



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

CALINO FERREIRA PACHECO NETO

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

**INDUÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA CRUZADA EM *SOLANUM
TUBEROSUM* UTILIZANDO INDUTORES DE RESISTÊNCIA CONTRA
PATÓGENOS**

Porto Alegre

2014

CALINO FERREIRA PACHECO NETO

Orientador: Prof. Dr. Leandro Vieira Astarita

INDUÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA CRUZADA EM *SOLANUM TUBEROSUM* UTILIZANDO INDUTORES DE RESISTÊNCIA CONTRA PATÓGENOS

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

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Calino Ferreira Pacheco Filho e Norma Ione Pereira, pelo apoio, carinho, preocupação, compreensão e por não deixarem de acreditar em mim. Ao meu irmão Cássio Pacheco pelo apoio e compreensão. A toda minha família, que apesar da distância, esteve sempre me apoiando com os melhores votos.

Ao professor Leandro Vieira Astarita principalmente pela paciência, compreensão e os constantes ensinamentos científicos e filosóficos, que com certeza levarei para o resto da vida.

A professora Eliane Santarém pela amizade, carinho e auxílio.

A técnica do laboratório de Biotecnologia Vegetal, Janaína Langlois, pela amizade, apoio e pelo auxílio mesmo nos maiores perrengues, com chuva ou sol.

Aos meus amigos biólogos e “ex-biotecs” Fox e Kiko, Fernando Dalmas e Marco Gadegast, respectivamente, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos colegas, e todo o grupo do Laboratório de Biotecnologia Vegetal - PUCRS, pela amizade, companheirismo, apoio sempre que precisei, e pelas risadas e brincadeiras. Obrigado Galera: Franciele Ortolan, Tamiris Salla, Giulia Failace, Kleiton Machado, Wagner Fagundes, Maila Pacheco, Natane Girelli, Natasha Ruschel, Rafaela Nozari, Thanise Ramos, Tiago Sartor.

Aos meus queridos amigos, Carolina Esteves, Fernanda Cruz, Sthefanie Souza, Max Bof, Pedro Joel Filho, Marcello Campos, Miguel Cabral, Cristiano Prunes, Mario Rosito, Gabriel Larré, Gabriel Armiliato, Natalia Ambros, Joseane Canova, Marília Rodrigues, André Bresolin, Joken Morencos e demais, por terem escutado por meses as minhas lástimas e promessas sobre a elaboração e término do presente trabalho.

RESUMO

Apesar da batata ser um dos alimentos mais consumidos do mundo, a sua produção apresenta sérias dificuldades devido a doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, reduzindo a produtividade e aumentando os custos de produção. Assim, este trabalho teve por objetivo analisar os mecanismos envolvidos na defesa cruzada de *Solanum tuberosum* cv. Ágata, através a ação de indutores bióticos no metabolismo de fenilpropanóides. Plantas jovens de *S. tuberosum* mantidas em casa de vegetação foram aspergidas com indutores de defesa: extratos autoclavados de *Xanthomonas axonopodis* e de *Ceratocystis fimbriata*, além do indutor sintético Bion®. Após cinco dias do tratamento, as plantas foram desafiadas com o fungo patogênico *Rhizoctonia solani*, sendo analisados o progresso da doença e os parâmetros bioquímicos: compostos fenólicos totais, flavonóides quercetínicos e atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidases. As plantas tratadas com o indutor XTH foram resistentes ao patógeno até 21 dpi. O indutor biótico XTH foi mais eficiente que o Bion® e CTS na promoção da resistência vegetal. A atividade mais elevada da POX foi observada em 9 dpi com o tratamento XTH. A inoculação de *R. solani* causou o aumento progressivo da atividade da PPO nas plantas dos tratamentos XTH e controle. Os indutores CTS e Bion® causaram a diminuição da atividade de PPO ao longo do experimento. Os níveis dos compostos fenólicos e dos flavonoides foram similares entre todos os tratamentos. As plantas foram mais suscetíveis ao patógeno *R. solani* quando aspergidas previamente com CTS ou Bion®. O XTH apresenta um bom potencial de utilização como indutor de resistência, retardando o progresso da doença e promovendo a resistência contra *R. solani*.

Palavras-chave: *Ceratocystis fimbriata*; *Xanthomonas axonopodis*; Acibenzolar-S-methyl; polifenol oxidase; peroxidases

ABSTRACT

Rhizoctonia solani is a pathogenic ubiquitous fungus in *Solanum tuberosum* cultures, causing severe losses in production. Plant resistance can be induced by molecules that promote natural plant defense system. In the present study, the efficiency of the inducers Acibenzolar-S-methyl (BION[®]), *Ceratocystis fimbriata* extract and *Xanthomonas axonopodis* extract against the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* in potato plants was evaluated. Plants treated with the inducer XTH were resistant to the pathogen at 21 dpi. The biotic inducer XTH was more efficient than Bion[®] and CTS on promoting plant resistance. The highest activity of POX was observed at 9 dpi on the XTH treatment. Inoculation of *R. solani* caused a progressive increase in the PPO activity in XTH- and control-plants. Both inducers CTS and Bion[®] caused a reduction on PPO activity over time. Levels of phenolics compounds and flavonoids were similar among all treatments. Plants were more susceptible to *R. solani* when induced with CTS or Bion[®]. XTH did not show a negative effect on plant resistance. XTH presented a good potential as inducer, delaying disease progression and promoting plant resistance against *R. solani*.

Keywords: *Ceratocystis fimbriata*; *Xanthomonas axonopodis*; Acibenzolar-S-methyl; polyphenol oxidase; peroxidases

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 08 |
| 1.2 OBJETIVOS | 09 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 09 |
| 2.1 <i>Solanum tuberosum</i> | 09 |
| 2.1.1 Principais doenças | 10 |
| 2.2 Defesa vegetal..... | 10 |
| 2.2.1 Percepção de patógenos..... | 10 |
| 2.2.2 Metabolismo relacionado à defesa | 11 |
| 2.2.3 Resistência sistêmica adquirida (SAR) | 12 |
| 2.3 Agentes indutores de defesa e patógenos desafiadores | 13 |
| 2.3.1 Características de agentes indutores | 13 |
| 2.3.2 Indutor sintético de defesa Bion [®] | 14 |
| 2.3.3 Indutor de defesa XTH | 15 |
| 2.3.4 <i>Ceratocystis fimbriata</i> como indutor de defesa vegetal | 15 |
| 3. REFERÊNCIAS | 17 |
| 4. ARTIGO | 20 |
| Introduction..... | 23 |
| Material and Methods | 24 |
| Results..... | 27 |
| Discussion..... | 28 |
| Acknowledgements..... | 31 |
| References..... | 32 |
| Tables and figures | 35 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 6. CONCLUSÕES | 39 |
| 7. PERSPECTIVAS | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS

CTS - Extrato autoclavado de *Ceratosystis fimbriata*

EROs - Espécies reativas de oxigênio;

ETI - Imunidade desencadeada por efetores;

ISR - Resistência sistêmica induzida;

MAMPs - Padrões moleculares associados a microrganismos;

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos;

PAL - Fenilalanina amônia liase;

POX – Peroxidase;

PPO - Polifenol oxidase;

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões;

PRs - Proteínas relacionadas à patogenicidade;

PTI - Imunidade desencadeada por PAMPs;

SAR - Resistência sistêmica adquirida;

XTH – Extrato autoclavado de *Xantomonas axonopodis*

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de batata é uma das mais importantes do planeta, sendo um dos alimentos mais consumidos e com grande importância na economia mundial. Existem diversos tipos de cultivares de batata comerciais. No Brasil, a cultivar Ágata apresenta características agronômicas importantes, como a tuberação precoce e tubérculos grandes, conferindo melhor produção e fazendo desta cultivar a melhor opção no Brasil.

A cultura da batata, apresenta em sua produção sérias dificuldades, devido a doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, reduzindo a produtividade e aumentando os custos de produção. Além disso, a utilização de defensivos agrícolas causa danos ambientais, pois estes produtos apresentam efeitos tóxicos em outras plantas e organismos.

Uma abordagem promissora no controle de doenças em campo é a promoção da defesa vegetal, utilizando indutores bióticos, os quais visam aumentar de forma ampla e preventiva, os níveis de resistência nas plantas. As respostas amplas de defesa são complexas, envolvendo mecanismos de resposta cruzada, onde indutores de defesa contra patógenos bacterianos podem também promover a defesa contra fungos patogênicos. Esta abordagem torna-se interessante em plantações nas quais as plantas são atacadas por diferentes patógenos.

A defesa vegetal é desencadeada por uma série de estímulos dentro da planta, que vão desde a sua percepção a injúrias até a liberação de compostos para defender-se de uma ameaça. Alguns destes compostos, como os compostos fenólicos e flavonoides, bem como as enzimas envolvidas na defesa vegetal, como a peroxidase e a polifenol oxidase são indicadores da resposta de defesa das plantas sob ataque de patógenos.

O fungo *Rhizoctonia solani* é um dos principais patógenos da batata, estando presente em todo mundo. O controle desta doença com fungicidas químicos nem sempre é eficaz. Neste sentido, o controle com indutores biológicos pode desempenhar um papel valioso na redução das perdas econômicas.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo analisar os mecanismos envolvidos na defesa cruzada de *Solanum tuberosum* cv. Ágata, avaliando a ação de indutores bióticos no metabolismo de fenilpropanóides, relacionados à defesa vegetal.

1.1 OBJETIVOS

- Avaliar os mecanismos de defesa contra patógenos em *Solanum tuberosum* cv. Ágata promovidos por indutores bióticos;
- Determinar os níveis de compostos secundários (compostos fenólicos e flavonoides quercetínicos) relacionados à defesa vegetal em *S. tuberosum* em resposta ao fungo *Rhizoctonia solani*, com a aplicação prévia de extratos de *Ceratocystis fimbriata* (CTS) ou de *Xanthomonas axonopodis* (XTH);
- Avaliar os níveis de atividade de enzimas (polifenol oxidases e peroxidases) relacionadas à defesa vegetal em *S. tuberosum* em resposta ao fungo *R. solani* com a aplicação prévia dos indutores bióticos CTS ou XTH;
- Avaliar a progressão da doença causada pelo patógeno *R. solani* em plantas de batata;
- Determinar a ocorrência de resistência cruzada nas plantas de batata submetidas aos indutores de defesa CTS e XTH.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Solanum tuberosum*

A batateira é uma planta dicotiledônea e tem como centro de origem a região próxima à fronteira entre o Peru e a Bolívia. Nos Andes, a bataticultura vem sendo praticada pelos indígenas nos últimos oito milênios, havendo oito espécies botânicas cultivadas e mais de 200 espécies tuberíferas silvestres. A batata andina foi levada para a Espanha em 1570, após a conquista do Império Inca pelos espanhóis. No entanto, somente 200 anos depois se tornou um alimento básico para os europeus.¹

Atualmente, no Brasil são plantados aproximadamente 147 mil hectares de batata por ano, com produção de 3.511.892 toneladas de tubérculos.² A região sul vem se destacando no cenário da cadeia de produção da batata, produzindo aproximadamente 1.241.761 toneladas por ano, correspondendo a segunda maior produção do Brasil. O Estado do Paraná é responsável por 60% da produção da região Sul.²

A cultivar Ágata (Böhm52/72 x Sirco), originária da Holanda, representa uma das cultivares comercializadas mais importantes no Brasil, apresentando características agronômicas importantes como a tuberização precoce, iniciando-se aos 35 dias após o plantio. Esta precocidade é sua característica marcante, produzindo tubérculos normalmente uniformes em tamanho. Como características agronômicas, as plantas apresentam hastes finas

e moderadamente finas, com coloração verde muito pronunciada e que se espalham muito; folhas moderadamente grandes, de silhueta bastante fechada e de cor verde clara; folículos grandes a muito grandes; floração pobre de inflorescências pequenas e flores brancas; ciclo precoce a muito precoce; tubérculos grandes, ovais, com película amarela e predominantemente lisa, polpa de cor amarelo-clara, olhos superficiais e baixo teor de matéria seca.³ Assim, a cultivar representa uma ótima opção para os produtores que querem aliar qualidade com rendimento.

2.1.1 Principais doenças

Segundo a Associação Brasileira da Batata, as principais doenças fúngicas que atingem as lavouras de batata são a requeima (*Phytophthora infestans*), a mancha de alternária (*Alternaria solani*) e o tombamento (*Rhizoctonia solani*).⁴ Por outro lado, as principais doenças bacterianas são a podridão mole (*Pectobacterium carotovorum*) e a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), além de viroses e nematoides.⁵

Rhizoctonia solani Kühn é um fungo habitante do solo, basidiomicota, que ocorre mundialmente causando doenças economicamente importantes em uma grande variedade de plantas cultivadas.⁶ Patógeno de *S. tuberosum*, é onipresente na sua produção em todo o mundo e pode causar lesões nas raízes chamadas de cancro, e produzir esclerócios denominados sarna preta sobre tubérculos filhos.⁷ Ambos os sintomas reduzem o valor de mercado dos tubérculos. O controle com fungicida nem sempre é eficaz, especialmente quando os níveis de inóculo inicial são elevados.⁸ O controle biológico de *R. solani* pode desempenhar um papel valioso na redução das perdas econômicas.

2.2 Defesa vegetal

2.2.1 Percepção de patógenos

A ativação das defesas das plantas pode ocorrer a partir da eliciação por compostos presentes em extratos de plantas, preparações de leveduras, exopolissacarídeos bacterianos, rizobactérias promotoras de crescimento, fungos promotores de crescimento, e ainda cepas não virulentas do patógeno, além do próprio patógeno inativado pelo calor.⁹

O reconhecimento de patógenos e seus produtos são eventos primários e essenciais para indução da expressão dos mecanismos de resistência ou suscetibilidade nas plantas. Este reconhecimento, normalmente, se dá por meio da ligação de um elicitador, produzido pelo fitopatógeno, a PRRs (Receptores de reconhecimento de padrões), a partir desta ligação

ocorre a sinalização e a síntese de compostos de defesa.¹⁰ PRRs reconhecem estruturas com ampla distribuição em células microbianas, normalmente, são de natureza protéica e presentes tanto na superfície externa quanto membrana citoplasmática interna, permitindo o reconhecimento de patógenos em diferentes localizações. Existem poucas informações referentes à ligação entre receptor e elicitor. Contudo, se houver semelhança entre o sistema vegetal com o modelo existente em mamíferos, a ligação receptor-elicitor pode ser multivalente. Assim, um elicitor pode se ligar a mais de um receptor ou a mais de um sítio de um mesmo receptor.¹¹

As plantas apresentam um mecanismo de reconhecimento primário denominado de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Este sistema se baseia na detecção primária de moléculas evolutivamente bastante conservadas, tais como flagelina, quitina e lipopolissacarídeos, através dos receptores de reconhecimento de padrões presentes na membrana plasmática. Estes eventos de reconhecimento levam à ativação da defesa vegetal, denominada de PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), que está associada com sinalização mediada por MAP-quinases, induzindo defesa através da expressão de genes específicos, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e deposição de calose na parede celular. A indução de PTI é, muitas vezes, suficiente para impedir a colonização microbiana da planta.¹²

2.2.2. Metabolismo relacionado à defesa

A via dos fenilpropanóides é uma das mais importantes no metabolismo de defesa vegetal. Os fenilpropanóides têm como seus principais representantes os compostos fenólicos. Estes compostos passam de uma forma atóxica, reduzida e compartimentalizada, para uma forma tóxica, não reduzida, ocorrendo a descompartimentalização. Fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica tanto sobre patógenos como sobre a própria célula vegetal, contribuindo para a reação de hipersensibilidade.¹³ Os ácidos clorogênico, caféico e ferrúlico são exemplos de alguns desses compostos. Algumas formas de fenóis podem ser convertidas em derivados com radicais de oxigênio, extremamente reativos (EROs) tornando-se muito tóxicos.¹⁴ Os fenóis possuem, pelo menos, um anel benzênico, com um ou mais grupos hidroxila, livres ou substituídos.

As peroxidases (POX) representam um grupo de enzimas oxidoreduases relacionadas à defesa vegetal. Estas são capazes de catalisar um grande número de reações oxidativas em plantas, usando peróxido de hidrogênio como substrato, ou, em alguns casos, oxigênio como

um aceptor de hidrogênio. Este grupo de enzimas está relacionado ao enrijecimento das paredes vegetais quando as células são atacadas por microrganismos patogênicos.¹⁸

As polifenol oxidases (PPO) constituem outro grupo de enzimas com ação na defesa vegetal. Estas enzimas também são conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases, ocorrendo em plantas, animais e fungos. Estas enzimas contêm cobre no centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio. A primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis formando *o*-difenois e a segunda à oxidação de *o*-difenois formando *o*-quinonas. As polifenoloxidases utilizam dois principais grupos de substratos, os monofenólicos: Citase *p*-cresol, tirosina e ácido *p*-cumárico; e os substratos difenólicos catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico.¹⁹

Peroxidases e polifenoloxidases lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local da descompartimentalização celular do tecido vegetal provocada por patógenos. Um dos resultados mais estudados deste fenômeno é o aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas,²⁰ ocorrendo somente no primeiro estágio da infecção por microrganismos, levando à formação de quinonas a partir de *o*-difenois por processo enzimático.²¹ No entanto, há uma sequência de reações químicas que são ainda pouco conhecidas.

2.2.3 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)

A Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) é o mecanismo de defesa responsável por “imunizar” a planta perante um ataque de microrganismos, produzindo um sinal liberado a partir do sítio de infecção, o qual provoca a necrose e a translocação deste sinal para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que protegerão a planta contra agressões subsequentes. Esta resposta está relacionada com modificações na parede celular vegetal, liberação de fitoalexinas e o aumento na expressão de vários de genes já caracterizados e envolvidos com defesa, como os genes relacionados à patogênese (genes PR).

Existem relatos da ocorrência da SAR desde 1933, onde plantas previamente infectadas por patógenos ou pelo patógeno atenuado adquiriam resistência a uma segunda infecção.²² Ross²³ demonstrou que plantas de fumo após a infecção localizada com o vírus do mosaico do tabaco (TMV), adquiriam resistência sistêmica contra vários patógenos, resultando na concepção do termo “resistência sistêmica adquirida”.

A SAR pode ser induzida por diferentes moléculas de origem variável, podendo ser constituídas de lipopolissacarídeos, glicoproteínas da parede celular de fungos patogênicos,

carboidratos da parede celular de fungos não patogênicos, carboidratos, glicoproteínas, proteínas e lipídeos.²⁴⁻²⁵

Entre os indutores abióticos da SAR, podemos mencionar o ácido β -aminobutírico (BABA), o ácido salicílico (AS) e os respectivos análogos funcionais como o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) e o éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, Bion[®]). O composto sintético acibenzolar tem conferido proteção sistêmica contra diferentes patógenos em várias culturas como, por exemplo, batata, fumo, trigo, feijoeiro e cacauero.²⁶⁻²⁷ Colson e Deverall²⁸, trabalhando com o algodoeiro, relataram que o AS e o INA parecem superar o efeito dos ativadores bióticos da SAR e tornam as plantas mais resistentes à mancha de *Alternaria*, à murcha de *Verticillium* e à queima bacteriana. Em pepino, por exemplo, a inoculação primária com o fungo *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose, induz a SAR contra uma dúzia de doenças causadas por patógenos fúngicos e bacterianos, bem como virais.²⁹ Em *Arabidopsis*, a murcha causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*, foi afetada por respostas de defesa ativadas durante SAR, que também foi efetiva contra a mancha bacteriana e a podridão negra.³⁰

2.3 Agentes indutores de defesa e patógenos desafiadores

2.3.1 Características de agentes indutores

Os indutores de defesa podem ser definidos como agentes externos (bióticos ou abióticos) ao vegetal que promovem a ativação de um estado de resistência contra doenças, o qual é induzido sistemicamente em plantas, sem qualquer alteração do genoma do vegetal. Esta ativação de resistência ocorre de maneira não-específica, por meio da ativação de genes que codificam para diversas respostas de defesa.³¹⁻²⁷

A atividade do agente indutor não é devida à ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes antimicrobianos, mas sim relacionado à capacidade do mesmo em sensibilizar e ativar mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos nas plantas, em resposta à presença de um patógeno em potencial. Usualmente, estas respostas são complexas e têm como base a ação combinada de diversos fatores e não apenas um componente.³²

Existem no mercado diversos indutores de defesa para diferentes tipos de patógenos, apresentando princípios ativos distintos. O produto comercial denominado de Messenger[®] possui em sua composição uma proteína harpina (hrp) extraída da bactéria *Erwinia amylovora*, agente causador do “fogo bacteriano” em pereira e macieira. Ele é indicado para

proteção de diversas plantas contra doenças causadas por bactérias, vírus, fungos, nematóides e insetos, sugerindo uma indução de defesa cruzada de amplo espectro nas plantas. Outro produto é o Elexa[®], constituído de quitosana extraída do exoesqueleto de crustáceos. Ambos os produtos possuem características semelhantes, pois suas moléculas se ligam à membrana das células e mimetizam uma interação incompatível entre planta e “patógeno”, desencadeando, assim, uma reação de defesa.¹⁰

O Oxycom[™] é um produto formado pela combinação de dois compostos, sendo o primeiro uma mistura de nutrientes e o segundo uma mistura de ácido peracético, ácido acético e H₂O₂. O produto é capaz de aumentar a atividade de enzimas importantes ligadas à SAR, como a PAL, chalcona sintase e POX, protegendo as plantas contra nematóides e fungos.³³ Os indutores de defesa vegetal, por serem produzidos com compostos naturais têm vantagem em relação ao uso de defensivos químicos e, em determinados casos, são mais seletivos e eficazes, além de não prejudicarem o meio ambiente e as pessoas que o manipulam, tornando-se uma alternativa mais segura em um mercado em expansão.

2.3.2 Indutor sintético de defesa Bion[®]

O éster-S-metil do ácido benzol (1,2,3) tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM), comercializado com o nome de Bion[®] 500 WG (Syngenta: Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA) é um benzotiadiazole, análogo ao ácido salicílico (AS). Da mesma forma que o ácido salicílico, o ASM é um ativador químico de resistência, fornecendo proteção contra o mesmo espectro de patógenos e ativando a expressão dos mesmos genes, quando comparado com a indução biológica da SAR. Constitui-se no primeiro ativador vegetal sintético de SAR disponível no mercado, registrado para as culturas do cacau, tomate, batata e citros.³⁴

A ativação da SAR por Bion[®] foi observada nas culturas de arroz, trigo, fumo, banana e tomate, entre outras, geralmente contra doenças causadas por fungos e bactérias.³⁵ O Bion[®] é capaz de desencadear a resistência cruzada contra agentes de estresse biótico. Segundo Diwaker *et al.* (2010), o Bion[®] agiu promovendo a defesa de plantas de tabaco através da ativação do gene SABP2 (*Salicylic Acid-Binding Protein 2*) que percebe e aciona o sistema imune inato vegetal.³⁶ Em plantas de trigo, o Bion[®] promove uma resistência duradoura contra o míldio pulverulento causado por *Erisiphe graminis*. Da mesma forma, este produto se mostrou eficaz em plantas de soja, tanto em campo quanto em casa de vegetação.³⁷

2.3.3 Indutor de defesa XTH

O indutor de defesa XTH trata-se de um indutor biótico formulado a partir de extratos bacterianos autoclavados ou filtroesterilizados. O produto denominado de XTH foi desenvolvido pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Biociências da PUCRS em 2008 (PI 0805370-7). Após diversos testes em casa-de-vegetação utilizando-se plantas de batata, chegou-se a uma formulação adequada para promover o metabolismo de resistência sem comprometer o crescimento das plantas.³⁸ Em estudos anteriores, foi determinada a eficiência do produto XTH comparado ao produto comercial Bion[®], recomendado como indutor de resistência em batata e tomate. Estes resultados indicaram que a resistência promovida pelo XTH foi significativamente superior ao obtido pelo produto comercial, indicando um potencial econômico no uso deste indutor de resistência. Avaliações realizadas demonstraram que os sobrenadantes das culturas bacterianas, utilizadas na formulação do indutor XTH, também apresentam capacidade de promover o aumento do metabolismo relacionado à defesa vegetal em cultura de células de batata, indicando que moléculas hidrossolúveis exsudadas, tais como proteínas e açúcares são os agentes responsáveis pela promoção da defesa. Neste sentido, até o presente momento se desconhece o mecanismo pelo qual o indutor XTH age promovendo alterações metabólicas em células e tecidos de plantas de batata.³⁸

2.3.4 *Ceratocystis fimbriata* como indutor de defesa vegetal

Esse trabalho é pioneiro na avaliação do fungo *Ceratocystis fimbriata* como possível indutor de defesa vegetal. Assim foi utilizado um indutor fúngico para testar com um desafiador bacteriano (*E. carotovora*), conferindo assim a possível ocorrência de resistência cruzada nas plantas de batata.

O fungo *C. fimbriata* pode ser utilizado como indutor biótico de defesa, a partir da utilização de extratos inativados (autoclavados ou filtroesterilizados). Este microrganismo é incompatível com *S. tuberosum*, o que significa que este não causa doença na batateira. A utilização de um organismo incompatível e inativado como indutor é uma abordagem vantajosa, por não oferecer risco tanto para a planta a ser induzida quanto para outras espécies que eventualmente podem possuir uma relação de compatibilidade com o patógeno.

C. fimbriata é descrito como causador de doenças em muitas plantas lenhosas de importância econômica, como acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild), cacau (*Theobroma cacao* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), citrus (*Citrus* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), figo (*Ficus carica* L.), gmelina (*Gmelina arborea* Roxb), mangueira (*Mangifera indica* L.) e

seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell & Arg], além de algumas herbáceas, como batata doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. É um patógeno que atinge o xilema da planta e exala odor de fruta madura que atrai insetos (vetores) que são responsáveis por transmitir a doença para outras árvores.³⁹

3 REFERÊNCIAS

- 1 Filgueira FAR, Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, 2ª edição. UFV, Viçosa, p.412 (2003).
- 2 IBGE, Estatística de produção Agrícola (2012). Disponível: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201206.pdf. [1 de março 2014].
- 3 Melo, PCT, Pinto CABP, Granja N P, Miranda Filho HS, Sugawara AC, Oliveira RF, Análise do crescimento da cultivar de batata “Ágata”. Anais do 43º Congresso brasileiro de olericultura, Recife, **21**:323-324 (2003).
- 4 ABBA, Principais doenças da Batata (2001). Disponível : http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista01_018.htm. [1 de março de 2014].
- 5 Pereira AS, Daniels J, O cultivo da batata na região sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Clima Temperado. 567p. (2003).
- 6 Anderson NA, The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **20**:329-344 (1982).
- 7 Banville GJ, Carling DE, Otrysko BE, *Rhizoctonia* disease on potato. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 321-330 (1996).
- 8 Tsror L, Peretz-Alon I, The influence of the inoculum source of *Rhizoctonia solani* on development of black scurf on potato. *Journal of Phytopathology* **153**:240-244 (2005).
- 9 Silva RA, Reis VM, Baldani JI, Olivares FL, Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Embrapa Agrobiologia, Brasília, 49p. (2008).
- 10 Labanca ERG, Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.118 (2002).
- 11 Bertozzi CR, Kiessling L, Chemical glycobiochemistry. *Science* **291**: 2357–2364 (2001).
- 12 Bhardwa JV, Meier S, Petersen LN, Ingle RA, Roden LC, Defence responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Pseudomonas syringae* are regulated by the circadian clock. *PLoS One* **6**(10): e26968 (2011).
- 13 Hrazdina G, Compartmentation in phenolic metabolism. *Acta Horticulturae*, Wageningen, Transgenic Banana Plants Enhances Resistance to *Fusarium* Wilt. *Plant Cell Reports* **26**:631–639 (1994).

14 Hartleb H, Heitefuss R, Hoppe H, Resistance of crop plants against fungi. G. Fischer, Stuttgart, p.544 (1997).

15 Chakraborty U, Dutta S, Chakraborty B, Drought induced biochemical changes in young tea leaves. *Indian Journal of Plant Physiology* **6**:103-106 (2001).

16 UFRPE, Atividade da fenilalanina amônia liase em aceroleiras submetidas ao estresse hídrico (2009). Disponível: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0122-1.pdf>. [28 de fevereiro de 2014].

17 Jan S, Parween T, Siddiqi TO, Mahmooduzzafar, UM, Enhancement in furanocoumarin content and phenylalanine ammonia lyase activity in developing seedlings of *Psoralea corylifolia* L. in response to gamma irradiation of seeds. *Radiat Environ Biophys* **51**:341-347 (2012).

18 Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI et al. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* **122**:1119- 1112 (2000).

19 Vámos-Vigyázó, L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critic. Rev Food Sci Nutr* **15**:49-127 (1981).

20 Macheix JJ, Fleuriet A, Quessada MP, Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. (Ed.) Greppin H, Penel C, Gaspar T, Geneva, p.286 (1986).

21 Mason, H.S. Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Advanced in Enzymology and Related Subject of Biochemistry* **16**:105-184 (1955).

22 Chester KS, The problem of acquired physiological immunity in plants. *Phytopathology* **80**: 466-472 (1933).

23 Ross AF, Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340-358 (1961).

24 Hahn MG, Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 387-412 (1996).

25 Koch T, Schulz S, Schroder H, Wolf R, Raulf E, Holtt V, Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* **273**: 13652–13657 (1998).

26 Guzzo SD, Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 256 (2004).

27 Hammerschmidt R, Métraux, JP, Van Loon LC, Inducing Resistance: a summary of papers

presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. *European Journal Plant of Pathology* **107**: 1-6 (2001).

28 Colson E, Deverall B, Helping plant fight their own disease battles. *Australian Cottongrower* **17**: 76-80 (1996).

29 Pascholati SF, Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. 1998. 123p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

30 Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Hoffland E, Van Pelt JA, and Van Loon, LC, Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**:1225-1237 (1996).

31 Stadinik MJ, Indução de resistência a oídios. *Summa Phytopathologica* **26**:175-177 (2000).

32 Soares AMS, Machado OLT, Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica* **1**:9-19 (2007).

33 Kim YC, Blee KA, Robins J, Anderson AJ, OxycomTM under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. *European Journal of Plant Pathology* **107**:129-136 (2001).

34 Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Rella, MG, Meier B, Dincher S, Staub T, uknes S, A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J* **10**: 61-70 (1996).

35 Novartis. The plant activator; nature created the concept. Novartis Crop Protection. 35p. Novartis. s.d. Plant activator. Ativação da resistência de plantas: novo conceito no manejo integrado de doenças. (Informe Técnico) 4 p. (1997).

36 Diwaker T, Yu-lin J, Dhirendra K, SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Letters* **584**: 3458–3463 (2010).

37 Grolach JS, Volrath G, Knauf-Beiter G, Hengy U, Beckhove KH, Kogel M, Ostendorp T, Staub E, Ward H, Kessman RJ, Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* **8**:629-643(1996).

38 Poiatti VAD, Dalmas, FR, Astarita LV, Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. *Biol Res* **42**: 205-215 (2009).

39 Baker CJ, Harrington TC, Krauss U, Alfenas AC, Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* **93**:1274- 1284 (2003).

4. ARTIGO

Cross resistance and inducers on defense responses of *Solanum tuberosum* plants infected with *Rhizoctonia solani*

Artigo a ser submetido à revista American Journal of Botany
JCR 2,586

Cross resistance and inducers on defense responses of *Solanum tuberosum* plants infected with *Rhizoctonia solani*

Pacheco-Neto^a, Calino Ferreira; Santarem, Eliane Romanato^a; Astarita^{a*}, Leandro Vieira

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

*Corresponding author:

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

Tel.: +55 51 3353 4148

E-mail: astarita@pucrs.br

Abstract

Premise of the study: *Rhizoctonia solani* is a pathogenic ubiquitous fungus in *Solanum tuberosum* cultures, causing severe losses in production. Plant resistance can be induced by molecules that promote natural plant defense system. In the present study, the efficiency of the inducers Acibenzolar-S-methyl (BION®), and extracts of *Ceratocystis fimbriata* (CTS) and *Xanthomonas axonopodis* (XTH) were evaluated in potato plants inoculated with the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*.

Methods: Inducers were prepared from bacterial suspension of *X. axonopodis* (XTH), the fungus *C. fimbriata* (CTS) and commercial inducer Bion®. Potato plants were sprayed and after five days, they were inoculated with the pathogenic fungus *R. solani*. Development and progression of disease caused by *R. solani* was monitored over 35 dpi. Phenolic compounds; flavonoids; proteins and enzymatic activity of peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) were evaluated 5 days post-inoculation (dpi).

Key results: Plants treated with the inducer XTH showed resistance to the pathogen at 21 dpi. The biotic inducer XTH was more efficient than Bion® and CTS on promoting plant resistance. The highest activity of POX was observed at 9 dpi for the treatment XTH. Inoculation of *R. solani* caused a progressive increase in the activity of POX in XTH- and control-plants. Both CTS and Bion® caused reduction on PPO activity over time. Levels of phenolics compounds and flavonoids were similar among all treatments.

Conclusions: Plants were more susceptible to *R. solani* when treated with CTS or Bion®. XTH showed a positive effect on plant resistance. XTH presented a good potential as inducer, delaying disease progression and promoting plant resistance against *R. solani*.

Key words: *Ceratocystis fimbriata*; *Xanthomonas axonopodis*; Acibenzolar-S-methyl; polyphenol oxidase; peroxidases.

INTRODUCTION

Rhizoctonia solani Kühn is a pathogenic fungus that occurs worldwide and causes important economic losses in a wide variety of crop plants (Anderson, 1982). This fungus is ubiquitous in *Solanum tuberosum* cultures, causing severe losses in production (Banville *et al.*, 1996). The most characteristic symptoms of *R. solani* infection is the formation of lesions in the roots (cancro) and production of sclerotia called black scab in potato tubers, reducing the market value of this crop. Control of *R. solani* based on fungicides is often not effective, especially when infestation levels are high in farming (Tsrer and Peretz-Alon, 2005). A novel and alternative approach for controlling *R. solani* is the promotion of natural plant defense system, representing a strategy for management and control of diseases.

Plant protection system can be induced by molecules which are highly conserved molecular patterns present in a given class of microorganisms (pathogenic or not). Molecules that are recognized by plants and are able to induce defense responses are known as inducers (Thomma *et al.*, 2011). Defense responses driven by inducers are not pathogen-specific and consist in biochemical and structural changes in the plant, such as the accumulation of salicylic acid and reactive oxygen species (ROS), strengthening of cell wall by lignification (Anterola and Lewis, 2002), and the synthesis of phytoalexins (He *et al.*, 2002). Inducers can also lead to a lasting defense response in plants, referred as to Systemic Acquired Resistance (SAR). Starting with signs made by SAR, the plant can release metabolites as enzymes peroxidases (POX); polyphenol oxidases (PPO) are closely related to the induction of resistance in plants (Mohammadi and Kazemi, 2002; Qin *et al.*, 2003, Yao and Tian, 2005). and phenylpropanoids which is related to the mechanisms of adaptation and protection of plants to (Chakraborty *et al.*, 2001).

Phenylpropanoids are the most important compounds in the metabolism of plant defense and might be oxidized from a nontoxic form to a toxic form, such as quinines, by PPO (Macheix *et al.*, 1986). Moreover, peroxidases represent another group of plant defense-related enzymes, which are most likely involved in fortification of cell walls when plants are attacked by pathogenic microorganisms.

Several synthetic activators of defense metabolism have been characterized, such as benzol (1,2,3)-7-thiadizole carbothionic acid S-methyl ester (BTH), 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and N-2-Cyanomethyl-chloroisonicotinamide (NCI), leading to plant resistance against various pathogens (Yasuda *et al.*, 2003). The synthetic inducer acibenzolar-S-methyl (BION[®]) has been used commercially to promote defense, resulting in plant resistance against fungi, viruses and pathogenic bacteria (Resende *et al.*, 2002). On the other hand, biotic

inducers, such as autoclaved extracts of pathogenic bacteria, have been shown to be effective on promoting resistance of *S. tuberosum* against *Pectobacterium carotovorum* (Poiatti *et al.*, 2009), causing hypersensitivity response and increasing synthesis of plant defense compounds. Similarly, pretreatment of tomato plants with harzianolide compound from *Trichoderma harzianum*, was efficient on promoting SAR and reducing foliar lesions caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Cai *et al.*, 2013). Wu *et al.* (2013) showed that incompatible races of *Fusarium* can be used to promote SAR in banana (Musa AAA Cavendish subgroup) conferring resistance against compatible races of *Fusarium*.

Whereas the plant defense responses are not pathogen-specific, several reports have demonstrated the occurrence of wide defense responses leading to resistance of plants to fungi and bacteria (cross-protection). Various studies report benefits from the interaction plant-rhizobacteria on promoting defense responses against fungi and viruses, through the induction of systemic resistance (Maurhofer *et al.*, 1994; Hofté and De Meyer, 1997). Preparations with *Saccharomyces cerevisiae* applied in strawberry plants promoted increased activity of chitinase and glucanase, enzymes involved in SAR, as well as reduced the incidence of *Botrytis cinerea* (Gouvea *et al.*, 2009). Similarly, the use of chitosan (polysaccharide obtained from chitin deacetylation) on strawberry plants resulted in resistance against pathogenic fungi (Mazaro *et al.*, 2008).

In the present study, the efficiency of the inducers Acibenzolar-S-methyl (BION[®]), *Ceratocystis fimbriata* extract and *Xanthomonas axonopodis* extract (PI 0805370-7) against the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* in *S. tuberosum* plants was evaluated. Disease progression in infected plants was assessed by alterations on the levels of, phenolics compounds and the fraction of quercetinic flavonoids, and changes on defense-related enzymes, such as peroxidase and polyphenol oxidases.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Potato tubers, cultivar Ágata, were disinfested in ethanol 70% for 1 min, followed by sodium hypochlorite (2% active chloride) for 20 min and fungicide Ridomil Gold MZ (3 g/L; Syngenta SA) for 20 min. Disinfested tubers were submerged in gibberellic acid (GA₃; 25 mg/L) for 30 min for dormancy loss. Then, tubers were transferred to trays with filter paper and maintained at 25±2°C and 16 h-photoperiod for about 15 days, until shoot development was achieved. Healthy shoot-containing tubers were transferred to plastic pots (11 L) filled with organic soil. Pots were maintained in greenhouse for approximately five weeks, when

plants were used for experiments.

Inducers of plant defense

The fungus *Ceratocystis fimbriata*, pathogen of *Eucalyptus sp.* and incompatible with potato was used as biotic inducer of defense (Baker et al., 2003). Fungus was cultivated on semisolid potato-dextrose-agar (BDA), at 26 °C for seven days. Inducer solution consisted was prepared from the mycelia removed from the culture plates with the aid of a scalpel blade, solubilized in sterile distilled water and autoclaved (121 °C; 1 atm) for 20 min. Autoclaved solution (CTS) was homogenized with a microgrinder. Similarly, autoclaved extracts of *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (XTH) were used as plant defense inducer. Bacteria were cultivated in LB liquid medium for 48 hours at 26 °C, at 100 rpm. The procedure for centrifuging and washing the pellets was the same as previously described and the cell concentration was adjusted for $10^8 - 10^9$ cfu/mL ($OD_{600nm} = 1.0$) (Poiatti *et al.*, 2009). Cell suspension was autoclaved at 121°C, 1 atm for 30 min. Solution of synthetic inducer Acibenzolar-S-methyl (ASM) (Bion® 500WG, Syngenta) was prepared with sterile distilled water at 500 mg L⁻¹.

Experiment design

Experiments consisted in the use of inducers of plant defense prepared from bacterial suspension of *X. axonopodis* (XTH), the fungus *C. fimbriata* (CTS) and commercial inducer Bion®, sprayed on potato plants. All inducers were applied on potato plants with the aid of atomizer (5 ml plant⁻¹), to ensure uniformity of spraying on leaf surface. Plants sprayed with 5 ml of sterile distilled water were used as control. Five days after spraying the inducers, plants were inoculated with the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* as a challenging. *R. solani* was inoculated at the stem base of young *S. tuberosum* plants (five week-old) maintained in greenhouse. Agar discs (1 cm diameter) with mycelia were fixed in shoots with the aid of moistened cotton and covered with plastic wrap. Stems were previously wounded by scratching the site of infection.

The experiment was a factorial design with four plants per treatment. Analyses were carried out at intervals of 1, 3, 6 and 9 days post-inoculation (dpi) for biochemical analysis and 2, 7, 9, 14, 16, 21, 23, 28, 30 and 35 dpi for evaluation of disease progression.

Evaluation of disease symptoms

Development and progression of disease caused by *R. solani* was monitored over 35 dpi. Percentage of affected leaflets, number of leaves with symptoms and death of leaflets were

evaluated. The grading scale proposed by Sidhu & Webster (1977) was used to evaluate the progression of disease symptoms. Disease severity was quantified by visual examination converted into a percentage of severity, following the range 0, 1, 2, 3 and 4, expressing the leaflets condition: 0 - healthy leaflets; 1 - light symptoms; 2 - moderate symptoms; 3 - yellow leaflets and diseased; 4 - dead leaflets. Disease index (DI) below 2, 2 to 3, and 3 to 4 were equated with resistance, moderate resistance and susceptible reaction classes, respectively.

Disease incidence was determined by estimating the chlorotic leaflets (%). The incidence was plotted against time in order to generate the area under the disease progress curve (AUDPC), as shown below:

$$\text{AUDPC} = \sum[(y_{i+1} + y_i) \times 0,5] \times [t_{i+1} - t_i], \text{ where}$$

y_i = percentage of chlorotic leaflets (severity at the i^{th} observation); t_i = time (in days) after inoculation with *R. solani* at the i^{th} observation.

Secondary metabolism evaluation

Leaf samples (0.5 g) were ground in 2.5 ml of 80 % methanol (1:5 w/v) and extracts were filtered and centrifuged at 1,250 xg for 15 min at 15 °C. Phenolic compounds were quantified by a colorimetric technique using Folin-Ciocalteu reagents and Na_2CO_3 (20% w/v). The absorbance (765 nm) was determined after 30 min incubation at 25 °C in the dark. Gallic acid was used as standard. Contents of total phenolic compounds were expressed as mg g^{-1} of fresh mass (FM). Levels of flavonoids were determined spectrophotometrically at 415 nm using the reaction with 96% ethanol, 10% aluminum nitrate and 1 M potassium acetate. The flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalents g^{-1} fresh weight (Poiatti et al., 2009).

Activities of polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1) and peroxidases (POX; EC 1.11.17) enzymes were quantified in extracts obtained from *in vitro* plants (0.5 g) grounded in 5 mL of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), supplemented with 2% (v/v) Triton X-100 and 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone. Extracts were filtered and centrifuged at 2,500 xg for 15 min at 5 °C, and the supernatant was collected for determination of protein content and enzyme assay. PPO activity was determined using chlorogenic acid as the substrate at 400 nm in a spectrophotometer, according to Poiatti et al. (2009). Specific enzyme activity was defined as the change in absorbance min mg^{-1} protein. Peroxidases activity was determined in a spectrophotometer by the oxidation of guaiacol at 420 nm, using the extract described above. The reaction mixture contained 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.1 M guaiacol as substrate and 10 mM hydrogen peroxide. Specific enzyme activity was expressed as mKatal mg^{-1} protein. The protein content in the enzyme extracts was measured by the

Bradford method, using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and outliers determined by Boxplot were eliminated. Variance homogeneity was verified through a graphical representation of residuals. Means were separated by Duncan Test, $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, US).

RESULTS

Plants inoculated with *R. solani* showed the characteristic disease symptoms (dark brown lesions, yellow leaves and stem rot). The first symptoms of disease were observed at 9 dpi of *R. solani* (Fig. 1), regardless of treatment. Although plants treated with XTH, CTS and Bion[®] showed 100% of disease symptoms at 28 dpi, control plants reached 100% at 35 dpi. The disease index (DI) indicated that control plants were partially resistant (DI=2.45) against *R. solani* (Table 2). On the other hand, plants treated with the inducer XTH were resistant to the pathogen at 21 dpi ($P=0.011$) (Fig. 1) and showed the lowest disease index (DI=0.97) based on the severity scale. This time point was chosen for DI evaluation because all plants from the treatment Bion[®] presented disease symptoms. In the present work, light and moderate symptoms were not possible to be distinguished.

Levels of disease symptoms were similar between the XTH pretreated plants and plants from the control treatment ($P=0.084$). Interestingly, the biotic inducer XTH was more efficient than the inducers Bion[®] and CTS ($P=0.019$) on promoting plant resistance against *R. solani* (Tab. 1).

Analysis of the POX activity through polynomial regression showed a trend towards increased activity of this enzyme in XTH-treated plants (Fig. 2A). The highest activity of POX ($P < 0.001$) was observed at 9 dpi (0.328 mKatal mg^{-1} protein) for the treatment XTH, representing 1.9 times higher than the activity observed in plants pretreated with Bion[®]. Despite the highest activity of POX at 1dpi ($P=0.019$) have been resulted from CTS treatment, this activity was reduced over time ($R^2=0.74$). PPO activity also varied among the treatments and along the time (Fig. 2B). CTS caused a reduction on PPO activity over time. Contrarily, the highest PPO activities were observed at 3 and 6 dpi (1.20 and 1.18 $\Delta\text{Abs min}^{-1}\text{g}^{-1}$ protein, respectively) in Bion[®]-treated plants. After this time point, PPO activity was reduced (Fig. 2B). Inoculation of *R. solani* caused a progressive increase in the levels of PPO activity in XTH- and control-plants ($R^2=0.88$ and $R^2=0.93$, respectively). However, PPO activity was

significantly higher in XTH plants ($0.85 \Delta\text{Abs min}^{-1}\text{g}^{-1}$ protein) than in control treatment ($0.55 \Delta\text{Abs min}^{-1}\text{g}^{-1}$ protein) at 9 dpi ($P=0.01$). At this time point, no significant difference was observed amongst plants from control, CTS and Bion[®] treatments. Comparative analysis between POX and PPO activities showed a positive and significant ($P<0.05$) correlation in CTS-treated plants ($r=0.987$), indicating parallelism in their activities after fungus infection, response expected in resistant plants.

Plants pretreated with water (control) or XTH showed similar trend on the accumulation of phenolic compounds (Fig. 3A). The highest phenolics levels were observed in the control (2.146 mg g^{-1} FM) and XTH plants (2.148 mg g^{-1} FM) at 6 dpi, significantly differing from the other treatments ($P<0.01$). However, levels of phenolics compounds were similar among all treatments at 9 dpi ($P=0.135$). Overall, no difference was detected on the behavior of flavonoid synthesis and accumulation among all treatments throughout the time of evaluation (Fig. 4B). At 9 dpi, however, significant difference on Bion[®]-treated plants was observed (0.61 mg/g FM) ($P=0.018$).

DISCUSSION

Plant defense inducers secreted by or released from microbial may induce a wide range of unspecific plant defense responses, leading to cross resistance against different microorganisms. Inducers have been isolated from fungi, bacteria and oomycete pathogens and vary from proteins, peptides, glycoproteins, lipids, and oligosaccharides (Foley et al., 2013). As expected for these molecules, our previous studies with *in vitro* cultures showed that XTH and CTS extracts do not present any inhibitory effect against *R. solani* (data not shown). Although the effect of XTH was similar to the control, the inducer was the most effective in promoting plant resistance against *R. solani*, compared to Bion[®] and CTS. Although both extracts might be considered biotic inducers, their different composition may be accounted for the difference on their effectiveness. XTH is constituted by autoclaved cell fragments from the incompatible bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, whereas CTS is constituted by autoclaved cell fragments from the incompatible fungus *Ceratosystis fimbriata*. Composition of XTH and CTS suggests that their perception occur at the plant cell surface by plasma membrane receptors (PRR – Pattern Recognition Receptors), initiating PTI-type recognition (PAMP-triggered immunity), in which the plant perceives the elicitor, activates its innate immunity and remains in alertness until pathogen attack. Interestingly, the faster disease progression promoted by CTS indicates that this inducer disturbed the plant defense, leading to defense weakness. The reduced CTS effectiveness might be attributed to a reduced

solubility of autoclaved compounds present in the crude non-filtrated extract, hindering the plant-inducer recognition. However, it still unknown the mechanism by which CTS treatment increased plant susceptibility to *R. solani*. On the other hand, the inducer XTH showed a positive effect on plant resistance and its effectiveness might be related to the promotion of nonspecific signaling pathways, leading to broader defense responses. Similar to XTH-induced response in potato plants, cross response was observed in other species. It has been demonstrated that the application of chitosan (a mycelium extract from *Crinipellis perniciosa*) was just as effective on protecting tomato plants against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and enhancing chitinase and β -1,3-glucanase activity (Slaughter et al., 2012). Preparations with *Saccharomyces cerevisiae* applied in strawberry plants promoted increased activity of chitinase and glucanase, enzymes involved in systemic acquired resistance (SAR), and the reduction of the incidence of the fungus *Botrytis cinerea*.¹⁹ Moreover, protein isolated from mycelium of *B. cinerea* was efficient in inducing disease resistance against gray mold fungus in tomato (Zhang et al., 2010).

Potato plants treated with Bion[®] showed the lowest plant protection against *R. solani*. The differences on plant resistance observed for Bion[®] and XTH treatments might be attributed to the distinct mechanism of action. The main component of Bion[®] is Acibenzolar-S-Methyl (ASM), a salicylic acid (SA) analogue. It belongs to the benzothiadiazoles (BTH) chemical group, which acts directly activating SA defense pathway (Slaughter et al., 2012). Bion[®] has induced resistance against microorganisms in diverse plants (Faessel et al, 2008; Diwaker et al., 2010). leading to a durable resistance in wheat and soybean (Gorlach et al., 1996). Moreover, exogenous BTH was able to reduce lesions caused by *Peronospora tabacina* in transgenic tobacco plants expressing *NahG* gene (Slaughter et al., 2012), with low SA production. Indeed, Bion[®] could induce SA-independent SAR. Likelihood, exogenous Bion[®] might have more expressive effect on plant resistance against biotrophic microorganisms than against necrotrophic pathogens, such as *R. solani*.

POX and PPO are very important enzymes in plant defense reaction, which are involved in the formation of lignin and phytoalexins, being related to the development of plant resistance (Zhang et al., 2010). Therefore, variation on the enzymes activity can indirectly reflect plant disease resistance (De Ascensao and Dubery, 2000). PPO and POX activities were reduced over the time on potato plants treated with CTS. Contrarily, these activities were continuously promoted by XTH after inoculation with *R. solani*. In general, plant resistance is correlated to the high POX and PPO activities (Calvalcanti et al., 2006). Resistant genotypes of *Penisetum glaucum* showed localized and elevated levels of PPO,

rapidly induced following infection by *Scerospora graminicola*, whereas susceptible cultivars failed to accumulate PPO even after a considerable time (Raj et al., 2006). It has been reported that PPO clearly plays a role in the resistance of tomato to *Pseudomonas syringae* (Thipyapong et al., 2004). Likewise, leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) showed increased PPO activity after inoculation with *Ascochyta rabei* (Khirbat and Jalali, 1998), implying that this enzyme may be involved in the hypersensitive response. Higher basal level or a rapid enhancement of POX activity was also observed in grapevines resistant to the fungus *Plasmopara viticola* (Kortekamp and Zyprian, 2003). POX catalyzes the cell-wall crosslinking, promoting the strengthening of cell walls, and therefore acting against the pathogen attack (Calvalcanti et al., 2006).

Synthesis of phenolic compounds is a frontline in plants defense. The highest level of phenolic compounds occurred in the control and XTH treatments at 6 dpi. The accumulation of these compounds and their oxidation by increased PPO and POX activities is deeply related to plant defense (Calvalcanti et al., 2006). In spite of that, no significant correlation was detected in the control and XTH treatments for the combination of enzyme activity and phenolic compounds. An important class of phenylpropanoids, the flavonoids, are involved in UV scavenging and disease resistance through phytoalexins and phytoanticipins (Dixon and Paiva, 1995) Flavonoids and their derivatives are implicated on resistance induction in citrus (Ballester et al., 2013). Although flavonoids accumulation has been proven to be related to plant resistance, only Bion® treatment was able to induce an increment on these compounds at 9 dpi. Intriguingly, this treatment caused a drastic disease development, suggesting that flavonoids were not efficient markers for plant resistance in potato plants.

In our experiment, all plants were sprayed only once with inducers. However, additional sprays might improve plant protection, reducing disease symptoms and delaying plant death. *Rhizoctonia solani* is an important soil-borne necrotrophic fungal pathogen, with a broad host range and little effective resistance in crop plants. Inducers may represent a tool for this disease control, leading to the development of products that can promote plant defense without compromising its growth. However, inducers cannot be used as a stand-alone method for pest management. Although XTH presented a good potential for delaying disease progression and induced plant resistance, promoting cross resistance against a pathogenic fungus, experimental conditions have to be optimized in order to improve the plant protection.

Acknowledgements

The authors thank Dra. Isabel Cristina Padula Paz for providing the *Rhizoctonia solani* and Dr. Esteban Gonzalez (Suzano Papel e Celulose, Itapetininga, SP, Brazil) for providing the *Ceratocystis fimbriata* cultures used in this study, Brazilian Agricultural Research Corporation (Canoinhas, SC, Brazil) for providing the potato tubers, Syngenta Crop Protection/Brazil for providing Bion®, the Toxicology Institute (InTox/PUCRS) for technical support.

REFERENCES

- Anderson, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 20:329-344.
- Anterola, A.M. and N.G. Lewis. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61:221-294.
- Baker, C.J., T.C. Harrington, U. Krauss, and A.C. Alfenas. 2003. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 93:1274-1284.
- Ballester, A. R., M.T. Lafuente, R.C.H Vos, A.G Bovy, and L.G.C Ballester. 2013. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: Metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chemistry* 136:178-185.
- Banville, G.J., D.E. Carling, and B.E. Otrysko. 1996. *Rhizoctonia* disease on potato. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 321-330.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Cai, F., G. Yu, P. Wang, Z. Wei, L. Fu, Q. Shen, and W. Chen. 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiol Biochem* 73:106-113.
- Calvalcanti, F.R., M.L.V. Resende, A.B. Zacaroni, P.M. Ribeiro-Junior, J.C.B. Costa, and R.M. Souza. 2006. Acibenzolar-s-metil e ecolife na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira* 31:372-380.
- Chakraborty. U., S. Dutta, and B. Chakraborty. 2001. Drought induced biochemical changes in young tea leaves. *Indian Journal of Plant Physiology* 6:103-106.
- De Ascensao, A.R. and I.A. Dubery. 2000. Panamadisease: cell-wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum*.sp. cubense race four. *Phytopathology* 90:1173-1180.
- De Meyer, G. and M. Höfte. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87:588-593.
- Diwaker, T., J. Yu-lin, and K. Dhirendra. 2010. SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Letters* 584: 3458–3463.
- Dixon, R.A., and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.

- Faessel, L., R. Nassr, T. Lebeau, and B. Walter. 2008. Effects of the plant defence inducer, Acibenzolar-S-Methyl, on hypocotyl rot of soybean caused by *Rhizoctonia solani* AG-4. *J. Phytopathology* 156:236-242.
- Foley, R.C., C.A. Gleason, J.P. Anderson, T. Hamann, and K.B. Singh. 2013. Genetic and genomic analysis of *Rhizoctonia solani* interactions with Arabidopsis: Evidence of resistance Mediated through NADPH oxidases. *Plos One* 8:1-11.
- Gorlach, J.S., G. Volrath, G. Knauf-Beiter, U. Hengy, K.H. Beckhove, M. Kogel, T. Ostendorp, ET AL. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell* 8:629-643.
- Gouvea, A., O.J. Kuhn, S.M. Mazaro, L.L.M. Mio, C. Deschamps, L.A. Biasi, and V.C. Fonseca. 2009. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. *Horticultura Brasileira* 27: 527-533.
- He, C.Y., T. Hsiang, and D.J. Wolyn. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 51:225-230.
- Khirbat, S.K., and B.L. Jalali. 1998. Polyphenol oxidase and bound phenol content in leaves of chickpea (*Cicer arietinum* L.) after inoculation with *Ascochyta rabei*. *Legume Res* 21:198-200.
- Kortekamp, A., and E. Zyprian. 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using *in vitro* plants. *J Plant Physiol* 160:1393-1400.
- Macheix, J.J., A. Fleuriet, and M.P. Quessada. 1986. Involvement of phenols and peroxidases in wound healing and grafting. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. (Ed.) Greppin H, Penel C, Gaspar T, Geneva, p.286.
- Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.P. Métraux, and G. Défago. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139-146.
- Mazaro, S.M., C. Deschamps, L.L.M. Mio, L.A. Biasi, A. Gouvea, and C.K. Sautter. 2008. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após a aplicação pré-colheita de quitosana e acibenzolar-S-metil. *Rev Bras Frutic* 30:185-190.
- Mohammadi, M., and H. Kazemi. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Sci* 162:491-498.
- Poiatti, V.A.D., F.R. Dalmas, and L.V. Astarita. 2009. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* L. in response to attack by plant-pathogenic bacteria. *Biol Res* 42:205-215.
- Qin, G.Z., S.P. Tian, Y. Xu, and Y.K. Wan. 2003. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:147-154.

- Raj, S.N., B.R. Sarosh, and H.S. Shetty. 2006. Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Funct Plant Biol* 33:563-571.
- Resende, M.L.V., G.B.A Nojosa, L.S. Cavalcanti, M.A.G. Aguilar, L.H.C.P. Silva, J.O. Perez, G.C.G. Andrade, ET AL. 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology* 51:621-628.
- Sidhu, G.S., and J.M. Webster. 1977. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot-wilt fungus disease complex of tomato. *Physiological Plant Pathology* 11:117-127.
- Slaughter, A., X. Daniel, V. Flors, E. Luna, B. Hohn, and B. Mauch-Mani. 2012. Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol* 158:835-843.
- Thipyapong, P., M.D. Hunt, and J.C. Steffens. 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* 220:105-117.
- Thomma, B.P.H.J., T. Nurnberger, and M.H.A.J. Joosten. 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* 23:4-15.
- Tsrur, L., and I. Peretz-Alon. 2005. The influence of the inoculum source of *Rhizoctonia solani* on development of black scurf on potato. *J Phytopathol* 153:240-244.
- Wu, Y., G. Yi, X. Peng, B. Huang, E. Liu, and J. Zhang. 2013. Systemic acquired resistance in Cavendish banana induced by infection with an incompatible strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense. *J Plant Physiol* 170:1039-1046.
- Yao, H., and S. Tian. 2005. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology* 35:253-26.
- Yasuda, M., M. Nishioka, H. Nakashita, I. Yamaguchi, and S. Yoshida. 2003. Pyrazolecarboxylic acid derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:2614-262.
- Zhang, Y., X. Yang, Q. Liu, and D. Qiu. 2010. Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. *Microbiol Res* 165:142-151.

TABLES and FIGURES

Table 1. Area under the disease progress curve (AUDPC) values* of *S. tuberosum* plants. Plants were pretreated with autoclaved microbial extracts (XTH and CTS), Bion® or water (control). After five days, all plants were inoculated with *Rhizoctonia solani*. XTH, *Xanthomonas axonopodis*; CTS, *Cerathosystis fimbriata*.

| Treatments | AUDPC |
|------------|-----------------------|
| Control | 1893.00 (135.15) bc** |
| XTH | 1874.71 (188.46) c |
| CTS | 2133.36 (120.92) ab |
| BION® | 2363.65 (64.38) a |

*Data are given as mean of four replicates. Number in parenthesis represents standard error of the mean. **Different letters indicate significant differences in the column (Duncan's $p \leq 0.05$).

Table 2. Disease index of *S. tuberosum* inoculated with *Rhizoctonia solani* (Sidhu and Webster, 1977). Index was determined at 21 dpi. Plants were pretreated with autoclaved microbial extracts (XTH and CTS), Bion® or water (control). After five days, all plants were inoculated with *R. solani*. XTH, *Xanthomonas axonopodis*; CTS, *Cerathosystis fimbriata*.

| Treatments | General reaction* | Disease index |
|------------|-------------------|---------------|
| Control | P | 2.454 |
| XTH | R | 0.972 |
| CTS | S | 2.914 |
| BION® | S | 3.621 |

*Partially resistant (P); Resistant (R); Susceptible (S)

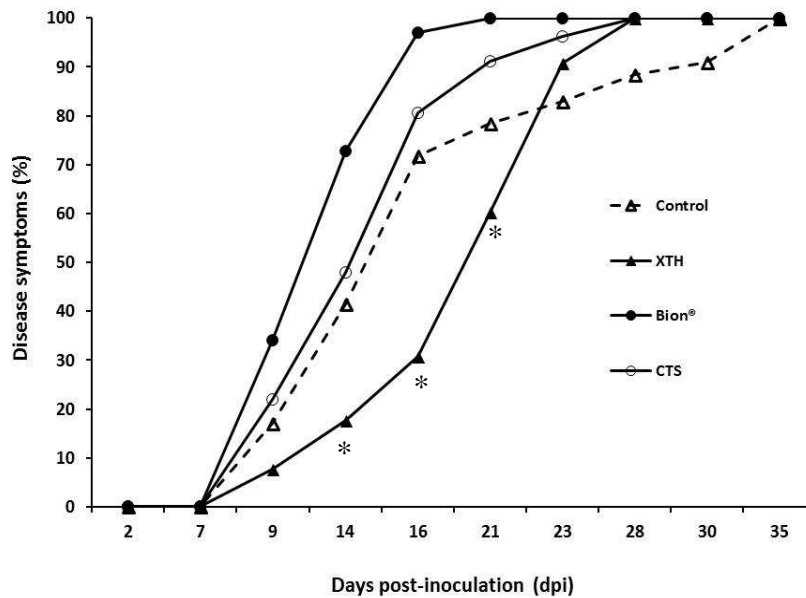
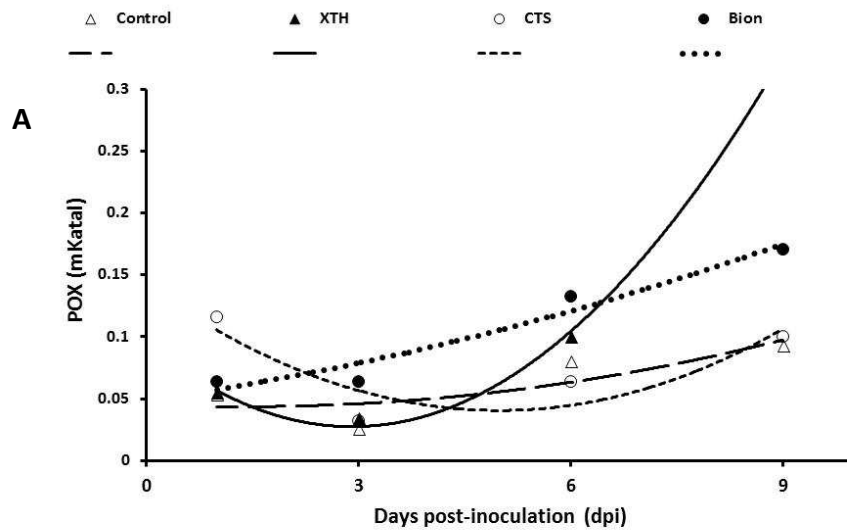
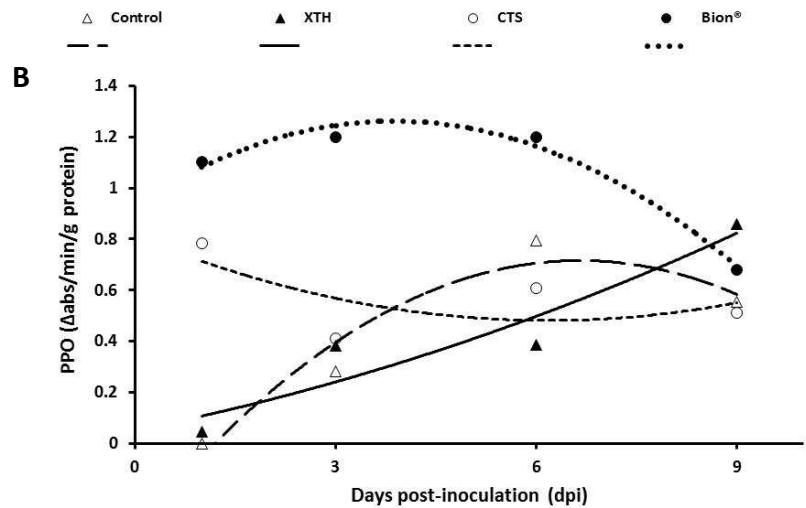


Figure 1. Disease symptoms on *S. tuberosum* leaflets. Plants were pretreated with autoclaved microbial extracts (XTH and CTS), Bion® or water (control). After five days, all plants were inoculated with *Rhizoctonia solani*. XTH, *Xanthomonas axonopodis*; CTS, *Ceratosystis fimbriata*. Asterisks indicate significant differences amongst means.



Control $R^2=0.6927$ ($y = 0.0009x^2 - 0.0027x + 0.0455$) CTS $R^2=0.7407$ ($y = 0.0041x^2 - 0.0408x + 0.1423$)

XTH $R^2=0.9987$ ($y = 0.0081x^2 - 0.0469x + 0.0957$) Bion $R^2=0.9487$ ($y = 0.0007x^2 + 0.0079x + 0.0489$)



Control $R^2=0.9792$ ($y = -0.0217x^2 + 0.1687x + 0.9347$) CTS $R^2=0.8886$ ($y = 0.0038x^2 + 0.0516x + 0.0518$)

XTH $R^2=0.374$ ($y = 0.0087x^2 - 0.1072x + 0.812$) Bion $R^2=0.9324$ ($y = -0.024x^2 + 0.3192x - 0.3457$)

Figure 2. Polynomial regression of peroxidases (POX) activity (A) and polyphenol oxidases (PPO) activity (B) over time in *S. tuberosum*. Plants were pretreated with autoclaved microbial extracts (XTH and CTS), Bion® or water (control). After five days, all plants were inoculated with *Rhizoctonia solani*. XTH, *Xanthomonas axonopodis*; CTS, *Ceratosystis fimbriata*. Equations of regression are shown for each treatment.

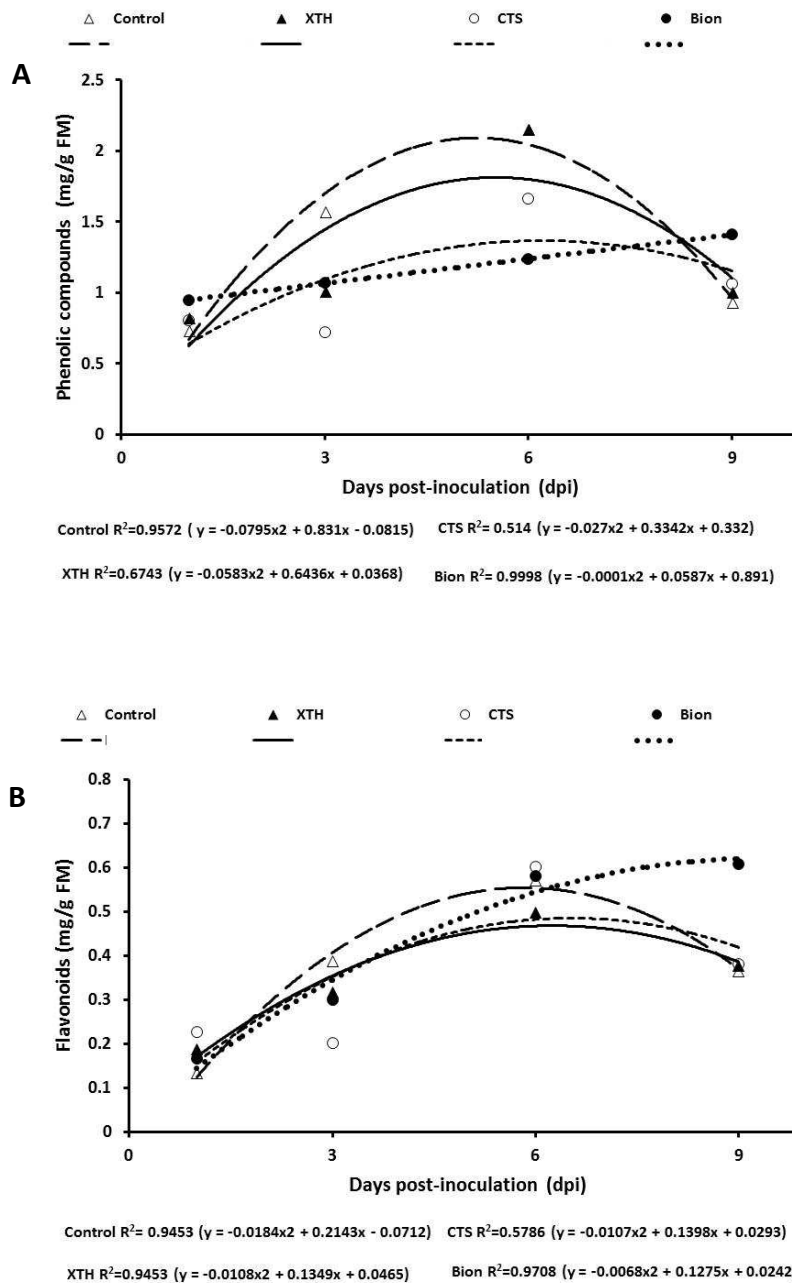


Figure 3. Polynomial regression of phenolics compounds levels (A) and quercetinics flavonoids levels (B) over time in *S. tuberosum*. Plants were pretreated with autoclaved microbial extracts (XTH and CTS), Bion® or water (control). After five days, all plantas were inoculated with *Rhizoctonia solani*. XTH, *Xanthomonas axonopodis*; CTS, *Cerathosystis fimbriata*. Equations of regression are shown for each treatment.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indutores de defesa secretados pela planta ou exsudados por microrganismos podem induzir uma ampla gama de respostas de defesa da planta inespecíficas, levando a atravessar a resistência contra diferentes microrganismos. Indutores foram isolados a partir de fungos, bactérias e agentes patogênicos oomicetos e podem ser proteínas, péptidos, glicoproteínas, lípidos, e oligossacarídeos.

O indutor XTH mostrou um efeito positivo sobre a resistência das plantas de *S. tuberosum* ao retardar os sintomas da doença causada por *R. solani*. Sua eficácia pode estar relacionada com a promoção de vias de sinalização não específicas levando a respostas de defesa mais amplas. Assim, a resposta de defesa cruzada foi observada em XTH com plantas de batata.

Os indutores podem representar uma ferramenta para este controle da doença, conduzindo ao desenvolvimento de produtos que podem promover a defesa da planta sem comprometer o seu crescimento. No entanto, os indutores não podem ser utilizados como um método independente para a gestão das pragas. Embora XTH apresentou um bom potencial para retardar a progressão da doença e induziu a resistência da planta, promovendo resistência cruzada contra um fungo patogênico, as condições experimentais devem ser otimizadas, a fim de melhorar a proteção das plantas.

6. CONCLUSÕES

- Os indutores CTS e Bion[®] não foram eficientes na promoção da resistência das plantas de batata contra *Rhizoctonia solani*;
- As plantas tratadas com CTS e Bion[®] foram mais suscetíveis ao patógeno fúngico do que as plantas controle;
- O indutor XTH foi eficiente na promoção da resistência das plantas de batata contra *Rhizoctonia solani*, retardando o progresso da doença;
- O aumento da resistência de plantas de batata induzido por XTH pode estar relacionado ao incremento progressivo da atividade das enzimas POX e PPO;
- O indutor XTH destaca-se como um possível promotor da resistência cruzada em plantas de

batata.

7. PERSPECTIVAS

Mais estudos serão realizados para determinar a eficácia do indutor biótico bacteriano XTH na promoção de resistência em plantas de *S. tuberosum* contra o patógeno fungico *R. solani*, tendo em vista que no presente trabalho não foi possível a determinação da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima de grande importância na defesa vegetal. Bem como, de fitoalexinas, moléculas importantes para a defesa vegetal. Da mesma forma, é necessário a otimização das condições do uso dos indutores, como periodicidade na aplicação e concentração.

Para reforçar os dados de defesa cruzada é necessário fazer novos experimentos utilizando o indutor fúngico CTS e um patógeno bacteriano. Assim será possível avaliar o potencial de CTS na defesa cruzada contra fitobactérias.

O precedente para o sucesso desses experimentos seria a validação da hipótese de que é possível utilizar apenas um indutor biótico para promover, de forma eficiente, o estabelecimento de uma resposta ampla de defesa vegetal, garantindo a resistência contra patógenos fúngicos e bacterianos, sem comprometer o crescimento e a produtividade vegetal.