



ESTUDO DA COMPLEMENTAÇÃO DE *Xylella fastidiosa* CAUSADORA DE CVC COM UMA ENZIMA POLIGALACTURONASE FUNCIONAL E SEU IMPACTO NA FISIOLOGIA DA BACTÉRIA

Marcella Rosa Leão da **Costa**¹; Juliana Helen de Souza de **Oliveira**²; Natália Sousa **Teixeira-Silva**³; Alessandra Alves **de Souza**⁴

Nº 20131

RESUMO – A *Xylella fastidiosa* é um fitopatógeno restrito ao xilema de culturas como citros e videira, causando a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e a doença de Pierce (PD). A partir de estudos de genômica comparativa entre as subespécies *fastidiosa* (Xf-PD) e *pauca* (Xf-CVC), observou-se que o gene precursor da enzima poligalacturonase (*pglA*) em Xf-CVC apresenta um frameshift que gera uma proteína não funcional. A *pglA* degrada as pectinas da parede celular, possibilitando a movimentação do patógeno. Isto sugere que a mutação da *pglA* em Xf-CVC pode levar a colonização mais lenta observada em citros, ou impedir o disparo do sistema imune vegetal pela percepção de DAMPs. Para verificar se a presença de *pglA* confere maior virulência ou ausência de sintomas, Xf-CVC foi complementada com o gene funcional de Xf-PD e clonado em vetor pXF20. A complementação foi confirmada por PCR convencional e cortes de restrição. A bactéria complementada foi inoculada em laranja doce e após sete meses ainda não apresentaram sintomas, sugerindo que a presença da *pglA* não acelera os sintomas em citros, e provavelmente, a degradação de pectina leva à ativação do sistema imune. Devido seu comportamento fastidioso, novas avaliações serão necessárias. Para comprovar a complementação *in vitro* e expressão *in vivo*, um anticorpo específico contra a *pglA* foi produzido. Para tal, a *pglA*-PD foi clonada em vetor pET28a, transformada em *E. coli* Rosetta e induzida em sistema heterólogo. A proteína foi expressa na fase insolúvel do extrato proteico, isolada via SDS-PAGE e o anticorpo foi sintetizado para validação.

Palavras-chaves: *Xylella fastidiosa*, Clorose Variegada dos Citros, Poligalacturonase, Pectina.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biotecnologia, UFSCar – Campus Araras, Araras – SP; marcellarlcosta@gmail.com

2 Colaborador, Graduação em Biotecnologia, UFSCar – Campus Araras, Araras - SP.

3 Colaborador, Bolsista Fapesp: Pós Doutorado, Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis - SP.

4 Orientador: Pesquisador do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis – SP; desouza@ccsm.br



ABSTRACT – *Xylella fastidiosa* is a phytopathogen restricted to the xylem of crops such as citrus and grapevine, causing citrus variegated chlorosis (CVC) and Pierce's disease (PD). Comparative genomics studies between the subspecies *fastidiosa* (Xf-PD) and *pauca* (Xf-CVC), it was observed that the precursor gene of the enzyme polygalacturonase (pglA) in Xf-CVC presents a frameshift that generates a non-functional protein. PglA degrades the pectins on the cell wall, allowing the movement of the pathogen. It suggests that the mutation of pglA in Xf-CVC may lead to the slower colonization observed in citrus or prevent the triggering of the plant immune system by DAMPs. To verify whether the expression of pglA confers greater virulence or absence of symptoms, Xf-CVC was complemented with the functional gene of Xf-PD, which was cloned into vector pXF20 and the complementation was confirmed by conventional PCR and restriction enzymes. The complemented bacteria was inoculated in sweet orange and after seven months they still had no symptoms, suggesting that the presence of pglA does not accelerate symptoms in citrus, and probably, the degradation of pectin leads to the activation of the immune system. Due to its fastidious behavior, further evaluations are necessary. To prove *in vitro* complementation and *in vivo* expression, a specific antibody against pglA was produced. For this, pglA-PD was cloned into pET28a vector, transformed into *E. coli* Rosetta and induced in a heterologous system. The protein was expressed in the insoluble fraction of the protein extract, isolated via SDS-PAGE and the antibody was synthesized for validation.

Keywords: *Xylella fastidiosa*, Citrus Variegated Chlorosis, Polygalacturonase, Pectin.