

بررسی تغییرات رونوشت های دو ژن کیتیناز و بتا 1 و 3 گلوکاناز در نهال های پرتقال
(*Citrus sinensis*) در پاسخ به آلودگی باکتری عامل شانکر مرکبات

مهدی منصوری^{1*}، اکبر حسینی پور²، غلامرضا شریفی سیرچی³، حسین معصومی⁴

¹ پژوهشکده باغبانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

² بخش گیاهپزشکی و پژوهشکده باغبانی دانشگاه شهید باهنر کرمان

³ بخش بیوتکنولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان

⁴ بخش گیاهپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

شانکر باکتریایی مرکبات با عامل (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) یکی از مهمترین بیماری های مرکبات در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر محسوب می شود. تجمع پروتئین های مرتبط با بیماریزایی نظیر کیتیناز و گلوکاناز در اثر حمله عوامل بیمارگر گیاهی، یکی از مکانیسم های دفاعی گیاهان در مقابل عوامل بیماریزا محسوب می شود. به منظور بررسی و مقایسه میزان mRNA دو ژن کیتیناز و گلوکاناز در مراحل اولیه آلودگی نهال های پرتقال (رقم واشنگتن ناول) به باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات از روش Real time RT-PCR استفاده گردید. پس از آلوده نمودن برگهای پرتقال با باکتری *X. citri* subsp. *citri*، در زمان های مختلف RNA کل استخراج و پس از سنتز cDNA، تغییرات میزان بیان ژن های مذکور اندازه گیری شد. نتایج نشان داد پس از 24 ساعت از زمان مایه زنی، میزان cDNA نسخ این دو ژن چهار برابر شاهد (برگ های پرتقال تزریق شده با آب سترون) بود و پس از گذشت 96 ساعت این میزان به طور معنی دار ($p < 0.0001$) کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان می دهد که مقدار تغییرات ژن کیتیناز نسبت به ژن گلوکاناز بیشتر است و این ژن در مراحل اولیه فرایند برهمکنش باکتری با گیاه نقش بیشتری دارد.

واژه های کلیدی: شانکر باکتریایی مرکبات، پروتئین های مرتبط با بیماریزایی، بیان ژن

نتیجه برهمکنش های سازگار جزئی و ناسازگار صورت می گیرد. بیان این پروتئین ها در گیاه به صورت اختصاصی انجام می شود، برای مثال در گیاه *Arabidopsis thaliana*، مجموع ژن های PR که در پاسخ به آلودگی با قارچ *Prenospora parasitica* بیان می شود با مجموع ژن های PR که در پاسخ به آلودگی با قارچ *Alternaria brassiciola* بیان می شود متفاوت است (Thomma et al., 1998). واکنش اولیه گیاه به آلودگی توسط عوامل بیماریزا بوسیله تغییرات متابولیکی همچون reactive oxygen species، مقاومت اکتسابی سیستمیک systemic acquired resistance (SAR) و مقاومت القایی induced systemic resistance سیستمیک ابراز می شود (Hammond-Kosack & Jones, 1996). فعالیت و حضور پروتئین های مرتبط با SAR ارتباط مستقیمی با سطح مقاومت و حساسیت گیاه دارد. پروتئین های مرتبط با بیماریزایی همچون کیتیناز و گلوکاناز که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با SAR می باشند (Ryals et al., 1996)؛ تولید گیاهان مقاوم به عوامل بیماریزای قارچی، باکتریایی و ویروسی از طریق انتقال ژن های کد کننده مواد ضد میکروبی روش امیدوار کننده ای برای مبارزه با بیماری های گیاهی است

شانکر باکتریایی مرکبات یکی از مخرب ترین بیماری های مرکبات در دنیا و ایران محسوب می شود. عامل بیماری *Xanthomonas citri sub sp.citri* (Xcc) گزارش شده است (Schaad et al, 2006) که پراکندگی وسیعی در تمام مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دارد. علائم بیماری تشکیل زخم های آشفشانی شکل با هاله آبسوخته بر روی برگ، ساقه و میوه درختان آلوده می باشد. این بیماری دامنه میزبانی وسیعی بر روی گونه های گیاهی خانواده Rutaceae دارد که در بین آنها برخی از ارقام مهم تجاری نظیر پرتقال (*Citrus sinensis*) (L.) Osbeck و لیموترش (*Citrus aurantifolia*) خسارت شدیدی می بینند (Gottwald & Graham, 2000). گیاهان جهت مقابله با عوامل بیماریزا از طیف وسیعی از مکانیسم ها استفاده می کنند. نتیجه برهمکنش گیاه با عوامل بیماریزا، القا بیان ژن های دخیل در مقاومت و در نتیجه کاهش زخم و آسیب توسط بیمارگر می باشد (Dixon et al., 1994). پروتئین های مرتبط با بیماریزایی (pathogenesis related proteins; PR) دسته ای از پروتئین ها محسوب می شوند که در اثر حمله پاتوژن ها و یا مواد مرتبط با بیمارگر همچون الیستور ها در گیاه تولید می شوند (van Loon et al., 1994). بیان این پروتئین ها به صورت موضعی و سیستمیک در گیاه، در

مواد و روشها

مواد گیاهی

این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه های مرکزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال 1388 انجام شد. نهال های دو ساله پرتقال پیوند شده روی نارنج (*Citrus aurantium*) تحت شرایط گلخانه ای در درجه حرارت 25-30 درجه سانتی گراد و رطوبت 55-65 درصد نگهداری شدند. شرایط بهینه تغذیه ای از طریق محلول پاشی با کودهای حاوی عناصر ریز مغذی در فواصل 30 روز تامین گردید.

تهیه اینوکولوم و روش مایه زنی

باکتری عامل بیماری به وسیله خرد کردن برگ های علایم دار بیماری جمع آوری شده از منطقه جیرفت و با استفاده از محیط کشت (Nutrient-Agar- NAS (Sucrose جدا سازی و خالص سازی گردید و سپس با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی XACF/XACR (Park et al., 2006) به عنوان باکتری *X. citri* subsp. *citri* تشخیص داده شد. بیماریزایی باکتری جداسازی شده در شرایط گلخانه اثبات شد. مایه زنی با استفاده از تزریق سوسپانسیون (10^6 cfu/ml) از باکتری در فاز رشد لگاریتمی با سرنگ بدون سوزن به بافت برگ انجام شد. 24 ساعت قبل و بعد از مایه زنی،

(Zasloff, 2002). یکی از مشهورترین مثال ها، تولید گیاهان تراریخته ای است که از طریق افزایش بیان ژن های کیتیناز و گلوکاناز مقاومت زیادی نسبت به عوامل بیماریزا کسب کرده اند (Sareena et al., 2006؛ Brogue et al., 1991). مشخص گردیده است که بیان هم زمان دو یا چند ژن *PR*، با اثر سینرژیستی باعث افزایش مقاومت و در نتیجه کنترل بهتر بیماری می گردد (Zhu et al., 1994).

روش Real time PCR کمی به عنوان روشی مناسب و دقیق در مطالعه بیان ژن مطرح است. اساس این روش مبتنی بر سنجش کمی نسخه های تکثیر شده در مرحله تصاعدی واکنش PCR، از طریق سنجش میزان نشر نور فلورسانس می باشد. در این روش از یک رنگ فلورسانس در طی واکنش تکثیر استفاده می شود و میزان نشر متناسب با میزان محصول تکثیر شده در هر چرخه افزایش می یابد و دستگاه آن را شناسایی و ثبت می کند. هدف از این تحقیق، بررسی و مقایسه میزان بیان دو ژن کیتیناز و گلوکاناز در واکنش به باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات با استفاده از روش Real time PCR (QPCR) کمی در مراحل اولیه آلودگی نهال های پرتقال است.

طبق روش ژانگ و همکاران (1998) استخراج گردید. کیفیت و کمییت RNA و DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتوفوتومتر ارزیابی شد.

گیاهان با استفاده از کیسه های پلاستیکی شفاف پوشانده شدند.

استخراج RNA کل و DNA ژنومی

جهت استخراج RNA، از برگ های واقع در قسمت های پایین ساقه (در زیر برگ مایه زنی شده) نمونه برداری شد. برگ ها بلافاصله پس از جدا کردن از گیاه در ازت مایع قرار گرفتند، سپس برگ ها در هاون استریل با استفاده از ازت مایع پودر گردید. استخراج RNA طبق روش اشلاپیچ و ساعربرون (2004) با تغییرات جزئی انجام شد. به طور خلاصه به بافت پودر شده 400 میکرولیتر از هر یک از سه محلول، بافر استخراج (100 mM Tris-Hcl pH: 8.5, 10 mM EDTA pH: 8, 100mM LiCl, 1% SDS)، محلول فنل و محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (24:1) افزوده شد. پس از ورتکس و سانتریفوژ، فاز روئی به میکرو لوله جدید منتقل شد و در معرض LiCl(10M) در دمای 20- درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفوژ کردن در 14000g رسوب حاصل در آب مقطر حل شد. RNA استخراج شده با اتانول و استات سدیم شستشو و رسوب داده شد و در نهایت در آب مقطر حل شد. شرایط عاری از RNase در تمام مراحل رعایت شد. همچنین DNA ژنومی از برگ نهال های پرتقال با استفاده از بافر (CTAB) و Cetyltrimethylammoniumbromide

واکنش Real-time RT-PCR

جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA استخراج شده با DNA ژنومی از DNase (Fermentase) عاری از RNase مطابق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد. به منظور تهیه cDNA، 1 میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر الیگومر تیمیدین (OligodT) و کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentase) در حجم 20 میکرولیتر طبق دستور العمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد. به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن های کیتیناز و گلوکاناز در اثر آلودگی با باکتری عامل بیماری از آغازگرهای الیگونوکلوئوتیدی طراحی شده توسط دیستفانو و همکاران (2008) استفاده گردید (جدول شماره 1). برای انجام Real Time PCR از دستگاه Bio-Rad IQ5 (آمریکا Bio-Rad, IQ SYBR Green) و کیت Master Mix Kit (آمریکا Bio-Rad, Master Mix Kit) استفاده شد. درون هر چاهک از پلیت 96 خانه ای (آمریکا Bio-Rad, 12/5 میکرولیتر از محلول کیت به همراه یک میکرولیتر (0/5 μM) از هر آغازگر و دو میکرولیتر cDNA و 8/5 میکرولیتر آب مقطر ریخته شد. پس از تهیه حجم مورد

مرتبط با تکثیر ژن های کیتیناز و گلوکاناز و همچنین ژن *EF1*، کارایی PCR برای تمامی این ژن ها بر اساس فرمول $Efficiency = [10(-1/Slope)] - 1$ محاسبه شد. ارزیابی کمی میزان بیان ژن با استفاده از روش مقایسه چرخه آستانه (Cycle threshold) انجام شد. تغییرات نسبی بیان ژن های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به ژن *EF1* نرمالایز شد. نتایج قبلی نشان داده است، ژن *EF1* یکی از مناسب ترین ژن ها جهت نرمالایز کردن داده های بیان ژن می باشد و از ثبات کافی در تنش های زیستی و غیر زیستی برخوردار می باشد (Nicot et al., 2006; Jain et al., 2005). میزان بیان ژن های مورد نظر قبل از آلودگی، 24، 48 و 96 ساعت پس از آلودگی اندازه گیری شد. میزان بیان قبل از آلودگی به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. مقادیر چرخه آستانه، محاسبه و تغییرات بیان ژن مطابق روش لیواک و شمیتگن (2001) اندازه گیری شد. بررسی آماری داده ها در قالب آزمایش فاکتوریل با دو سطح کنترل و بیماری، چهار زمان تلقیح، دو تکرار زیستی و سه تکرار آزمایشگاهی به عنوان مشاهدات انجام شد و مقایسه میانگین نیز با استفاده از روش چند دامنه ای دانکن با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.1 صورت گرفت.

نظر، واکنش PCR در 45 چرخه، شامل 1 دقیقه در 94 درجه سانتی گراد، 1 دقیقه در 55 درجه سانتی گراد و 1 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد انجام گردید. یک مرحله اولیه در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و یک مرحله پایانی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه نیز در ابتدا و انتهای چرخه ها انجام شد. برنامه دمایی PCR برای هر سه ژن یکسان انتخاب شد. پس از اتمام چرخه های PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی 0/5 درجه سانتی گراد در هر چرخه و بین دمای 55-99 درجه سانتی گراد به منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم گردید. از هر نمونه سه تکرار و آزمایش دو بار تکرار شد.

روش ارزیابی و محاسبه میزان بیان ژن های کیتیناز و گلوکاناز

پس از اتمام واکنش PCR، خط آستانه توسط نرم افزار دستگاه تعیین گردید. تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار IQ5 Software انجام شد. برای تعیین بازدهی و ضریب همبستگی ژن های هدف (کیتیناز و گلوکاناز) و ژن خانه دار (elongation factor 1-alpha (EF1))، از DNA استخراج شده از بافت برگ پرتقال رقت های متوالی تهیه و پس از انجام Real time PCR، نمودار استاندارد برای هر قطعه ژن ترسیم شد. با توجه به شیب (Slope) نمودار استاندارد

نتایج

واکنش Real-time PCR

مقدار پرایمر و دمای مرحله اتصال پرایمر از فاکتورهای اساسی در بهینه کردن واکنش Real-time PCR محسوب می شوند. شرایط بهینه طوری فراهم شد که بازدهی واکنش در بهترین حالت ممکن و هیچ محصول غیر اختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب (مشاهده یک پیک ذوب منفرد) و الکتروفورز محصول واکنش در ژل آگارز 2 در صد (مشاهده یک بانده در اندازه مورد نظر) تأیید شد.

آنالیز بیان ژن با Real-time RT-PCR

روش مقایسه ای چرخه آستانه در Real Time PCR مبتنی بر تغییرات چرخه آستانه نمونه آزمایش در مقایسه با نمونه کنترل است که با کمک آن نسبت تعداد نسخه نمونه اولیه قابل اندازه گیری می باشد. با توجه به اینکه بازدهی واکنش PCR بین ژن های هدف با ژن خانه دار (*EFI*) یکسان بود (شکل 1)، بنابراین استفاده از روش مقایسه ای چرخه آستانه از اعتبار لازم برخوردار می باشد. نتایج بیان ژن (شکل 2) نشان داد که بر اساس آزمون دانکن افزایش معنی داری (در سطح 5%) در میزان بیان ژن های کیتیناز و گلوکاناز در طول برهمکنش گیاه با باکتری اتفاق می افتد. در

گیاه تلقیح شده با باکتری بیشترین افزایش بیان در ژن کیتیناز نسبت به مرحله قبل از تلقیح به میزان 44 برابر ($P < 0.0001$) و در ژن گلوکاناز به میزان 4 برابر ($P < 0.0001$) می باشد. در گیاه کنترل که فقط با آب مقطر استریل تلقیح گردید، بیشترین افزایش بیان به میزان 10 برابر در ژن کیتیناز مشاهده گردید ولی در ژن گلوکاناز تغییری مشاهده نشد ($P < 0.0001$). در نتیجه نرمالیز کردن (که از تقسیم عدد میزان بیان ژن بین گیاه آلوده شده با گیاه کنترل بدست می آید *Relative Quantitation of Gene Expression, 2001*) نتایج بیان ژن بین گیاه تلقیح شده با نتایج بیان ژن در گیاه کنترل که فقط با آب مقطر استریل تلقیح گردیده است مشاهده می شود که افزایش 4 برابری در بیان هر دو ژن کیتیناز و گلوکاناز مشاهده می شود.

بحث

پیش نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم های گیاهی دخیل در واکنش به عوامل بیماریزا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می شود (Baker et al., 1997). پروتئین های مرتبط با بیماریزایی همچون کیتیناز و گلوکاناز که نقش ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند در ارتباط با مقاومت اکتسابی سیستمیک می باشند (Sticher et al., Ryals et al., 1996)

ژن های کیتیناز و گلوکاناز در ارتباط با افزایش سطح مقاومت در درختان سیب نسبت به بیماری یاکتریایی آتشک درختان دانه دار می باشد. مطالعات نشان داده است که با استفاده از یکسری مواد القا کننده که باعث افزایش بیان برخی از ژن های *PR* در گیاهان می شوند، افزایش مقاومت نسبت به عوامل بیماریزا حاصل می شود (Brisset et al., 2000; Francis et al., 2009; Herman et al., 2008). در مقایسه با روش *time PCR*، روشهای نورترن بلاتینگ و *Semi quantitative PCR* از دقت کمتری برخوردار هستند و نمی توان به طور دقیق به میزان تغییرات بیان ژن ها پی برد، در حالی که در روش *Quantative Real Time PCR* بیان ژن به طور دقیق و کمی تعیین می شود و به عنوان روشی مطمئن جهت مطالعه تغییرات بیان ژن ها به کار می رود (Farrell, 2005). نتایج قبلی نشان داده است که جمعیت باکتری *XCC* در بافت برگ گیاه پرتقال تا هشت روز پس از ورود باکتری به داخل بافت به سرعت افزایش می یابد و پس از طی این مدت شدت رشد باکتری در داخل گیاه کاهش می یابد (Shiotani et al., 2008). در این تحقیق از روش تزیق اینوکولوم به داخل بافت برگ استفاده شد به این دلیل که در این روش به طور همزمان تعداد زیادی از سلول های گیاه در تماس با باکتری قرار می گیرند و امکان ارزیابی پاسخ

(1997). نتایج این تحقیق نشان داد پس از تلقیح گیاه با اینوکولوم، افزایش بیان در دو ژن کیتیناز و گلوکاناز مشاهده می شود. مقدار این افزایش بیان در ژن کیتیناز نسبت به گلوکاناز تفاوت معنی داری ($p < 0.0001$) دارد و بر اساس محاسبه ضریب تنوعات مشاهده گردید که ضریب تنوعات در داده های بیان ژن کیتیناز نسبت به ژن گلوکاناز بسیار بیشتر است. نتایج مشابهی نیز از افزایش فعالیت کیتیناز نسبت به گلوکاناز گزارش شده است. برای مثال، در گیاه سیب زمینی در پاسخ به آلودگی قارچی میزان فعالیت آنزیمی کیتیناز بسیار بیشتر از میزان فعالیت گلوکاناز مشاهده شده است (Kombrink et al., 1988). اگر چه کیتینازها بیشتر فعالیت ضد قارچی دارند و در بر همکنش های بین قارچ های بیماریزای گیاهی با گیاهان نقش عمده ای دارند ولی مطالعات نقش لیزوزیمی را نیز برای کیتینازها اثبات کرده و استنباط شده که از این طریق باعث تجزیه دیواره سلولی باکتری ها می شوند (Fritig et al., 1998; Heitz et al., 1994). نتایج مطالعات قبلی نشان داده است افزایش بیان ژن کیتیناز و برخی از ژن های *PR* در گیاه فلفل باعث افزایش مقاومت به آلودگی در برابر باکتری *Xanthomonas campestris* (Hong & Hwang, 2005) بریست و همکاران (2000) نشان دادند که افزایش میزان بیان

تغییرات مشاهده شده در الگوی بیان ژن های مورد مطالعه و نقش ژن های کیتیناز و گلوکاناز در آلودگی های باکتریایی، تصور می شود که این دو ژن در ارتباط با پاسخ های دفاعی نهال های پرتقال نسبت به باکتری شانکر مرکبات باشد و می توانند به عنوان ژن های کاندید، برای مطالعات بیشتر در جهت تولید ارقام مقاومی که دارای سطح بیان بیشتری از این ژنها باشند محسوب شوند.

سپاسگزاری

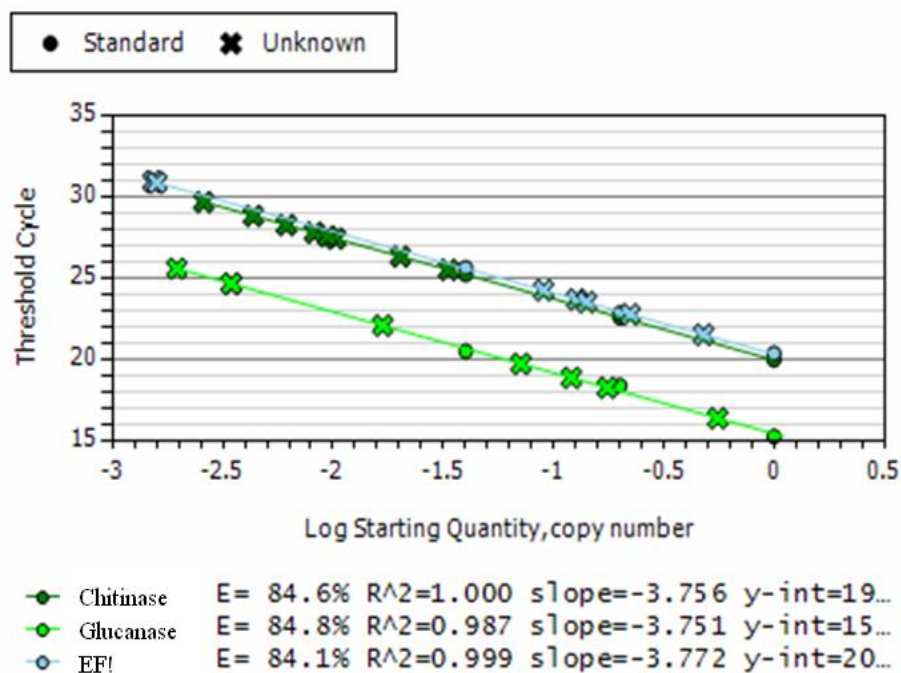
نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر قاسم محمدی نژاد در زمینه پردازش داده های آماری این تحقیق، کمال تشکر را دارند.

جدول 1- آغازگرهای استفاده شده در واکنش **Real Time PCR** جهت تکثیر ژن های کیتیناز،

گلوکاناز و *EF1*.

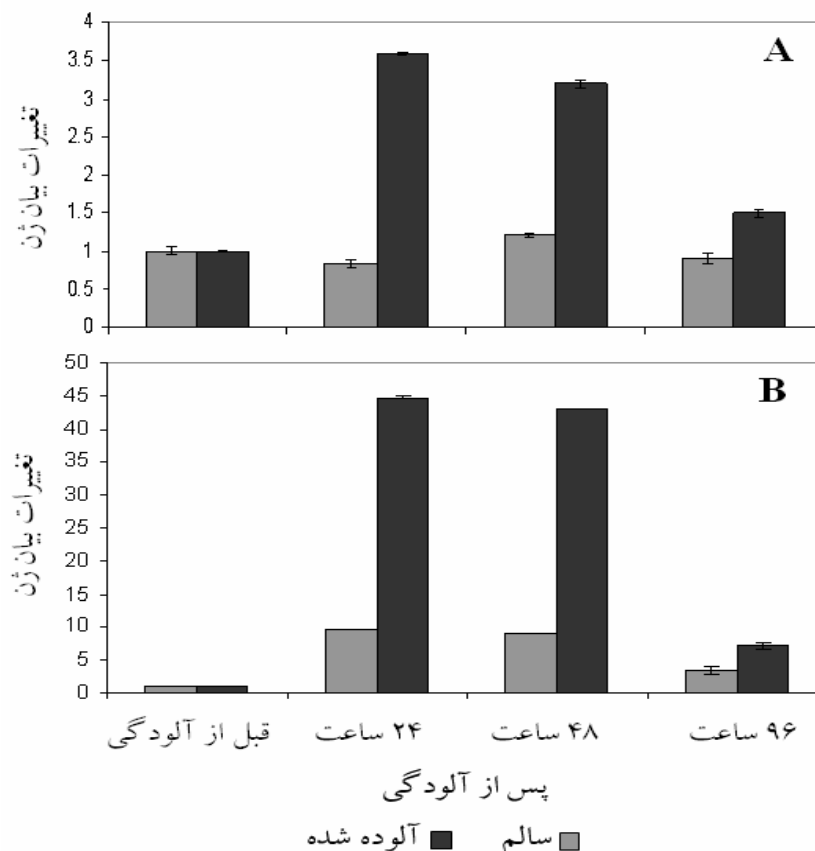
نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence	قطعات تولیدی (جفت طراحی آغازگر باز) Amplicon size(bp)	توالی استفاده شده جهت طراحی آغازگر Accession number
Chitinase	Forward 5'-AATGTTGCTAGCATTGTGACTCC-3' Reverse 5'-GCAGCATTCAGAAACGCATCT-3'	111	AF090336
Glucanase	Forward 5'-TTCCGACGGATCGTTAAGTTACC-3' Reverse 5'-CCACCCACTCTCTGATATCACG-3'	117	AJ000081
Elongation factor1-alpha	Forward 5'-GGTCAGACTCGTGAGCATGC-3' Reverse 5'-ATCGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG-3'	115	AY498567

Table 1- Primers used in Real time PCR reactions for the amplification of Chitinase, Glucanase and *EF1* genes.



شکل 1- نمودار منحنی استاندارد رسم شده بر اساس سری رقت از DNA گیاه پرتقال مربوط به ژن های کیتیناز و گلوکاناز و ژن خانه دار *EF1*. راندمان تکثیر محاسبه شده برای ژن های کیتیناز، گلوکاناز و *EF1* به ترتیب 84/6، 84/8، و 84/1 می باشد.

Figure 1- The standard curves were constructed with serial dilutions of the citrus DNA for *Chitinase*, *Glucanase* and *EF1* genes. For each set, determined Ct values were plotted against the logarithm of their known initial copy number. Efficiency for *Chitinase*, *Glucanase* and *EF1* genes was 84.6, 84.8 and 84.1 respectively.



شکل 2- نتایج تغییرات بیان ژن گلوکاناز (A) و کیتیناز (B) محاسبه شده به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ در فواصل زمانی قبل از آلودگی (زمان صفر)، 24 ساعت، 48 ساعت و 96 ساعت پس از مایه زنی سوسپانسیون (10^6 cfu/ml) باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* با استفاده از روش سرنگ بدون سوزن (Infiltration). میل بارها نشان دهنده مقادیر خطای استاندارد میانگین می باشد.

Figure 2- Relative expression of the *Chitinase* (B) and *Glucanase* (A) genes in citrus leaves after injection *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (10^6 cfu/ml) at 0, 24, 48 and 96 hours post inoculation. Relative gene expression was calculated using 2- $\Delta\Delta CT$ method. Error bars represent standard error of the mean

1. Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science* 276: 726-733.
2. Bowles DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59:873-907.
3. Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000) Acibenzolar-Smethyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.
4. Brogue K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
5. Chang M-M, Horovitz D, Culley D, Hadwiger LA (1995) Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan. *Plant Molecular Biology* 28:105-111.
6. Ciardi JA, Tieman DM, Lund ST, Jones JB, Stall RE, Klee HJ (2000) Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology* 123: 81-92.
7. Distefano G, La Malfa S, Vitale A, Lorito M, Deng Z, Gentile A (2008) Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*. 17 : 873-879.
8. Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*. 32:479-501.
9. Farrell Jr RE (2005) RNA methodologies (Third Edition) A laboratory guide for isolation and characterization. Elsevier, Inc. USA
10. Francis MI, Redondo A, Burns JK, Graham JH (2009) Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology*. 124:283-292
11. Fritig B, Heitz T, Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* 10:16-22.
12. Gottwald TR, Graham JH (2000) Canker. In: Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH (eds) *Compendium of citrus diseases*, 2nd edn. APS Press, St. Paul, pp 5-7.
13. Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance genedependent plant defence responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
14. Heitz T, Segond S, Kauffmann S, Geoffroy P, Prasad V, Brunner F, Fritig B, Legrand M (1994) Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis-related (PR) protein – a new plant chitinase/lysozyme. *Molecular and General Genetics* 245:246-254.
15. Herman MAB, Davidson JK, Smart CD (2008) Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. *Phytopathology* 98:1226-1232.
16. Hong JK, Hwang BK (2005) Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Pathology Journal* 21: 195-206.
17. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative

- real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345:646–651
18. Kombrink E, Schroder M, Hahlbrock K (1988) Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.85:782-786
 19. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-8.
 20. Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56:2907–2914
 21. O'Garro LW, Charlemagne E (1994) Comparison of bacterial growth and activity of glucanase and chitinase in pepper leaf and flower tissue infected with *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45:181-188.
 22. Park DS, Hyun JW, Park YJ, Kim JS, Kang HW, Hahn JH, Go SJ (2006) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiology Research* 161:145—149
 23. Rasmussen U, Bojsen K, Collinge DB (1992) Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*. 1992 20:277-87.
 24. Relative Quantitation of Gene Expression (2001) from http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf
 25. Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809–1819.
 26. Sareena S, Poovannan K, Kumar KK, Raja JAJ, Samiyappan R, Sudhakar D, Balasubramanian P (2006) Biochemical responses in transgenic rice plants expressing a defence gene deployed against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani* *Current Science*. 91: 1529-1532.
 27. Sauerbrunn N, Schlaich NL (2004) *PCC1*: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in *Arabidopsis*. *Planta* 218: 552-561.
 28. Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, garkova L, Stromberg PE, Stromberg VK, daver K (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* 29:90–695.
 29. Shiotani H, Ozaki K, Tsuyumu S (2000) Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of Pummelo (*Citrus grandis*). *Phytopathology* 90:1383–1389.
 30. Shiotani H, Yoshioka T, Yamamoto M, Matsumoto R (2008) Susceptibility to citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* depends on the nuclear genome of the host plant. *Journal of General Plant Pathology*. 74:133–137.
 31. Sticher L, MauchMani B, Metraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35:235–270.
 32. Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF (1998) Separate Jasmonate- dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*95:15107-15111.

33. Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
34. Zhang Y, Uyemoto Jk, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 71:45-50.
35. Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology* 12: 807-812.
36. van Loon LC, Pierpoint WS, Bolle r T, Conejero V (1994) Recommendations for Naming Plant Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12:245-264.

Changes in chitinase and β -1,3-glucanase transcript levels in sweet orange (*Citrus sinensis*) in response to treatment with *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

Mansouri M.^{1*}, Hosseini pour A.², Sharifi-sirchi Gh. R.³, Massumi H.⁴

¹ Horticulture and Dates Research institute, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, kerman, Iran.

² Department of Plant protection and Horticulture and Dates Research institute, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, kerman, Iran

³ Department of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, kerman, Iran.

⁴ Department of Plant protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, kerman, Iran.

Abstract

Asiatic citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is a bacterial disease with economic importance in tropical and subtropical citrus-producing areas. One of the potential reaction of plants to pathogens attack is an increased levels of pathogenesis-related proteins such as chitinase and β - 1,3 -glucanase. The objective of present study was to investigate the expression of the PR proteins; β -1,3-glucanase and chitinase in Washington Navel orange (*Citrus sinensis*) inoculated with *Xanthomonas citri* sub sp.*citri*. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction is used to quantify the mRNA level of chitinase and β - 1,3 -glucanase genes in early stage of plant defense response. For this purpose, total RNA was extracted from inoculated and non inoculated citrus plants at different times post-inoculation. Higher amounts of transcripts were detected 24 hours after pathogen inoculation of citrus leaves and four-fold more than the control citrus plant. The transcript levels of the two genes were reduced with the time after inoculation, and decreased significantly at 96 hours post inoculation. This study indicated that the role of chitinase gene is more than glucanase in early stage of citrus canker disease.

Key Words: *citrus bacterial canker, pathogenesis-related proteins, gene expression*

* Corresponding Author: Mansouri Mehdi Tel: 03413203117 E-mail: me.mansoori@gmail.com