

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

**TIAGO SARTOR**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM PLANTAS DE  
*Solanum tuberosum* TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO E EXTRATO BACTERIANO**

Porto Alegre

2015

TIAGO SARTOR

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM PLANTAS DE  
*Solanum tuberosum* TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO E EXTRATO BACTERIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Romanato Santarém

Porto Alegre

2015

TIAGO SARTOR

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM PLANTAS DE  
*Solanum tuberosum* TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO E EXTRATO BACTERIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira – PUCRS

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros – UFLA

Dr<sup>a</sup>. Leonor Guerra Guimarães – ICT

Porto Alegre

2015

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Leandro V. Astarita e Eliane R. Santarém pelos 7 anos de ensinamentos, paciência, dedicação e exemplo profissional.

À toda minha família pelo apoio dado durante a realização deste mestrado, em especial à minha mãe Clara e minha irmã Sarah, que vivenciaram de perto os momentos mais intensos e *alvorçados* de estudo e trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da PUCRS, sem os quais esta jornada jamais teria sido a mesma. Obrigado por transformarem o laboratório em um ambiente produtivo e divertido de se trabalhar.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A batata é atualmente o terceiro alimento mais consumido no mundo, depois do arroz e do trigo, além de ser um recurso importante no combate à fome em países subdesenvolvidos. Entretanto, plantas de batata são atacadas por diversas pragas e patógenos, que representam uma ameaça à produção global de tubérculos. Ao contrário dos animais, as plantas não possuem um sistema imune adaptativo. Dessa forma, as plantas dependem que cada célula, individualmente, tenha a capacidade de perceber o patógeno, sinalizar às células vizinhas e produzir uma resposta de defesa. As células vegetais percebem o contato do patógeno através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), desencadeando cascatas de sinalização que levam à ativação de genes de defesa, os quais caracterizam a ocorrência de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR). Dentre os fatores envolvidos na regulação de genes relacionados à defesa, o ácido salicílico é amplamente conhecido como um eliciador da defesa vegetal contra patógenos biotróficos. Além deste hormônio, foi demonstrado que o extrato bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (denominado de indutor XTH) possui a característica de induzir resistência contra fitobactérias pectolíticas através de mecanismos ainda pouco conhecidos. Considerando as diferentes vias de sinalização envolvidas na defesa vegetal, pretendeu-se investigar a ocorrência de resistência sistêmica em plantas de *Solanum tuberosum* tratadas com indutor XTH ou ácido salicílico, através da análise transcricional dos genes *PR-1b*, *PR-2*, *ChtA*, *PAL*, *Pin2*, *JAZ1/TIFY10A* e *ERF1*. Os resultados sugerem que o indutor XTH tem a capacidade de induzir resistência sistêmica em plantas de batata através da ativação concomitante das vias de sinalização do ácido salicílico, jasmonato e etileno.

**Palavras-chave:** Resistência sistêmica, *Xanthomonas*, batata, SAR.

## ABSTRACT

Potato is currently the third most consumed food crop after rice and wheat, and it is a valuable resource for alleviating poverty in undeveloped countries. However, potato crop fields are attacked by numerous pests and pathogens, which represent a threat to the global potato production. Unlike animals, plants do not possess an adaptive immune system. Therefore, each individual plant cell needs to be able to perceive the pathogen, release signals to neighbor cells, and produce a defense response. Plant cells recognize the pathogen through Pattern Recognition Receptors (PRRs), triggering a signaling cascade that results in the activation of defense-related genes, which characterize the occurrence of Systemic Acquired Resistance (SAR). Among the factors involved in the regulation of defense-related genes, salicylic acid is widely known as an elicitor of plant defense against biotrophic pathogens. Besides this hormone, it has been demonstrated that a bacterial extract of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (referred to as XTH) is capable of inducing resistance against pectolytic bacteria via poorly understood mechanisms. Considering the different signaling pathways involved in plant defense, we intended to investigate the occurrence of systemic resistance in *Solanum tuberosum* plants treated with XTH or salicylic acid, by analyzing the expression of *PR-1b*, *PR-2*, *ChIA*, *PAL*, *Pin2*, *JAZ1/TIFY10A*, and *ERF1* genes. Our results suggest that XTH is capable of inducing systemic resistance in potato plants via concomitant activation of the salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene signaling pathways.

**Key-words:** Systemic resistance, *Xanthomonas*, potato, SAR.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	8
1. Introdução .....	9
1.1 História e importância econômica da batata .....	9
1.2 Doenças de <i>Solanum tuberosum</i> .....	10
1.3 Mecanismos de defesa contra patógenos: Resistência Sistêmica Adquirida.....	11
2. Justificativa .....	20
3. Objetivos.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
Referências .....	22
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO .....	25
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	44
1. Considerações finais .....	45
2. Perspectivas futuras .....	47
Referências .....	49

# **CAPÍTULO 1**

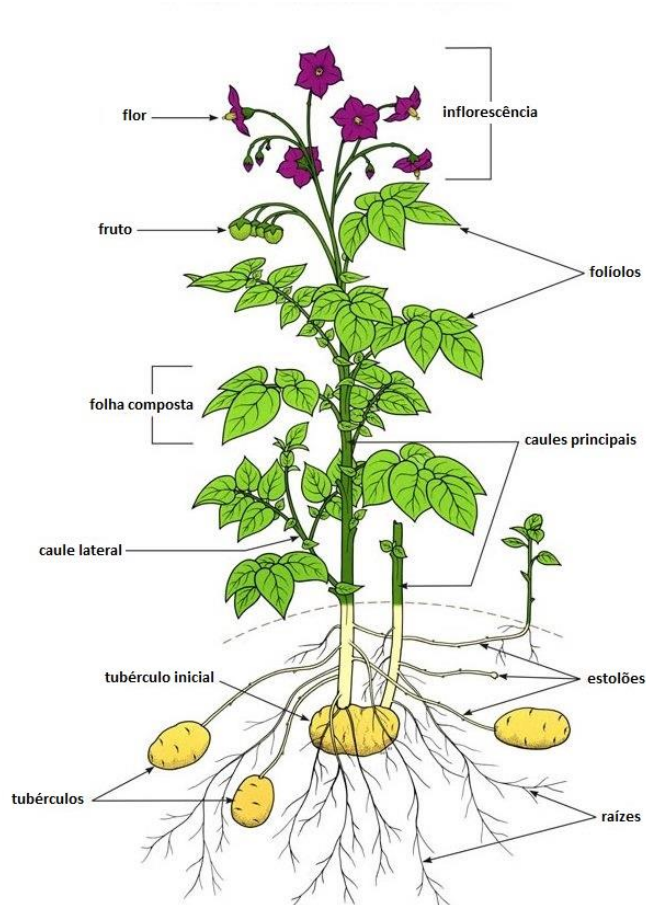
## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1. Introdução

### 1.1 História e importância econômica da batata

A batata (*Solanum tuberosum*) é oriunda da região tropical Andina, onde, há aproximadamente 8.000 anos, cultivares selvagens foram domesticados por americanos nativos (Figura 1) (FAO, 2008). A difusão da batata pelo mundo só iniciou-se a partir de 1532 quando os espanhóis passaram a colonizar a porção ocidental da América do Sul. Os primeiros registros do cultivo da batata na Europa datam de 1565 nas Ilhas Canárias e de 1573 no território continental espanhol (FAO, 2008).



**Figura 1.** Características morfológicas de plantas de *Solanum tuberosum* (Fonte: <http://cipotato.org/potato/how-potato-grows>).

Atualmente, a batata é considerada pela FAO como um alimento-base para a população mundial e um importante recurso no combate à fome em países subdesenvolvidos (FAO, 2008). A batata produz maior quantidade de amido por hectare do

que qualquer outro cultivo e é o segundo alimento com maior teor de proteínas depois da soja (Oerke, 2006). Neste cenário, a batata está posicionada como o terceiro maior cultivo em termos de consumo humano, atrás apenas do arroz e do trigo (CIP, 2013) e quinto lugar em termos de produção global, aumentando de aproximadamente 330 milhões de toneladas em 2010 para cerca de 370 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2012).

Apesar de sua crescente produção, o cultivo da batata é severamente ameaçado por microrganismos patogênicos, responsáveis por perdas expressivas na produção, estimadas anualmente em até 15% (Oerke, 2006). Isso significa que no ano de 2012, entre 50 e 55,5 milhões de toneladas de tubérculos foram perdidos somente devido à ação de patógenos. Sem a devida proteção da lavoura, como o uso de defensivos agrícolas, as perdas causadas por microrganismos podem ser superiores a 20% (Oerke, 2006).

## **1.2 Doenças de *Solanum tuberosum***

Plantas de batata são suscetíveis ao ataque de diferentes organismos patogênicos e parasitas, incluindo bactérias, fungos, oomicetos, vírus, nematóides e insetos (CIP, 1996; Pereira & Daniels, 2003; Wharton, 2013). Dentre as diversas doenças que acometem plantas de batata, destacam-se a requeima, a murcha bacteriana e a podridão mole (FAO, 2008; CIP, 2013).

Causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*, a requeima é considerada a principal doença de *S. tuberosum* no mundo atualmente (FAO, 2008; CIP, 2013). A requeima se caracteriza pelo surgimento de manchas marrom-avermelhadas em folhas, caules e tubérculos da planta infectada. Em folhas, sua presença pode ser evidenciada na forma de um mofo branco-acinzentado tênue na superfície abaxial (Pereira & Daniels, 2003; Pereira, 2011).

A murcha bacteriana e a podridão mole são doenças bacterianas que ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do planeta, sendo especialmente favorecidas em condições climáticas úmidas (Pereira & Daniels, 2003; Pereira, 2011; CIP, 2013). A murcha bacteriana é causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, que infecta a planta pelas raízes e coloniza os vasos do xilema, causando o sintoma de murcha em folhas e ramos (Pereira & Daniels, 2003). Em estágios mais avançados, a planta seca e morre (Pereira, 2011).

A podridão mole é causada por bactérias pectolíticas pertencentes aos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya* (Enterobacteriaceae) (Davidsson *et al.*, 2013). A doença é caracterizada por lesões necróticas que ocasionam a desintegração do tecido parenquimático de caules e raízes da planta infectada (Figura 2) (Toth *et al.*, 2003; Pereira, 2011). Especificamente, *P. carotovorum* é considerada a mais difusa dentre as enterobacteriáceas pectolíticas e a principal agente causadora da podridão mole em batata (Davidsson *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Tubérculo apresentando sintomas de infecção por *Pectobacterium carotovorum*

(Fonte: <http://www.potatodiseases.org/seedpiecehealth.html>).

Infecções virais, embora menos frequentes e significativas, podem ser introduzidas em plantações através de tubérculos infectados e rapidamente disseminadas através de vetores, como por exemplo, pulgões (Pereira & Daniels, 2003; Pereira, 2011). Alguns vírus podem reduzir os rendimentos na produção em mais de 50%, caso o devido controle dos vetores não seja efetuado (Pereira, 2011; CIP, 2013).

### **1.3 Mecanismos de defesa contra patógenos: Resistência Sistêmica Adquirida**

O sistema imune vegetal vem sendo extensivamente estudado a fim de se compreender quais são os processos celulares envolvidos na percepção dos patógenos, bem como as vias de sinalização que, em última análise, levam à resistência da planta. Diferentemente dos animais, as plantas não apresentam um sistema imune adaptativo com células móveis. Dessa forma, elas dependem que cada célula, individualmente, tenha a

capacidade de perceber o patógeno, sinalizar às células vizinhas e produzir uma resposta de defesa (Spoel & Dong, 2012; Fu & Dong, 2013).

Microrganismos, de um modo geral, possuem estruturas conservadas denominadas de MAMPs ou PAMPs (*microorganism/pathogen-associated molecular patterns*). MAMPs/PAMPs podem ser lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, flagelina, fator de alongação Tu (EF-Tu) ou fragmentos de quitina (Spoel & Dong, 2012; Davidsson *et al.*, 2013). Estas estruturas altamente conservadas são reconhecidas por receptores de membrana extracelulares, denominados de PRRs (*pattern recognition receptors*), os quais são os primeiros responsáveis pela percepção de microrganismos potencialmente patogênicos (Spoel & Dong, 2012; Davidsson *et al.*, 2013). As respostas de defesa ativadas por MAMPs são denominadas de MTI (*MAMP-triggered immunity*) e são respostas geralmente de baixa intensidade e restritas ao local de contato com o microrganismo, não havendo uma ativação expressiva da defesa em órgãos e tecidos distantes do local de infecção (Takken & Taming, 2009; Liu *et al.*, 2013).

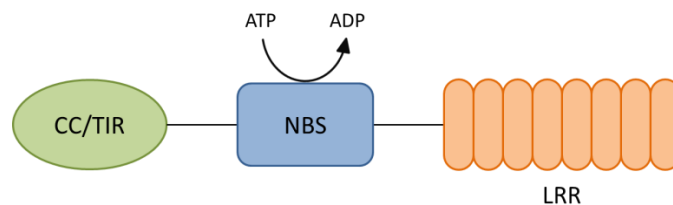
Patógenos bem adaptados, entretanto, podem apresentar estratégias para burlar a MTI através da produção de proteínas efetoras, que são inseridas no citoplasma da célula vegetal para inibir cascatas de sinalização que levam à defesa, possibilitando assim uma infecção bem-sucedida. Por exemplo, as bactérias *Erwinia amylovora* e *Pantoea stewartii* utilizam-se de efetores para suprimir genes da via de sinalização do ácido salicílico em seus hospedeiros (DeRoy *et al.*, 2004; Boureau *et al.*, 2005; Ham *et al.*, 2006; Ham *et al.*, 2008). Algumas plantas, por outro lado, através de co-evolução, desenvolveram receptores intracelulares (proteínas R) que têm como função identificar diretamente a presença destes efetores ou indiretamente, detectando alterações nas proteínas-alvo dos mesmos (Heidrich *et al.*, 2012; Spoel & Dong, 2012).

Proteínas R caracterizam-se principalmente pela presença de um domínio CC (*coiled-coil*) ou TIR (*Toll/Interleukin-1 receptor*) na extremidade amino-terminal, um sítio NBS (*nucleotide binding site*) e uma região LRR (*leucine rich repeats*) (Figura 3) (Heidrich *et al.*, 2012; Takken & Goverse, 2012). Geralmente, a ativação de uma proteína R resulta em uma resposta de hipersensibilidade, caracterizada pela superprodução de espécies reativas de oxigênio e morte celular programada na região infectada do tecido. O mecanismo de

ativação da defesa através de proteínas R é chamado de ETI (*effector-triggered immunity*) (Foyer & Noctor, 2005; Heidrich *et al.*, 2012; Spoel & Dong, 2012).

Em alguns casos, o patógeno evoluiu para utilizar este mecanismo a seu favor, como na interação entre a planta *Arabidopsis thaliana* e o fungo *Cochliobolus victoriae*. A toxina victorina, produzida pelo fungo, se liga e inibe a atividade de tiorredoxinas envolvidas na via de sinalização do ácido salicílico. Uma vez ligadas à victorina, as tiorredoxinas passam a ser reconhecidas pela proteína R denominada de LOV1, que quando ativada, leva à morte celular programada. Por se tratar de um patógeno necrotrófico, o fungo *C. victoriae* acaba por se beneficiar da morte da célula (Lorang *et al.*, 2012).

Quando um patógeno necrotrófico explora o mecanismo de ETI para infectar com sucesso seu hospedeiro, diz-se então que a ETI é subvertida à ETS (*effector-triggered susceptibility*) (Davidsson *et al.*, 2013). Conseqüentemente, a MTI pode ser considerada como a principal estratégia de defesa contra patógenos necrotróficos, como por exemplo, *P. carotovorum* (Davidsson *et al.*, 2013).



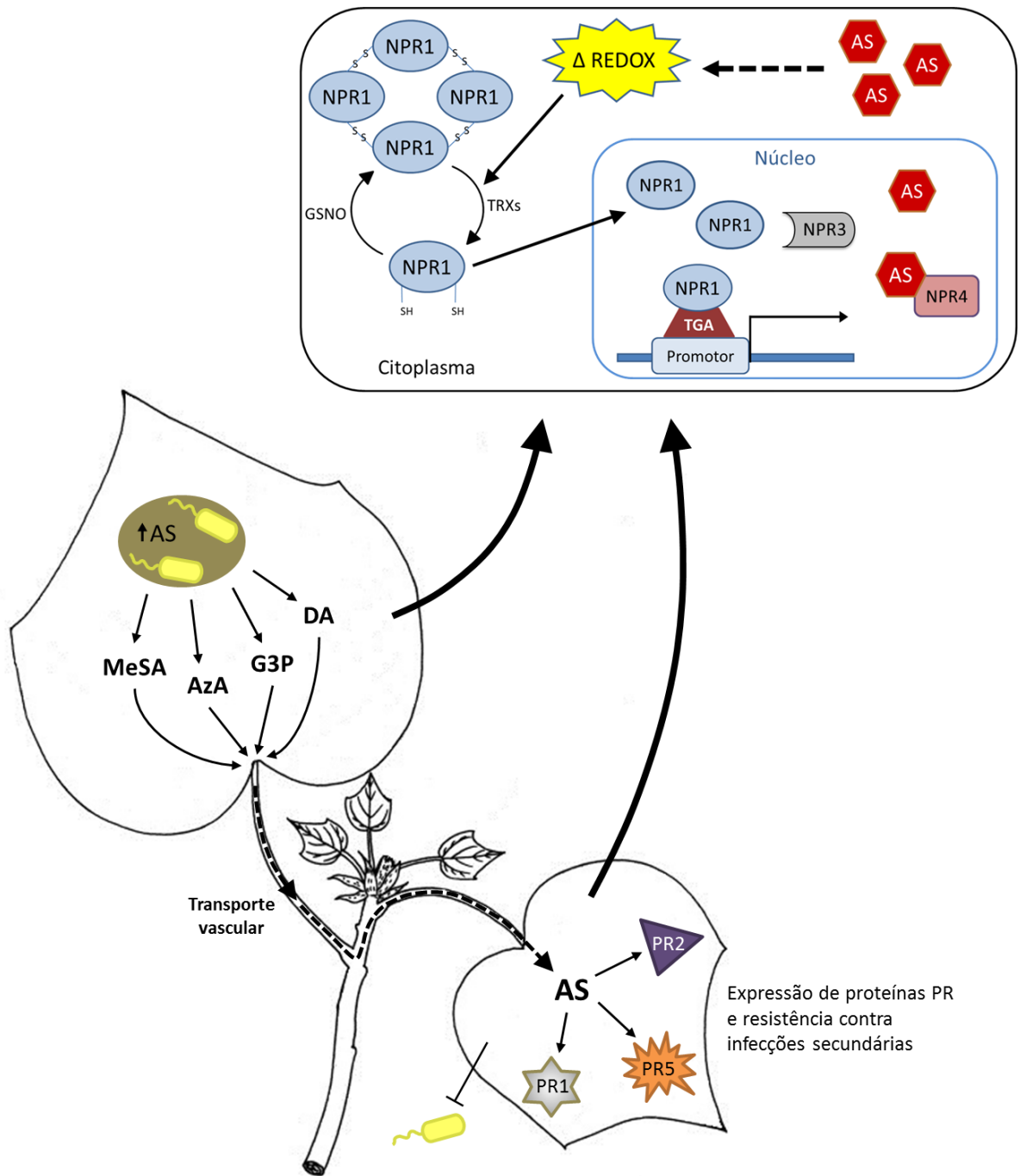
**Figura 3.** Representação geral de uma proteína R e seus respectivos domínios CC/TIR, NBS e LRR. CC (domínio supertorcido), TIR (receptor do tipo Toll/Interleucina-1), NBS (sítio de ligação a nucleotídeo), LRR (região rica em leucinas).

A ativação da defesa através de proteínas R (ETI) envolve a intensificação dos sinais da MTI e a indução de uma resistência duradoura em todos os órgãos e tecidos da planta. A indução da resistência em um órgão distante do local de infecção é comumente referenciada como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (Heidrich *et al.*, 2012; Davidsson *et al.*, 2013). Uma característica notável da SAR é o tempo no qual as defesas da planta permanecem ativadas, podendo ser de semanas até meses (Fu & Dong, 2013).

Os dados atualmente disponíveis na literatura indicam que o estabelecimento da resistência sistêmica envolve o deslocamento de moléculas sinalizadoras do local da infecção para os demais órgãos e tecidos da planta. O aumento nos níveis do hormônio ácido salicílico, tanto no local da infecção, quanto nos demais tecidos é imprescindível para a formação das respostas de defesa. Entretanto, o ácido salicílico não é a molécula responsável pela sinalização entre células (Vernooij *et al.*, 1994). Evidências sugerem que mais de uma molécula estejam envolvidas no estabelecimento da SAR. O glicerol-3-fosfato (G3P), o ácido azelaico (AzA), o metil-salicilato (MeSA) e o desidroabietinal (DA) são prováveis sinais imunes que induzem o acúmulo de ácido salicílico em tecidos distantes do local de infecção (Figura 4). O ácido salicílico, por sua vez, regula a expressão de diferentes genes relacionados à defesa vegetal (Tabela 1) (Spoel & Dong, 2012; Fu & Dong, 2013).

**Tabela 1.** Exemplos de genes marcadores da via de sinalização dos hormônios ácido salicílico, jasmonato e etileno (Derksen *et al.*, 2013).

Via de sinalização	Genes marcadores
Ácido salicílico	<i>PAL</i> (fenilalanina amônia liase) <i>PR-1</i> (função desconhecida) <i>PR-2</i> (1,3- $\beta$ -glucanase) <i>PR-5</i> (taumatina-like)
Jasmonato/Etileno	<i>ERF1</i> (fator de resposta ao etileno) <i>POTLX3</i> (lipoxigenase) ACS (gene da síntese de etileno) <i>THI2.1</i> (tionina) <i>PDF1.2</i> (defensina) <i>PR-3</i> (quitinase) <i>PR-4</i> (quitinase) <i>PR-6</i> (inibidor de proteínase) <i>PR-9</i> (peroxidase)



**Figura 4.** Modelo de ação do ácido salicílico (AS) e do mecanismo de reprogramação transcricional desencadeado por NPR1 (adaptado de Spoel & Dong, 2012; Fu & Dong, 2013). Ver descrição no texto. NPR (Nonexpressor of *PR* genes), AzA (ácido azelaico), DA (desidroabietinal), G3P (glicérol-3-fosfato), GSNO (S-nitrosoglutationa), MeSA (metil-salicilato), TRXs (tioredoxinas).

O hormônio ácido jasmônico também desempenha um papel importante na regulação das respostas de defesa em plantas (Tabela 1). A via de sinalização do ácido jasmônico é dividida em dois ramos principais: o ramo MYC e o ramo ERF. O ramo MYC é associado à defesa contra herbívoros, enquanto que o ramo ERF está relacionado à resistência contra patógenos necrotróficos e requer participação do hormônio etileno. O etileno é considerado um hormônio muito versátil, pois atua na regulação de diversos processos e etapas do desenvolvimento vegetal, como por exemplo, floração, senescência/abscisão foliar, além da própria imunidade vegetal (Dolan, 1997; Pieterse *et al.*, 2009). Além de participar na indução do ramo ERF, o etileno atua inibindo o ramo MYC, direcionando a resposta vegetal para uma defesa contra patógenos necrotróficos (Pieterse *et al.*, 2012). O ramo ERF é controlado em *Arabidopsis* por membros da família AP2/ERF de fatores de transcrição, como por exemplo, ERF1 e ORA59 (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012). Diversos genes *PR* são regulados pelo ramo ERF da via de sinalização do jasmonato/etileno e, conseqüentemente, podem ser utilizados como marcadores desta via de defesa (Tabela 1).

Tradicionalmente, o jasmonato e o ácido salicílico são referenciados como hormônios antagônicos. Entretanto, em órgãos e tecidos distantes do local de infecção, o jasmonato e o ácido salicílico podem ocorrer em baixas concentrações e atuar em sinergismo, promovendo uma resposta de defesa inespecífica e de amplo espectro de ação (Fu & Dong, 2013). Ao entrar em contato com diferentes tipos de patógenos (biotróficos ou necrotróficos), a planta passa a aumentar os níveis de ácido salicílico (estratégia contra biotróficos) ou de jasmonato (estratégia contra necrotróficos) no tecido infectado. Em maiores concentrações, estes hormônios passam a agir de forma antagônica, promovendo uma resposta de defesa específica, voltada para o tipo de patógeno detectado (Fu & Dong, 2013). Do ponto de vista evolutivo, este mecanismo previne, por exemplo, que a planta, ao ser infectada em uma de suas folhas por um patógeno biotrófico, permaneça suscetível ao ataque de patógenos necrotróficos em seus demais órgãos e tecidos (Fu & Dong, 2013).

O ácido salicílico atua ativando a proteína NPR1, uma co-ativadora transcricional, através da modificação das características redox do citoplasma celular (Figura 4). Por sua vez, NPR1 induz a reprogramação transcricional da célula, ativando a expressão de genes relacionados à defesa, como por exemplo genes *PR* (Tabela 1), além de regular



negativamente a expressão de genes envolvidos em processos celulares básicos, como a fotossíntese. Dessa forma, diz-se que o hormônio ácido salicílico prioriza o metabolismo de defesa às custas do crescimento da planta (Spoel & Dong, 2012; Fu & Dong, 2013).

Em condições não indutivas, as proteínas NPR1 encontram-se em complexos oligoméricos, unidas umas às outras através de ligações dissulfeto (estado oxidado). O hormônio ácido salicílico, induzindo alterações no potencial redox citoplasmático, causa a liberação de monômeros de NPR1 a partir da redução das ligações dissulfeto por tioredoxinas (Tada *et al.*, 2008). Os monômeros de NPR1 possuem um sinal de localização nuclear, possibilitando sua translocação até o núcleo, onde atuam como co-ativadores de fatores de transcrição da família TGA (Figura 4) (Foyer & Noctor, 2005; Spoel & Dong, 2012; Fu & Dong, 2013).

Os fatores de transcrição da família WRKY exercem um papel central na imunidade das plantas, atuando como reguladores (positivos ou negativos) das respostas de defesa ativadas por MAMPs (MTI) ou efetores (ETI) (Rushton *et al.*, 2010). O fator de transcrição WRKY70 de *Arabidopsis thaliana* é um dos mais bem descritos exemplos do papel regulatório de WRKYS no metabolismo de defesa. WRKY70 é expresso em resposta ao ácido salicílico/NPR1 e promove o antagonismo entre as vias ativadas por este hormônio e aquelas ativadas pelo hormônio ácido jasmônico (Davidsson *et al.*, 2013; Derksen *et al.*, 2013). O antagonismo promovido por WRKY70 se dá a partir da ativação de genes da via do ácido salicílico e repressão de genes responsivos ao ácido jasmônico (Tabela 1) (Pieterse *et al.*, 2012; Derksen *et al.*, 2013). Curiosamente, uma baixa expressão de WRKY70 pode induzir a expressão dos mesmos genes responsivos ao jasmonato (Derksen *et al.*, 2013), possibilitando assim uma explicação para a ocorrência de sinergismo entre estes dois hormônios, quando ambos encontram-se em baixas concentrações. Além disso, WRKY70, juntamente com WRKY54, regula negativamente a expressão de genes envolvidos na síntese de ácido salicílico em *Arabidopsis*, como a enzima isocorismato sintase (ICS1), fornecendo assim um mecanismo de feedback negativo de NPR1 sobre o ácido salicílico (Fu & Dong, 2013).

O estabelecimento da SAR resulta em uma profunda reprogramação transcricional e alteração dos processos metabólicos em todos os tecidos da planta (Figura 4). O auge da resistência sistêmica é a produção e o acúmulo de moléculas com propriedades

antimicrobianas, tais como fitoalexinas e proteínas PR (Tabela 1), também chamadas de executores da SAR (Fu & Dong, 2013). Além da síntese de moléculas antimicrobianas, a SAR produz uma resistência de longa duração, ou “memória imunológica”. A memória imunológica das plantas consiste de modificações epigenéticas da cromatina (*priming*), as quais estão intimamente associadas ao próprio processo de estabelecimento da SAR (Fu & Dong, 2013). Nesse sentido, estudos sobre a regulação da expressão gênica em plantas de *Solanum tuberosum* durante a interação com microrganismos patogênicos vêm sendo realizados buscando compreender os mecanismos celulares envolvidos nos processos de defesa (Zhu *et al.*, 1995; Avrova *et al.*, 1999; Beyer *et al.*, 2001; Collinge & Boller, 2001; Restrepo *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006).

O uso de produtos que promovem a defesa inata das plantas (indutores de resistência), sozinhos ou em combinação com pesticidas, é uma alternativa econômica e ambientalmente viável para a redução do uso de agroquímicos nas lavouras. Indutores de resistência são moléculas que induzem a ativação de respostas imunes em plantas e, dessa forma, atuam sensibilizando as plantas contra um futuro ataque de patógenos. Diversos indutores comerciais encontram-se disponíveis hoje no mercado, como por exemplo o Bion® (500WG, Syngenta S.A.), que tem como princípio ativo o acibenzolar-S-metil, um análogo sintético do hormônio ácido salicílico. Diversos estudos demonstram que plantas previamente sensibilizadas por indutores de resistência desenvolvem respostas de defesa mais eficazes ao serem posteriormente desafiadas com patógenos (Poiatti *et al.*, 2009; Janus *et al.*, 2013; Po-Wen *et al.*, 2013).

Poiatti e colaboradores (2009) mostraram que a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* tem a capacidade de induzir respostas de defesa em plantas de batata inoculadas com este microrganismo. Testes subsequentes utilizando um extrato autoclavado de *X. axonopodis* pv. *citri*, denominado de indutor XTH, mostraram que este indutor tem a capacidade de retardar a doença podridão mole causada por bactérias pectolíticas em plantas de *S. tuberosum* (Astarita *et al.*, 2008). Atualmente existem diversos trabalhos e patentes que propõe a utilização de espécies de *Xanthomonas* e seus derivados como promotores de resistência em plantas (Wei *et al.*, 2002; Hysmith, 2008; Astarita *et al.*, 2008; Antoniazzi *et al.*, 2008). Todavia, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ativação da defesa de plantas de batata em contato com *Xanthomonas* sp.

Halim e colaboradores (2009) inocularam plantas de batata com uma PAMP de *Phytophthora infestans*, denominada de Pep-13. Pep-13 é uma cadeia polipeptídica de 13 aminoácidos que compõe um motivo altamente conservado da enzima transglutaminase de *P. Infestans*. Através da utilização de plantas transgênicas insensíveis aos hormônios ácido salicílico e ácido jasmônico, Halim *et al.* (2009) mostraram que ambos os hormônios são necessários para a formação das respostas de defesa desencadeadas por esta PAMP. Além disso, Davidsson *et al.* (2013) recentemente discutiu em uma revisão que a ativação simultânea das vias do jasmonato e salicilato parece ser crucial para a atenuação da virulência de bactérias pectolíticas. Dessa forma, o estudo da expressão de genes relacionados à defesa em plantas de batata tratadas com *Xanthomonas sp.* ou derivados poderá ajudar na elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resistência de plantas contra bactérias fitopatogênicas.

## 2. Justificativa

Apesar de sua crescente produção, o cultivo da batata é severamente ameaçado por microrganismos patogênicos, responsáveis por perdas expressivas na produção. O uso de indutores de resistência, que promovem a defesa inata das plantas, é uma alternativa econômica e ambientalmente viável para a redução tanto das perdas agrícolas, quanto do uso de agroquímicos nas lavouras. O sucesso na utilização de indutores de resistência depende do conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos nas respostas de defesa vegetal. Contudo, estes mecanismos ainda são pouco compreendidos. O estudo das alterações moleculares envolvidas nos processos de defesa de *S. tuberosum* em resposta a hormônios e indutores bióticos poderá levar ao desenvolvimento de ferramentas para o manejo agrícola, visando reduzir as perdas na produção de batata.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes relacionados à defesa em plantas de *Solanum tuberosum* tratadas com ácido salicílico (AS) ou extrato bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XTH).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de mRNA dos genes *PR-1b*, *PR-2*, *ChtA*, *PAL*, *Pin2*, *JAZ1/TIFY10A*, e *ERF1*, através da técnica de RT-qPCR;
- Determinar a ocorrência de respostas local e sistêmica de defesa em plantas de batata tratadas com AS ou XTH;
- Elucidar as possíveis vias de sinalização hormonais ativadas pelo XTH em plantas de batata.

## REFERÊNCIAS

- Antoniazzi N., Deschamps C., Bach E.E. (2008) Effect of xanthan gum and allicin as elicitors against *Bipolaris sorokiniana* on barley in field experiments. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115(3):104-107.
- Astarita L.V., Dalmas F.R., Poiatti V.A.D. (2008). Bacterial Extract Elicitor. PI0805370-7; CN102256495A; US20110237433A1.
- Avrova A.O., Stewart H.E., De Jong W., Heilbronn J., Lyon G.D., Birch P.R. (1999). A Cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(12):1114-1119. DOI: 10.1094/MPMI.1999.12.12.1114
- Beyer K., Binder A., Boller T., Collinge M. (2001). Identification of potato genes induced during colonization by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 2(3):125-134. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2001.00059.x
- Boureau T., El Maarouf-Boteau H., Garnier A., Brisset M-N., Perino C. et al. (2005). DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and non-host tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:16-24. DOI: 10.1094/MPMI-19-0016
- CIP – International Potato Center (1996). Major Potato Diseases, Insects, and Nematodes. Disponível em: <<http://cipotato.org/publications/pdf/002408.pdf>>. Acesso em: 10/11/2013.
- CIP – International Potato Center (2013). Disponível em: <<http://cipotato.org/potato>>. Acesso em: 10/11/2013.
- Collinge M. & Boller T. (2001). Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* 46:521-529.
- Davidsson P.R., Kariola T., Niemi O., Palva E.T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science* 4:191. DOI: 10.3389/fpls.2013.00191
- DebRoy S., Thilmony R., Kwack YB., Nomura K., He SY. (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *PNAS* 101:9927-9932. DOI: 10.1073/pnas.0401601101
- Derksen H., Rampitsch C., Daayf F. (2013) Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science* 207:79-87. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.03.004
- Dolan L. (1997) The role of ethylene in the development of plant form. *Journal of Experimental Botany* 48(307):201-210.
- Durrant W.E. and Dong X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209. DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- FAO (2008). International Year of the Potato 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/potato-2008/en/index.html>>. Acesso em: 10/11/2013.
- FAO (2012). FAO Statistical Database (FAOSTAT). Disponível em: <[http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/commodities_by_regions/E)>. Acesso em: 10/11/2013.
- Foyer C.H. and Noctor G. (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell* 17:1866-1875. DOI: 10.1105/tpc.105.033589
- Fu Z.Q. and Dong X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* 64:839-863. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105606

- Halim V.A., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Rosah S. (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant Journal* 57:230-242. DOI:10.1111/j.1365-313X.2008.03688.x
- Ham J.H., Majerczak D.R., Arroyo-Rodriguez A.S., Mackey D.M., Coplin D.L. (2006). WtsE, an AvrE-family effector protein from *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes disease-associated cell death in corn and requires a chaperone protein for stability. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1092-1102. DOI: 10.1094/MPMI-19-1092
- Ham J.H., Majerczak D.R., Ewert S., Sheehkha M.-V., Mackey D., Coplin D.L. (2008). WtsE, an AvrE-family type III effector protein of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes cell death in non-host plants. *Molecular Plant Pathology* 9:633-643. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2008.00489.X
- Heidrich K., Blanvillain-Baufumé S., Parker J.E. (2012). Molecular and spatial constraints on NB-LRR receptor signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 15(4):385-391. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.03.015
- Hysmith R.M. (2008) Bioimmune-agressin composition for suppression of xanthomonad infections in agriculture crops. US Patent No 7,374,786 B2.
- Janus L., Milczarek G., Arasimowicz-Jelonek M., Abramowski D., Billert H., Floryszak-Wieczorek J. (2013) Normoergic NO-dependent changes, triggered by a SAR inducer in potato, create more potent defense responses to *Phytophthora infestans*. *Plant Science* 211:23-34. DOI: 10.1016/j.plantsci.2013.06.007
- Liu W., Liu J., Ning Y, Ding B., Wang X., Wang Z., Wang G-L. (2013). Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* 6(3):605-620. DOI: 10.1093/mp/sst015
- Lorang J., Kidarsa T., Bradford C.S., Gilbert B., Curtis M., Tzeng S.-C. et al. (2012). Tracking the Guard: Exploiting Plant Defense for Disease Susceptibility. *Science* 338:659-662. DOI: 10.1126/science.1226743
- Oerke E.-C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144:31-43. DOI: 10.1017/S0021859605005708
- Pereira A.S. (2011). Produção de Batata no Rio Grande do Sul. Disponível em: <[http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema19\\_novo/cap7\\_doen%C3%A7as.htm](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema19_novo/cap7_doen%C3%A7as.htm)> Acesso em: 10/11/2013.
- Pereira A.S. & Daniels J. (2003). O Cultivo da Batata na Região Sul do Brasil. 1ª edição, 567 p. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.
- Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., der Ent S.V., Wees S.C.M.V. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308-316. DOI:10.1038/nchembio.164
- Pieterse C.M.J., der Does V.D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Wees S.C.M.V. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:489-521. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154055
- Poiatti V.A.D., Dalmas F.R., Astarita L.V. (2009). Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. *Biological Research* 42:205-215. DOI: 10.4067/S0716-97602009000200009
- Po-Wen C., Singh P., Zimmerli L. (2013). Priming of the *Arabidopsis* pattern-triggered immunity response upon infection by necrotrophic *Pectobacterium carotovorum* bacteria. *Molecular Plant Pathology* 14(1):58-70. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00827.x

- Restrepo S., Myers K.L., del Pozo O., Martin G.B., Hart A.L., Buell C.R. et al. (2005). Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(9):913-922. DOI: 10.1094/MPMI-18-0913
- Rushton P.J., Somssich I.E., Ringler P., Shen Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15(5):247-258. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.02.006
- Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C. et al. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321(5891):952-956. DOI: 10.1126/science.1156970
- Takken F.L.W. & Tameling W.I.L. (2009). To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science* 324(5928):744-746. DOI: 10.1126/science.1171666
- Takken F.L.W. & Govere A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology* 15(4):375-384. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.05.001
- Tian Z.D., Liu J., Wang B.L., Xie C.H. (2006). Screening and expression analysis of *Phytophthora infestans* induced genes in potato leaves with horizontal resistance. *Plant Cell Reports* 25(10):1094-1103. DOI: 10.1007/s00299-006-0169-7
- Toth I.K., Bell K.S., Holeva M.C., Birch P.R.J. (2003). Soft rot erwiniae: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology* 4:17-30. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x
- Vernooij B., Friedrich L., Morse A., Reist R., Kolditz-Jawhar R., Ward E. et al. (1994). Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *The Plant Cell* 6(7):959-965. DOI: 10.1105/tpc.6.7.959
- Wharton P.S. (2013) Michigan Potato Diseases. Disponível em: <<http://www.potatodiseases.org/index.html>>. Acesso em 10/11/2013.
- Wei Z., Swanson S.S., Fan H. (2002) Hypersensitive response elicitor from *Xanthomonas campestris*. US Patent No 2002/0066122 A1
- Zhu B., Chen T.H.H., Li P.H. (1995). Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Molecular Biology* 28:17-26. DOI: 10.1007/BF00042034



# **CAPÍTULO 2**

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

Artigo a ser submetido ao periódico *Plant Physiology and Biochemistry*

(Fator de Impacto 2,352)

## Regulation of defense-related genes in potato plants treated with salicylic acid and bacterial extract

Tiago Sartor<sup>a</sup>, Vítor da S. Falavigna<sup>b</sup>, Luís F. Revers<sup>b</sup>, Eliane R. Santarém<sup>a</sup>, Leandro V. Astarita<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Plant Biotechnology, Department of Cellular and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Plant Molecular Genetics, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Bento Gonçalves, RS 95700-000, Brazil

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

### Abstract

Potato is a major food crop that can be severely attacked by numerous pests and pathogens. Biotic elicitors represent an alternative tool for management of potato plantations, allowing producers to reduce losses and the amount of chemicals used. An autoclaved extract of *Xanthomonas axonopodis* (XTH elicitor) was found to promote resistance of potato plants against the black leg disease caused by pectolytic bacteria via a poorly understood mechanism. Considering the different signaling pathways involved in plant defense, this work was intended to investigate and characterize the elicitation mechanism of XTH in *Solanum tuberosum* plants by analyzing the expression of *PR-1b*, *PR-2*, *ChtA*, *PAL*, *Pin2*, *JAZ1/TIFY10A*, and *ERF1* genes. Our results suggest that XTH is capable of inducing systemic resistance in potato plants via concomitant activation of the salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. Interestingly, exogenous application of salicylic acid induced the expression of *JAZ1/TIFY10A* in potato plants via a putative jasmonate-independent pathway.

**Key-words:** *Solanum tuberosum*, systemic resistance, *Xanthomonas*, jasmonic acid, PAMP-triggered immunity.

## 1. Introduction

Potato plants can be attacked by a variety of organisms including viruses, bacteria, fungi, oomycetes, nematodes, and insects (Oerke, 2006). According to their lifestyle, plant pathogens are usually divided into biotrophs, which feed on living tissue, and necrotrophs, which derive nutrients from dead tissue (Pieterse *et al.*, 2012). Pathogens possess conserved structures denominated pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as flagellin, lipopolysaccharides, chitin, among others. Upon infection, PAMPs released from the pathogen can be recognized by the plant through membrane receptors known as pattern recognition receptors (PRRs), which start a signaling cascade resulting in the activation of defense responses, also called PAMP-triggered immunity (PTI). Successful pathogens can use effector molecules to disrupt PTI signaling and cause disease. On the other hand, plants evolved resistance (R) proteins to recognize such effectors and produce a defense response characterized by programmed cell death at the infection site. This second line of defense is called effector-triggered immunity (ETI) (Pieterse *et al.*, 2012; Fu and Dong, 2013). Depending on the life-style of the pathogen, different signals are perceived by the plant. Biotrophic pathogens are perceived mainly by PAMPs and effectors, whereas pathogens that kill the host cells, such as necrotrophs, also release damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are self-recognizable structures from the plant itself (Pieterse *et al.*, 2009).

Salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and ethylene (ET) are key hormones that modulate the plant defense response against such pathogens. SA plays an important role in resistance against biotrophs, while JA and ET are traditionally involved in defense responses against necrotrophs (Pieterse *et al.*, 2012). The SA signaling pathway is controlled in plants by the regulatory protein NONEXPRESSOR OF *PR* GENES1 (NPR1). SA triggers NPR1 translocation to the nucleus by inducing changes in the cellular redox state (Tada *et al.*, 2008). In the nucleus, NPR1 interacts with members of the TGA family of transcription factors to activate downstream responses, such as the expression of PATHOGENESIS-RELATED (*PR*) genes (Pieterse *et al.*, 2012; Fu and Dong, 2013). The activation of the SA signaling pathway at the attempted site of infection generally triggers a similar response in distal plant parts to protect undamaged tissues against subsequent infections. This response is commonly referred to as systemic acquired resistance (SAR) (Pieterse *et al.*, 2009, 2012). The JA signaling pathway is divided into two major branches: the MYC branch and the ERF

branch. The MYC branch is associated with defense against herbivores, while the ERF branch requires the participation of the hormone ET and is related to resistance against necrotrophic pathogens. The ERF branch is regulated in *Arabidopsis* by members of the APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) family of transcription factors, such as ERF1 and ORA59 (Pieterse *et al.*, 2009, 2012). One central step in the JA signaling pathway is the COI1-mediated degradation of JAZ repressor proteins, which activates JA downstream responses. Among the genes induced by JA are the *PDF1.2*, *Thi2.1*, and *proteinase inhibitor (Pin)* (Mur *et al.*, 2006; Derksen *et al.*, 2013a).

Traditionally, SA and JA are reported as antagonistic hormones (Mur *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2012). However, in organs and tissues distant from the infection site, antagonism between SA and JA is negligible and does not interfere in resistance against pathogens of different life-styles (Spoel *et al.*, 2007). In tissues distant from the infection site, SA and JA may occur at lower concentrations and act in synergism, promoting a broad-spectrum defense response (Mur *et al.*, 2006). From an evolutionary perspective, this mechanism would prevent the plant from remaining susceptible to the attack of necrotrophs when producing a defense response against a biotrophic pathogen, for example (Mur *et al.*, 2006; Spoel *et al.*, 2007; Fu and Dong, 2013).

One strategy to avoid crop losses and reduce the use of pesticides is the employment of biotic inducers or elicitors to stimulate the plant innate immunity. Several natural and synthetic compounds have been shown to induce defense responses against pathogens and herbivores in plants (Jakab *et al.*, 2001; Reddy, 2013). The molecule  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) is a non-protein amino acid rarely found in plants that is able to induce systemic resistance against a broad range of pathogens including viruses, bacteria, oomycetes, fungi, nematodes, as well as several abiotic stresses (Jakab *et al.*, 2001). Spraying potato plants with a mixture consisting of BABA and the fungicide mancozeb was shown to effectively protect the plants against the late blight disease caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Baiden and Cohen, 2003).

In a previous report from our research group it was shown that the non-host pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is capable of inducing defense responses in potato plants via a poorly understood mechanism (Poiatti *et al.*, 2009). Afterwards, tests using an autoclaved extract of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (named XTH elicitor)

showed that the defense responses triggered by this elicitor efficiently delayed the progression of black leg disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* (CN102256495A; US8932844B2). The purpose of this work was to investigate the mechanisms involved in XTH-triggered defense responses, as well as to characterize the ability of XTH to induce systemic activation of plant defenses in potato plants by comparing the responses triggered by this elicitor to that of the hormone SA. SA-responsive genes (*PR-1b*, *PR-2*, and *ChIA*) and JA/ET-responsive genes (*Pin2*, *ERF1*, and *JAZ1/TIFY10A*) were analyzed in order to elucidate possible hormonal pathways activated by this elicitor.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Plant material

Potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Agata) were obtained from a local potato distributor in Southern Brazil. The tubers were washed with detergent to remove dirt and disinfested with 1% sodium hypochlorite for 20 minutes. Afterwards, tubers were treated with 25 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> for 30 minutes to induce uniform sprouting. After 20 days in a culture room (14h light, 25±2 °C), the sprouted tubers were planted in individual pots (11 L) in a greenhouse using non-autoclaved soil to simulate field conditions. Four-week-old plants were used in the experiments.

### 2.2 Preparation of the elicitors

The bacterial extract (XTH) was prepared following the procedure previously described by Poiatti *et al.* (2009). Briefly, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* inoculums were grown in liquid LB medium (Sezonov *et al.*, 2007) supplemented with 10 g.L<sup>-1</sup> sucrose for 72h at 25 °C, the cell culture was centrifuged at 1,250 *g* for 10 minutes and rinsed twice with distilled autoclaved water. The optical density (OD<sub>600nm</sub>) of the bacteria was adjusted to 1.0 with distilled autoclaved water. The bacterial suspension was then autoclaved (20 min, 121 °C) and stored at -20 °C until use. A concentration of 50 mM salicylic acid (SA) (Sigma-Aldrich®) in sterile water was used to induce hypersensitive response (HR) in potato leaflets. Salicylic acid was used as a comparative measure between the responses triggered by this immune hormone to that of the bacterial extract XTH.

### 2.3 Experimental procedure

In order to investigate whether XTH has the ability to induce systemic defense responses in potato plants, the elicitors (SA or XTH) were applied with a delicate brush on a leaflet of a fully expanded leaf (therein named treated leaf). The treated leaf and the immediate upper leaf (systemic leaf) were then removed for analysis. Leaves were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until qRT-PCR analysis. Independent experiments were conducted for each of the elicitors tested. A total of 81 plants were used in each experiment and leaves were collected 0, 6, 12, 18, and 24 hours after the onset of the experiment. Control treatments consisted of untreated plants.

### 2.4 RNA extraction and cDNA synthesis

RNA was extracted from frozen potato leaves following the rapid CTAB-based method established by Gambino *et al.* (2008). The RNA integrity and quantity were evaluated through agarose gel electrophoresis and UV light absorption (280, 260, and 230 nm), respectively. To eliminate residual genomic DNA, the total RNA was treated 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.

### 2.5 Real-time quantitative RT-PCR

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 Supplementary Table S1. 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-1 $\alpha$* ) as the internal reference (Nicot *et al.*, 2005) and the mean relative gene expression was calculated according to Pfaffl

(2001). Estimation of qPCR efficiencies was assessed using the LinRegPCR software version 2014.6.

**Supplementary Table S1.** List of genes and primers used in this study.

Gene	Abbreviation	Accession number	Primers (5'–3')
Pathogenesis-related protein 1b	<i>PR-1b</i>	AY050221.1	PR1b-F: TACCAACCAATGTGCAAGCG PR1b-R: TTGTCCGACCCAGTTTCCAA
Endo-1,3- $\beta$ -glucanase	<i>PR-2</i>	U01900.1	PR2-F: ATGGAACGAACAGGAGGAGG PR2-R: ATAGGTCCAGGCTTTCTCGG
Acidic class II chitinase	<i>ChtA</i>	U49970.1	ChtA-F: AATAGAGTGCCAGGGTACGG ChtA-R: CACCAGTGGGAACATTCAAGC
Phenylalanine ammonia lyase	<i>PAL</i>	X63103.1 X63104.1	PAL-F: GCAGTTGGTTCTGSTATGGC PAL-R: ACCAGGGTGATGCTTCAACT
Ethylene response factor 1	<i>ERF1</i>	NM_001288674.1	ERF1-F: GGTTTAAATGAGCCGGAGCC ERF1-R: CCCCGGCTCTGAACTTCTAA
Predicted JAZ1/TIFY10A <sup>a</sup>	<i>JAZ1/TIFY10A</i>	XM_006345194.1	JAZ1-F: GCGAGGCGGAATTCACCTAC JAZ1-R: GCACCTAATCCCAACCATGC
Proteinase inhibitor II	<i>Pin2</i>	X99095.1	Pin2-F: GGTACTTGTAGCGCGATGG Pin2-R: CTGCACAACAGTTGGTGCAT
Elongation factor 1-alpha	<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	AB061263.1	EF1 $\alpha$ -F: CTGCACTGTGATTGATGCCC EF1 $\alpha$ -R: ACCAGCTTCAAAACCACCAG

<sup>a</sup> The predicted potato JAZ1/TIFY10A mRNA sequence has 95% identity to the tomato JAZ1 mRNA sequence (NM\_001247954.1).

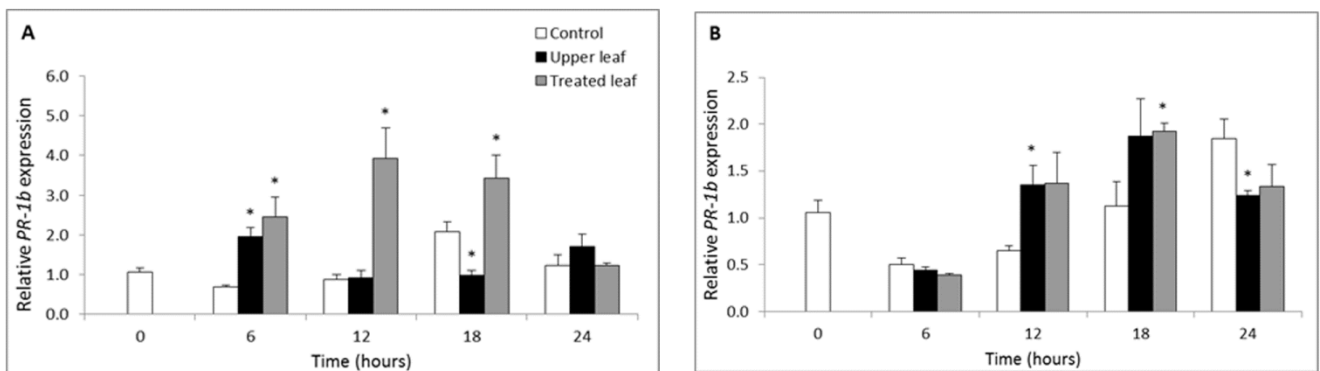
## 2.6 Statistics

Results were analyzed using the SPSS v18.0 software and means were compared using Student's *t*-test ( $p \leq 0.05$ ).

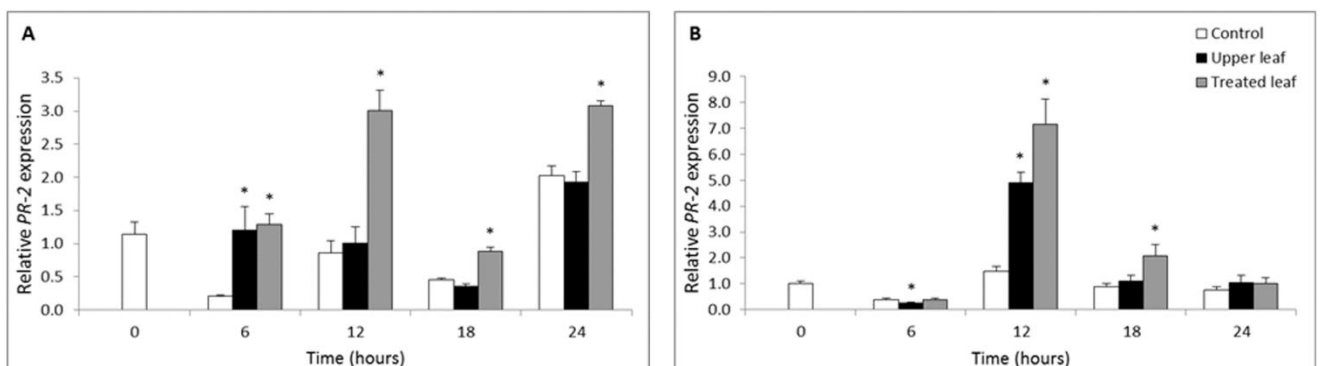
### 3. Results and Discussion

#### SA induces local, but not systemic expression of *PAL*

Salicylic acid (SA) is known as the hormone responsible for the establishment of systemic acquired resistance (SAR) in plants (Fu and Dong, 2013). As expected, SA treatment was able to induce SAR in potato plants. This was verified by the induction of several SA-responsive genes, such as *PR-1b*, *PR-2*, and *ChIA*, in treated and systemic leaves (Fig. 1A-3A) (Pierpoint *et al.*, 1990; Büchter *et al.*, 1997; Navarre and Mayo, 2004). Gene expression in systemic leaves (Fig. 1A-3A) was induced at 6h and returned to basal levels at 12h, remaining at this state until 24h. It is possible that systemic leaves entered a primed state beginning at 12h after SA treatment, although this was not evaluated in our study.

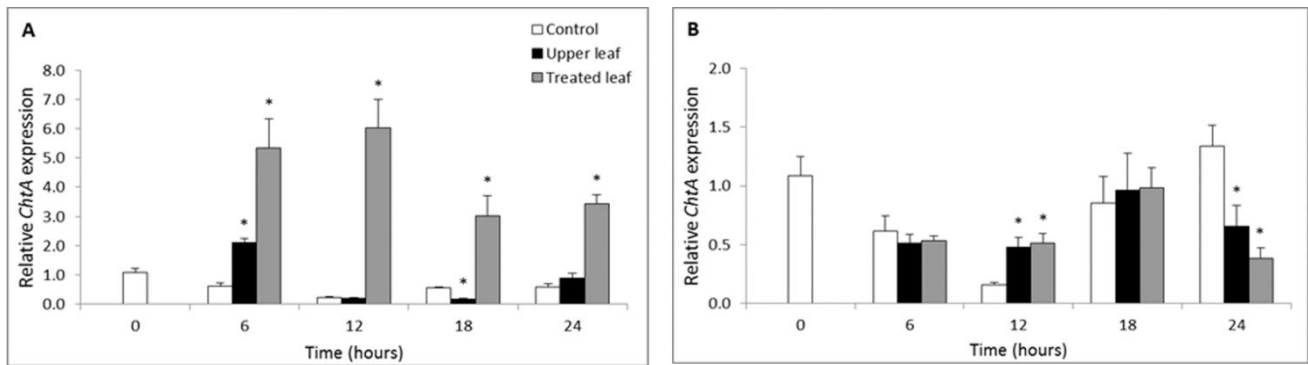


**Figure 1.** Relative expression of *PR-1b* in SA-treated (A) and XTH-treated (B) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.



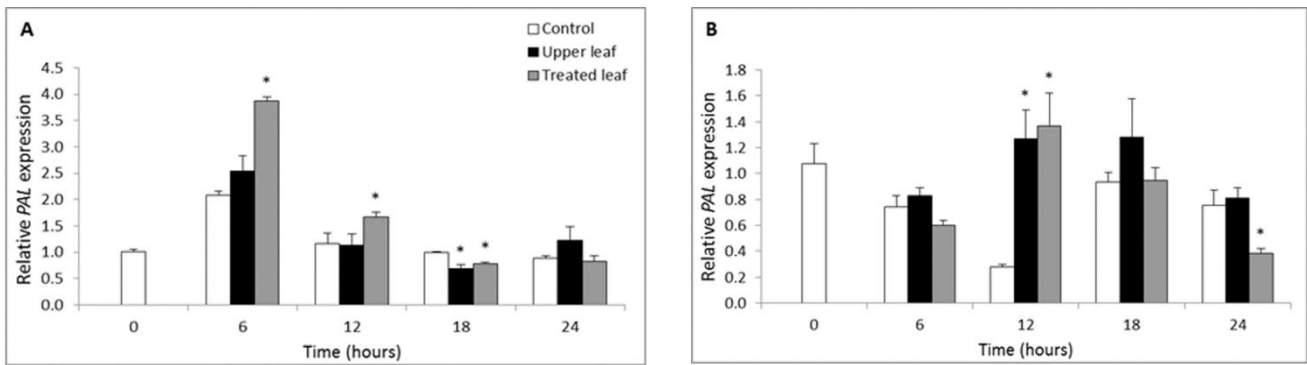
**Figure 2.** Relative expression of *PR-2* in SA-treated (A) and XTH-treated (B) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.





**Figure 3.** Relative expression of *ChtA* in SA-treated (**A**) and XTH-treated (**B**) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.

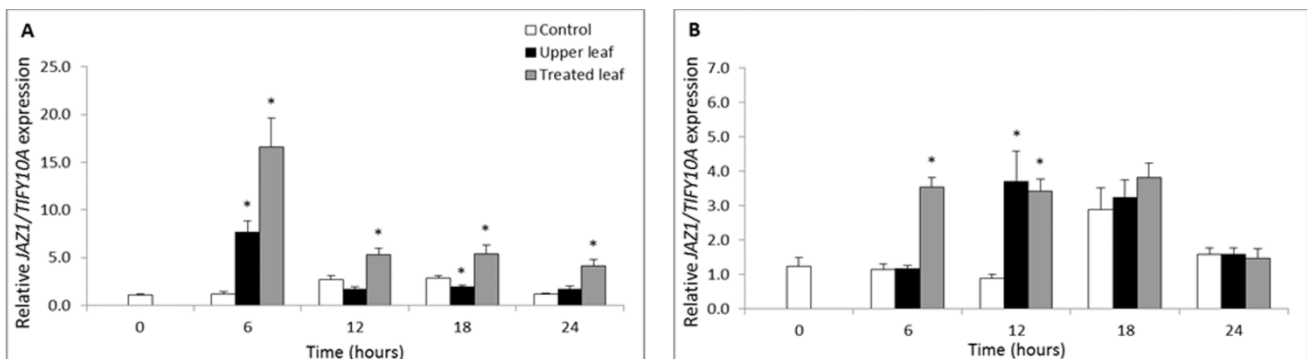
Intriguingly, SA treatment induced the expression of *PAL* only in the treated leaves, whereas *PAL* expression in systemic leaves remained at basal (control) levels (Fig. 4A). During defense responses, *PAL* expression in plants has been previously associated with the SA signaling pathway (Derksen *et al.*, 2013a). However, there are a few contradictory reports regarding *PAL* responsiveness to immune hormones in potato. Derksen *et al.* (2013b) affirmed that both *PAL-1* and *PAL-2* are SA-responsive genes. On the other hand, Arseneault and colleagues (2014) stated that *PAL-2* is a JA-responsive gene. In the present study, the total *PAL* transcript levels (*PAL-1* + *PAL-2*) were analyzed and we observed that *PAL* responded locally to SA, but was not induced systemically by this hormone (Fig. 4A). Given that *PAL* is a key enzyme involved in the SA biosynthesis in potato (Coquoz *et al.*, 1998), our result may suggest that SA does not accumulate in systemic tissues during the establishment of SAR. Interestingly, Coquoz *et al.* (1995) reported that arachidonic acid was able to induce SAR and local accumulation of SA, but was not able to induce systemic synthesis of this hormone. In the same study, the authors observed that inoculation of potato leaves with *Phytophthora infestans* also induced SAR and local accumulation of SA, but again, no systemic accumulation of SA was detected. Taking into consideration that the phenylpropanoid pathway is the main source of SA synthesis in potato (Coquoz *et al.*, 1998), the absence of SA buildup in systemic leaves could thus be attributed to a stable expression of *PAL* in such tissues, even under an SA-mediated defense response (Fig. 4A).



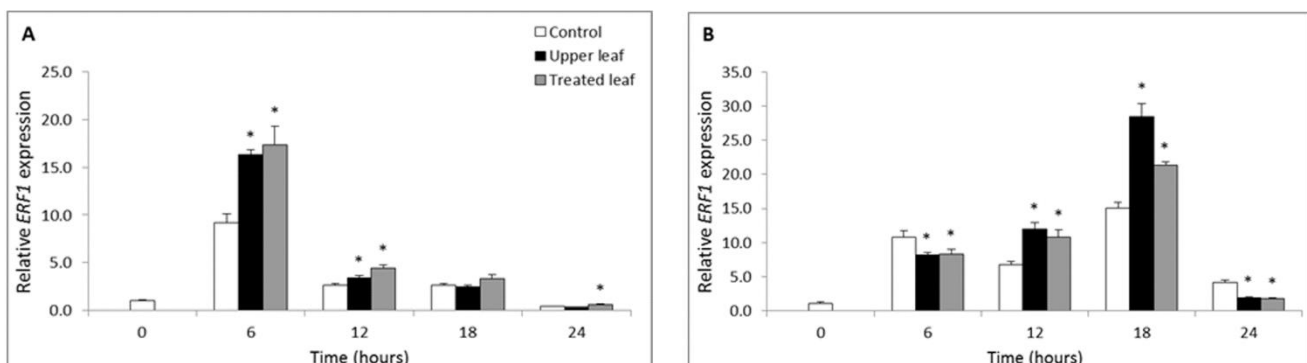
**Figure 4.** Relative expression of *PAL* in SA-treated (A) and XTH-treated (B) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.

### SA treatment induced the expression of JA-related genes

SA induced local and systemic expression of the JA/ET marker genes *JAZ1/TIFY10A* and *ERF1* in potato plants (Fig. 5A and 6A). *JAZ1/TIFY10A* mRNA levels accumulated only transiently in systemic leaves, whereas SA-treated leaves expressed *JAZ1/TIFY10A* up to 24 hours (Fig. 5A). *ERF1* expression was also induced by SA treatment, both locally and systemically (Fig. 6A).



**Figure 5.** Relative expression of *JAZ1/TIFY10A* in SA-treated (A) and XTH-treated (B) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.



**Figure 6.** Relative expression of *ERF1* in SA-treated (A) and XTH-treated (B) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.

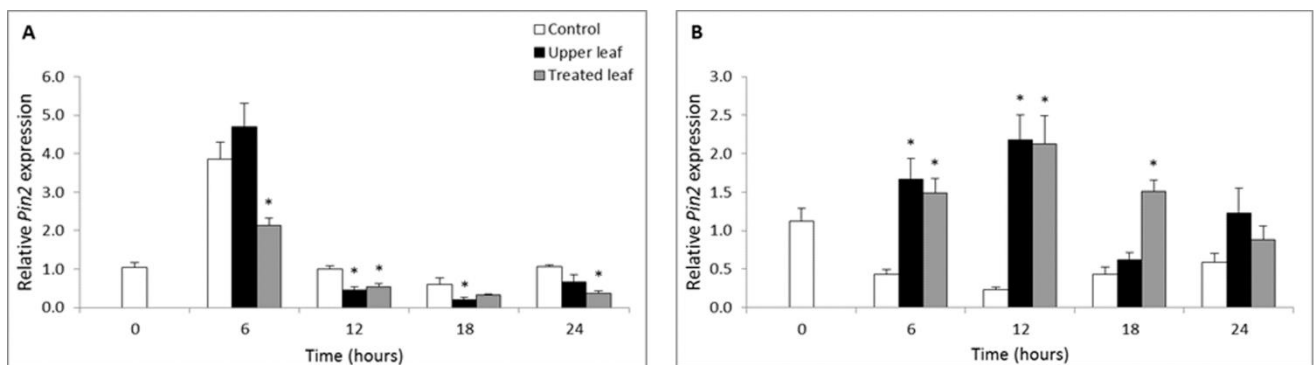
It is well established that the SA and JA pathways act antagonistically on each other (Mur *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2012). Exogenous application of SA is able to impair JA responsiveness in plants (Doares *et al.*, 1995; Mur *et al.*, 2006; Spoel *et al.*, 2007). Therefore, our results suggest that SA might regulate the expression of *JAZ1/TIFY10A* independently of the JA signaling pathway, and that *JAZ1/TIFY10A* could also play a role in the SA-JA antagonism in potato.

In *Arabidopsis*, the expression of *JAZ* genes is known to be activated by JA (Pieterse *et al.*, 2012). In turn, *JAZ* proteins provide a negative feedback regulation of the JA signaling pathway by interacting with positive transcriptional regulators, such as MYC and EIN transcription factors (Kazan and Manners, 2012).

Van der Does *et al.* (2013) and Zander *et al.* (2014) recently reported that the mechanism by which SA suppresses the JA/ET signaling pathway relies on the transcriptional downregulation of the ERF transcription factor *ORA59*. While *ORA59* appears to be an important node of convergence for SA-induced suppression of the JA/ET pathway, other molecular players, including NPR1, MPKs, WRKYs, among others were shown to be equally crucial during SA-JA antagonistic interactions (Pieterse *et al.*, 2012; Derksen *et al.*, 2013a; Gimenez-Ibanez and Solano, 2013). By studying splicing variants of the *JAZ10* gene, Van der Does *et al.* (2013) concluded that *JAZ10* is not involved in the SA-mediated suppression of the JA signaling pathway in *Arabidopsis*. However, their finding does not necessarily exclude the involvement of other *JAZ* proteins in the SA-JA antagonism. Interestingly, Grunewald and colleagues (2009) showed that auxin is able to regulate the expression of *JAZ1/TIFY10A* independently of the JA signaling pathway via ARF6 and ARF8 proteins. Moreover, although *JAZ1/TIFY10A* was proven to be an early auxin-inducible *JAZ* gene expressed transiently upon naphthalene acetic acid (NAA) treatment, Grunewald *et al.* (2009) noted that several other experiments failed to demonstrate this. This evidence reinforces our findings and suggests that, similarly to auxin, SA could control the expression of *JAZ1/TIFY10A* in a JA-independent manner in potato.

On the other hand, it has been reported that sorghum plants show a transient accumulation of JA approximately 3 hours after treatment with 1 mM SA (Salzman *et al.*, 2005). This finding could provide a different explanation for the induction of JA/ET marker genes in SA-treated plants (Fig. 5A and 6A). Whether potato plants accumulate JA upon

treatment with SA still needs to be investigated. However, it is important to notice that whereas SA treatment induced the expression of *JAZ1/TIFY10A* and *ERF1* (Fig. 5A and 6A), the transcription of the gene *Pin2* was locally and systemically repressed by this hormone (Fig. 7A). *Pin2* is a well-established JA-responsive gene (Doares *et al.*, 1995; Peña-Cortés *et al.*, 1995; Dammann *et al.*, 1997) and its repression by SA confirms that antagonism between the SA and JA signaling pathways occurred under our experimental conditions (Doares *et al.*, 1995). Therefore, our results refute a possible stimulation of the JA signaling pathway and further support the existence of an SA-based mechanism controlling *JAZ1/TIFY10A* expression in potato.



**Figure 7.** Relative expression of *Pin2* in SA-treated (A) and XTH-treated (B) plants. Time point 0h represents the initial expression level for all treatments. Asterisks represent statistical differences from control (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ). Error bars represent the standard error of the mean.

### SA may act synergistically with ET in potato

APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) transcription factors, such as ERF1 and ORA59, are positive regulators of the JA signaling pathway. More specifically, ERFs control the ERF branch of the JA pathway, which is also dependent on ET signaling (Pieterse *et al.*, 2009, 2012).

Although ET is widely known for its role in JA-induced resistance against necrotrophs, synergism between SA and ET has also been reported (Pieterse *et al.*, 2009, 2012; Derksen *et al.*, 2013a). Thus, the finding that *ERF1* expression was upregulated in potato plants treated with SA (Fig. 6A) could substantiate the idea of a positive crosstalk between ET and SA in potato. In tobacco, another solanaceous plant, ET perception is essential for SA accumulation and SAR development (Verberne *et al.*, 2003). Furthermore, ET was shown to enhance the response of *Arabidopsis* plants to SA via the EIN2 transcription factor, resulting

in increased expression of the SA marker gene *PR-1* (Pieterse *et al.*, 2009). Therefore, the expression of ERF1 and other ET-related transcription factors during an SA-induced defense response in potato plants could lead to the activation of specific branches of the ET pathway and also contribute to enhanced expression of SA-responsive genes.

Zander *et al.* (2014) reported for *Arabidopsis* that the expression of the ERF transcription factors *ORA59* and *ERF96* is greatly repressed in the presence of SA. However, the same was not observed for other ERFs, including *ERF1* (Van der Does *et al.*, 2013; Zander *et al.*, 2014). In fact, the expression of several *ERF* genes remained quite elevated when *Arabidopsis* plants were concomitantly sprayed with SA and the ET precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) (Zander *et al.*, 2014). Besides that, the tomato *Pti4* gene, another member of the ERF family of transcription factors, was shown to be induced either by ET or SA, although expression of GCC-box-containing *PR* genes only occurred in the presence of ET (Gu *et al.*, 2000). Nevertheless, these findings allow us to speculate that some specific branches of the ET pathway could remain active in potato during an SA-induced defense response.

The repression of *Pin2* transcription by SA is in concert with our overall findings, because the induction of JA repressors, such as *JAZ1/TIFY10A*, would lead to higher degrees of inactivation of JA-related genes. Taking into account that the expression of ERFs are regulated by EIN and EIL transcription factors, which in turn are negatively regulated by JAZ proteins, it can be thought that SA-induced expression of *JAZ1/TIFY10A* should also indirectly lead to repression of *ERF1* transcription. Nevertheless, it has been described 12 JAZ repressor proteins in *Arabidopsis*, and different JAZ proteins bind and inactivate different classes of transcription factors (Kazan and Manners, 2012). Hence, our results suggest that *JAZ1/TIFY10A* does not inactivate transcription factors involved in *ERF1* transcription in potato (Fig. 5A and 6A). However, this remains to be demonstrated. Also, it is still necessary to determine whether ERF1 is involved in the regulation of ET-responsive genes or enhanced expression of SA-related genes, or both, during an SA-mediated defense response.

### **XTH-induced defense response is partly mediated by JA**

*Xanthomonas axonopodis* extract (XTH) was able to induce systemic defense responses in potato plants. Essentially all genes analyzed in this study were locally and

systemically upregulated by XTH (Fig. 1B-7B). As observed for SA (Fig. 1A-3A), XTH treatment also induced a rapid and transient gene expression in systemic leaves (Fig. 1B-3B) which could suggest that the XTH elicitor also triggers a primed state in potato plants, although this was not investigated. In general, there was a delay in the responses triggered by XTH when compared to SA treatment. Whereas SA was capable of activating local and systemic gene expression at 6 hours after the onset of the experiment (Fig. 1A-7A), XTH-induced responses only started at 12h (Fig 1B-7B). This could be explained due to the fact that, as a hormone, SA is able to readily initiate a transcriptional reprogramming in the cells, whereas XTH needs to be first recognized by membrane receptors and then activate a signaling cascade that ultimately would lead to defense gene expression.

As previously shown in Figure 7A, the transcription of the JA-responsive gene *Pin2* is effectively suppressed by SA. Interestingly, we observed that the expression of *Pin2* was upregulated by XTH treatment (Fig. 7B). Because *Pin2* is considered a robust marker of the JA signaling pathway (Doares *et al.*, 1995; Peña-Cortés *et al.*, 1995; Dammann *et al.*, 1997), this evidence allows us to assume that XTH-triggered defense responses are, at least partly, mediated by JA. Furthermore, *PAL* expression was not induced in systemic leaves by SA (Fig. 4A). On the other hand, XTH treatment was able to induce systemic expression of *PAL* (Fig. 4B). This suggests that XTH-induced systemic *PAL* expression is not mediated by SA, but instead, via an alternative pathway. Our results are in agreement with Derksen *et al.* (2013a, 2013b) and Arseneault *et al.* (2014), which stated that *StPAL* is an SA- and a JA-responsive gene, respectively. Besides that, the JA/ET-related genes *JAZ1/TIFY10A* and *ERF1* were also upregulated by XTH treatment in potato leaves (Fig. 5B and 6B). However, these genes may not be considered reliable markers of the JA signaling pathway in potato, given that SA was also capable of inducing their expression (Fig. 5A and 6A).

### **XTH induced the expression of SA-responsive genes**

In contrast to the findings that JA mediates XTH-triggered defense responses, several SA-responsive genes were induced by XTH (Fig. 1B-3B). These results may indicate that the elicitation mechanism of XTH involves the concomitant activation of the JA/ET and SA signaling pathways. Although SA and JA are traditionally reported as antagonistic hormones, synergistic effects between SA and JA have been largely reported (Mur *et al.*, 2006; Pieterse

*et al.*, 2012; Fu and Dong, 2013). Xu *et al.* (2011) showed that cotton defense responses to *Verticillium dahliae* consist of a complex hormonal network involving the SA, JA, and ET pathways. Davidsson *et al.* (2013) discussed that activation of plant innate immunity by SA and JA/ET appears to play a central role in enhancement of plant defenses and resistance against pectolytic bacteria. In *Arabidopsis thaliana* plants, the pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* is primarily resisted through a combination of JA-, ET-, and SA-dependent pathways (Ton *et al.*, 2002). In another study with *Arabidopsis*, Pieterse *et al.* (1998) reported that rhizobacteria-induced systemic resistance also required JA, ET, and SA signaling via NPR1.

*Xanthomonas* species are known to produce several macromolecules implicated in pathogenesis, such as extracellular enzymes (proteases, pectinases, and endoglucanases) and extracellular polysaccharides (xanthan gum). Other pathogenicity factors include the production of type III secretion system proteins encoded by *hrp* genes (Dow and Daniels, 2000). As gram-negative bacteria, *Xanthomonas* sp. also possess conserved structures such as lipopolysaccharides, flagellins, glycoproteins, among others (Romeiro and Kimura, 1997; Braun *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). All these molecules are potential PAMPs that can be recognized by plant pattern recognition receptors (PRRs) and act as elicitors of plant immunity.

Halim *et al.* (2009) has shown that PAMP-induced defense responses in potato plants inoculated with a PAMP from *Phytophthora infestans* require both SA and JA signaling. In the present study, the autoclaved bacterial extract XTH was applied on the surface of potato leaflets. Therefore, the epidermal cells in the leaves are expected to perceive the contact of XTH via PAMP recognition by PRRs. Because we observed an induction of SA- and JA-responsive genes in XTH-treated plants (Fig. 1B-4B and 7B), our results suggest that XTH-induced defense responses, which rely mainly on PAMPs, are mediated not only by JA but also by SA, corroborating the report of Halim *et al.* (2009) that PAMP-triggered immunity in potato requires both hormones. In addition, according to Davidsson *et al.* (2013), activation of SA- and JA-mediated defenses by XTH could help explain the observed resistance against necrotrophic pectobacteria when potato plants were treated with this elicitor (CN102256495A; US8932844B2).

#### 4. Conclusions and Future Perspectives

We propose that *Xanthomonas axonopodis* extract (XTH) has the ability to trigger systemic defense responses in *Solanum tuberosum* plants by concomitantly activating the JA- and the SA-dependent pathways. We envision the use of XTH as a tool for potato crop management. However, the successful employment of XTH in a commercial scale will require a better comprehension of the mechanisms behind the elicitation process and the ability to render potato plants resistant against a broad range of pathogens.

Apart from that, we provide evidence suggesting that the expression of the jasmonate repressor *JAZ1/TIFY10A* may be regulated by SA in a JA-independent manner. The mechanism by which salicylic acid controls *JAZ1/TIFY10A* expression in potato remains elusive, and we emphasize that the role of SA should be further investigated through other molecular approaches, such as the use of transgenic potato lines carrying silencing constructs for genes involved in the JA biosynthetic and signaling pathways and/or plants overexpressing the bacterial salicylate hydroxylase gene *NahG*. Possible targets of *JAZ1/TIFY10A* should also be investigated.

#### Acknowledgments

We would like to thank Diogo Denardi Porto and the Laboratory of Immunology and Microbiology of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul for the technical support. This work was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

#### References

Arseneault T., Pieterse C.M.J., Gérin-Ouellet M., Goyer C., Filion M. (2014) Long-Term Induction of Defense Gene Expression in Potato by *Pseudomonas* sp. LBUM223 and *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 104(9):926-932. DOI:10.1094/PHYTO-11-13-0321-R

Baiden A. and Cohen Y. (2003) Synergistic Interaction between BABA and Mancozeb in Controlling *Phytophthora infestans* in Potato and Tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in Cucumber. *Phytoparasitica* 31(4):399-409. DOI:10.1007/BF02979812



- Braun S.G., Meyer A., Holst O., Pühler A., Niehaus K. (2005) Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Lipopolysaccharide Substructures Essential for Elicitation of an Oxidative Burst in Tobacco Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(7):674-681. DOI:10.1094/MPMI-18-0674
- Büchter R., Strömberg A., Schmelzer E., Kombrink E. (1997) Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Molecular Biology* 35:749-761. DOI:10.1023/A:1005830706507
- Coquoz J.-L., Buchala A.J., Meuwly Ph., Métraux J.-P. (1995) Arachidonic Acid Induces Local but not Systemic Synthesis of Salicylic Acid and Confers Systemic Resistance in Potato Plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* 85:1219-1224. DOI:10.1094/Phyto-85-1219
- Coquoz J.-L., Buchala A., Métraux J.-P. (1998) The Biosynthesis of Salicylic Acid in Potato Plants. *Plant Physiology* 117:1095-1101. DOI:10.1104/pp.117.3.1095
- Dammann C., Rojo E., Sánchez-Serrano J.J. (1997) Abscisic acid and jasmonic acid activate wound-inducible genes in potato through separate, organ-specific signal transduction pathways. *The Plant Journal* 11(4):773-782. DOI:10.1046/j.1365-313X.1997.11040773.x
- Davidsson P.R., Kariola T., Niemi O., Palva E.T. (2013) Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science* 4:191. DOI:10.3389/fpls.2013.00191
- Derksen H., Rampitsch C., Daayf F. (2013a). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science* 207:79-87. DOI:10.1016/j.plantsci.2013.03.004
- Derksen H., Badawi M., Henriquez M.A., Yao Z., El-Bebany A.F., Daayf F. (2013b) Differential Expression of Potato Defence Genes Associated with the Salicylic Acid Defence Signalling Pathway in Response to Weakly and Highly Aggressive Isolates of *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology* 161:142-153. DOI:10.1111/jph.12038
- Doares S.H., Narváez-Vásquez J., Conconi A., Ryan C.A. (1995) Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiology* 108:1741-1746. DOI:10.1104/pp.108.4.1741
- Dow J.M. and Daniels M.J. (2000) *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17:263-271. DOI:10.1002/1097-0061(200012)17:4<263::AID-YEA44>3.0.CO;2-G
- Fu Z.Q. and Dong X. (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* 64:839-863. DOI:10.1146/annurev-arplant-042811-105606
- Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. (2008) A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19:520-525. DOI:10.1002/pca.1078
- Gimenez-Ibanez S. and Solano R. (2013) Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4:72. DOI:10.3389/fpls.2013.00072
- Grunewald W., Vanholme B., Pauwels L., Plovie E., Inzé D., Gheysen G., Goossens A. (2009) Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signaling repressor *JAZ1/TIFY10A* is stimulated by auxin. *EMBO Reports* 10(8):923-928. DOI:10.1038/embor.2009.103

Gu Y.-Q., Yang C., Thara V.K., Zhou J., Martin G.B. (2000) *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *The Plant Cell* 12(5):771-785. DOI:10.1105/tpc.12.5.771

Halim V.A., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Rosah S. (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant Journal* 57:230-242. DOI:10.1111/j.1365-313X.2008.03688.x

Jakab G., Cottier V., Touquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J.-P., Mauch-Man B. (2001)  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107:29-37. DOI:10.1023/A:1008730721037

Kazan K. and Manners J.M. (2012) JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* 17:22-31. DOI:10.1016/j.tplants.2011.10.006

Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C. (2006) The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiology* 140:249-262. DOI:10.1104/pp.105.072348

Navarre D.A. and Mayo D. (2004) Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:179-188. DOI:10.1016/j.pmpp.2004.09.001

Nicot H., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56(421):2907-2914. DOI:10.1093/jxb/eri285

Oerke E.-C. (2006) Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144:31-43. DOI:10.1017/S0021859605005708

Peña-Cortés H., Fisahn J., Willmitzer L. (1995) Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *PNAS* 92(10):4106-4113.

Pierpoint W.S., Jackson P.J., Evans R.M. (1990) The presence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36:325-338. DOI:10.1016/0885-5765(90)90062-3

Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits H., *et al.* (1998) A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10(9):1571-1580. DOI:10.1105/tpc.10.9.1571

Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., der Ent S.V., Van Wees S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308-316. DOI: 10.1038/nchembio.164

Pieterse C.M.J., Van der Does D., Zamioudis C., Leon-Reyes A., Van Wees S.C.M. (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:489-521. DOI:10.1146/annurev-cellbio-092910-154055

Poiatti V.A., Dalmas F.R., Astarita L.V. (2009) Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. *Biological Research* 42:205-215. DOI:10.4067/S0716-97602009000200009

Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:2002-2007. DOI:10.1093/nar/29.9.e45

Reddy P.P. (2013) Plant Defence Activators. *Recent Advances in Crop Protection*. Ch. 9, pp.121-123. DOI:10.1007/978-81-322-0723-8\_9

Romeiro R.S. and Kimura O. (1997) Induced Resistance in Pepper Leaves Infiltrated with Purified Bacterial Elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Phytopathology* 145:495-498. DOI:10.1111/j.1439-0434.1997.tb00356.x

Salzman R.A., Brady J.A., Finlayson S.A., Buchanan C.D., Summer E.J., Sun F., *et al.* (2005) Transcriptional Profiling of Sorghum Induced by Methyl Jasmonate, Salicylic Acid, and Aminocyclopropane Carboxylic Acid Reveals Cooperative Regulation and Novel Gene Responses. *Plant Physiology* 138:352-368. DOI:10.1104/pp.104.058206

Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. (2007) *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology* 189(23):8746-8749. DOI:10.1128/JB.01368-07

Spoel S.H., Johnson J.S., Dong X. (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *PNAS* 104(47):18842-18847. DOI:10.1073/pnas.0708139104

Sun W., Dunning M., Pfund C., Weingarten R., Bent A.F. (2006) Within-Species Flagellin Polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and Its Impact on Elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-Dependent Defenses. *The Plant Cell* 18:764-779. DOI:10.1105/tpc.105.037648

Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C. *et al.* (2008) Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321(5891):952-956. DOI:10.1126/science.1156970

Ton J., Van Pelt J.A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. (2002) Differential Effectiveness of Salicylate-Dependent and Jasmonate/Ethylene-Dependent Induced Resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(1):27-34. DOI:10.1094/MPMI.2002.15.1.27

Van der Does D., Leon-Reyes A., Koornneef A., Van Verk M.C., Rodenburg N., Pauwels L., *et al.* (2013) Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCF<sup>COI1</sup>-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell* 25:744-761. DOI:10.1105/tpc.112.108548

Verberne M.C., Hoekstra J., Bol J.F., Linthorst H.J.M. (2003) Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *The Plant Journal* 35:27-32. DOI:10.1046/j.1365-313X.2003.01778.x

Xu L., Zhu L., Tu L., Guo X., Long L., Sun L., *et al.* (2011) Differential Gene Expression in Cotton Defence Response to *Verticillium dahliae* by SSH. *Journal of Phytopathology* 159(9):606-615. DOI:10.1111/j.1439-0434.2011.01813.x

Zander M., Thurow C., Gatz C. (2014) TGA Transcription Factors Activate the Salicylic Acid-Suppressible Branch of the Ethylene-Induced Defense Program by Regulating ORA59 Expression. *Plant Physiology* 165:1671-1683. DOI:10.1104/pp.114.243360

# **CAPÍTULO 3**

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

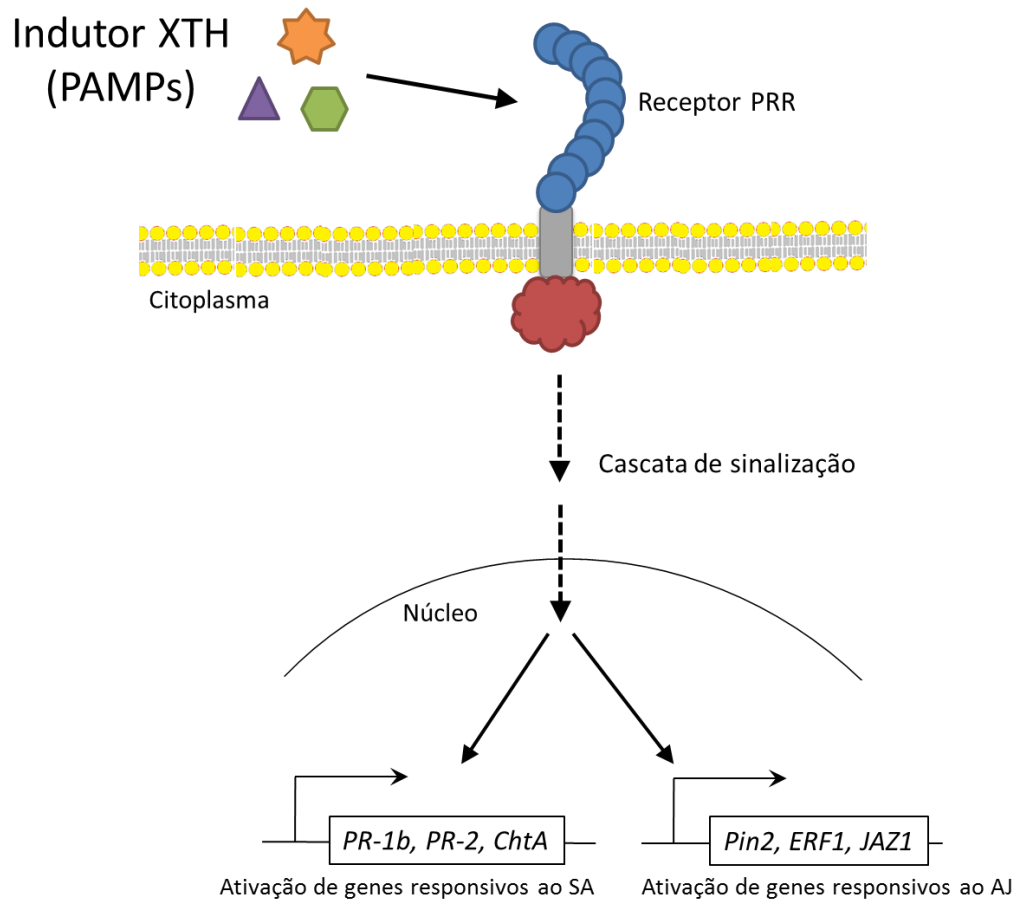
## 1. Considerações finais

A batata foi apresentada ao mundo há pelo menos 440 anos, quando os colonizadores espanhóis levaram esta cultivar para a Europa em meados do século XVI (FAO, 2008). Atualmente a batata é o terceiro alimento de origem vegetal mais consumido no mundo, salientando sua importância na nutrição humana (CIP, 2013). Somente no ano de 2012, a produção atingiu 370 milhões de toneladas de tubérculos (FAO, 2012). Apesar de sua importância socioeconômica, o cultivo da batata é severamente ameaçado por diversas pragas e doenças, as quais são responsáveis por perdas expressivas na produção (Oerke, 2006). Plantas de batata são suscetíveis ao ataque de diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, oomicetos, vírus, nematóides e insetos (CIP, 1996; Pereira & Daniels, 2003; Wharton, 2013). Consequentemente, uma grande quantidade de defensivos agrícolas é administrada no manejo das lavouras comerciais, o que representa um sério risco ao meio-ambiente e à saúde humana.

O uso de indutores de resistência, que promovem a defesa inata das plantas, é uma alternativa econômica e ambientalmente viável para a redução tanto das perdas agrícolas, quanto do uso de agroquímicos nas lavouras. Todavia, o sucesso na utilização de indutores de resistência depende do conhecimento dos mecanismos celulares envolvidos nas respostas de defesa vegetal. Desse modo, o presente trabalho se propôs a investigar e caracterizar o mecanismo de ação do indutor XTH (Astarita *et al.*, 2008) através da análise quantitativa de genes relacionados às diferentes vias de sinalização hormonais, comparando-se as respostas desencadeadas por este indutor àquelas moduladas pelo hormônio ácido salicílico.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi redigido um manuscrito científico (Capítulo 2) onde os resultados são detalhadamente apresentados e discutidos. Inicialmente, foi possível verificar que o indutor XTH tem a capacidade de induzir respostas sistêmicas em plantas de batata. Curiosamente, foi sugerido que plantas de batata respondem à eliciação mediada por MAMPs/PAMPs através das vias de sinalização dos hormônios jasmonato e salicilato (Halim *et al.*, 2009). No presente estudo, o indutor XTH foi aplicado apenas superficialmente nos folíolos de plantas de batata. Dessa forma, acredita-se que o mecanismo de eliciação desencadeado pelo XTH se dê principalmente através do reconhecimento de MAMPs/PAMPs por receptores PRR presentes na superfície celular. Os

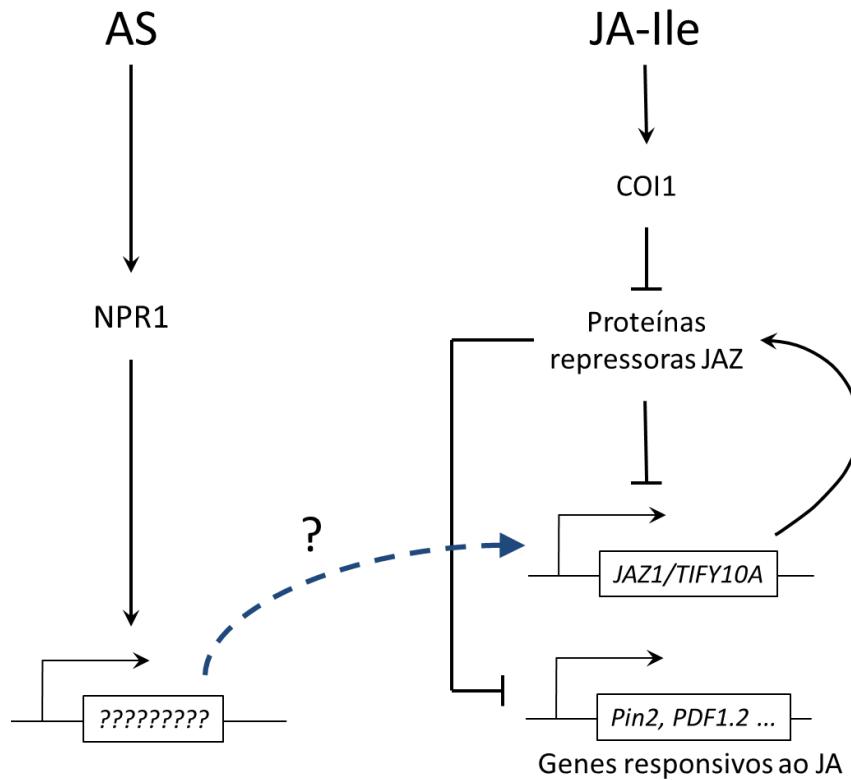
resultados obtidos corroboram o relato de Halim *et al.* (2009) de que respostas de defesa induzidas por MAMPs/PAMPs em plantas de *Solanum tuberosum* são mediadas pelos hormônios jasmonato e ácido salicílico (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de ação proposto para o indutor XTH em folhas de *Solanum tuberosum*. O reconhecimento de PAMPs por receptores PRR desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na ativação de genes responsivos ao AS e AJ.

De forma inesperada, a aplicação de ácido salicílico foi capaz de induzir a expressão do gene *JAZ1/TIFY10A* em folhas de batata. Levando em consideração que o gene *JAZ1/TIFY10A* representa um gene de resposta ao jasmonato, foi levantada a hipótese de que a aplicação exógena de ácido salicílico poderia promover a síntese de jasmonato em plantas de batata. Entretanto, esta hipótese foi refutada pela repressão do gene *Pin2*, um marcador da via do jasmonato. A partir destes resultados, propôs-se que o ácido salicílico é

capaz de regular a expressão do gene *JAZ1/TIFY10A* em plantas de batata independentemente da via de sinalização do ácido jasmônico (Figura 2).



**Figura 2.** Modelo proposto de regulação do gene *JAZ1/TIFY10A* pelo ácido salicílico em *Solanum tuberosum*. AS (ácido salicílico), JA-Ile (jasmonato-isoleucina), COI1 (coronatine insensitive 1), JAZ (Jasmonate ZIM domain protein).

## 2. Perspectivas futuras

Estudos futuros deverão ser realizados de modo a investigar-se mais a fundo a contribuição de cada um dos hormônios, ácido salicílico e ácido jasmônico, nas respostas de defesa desencadeadas por MAMPs/PAMPs em plantas de batata. Além disso, o mecanismo de regulação do gene *JAZ1/TIFY10A* pelo ácido salicílico também deve ser investigado mais detalhadamente. Uma forma de aprofundar o entendimento acerca do papel do ácido salicílico na regulação do gene *JAZ1/TIFY10A* é através da utilização de plantas transgênicas insensíveis ao ácido jasmônico ou ao ácido salicílico. Dessa forma, caso o ácido salicílico seja capaz de ativar a expressão do gene de forma independente do ácido jasmônico, as plantas insensíveis ao jasmonato deverão expressar *JAZ1/TIFY10A* mesmo quando aspergidas com

ácido salicílico. Por outro lado, plantas insensíveis ao ácido salicílico ou duplamente insensíveis ao salicilato e jasmonato não deverão expressar este gene durante um tratamento com ácido salicílico. Além disso, também é necessário investigar os possíveis alvos da proteína JAZ1/TIFY10A em *Solanum tuberosum*. Um método muito utilizado para prospecção da interação entre uma proteína e seus alvos é o sistema de duplo-híbrido em levedura.



## REFERÊNCIAS

- Astarita L.V., Dalmas F.R., Poiatti V.A.D. (2008). Bacterial Extract Elicitor. PI0805370-7; CN102256495A; US20110237433A1.
- CIP – International Potato Center (1996). Major Potato Diseases, Insects, and Nematodes. Disponível em: <<http://cipotato.org/publications/pdf/002408.pdf>>. Acesso em: 10/11/2013.
- CIP – International Potato Center (2013). Disponível em: <<http://cipotato.org/potato>>. Acesso em: 10/11/2013.
- FAO (2008). International Year of the Potato 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/potato-2008/en/index.html>>. Acesso em: 10/11/2013.
- FAO (2012). FAO Statistical Database (FAOSTAT). Disponível em: <[http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/commodities\\_by\\_regions/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/rankings/commodities_by_regions/E)>. Acesso em: 10/11/2013.
- Halim V.A., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Rosah S. (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant Journal* 57:230-242. DOI:10.1111/j.1365-3113X.2008.03688.x
- Oerke E.-C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144:31-43. DOI: 10.1017/S0021859605005708
- Pereira A.S. & Daniels J. (2003). *O Cultivo da Batata na Região Sul do Brasil*. 1ª edição, 567 p. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.
- Wharton P.S. (2013) Michigan Potato Diseases. Disponível em: <<http://www.potatodiseases.org/index.html>>. Acesso em 10/11/2013.