long-term expression of plant genes related to defense pathways. The CLV163 promoted the upregulation of genes associated to defense only when plants were challenged with *P. carotovorum*. This response occurs via SA and ET signaling instead of the JA pathway. Taking into account all these results, we suggest an induced priming state promoted by CLV163 in *S. tuberosum* plants, and a cross-talking between SA and ET pathways in response to the necrotrophic phyto bacterium. Moreover, further studies are necessary to clarify the effect of CLV163 on plant defense based on SA and ET signaling.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Andreia Mara Rotta de Oliveira, from the Phytopathology Laboratory of Fepagro RS/Brazil. This work was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 403843/2013-8) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

1. Aittamaa, M. *et al.* Distinguishing bacterial pathogens of potato using a genome-wide microarray approach. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 705–717 (2008).
2. Jardim, I. C. S. F., Andrade, J. de A. & Queiroz, S. C. do N. de. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. *Quim. Nova* **32**, 996–1012 (2009).
3. Pereira, A. da S. & Daniel, J. *O cultivo da batata na região sul do Brasil.* (2003).
4. King, U. Draft Genome Sequences of Three Pectobacterium Strains Causing. *Genome* **3**, 3–4 (2015).
5. Schippers, B., Bakker, A. W. & Bakker, P. A. H. M. Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 339–358 (1987).
6. Ashrafuzzaman, M. *et al.* Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **8**, 1247–1252 (2009).
7. Gholami, A., Shahsavani, S. & Nezarat, S. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination , Seedling Growth and Yield of Maize. 19–24 (2009).
8. Gray, E. J. & Smith, D. L. Intracellular and extracellular PGPR : commonalities and distinctions in the plant – bacterium signaling processes. **37**, 395–412 (2005).
9. Bhattacharyya, P. N. & Jha, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1327–1350 (2012).
10. Pieterse, C. M. J. *et al.* Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 1–29 (2014).
11. Wei, G., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. Induction of Systemic Resistance of Cucumber to Colletotrichum orbiculare by Select Strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

- Phytopathology* **81**, 1508 (1991).
12. Cassan, F. D. & Luna, M. V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean ... (2009).
doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
 13. van Peer, R., Niemann, G. J. & Schippers, B. Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r.PDF. *Phytopathology* **81**, 728–734 (1991).
 14. Vacheron, J. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* **4**, 356 (2013).
 15. Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. M. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 489–521 (2012).
 16. J.Y. Leveau, M. B. MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL. 608 (2000). Available at:
<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-9.htm>.
 17. Alexander, M. *Introduction to soil microbe.* (1977).
 18. Fialho de Oliveira, M., Germano da Silva, M. & Van Der Sand, S. T. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology* **161**, 565–572 (2010).
 19. Dalmas, F. R., Pereira, T. C. B., Bogo, M. R. & Astarita, L. V. Autochthonous *Streptomyces* regulate the metabolism of seedlings of *Araucaria angustifolia* (Coniferales) during root colonisation. *Aust. J. Bot.* **59**, 118–125 (2011).
 20. Daros Salla, T., Ramos da Silva, T., Vieira Astarita, L. & Romanato Santar em, E. *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. *Plant Physiol. Biochem.* **85**, 14–20 (2014).
 21. Conrath, U. *et al.* Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 1062–1071 (2006).
 22. De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P. A. H. M. & Hofte, M. *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against *Magnaporthe oryzae* Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. *Plant Physiol.* **148**, 1996–2012 (2008).
 23. Hase, S. *et al.* Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol.* **57**, 870–876 (2008).
 24. Pieterse, C. M. J. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571–1580 (1998).
 25. Pineda, A., Zheng, S.-J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J. & Dicke, M. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci.* **15**, 507–514 (2010).

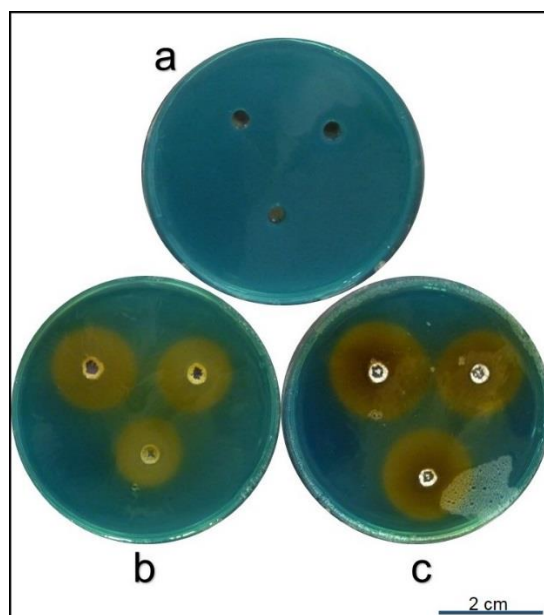
26. Hoffland, E., Pieterse, C. M. J., Bik, L. & Van Pelt, J. A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**, 309–320 (1995).
27. Van, W. S. C. *et al.* Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 716–724 (1997).
28. Verberne, M. C., Hoekstra, J., Bol, J. F. & A, H. J. M. L. Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant J.* **35**, 27–32 (2003).
29. Pieterse, C. M. J. *et al.* RIZOBACTÉRIAS E COMUNICAÇÃO NA ROTA. **13**, 277–295 (2005).
30. Conrath, U. Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* **16**, 524–531 (2011).
31. Niu, D. *et al.* *Bacillus cereus* AR156 primes induced systemic resistance by suppressing miR825/825* and activating defense-related genes in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* **58**, 426–439 (2016).
32. Kazan, K. & Manners, J. M. MYC2: The Master in Action. *Mol. Plant* **6**, 686–703 (2013).
33. Susheng Song¹, Tiancong Qi¹, Claus Wasternack², a, D. X. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**, 112–119 (2014).
34. Catinot, J. *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96 positively regulates Arabidopsis resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate- and ethylene-responsive defence genes. *Plant. Cell Environ.* n/a-n/a (2015).
doi:10.1111/pce.12583
35. Li, C. *et al.* The Tomato Suppressor of prosystemin-mediated responses² Gene Encodes a Fatty Acid Desaturase Required for the Biosynthesis of Jasmonic Acid and the Production of a Systemic Wound Signal for Defense Gene Expression. *Plant Cell* **15**, 1646–1661 (2003).
36. Zhao, Y. *et al.* Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J.* **36**, 485–499 (2003).
37. Fowler, J. H. *et al.* Leucine aminopeptidase regulates defense and wound signaling in tomato downstream of jasmonic acid. *Plant Cell* **21**, 1239–1251 (2009).
38. Tada, Y. *et al.* Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science (80-)*. **321**, 1–9 (2008).
39. Fu, Z. Q. & Dong, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 839–63 (2013).
40. Yan, S. & Dong, X. Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**, 64–68 (2014).
41. Ryals, J. a *et al.* Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809–1819 (1996).
42. Masayuki Hayakawa, H. N. A New Method for the Intensive Isolation of Actinomycetes from Soil. *Actinomycetologica* **3**, 95–104 (1989).
43. Salkowski, E. Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. *Zeitschrift für*

- Physiol. Chemie* **9**, 23–33 (1885).
44. Glick, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**, 109–117 (1995).
 45. Cattelan, A. J. Métodos Qualitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. *Embrapa Soja* **139**, 36 (1999).
 46. Glick, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **169**, 30–39 (2014).
 47. DWORKIN, M. & FOSTER, J. W. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* **75**, 592–603 (1958).
 48. Dingle, J., Reid, W. W. & Solomons, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II—Application of the ‘Cup-plate’ assay to the estimation of enzymes. *J. Sci. Food Agric.* **4**, 149–155 (1953).
 49. Lucas, J. A., Garc, J., Bonilla, A., Ramos, B. & Gutierrez-ma, J. Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **82**, 44–53 (2014).
 50. Campbell, C. L. & Madden, L. V. *Introduction to Plant Disease Epidemiology.* (1990).
 51. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
 52. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532–537 (1993).
 53. Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329 (2006).
 54. Anwar, S., Ali, B. & Sajid, I. Screening of rhizospheric actinomycetes for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016).
 55. Ahemad, M. & Kibret, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* **26**, 1–20 (2014).
 56. de Souza, R., Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* **38**, 401–419 (2015).
 57. Sadeghi, A. & Karimi, E. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. 1503–1509 (2012). doi:10.1007/s11274-011-0952-7
 58. Long, H. H., Schmidt, D. D. & Baldwin, I. T. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One* **3**, (2008).
 59. Radmann, E. B., Fachinello, J. C. & Peters, J. A. Effect of auxin and cultivation conditions in in vitro rooting of root-stoock of apple ‘M-9’. . *Rev. Bras. Frutic.* **24**, 624–628 (2002).
 60. Arunachalam Palaniyandi, S., Yang, S. H., Damodharan, K. & Suh, J. W. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with

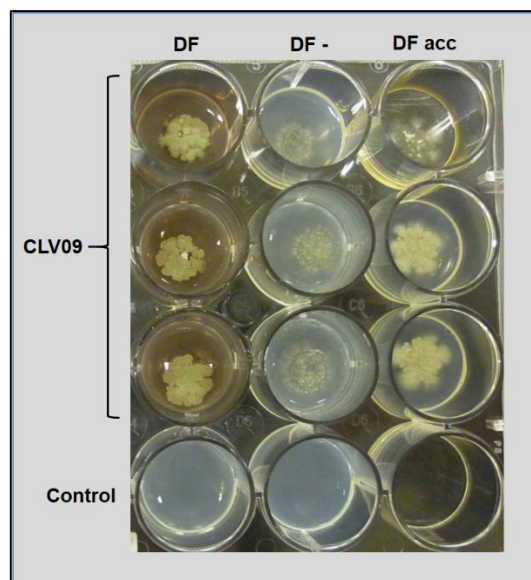
- yam rhizosphere. *J. Basic Microbiol.* **53**, 985–995 (2013).
61. El-Tarabily, K. A. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* **308**, 161–174 (2008).
 62. Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 635–648 (2007).
 63. Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L. & Suh, J. W. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9621–9636 (2013).
 64. Lucas, J. A. et al. Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *F. Crop. Res.* **114**, 404–410 (2009).
 65. Xu, S. J., Park, D. H., Kim, J. Y. & Kim, B. S. Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. *Trop. Plant Pathol.* **41**, 169–176 (2016).
 66. Zhao, J. et al. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biocontrol of gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) and growth promotion of *Cucumis melo* L. *Biocontrol Sci. Technol.* **22**, 23–37 (2012).
 67. Heil, M. & Bostock, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.* **89**, 503–512 (2002).
 68. L. Sticher, B Mauch-Mani, and J. M. Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 235–270 (1997).
 69. Biologie, D. De, Fribourg, U. De & Gockel, R. a. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Ann. Bot.* **82**, 535–540 (1998).
 70. Yang, J. W., Yu, S. H. & Ryu, C. M. Priming of defense-related genes confers root-colonizing bacilli-elicited induced systemic resistance in pepper. *Plant Pathol. J.* **25**, 389–399 (2009).
 71. Ahn, I.-P., Lee, S.-W. & Suh, S.-C. Rhizobacteria-Induced Priming in *Arabidopsis* Is Dependent on Ethylene, Jasmonic Acid, and *NPR1*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 759–768 (2007).
 72. Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **4**, 1044–1051 (2012).
 73. Gao, Q.-M., Kachroo, A. & Kachroo, P. Chemical inducers of systemic immunity in plants. *J. Exp. Bot.* **65**, 1849–55 (2014).
 74. Doares, S. H., Narvez-Viquez, J., Conconi, A. & Ryan, C. A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **(**, 1741–1746 (1995).
 75. Peña-Cortés, H., Fisahn, J. & Willmitzer, L. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4106–13 (1995).

76. Dammann, C., Rojo, E. & Sánchez-Serrano, J. J. Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *Plant J.* **11**, 773–782 (1997).
77. Pangesti, N. *et al.* Jasmonic Acid and Ethylene Signaling Pathways Regulate Glucosinolate Levels in Plants During Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance Against a Leaf-Chewing Herbivore. *J. Chem. Ecol.* 1–14 (2016). doi:10.1007/s10886-016-0787-7
78. Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 308–316 (2009).
79. Kevin L.-C. Wang, Hai Li, J. R. E. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant Cell* 131–151 (2002). doi:10.1105/tpc.001768
80. García-Gutiérrez, L. *et al.* The antagonistic strain *Bacillus subtilis*UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb. Biotechnol.* **6**, 264–274 (2013).
81. Ryu, C. M., Hu, C. H., Reddy, M. S. & Kloepper, J. W. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytol.* **160**, 413–420 (2003).
82. Niu, D.-D. *et al.* The plant growth-promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**, 533–542 (2011).
83. Conn, Walker, R. & Franco, C. M. M. Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Am. Phytopathol. Soc.* **21**, 208–218 (2008).

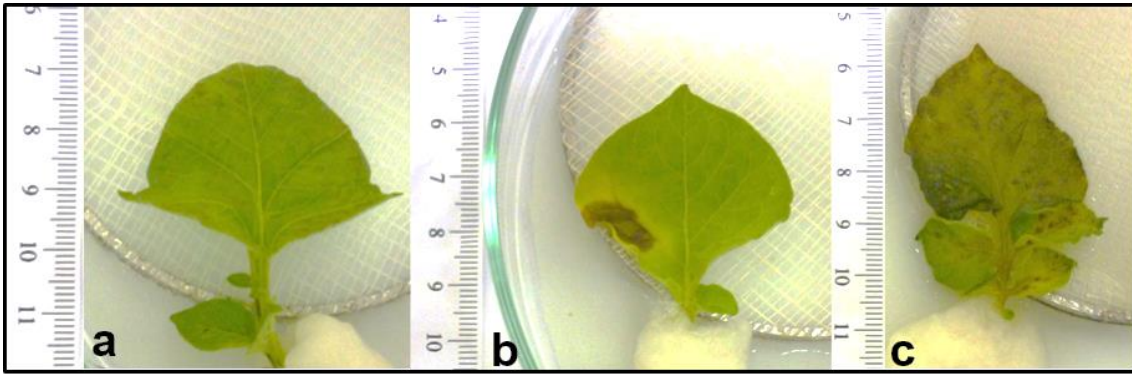
Supplementary Information



SI Figure 1 – Siderophore production by *Streptomyces* (CAS/HDTMA-LB plate assay). Control (a); CLV163 (b) and CLV165 (c). Measurements were taken considering the diameter of the orange halo zone (mm).



SI Figure 2 – ACC deaminase activity from *Streptomyces* CLV09 cultivated in DF medium (Dworkin & Foster medium)⁴⁶. Complete medium (DF), medium without any nitrogen source (DF-) and medium supplemented with ACC (2.4 g/L) as unique nitrogen source (DFacc). Control consisted in medium inoculated with water.



SI Figure 3 – Detached leaves of *S. tuberosum* cultivated in Petri-dishes. Plants were watered with *Streptomyces* and leaves were removed after 15 days. Detached leaves were inoculated with *P. carotovorum* pv. *brasiliensis* and cultivated in Petri-dishes for 5 days. Control consisted in plants cultivated and inoculated with water (a); plants cultivated with CLV163 and detached leaves inoculated with the pathogen (b); plants cultivated with water and detached leaves inoculated with the pathogen (c).

CAPÍTULO III

Conclusões

Perspectivas

CONCLUSÕES

- Todos os isolados foram capazes de produzir AIA, sendo que CLV09 foi o único que não se diferenciou estatisticamente do controle.
- Quanto a produção de ACC desaminase, apenas o isolado CLV09 apresentou a capacidade de utilizar o substrato ACC como única fonte de nitrogênio.
- Todos os isolados de *Streptomyces* foram capazes de produzir sideróforos.
- Não foi possível observar um aumento significativo no crescimento e na produção de biomassa nas plantas tratadas com os isolados de *Streptomyces*, mesmo quando estas rizobactérias possuíam a capacidade de produzir auxina, sideróforos ou ACC desaminase.
- Embora as *Streptomyces* tenham sido inoculadas no solo, existe uma tendência de crescimento da parte aérea ser mais afetado pelas rizobactérias.
- Comparando-se o desempenho das rizobactérias entre si, observa-se que o CLV163 apresentou características de PGPR, tais como a produção de altas quantidades de auxinas e sideróforos, além da capacidade de interagir com *S. tuberosum* aumentando a massa seca da raiz.
- Houve diminuição da progressão da doença causada pelo patógeno *Pectobacterium* em folhas de *S. tuberosum*, quando as plantas foram tratadas com a *Streptomyces* CLV163 sem o comprometimento do crescimento da planta.
- O CLV163 promoveu a regulação positiva de genes associados à defesa somente quando as plantas foram desafiadas com *P. carotovorum*.
- A resposta inicial de defesa gerada pelo isolado CLV163 ocorreu pela via de sinalização AS e ET ao invés da via do JA.
- Tendo em vista estes resultados, considera-se que o CLV163 promova um estado de *priming* nas plantas de *S. tuberosum*, ocorrendo uma sinalização cruzada entre as vias AS e ET em resposta ao patógeno *P. carotovorum*.

PERSPECTIVAS

Como próximos passos para esta pesquisa serão realizadas as análises de identificação molecular dos isolados para a confirmação do gênero *Streptomyces*. Também almeja-se definir se existe uma interação cruzada entre as vias dependentes de AS e JA/ET, a partir da análise de um número maior de genes marcadores de defesa, tais como *NPR1*, *PR2*, *JAZ*, *COI*, *LOX* e *ACC oxidase*. Por fim, pretende-se avaliar o isolado CLV163 como indutor de defesa em outras espécies vegetais de uso comercial, com a finalidade de verificar a sua habilidade de aumentar a resistência contra patógenos bacterianos e fúngicos em diferentes cultivares. Desta forma, pode-se ampliar avaliação do potencial de uso deste indutor de resistência, visando desenvolver

formulações capazes de gerar um produto comercial que promova respostas de defesa sem comprometer o desenvolvimento e a produtividade vegetal.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br