

Expressão gênica diferencial da β -1,3-Glucanase (PR-2) nas interações compatível e incompatível entre *Xanthomonas axonopodis* e *Citrus sinensis*

β -1,3-Glucanase (PR-2) differential gene expression during compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas axonopodis* and *Citrus sinensis*

Juliana da Silva VANTINI¹, Maria Inês Tiraboschi FERRO¹, Jesus Aparecido FERRO¹, Julio Cezar Franco DE OLIVEIRA²

¹ UNESP-Universidade Estadual Paulista. Departamento de Tecnologia, FCAV- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal - SP, Brasil. e-mail: juvantini@yahoo.com.br.

² UNIFESP/Diadema-Universidade Federal de São Paulo, SP - Brasil. juliunifesp@yahoo.com.br.

Resumo

A produção de citros é uma das atividades agroindustriais mais importantes em nosso País, a qual vem sendo constantemente ameaçada pela doença do cancro-cítrico, causada pela bactéria Gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*). Esta bactéria, quando em contato com uma planta hospedeira, provoca lesões nas folhas, frutos e ramos. Por outro lado, quando este patógeno infecta uma planta não hospedeira, provoca uma reação necrótica. A indução das proteínas relacionadas à patogênese (PR) é associada com a resposta de defesa da planta ao ataque do patógeno. Neste trabalho, investigamos a indução do gene que codifica a proteína β -1,3-glucanase (PR-2) durante as interações *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolli* C (*Xaa-C*):*Citrus* (não hospedeira) e *Xac-A*::*Citrus* (hospedeira). Suspensões bacterianas (*Xac-A* ou *Xaa-C*) foram inoculadas em folhas de laranja (*Citrus sinensis*), as quais foram coletadas em tempos diferentes da cinética de infecção. A expressão do gene *pr-2* foi analisada por *Northern blot* com a ajuda de uma sonda de β -1,3-glucanase de *C. sinensis*, obtida via amplificação por PCR, com a utilização de oligonucleotídeos específicos e DNA genômico de folhas de laranja. Os resultados deste trabalho mostram que, na interação *Xac-A*::*Citrus*, o gene *pr-2* é expresso mais lentamente e em menos intensidade do que na interação *Xaa-C*::*Citrus*, onde a indução mais rápida de *pr-2* sugere um papel da proteína PR-2, quando expressa precocemente, na reação de resistência da planta cítrica atacada por *Xaa-C*.

Palavras-chave adicionais: cancro-cítrico; resistência não hospedeira; *Xanthomonas axonopodis* pv.citri; interação planta-patógeno.

Abstract

The production of citrus fruits is one of the most important agro-industrial activities in Brazil, which has been constantly threatened by the citrus canker disease, caused by the Gram-negative bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*). In contact with host plants, *Xac-A* causes injuries to leaves, fruits, and stems. On the other hand, a necrotic reaction is induced when this pathogen infects a non-host plant. The induction of pathogenesis-related (PR) proteins is associated to the plant defense response to the pathogen attack. In this work we investigated the β -1,3-glucanase (PR-2) gene expression during *X. axonopodis* pv. *aurantifolli* C (*Xaa-C*):*Citrus* interaction (non-host resistance response) and during *Xac-A*::*Citrus* interaction (citrus canker disease). Bacterial suspensions (*Xac-A* or *Xaa-C*) were inoculated in orange leaves (*Citrus sinensis*), which were then collected at different time points during the infection process. The expression of the PR-2 coding gene has been analyzed by *Northern blot* using a citrus β -1,3-glucanase probe obtained by PCR using specific oligonucleotide and orange leaves genomic DNA. The *Xaa-C*::*Citrus* interaction has shown to induce a faster and more intense *pr-2* gene expression when compared to *Xac-A*::*Citrus* interaction, suggesting a resistance role to citrus PR-2 protein expressed early during *Xaa-C* infection.

Additional keywords: citrus canker; nonhost resistance; *Xanthomonas axonopodis* pv.citri; plant-pathogen interaction.

Introdução

A produção de citros vem sendo constantemente ameaçada pela bactéria Gram nega-

tiva *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*), causadora do cancro-cítrico. Esta bactéria, quando em contato com uma planta hospedeira

(interação compatível-doença), provoca lesões nas folhas, frutos e caules. O processo de infecção ocorre através das aberturas naturais da planta ou ferimentos por onde a bactéria *Xanthomonas citri* adentra na planta hospedeira, infectando-a. Os sintomas que o cancro provoca nas folhas são manchas amareladas que, aos poucos, ficam com uma coloração marrom no centro; essas lesões são salientes e aparecem na superfície abaxial da folha (Web site: FUNDECITRUS). A bactéria *Xac-A*, de fácil disseminação e altamente contagiosa, é resistente e consegue sobreviver em vários ambientes, por vários meses (Web site: FUNDECITRUS).

O principal método de controle ao cancro-cítrico é erradicar o material contaminado. Por outro lado, quando este patógeno infecta uma planta não hospedeira (interação incompatível), uma reação necrótica é induzida, mais conhecida por Resposta de Hipersensibilidade (HR). Ou seja, nesta interação, o patógeno, ao penetrar o tecido da planta, dispara as respostas de defesa do hospedeiro, que, ativadas rápida e intensamente, impedem a multiplicação do patógeno evitando assim a doença.

Assim sendo, o termo HR refere-se a uma morte celular programada das células vegetais atacadas pelo patógeno e células adjacentes ao sítio de infecção, levando ao bloqueio e eliminação do agente invasor no sítio de infecção (STASKAWICZ et al., 1995). Os fenômenos referentes à HR envolvem um aumento intracelular dos níveis de espécies ativas de oxigênio, fortalecimento da parede celular, produção de fitoalexinas antimicrobianas e indução da expressão de proteínas de defesa, que limitam a colonização de tecidos vegetais e impedem a manifestação da doença (HAMMOND-KOSAK & JONES, 1997).

Diversos são os mecanismos de resposta de defesa de plantas em relação a patógenos, dentre os quais, se destaca um grupo específico de proteínas, as quais preferencialmente se acumulam nos espaços intracelulares, sendo chamadas de proteínas relacionadas à patogênese (PR) (VAN LOON, 1985; WHITE et al., 1987). A indução das proteínas PR está associada com o estabelecimento de uma interação incompatível (resistência), manifestada pelo aparecimento de uma reação de hipersensibilidade na planta (FRITIG et al., 1987). Assim sendo, a expressão dos genes *pr* é induzida tanto sistemicamente quanto localmente após a inoculação com patógeno ou seguida do tratamento com ácido salicílico, sendo caracterizados como moléculas sinalizadoras da resistência da planta à doença (TAKEMOTO et al., 2003). Dados que buscam esclarecer sobre o papel da proteína PR-2 na resposta de resistência sistêmica da planta, mostram que plantas transgênicas de

Arabidopsis, expressando constitutivamente uma carboxipeptidase, apresentam expressão aumentada do gene *pr-2* (LIU et al., 2008), sendo que um aumento de *pr-2* foi também verificado em plantas transgênicas de tabaco, expressando de maneira constitutiva a proteína GbERF, que corresponde a um fator de transcrição ativado por etileno, e uma resistência aumentada destas plantas contra o ataque da bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* foi demonstrado (QIN et al., 2006).

As β -1,3-glucanases, mais conhecidas como (PR-2), são amplamente distribuídas em plantas superiores e são induzidas durante a resposta de hipersensibilidade da planta a patógenos (BUCHER et al., 2001). Segundo SCHLUMBAUM et al. (1986), estas enzimas hidrolíticas são capazes de inibir o crescimento dos patógenos, presumivelmente degradando suas paredes celulares. As β -1,3-glucanases são enzimas líticas capazes de degradar os polissacarídeos encontrados nas paredes celulares de muitos fungos e têm atividade antifungal quando analisada *in vitro* (MAUCH et al., 1994; SELA-BUURLAGE et al., 1993).

A identificação e o estudo dos genes envolvidos nas respostas de defesa de plantas a patógenos (resistência não hospedeira) constituem-se numa etapa fundamental para a compreensão dos fenômenos bioquímico-moleculares, visando a variedades agrícolas mais resistentes, podendo aumentar a produção e a qualidade dos alimentos. O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão do gene *pr-2* em folhas do hospedeiro *Citrus sinensis* infectadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolli* estirpe C (*Xaa-C*), que induz uma reação de resistência não hospedeira nesta interação, ou infectadas com *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac-A*), que induz sintomas de cancro-cítrico neste hospedeiro.

Material e Métodos

Estirpe bacteriana, condições de cultura e inoculação em plantas

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* estirpe A (*Xac-A*), cujo genoma foi sequenciado por completo (DA SILVA et al., 2002), e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolli* estirpe C (*Xaa-C*), foram cultivadas a 28°C em meio TSA (10 g/L de triptona, 10 g/L de sacarose e 1g/L de glutamato de sódio), com e sem adição de ágar. As plantas cítricas, *Citrus sinensis* (laranja-Pera), foram mantidas em casa de vegetação antes da inoculação. Durante e após as inoculações, as plantas foram mantidas em ambiente apropriado. Foram utilizadas para inoculação folhas jovens, com aproximadamente 7 cm de comprimento ao longo da nervura principal. A preparação do inóculo foi realizada com bacté-

rias cultivadas por 3 dias a 28 °C em meio TSA sólido para obtenção de massa celular que foi ressuspensa em água destilada e ajustada a uma densidade óptica de $A_{600} = 0,3$ equivalente a aproximadamente 10^8 UFC/mL. As inoculações em plantas foram realizadas por infiltração da suspensão de bactérias com auxílio de seringa hipodérmica sem agulha, diretamente no espaço apoplástico, em todo o limbo foliar, na parte abaxial de folhas expandidas jovens.

Cinética de infecção

As folhas de laranja-Pera inoculadas, respectivamente, com *Xaa-C*, *Xac-A* ou água ("mock"), foram coletadas dentro de uma cinética de infecção representando 10 períodos diferentes (0; 3; 6; 12; 24; 36; 48; 60; 72 e 96 h após a inoculação). Além disso, foi utilizada também uma planta-controle (planta não inoculada).

Extração de RNA total

As amostras de RNA total foram purificadas segundo o método descrito por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987), baseado na extração utilizando uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol). Aproximadamente 1,5 g de folhas foi coletado para cada ponto da cinética de infecção e da planta-controle (não inoculada) e mantidos em nitrogênio líquido até a pulverização, individual, realizada em gral contendo nitrogênio líquido. Extraídas as amostras de RNA total, estas foram estocadas a -80 °C após a quantificação a 260 nm, em espectrofotômetro.

Obtenção da sonda da β -1,3-glucanase específica de *Citrus sinensis*

Sequências de cDNA da β -1,3-glucanase de citros (*Citrus sinensis*) foram recuperadas do site National Center for Biotechnology Information (Web site: NCBI HomePage). Através da sequência de nucleotídeos (AJ000081), foram construídos oligonucleotídeos específicos com o auxílio do software Gene Runner (Hastings Software, Inc), para a amplificação por PCR de fragmentos de DNA correspondente ao gene da β -1,3-glucanase escolhido como sonda. Os oligonucleotídeos construídos foram: BGLUC *Forward* - 5' GTCGTCTTGTCTTCTTCTTG 3'; BGLUC *Reverse* - 5' TTAATCTGGTATCTAGGCTG 3'.

A obtenção da sonda foi realizada a partir de amplificações via PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos e o DNA genômico de folhas da laranja-Pera, obtido pelo método de extração de DNA segundo ROMANO & BRASILEIRO (1999). Os amplicons obtidos foram clonados em vetor TOPO T/A (Original TA cloning kit-Invitrogen) e transformado por eletroporação em células de *Escherichia coli* competentes DH10B. O plaqueamento foi realizado com meio

sólido 2xTY (16 g de Triptona; 10 g de Extrato de Levedura; 5,0 g de NaCl; 12 g de Ágar; q.s.p. 1000 mL com água destilada) contendo 50 μ g/mL de kanamicina. Esse meio foi suplementado com X-Gal (0,026%) e IPTG (0,82 mM). As colônias brancas indicam sucesso na clonagem. Assim, os clones positivos (colônias brancas) foram selecionados e submetidos a micro preparação de DNA plasmidial ("Boiling-Prep") segundo HOLMES & QUIGLEY (1981). O sequenciamento do DNA obtido destes clones foi realizado de acordo com SANGER et al. (1977). O Sequenciador automático utilizado foi ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Para a anotação das sequências deste gene, foi utilizado um *script* para a contagem de bases dos cromatogramas com qualidade, sendo que o critério utilizado para a validação dos mesmos foi de, pelo menos, 400 bases por sequência com qualidade acima de 20. Os cromatogramas das sequências foram analisados através do programa Phred/Phrap/Consed (GORDON et al., 1998). Foram realizadas comparações utilizando a ferramenta Blast de modo automático comparando-se cada sequência ao banco de dados público GenBank, sendo considerados apenas os alinhamentos que obtiveram *e-values* inferiores a e^{-10} . Os dados obtidos com o sequenciamento confirmaram que o amplicon clonado foi mesmo um fragmento de DNA genômico de *C. sinensis* codificando a β -1,3-Glucanase, um fragmento de 1.589 pb.

Em seguida, realizou-se a preparação de DNA de plasmídeo, o qual foi digerido com *EcoRI*. A amostra digerida com *EcoRI* foi aplicada em gel de agarose a 1% e purificada com a utilização do Kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" – Promega, conforme as recomendações do fabricante.

Northern blot

O experimento de *Northern blot* foi realizado segundo o método descrito em SAMBROOK et al. (1989). Foram utilizados 15 μ g de RNA total para cada um de todos os tempos de cada cinética de inoculação, incluindo o material da planta-controle (planta não inoculada). Os RNAs totais foram separados em gel de agarose desnaturante a 1,5% e transferidos para a membrana de náilon (Hybond H⁺).

As sondas radioativas foram preparadas através da utilização do Kit "Random Primers DNA Labeling System" da Invitrogen e 25 μ Ci [α -³²P] dCTP, conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, as sondas passaram por processo de eliminação dos nucleotídeos não incorporados, em coluna de Sephadex G-50. As sondas foram desnaturadas novamente em água fervente, por 5 min, antes de serem adicionadas à solução de hibridização.

As membranas foram umedecidas em solução de SSC 2X e colocadas dentro de tubos de vidro de 300 mL. Então, adicionaram-se 20mL de solução [mono-hidrogênio fosfato de sódio 1M (Na_2HPO_4), di-hidrogênio fosfato de sódio 1M (NaH_2PO_4), BSA 5%, SDS 20%]. A pré-hibridização ocorreu a 68 °C, durante 3 h, em forno de hibridização, marca Hybaid. Após este período, a sonda foi adicionada à solução de hibridização pré-aquecida a 68 °C do tubo e incubou-se a 68 °C, durante 16 h. As primeiras lavagens das membranas foram feitas com solução de baixa estrigência (SSC 2X; SDS 0,05%), utilizando volume de 200 mL, o processo se repetiu quatro vezes, por 10 min, sendo as soluções descartadas adequadamente e, em seguida, uma segunda solução pré-aquecida a 50 °C com maior estrigência foi utilizada (SSC 0,1X; SDS 0,1%),

sendo realizadas duas lavagens de 40 min cada, com o mesmo volume citado acima para cada lavagem. Ao final do processo, a membrana foi selada em vita filme e exposta a um filme de raio-X, em cassete apropriado e mantida no *freezer* (-80 °C). A membrana foi revelada após período de 10 dias de exposição.

Resultados e Discussão

A técnica de *Northern blot* foi utilizada para investigar a expressão do gene que codifica a proteína β -1,3-glucanase (PR-2) durante a resposta de defesa da planta na interação *Xaa-C/citros* (resposta de hipersensibilidade-HR) e a indução de cancro-cítrico na interação *Xac-A/citros* (Figura 1).

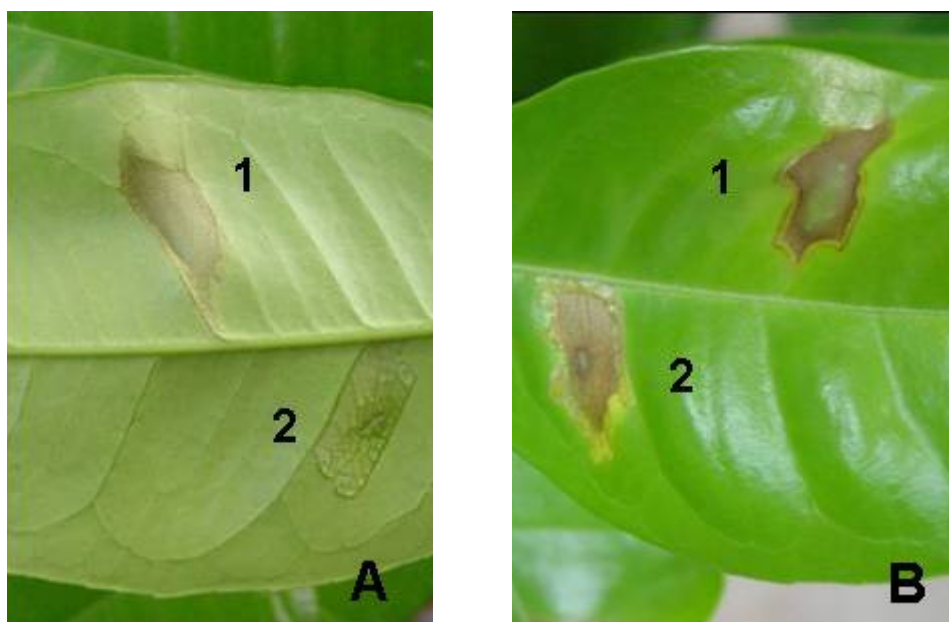


Figura 1 - Sintomas de cancro induzidos em planta (*Citrus sinensis*) a 3 (A) ou 8 (B) dias após inoculação. 1: Resposta de hipersensibilidade (HR) induzida na interação *Xaa-C/citros*. 2: Sintoma de cancro-cítrico induzido na interação *Xac-A/citros*.

Figure 1 - Canker symptoms induced in host plants (*Citrus sinensis*) 3 (A) or 8 (B) days after inoculation. 1: Hypersensitivity response (HR) induced during *Xaa-C/citrus* interaction. 2: Citrus canker symptoms induced during *Xac-A/citrus* interaction.

As amostras de RNAs totais extraídas do tecido foliar de laranja-Pera inoculadas com *Xac-A*, *Xaa-C* ou água, conforme a cinética utilizada, foram quantificadas em espectrofotômetro, e a sua integridade (visualização das bandas 28S e 18S) foi verificada por meio de uma eletroforese com gel a 1,5% de agarose sob condições desnaturantes (Figura 2). A presença das

bandas dos RNAs ribossomais 28S e 18S, íntegras, viabiliza a utilização destas amostras para a realização dos experimentos de *Northern blot*. Pela quantidade equivalente de RNA aplicado no gel, para cada condição experimental, é possível inferir as variações de expressão do gene codificador da β -1,3-glucanase, através de *Northern blot*.

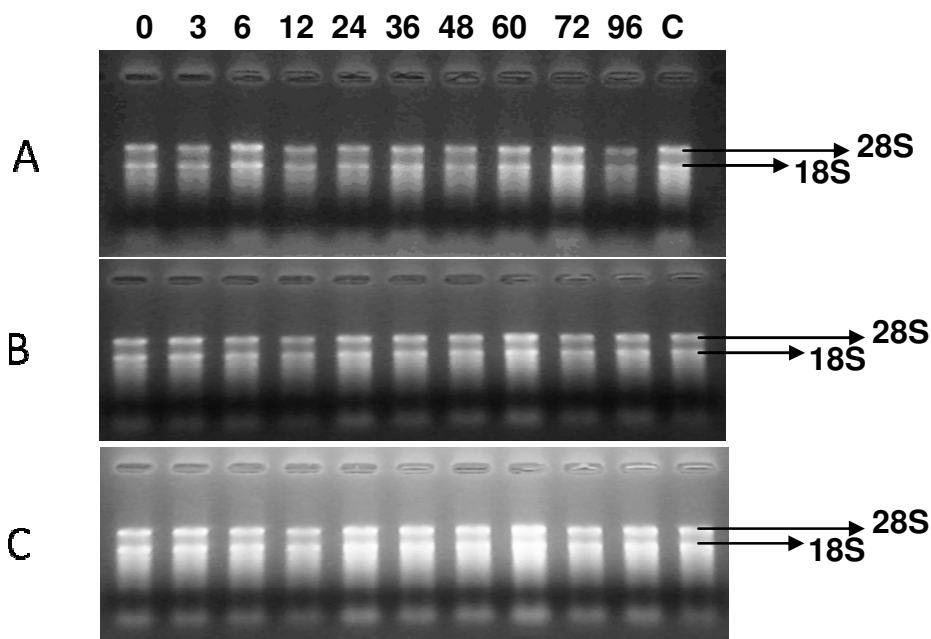


Figura 2- Eletroforese de RNA em gel de agarose 1,5% (desnaturante). Foram aplicados 2 µg de RNA total de folhas de laranjeira conforme a cinética de infecção utilizada (0; 3; 6; 12; 24; 36; 48; 60; 72 e 96 h após inoculação) e (C) controle representado por planta não inoculada. A: RNA total de planta inoculada com água (“mock”). B: RNA total de planta inoculada com *Xaa-C*. C: RNA total de planta inoculada com *Xac-A*. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas por setas.

Figure 2 - RNA denaturing gel electrophoresis at 1.5% agarose. Two micrograms of total RNA extracted from citrus leaves infected at 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, and 96 h post inoculation and non-inoculated leaves (C). A: Total RNA from water inoculated leaves (mock). B: Total RNA from citrus inoculated with *Xaa-C*. C: Total RNA from citrus inoculated with *Xac-A*. 18S and 28S ribosomal RNAs are indicated by arrows.

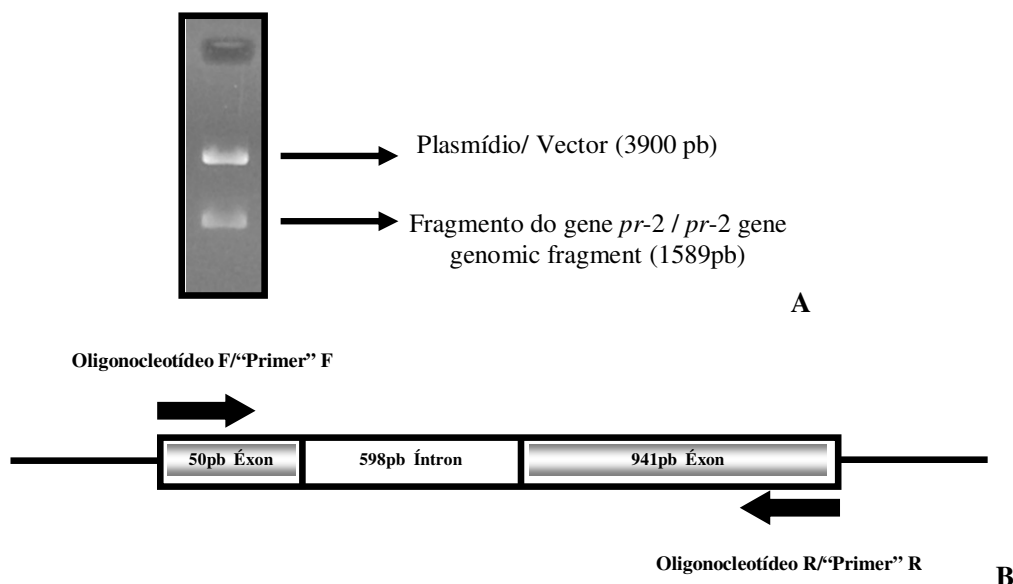


Figura 3 - Resultado da digestão com *EcoRI*. A: Construção de fragmento genômico clonado do vetor PCR-TOPO e digerido com *EcoRI*, as setas estão indicando o vetor e o fragmento clonado do gene *pr-2*. B: Esquema mostrando presença de um íntron de 598 pb no fragmento genômico do gene *pr-2*.
 Figure 3 - Restriction digestion with *EcoRI*. A: Genomic fragment cloned at PCR-TOPO vector and digested with *EcoRI*, with arrows indicating vector and *pr-2* gene genomic fragment. B: Schematic representation of an 598bp intron located at *pr-2* genomic fragment.

Através da análise das sequências do gene *pr-2* foi identificada a presença de um íntron. Um fragmento de 1.589 pb do gene da β -1,3-glucanase foi amplificado numa PCR contendo os oligonucleotídeos específicos e DNA genômico de células da laranjeira, e a digestão deste amplicon com *EcoRI*, que liberou o inserto clonado no vetor plasmidial, como pode ser visto na Figura 3^a; no entanto, ocorreram diferenças, pois o esperado, segundo cDNA da β -1,3-glucanase de *C. sinensis*, deveria ter sido um fragmento de 991pb. O sequenciamento deste fragmento de PCR revelou a presença de um íntron de 598pb no DNA genômico que codificou a β -1,3-glucanase, (Figura 3B). A literatura relata que o gene da β -1,3-glucanase pode conter um íntron que, em plantas, pode variar entre 400 e 600 pb (SHI, 2005), embora em *Nicotiana plumbaginifolia* tenham sido descritos dois íntrons de 669 pb e 199 pb (CASTRESANA et al., 1990).

A técnica de *Northern blot* (SAMBROOK et al., 1989) possibilitou a verificação da expres-

são do gene que codifica a β -1,3-glucanase (PR-2) nas condições investigadas. A Figura 4 mostra o perfil de expressão da β -1,3-glucanase durante a cinética de infecção de plantas de laranjeiras inoculadas com *Xac-A* ou *Xaa-C*. Na interação com a *Xac-A* (doença), o gene codificador da β -1,3-glucanase, que não apresentava expressão visível até 12 h de inoculação, passa a ser expresso em 24 h e prosseguiu assim por até 96 h, tendo sido detectado um aumento de expressão no período entre 48 até 96 h. O perfil de expressão do gene *pr-2* em plantas de citros inoculadas com *Xaa-C* (resistência) mostrou-se distinto. A expressão gênica iniciou-se precocemente com 3 h e prosseguiu até as 96 h. Embora não seja totalmente visível a indução de *pr-2* entre 3 e 6 h de inoculação com *Xaa-C*, a expressão de *pr-2* começou a aumentar após 12 h e prosseguiu até as 96 h, com um máximo de expressão às 24 h do início da cinética de infecção e mantendo-se em nível elevado até 72 h com posterior diminuição a partir deste ponto.

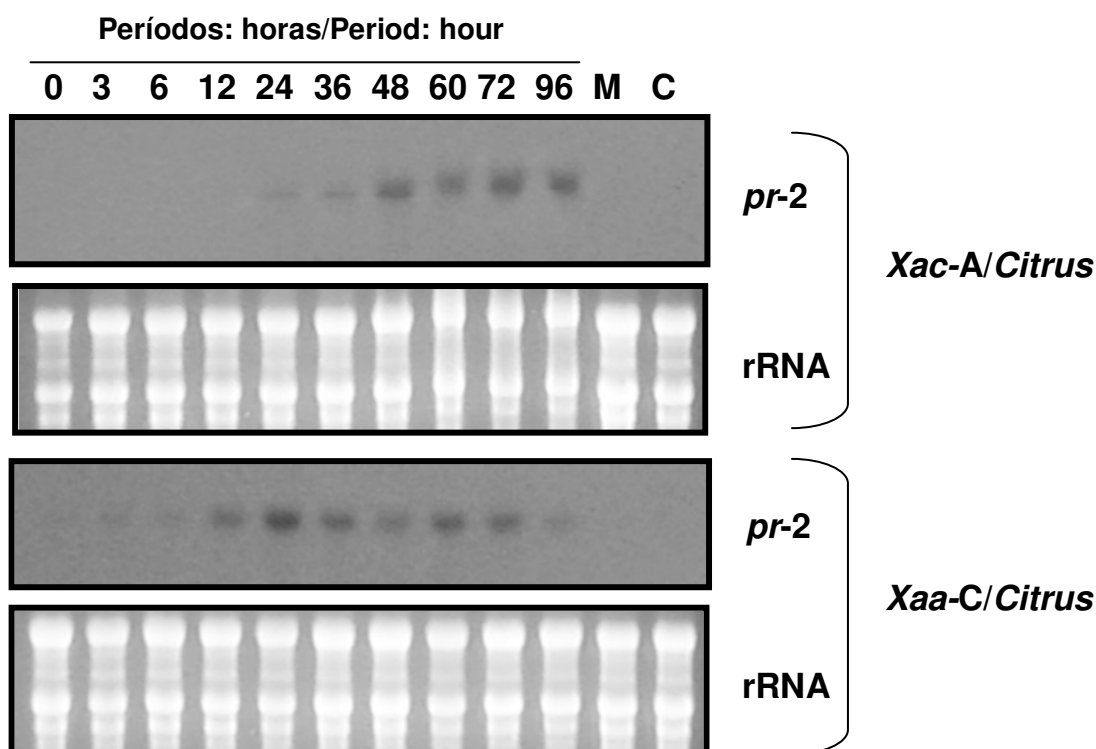


Figura 4 - Perfil de expressão do gene *pr-2* nas interações entre 2 patovares distintos de *Xanthomonas axonopodis* e *Citrus sinensis*. *Northern blot* do gene que codifica proteína PR-2 nas interações *Xac-A/Citrus*, *Xaa-C/Citrus*, na planta inoculada com água (M, "mock") e planta-controle (C, não inoculada). Em cada canaleta, foram aplicados 15 μ g de RNA total. A cinética de inoculação foi realizada nos períodos de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h após inoculação. A hibridização do RNA foi realizada com uma sonda do gene *pr-2* marcada radioativamente, específica de *Citrus sinensis*.

Figure 4 - *pr-2* gene expression profile during interactions of two distinct *Xanthomonas axonopodis* pathogens and the plant host *Citrus sinensis*. Northern blot analysis of PR-2 coding gene during *Xac-A/Citrus*, *Xaa-C/Citrus* interaction, water inoculated (M/mock) and control (non-inoculated plants). 15 μ g of total RNA from infected leaves corresponding to 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, and 96 h post inoculation were electrophoresed. Northern hybridization has been done with a *pr-2* radioactive probe.

Pela análise do perfil de expressão do gene *pr-2* nas interações entre *Xac-A::Citrus* e *Xaa-C::Citrus*, foi observado que a expressão gênica deste foi induzida de maneira mais rápida e intensa nas primeiras 36 h da interação *Xaa-C::Citrus*, que levou ao desenvolvimento de uma reação de resistência do tipo HR e ausência de sintomas de cancro-cítrico. Na interação com *Xaa-C*, o gene codificador da β -1,3-glucanase mostrou-se induzido desde 12 h de inoculação, enquanto na interação com *Xac-A* a indução foi verificada a partir das 48 h de infecção. Recentemente, foi verificado o mesmo padrão de resposta para plantas de taro cultivar (*Colocasia esculenta* L.) capazes de desenvolver resposta incompatível ao ataque por *Phytophthora colocasiae*, que apresentaram expressão maior e mais rápida de genes *pr* do que plantas de taro cultivar que desenvolvem reação compatível quando confrontada pelo patógeno *Phytophthora colocasiae* (SHARMA et al., 2008).

A ativação da expressão da β -1,3-glucanase (*pr-2*) como resposta de resistência a patógenos foi descrita inicialmente para interações entre plantas e fungos patogênicos. Em plantas de tabaco infectadas com *Colletotrichum destructivum* e pimenteiras infectadas por *Colletotrichum coccodes*, foi verificada a ativação do gene *pr-2* após 48 h de infecção (DEAN, 2002; HONG & HWANG, 2002). Em trigo inoculado com *Fusarium graminearum*, níveis máximos de acúmulo de mRNA codificando a β -1,3-glucanase foram verificados após 24 h de infecção (LI et al., 2001), assim como verificado neste trabalho para a interação entre *Xaa-C* e laranja-Pera-doce. Porém, evidências mostram que a ativação da expressão de *pr-2* está associada à resposta sistêmica da planta frente a estímulos bióticos ou abióticos. Plantas de trevo (*Trifolium repens* L.) submetidas a estresse hídrico mostraram ativação da expressão de *pr-2* nas duas primeiras semanas sem rega (LEE et al., 2008). Além da já bem caracterizada ativação da expressão de *pr-2* em resposta ao ataque de fungos patogênicos e vírus (CÔTE et al., 1991), foi verificado que o mesmo tipo de resposta pode ser obtida na interação entre plantas de tabaco transgênico expressando de maneira constitutiva o gene NPR1, que controla a ativação da resposta de resistência sistêmica em plantas, e a larva do inseto herbívoro *Spodoptera litura* (MEUR et al., 2008). Uma resposta aumentada da expressão de *pr-2* foi observada na infecção em folhas de tomateiro infectadas com a rizobactéria não patogênica *Pseudomonas putida* LSW17S (AHN et al., 2007) e este trabalho vem trazer evidências da ativação da expressão de *pr-2* de folhas de laranja, em resposta às interações com as batérias *Xac-A* e *Xaa-C*.

Conclusão

Esta ativação precoce e intensa da expressão da *pr-2* nas primeiras 36 horas da interação *Xaa-C::Citrus* pode contribuir para a contenção e eliminação do patógeno no sítio de infecção, embora a ação de outras proteínas relacionadas à resistência deva ser considerada.

Referências

- AHN, I. P.; LEE, S. W.; SUH, S. C. Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 20, p.759-68, 2007.
- BUCHER, G. L.; TARINA, C.; HEINLEIN, M.; DI SERIO, F.; MEINS JR, F.; IGLESIAS, V. A. Local expression of enzymatically active class I b-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. **The Plant Journal**, New York, v.28, n.3, p.361-369, 2001.
- CASTRESANA, C.; DE CARVALHO, F.; GHEYSEN, G.; HABETS, M.; INRB, D.; VAN MONTAGU, M. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* Beta 1,3-glucanase gene. **Plant Cell**, Rockville, v.2, p.1131-1143, 1990.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.162, p.156-159, 1987.
- CÔTE, F.; CUTT, J. R.; ASSELIN, A.; KLESSIG D. F. Pathogenesis-related acidic beta-1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v.4, p.173-81, 1991.
- DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v.417, p.459-463, 2002.
- DEAN, J. D.; GOODWIN, P. H.; HSIANG, T. Comparison of Relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of β -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.20, p.347-356, 2002.

- FRITIG, B.; KAUFFMANN, S.; DUMAS, B.; GEOFFROY, P.; KOPP, M.; LEGRAND, M. Mechanism of the hypersensitivity reaction of plants. **Plant Resistance to Viruses**, Chichester, v.133, p.92-108, 1987.
- FUNDECITRUS. Disponível em: (<http://www.fundecitrus.com.br>) Acesso em 23 ago. 2006.
- GenBank do NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Acesso 25 maio 2006.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.195-202, 1998.
- HAMMOND-KOSAK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annu.Rev.Plant Physiology**, Palo Alto, v.48, p.2-45, 1997.
- HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.114, p. 193-197, 1981.
- HONG, J. K.; HWANG, B. K. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Cap-sicum annuum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.114, p.549-558, 2002.
- LEE, B. R.; JUNG, W. J.; LEE, B. H.; AVICE, J. C.; OURRY, A.; KIM, T. H. Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.132, p. 329-37, 2008.
- LI, W. L.; FARIS, J. D.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIU, D. J.; CHEN, P. D.; GILL, B. S. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p. 353-362, 2001.
- LIU, H.; WANG, X.; ZHANG, H.; YANG, Y.; GE, X.; SONG, F. A rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCPL1 is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. **Gene**, Okemos, v.420, p.57-65, 2008.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p.936-942, 1988.
- MEUR, G.; MADHUSUDAN, B.; SRINIVASAN, T.; RAJESH KUMAR, K. R.; GUPTA, A. D.; KIRTI, P. B. Constitutive expression of Arabidopsis NPR1 confers enhanced resistance to the early instars of *Spodoptera litura* in transgenic tobacco. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.33, n.4, p.765-775, 2008.
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Acesso 12 set. 2005.
- QIN, J.; ZUO, K.; ZHAO, J.; LING, H.; CAO, Y.; QIU, C.; LI, F.; SUN, X.; TANG, K. Overexpression of GbERF confers alteration of ethylene-responsive gene expression and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae* in transgenic tobacco. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 31, p.255-63, 2006.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.9, p.40-43, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington**, v.74, p.5.463-5.467, 1977.
- SCHLUMBAUM, A.; MAUSCH, F.; VOGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, London, v.324, p.365-367, 1986.
- SELA-BUURLAGE, M.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; VAN DEN ELZEN, P. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.857-863, 1993.
- SHARMA, K.; MISHRA, A. K.; MISRA, R. S. Identification and characterization of differentially expressed genes in the resistance reaction in taro infected with *Phytophthora colocasiae*. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.36, n.6, p.1291-7, 2009.
- SHI, Y. **Isolation, characterization, and expression analysis of β -1,3-glucanase genes from strawberry plants**. These (Doctor of Philosophy) - Faculty of the Louisiana, State Univer-

sity and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2005.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v.268, p.661-667, 1995.

TAKEMOTO, D.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.118, p. 545-553, 2003.

VAN LOON, L. C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.4, p.111-116, 1985.

WHITE, R. F.; RYBICKI, E. P.; VON WECHMAR, M. B.; DEKKER, J. L.; ANTONIW, J. F. Detection of PR 1-type proteins in Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Graminae and Solanaceae by immunoelectroblotting. **Journal of General Virology**, London, v.68, p.2043-2048, 1987.

Recebido em 30-11-2006

Aceito para publicação em 22-06-2008