UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Instituto de Química
Campus de Araraquara - SP

BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PARA O CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO E DO HUANGLONGBING

ARARAQUARA – S.P.

2024

BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES

CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PARA O CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO E DO HUANGLONGBING

Tese de Doutorado, apresentado ao Programa de Biotecnologia do Instituto de Química Unesp/Araraquara, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Orientador: Nelson Arno Wulff

ARARAQUARA – S.P.

2024

S211c

Sanches, Beatriz Cristina Pecoraro
Caracterização de peptídeos antimicrobianos e avaliação do potencial para o controle do Cancro cítrico e do Huanglongbing / Beatriz Cristina Pecoraro Sanches. -- Araraquara, 2024
118 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Nelson Arno Wulff

1. Fitopatologia. 2. Cancro cítrico. 3. Antimicrobianos. 4. Peptídeos. 5. Ácido salicílico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Caracterização de peptídeos antimicrobianos e avaliação do potencial para o controle do cancro cítrico e do huanglongbing"

AUTORA: BEATRIZ CRISTINA PECORARO SANCHES
ORIENTADOR: NELSON ARNO WULFF

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF (Participaçao Presencial)
Departamento Científico, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO (Participaçao Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dr. FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO (Participaçao Virtual)
Laboratório de Expressão de Genes / Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA - Brasília, DF

Dra. ELIANE CRISTINA LOCALI (Participaçao Presencial)
Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS / Araraquara/SP

Dr. FRANKLIN BEHLAU (Participaçao Presencial)
Departamento Científico / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara

Araraquara, 08 de janeiro de 2024

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A busca por moléculas alternativas, sustentáveis e inovadoras para controlar ou mitigar os efeitos provocados pelos principais patógenos que acometem a citricultura está avançando cada vez mais. Os peptídeos são macromoléculas com alto potencial biotecnológico pois podem apresentar alta atividade antibiótica, ativar o sistema de defesa vegetal, podem ser naturalmente produzidos por plantas e outros seres vivos e facilmente obtidos via estratégias de síntese em fase sólida, o que amplia caminhos para testes de *screening* e possibilidades de modificações em sua estrutura primária. O estudo revelou uma classe de peptídeos com maior indução das vias biossintéticas do ácido jasmônico e do ácido salicílico, como também, uma classe peptídica que apresentou maior interação e potencial antibiótico frente a *Xanthomonas citri* (*in vivo* e *in planta*) e *Candidatus* Liberibacter asiaticus (*in planta*), microrganismos relacionados ao cancro cítrico e ao huanglongbing (HLB), a doença mais devastadora do setor na atualidade. A obtenção desses resultados abre oportunidades para a aplicação de peptídeos no desenvolvimento de produtos para o controle de doenças dos citros.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The search for sustainable and innovative alternatives to control or mitigate the effects caused by the main pathogens that affect citrus farming is advancing increasingly. Peptides are macromolecules with high biotechnological potential, as they can present high antibiotic activity, activate the plant defense system, can be produced naturally by plants and other living beings and are easily obtained through solid phase synthesis strategies, what expands pathways for screening tests and possibilities for modifications to its primary structure. The study revealed a class of peptides with greater induction of the jasmonic acid and salicylic acid biosynthetic pathways, as well as a peptide class that presented greater interaction and antibiotic potential against *Xanthomonas citri* (*in vivo* and *in planta*) and *Candidatus* Liberibacter asiaticus *(in planta*), microrganisms related to citrus cancer and huanglongbing (HLB), the most devastating disease in the sector today. Obtaining these results opens up opportunities for the application of peptides in the development of products for the control of citrus diseases.

DADOS CURRICULARES

Beatriz Cristina Pecoraro Sanches

Dados Pessoais

Nome: Beatriz Cristina Pecoraro Sanches

Nome em citações bibliográficas: SANCHES, B.C.P

Endereço eletrônico: biapecorarosanches@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2019 – atual

Doutorado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Título: Peptídeos antimicrobianos no controle de doenças de citros. Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2016 - 2018

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Título: Desenvolvimento e Caracterização de lipossomas de ramnolipídeos encapsulados com peptídeos inibidores de topoisomerases bacterianas. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Coorientador: Prof. Dr. Jonas Contiero. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2016 - 2017

Especialização em Sustentabilidade e Agronegócios.

Universidade de Araraquara (UNIARA). Título: Energias Renováveis na atualidade: Uma análise crítica. Orientadora: Vanessa Colombo Corbi.

2012 - 2015

Graduação em Biotecnologia.

Universidade Federal de São Carlos, Araras, Brasil. Título: Efeito da concentração e açúcar e nitrato sobre a produção de etanol e ácido por linhagens de *Dekkera bruxellensis* em culturas submetidas à diferentes velocidades de agitação. Orientadora: Prof. Dr. Sandra Regina Ceccatto-Antonini. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Atuação Profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, 2019 – atual

Vínculo: Bolsista
Enquadramento funcional: doutoranda

2. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, 2016 - 2018

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: mestrado

3. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2012 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: membro do departamento de Relações Humanas e posteriormente, Diretora do Departamento Jurídico e Financeiro da Empresa Júnior de Biotecnologia (SUSTEC Jr).

4. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2014 - 2015

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estágio voluntário com biologia molecular, purificação de proteínas e mecanismos da *Neurospora crassa*, sob a orientação da Prof. Dr. Maria Célia Bertolini (UNESP, IQ).

5. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2014 - 2014

Vínculo: bolsista;

Enquadramento funcional: monitora da disciplina Biologia Celular, sob a orientação da Prof. Dr. Silvana Perissato Meneghin (UFSCar, Araras).

6. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2014 - 2014

Vínculo: voluntário;

Enquadramento funcional: estágio com citricultura, cultura de tecidos vegetais e técnicas de microenxertia, sob orientação da Prof. Dr. Alessandra Souza (IAC, Cordeirópolis).

Idiomas

Português: Lê bem, compreende bem, Fala bem, escreve bem.

Inglês: Lê bem, compreende bem, Fala bem, escreve bem, escreve razoavelmente bem.

Espanhol: Lê razoavelmente bem, compreende bem, Fala bem, escreve razoavelmente bem.

Prêmios e títulos

2022

1º Lugar entre os trabalhos apresentados na forma oral no 67th Brazilian Congress of Genetics, Natal-RN, com o trabalho intitulado “Prospection of peptides with antibacterial and inducer of vegetal defense system activities against Huanglonbing”.

2017

1° Lugar entre os trabalhos apresentados na forma de painel no VII Congresso Farmacêutico da UNESP, Araraquara-SP, com o trabalho intitulado “Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*”, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Produções

1. Artigos completos publicados em periódicos

1. SANCHES, B. C. P., ROCHA, C. A., MARTIN BEDOYA, J. G., SILVA, V. L. D., SILVA, P. B. D., FUSCO-ALMEIDA, A. M., MARCHETTO, R. Rhamnolipid-based liposomes as promising nano-carriers for enhancing the antibacterial activity of peptides derived from bacterial toxin-antitoxin systems. **International Journal of Nanomedicine**, p.925-939, 2021.

2. FONSECA, RAFAEL F. ; MELO, CAIO C. B. ; SANCHES, BEATRIZ B. C. P. ; BERTUCCI-NETO, VICTOR ; FARINAS, CRISTIANE S. ; KWONG, WU H. . Modelling of Solid-State Fermentation over Wide Operational Range for Application in Process Optimization. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 1, p. 1, 2018.

3. BASSI, ANA PAULA GUARNIERI.; MENEGUELLO, L.; PARALUPPI, A.L.; SANCHES, B.C.P.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Interaction of Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus fermentum, *Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 1, p. 1-12, 2018.

2. Pedidos de Patente

SANCHES, B.C.P., SILVA, V.L., BRIAM-SALAZÁR, A.M., LOVAGLIO, R., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETTO, R. Peptides and rhamnolipids liposomes. Provisional Number: 62517264. U.S. Patent and Trademark Office. 2017.

3. Materiais didáticos

Técnicas Moleculares Básicas: PCR, RT-qPCR, Sequenciamento, RFLPs, STRs (60 h/a), 2023 – Material didático criado para a Faculdade Unyleya para o curso de Técnicas em Biologia Molecular.

Defesas do Hospedeiro Envolvidas na Resistência e na Recuperação das Infecções Virais (60 h/a), 2021 – Material didático criado para a Faculdade Unyleya para o curso de Virologia.

Patologia Oncológica (40 h/a), 2020 - Material didático criado para a Faculdade Unyleya para o curso de Farmácia Oncológica.

4. Resumos publicados em anais de eventos

1. SANCHES, B.C.P., MARTINS, E., DAROLT, J.C., DUTRA, M.F., CRUSCA, E., MARCHETTO, R., WULFF, N.A. Prospection of peptides with antibacterial and inducer of vegetal defense system activities against Huanglongbing. SBG, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. 2022. (Apresentação de trabalho/Outra).

2. SANCHES, B.C.P., SILVA, V.L., LOVAGLIO, R., CRUSCA, E., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETTO, R. Internalization of ParE toxin peptide

analogue by rhamnolipids liposomes. SIMB, Denver, Colorado. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3. SANCHES, B.C.P., ROCHA, C.A., CARRIJO, R.S., BENITES, T.A., CRUSCA,E., SILVA, P.B., CHORILLI, M., CONTIERO, J., MARCHETO, R. Rhamnolipid liposomes: a vehicle for ParE toxin peptide analogue transport to bacterial cell. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. CARRIJO, R. S.; ROCHA, C. A. ; CONCEICAO, M. B. ; SANCHES, B. C. P. ; BARBOSA, L. C. B. Estrutura e função da proteína GhoT de *Salmonella enterica*: uma toxina bacteriana implicada no fenômeno de persistência celular. In: VII Congresso Farmacêutico da UNESP, 2017, Araraquara. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

5. ROCHA, C.A., RAMOS, M.A.S., CRUSCA, E., TOLEDO, R.G., CARRIJO, R.S., SANCHES, B.C.P., BAUAB, T.M., MARCHETTO, R., Effects of dimerization on the biological activity of the WRWYCRCK peptide. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo (Apresentação de Trabalho/Outra).

6.BENITES, T. A.; ZOTTIS, A.; MARCHETTO, R.; SANCHES, B. C. P. Study of computacional mutations to increase ParD antitoxin affinity. 2017. SBBq, Águas de Lindóia, São Paulo (Apresentação de Trabalho/Outra).

7. SANCHES, B. C. P.; Ceccato-Antonini, S. R. ; BASSI, A. P. Efeito da concentração de açúcar e nitrato sobre a produção de etanol e ácido por linhagens de *Dekkera bruxellensis* em culturas submetidas à diferentes velocidades de agitação. 2015. CIC, São Carlos (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

8. SANCHES, B. C. P.; BASSI, A. P.; Ceccato-Antonini, S. R. Cell growth and alcohol production is differently dependent on the level of agitation and glucose concentration in *Dekkera bruxellensis*. In: International Union of Microbiological Societies, 2014, Montréal. Cell growth and alcohol production is differently dependent on the level of agitation and glucose concentration in *Dekkera bruxellensis*, 2014. IUMS, Québec, Canada (Apresentação de Trabalho/Outra).

Participação em eventos científicos:

- From gene to trait. UNICAMP. 2023 (Curso);
- First integrated school of metabolomics, UNESP. 2023 (Curso);
- Sociedade Brasileira de Genética – SBG, Natal. 2023 (Congresso);
- VII Rotas Tecnológicas da Biotecnologia. Parque Supera. 2018 (Evento);
- 46° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2018 (SBBq – Congresso);
- VII Congresso Farmacêutico da UNESP. 2017 (Congresso);
- Workshop de Caracterização de Macromoléculas com Foco em Estabilidade Estrutural e Afinidade de Interações, com Uso de nanoDSF e Termoforese em Microescala (CNPEM). 2016 (Curso);
- Four Biotec: Quatro Dias pela Biotecnologia. UFSCar. 2016. (Outra);
- SINAFERM. 2015. (Simpósio);
- International Union of Microbiological Societies Congresses. 2014. (Congresso);
- Simpósio de Biotecnologia Forense. 2014. (Simpósio);
- Terra e Alimentos. 2014. (Simpósio);
- SMA – Simpósio de Microbiologia Aplicada. UNESP, Rio Claro. 2013 (Simpósio).

A meus pais, Isabel e Luiz Cláudio, que nunca mediram esforços
para me auxiliar nesta caminhada.
A meu irmão, Bernardo, que sempre me guiou e
me ajudou a seguir em frente.
Vocês são a razão da minha vida,

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e perseverança concedida.

Aos meus pais: Isabel e Luiz Cláudio, meu irmão: Bernardo. Os grandes amores da minha vida, muito obrigada pelo enorme amor, apoio, carinho e paciência que sempre tiveram comigo. Obrigada por acreditarem em mim quando eu não acreditei. Amo vocês demais!

Ao meu namorado: Túlio. Muito obrigada por me acalmar nos dias difíceis e me mostrar que logo tudo iria se ajeitar.

Ao meu cachorro: Thor, que foi o personagem principal de muitas conversas com meus amigos de trabalho. Ser recebida com tanto amor e lambeijos sempre tornou meus dias melhores.

Aos meus familiares, Tio Pedro, Tio Egídio e Tia Sônia pela ajuda de sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Arno Wulff pela oportunidade de realizar o presente trabalho, por ter me acolhido no FUNDECITRUS, pela paciência, disposição e conhecimentos a mim concedidos durante esses anos. Seu profissionalismo e inteligência são uma inspiração para mim.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto por ter colaborado conosco durante todos esses anos, além de estar sempre presente para me motivar e passar seus valiosos conhecimentos. Sua inteligência, personalidade e amor pela pesquisa e ciência são uma inspiração para mim.

Aos meus grandes amigos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - UNESP: Gabi, Nai, Greg e Faulller. Muito obrigada por sempre ouvirem meus desabafos e ajudarem em tudo que precisava, especialmente pelos cafés da tarde e idas aos barzinhos. Vocês foram essenciais nessa caminhada. Vocês são muito, muuito queridos!!

Às minhas amigas queridas do FUNDECITRUS: Josi, Monica, Michele, Helo Tati, Tami. Cada troca de experiência que tivemos me fez uma profissional e uma pessoa mais completa e mais feliz. Obrigada, girls, pelos cafezinhos e barzinhos onde vivemos tantos momentos gostosos. Ter vocês nos meus dias é maravilhoso!

Ao amigo Jaci, que sempre me ajudou muito e me incentivou nessa caminhada. Muito obrigada pela amizade! Você é uma inspiração de pessoa, cientista e profissional.

À amiga Elaine, que sempre me ajudou muito no Laboratório, dando seus 'pitacos de excelência' para sempre melhorar os resultados obtidos e dar conselhos da vida. Muito obrigada pela parceria!

À Prof. Dr. Eliane, que organizava os Seminários Internos do FUNDECITRUS. Os temas eram muito produtivos e enriqueceram muito meus conhecimentos. Obrigada pela generosidade.

Ao Prof. Dr. Franklin Behlau, que sempre me ajudou muito na condução dos experimentos e sempre que pode, me ajudou com muitos conselhos ou estratégias científicas. Obrigada pela generosidade.

Ao Prof. Dr. Juan Cifuentes que me ajudou a conduzir os ensaios de ontogenia e sempre esclareceu todas as minhas variadas dúvidas, rsrs. Muito obrigada pela paciência e amizade!

Muito obrigada a todos os pesquisadores do FUNDECITRUS: Monica Alves, Eliane Localli, Renato Bassanezi, Marcelo Miranda, Geraldo Silva, Eduardo Girardi, Silvio

Lopes, Haroldo Volpe, Juan Cifuentes e Rodrigo Fachini. Obrigada por sempre me ensinarem tanto e confiarem em mim.

Aos técnicos do FUNDECIRUS: Alf, Jean, Sidnei, Deividson, Dani. Muito obrigada por todas as amostras que vocês processaram e analisaram para mim, quando eu já estava sem tempo para analisar. Parabéns por serem profissionais tão dedicados.

À Talita e Mateuzinho: muito obrigada por cada ajuda na coleta dos materiais e preparo para novos experimentos. A ajuda de vocês sempre foi um misto de muito trabalho e ótima companhia.

Aos amigos do Lab. de Ecotoxicologia e Química Comportamental do FUNDECITRUS: muito obrigada Tati, Rejane, Michele, Éder e Haroldo por disponibilizarem as salas para que eu pudesse conduzir alguns experimentos. A ajuda de vocês foi essencial.

Aos amigos da salinha de pós-docs, Isabela, Rafaelle, Wellington, Deived e Fernando. Muito obrigada pelas trocas de ideias e conversas.

Aos funcionários da estufa do FUNDECITRUS: Rogerinho, Zé Luiz e Miguel, Eliabe e Anélio. Muito obrigada por cuidarem tão bem das minhas plantinhas. Ao André, por toda organização das estufas, facilitando muito nosso trabalho.

Às funcionárias da limpeza FUNDECITRUS: Jozi e Jane, muito obrigada por toda ajuda e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial da UNESP de Rio Claro.

Aos professores Henrique Ferreira, Elliot Kitajima e ao pós-doc Crusca: muito obrigada pelo apoio com os experimentos conduzidos.

Às minhas amigas de infância e da vida Cat, Vivi, Lalis, Gabi por todo apoio e por acompanharem de perto essa ‘saga do doutorado da Bia’. Vocês são maravilhosas e me conhecem como ninguém.

A todos os funcionários da Seção Técnica da Pós Graduação – IQ, UNESP, especialmente à Maria Isabel Uhtman, Pedro Pedro e Wennia Limonti. Ao funcionário do STAEPE, Jardel Sotrotti, que me ajudou muito no momento da defesa do doutorado.

A todos os funcionários do Administrativo e RH do FUNDECITRUS.

Ao FUNDECITRUS, pela oportunidade e disponibilidade de uso dos Laboratórios. Foi uma oportunidade profissional muito importante. Com certeza aprendi demais nessa vivência no ‘mundo corporativo’, como eu gostava de falar.

Ao FUNDECITRUS e FUNDAG pelos financiamentos dos Congressos Científicos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Para pequenas criaturas como nós,
a vastidão é suportável somente através do amor.
(*Carl Sagan*)

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de laranja-doce do mundo. Apesar da contribuição do setor para a economia nacional, fatores bióticos acometem o cinturão citrícola brasileiro, impactando diretamente na viabilidade do setor. Entre as doenças bacterianas que afetam as laranjeiras-doces destacam-se o cancro cítrico causado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o Huanglongbing (HLB) associado à *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las). Hoje a principal alternativa ao controle químico do cancro cítrico trata-se da aplicação de produtos à base de cobre como medida protetiva, o qual traz risco de seleção de estirpes resistentes ao cobre, além de ser um metal pesado que pode acumular no solo. O manejo do HLB envolve a aplicação de inseticidas para controlar o psilídeo *Diaphorina citri*, inseto vetor das bactérias, e a erradicação de plantas sintomáticas. Entretanto, não há forma de controle direto da bactéria e a incidência do HLB vem aumentando ao longo dos anos, no Brasil. O objetivo do projeto foi testar peptídeos com potencial atividade antibiótica frente as bactérias *Xanthomonas citri* (Xcc) e *Liberibacter crescens* (Lcr), uma espécie cultivável em meio de cultura e filogeneticamente próxima à Las, no cultivo *in vitro*. Neste trabalho, sete peptídeos foram obtidos por síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e identificados por espectrometria de massa *ion-trap*. Em ensaios *in vitro*, os peptídeos Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 tiveram ação antibiótica sobre Xcc e Lcr em concentrações abaixo de 12,5 $\mu mol.L^{-1}$. Ensaios hemolíticos mostraram que Gr01 apresentou atividade hemolítica somente em concentrações peptídicas superiores a 50 $\mu mol.L^{-1}$ contra eritrócitos humanos. Estudos com miméticos de membrana demonstraram que Gr01, Guavanin-2 e K13 atuam promovendo a lise da membrana bacteriana, enquanto Lin3 possui mecanismo de ação distinto. Para Xcc, Gr01 e K13 apresentaram atividade protetiva em experimentos *in planta*, sendo capazes de controlar até 87 e 75%, respectivamente, do desenvolvimento da bactéria. Para Las, plantas aspergidas com BP178, K13 e HLB01 apresentaram 10, 10 e 10% de incidência de plantas positivas para HLB após 332 dias da exposição aos insetos infectivos com Las, enquanto o controle apresentou incidência de 60% de plantas positivas para a doença. A indução da expressão de genes relacionados a ativação do sistema de defesa vegetal por meio das vias do AJ e AS foi avaliada: em plantas sadias, Gr01, Guavanin-2, HLB01, HLB02 e Lin3 foram os peptídeos que mais induziram a expressão de NPR1, BSMT1, PR2 e , LOX

com distinção nos tempos avaliados. Para plantas infectadas com Las, BP178, HLB01, HLB02 e K13 induziram maiores valores de expressão dos genes NPR1, PR2 e LOX. Os resultados obtidos evidenciam o potencial uso e aplicação biotecnológica de moléculas peptídicas para o desenvolvimento de novas terapias contra fitopatógenos e atividade eliciadora do sistema de defesa vegetal em citros.

Palavras-chave: Fitopatologia, cancro cítrico, antimicrobianos, peptídeos, ácido salicílico.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sweet oranges in the world. Despite the contribution to the national economy, biotic factors have been affecting the Brazilian citrus belt, directly impacting the sector's viability. Among the bacterial diseases that affect sweet orange trees, citrus cancer caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and Huanglongbing (HLB) associated with *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) stands out. Today, the main alternative to chemical control of citrus canker is the application of insoluble copper-based products as a protective measure, which poses a risk of selecting copper-resistant strains, in addition to being a heavy metal that can accumulate in the soil. HLB management involves the application of insecticides to control the psyllid *Diaphorina citri,* the disease vector, and eradication of diseased plants. However, there is no way to directly control the bacteria and the incidence of HLB has increased over the years. The main purpose of the project was to evaluate peptides with potential antibiotic activity against *Xanthomonas citri* (Xcc) and *Liberibacter crescens* (Lcr), a cultivable strain and phylogenetically close to Las, in *in vitro* assays. In this work, seven peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis (SPFS), purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC-RP) and identified by ion-trap mass spectrometry. In *in vitro* antibiotic assays, Gr01, Guavanin-2, K13 and Lin3 acted on Xcc and Lcr at concentrations below 12.5 $\mu mol.L^{-1}$. Hemolytical assays showed that Gr01 presented hemolytic activity only at peptide concentrations greater than 50 $\mu mol.L^{-1}$ against human erythrocytes. Studies with membrane mimetics demonstrated that Gr01, Guavanin-2 and K13 act by promoting bacterial membrane lysis, while Lin3 has a distinct mechanism of action. For Xcc, Gr01 and K13 showed protective activity, being able to control up to 87 and 75%, respectively, of the bacteria's development *in planta*. For Las, plants sprayed with BP178, K13 and HLB01 showed 10, 10 and 10% incidence of HLB-positive plants after 332 days of exposure to Las-infected insects, while the negative control showed a 60% incidence of HLB-positive plants. The induction of gene expression related to the activation of the plant defense system through AJ and AS pathways was evaluated: for healthy plants, Gr01, Guavanin-2, HLB01, HLB02 and Lin3 were the peptides that most induced the expression of NPR1, BSMT1, PR2 and LOX at the different times evaluated. For plants infected with Las, BP178, HLB01, HLB02 and K13 induced higher expression values of the NPR1, PR2 and LOX genes at the evaluated times. The results obtained are promising and highlight the potential use and

biotechnological application of peptide molecules for the development of new antibiotics against phytopathogens and eliciting activity of the plant defense system.

Keywords: Phytopathology, citrus canker, antimicrobials, peptides, salicylic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1. Aminoácidos

Ala (A) - alanina

Arg (R) - arginina

Asp (D) - ácido aspártico

Gln (Q) – glutamina

Gly (G) - glicina

His (H) - histidina

Ile (I) - isoleucina

Leu (L) - leucina

Lys (K) - lisina

Met (M) - metionina

Phe (F) - fenilalanina

Pro (P) - prolina

Ser (S) - serina

Thr (T) - treonina

Trp (W) - triptofano

Tyr (Y) - tirosina

Val (V) - Valina

2. Outras terminologias

ACES - ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanossulfónico

ACN - acetonitrila

ACP- psilídeo asiático dos citros; do inglês: '*Asian citrus psyllid*'

ACP Las+ - psilídeo infectado com *Candidatus* Liberibacter asiaticus

ACP Las- - psilídeo sadio para *Candidatus* Liberibacter asiaticus

AJ – ácido jasmônico

AS – ácido salicílico

ASM – acibenzolar-S-metílico

ATCC – do inglês *'American Type Culture Collection'*

BLAST - ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local

Boc - t-Butiloxicarbonila

cDNA - fita de DNA complementar

CF – carboxifluoresceína

CIM - concentração inibitória mínima

CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

Ct - do inglês 'Cicle threshold', ou ciclo limiar

CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio

$D.O._{600nm}$ - densidade óptica a 600 nm

DAA – dias após a aplicação

DAI - dias após a inoculação

DAMPs – padrões moleculares associados aos danos (do inglês *damage-associated molecular patterns*)

DCM - diclorometano

DIC - N,N'- diisopropilcarbodiimida

DMF - dimetilformamida

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNAse - Enzima que hidrolisa o DNA

dNTPs - desoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

FDA - Administração de Comidas e Remédios dos EUA, do inglês '*Food and Drugs Administration'*

Fmoc - 9-fluorenilmetiloxicarbonila

Fmoc-AA - 9-fluorenilmetiloxicarbonila-aminoácido

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura

GUV - vesícula unilamelar gigante

HLB - Huanglongbing

HOBt - N-hidroxibenzotriazol

LB - meio de cultivo Luria-Bertani

LUV - vesícula unilamelar grande

MAMPs – padrões moleculares associados ao microrganismo (do inglês '*microrganis-associates molecular patterns*')

MLV - vesícula multilamelar

ORF - fase de leitura aberta (do inglês *'open reading frame'*)

PAMs - peptídeos antimicrobianos

PAMPs – padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês '*pathogen-associated molecular patterns')*

PBS – tampão fosfato-salino

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês '*polymerase chain reaction'*)

PIB - Produto Interno Bruto

POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)

POPE - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

Primer – do inglês "iniciador" ou oligonucleotídeo

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real associado a enzima transcriptase reversa

RNA - ácido ribonucleico

Seedlings – plantulas 'pé franco' de laranjeira

SPFS – síntese de peptídeos em fase sólida

SUV - vesícula unilamelar pequena

*t*Bu - *terc*-butílicos

TFA - ácido trifluoroacético

TNM-FH – meio de cultivo comercial para crescimento de insetos, rico em L-aminoácidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos representativos para os mecanismos de ação de peptídeos membranolíticos. A) Modelo Poro-Barril. B) Modelo Poro-Toroidal. C) Modelo carpete 38
Figura 2. Rota biossintética de ativação da produção de ácido jasmônico em plantas . 42
Figura 3. Rota biossintética de ativação da produção do ácido salicílico em plantas ... 44
Figura 4. Esquema dos estágios de brotação das plantas de *Citrus sinensis* no decorrer do experimento de expressão gênica. A: plantas em estágio V3, 1 dia após a aspersão dos peptídeos [100 μmol.L^{-1}]; B: plantas em estágio V4, 3 dias após a aspersão dos peptídeos, C: plantas em estágio V5, 7 dias após a aspersão dos peptídeos, D: plantas em estágio V6, 15 dias após a aspersão dos peptídeos. 56
Figura 5. Esquema das aplicações de peptídeos e datas para coleta de material foliar para ensaios de expressão gênica (EG) e detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus por qPCR nas plântulas de laranja doce. 61
Figura 6. Esquema das aplicações do peptídeo K13, inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) por psilídeos e detecção de Las (qPCR) por qPCR em mudas de laranja 63
Figura 7. Perfis de absorbância para os peptídeos A) Guavanin-2, B) Gr01, C) BP143, D) MdPep3, E) Lin3, F) K13 obtidos após purificação via cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica. Condições da análise: coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 μm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 mL.min^{-1} e detecção a 220 nm (azul) e 280 nm (vermelho). 67
Figura 8. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo Citrusina III antes (A) e após (B) a etapa de ciclização. Condições de purificação: coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL.min^{-1} e detecção a 220 nm. 70
Figura 9. Espectros de massas do peptídeo Citrusina III A) antes e B) após a ciclização 70
Figura 10. Perfil de liberação de carboxifluoresceína por meio da permeabilização de vesículas unilamelares grandes (LUVs) contendo POPE/POPC (3:1) pelos peptídeos Gr01 (preto), K13 (cinza), Guavanin-2 (laranja) e Lin3 (amarelo) na concentração de 5

µmol.L^{-1}. No tempo de 1 minuto foi acrescido o peptídeo na concentração teste ao sistema constituído pelo tampão PBS 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2) e vesículas. Aos 5 min foi adicionado o Triton x-100 (1%) 73

Figura 11. Micrografias da morfologia da bactéria Lcr após exposição aos peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 [100 µmol.L^{-1}], sob força de aceleração de 200Kv no microscópio eletrônico de transmissão. C-: controle negativo. 74

Figura 12. A) Redução da severidade de sintomas de cancro cítrico em folhas de 'Pera' x 'Cravo' após tratamento com solução aquosa dos peptídeos Gr01, Lin-3, Guavanin-2 e K-13 (100 µmol.L^{-1}) e cobre (0,6 g.L^{-1} cobre metálico) em relação aos sintomas desenvolvidos nas plantas sem tratamentos (porcentagem média de redução no número de lesões/cm^2, seguida de erro padrão da média de 10 folhas/planta). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tuckey (P<0,05).B) Comparação visual das lesões desenvolvidas após 35 dias de experimento. 75

Figura 13. Nível de expressão do gene A) NPR1, B) BSMT1, C) PR2, D) LOX em plantas de 'Valencia' x 'Cravo' tratadas com os peptídeos [100 µmol.L^{-1}] BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 e [16 µmol.L^{-1}] para os peptídeos HLB01 e HLB02 nos tempos de 1, 3, 7 e 15 dias após a aspersão (DAA). A expressão gênica relativa foi analisada por RT-qPCR usando o método ΔΔCt e normalizada com os endógenos Actina e GAPC2. Controle negativo: plantas de 'Valencia' x 'Cravo' tratadas com água, controle positivo: plantas de 'Valencia' x 'Cravo' tratadas com indutor de genes de defesa comercial. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, avaliados pelo teste de Tuckey (P< 0,05)..... 77

Figura 14. Nível de expressão do gene A) NPR1, B) BSMT1, C) PR2, D) LOX em plântulas de laranja doce 'Pera' tratados com os peptídeos [100 µmol.L^{-1}] BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 e [16 µmol.L^{-1}] dos peptídeos HLB01 e HLB02 nos tempos de 6 e 22 dias após a inoculação de Las via psilídeo. A expressão relativa foi analisada por RT-qPCR usando o método ΔΔCt e normalizada com os endógenos Actina e GAPC2. Controle negativo (Água): plântulas de 'Pera' tratadas com água e expostos aos psilídeos infectivos; controle positivo (ASM): plântulas de 'Pera' tratadas com indutor de sistema de defesa vegetal comecial; sadio: plântulas de 'Pera' expostos aos psilídeos sadios. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, avaliados pelo teste de Tuckey (P<0,05). 79

Figura 15. Progressão de plantas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) com tratadas com peptídeos previamente à inoculação por *D. citri.* Porcentagem de plantas com a presença de Las nos períodos amostrais, aspergidos com os peptídeos (**A**) Guavanin-2, Gr01, Lin3, K13 e (**B**) BP178, HLB01 e HLB 02 e controle positivo da infecção (água). ASM foi utilizado como indutor de expressão gênica. **C**. Título de Las (Log_{10} ± erro padrão de células de Las.g^{-1} de tecido fresco, transformados a partir dos valores de Ct) nos períodos amostrais. BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 foram aspergidos nas plântulas de 'Pera' na concentração de 100 µmol.L^{-1}, enquanto os peptídeos HLB01 e HLB02 foram aspergidos na concentração de 16 µmol.L^{-1}..... 81

Figura 16. Progressão de plantas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) com tratamentos com peptídeos previamente à inoculação por *D. citri*. (**A)** Porcentagem de plantas com a presença de Las nos períodos amostrais, aspergidos com o peptídeo K13, ASM utilizado como indutor de expressão gênica e controle positivo da infecção (água). (**B**) Título de Las (Log_{10} ± erro padrão de células de Las.g^{-1} de tecido fresco, transformados a partir dos valores de *Ct*) nos períodos amostrais de plantas tratadas com K13 (concentração de 175 µmol.L^{-1}), ASM (0,8 g.L^{-1}) e controle de infecção (água). . 82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estrutura primária dos peptídeos sintetizados 50
Quadro 2. Especificações do crescimento celular de *Escherichia coli*, *Liberibacter crescens* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 51
Quadro 3. Genes das vias biossintéticas dos ácidos salicílico e jasmônico selecionados para análises de expressão 59
Quadro 4. Ontogenia do segundo fluxo dos brotos de 'Valencia' x 'Cravo' após a aspersão de água (controle negativo). Parâmetros avaliados: estágio vegetativo e comprimento (cm) do broto 83
Quadro 5. Ontogenia do segundo fluxo dos brotos de 'Valencia' x 'cravo' após a aspersão do peptídeo K13 [100 µmol.L^{-1}]. Parâmetros avaliados: estágio vegetativo e comprimento (cm) do broto 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Razão massa molecular/carga (g.mol^{-1}) teórica calculada para a peptídeos BP143, Gr01, Guavanin-2, Lin3, MdPep3 69
Tabela 2. Razão massa molecular/carga (g.mol^{-1}) teórica calculada para o peptídeo cíclico Citrusina III antes e após a etapa de ciclização 70
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) em μmol.L $^{-1}$ dos peptídeos Guavanin-2, Gr01, BP143, K13, MdPep3, Lin3 e Citrusina III..... 71
Tabela 4. Atividade hemolítica dos peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 nas células de eritrócitos humanos. Controle negativo: Triton-X100 (1% v/v)..... 72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 30
1.1. A citricultura brasileira 30
1.2 Huanglongbing (HLB) 30
1.3 Cancro cítrico 33
1.4 Peptídeos antimicrobianos 34
1.5 Mecanismo de ação dos peptídeos 37
1.6 Sistema bioquímico de defesa vegetal 38
1.7 Indução da resistência e efeito *priming* – uma abordagem peptídica 39
1.8 Via de biossíntese do ácido jasmônico (AJ) 41
1.9 Via de biossíntese do ácido salicílico (AS) 42
1.10 Situação atual do emprego de peptídeos em produção de larga escala e perspectivas para o setor da citricultura 44
2. OBJETIVOS 47
2.1 Objetivo geral 47
2.2 Objetivos específicos 47
3. MATERIAL E MÉTODOS 48
3.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos 48
3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de peptídeos frente a bactérias 51
3.4 Determinação do potencial hemolítico dos peptídeos 53
3.5 Determinação do potencial lítico dos peptídeos 54
3.5.1 Experimento com miméticos de membrana por meio do vazamento da carboxifluoresceína 54
3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão– MET 55
3.6 Indução por peptídeos da expressão gênica nas vias do ácido salicílico e ácido jasmônico 56
3.6.1 Extração do RNA total de folhas de *Citrus sinensis* **57**
3.6.2 Tratamento das amostras de RNA com DNAse e síntese do DNA complementar (cDNA) **57**
3.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real para avaliar a expressão gênica (RT-qPCR) **58**
3.7 Efeito protetivo de peptídeos contra cancro cítrico em plantas em condição de casa de vegetação 59

3.8 Detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus em plantas em condição de casa de vegetação tratadas com os peptídeos antibióticos..... 60

3.8.1 Criação de *D. citri* em plantas de citros infectadas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus..... **60**

3.8.2 Inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus com *D. citri* em citros pulverizados com peptídeos: detecção de Las e expressão gênica nas vias do ácido salicílico e jasmônico (Experimento 1). **60**

3.8.3 Inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus com *D. citri* em citros pulverizados com o peptídeo K13: detecção de Las (Experimento 2). **62**

3.8.4 Efeito do peptídeo K13 na ontogenia de laranjeiras **63**

3.9 Extração de DNA de folhas de *Citrus sinensis* e *D. citri* 64

3.10 qPCR para detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus 65

4. RESULTADOS 67

4.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos 67

4.1.1 Peptídeos lineares **67**

4.1.2 Peptídeos cíclicos..... **69**

4.2. Atividade antibiótica dos peptídeos – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 71

4.3 Atividade hemolítica dos peptídeos 72

4.4 Interação dos peptídeos com miméticos de membrana..... 72

4.5 Morfologia bacteriana após exposição aos peptídeos 73

4.6 Atividade protetiva dos peptídeos frente ao desenvolvimento de cancro cítrico por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em casa de vegetação 74

4.7 Expressão gênica do sistema de defesa em citros pela aplicação dos peptídeos....76

4.8. Aplicação dos peptídeos e inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus com *D. citri*: expressão gênica do sistema de defesa e detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus..... 78

4.9 Ontogenia de plantas de *Citrus sinensis* tratadas com K13 82

5. DISCUSSÃO 84

6. CONCLUSÕES..... 101

REFERÊNCIAS 103

1. INTRODUÇÃO

1.1. A citricultura brasileira

O suco de laranja é uma das mais importantes *comodities* do Brasil (NEVES, 2016). O cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro, concentra a maior região produtora de laranja e exportadora de suco do Brasil e do mundo. Fatores como o desenvolvimento industrial, a proximidade com os portos e centros de pesquisa contribuíram para o desenvolvimento da atividade nesta região. Em menores proporções, outros estados como Bahia, Minas Gerais, Pará, Paraná e Rio Grande do Sul contribuem para o agronegócio dos citros com a produção de laranjas, tangerinas e lima ácida Tahiti (FUNDECITRUS, 2023b; LOPES et al., 2011; NEVES; TROMBIN, 2017).

De acordo com o inventário do número de árvores de citros, realizado em 2022/23 pela Pesquisa de Estimativa de Safra (PES do FUNDECITRUS), o parque citrícola está presente numa área de 461,92 hectares composto por 86% de laranjas, 11% de limas ácidas e limões e 3% de tangerinas perfazendo um total de 199,31 milhões de árvores. A safra de laranja 2022/2023 totalizou 314,21 milhões de caixas de 40,8 kg (12,82 milhões de toneladas), e o destino industrial representa 3/4 da exportação mundial do suco concentrado da fruta (FUNDECITRUS, 2023). O Brasil é o segundo maior produtor de frutas cítricas, com uma produção anual média de 19 milhões de toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020).

Mesmo ocupando a liderança mundial no ranking da exportação de laranja doce, a citricultura brasileira tem enfrentado problemas, ocasionados por fatores climáticos, fitopatológicos e mercadológicos impactando diretamente na produção e no lucro obtido com as safras (CONAB, 2013). Entre os variados problemas fitopatológicos que acometem a citricultura no Brasil, destaca-se o cancro cítrico, a leprose, a pinta preta dos citros e o huanglongbing (HLB).

1.2 Huanglongbing (HLB)

O Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening*, é a doença mais devastadora da citricultura na atualidade, foi detectado no Brasil em 2004 e nos EUA em 2005 (HALBERT et al., 2005; BOVÉ, 2006; GOTWALD et al., 2007). Na Flórida (EUA), devido aos danos causados pela doença, a produtividade dos pomares afetados

caiu cerca de 72%, entre o curto espaço de tempo de 2007 e 2018 (DALA-PAULA et al., 2019).

As bactérias associadas ao HLB são transmitidas entre plantas cítricas pelo psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera : Psylloidea : Diaphorininae), inseto vetor de *Ca*. L. asiaticus (Las) (BURKHARDT et al., 2021; CAPOOR et al., 1967; CHEN et al., 1973) e *Ca*. L. americanus (YAMAMOTO et al., 2006) e por *Trioza erytreae* Del Guercio (Hemiptera: Triozidae), inseto vetor de *Candidatus* Liberibacter africanus (MCCLEAN e OBERHOLZER, 1965).

No Brasil, *Diaphorina citri (D. citri)* é o inseto-vetor responsável pela disseminação das bactérias. Ao se alimentar do floema da planta infectada o inseto adquire a bactéria e a transmite para outras plantas após o período de latência. No psilídeo, a colonização da bactéria é sistêmica (AMMAR et al., 2014). Nas plantas suscetíveis, as bactérias se desenvolvem de maneira sistêmica no floema. Os principais sintomas causados pelo HLB são deficiência de micronutrientes, frutos com tamanhos reduzidos e assimétricos, abortamento de sementes, coloração assimétrica das folhas (mosqueado), redução do número de radicelas e queda acentuada de folhas. (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007). Frutos provenientes de árvores sintomáticas são menores, mais ácidos, com menores níveis de ºBRIX e menos favoráveis para o consumo *in natura* (BASSANEZI et al., 2009).

As bactérias associadas ao HLB são *Candidatus* Liberibacter africanus (Laf), *Candidatus* L. asiaticus (Las) e *Candidatus* L. americanus (Lam) (BOVÉ, 2006), que apresentam um genoma pequeno (em média 1,2 Mpb) e fazem parte da família *Rhizobiaceae* (DUAN et al., 2009; WULFF, et al., 2014). Entre estas, a bactéria mais frequentemente associada ao Huanglongbing no Brasil, nas américas e na Ásia é Las. Estas bactérias não podem ser cultivadas axenicamente, o que dificulta a prospecção de produtos capazes de interferir no seu metabolismo (MERFA et al., 2019). Contudo, a bactéria *Liberibacter crescens* (Lcr), isolada de *"mountain papaya"*, filogeneticamente próxima às demais *Candidatus* Liberibacter spp., pode ser cultivada axenicamente *in vitro* (LEONARD et al., 2012), sendo a única bactéria que apresenta tal característica. Apesar de não ser patogênica e não ter insetos vetores conhecidos, Lcr tem se mostrado útil por ter seu genoma de 1,5 Mpb completamente sequenciado, abrindo assim perspectivas para estudos funcionais neste grupo de bactérias (JAIN et al., 2015; JAIN et al., 2018; MERFA et al., 2019).

Os fatores que mais dificultam o controle e aceleram a dispersão do HLB são o tempo decorrente entre a inoculação da bactéria e a manifestação dos primeiros sintomas foliares e a dificuldade em conter a alta disseminação e proliferação do inseto vetor (FUNDECITRUS, 2020). Como medida de supressão da doença é recomendado o manejo regional do HLB e de *D. citri* somado às medidas individuais adotadas pelos citricultores: utilizar mudas sadias de viveiros certificados, realizar a inspeção de plantas doentes e a erradicação de plantas sintomáticas e o monitoramento e controle de *D. citri*.

O controle do vetor por meio do uso de inseticidas se destaca por ser a opção mais eficiente e viável para o controle de HLB até o momento. O uso em larga escala de inseticidas gera um acúmulo de custos ao produto, uma vez que sua aplicação gira em torno de R$ 480 e R$ 2400 reais por hectare (LI et al., 2020).

Além disso, a intensificação da aplicação de inseticidas também está relacionada ao fenômeno de seleção resistência que os insetos podem desenvolver em relação ao modo de ação do produto constantemente aplicado. Há evidências de populações de psílideos com elevado nível de resistência ao imidaclopride e thiamethoxam, ambos da classe dos neonicotinóides (NAAEM et al., 2019) e moderada resistência à bifentrina, da classe dos piretróides (TIAM et al., 2018).

Apesar do manejo, no Brasil, a incidência da doença continua aumentando: em 2022 cerca de 24,22% de plantas estavam sintomáticas para a doença, e em 2023 esse número atingiu o recorde de 38,06%, com aproximadamente 77,22 milhões de árvores doentes do total de 202,88 milhões de laranjeiras (FUNDECITRUS, 2023).

Somada à dificuldade do manejo do HLB, é sabido que as espécies e cultivares comerciais são suscetíveis ao HLB, o que dificulta o uso de estratégias para o melhoramento genético clássico de cítricos (ALVES et al, 2021). Assim, torna-se interessante estudar modelos alternativos capazes de controlar ou mitigar o desenvolvimento da bactéria na planta por meio de alternativas sustentáveis e eficientes. Neste contexto, a prospecção de novas moléculas com atividade antimicrobiana, baixa toxicidade, facilidade de escalonamento da produção e facilidade de manipulação vem ganhando evidência nas pesquisas como alvo no controle do desenvolvimento das bactérias associadas ao *greening* (HUANG et al., 2021, MONTESINOS et al., 2021). Com o advento das técnicas de síntese peptídica, desenho racional de peptídeos e DNA recombinante, a

busca por sequências peptídicas com atividade antimicrobiana frente a Lcr e, indiretamente, frente a Las, se tornou alvo de pesquisas e estudos na área.

1.3 Cancro cítrico

O cancro cítrico é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). Essa doença foi inicialmente detectada na Ásia e atualmente ocorre de forma endêmica em alguns os países produtores de laranja (FERENCE et al., 2018). Os frutos afetados pela bactéria podem cair prematuramente e levam à redução de produtividade das plantas. Além disso, as lesões ocasionadas pela bactéria depreciam a qualidade dos frutos para o mercado *in natura* e restringem a comercialização em áreas livres da doença (MARIN et al., 2019).

Nos pomares, a infecção se dá após a penetração da bactéria por meio das aberturas naturais da planta (estômatos), ferimentos causados pelos equipamentos, abrasão e insetos, principalmente o minador dos citros. Entre os sintomas de cancro cítrico mais frequentes destaca-se a presença de lesões nas folhas, sendo que as folhas jovens são mais suscetíveis; e frutos com pontuações salientes e marrons acompanhados por halo amarelado (BEHLAU, BELASQUE, 2014). Por se tratar de uma infecção localizada e não sistêmica, os sintomas ocasionados pela infecção não levam à morte da laranjeira, no entanto, o estresse biótico gerado altera o rendimento e produção da planta.

Por um longo período, a erradicação das plantas doentes foi a principal estratégia de controle da doença, contudo essa medida tornou-se menos praticada nas últimas décadas. Até o presente momento, não existem produtos com atividade curativa contra a doença. O manejo integrado da doença trata-se de 1) uso de plantas quebra-vento, que reduzem a dispersão da bactéria e a criação de ferimentos provocados pelo vento, o que leva à diminuição da infecção; 2) controle da larva minadora dos citros, reduzindo uma possibilidade de porta de entrada da bactéria para o espaço mesofílico das folhas e 3) pulverização de cobre como controle químico em pomares como forma de proteção das folhas para a chegada da bactéria. Segundo Behlau e colaboradores (2021), a aplicação de cobre é a medida de controle químico mais empregada para o controle de doenças bacterianas não sistêmicas. Como trata-se de uma medida protetiva, a aplicação do cobre deve ser frequente (a cada 14-21 dias) para formar e manter uma camada de filme sobre os novos tecidos em expansão antes da chegada do patógeno (GOTTWALD, GRAHAM, 1992; BEHLAU et al., 2017; BEHLAU et al., 2020). A frequência, somada à altas

concentrações e volumes necessários para o controle levam à toxicidade para as folhas e raízes da planta, aumentando o estresse e diminuindo a produtividade vegetal (BEHLAU et al., 2020).

O mecanismo de ação das formulações à base de cobre (solúvel e insolúvel) ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que o cobre metálico (insolúvel) pode atuar formando uma barreira física que dificulta a penetração da bactéria nos tecidos suscetíveis de ramos, folhas e frutos e que o cobre na forma iônica e solúvel (Cu^{2+}) atua interferindo no metabolismo da síntese de ácidos nucleicos, proteínas, além de promover o rompimento da parede celular bacteriana, levando à morte por lise (BEHLAU et al., 2017). Considerando a baixa solubilidade do cobre metálico, tal condição leva ao aumento de concentração e da frequência de aplicação do produto, levando ao acúmulo de cobre no solo, lençol freático e sedimentos (VARYMPOPI et al., 2022). Além disso, as espécies de *Xanthomonas spp,* são notavelmente bem sucedidas no desenvolvimento de populações resistentes, uma vez que os genes de resistência ao cobre são conservados e podem ser transferidos horizontalmente para bactérias sensíveis através da conjugação (BEHLAU et al., 2012; BEHLAU et al., 2020; VARYMPOPI et al., 2022).

A busca pelo desenvolvimento de compostos alternativos e métodos mais eficientes no ataque de fitopatógenos é um alvo para pesquisas na área. Neste cenário, algumas alternativas ao cobre vêm sendo estudadas, como seria o caso dos óleos essenciais (ZAMUNER et al., 2023), produtos biológicos, como determinado por Dang et al (2019), onde bactérias endofíticas do gênero *Bacillus spp.* apresentaram atividade antibiótica frente à Xcc. Os peptídeos são macromoléculas que vêm se destacando para tal aplicação por serem compostos naturais muitas vezes encontrados na composição vegetal, com alta atividade antimicrobiana e facilmente produzidos com o advento das técnicas de DNA recombinante e síntese química de peptídeos.

1.4 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são macromoléculas compostas por aminoácidos e podem apresentar uma grande variedade estrutural. Essas macromoléculas compõem o sistema de defesa de primeira linha de muitas formas de vida, e podem ser encontrados em microrganismos, insetos e outros animais, plantas e até no homem (LORENZÓN, 2015).

O amplo espectro de atividade, a rápida ação microbicida, a possibilidade de ser utilizado em combinação com outros produtos de ação antibiótica, e a facilidade em estudar alterações e substituições de aminoácidos na sequência peptídica fazem com que os estudos com peptídeos antimicrobianos sejam cada vez comuns, evidenciando o alto potencial dessas moléculas (FJELL et al., 2012; SEO et al., 2012; WENZEL et al., 2014).

Na área da saúde, estas macromoléculas são tema de pesquisas biotecnológicas há anos (ALBERICIO, 2004; VERLANDER, 2002), e mais recentemente, vem ganhando espaço no meio agrícola, por serem consideradas uma alternativa aos pesticidas usados no controle de patógenos de plantas, inclusive àqueles que afetam os citrus (KISHI et al., 2018). Neste cenário, HUANG e colaboradores (2021), prospectaram um peptídeo com atividade antibiótica frente Las *in planta*, sendo esta, uma sequência proveniente de plantas filogeneticamente próxima ao gênero de *Citrus* spp. notadamente em *Microcitrus australasica*, e outras que apresentam resistência e/ou tolerância às bactérias associadas ao HLB. No mesmo âmbito, Merfa e colaboradores (2022) também desenvolveram sequências peptídicas com visando diminuir ou controlar o desenvolvimento de Las na planta e sua aquisição pelo psilídeo. Esses são trabalhos são promissores, porém requerem estudos mais aprofundados.

O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos pode ocorrer por meio da interferência nos processos biológicos vitais dos microrganismos, como a duplicação do DNA, alteração no mecanismo de respiração e/ou por meio da desestabilização da organização da membrana plasmática dos microrganismos, levando-os morte por lise celular.

Com o advento das técnicas de otimização *in silico* de peptídeos, por meio das estratégias de modelagem molecular, *docking* e dinâmica molecular, Porto e colaboradores (2018) desenharam Guavanin-2, uma sequência peptídica de tamanho reduzido e alta atividade bactericida seletiva às bactérias Gram-negativas, utilizando a sequência peptídica de Pg-Amp1, proveniente da goiabeira. No trabalho de Conceição (2018), a mesma estratégia de estudo foi adotada para desenvolver 6 sequências peptídicas análogas ao peptídeo Pantinin-3, proveniente do veneno de escorpião. Nesta situação, a troca pontual do aminoácido L-Leu pelo aminoácido L-Lys na 13ª posição da sequência, promoveu a redução de 93% da atividade hemolítica em relação ao peptídeo original e, ainda assim, sua atividade bactericida foi mantida.

Sequências peptídicas encriptadas com atividades antimicrobianas também foram descritas em *Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* e *Gossypium*

raimondii (RAMADA et al., 2017). Dentre os peptídeos obtidos no trabalho, Gr01 (*G. raimondii*), apresentou alta atividade tóxica às bactérias Gram+ e Gram- e baixa atividade hemolítica

Entre as técnicas que vem sendo utilizadas para a prospecção de novos antimicrobianos, as bibliotecas digitais que utilizam química combinatória e modelagem molecular ganharam evidência. Para identificar peptídeos com atividade inibitória específicos para microrganismos fitopatogênicos, foi desenvolvida a Biblioteca CECMELL11 (GUELL et al., 2011). Um estudo com um grupo de 31 undecapeptídeos derivados do peptídeo BP100, previamente otimizado (BADOSA et al., 2007), mostrou que o peptídeo BP145 apresentou maior capacidade bactericida contra microrganismos Gram negativos e menor atividade hemolítica, além de sofrer menos ação de proteases, uma vez que as análises foram procedidas da alteração do aminoácido L-Phe⁴ para o aminoácido D-Phe⁴ (GUELL, et al., 2011). Ainda não existem trabalhos em citricultura com biblioteca CECMELL11, o que abre a oportunidade para a presente pesquisa.

Os orbitídeos, peptídeos classificados como cíclicos e pequenos, são macromoléculas formadas por sequências de 2-12 L-aminoácidos, com alto teor de resíduos apolares, ativos contra um amplo espectro de microrganismos, especialmente fungos e bactérias (PINTO, 2013; RAMALHO et al., 2018). Entre as principais vantagens de trabalhar com peptídeos cíclicos, destaca-se sua alta estabilidade físico-química e baixa propensão à degradação enzimática, justamente por não terem exposição das extremidades C e N-terminais (PINTO, 2013). Devido a sua abundância e natureza conservada, acredita-se que estas moléculas são comumente encontradas no floema das plantas (MERI et al., 2013) com a finalidade de desempenhar um papel de defesa contra microrganismos invasores (PINTO et al., 2018; BRUNETT et al., 2018). Os orbitídeos foram identificados em plantas das famílias*:* Annonaceae, Caryophyllaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae e Rutaceae. Na família das Rutaceae, gênero *Citrus*, foram identificadas 13 sequências destes peptídeos (PINTO, 2013). Para a família das Rutaceae, o orbitídeo [1-8-NαC] -Zanriorb A1 denominado Citrusina IX, proveniente da espécie *Zanthoxylum* spp. apresentou ação antitumoral (BEIRIGO, et al., 2016). No entanto, ainda não existem informações sobre o potencial antibacteriano das moléculas provenientes de tal família e tampouco das sequências encontradas nas espécies de *Citrus* spp., o que desperta interesses em pesquisas biotecnológicas com tais moléculas. *Zanthoxylum rhoifolium* não é hospedeira do psilídeo *D. citri* e aparentemente Las não se multiplica neste hospedeiro, mesmo em inoculação por enxertia (FELISBERTO, 2018),

o que pode ser um efeito de defesa atrelado à presença de orbitídeos nesta planta ou de outros mecanismos que não permitem a colonização.

Os peptídeos provenientes de bibliotecas digitais (CECMELL11), orbitídeos, peptídeos encriptados e elicitores do sistema imune das plantas são moléculas com caráter anfipático. A anfipacidade permite que esses peptídeos, assim como qualquer peptídeo antimicrobiano (PAM), interajam favoravelmente com estruturas também compostas por lipídeos anfipáticos (MATSUZAKI, 1999; ZASLOFF, 2002), como seria o caso das membranas plasmáticas de Las e Lcr, compostas por fosfatidilcolina e lipopolissacarídeos (MERFA et al., 2017; WULFF et al., 2014). Além disso, sabe-se que os peptídeos propostos no trabalho são catiônicos, o que promove e facilita a interação com as bactérias, que, de maneira geral, apresentam a membrana plasmática carregada negativamente. Esta interação entre cargas e composição química dos peptídeos com a membrana plasmática bacteriana pode levar à formação de poros (do tipo carpete ou toroidal), o que leva tais organismos ao desequilíbrio osmótico e lise celular (RAMADA, et al., 2018).

Alguns trabalhos descritos recentemente na literatura já vislumbram a utilização de peptídeos como moléculas alternativas para o combate de Las no patossistema (HUANG., et al., 2021 e MERFA et al., 2022). Devido a facilidade de síntese desses materiais, bem como sua estabilidade físico-química em meio aquoso e alta atividade membranolítica específica para bactérias Gram-negativas, e a presença de peptídeos ativos no genoma de citros, essas macromoléculas se tornam atraentes para estratégias de transformação de plantas e manejo dos pomares frente às principais bactérias que causam doenças que acometem a citricultura. Assim, a presente proposta visa utilizar peptídeos com variados modos de ação (intracelular e atividade membranolítica) e avaliá-los frente às doenças cancro cítrico e *greening*.

1.5 Mecanismo de ação dos peptídeos

Alguns mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o processo de perturbação e desestabilização que os peptídeos causam nas membranas (Figura 1). A princípio estes peptídeos carregados positivamente são atraídos e interagem eletrostaticamente com as membranas bacterianas, originariamente aniônicas, onde sofrem mudanças conformacionais, adotando uma estrutura em α-hélice anfipática. Nesta etapa os peptídeos tem o eixo da hélice orientado paralelamente à bicamada (YEAMAN; YOUNT, 2003; ANDERSSON et al., 2016; SUN et al., 2016). Posteriormente, estes

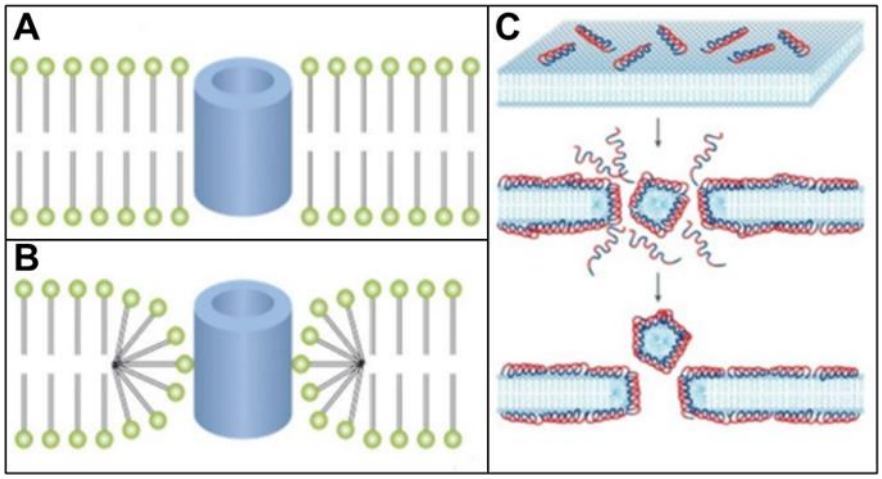
peptídeos podem promover a perturbação da membrana, que pode ocorrer por meio de um dos três modelos conhecidos:

Modelo barril: ocorre a interação da face apolar do peptídeo com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, enquanto que a face polar fica voltada para o interior do poro, em contato com o citoplasma.

Modelo toroidal: a face apolar do peptídeo passa a interagir com as cabeças polares da membrana lipídica do microrganismo.

Modelo carpete: os peptídeos se acumulam na superfície da membrana alvo, cobrindo-a como se fosse um carpete. Quando esse acúmulo de peptídeos atinge uma alta concentração ocorre a formação de agregados micelares e a permeabilização da membrana microbiana, muito similar à de um detergente.

Figura 1. Modelos representativos para os mecanismos de ação de peptídeos membranolíticos. A) Modelo Poro-Barril. B) Modelo Poro-Toroidal. C) Modelo carpete



Fonte: Modificado de BROGDEN, 2005.

1.6 Sistema bioquímico de defesa vegetal

A indução de resistência é uma alternativa para o controle de patógenos, e se dá pela ativação de mecanismos de defesa latentes da planta. Esses mecanismos, por sua vez, passam a ser naturalmente expressos após a exposição a elicitores bióticos ou abióticos (AMORIM & PASCHOLATI, 2018). Assim que a planta reconhece “padrões moleculares associados à patógenos/microrganismos/danos (bióticos e abióticos, etc)” (PAMPs/MAMPs/DAMPs), ela passa a reagir às tentativas de colonização por um patógeno virulento. Esse estágio de reconhecimento vegetal é também chamado de “estado de indução”, ou “sensibilização” (KRETZSCHMAR et al., 1997). Seguindo esse

comportamento, existem genes que são responsáveis por reconhecer os PAMPs/MAMPs no momento inicial da infecção, e são denominados “receptores de reconhecimento de padrões” (PRRs), sendo classificados como uma via de resistência qualitativa. Este reconhecimento é considerado um evento rápido e inicial, que provoca a ativação de vários genes vegetais por fatores de transcrição, semelhante a um efeito “em cascata” (PASCHOLATI et al., 2008). Em geral, as plantas reconhecem os PAMPs/MAMPs/DAMPs por meio de dois modelos: 1) uma determinada molécula do patógeno de encaixa no receptor da planta e, havendo o encaixe, o sistema de defesa vegetal é acionado; 2) a planta detecta algum sinal bioquímico alterado com a presença ou ataque do patógeno.

Se a planta não foi capaz de realizar o reconhecimento inicial, uma ativação tardia pode controlar a infecção causada pelo patógeno, sendo realizada pelos “genes-R”. Esse mecanismo é chamado resistência quantitativa, ou resistência adaptativa-específica. Os “genes-R” reconhecem as moléculas efetoras, que são codificadas por genes de virulência e secretadas pela fitopatógeno. Como consequência dessa resistência quantitativa, disparada pelos efetores, as plantas passam a tornar o ambiente vegetal inóspito para o desenvolvimento do microrganismo, liberando as espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou provocando a hipersensibilidade (AMORIM e PASCHOLATI, 2018).

1.7 Indução da resistência e efeito *priming* – uma abordagem peptídica

Segundo Amorim e Pascholati (2018), o reconhecimento dos PAMPs/MAMPs pode sinalizar a indução da resistência. Existem dois tipos de resistência induzida: resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI). A RSA é sinalizada através da via da biossíntese do ácido salicílico (AS) e de proteínas PR (como as quitinases e glucanases), enquanto a RSI é sinalizada pelos hormônios ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) e está associada à potencialização da expressão de genes regulados por estes hormônios.

Dentre essas vias de indução de resistência, existe o fenômeno *priming*, que é reconhecido como um estado de pré-condicionamento ou sensibilização da planta, uma forma de deixar a planta “em estado de alerta” e preparada para ativar seus mecanismos de defesa de maneira mais rápida e eficiente quando desafiadas por estresses bióticos e abióticos. Estudos relacionados à ativação desse fenômeno vêm ganhando destaque para

o desenvolvimento de novas estratégias no controle de doenças vegetais (AMORIM e PASCHOLATI, 2018; MONSTESINOS et al., 2021).

Os indutores de defesa vegetal são vistos como estratégias complementares que podem ter efeito retardando ou inibindo o desenvolvimento do microrganismo alvo. Os indutores artificiais são capazes de ativar as vias de defesa RSA e RSI antes da chegada do patógeno, provocando assim, o efeito *priming* na planta (CARAVACA-FUENTES, et al., 2021). Atualmente existem produtos químicos comerciais classificados como indutores artificiais de defesa vegetal, como exemplo, o acybenzolar-S-metílico (nome comercial BION 500W®). Trata-se de um composto sintético análogo ao ácido salicílico e tem função semelhante na via de transdução do sinal que leva à RSA (BAYZAL et al., 2003). Para laranjeiras foram publicados trabalhos que demonstram a eficiência da ativação do sistema de defesa em plantas infectadas com Las (DAROLT, et al., 2020), especialmente demonstrada pela superexpressão de genes relacionados às vias dos ácidos salicílico e jasmônico.

No contexto do patossistema do HLB, torna-se interessante estudar os mecanismos de regulação da defesa vegetal, bem como, buscar moléculas capazes de induzir artificialmente o efeito *priming* em citros, uma vez que a literatura aponta que o crescimento de Las nas plantas e o desenvolvimento da doença está diretamente relacionada com a modulação do sistema imunológico da planta (MA et al., 2022).

Peptídeos também foram descritos para atuar como elicitores de defesa em plantas (ZHANG et al., 2019; MALIK et al., 2020), pois desencadeiam a resposta imune em vias complexas reguladas por moléculas sinalizadoras como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ), etileno (ET) e ácido abscísico (ABA) (DERKSEN et al., 2013; MUR et al., 2013; LIEVENS et al., 2017; LI et al., 2019). Isso pode provocar uma resposta sistêmica em toda a planta.

PEP’s são uma classe de peptídeos elicitores endógenos e se tratam de sequências encriptadas da extremidade C-terminal de proteínas precursoras da sinalização do sistema de defesa vegetal, constituídas de 20-23 aminoácidos. No trabalho de Ruiz e colaboradores (2018), os peptídeos PdPep1 e MdPep3, codificados no genoma de diferentes espécies de Rosaceae, apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* e aumentaram a resistência das plantas quando expostas à *Xanthomonas arboricola*,

bactéria Gram- que ataca *Prunus spp*. (Rosaceae)., abrindo perspectivas para trabalhos com fitopatógenos de culturas economicamente importantes

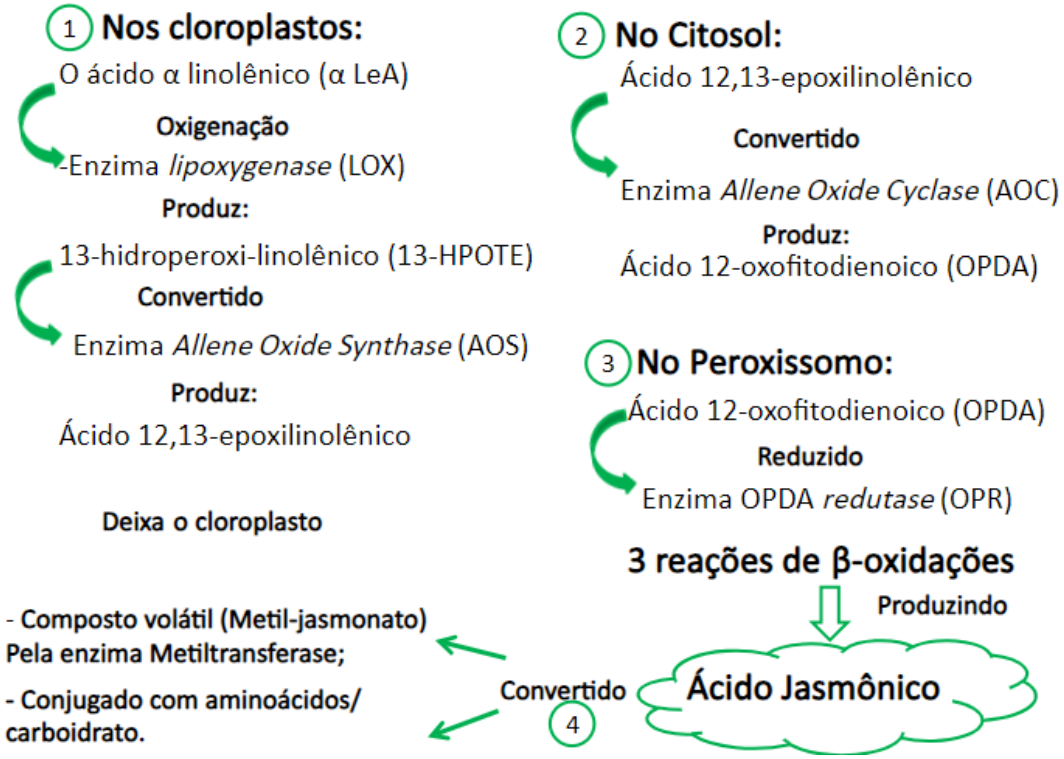
Há relatos da dualidade na função dos peptídeos antimicrobianos: os peptídeos MaSamp (HUANG et al., 2021) e BP178 (MONTESINOS et al., 2022) podem atuar como elicitores do sistema vegetal em laranjeiras e em amendoeiras, respectivamente, e também apresentam propriedade antibacteriana. Essa perspectiva abre caminhos para estudos no campo da biotecnologia, que relacionam a atividade eliciadora do sistema vegetal provocada por peptídeos que apresentam atividade antibiótica definida.

1.8 Via de biossíntese do ácido jasmônico (AJ)

Ácido jasmônico, metil-jasmonatos (aromático e volátil) e jasmonoil-isoleucina encontram-se largamente distribuídos em tecidos de plantas (STUMPF e CONN, 1981). O aumento na quantidade de transcritos da via do ácido jasmônico tem sido detectado em plantas durante ou após uma variedade de estresses, incluindo ataques por insetos, infecção por patógenos necrotróficos e em processos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento, senescência, armazenamento temporário de nitrogênio e biossíntese de moléculas regulatórias (HILDEBRAND et al., 1989; CREELMAN e MULLET, 1997; FEUSSNER et al., 1995)

Nos cloroplastos o ácido alfa linolênico sofre uma oxigenação pela enzima lipoxigenase (LOX), levando a produção de 13-hidroperoxi-linolênico (13-HPOTE). Esse produto será convertido, pela enzima alene oxido-sintase (AOS) em ácido 12,13-epoxilinolênico, composto instável que será oxidado pela aleno óxido ciclase (AOC) e levará a produção do ácido 12-oxofitodienóico (OPDA). No peroxissomo, o OPDA será reduzido pela enzima OPDA redutase (OPR). Após 3 reações de beta-oxidação, será produzido o ácido jasmônico. O AJ pode ir para a via do Me-JA, ou ainda, se conjugar a um aminoácido (Isoleucina), formando o jasmonoil-Ile. No contexto do HLB, monitorar a expressão da via do AJ é imprescindível, uma vez que plantas expostas ao inseto *D. citri* apresentam alta expressão de jasmonatos (KILLINY e NEHELA, 2017; ZEIER 2013; SHIVAJI et al. 2010).

Figura 2. Rota biossintética de ativação da produção de ácido jasmônico em plantas



Fonte: Modificado de Oliveira, 2015 e Secatto, 2013.

1.9 Via de biossíntese do ácido salicílico (AS)

O ácido salicílico é um produto natural que age como sinalizador nas plantas, principalmente na defesa contra microrganismos hemibiotróficos e o acúmulo desse composto nos tecidos das plantas induz a resistência sistêmica adquirida (SAR). Trata-se de um composto fenólico sintetizado pelas plantas, contendo um anel aromático e um grupo hidroxila (DEMPSEY et al., 2011). O AS é produzido no cloroplasto e transportado sistemicamente para o floema, sua biossíntese é conhecida como 'Via do ácido Chiquímico' (EBEL., 1986; NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT, 1992) e está ligada às vias biossintéticas da fenilalanina amônia liase (PAL) e do isocorismato (ICS) (CHEN et al. 2009; WILDERMUTH et al. 2001). Entre os sinalizadores químicos que indicam RSA, o AS é considerado um dos mais importantes, por induzir a síntese das *pathogenesis proteins* (PR proteínas) (DEMPSEY et al., 2011; TOUNEKTI et al., 2013).

A via do isocorismato, responsável pela maior parte da produção do AS, ainda continua incerta. Acredita-se que ainda no cloroplasto, ocorre a ativação de *isochorismate synthase* (ICS), que em conjunto com *isochorismate pyruvate synthase* (IPL) é

responsável pela conversão do isocorismato em ácido salicílico. Um gene chave na via do AS é o *non-expressor of pathogenesis-relate genes-1* (NPR1), que regula diretamente a produção de ICS. O excesso de produção de AS (que pode ser tóxico para a planta) resulta na deoligomerização de NPR1 e sua translocação para o núcleo, onde suprime a produção de ICS (ZHANG et al., 2019).

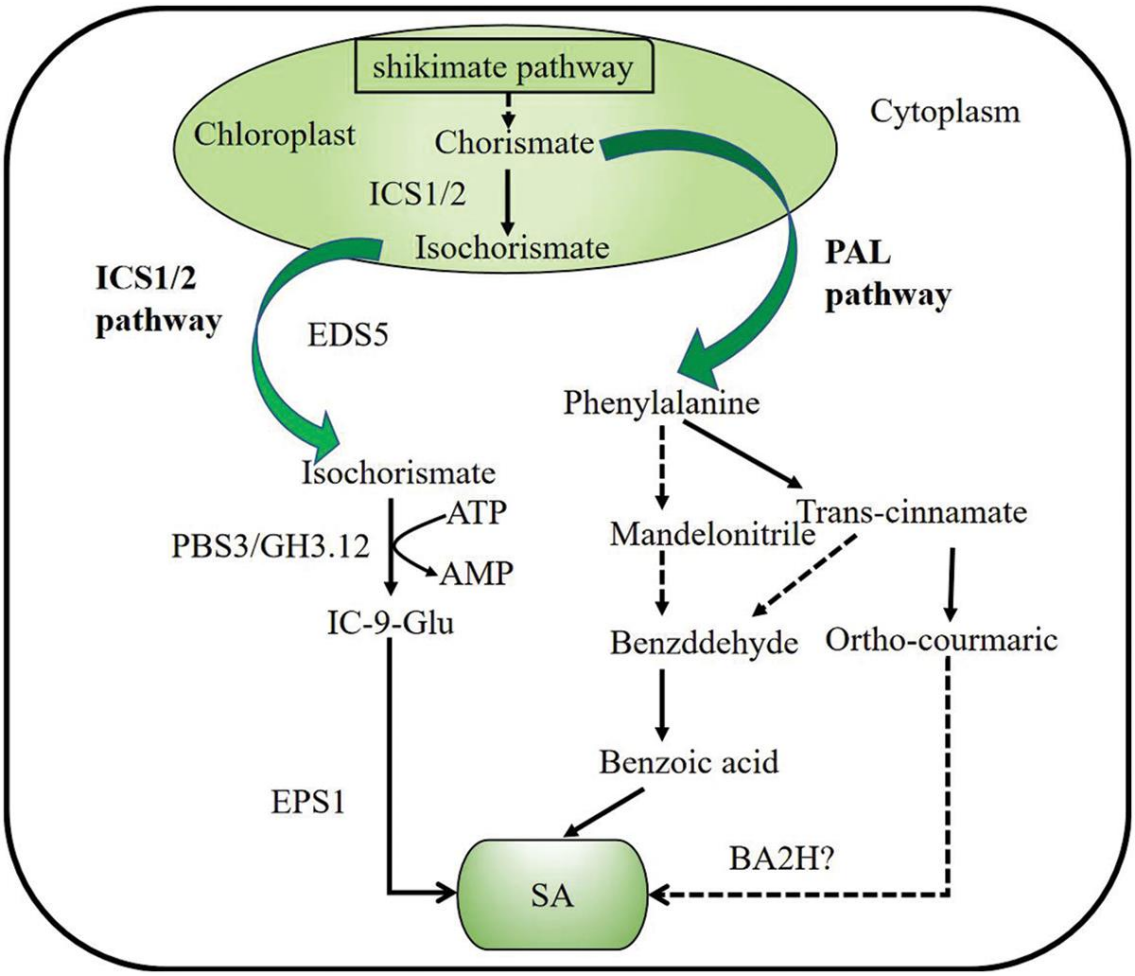
O ácido salicílico ainda pode existir na forma de diferentes conjugados formados pela sulfonatação, hidroxilação, glicosilação, metilação e também por sua conjugação com aminoácidos. Algumas dessas modificações permitem que grandes quantidades de AS sejam armazenadas no vacúolo das plantas. Na metilação, um dos processos mais recorrentes, o AS é convertido a metil salicilato (Me-SA) por metil-transferases (DEMPSEY et al., 2011; CHEN et al., 2003). Esse processo é mediado pelo gene relacionado a produção de ácido-benzóico-caboxil metil-transferase I (BSMT1) (DEMPSEY et al., 2011). Esse gene também está relacionado à biossíntese de AJ (ATTARAN et al., 2009).

Os PR-genes da família PR1, PR2 e PR5 também são conhecidos por serem ativados como resposta à produção de ácido salicílico. As "PR proteínas" estão relacionadas à família das 1,3-β-glucanases, enzimas induzidas à expressão principalmente em plantas infectadas por fitopatógenos como fungos, bactérias e vírus (PIETERSE et al., 1996). A presença da 1,3-β-glucanase é essencial nos estágios iniciais e avançados das infecções e também está relacionada a produção de hidrolases, enzimas que dificultam o desenvolvimento de patógenos (BRAGA, 2008) e as classifica como marcadores de SAR.

Trabalhos anteriores determinam que o genoma de *Candidatus* Liberibacter spp contém um gene putativo para a SA-hidroxilase (CLABASIA_00255) (DUAN et al., 2009; WULFF et al., 2014) , também presente no genoma de variadas fitobactérias, como *Agrobacterium* spp., *Rhizobium* spp., *Burkolderia* spp (LI et al., 2017). Na caracterização funcional do gene, WANG e PAKAJ (2013); LI et al (2017) determinaram que ele está relacionado a produção da enzima salicilato hidroxilase (SahA), capaz de hidrolisar o ácido salicílico produzido pela via do isocorismato e convertê-lo em catecol, composto orgânico, também conhecido como benzenodiol, que apresenta similiaridade com a estrutura molecular do AS, porém não tem efeito indutor do sistema de defesa vegetal. A explicação mais provável para esse fenômeno é que as bactérias (Las) induzem alterações no metabolismo do hospedeiro em benefício próprio (KIM, et al., 2009; SUH, et al., 2018)

e por isso, estudar moléculas indutoras do sistema de defesa de *Citrus sinensis* ganhou evidência como uma possível estratégia para mitigar os efeitos do HLB nas plantas.

Figura 3. Rota biossintética de ativação da produção do ácido salicílico em plantas



Fonte: Modificado de Hu et al., 2022.

1.10 Situação atual do emprego de peptídeos em produção de larga escala e perspectivas para o setor da citricultura

Diversas alternativas de produtos químicos já foram propostas no combate do Cancro cítrico e controle do Huanglongbing visando um manejo mais eficiente e uma agricultura mais sustentável, propondo a diminuição drástica da quantidade e frequência de aplicação de produtos á base de cobre e inseticidas químicos, contudo nenhuma estratégia foi eficiente. Os peptídeos antimicrobianos são conhecidos como agentes eficientes na inibição de bactérias (BULLET et al., 2004), células tumorais, sinalizadores do sistema imunológico de insetos, mamíferos e plantas (LI et al., 2021). Os peptídeos antimicrobianos podem ser divididos em antivirais, antibacterianos, antifúngicos e

peptídeos antiparasitários (JENSSEN,et al., 2020). Os peptídeos antibacterianos podem ter alvo intracelular, semelhante aos antibióticos tradicionais, que atuam interrompendo reações metabólicas e o crescimento celular, como também, podem ser mais modernos e apresentar alvo membranolítico, causando a lise celular. A segunda classe de peptídeos antibióticos descrita apresenta grande interesse devido à baixa probabilidade de seleção ou indução do surgimento de bactérias resistentes a esses agentes, pois para este caso, as bactérias necessitariam passar por diversos eventos de mutações genéticas para alterar todos os componentes do alvo (LEE et al., 2019; ZASLOFF, 2019). Por esse motivo, os peptídeos antimicrobianos membranolíticos têm sido cada vez mais estudados e avaliados como uma alternativa para a produção de novas drogas.

No âmbito da saúde humana, os peptídeos vêm sendo amplamente empregados em terapias antivirais e antitumorais, sendo o princípio ativo dos medicamentos Abarelix, Bivalirudin, Bleomycin, Calcitonin, Cetrorelix, Corticotropin, Cosyntropin, Cyclosporine, Daptomycin, Desmopressin, Enfurvirtide, Eptifibatide, recentemente aprovados pela Administração de Comidas e Remédios dos EUA (FDA) e já disponíveis em farmácias ao redor do mundo (CHEN et al., 2020). Ainda, outras sete sequências peptídicas já foram aprovadas pela mesma agência internacional, para uso no mercado alimentício ou em desenvolvimento de fármacos para uso clínico, sendo uma tendência cada vez maior o desenvolvimento e aplicação desses peptídeos nas mais diversas áreas (DATTA e ROY, 2021; LI et al., 2021).

Nas perspectivas agrícolas, existem algumas empresas que vêm trabalhando diretamente com o uso de peptídeos para o controle de doenças, como podemos citar a Vismax©, Invaio Sciences©, PeptideBio©, visando aplicações inclusive, para a citricultura. Até o presente momento, o único peptídeo utilizado em campo apresenta atividade inseticida frente a lepidópteros e lagartas, recebe o nome comercial de Spear LEP® e é comercializado pela empresa inglesa Vestaron©.

Os peptídeos são macromoléculas que podem ser utilizadas para técnicas de transformação genética de plantas, podem ser adaptados em vários tipos de formulações, como os microgéis, nanoencapsulações, ou ainda, podem ser fusionados a outros peptídeos de ancoragem, permitindo a fixação desses 'conjugados' em folhas e outros tecidos vegetais conforme proposto por Dilarri (2021), possibilitando uma liberação prolongada. Essas modificações relacionadas ao modo de liberação e de formulação do produto visam uma maior interação da macromolécula com o patógeno, ou ainda, reduzir

a degradação do peptídeo por fatores bióticos, evitar o efeito da lixiviação, que poderia ser um problema para essa classe de produtos. Desta forma, pensando na versatilidade das aplicações peptídicas, o presente trabalho teve como meta a seleção de peptídeos antimicrobianos para o potencial manejo, controle e proteção de plantas cítricas frente às doenças Cancro cítrico e Huanglongbing. A primeira abordagem foi a seleção de peptídeos antibióticos com diferentes alvos (intracelular e membranolítico) para propor qual estratégia seria mais eficiente no combate das bactérias. A segunda proposta vislumbrou avaliar a atividade eliciadora do sistema de defesa vegetal induzida por meio da aspersão dessas macromoléculas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Propor peptídeos com atividade protetiva frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em plantas sob condição de casa de vegetação e com atividade protetiva e eliciadora do sistema de defesa vegetal frente à *Candidatus* Liberibacter asiaticus em plantas sob condição de casa de vegetação.

2.2 Objetivos específicos

i) Selecionar e sintetizar sequências peptídicas de interesse, empregando a metodologia da fase sólida; purificar e identificar os peptídeos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas;

ii) Avaliar em meio de cultura a atividade antibiótica dos peptídeos em *Escherichia coli, Liberibacter crescens* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*;

iii) Determinar o modo de ação dos peptídeos antibacterianos por meio de estudos com microscopia eletrônica de transmissão e análise miméticos de membrana;

iv) Avaliar o efeito da pulverização dos peptídeos em mudas de laranja-doce, frente à infecção por *Candidatus* Liberibacter asiaticus e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*;

v) Determinar a atividade elicitora de defesa vegetal dos peptídeos em laranjeiras infectadas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos

Os peptídeos lineares e os cíclicos (Quadro 1) foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (STEWART & YOUNG, 1984; AMBLARD et al., 2005), de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α-amino grupos, e derivados *terc*-butílicos para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN & WHITE, 2000). As resinas de partida foram Rink-Amida para peptídeos lineares ou Wang para peptídeos cíclicos, e as etapas de acoplamento foram direcionadas com agentes de condensação, por meio de reações com duração de 2 horas. A desproteção dos grupos α-amínicos foi realizada empregando-se uma solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF, com tempo de exposição de 20 minutos. Nos peptídeos BP143, Citrusina III, Gr01, Guavanin-2 e MdPep3, foi introduzida uma metionina N-terminal à sequência original. Pensando nas futuras aplicações dos peptídeos para a expressão e transformação de plantas, optou-se por acoplar às sequências peptídicas encriptadas de proteínas, o aminoácido metionina (M) às extremidades N-terrminal, que codifica o início da tradução celular, mimetizando com mais propriedade a molécula que seria produzida via expressão gênica vegetal. Para algumas sequências, não houve adição da M à extremidade N-terminal da sequência peptídica (Quadro 1). A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). A acetilação das sequências peptídicas, foi feita com anidrido acético, por 30 minutos.

A síntese dos peptídeos BP143, Gr01, Guavanin-2, Lin-3, K-13, MdPep3 e foi desenvolvida seguindo os protocolos básicos da Síntese Peptídica em Fase Sólida partindo-se de 0,7g de uma resina Rink Amida MBHA de grau de substituição 0,55 $mmol.g^{-1}$, a qual foi utilizada para produzir peptídeos com um grupamento amida na extremidade C-terminal, após a clivagem final. Para a síntese do peptídeo MdPep3 foi realizada a etapa de acetilação dos resíduos da extremidade N-terminal empregando anidrido acético e N,N'- diisopropilcarbodiimida em dimetilformamida. O uso da resina Rink Amida MBHA e o procedimento de acetilação realizado para MdPep3 foram necessários para mimetizar as ligações peptídicas nestas regiões, visto que nestes peptídeos, os resíduos das extremidades C- e N-terminais correspondem a resíduos internos e conservados de sequências proteicas (BARBOSA, 2012).

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada utilizando ácido trifluoroacético (94,5%), água deionizada (2,5%), etanoditiol (2,5%) e triisopropilsilano (0,5%), a 25ºC por 3 horas. Peptídeos denominados brutos foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados seis vezes, sob força de agitação de 3000 x *g*, durante 5 minutos solubilizados em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizados.

A purificação dos peptídeos lineares BP143, Gr01, Guavanin-2, K13 foi feita por cromatografia liquida alta eficiência (Shimadzu) em coluna de fase reversa Jupiter Phenomenex C_{18} (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 30-60% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, com fluxo de 2,5 mL/min e detecção a 220 nm (azul) e 280 nm (vermelho) para resíduos cromóforos. Os peptídeos lineares MdPep3 e Lin3 foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu) em coluna de fase reversa Jupiter Phenomenex C_{18} (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 20-50% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, com fluxo de 2,5 mL/min e detecção a 220 nm (azul) e 280 nm (vermelho) para resíduos cromóforos. A caracterização dos produtos após purificação foi feita utilizando um espectrômetro de massas *íon trap* 3D modelo AmaZon SL (Bruker) acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS) empregando o modo de ionização positivo (ES-MS positivo). Para comparação das massas peptídicas téoricas em relação às massas obtidas com a síntese em fase sólida, foram utilizados os softwares *Phyre2* e *PepCalc*.

Para a síntese em fase sólida do peptídeo cíclico Citrusina III partiu-se de 0,7g de uma resina Wang-Ser(tBu) de grau de substituição de 0,37 $mmol.g^{-1}$, a qual foi utilizada para produzir peptídeos com um grupamento amina na extremidade C-terminal após a etapa de clivagem, permitindo assim a ciclização "cabeça-cauda". A clivagem de Citrusina III foi procedida utilizando ácido trifluoroacético (94,5%), água deionizada (2,5%), etanoditiol (2,5%) e triisopropilsilano (0,5%), a 25ºC por 3 horas. Peptídeos denominados brutos foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados seis vezes sob força de agitação de 3000 x *g*, durante 5 minutos dissolvidos, em solução aquosa de ácido acético 10% e liofilizados.

Com o peptídeo Citrusina III linear purificado (63 mg), o processo de ciclização do peptídeo foi realizado em sucessivas bateladas, partindo de quantidades reduzidas de peptídeo, 5 mg do peptídeo linear em cada etapa, para favorecer a ciclização. O processo

de ciclização química dos orbitídeos foi realizado em solução diluída com dimetilformamida (0,001 mol.L^{-1}), contendo 1,5 equivalentes de fosfato de hexafluor 2-(1H- benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametilurônio (HBTU) e 2 equivalentes de N-etildiisopropilamina (DIEA) sob agitação por 2 horas. Ao final do processo, foi obtido 21,4 mg de peptídeo Citrusina III cíclico.

A purificação do peptídeo Citrusina III foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu), usando uma coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C_{18} (250 x 10 mm; 10µm; 300 Å) com um gradiente linear de 35-65% de componente orgânico (acetonitrila; água; 0,036% TFA), em 90 minutos, com fluxo de 2,5 mL/min e detecção a 220 nm (azul). A caracterização dos produtos após purificação foi feita utilizando um espectrômetro de massas *íon trap* 3D modelo AmaZon SL (Bruker) acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS) empregando o modo de ionização positivo (ES-MS positivo). Para comparação das massas peptídicas téoricas em relação às massas obtidas com a síntese em fase sólida, foram utilizados os softwares *Phyre2* e *PepCalc*.

Os peptídeos BP178, PreHLB01 e PreHLB02 (os dois últimos com sequências ocultadas) foram doados pelo Prof. Dr. Emilio Seguí Montesinos, da Universidade de Girona (UdG) – Espanha, como colaboração dentro do projeto Europeu Pre-HLB - *Preventing HLB epidemics for ensuring citrus survival in Europe*, projeto financiado pelo programa *European Union's Horizon 2020* (No 817526) e do qual o FUNDECITRUS é colaborador. O método de produção selecionado também foi a síntese química em fase sólida. Para garantir a pureza de 95%, o material também foi identificado por Espectrometria de Massas – ESI e purificado por HPLC de fase reversa.

Quadro 1. Estrutura primária dos peptídeos sintetizados

Nome	Origem	Sequência	Referência
BP143*	Biblioteca	H_3N^+-MKKLFKKILKYL-$CONH_2$	Guell et al., 2011
BP178**	Biblioteca	H_3N^+-KKLFKKILKYLAGPAGIGKFLHSAK-KDEL-OH	Montesinos, 2017
Citrusina III	*Citrus natsudaidai*	ciclo(MPLLPYGS)	Matsubara et al., 1991
Gr01	*Gossypium raimondii*	H_3N^+-MGFKLGRKLVKVFKWII-$CONH_2$	Ramada et al., 2017
Guavanin-2	*Psidium guajava*	H_3N^+-MRQYMRQIEQALRYGYRISRR-$CONH_2$	Porto et al., 2018
K13	*Scorpion venon*	H_3N^+-XXX-$CONH_2$	Crusca et al. (no prelo)
Lin3	Biblioteca	H_3N^+-WRWYCRCK-$CONH_2$	Rocha, 2018

MdPep3	*Mallus domestica*	Acetil-MQRGIVCAENPPLSTGSGGQIN-$CONH_2$	Ruiz et al., 2018
HLB-01**	Biblioteca	XXX	Montesinos, 2022
HLB-02**	Biblioteca	XXX	Montesinos, 2022

*O aminoácido sublinhado corresponde ao D-aminoácido; ** peptídeos recebidos da colaboração com Universidade de Girona (UdG).

3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de peptídeos frente a bactérias

A avaliação da atividade antibacteriana dos peptídeos foi realizada com *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Liberibacter crescens BT-1* e *Xanthomonas citri* subs. *citri* nos meios LB, BM7 e NA, respectivamente e conforme condições de crescimento descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Especificações do crescimento celular de *Escherichia coli*, *Liberibacter crescens* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Meio de cultivo	***Escherichia coli***	***Liberibacter crescens***	***Xanthomonas citri* subsp. *citri***
	LB	**BM7**	**NA**
Composição (1L)	10g bacto-triptona 5g extrato de levedura 15g glicose 10g cloreto de sódio	550mL solução A* 300mL TNM-FH** 150mL Soro Bovino Fetal (Hyclone)	3g extrato de carne 5g peptona 5g cloreto de sódio
Condições de incubação	24 horas/37 °C	5 dias/28 °C	48 horas/28 °C
Referência	Bertani, L. 1951	Fagen et al., 2012; Fagen et al., 2014	Zachowski e Rudolph., 1988

*Solução A (1L): 3.64g de ácido α-cetoglutárico, 18,20g de ACES, 6,85g de KOH, pH=6,9, ** TNM-FH (IM008, Himedia): meio comercial para cultivo de insetos, rico em L-aminoácidos.

A atividade de inibição foi determinada pela técnica de diluição seriada em microplacas de 96 poços (Corning, CLS3603) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2006). Os testes foram realizados em duplicata técnica (dois poços por diluição/peptídeo/bactéria) e triplicata biológica. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico ciprofloxacina (80 $\mu mol.L^{-1}$) (Sigma-N1628). Como controle negativo foi utilizado o meio de cultivo + suspensão bacteriana diluída com meio de cultivo adequado.

As soluções peptídicas foram padronizadas pela massa (g) com auxílio de uma balança analítica (para peptídeos sem resíduos cromóforos na sequência peptídica) e via

espectrofotometria com λ_{280nm} para peptídeos com resíduos cromóforos (triptofano ou tirosina na sequência peptídica), solubilizados em água destilada e armazenados em -20ºC. Para determinar a concentração da solução estoque usa-se a Equação 1:

Equação 1. Padronização da concentração dos peptídeos

$$A = \varepsilon.b.c$$

A= absorção pelo espectrofotômetro (U.A.), ε = coeficiente de extinção molar ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$), b = caminho ótimo (cm), c = concentração ($mol.L^{-1}$).

Os ensaios consistiram na incubação de uma cultura de *E. coli* em meio LB em um Erlenmeyer de 125 mL e acondicionadas em um shaker a 37ºC, 180 rpm pelo período de 24 h. As culturas bacterianas foram padronizadas com o auxílio de um espectrofotômetro ajustado no comprimento de onda de 600 nm, estando as leituras entre 0,08 e 0,10 unidades arbitrárias (U.A.). Posteriormente, as suspensões foram diluídas (1:10) em meio LB, obtendo-se uma concentração de 1,0 x 10^7 $ufc.mL^{-1}$, a qual foi utilizada nos ensaios.

Inicialmente foi adicionado em cada poço da placa 80 µL de meio de cultivo LB, e posteriormente 100 µL dos peptídeos previamente padronizados em 450 $\mu mol.L^{-1}$ no poço com maior concentração peptídica. Foi procedida então a diluição seriada das amostras nos poços B até H, com 100 µL de solução por toda a respectiva coluna, de maneira a obter um gradiente de concentrações peptídicas decrescente. Na última diluição preparada, foram removidos 100 µL da diluição meio+peptídeo. Ao final, foi adicionado em todos os poços 20 µL da suspensão bacteriana, totalizando um volume final de 100 µL em cada poço da microplaca. Foram preparadas desta forma 8 diluições seriadas, nas concentrações de 3,12 $\mu mol.L^{-1}$ a 200 $\mu mol.L^{-1}$.

Para Xcc, a cultura bacteriana foi crescida em meio líquido NA em um Erlenmeyer de 250 mL e acondicionadas em um *shaker* a 28°C , 180 rpm por 48 horas. Em seguida, a cultura foi padronizada com o auxílio de um espectrofotômetro ajustado no comprimento de onda de 600 nm, e leituras entre 0,3 e 0,4 unidades arbitrárias (U.A.). Posteriormente, as suspensões foram diluídas (1:10) em meio NA, obtendo-se uma concentração de 1,0 x 10^7 $ufc.mL^{-1}$, a qual foi utilizada nos ensaios.

Para o teste na microplaca adicionou-se em todos os poços 180 µL de meio de cultivo NA, e posteriormente 200 µL dos peptídeos previamente padronizados em 422,2

μmol.L^{-1} no poço com maior concentração peptídica. Foi procedida a diluição seriada desses poços com 200 μL de solução em todos os poços da respectiva coluna, de maneira a obter um gradiente de concentrações peptídicas decrescente. Ao final, foi adicionado em todos os poços 20 μL da suspensão bacteriana padronizada, totalizando um volume final de 200 μL em cada poço da microplaca. Foram preparadas desta forma 8 diluições seriadas, nas concentrações de 3,12 μmol.L^{-1} a 200 μmol.L^{-1}.

Para Lcr, a cultura bacteriana foi crescida em meio líquido BM7 em um tubo falcon de 50 mL e acondicionada em um *shaker* a 28ºC, 200 rpm por 5 dias, até atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) entre 0,8 e 1 unidades arbitrárias (U.A.). Posteriormente pipetou-se em todos os poços 190 μL de meio cultivo BM7, e em seguida, 200 μL dos peptídeos previamente padronizados em 410,5 μmol.L^{-1} apenas nos poços da linha A (Figura 1). Após esse passo, foi precedida a diluição seriada com 200 μL de solução em todos os poços da respectiva coluna, de maneira a obter um gradiente de concentrações peptídicas decrescente. Ao final, foi adicionado em todos os poços 10 μL da suspensão bacteriana padronizada, totalizando um volume final de 200 μL em cada poço da microplaca. Foram preparadas desta forma 8 diluições seriadas, nas concentrações de 3,12 μmol.L^{-1} a 200 μmol.L^{-1}.

Após o período de incubação específico para cada espécie, a viabilidade celular foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), o qual consistem em adicionar em cada poço da microplaca, 30 μL do reagente resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) (Sigma, 62758-13-8) a 0,01%. Poços que mantém a coloração azul indicam ausência de crescimento celular, enquanto poços que apresentam a coloração rosa indicam crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A resazurina é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

3.4 Determinação do potencial hemolítico dos peptídeos

A metodologia usada para avaliação do teste hemolítico foi baseada em ONUMA et al (1999). Para a realização de tal experimento, o projeto foi previamente submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do

Campus de Araraquara da UNESP (CEP-FCF), sendo aprovado com o número CAAE: 61293316.4.0000.5426. Hemáceas humanas (O+) foram coletadas e lavadas três vezes em tampão fosfato, sendo padronizadas a 1% (v/v). Os peptídeos foram solubilizados em tampão PBS a 200; 100; 50; 25; 12,50, 6,25 e 3,12 μmol.L^{-1}. Alíquotas de 100 μL da suspensão de hemáceas e 100 μL da solução de peptídeos foram incubados a 37°C por 1 hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3000 x *g* por 2 min e 100 μL do sobrenadante foram colocados em placas de cultura celular de 96 poços.

Como controle positivo foi utilizado uma solução de Triton X-100 a 1% (v/v). O tampão fosfato foi utilizado como controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata para determinar a porcentagem de hemólise, conforme demonstrado na equação abaixo (ONUMA et al., 1999).

Equação 2. Porcentagem de Hemólise

$$\% \text{ Inibição de Atividade Hemolítica} = (A1/A0) \times 100$$

Em que: A1 representa a média das absorbâncias obtida para cada concentração de substância testada, já subtraída da absorção do controle negativo de hemólise. A0 representa a média das absorbâncias do controle positivo de hemólise, já subtraída da absorção do controle negativo de hemólise.

3.5 Determinação do potencial lítico dos peptídeos

3.5.1 Experimento com miméticos de membrana por meio do vazamento da carboxifluoresceína

O mecanismo de ação de peptídeos pode ser investigado *in vitro* com o auxílio de miméticos de membrana. Nessa perspectiva, estudos com bicamadas lipídicas ou lipossomas unilamelares, construídas a partir de lipídeos presentes na parede celular bacteriana tem sido amplamente explorados (LORENZÓN et al., 2015; CARRIJO, 2018).

Para mimetizar a parede celular de bactérias Gram negativas, os lipossomas foram compostos de fosfatidiletanolamina (POPE) e fosfatidilcolina (POPC) na proporção de 3:1 (v/v m/m) (MURZYN et al., 2005). Os lipídeos foram solubilizados em uma solução de clorofórmio:metanol (4:1) idem. O solvente foi evaporado com gás nitrogênio até formar um fino filme lipídico. Este filme foi acondicionado em dessecador *overnight* para a eliminação do solvente.Posteriormente o filme foi hidratado com a adição de uma solução de carboxifluoresceína (CF), [(80 mmol.L^{-1}) (Sigma® Life Science)], em tampão

Tris (0,01 M, pH 7,4) e NaCl (0,15 M) e submetidas a agitação via ultrassom Unique, USC-2850) e vórtex (GEHAKA, AV-1) por 5 minutos formando as vesículas multilamelares (MLVs). Para obter as vesículas unilamelares grandes (LUVs) e com homogeneidade de tamanho, as MLVs foram submetidas à um extrusor, contendo um filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Whatman Cyclopore PC).

A CF não incorporada às vesículas unilameres (LUVs) foi removida por meio da filtração em gel em uma coluna de Sephadex G50 (Amersham Biosciences, GE17-0573-02) estabilizada com Tris (0,01 mol.L^{-1}, pH 7,4) e NaCl 0,15 mol.L^{-1}. Para detecção e quantificação do conteúdo peptídico extravazado, foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência VARIAN Cary Eclipse programado com os comprimentos de onda específicos para a CF (492 nm para excitação e 517 nm para emissão). O valor de 100% de permeabilização foi obtido pela adição de Triton X-100 (1%), o qual provoca o rompimento das vesículas e a liberação da CF. O ensaio é realizado de forma cinética, após alcançar o primeiro minuto da análise, foi acrescido aos lipossomas, o peptídeo na concentração de 20 µmol.L^{-1}. Aos 5 minutos, foi adicionado o Triton X-100 para rompimento total das vesículas. Levando em consideração a instabilidade das vesículas, a suspensão de LUVs foi utilizada no mesmo dia do seu preparo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão– MET

Para inferir o modo de atuação dos peptídeos, a suspensão bacteriana de *Liberibacter crescens* BT-1, após exposição frente aos peptídeos com atividade antibiótica previamente estabelecidos no item 3.3, foram preparadas para a MET. Assim, o volume de solução presente nos poços da microplaca (aproximadamente 200 µL em cada poço) foi centrifugado à 5.000 x *g*, por 5 minutos, o *pellet* formado foi ressuspendido em 200 µL de tampão fosfato (0,1 mol.L^{-1}, pH 7,2) e centrifugado novamente, sob as mesmas condições descritas. Tal passo foi repetido 3 vezes para garantir a limpeza do *pellet* formado. O *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de glutaraldeído 2,5% (em tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1}, pH 7,2) overnight para a etapa de fixação das células.

Posteriormente, a suspensão foi centrifugada, o *pellet* formado foi ressuspendido em tampão fosfato (0,1 mol.L^{-1}, pH 7,2) e novamente centrifugado. Esse passo foi repetido 3 vezes para garantir a remoção do excesso de reagentes de fixação. Ao final das

3 lavagens, o *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de tampão fosfato (0,1 mol.L^{-1}, pH 7,2) e armazenado a 4ºC, overnight, para o ensaio de MET.

As suspensões bacterianas foram colocadas em uma grade de carbono, e em seguida, o excesso da amostra foi removido com o auxílio de um papel absorvente. Em seguida, 1 gota de solução aquosa de acetato de uranila 1% (v/v) foi adicionado para corar negativamente as bactérias presentes na solução. Depois de 1 minuto, o excesso de solução de acetato de uranila foi removido e a grade seca à temperatura ambiente. As análises foram submetidas ao microscópio eletrônico JEOL JEM-2100 LaB_6 com aceleração de 200kv. As imagens obtidas foram tratadas utilizando o Software ImageJ. O equipamento utilizado está localizado no Laboratório Multiusuário da USP de São Carlos – Instituto de Química.

3.6 Indução por peptídeos da expressão gênica nas vias do ácido salicílico e ácido jasmônico

Foram utilizadas plantas de laranja-doce 'Valencia' enxertada em limoeiro 'Cravo' com idade aproximada de 3 anos. As plantas foram podadas, alocadas em um ambiente com condições controladas, com fotoperíodo de 14 horas de iluminação e 10 horas de escuro, temperatura controlada de 28ºC. Nas plantas com brotos no estádio V3 (CIFUENTES et al., 2019), foram aspergidos os peptídeos em solução aquosa a 100 µmol.L^{-1} individualmente em cada planta, com aproximadamente 4 mL de solução peptídica para cada planta com auxílio de um borrifador. O desenho experimental consistiu em 4 repetições por tratamento, com amostragem nos tempos de 1, 3, 7 e 15 dias após a aspersão. Em cada período uma amostra de 0,5 mg de tecido vegetal de cada planta foi coletada, imediatamente congelada em nitrogênio líquido (N_2) e armazenada no freezer -80ºC.

Figura 4. Esquema dos estágios de brotação das plantas de *Citrus sinensis* no decorrer do experimento de expressão gênica. A: plantas em estágio V3, 1 dia após a aspersão dos peptídeos [100 µmol.L^{-1}]; B: plantas em estágio V4, 3 dias após a aspersão dos peptídeos, C: plantas em estágio V5, 7 dias após a aspersão dos peptídeos, D: plantas em estágio V6, 15 dias após a aspersão dos peptídeos.



3.6.1 Extração do RNA total de folhas de *Citrus sinensis*

A extração de RNA total foi feita pelo método do TRIzol LS (ThermoFisher), partindo de 0,5 mg de tecido foliar. Para promover a lise do material vegetal, utilizou-se o método físico, expondo as amostras ao *tissuelyzer* na frequência de 30 Hertz por 45 segundos. Para extração dos ácidos nucléicos utilizou-se o método químico, adicionando 1,2 mL de TRIzol LS (ThermoFisher) + 5% de β-mercaptoetanol por um período de incubação de 5 minutos, após, adicionou-se 400 µL de clorofórmio gelado. Posteriormente, as amostras foram submetidas à agitação (vórtex GEHAKA V2). O RNA foi separado dos restos celulares através de centrifugação (12.000 x g, 20 minutos, 4ºC), onde o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O RNA foi precipitado pela adição de 400 µL de NaCl 1,2 $mol.L^{-1}$ e citrato de sódio 0,8 $mol.L^{-1}$ e 400 uL de isopropanol gelado. Essa mistura foi armazenada em freezer -80ºC por 40 minutos e em seguida centrifugada (12.000 x g, 10 minutos, 4ºC). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado 2 vezes com etanol 70%, sob centrifugação (Eppendorf 5472) de 10.000 x *g*, durante 10 min, 4ºC.

Para refinar a purificação, foi feita uma segunda etapa de precipitação do RNA adicionando 50 µL de NaCl 0,2 $mmol.L^{-1}$ e 250 µL de etanol absoluto. A solução foi centrifugada (12.000 x *g*, 20 minutos, 4ºC) e o *pellet* foi lavado 2 vezes com etanol 70%, sob centrifugação (Eppendorf 5472) de 10.000 x g, durante 10 min, 4ºC. O restante do solvente foi seco no *speed vaccum* (Eppendorf), o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de água livre de nuclease (tratada com DEPC 0,1% e posteriormente filtrada em 0,2 µm). O RNA foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® ThermoFisher) e a solução foi armazenada no freezer -80ºC.

3.6.2 Tratamento das amostras de RNA com DNAse e síntese do DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA foram diluídas para a concentração final de 1000 $ng.\mu L^{-1}$. Para remoção de possíveis contaminantes de DNA genômico, foi procedido o tratamento enzimático com a DNAse (ThermoFisher Scientific, TurboDNAse). Em microtubos de 500 µL, foram adicionados 10 µL de amostra de RNA, 2 µL de tampão (10X), 2 µL de DNAse e 6 µL de água DEPC (1%), totalizando 20 µL de reação. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37ºC e, em seguida, adicionou-se 2 µL de "Reagente de Inativação de DNAse" (ThermoFisher). Após 5 minutos em temperatura ambiente, as

amostras foram centrifugadas a 13.000 x *g* por 1,5 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e armazenados em freezer -80ºC.

Em microtubos livres de DNAse, foram adicionados 5 µL de amostras de RNA tratados com DNAase, 1 µL dos *primer*s N6 [10 mmol.L $^{-1}$] e OligoDT [10 mmol.L $^{-1}$], 1 µL de dNTP's [5 mmol.L $^{-1}$], completando-se o volume para 11 µL com água DEPC (1%). Em seguida as amostras foram incubadas a 70ºC por 5 minutos e depois colocadas no gelo por mais 5 minutos. Após esse período, foram adicionadas 0,6 µL de água DEPC (1%), 4 µL de tampão 5X, 2,4 µL de $MgCl_2$ [25 mmol.L^{-1}], 1 µL de "*RNAse out*" e, por fim, 1µL da enzima Improm II (Promega). As amostras foram incubadas a 25ºC por 5 minutos, 45ºC por 1 hora e 70ºC por 15 minutos. Por fim, as amostras de cDNA foram armazenadas no freezer -20ºC e utilizadas para a detecção via PCR quantitativo.

3.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real para avaliar a expressão gênica (RT-qPCR)

Para a análise da expressão gênica foram utilizadas quatro repetições biológicas por tratamento de cada período avaliado. Essas repetições foram analisadas em triplicata técnica e como controle utilizou-se uma amostra sem cDNA ou controle negativo da qPCR e uma amostra de DNA de citros como controle positivo da qPCR. Os ensaios de RT-qPCR foram conduzidos no aparelho StepOnePlus Thermocycler (Applied Biosystems). A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). *Primers* específicos para cada gene alvo foram empregados (Quadro 3). Dois genes de referência (GAPC2 e actina) foram utilizados como controles internos da expressão (MAFRA et al., 2011). A reação foi constituída de 1 µL de cDNA, 1X de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) e 0,15 mmol.L^{-1} de *primer*s [100 mmol.L^{-1}] no volume final de 12 µL.

O método utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 95ºC por 10 minutos; seguido de 40 ciclos a 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 45 segundos. Ao final da termociclagem, a especificidade dos *primer*s foi determinada por meio de curva de dissociação ou *melting curve*. Os valores de *ct* (*Cycle Threshold*) obtidos foram utilizados para calcular a expressão gênica relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (SCHMITTGEN e LIVAK, 2001), utilizando-se a média das três réplicas técnicas de cada amostra.

Quadro 3. Genes das vias biossintéticas dos ácidos salicílico e jasmônico selecionados para análises de expressão

Sigla, descrição do gene	Forward/Reverse (5'-3')	Função molecular	Referência
GAPC2, *glyceraldeídoyde-3-desidrogenase fosfato C2*	TCTTGCCTGCTTTGAATGGA TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT	controle endógeno	Mafra et al., 2012
ACT, *actina-2*	GCAACATTGCCACTGAAGATCCATC GTAGCTTGAATCTGGGAAGGGAAGG	controle endógeno	Mafra et al., 2012
BSMT1, *carboximetil transferase do ácido salicílico*	GTTTAACGAGGCCGTTGATG TCGTCAAGGAAACTGTCACG	conversão do ácido salicílico (SA) em metil-salicilato (Me-SA)	Oliveira, 2013
NPR1, *gene não-expresso PR1*	TTCCACTGCCATCGAAACTG TGTAATCTTGTTTAAATGAGCCTCTTG	marcador da resposta mediada do ácido salicílico e indução de SAR em plantas	Chen et al., 2003
PR2, *proteína relacionada à patogenese2*	TTCCACTGCCATCGAAACTG TGTAATTTGTTTAAATGAGCCTCTTG	produção da enzima 1,3-β- glucanase	Francis et al., 2009
LOX, *lipoxigenase*	GCAACATTGCCACTGAAGATCCATC GTAGCTTGAATCTGGAAGGGAAGG	produção da enzima lipoxigenase nos cloroplastos das plantas	Rodriguez et al., 2014

3.7 Efeito protetivo de peptídeos contra cancro cítrico em plantas em condição de casa de vegetação

Para determinar a atividade antibiótica dos peptídeos frente a *Xanthomonas citri* subsp *citri* em um ambiente similar à dinâmica que ocorre no ambiente agrícola, foram realizados experimentos com mudas de laranja-doce (*Citrus sinensis*) 'Pera' enxertada em limão cravo em casa de vegetação. As plantas foram podadas e após desenvolverem brotos no estágio V5 (CIFUENTES, et al., 2019), realizou-se a aspersão de 2,5 mL de peptídeo na concentração de 100 μmol.L^{-1} solubilizados em água por planta.

Uma alíquota de 100 μL da suspensão bacteriana que fora e utilizada para aspersão das plantas, foi plaqueada em meio de cultivo sólido NA para quantificação do inóculo. Após 48 horas incubadas à 30ºC foi feita a contagem do número de UFC/mL

Após 24 horas da aplicação dos peptídeos, a suspensão bacteriana de Xcc padronizada em 1x10^7 UFC.mL^{-1} foi aspergida na parte abaxial das folhas até o ponto de

escorrimento e as plantas foram mantidas em câmara úmida em casa de vegetação. Após 24 horas da aspersão do inóculo bacteriano nas plantas, a câmara úmida foi removida. O acompanhamento dos sintomas foi monitorado até 35 dias após a aspersão dos peptídeos. O desenho experimental consistiu em 4 plantas por tratamento, com a coleta de 10 folhas de cada planta. Os experimentos foram conduzidos em duplicata biológica. Como controle positivo do experimento foi aspergido o produto comercial Recop na dose de 0,6 $g.L^{-1}$ de cobre metálico. Como controle negativo do experimento plantas receberam apenas a aspersão da suspensão bacteriana.

Equação 3. Determinação da severidade de cancro cítrico

$$S = \frac{números\ de\ lesões\ de\ necrose\ nas\ folhas}{área\ foliar\ (cm^2)}$$

S: severidade dos sintomas de cancro cítrico avaliados

3.8 Detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus em plantas em condição de casa de vegetação tratadas com os peptídeos antibióticos

3.8.1 Criação de *D. citri* em plantas de citros infectadas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Psilídeos adultos com 20 dias após emergência foram confinados em plantas fonte para Las em fluxos vegetativos em estágio V2/V3, com aproximadamente 14 dias após a poda (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018). Foram confinados em média 10 psilídeos sadios por broto, os quais tiveram 12 dias de acesso à aquisição (DAA) e nesse período houve oviposição. Os adultos foram removidos da planta fonte Las. A progênie F1 desenvolveu-se e foi mantida na mesma planta até completarem 20 dias de emergência dos adultos, tempo superior ao período de latência de Las no inseto (CANALE et al., 2019). Os psilídeos adultos da progênie F1 podem ser utilizados para transmissão de Las para novas laranjeiras sadias (LOPES, S. A; CIFUENTES-ARENAS J. C., 2021).

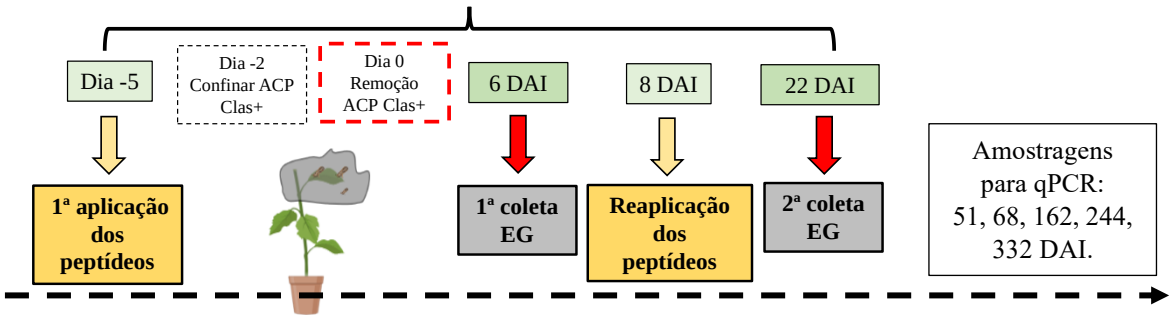
3.8.2 Inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus com *D. citri* em citros pulverizados com peptídeos: detecção de Las e expressão gênica nas vias do ácido salicílico e jasmônico (Experimento 1).

Plântulas da variedade ‘Pera’ cultivadas em fibra de coco em tubetes em casa de vegetação, 120 dias após semeadura e com aproximadamente 20 cm de altura, foram podados para estimular a brotação por meio da quebra da dormência apical vegetal e

mantidos em condições controladas com temperatura de 26ºC ± 2ºC, luminosidade artificial com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 60%.

Brotos no estágio vegetativo V2/V3 (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018) receberam a aplicação (-5 DAI) via pulverização dos peptídeos: BP178, Gr01, Guavanin-2, K-13, Lin-3 na concentração de 100 µmol.L^{-1} e HLB01 e HLB02 na concentração de 20 µmol.L^{-1} (Figura 5). Como controle positivo de indução do sistema de defesa vegetal utilizou-se o produto comercial Bion® (ASM) preparado na dose de 0,8 g.L^{-1}. Como controle negativo do experimento as plantas foram aspergidas com água. Uma segunda aplicação dos tratamentos peptídicos foi realizada 8 dias após a inoculação (8 DAI), da mesma maneira que aplicada inicialmente.

Figura 5. Esquema das aplicações de peptídeos e datas para coleta de material foliar para ensaios de expressão gênica (EG) e detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus por qPCR nas plântulas de laranja doce.



*DAI: dias após a inoculação de Las via psilídeo (considerado dia 0).

Elaborada pela autora

O desenho experimental consistiu em 10 plantas por tratamento e duas séries de coletas de amostras para i) expressão gênica na planta, aos 6 DAI e 22 DAI coletou-se material foliar de 3 plantas por tratamento, de maneira que essas plantas não foram amostradas novamente para avaliação de expressão gênica, para evitar a influência da lesão de remoção de folhas na indução dos genes de defesa vegetais; e ii) detecção de Las através de qPCR, com amostragens em função do período necessário para a detecção de Las de forma sistêmica na planta, nos tempos de 51, 68, 162, 244, 332 DAI.

Três dias após a pulverização dos tratamentos, 5 psilídeos adultos da geração F1 criados em plantas fonte de Las (conforme descrito no item 3.8.1) foram transferidos e aprisionados com *voil* em cada plântula para permitir a inoculação da bactéria (-2 DAI). Após 48h de confinamento (DIA O) foi feita a remoção dos psílideos e seu

armazenamento em congelador para posterior avaliação da porcentagem de insetos infectados com Las via qPCR.

Aos 6 e 22 dias após a inoculação (6 DAI e 22 DAI) foram feitas as coletas de material vegetal para determinação da expressão gênica e análises de RT-qPCR, conforme item 3.5. Após este período, as plantas foram levadas para a casa de vegetação, de onde foram realizadas as coletas para detecção de Las através de qPCR. A coleta para detecção de Las nos períodos de 51, 68, 162, 244, 332 DAI, contemplou folhas jovens e folhas maduras, formando uma amostra composta e representativa da planta.

Os tratamentos foram: i) ASM: plântulas expostas a psilídeos Las+, nas mesmas condições que os demais tratamentos e pulverizadas com ASM (nome comercial, Bion), ii) Água: plântulas expostas a psilídeos Las+, nas mesmas condições que os demais tratamentos e pulverizadas com água, iii) Sadio: plântulas expostas a psilídeos sadios (Las-), nas mesmas condições que os demais tratamentos, Peptídeos: plântulas expostas a psilídeos Las, nas mesmas condições que os demais tratamentos e pulverizadas com os peptídeos avaliados.

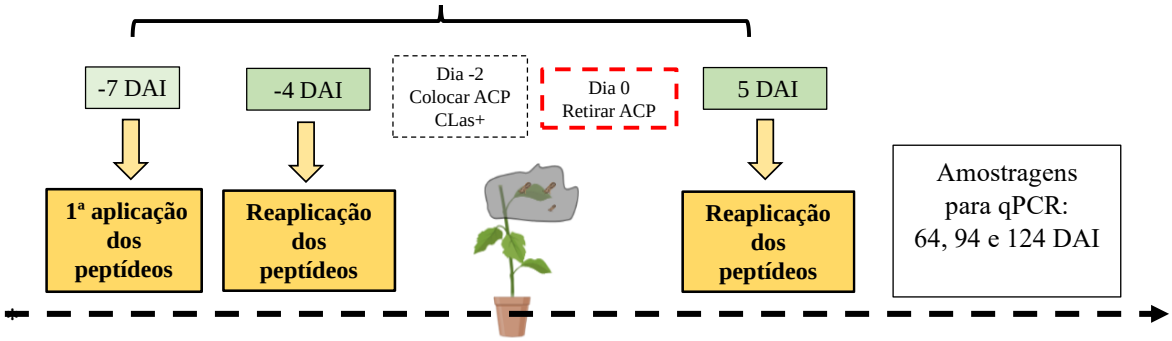
3.8.3 Inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus com *D. citri* em citros pulverizados com o peptídeo K13: detecção de Las (Experimento 2).

Mudas da variedade de laranja doce 'Valencia' produzida em limoeiro ‘Cravo’, com aproximadamente 3 anos de idade e 80 cm de altura, foram podadas para estimular a brotação por meio da quebra da dormência apical vegetal e mantidas em condições controladas, luminosidade artificial com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 60%.

O desenho experimental consistiu em 24 plantas por tratamento e coletas de amostras para detecção de Las através de qPCR, com amostragens em função do período necessário para a detecção de Las de forma sistêmica na planta, nos tempos de 64, 94 e 124 DAI (Figura 6).

Quando os brotos estavam no estágio vegetativo V2/V3 (CIFUENTES-ARENAS et al., 2018) as plantas receberam a primeira aplicação (-7 DAI) via pulverização do peptídeo K13 na concentração de 175 μM. Como controle negativo do experimento as plantas foram aspergidas com água. Uma segunda pulverização foi realizada após três dias (-4 DAI).

Figura 6. Esquema das aplicações do peptídeo K13, inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) por psilídeos e detecção de Las (qPCR) por qPCR em mudas de laranja



DAI: dias após inoculação de Las via psilídeo (considerado dia 0).

Elaborada pela autora

A inoculação de Las foi realizada confinando 5 psilídeos adultos da geração F1 criados em plantas fonte de Las (conforme descrito no item 3.9.1) em cada plântula (dia -2). Após 48h de confinamento (dia O) foi feita a remoção dos psílideos e seu armazenamento em congelador para posterior análise via qPCR. Cinco dias após a remoção dos insetos foi feita a terceira pulverização do peptídeo (5 DAI). Portanto, diferente do experimento 1, neste experimento 2 foram feitas três pulverizações do peptídeo.

Após este período, as plantas foram levadas para a casa de vegetação e foram feitas sucessivas amostragens nos períodos de 64, 94 e 124 DAI para extração de DNA vegetal (MURRAY e THOMPSON, 1980) e monitoramento da detecção de Las por qPCR (LI et al., 2006). As amostragens contemplaram folhas jovens e folhas maduras, formando uma amostra composta e representativa da planta.

3.8.4 Efeito do peptídeo K13 na ontogenia de laranjeiras

Para avaliar a influência do peptídeo K13 no crescimento dos brotos foi feito um estudo de fenologia utilizando mudas de laranja-doce ‘Valência’ produzida em limoeiro ‘Cravo’, com aproximadamente 3 anos e 80 cm de altura foram podadas drasticamente para estimular a brotação apical e lateral e foram acondicionadas em ambiente controlado com fotoperíodo de 12h, umidade relativa de 60% e temperatura de 26ºC. Para uniformizar as brotações, somente os três brotos superiores foram mantidos, sendo feito o desbaste dos brotos adicionais que haviam desenvolvido.

Com os brotos no estágio V2/V3 aplicou-se o peptídeo K13 nas plantas na concentração de 100 μmol.L^{-1}, em volume de cerca de 8 mL por planta. Em seguida, foi feito o acompanhamento semanal do desenvolvimento desses brotos em altura (cm), com auxílio de um paquímetro digital, e em crescimento vegetativo utilizando a escala disponível em Cifuentes-Arenas e colaboradores (2018) durante um período de 80 dias. Foram utilizadas 12 plantas tratadas com o peptídeo e 12 plantas tratadas como controle negativo, pulverizadas com água.

3.9 Extração de DNA de folhas de *Citrus sinensis* e *D. citri*

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo químico descrito por Murray e Thompson (1980), modificado por Teixeira et al. (2005). Para a etapa de lise química e física do material vegetal, microtubos de 2 mL contendo 1 *beads* magnética são preenchidos com 0,5g de material vegetal foliar picado (pecíolo e nervura central). O material picado é triturado pelo *tissue lyzer* (QIagen Retsch TissueLyzer II), numa frequência de 30Hz durante 45s. Adiciona-se 1 mL do tampão CTAB (Tris-HCl 1 mol.L^{-1} pH=8,0, NaCl 1,4 mol.L^{-1}, EDTA 20 mmol.L^{-1}) contendo β-mercaptoetanol 0,2%. Em seguida, os microtubos foram aquecidos em banho-maria 65ºC por 30 minutos e adicionou-se 700uL de clorofórmio:álcool isoamílico [24:1].

As amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas (Eppendorf, 5425R) a 13000 x *g* durante 5 minutos. Cerca de 800 uL do sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e então adicionou-se 0,6x o volume de isopropanol (480 μL), que foi homogeneizado levemente pela inversão e mantido a - 20ºC por no mínimo 30 minutos.

Para a etapa de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13000 x *g* durante 20 minutos, 4ºC para a *pelletização* do DNA, que foi então centrifugado (13000 x *g*, 10 min, 4ºC) duas vezes com etanol 70%. O resíduo de álcool foi removido em *speed-vaccum* (Eppendorf Vaccufage Plus, 22820109), por 8 min e as amostras de DNA foram resuspendidas em 50 uL de água Mili-Q autoclavada e armazenadas a -20ºC para análises.

Para realizar a extração de DNA de *Diaphorina citri*, partiu de 1 inseto por microtubo e foi seguido o mesmo protocolo desenvolvido por Murray e Thompson (1980), com adaptações. Ao final, as amostras foram hidratadas com 30 μL de água Mili-Q autoclavada e armazenadas a -20ºC para posteriores análises.

3.10 qPCR para detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus

3.10.1 Detecção de Las em tecidos foliares pelo protocolo de Zheng et al., 2016

O monitoramento da detecção de Las em tecidos vegetais para o experimento 1 (3.9.2) foi realizado seguindo o protocolo desenvolvido por de Zheng e colaboradores (2016), nomeado método da ribonuclease redutase (RNR) desenvolvido por Zheng et al., (2016), utilizando 250 nmol.L^{-1} dos *primer*s RNRf/RNRr e 50 nmol.L^{-1} da sonda RNRp, 1X de MasterMIX (KitTaqMan qPCR, Ambion) e 1uL de DNA [500 – 700 ng. .μL^{-1}] totalizando 12 uL de volume final da reação. As reações foram amplificadas nas seguintes condições de termociclagem (StepOnePlus, ThermoFischer Scientific): 2 min a 50 °C; 10 min a 95 ºC; 40 ciclos de 10 s a 95 °C para desnaturação e 30 s a 60 °C para anelamento e extensão. As amostras pelo método RNR foram consideradas positivas com *Ct* igual ou inferior a 34,0.

3.10.2 Detecção de Las em tecidos foliares e de *Diaphorina citri* pelo protocolo de Li et al., 2006

O monitoramento da detecção de Las em tecidos vegetais para o experimento 2 (3.9.3) foi realizado o protocolo de qPCR duplex determinada por Li et al (2006) utilizando 500 nmol.L^{-1} dos *primers* HLBas/HLBr, 150 nmol.L^{-1} da sonda HLBp para amplificação do gene 16SrDNA de Las, 500 nmol.L^{-1} dos *primers* COXf/COXr e 150 nmol.L^{-1} da sonda COXp, 1X de MasterMIX (KitTaqMan qPCR, Ambion), 1µL [500-700 ng.μL^{-1}] de DNA totalizando 12 µL de volume final da reação. As reações foram amplificadas nas seguintes condições de termociclagem (StepOnePlus, ThermoFischer Scientific): 10 min a 95 ºC para desnaturação inicial; 40 ciclos de 10 s a 95 °C para desnaturação e 45 s a 58 °C para anelamento e extensão. As amostras foram consideradas positivas com *Ct* igual ou inferior a 34,0.

Para monitorar a detecção de Las em *Diaphorina citri* utilizou-se o protocolo de qPCR duplex determinado por Li et al (2006), contendo 500 nmol.L^{-1} dos *primer*s HLBas/HLBr, 150 nmol.L^{-1} da sonda HLBp para amplificação do gene 16SrDNA de Las, 0,35 nmol.L^{-1} dos *primer*s DCF/DCR e 1,5 µmol.L^{-1} da sonda DCP para amplificação do gene do inseto *awd*, conforme desenvolvido por Manjunath et al (2008), 1X de MasterMIX (KitTaqMan qPCR, Ambion), 3µL [100-130 ng.μL^{-1}] de DNA de inseto totalizando 12 µL de volume final da reação. As reações foram amplificadas nas seguintes condições de termociclagem (StepOnePlus, ThermoFischer Scientific): 10 min a 95 ºC

para desnaturação inicial; 40 ciclos de 10 s a 95 °C para desnaturação e 45 s a 58 °C para anelamento e extensão. As amostras foram consideradas positivas com *Ct* igual ou inferior a 34,0.

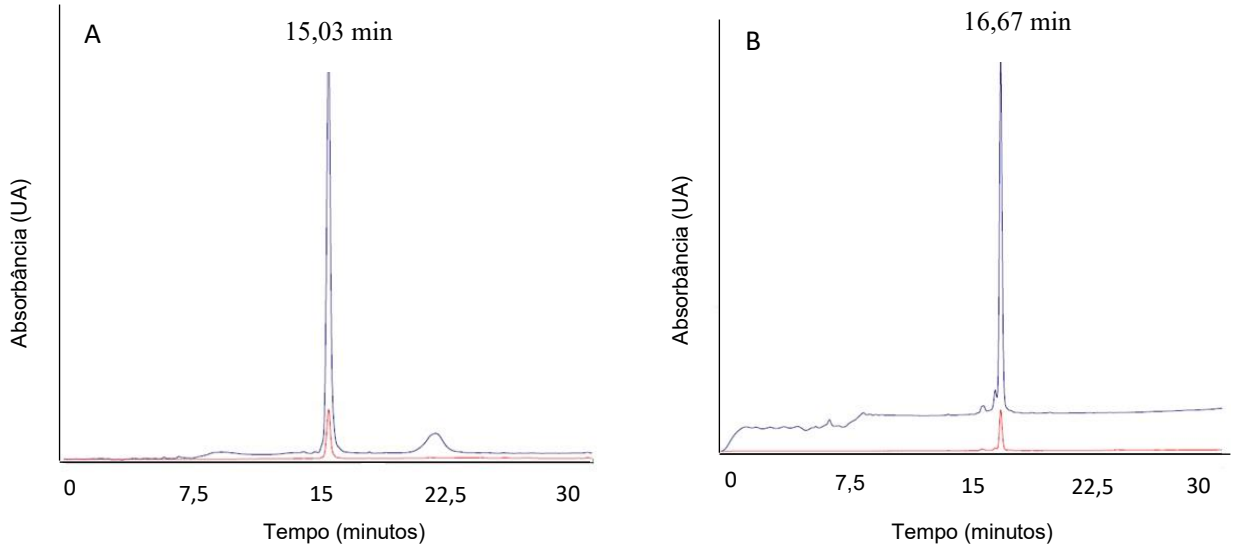
4. RESULTADOS

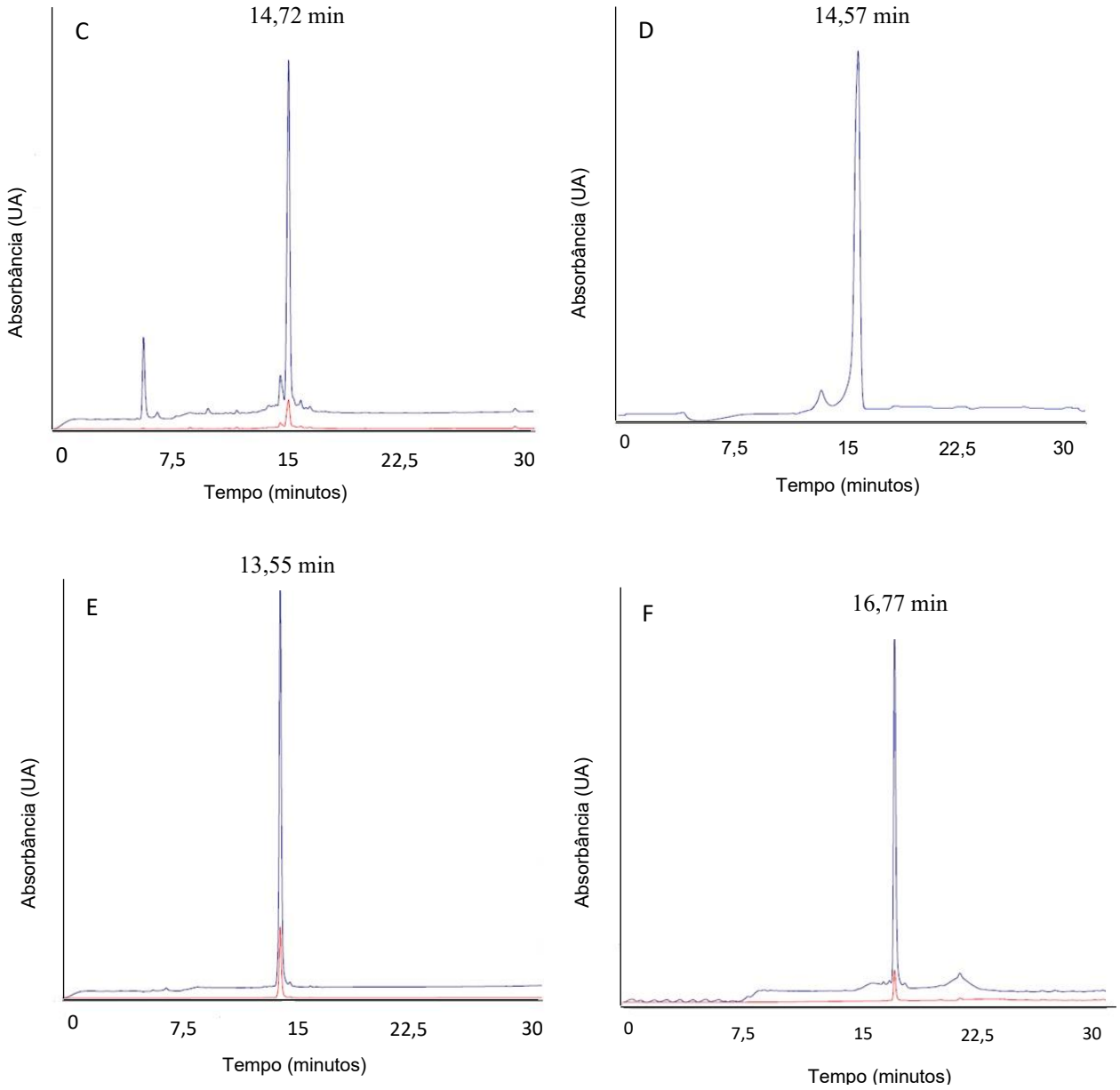
4.1 Síntese, purificação e caracterização de peptídeos

4.1.1 Peptídeos lineares

A síntese peptídica em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc/*t*-Butil foi eficiente para produzir os peptídeos Guavanin-2, Gr01, BP143, K13, MdPep3 e Lin3. A clivagem pelo método ácido foi eficiente para promover a liberação da cadeia peptídica da resina Rink amida MBHA e remoção dos grupamentos protetores laterais derivados de *t*-butila. O método de purificação adotado para cada peptídeo foi eficiente para promover grau de pureza superior a 90% para os peptídeos produzidos (Figura 5).

Figura 7. Perfis de absorbância para os peptídeos A) Guavanin-2, B) Gr01, C) BP143, D) MdPep3, E) Lin3, F) K13 obtidos após purificação via cromatografia líquida de alta eficiência em escala analítica. Condições da análise: coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 μm; 300 Å). Gradiente linear de 5-95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 0,6 mL.min^{-1} e detecção a 220 nm (azul) e 280 nm (vermelho).





A análise de espectrometria de massas confirmou a identidade dos peptídeos: as massas teóricas foram previamente determinadas por meio de softwares online (Phyre2 e Pepcalc) e foram coincidentes com os resultados coletados após análise do material pelo espectrômetro de massas do tipo *íon-trap* (Tabela 1).

Tabela 1.Razão massa molecular/carga (g.mol^{-1}) teórica calculada para a peptídeos BP143, Gr01, Guavanin-2, Lin3, MdPep3

Peptídeo	Massa molecular (g.mol^{-1})	ES+	ES m/z teórico (g.mol^{-1})	ES m/z observado (g.mol^{-1})
BP143	1553,20	2	777,60	777,00
		3	518, 13	518,40
		4	388,30	388,80
Gr01	2062,66	2	1032,33	1032,20
		3	688,55	688,50
		4	516,66	516,60
		5	413,53	413,40
Guavanin-2	2774,24	4	694,56	694,40
		5	555,84	555,70
Lin3	1199,46	2	600,73	600,30
		3	400,82	400,50
MdPep3	2270,55	2	1136,27	1133,60
		3	758,85	757,70

4.1.2 Peptídeos cíclicos

A síntese peptídica em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc foi eficiente para produzir o peptídeo Citrusina III e a clivagem pelo método ácido foi eficiente para promover a liberação da cadeia polipeptídica da resina Wang-Ser e remoção dos reagentes protetores laterais derivados de *t*-butila. O método de purificação adotado para o peptídeo foi eficiente para promover grau de pureza superior a 90% (Figura 6).

A identidade do peptídeo Citrusina III antes e após a ciclização foi confirmada por espectrometria de massas, uma vez que o polipeptídeo Citrusina III sofreu a perda de 18 g.mol^{-1}, caracterizado pela perda de uma molécula de água decorrente da ciclização pela estratégia “cabeça-cauda”.

Figura 8. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo Citrusina III antes (A) e após (B) a etapa de ciclização. Condições de purificação: coluna de fase reversa Shimadzu C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 minutos, fluxo de 1,0 mL.min^{-1} e detecção a 220 nm.

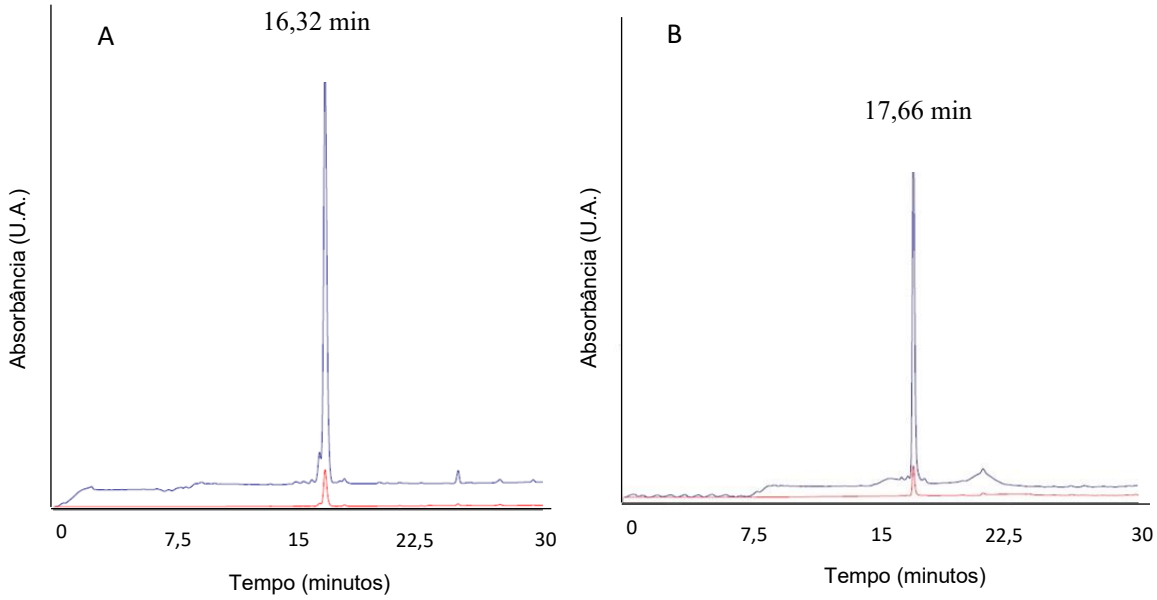


Figura 9. Espectros de massas do peptídeo Citrusina III A) antes e B) após a ciclização

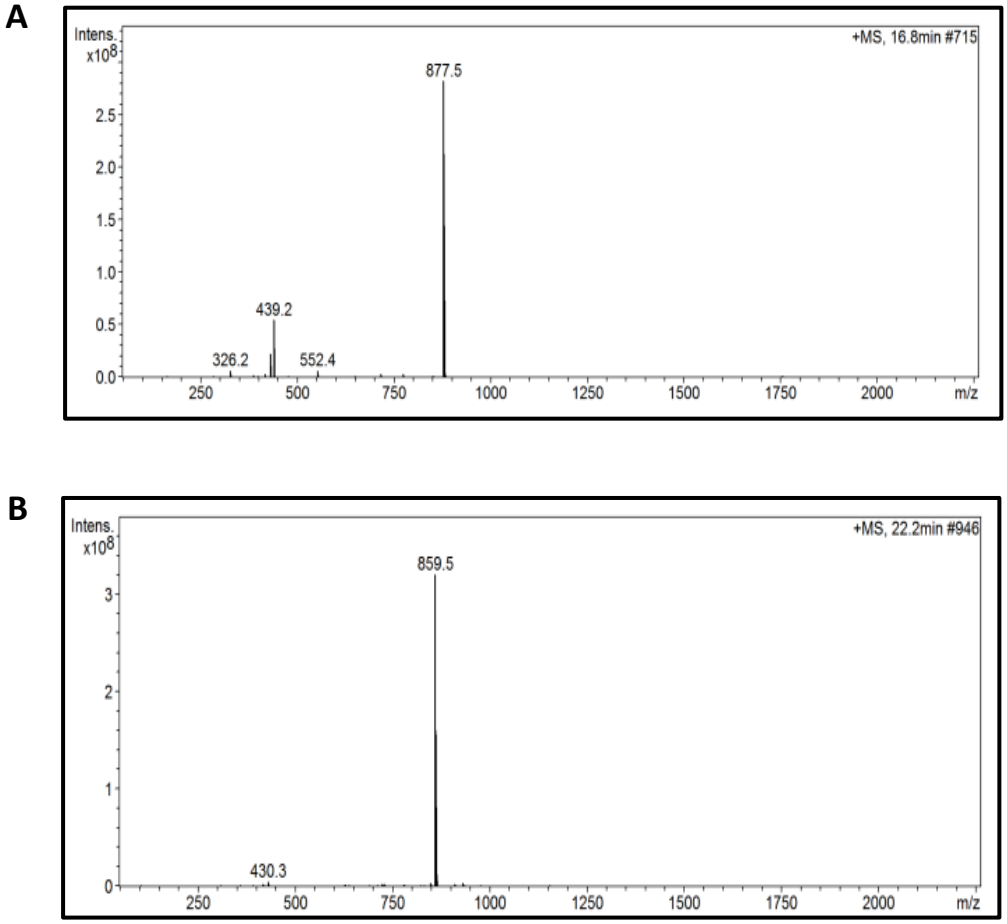


Tabela 2. Razão massa molecular/carga ($g.mol^{-1}$) teórica calculada para o peptídeo cíclico Citrusina III antes e após a etapa de ciclização

Peptídeo	Massa molecular ($g.mol^{-1}$)	ES+	ES m/z teórico ($g.mol^{-1}$)	ES m/z observado ($g.mol^{-1}$)
Citrusina III (Linear)	877,8	1	876,80	877,50
		2	437,90	439,20
Citrusina III (Cíclico)	859,5	1	858,50	860,50

4.2. Atividade antibiótica dos peptídeos – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antibiótica dos peptídeos Guavanin-2, Gr01, BP143, K13, MdPep3, Lin3 e Citrusina III foi avaliada frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* O157:H7, *Liberibacter crescens* BT-1 e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Os peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 mostraram atividade inibitória em concentrações inferiores a 12,5 $\mu mol.L^{-1}$, ou seja, aproximadamente 57% dos peptídeos sintetizados, mostraram atividade antibiótica satisfatória. Os peptídeos MdPep3, BP143 e Citrusina III não apresentaram capacidade de interferir no desenvolvimento das bactérias testadas.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu mol.L^{-1}$ dos peptídeos Guavanin-2, Gr01, BP143, K13, MdPep3, Lin3 e Citrusina III

	$HC_{(90)}$*		
Peptídeos	***Escherichia coli***	***Liberibacter crescens***	***Xanthomonas citri***
Gr01	3,12	6,25	3,12
Guavanin-2	3,12	6,25	3,12
K13	3,12	6,25	3,12
Lin3	3,12	12,5	6,25
BP143	-	-	-
Citrusina III	-	-	-
MdPep3	-	-	-

*Concentração peptídica necessária para inibir o crescimento de 90% das bactérias; - indica que não houve efeito inibitório.

Os peptídeos que apresentaram atividade antibiótica, Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 foram avaliados quanto aos demais parâmetros e os demais não houve continuidade na experimentação.

4.3 Atividade hemolítica dos peptídeos

Os peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3, não demonstraram capacidade de romper os eritrócitos humanos, modelo utilizado para avaliação da atividade hemolítica

O peptídeo Gr01 promoveu a lise de 50% dos eritrócitos humanos, sob concentrações (iguais ou) superiores a 50 $\mu mol.L^{-1}$.

Tabela 4. Atividade hemolítica dos peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 nas células de eritrócitos humanos. Controle negativo: Triton-X100 (1% v/v)

Peptídeo	**Atividade Hemolítica $HC_{(50)}$ ***
Gr01	50 $\mu mol.L^{-1}$
Guavanin-2	-
K13	-
Lin3	-

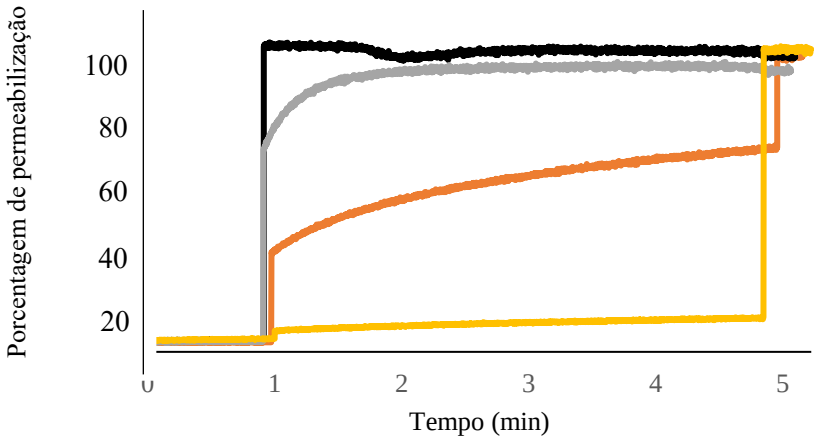
* Concentração peptídica necessária para promover a lise de 50% dos eritrócitos humanos.

4.4 Interação dos peptídeos com miméticos de membrana

Nos testes de permeabilização para determinar a interação dos peptídeos com lipossomas que mimetizam a bicamada lipídica de bactérias Gram-negativas, a porcentagem aproximada de ruptura das vesículas correspondeu a 100% para Gr01, similar ao controle positivo do experimento (Triton X-100). Esta análise não foi descrita na literatura para tal macromolécula, contudo, de acordo com Ramada e colaboradores (2018), Gr01 é classificado como um peptídeo AMP atuando com modo de ação detergente para as membranas plasmáticas bacterianas. O peptídeo K13 promoveu a lise de aproximadamente 70% dos miméticos de membrana.

Guavanin-2, as porcentagens de lise dos miméticos corresponderam aproximadamente a 40%, com acúmulo da porcentagem de permeabilização em função do tempo. Em contrapartida, o peptídeo Lin3 não exibiu capacidade de romper os lipossomas formadas, de maneira que não houve captura de sinal de fluorescência durante a cinética do experimento.

Figura 10. Perfil de liberação de carboxifluoresceína por meio da permeabilização de vesículas unilamelares grandes (LUVs) contendo POPE/POPC (3:1) pelos peptídeos Gr01 (preto), K13 (cinza), Guavanin-2 (laranja) e Lin3 (amarelo) na concentração de 5 µmol.L^{-1}. No tempo de 1 minuto foi acrescido o peptídeo na concentração teste ao sistema constituído pelo tampão PBS 10 mmol.L^{-1} (pH 7,2) e vesículas. Aos 5 min foi adicionado o Triton x-100 (1%)

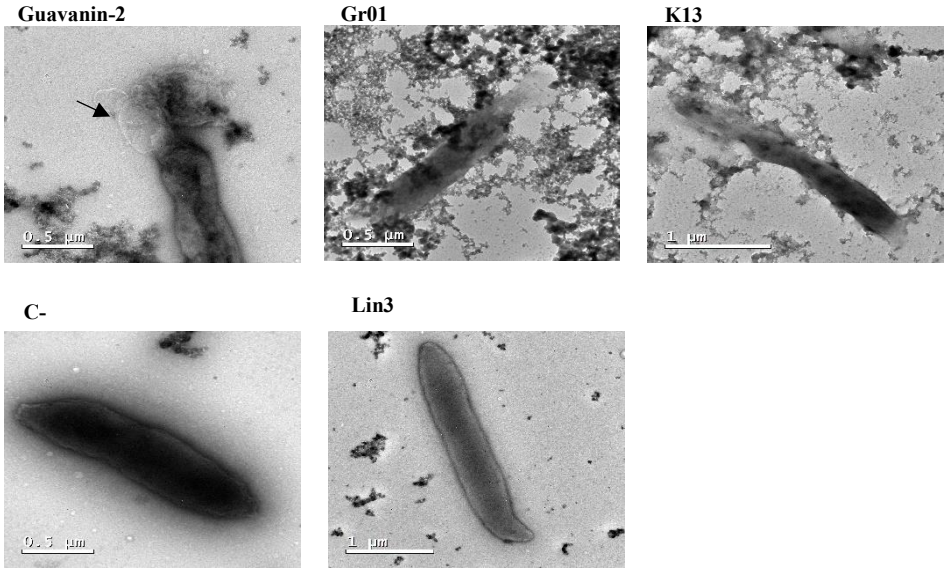


4.5 Morfologia bacteriana após exposição aos peptídeos

O mecanismo de ação dos peptídeos e as mudanças morfológicas que ocorrem nas bactérias após o período de contato, foi avaliada pela microscopia eletrônica de transmissão. O contato entre os peptídeos Gr01, K13 e a suspensão bacteriana de Lcr provocou o extravasamento do conteúdo intracelular e o rompimento da parede celular bactérias, levando à perda de sua estruturação e definição morfológica. No tratamento com peptídeo Guavanin-2 foi possível observar que a morfologia da bactéria não foi totalmente prejudicada, porém, existe vazamento do conteúdo intracelular em uma das extremidades da membrana plasmática bacteriana, identificado pela seta.

Nas micrografias relacionadas à exposição da bactéria frente ao peptídeo Lin3 não foi possível observar qualquer alteração morfológica na parede celular de Lcr, ou seja, a estrutura bacteriana foi mantida intacta, conforme observado no controle negativo do experimento, indicando que o mecanismo de ação deste peptídeo é diferente dos demais evidenciados acima.

Figura 11. Micrografias da morfologia da bactéria Lcr após exposição aos peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 [100 µmol.L^{-1}], sob força de aceleração de 200Kv no microscópio eletrônico de transmissão. C-: controle negativo.



C-: controle negativo, bactéria tratada com água autoclavada.

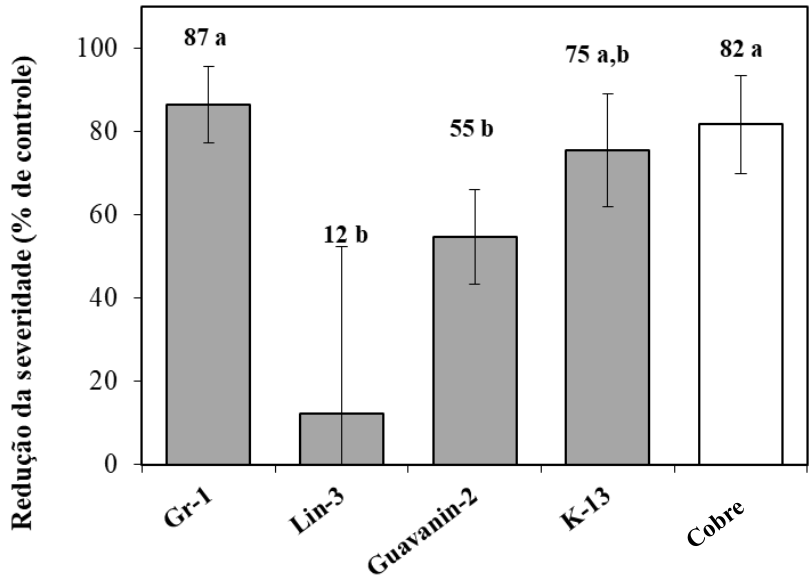
Elaborado pela autora

4.6 Atividade protetiva dos peptídeos frente ao desenvolvimento de cancro cítrico por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em casa de vegetação

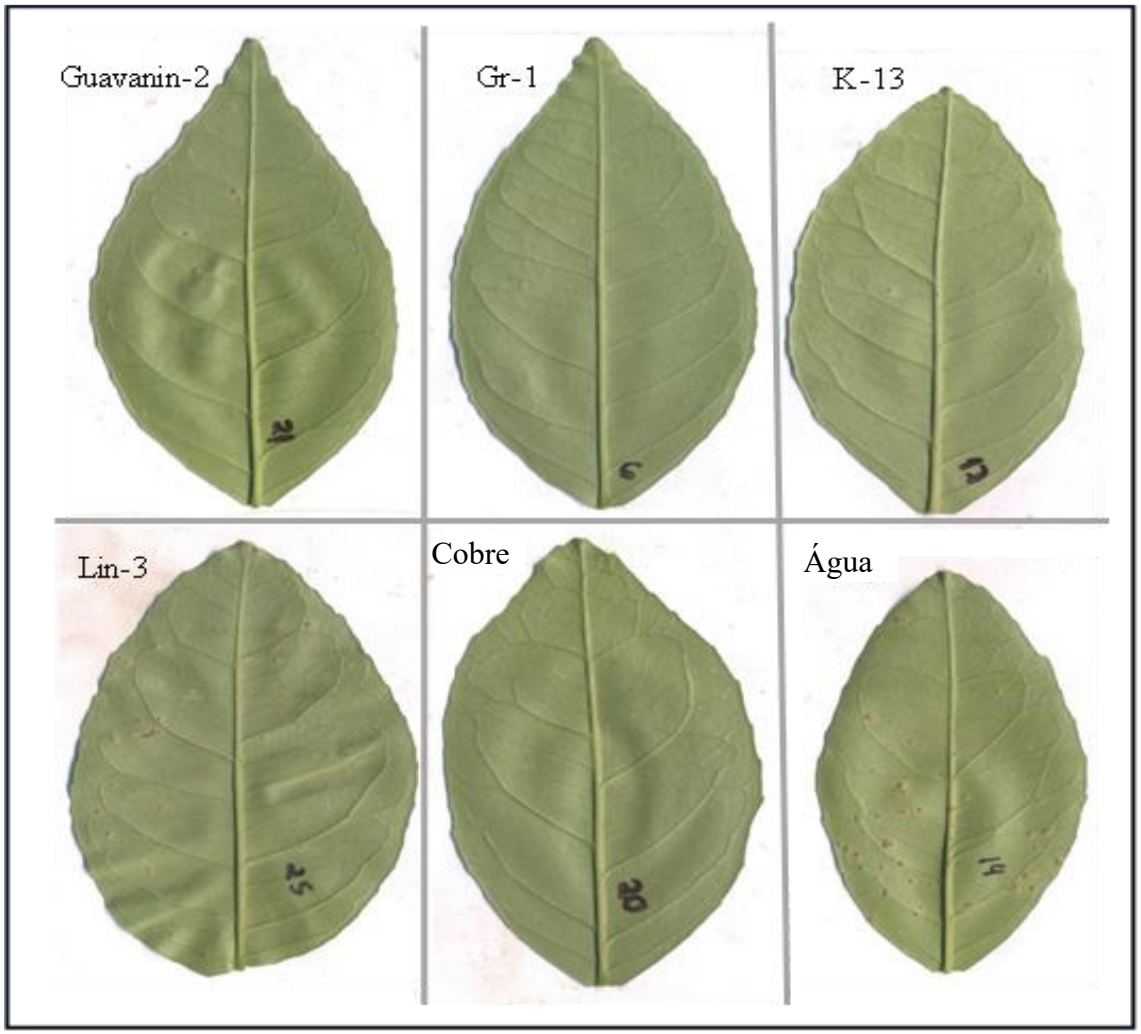
Com os testes *in planta* foi possível determinar a viabilidade da aplicação dos peptídeos Guavanin-2, Gr01, K13 e Lin3 em uma dinâmica mais próxima à realidade do patossistema do cancro cítrico. Além da capacidade antibiótica *in vitro* previamente descrita dos peptídeos citados, aspectos como capacidade dos peptídeos em penetrar o tecido vegetal, solubilidade, fitopatogenicidade para as folhas das laranjeiras e biodisponibilidade para atuar no ataque às bactérias no sistema *in planta* foram indiretamente avaliados com a execução deste ensaio.

Figura 12. A) Redução da severidade de sintomas de cancro cítrico em folhas de 'Pera' x 'Cravo' após tratamento com solução aquosa dos peptídeos Gr01, Lin-3, Guavanin-2 e K-13 (100 µmol.L^{-1}) e cobre (0,6 g.L^{-1} cobre metálico) em relação aos sintomas desenvolvidos nas plantas sem tratamentos (porcentagem média de redução no número de lesões/cm^2, seguida de erro padrão da média de 10 folhas/planta). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tuckey (P<0,05).B) Comparação visual das lesões desenvolvidas após 35 dias de experimento.

A



B



Os peptídeos Gr01 e K13 promoveram a redução de 87 e 75%, respectivamente, da severidade dos sintomas de cancro cítrico, resultados esses estatisticamente iguais ao controle positivo do experimento. Guavanin-2 e Lin3 promoveram a queda na severidade da doença em apenas 55 e 12%, respectivamente, (Figura 12A). Por meio da Figura 12B observou-se que as folhas tratadas com Gr01, K13 e cobre metálico (0,6 $g.L^{-1}$ cobre metálico) tiveram poucas lesões de cancro cítrico detectadas visualmente na parte abaxial da folha avaliada, enquanto os tratamentos com Guavanin-2, Lin-3 e água apresentaram maior número de lesões de cancro cítrico detectadas visualmente na parte abaxial das folhas avaliadas.

4.7 Expressão gênica do sistema de defesa em citros pela aplicação dos peptídeos

Os peptídeos avaliados induziram a expressão dos genes avaliados, com distinção no momento da ativação e na intensidade (Figura 13). Com exceção do peptídeo HLB02, os demais promoveram a expressão do gene *nonexpressor of pathogenesis-related gene 1* (NPR1) no 1º dia após a aspersão: 172,03 vezes mais expressão em plantas tratadas com Lin3; 16,7 vezes com Guavanin-2; 12,30 vezes com Gr01; 11,80 vezes com K13; 9,58 vezes com BP178 e 7,45 vezes com HLB01 maior expressão em plantas tratadas com peptídeos em comparação com a superexpressão observada em plantas tratadas com água.

No 7º dia após a aspersão, podemos evidenciar o aumento de 64,86; 18,77 e 15,59 vezes da expressão do gene NPR1 promovido pelos peptídeos HLB01, Lin3 e BP178, respectivamente. Entre Lin3 e BP178 não houve diferença significativa. No 15º dia após a aspersão, os peptídeos Gr01 e HLB02 promoveram aumento de 220 e 50 vezes da expressão, respectivamente. O ASM somente induziu o aumento da expressão de NPR1 aos 7 e 15 dias após aspersão em 7,88 e 14,76 vezes, respectivamente e aos 3 dias após a aspersão não houve modulação da expressão.

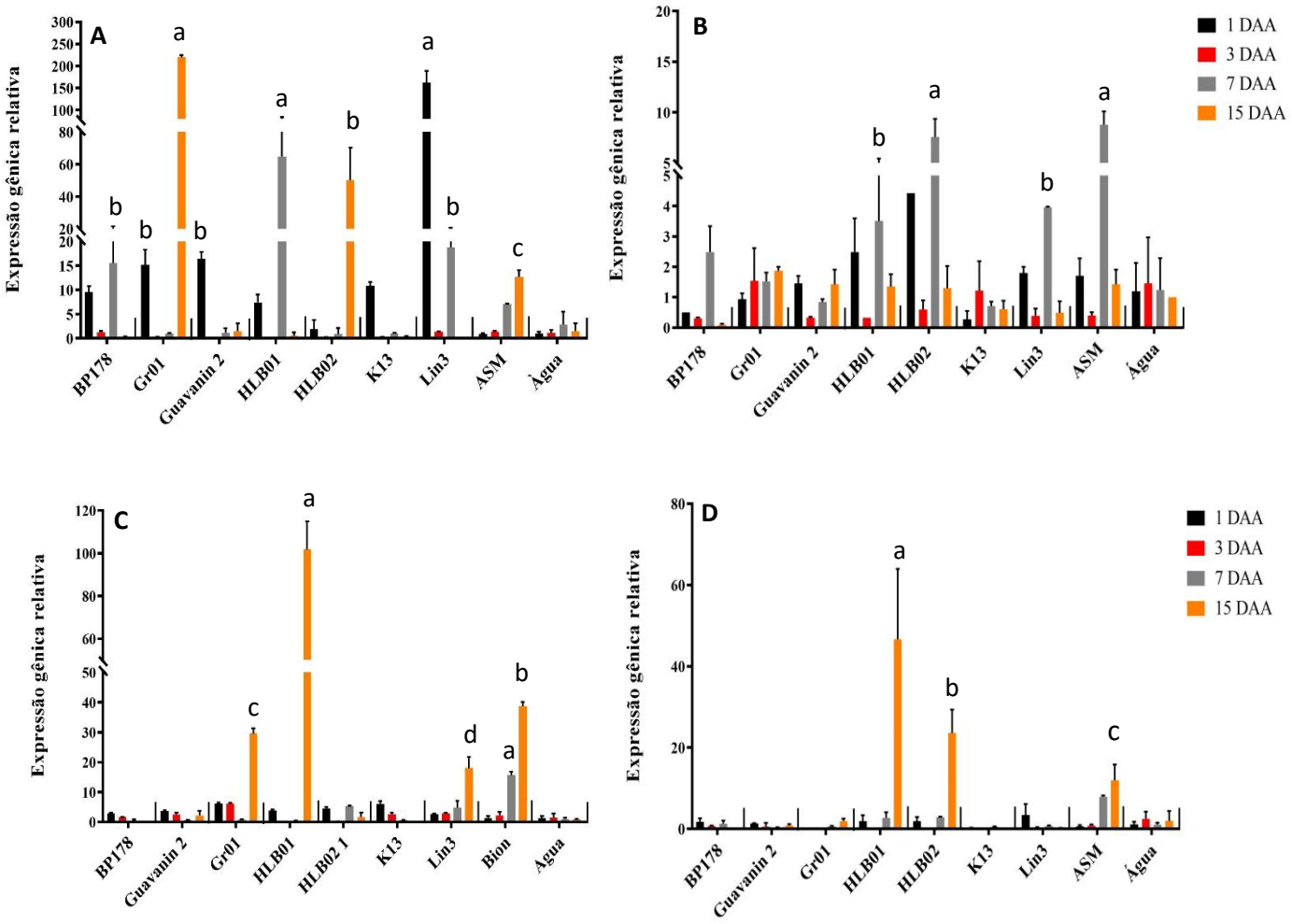
Na avaliação de um dia após a aplicação dos peptídeos, a expressão do gene *benzoic acid/SA carboxyl methyltransferase* (BSMT1) foi superior para plantas tratadas com o peptídeo HLB02, que aumentou a expressão do gene em 4,47 vezes em relação a água, enquanto HLB01, Lin3 e Guavanin-2 induziram expressão similar, porém menor do que HLB01. No tempo de 7 dias após a aspersão, a expressão foi pronunciada para os peptídeos HLB02, HLB01 e Lin3, sendo 9,50; 3,93 e 3,97 vezes superior que a expressão

relativa do controle negativo, respectivamente. O indutor ASM induziu expressão 9,77 maior que o controle negativo. Aos 3 dias a expressão deste gene não foi induzida, enquanto aos 15 dias, embora menor do que nos demais períodos onde houve expressão induzida, houve indução no caso dos peptídeos Gr01, Guavanin-2, HLB01 e HLB02 e com o ASM.

Para o gene *pathogenesis related protein*-2 (PR2), a expressão em 1 e 3 dias após a aplicação dos tratamentos foi muito próxima ao controle negativo. No tempo de 7 dias após a aplicação, HLB02, Lin3 e ASM promoveram o aumento da expressão em 5,31; 4,83 e 15,67 vezes, respectivamente. HLB02 e Lin3, no entanto, não tiveram diferença significativa nos resultados. Para 15 dias após a aplicação HLB01, Gr01 e Lin3 induziram 101,70; 29,30 e 18,04 vezes, respectivamente, mais expressão do gene PR2 nas plantas, quando comparadas com plantas tratados com água. ASM induziu 36,43 vezes.

A expressão do gene *lipoxygenase* (LOX) somente foi destacada no tempo de 15 dia após a aplicação dos peptídeos HLB01 e HLB02 e do indutor ASM, que promoveram o aumento em 46,60; 27,50 e 11,24 vezes na expressão do gene, respectivamente.

Figura 13. Nível de expressão do gene A) NPR1, B) BSMT1, C) PR2, D) LOX em plantas de 'Valencia' x 'Cravo' tratadas com os peptídeos [100 µmol.L^{-1}] BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 e [16 µmol.L^{-1}] para os peptídeos HLB01 e HLB02 nos tempos de 1, 3, 7 e 15 dias após a aspersão (DAA). A expressão gênica relativa foi analisada por RT-qPCR usando o método ΔΔCt e normalizada com os endógenos Actina e GAPC2. Controle negativo: plantas de 'Valencia' x 'Cravo' tratadas com água, controle positivo: plantas de 'Valencia' x 'Cravo' tratadas com indutor de genes de defesa comercial. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, avaliados pelo teste de Tuckey ($P< 0,05$).



4.8. Aplicação dos peptídeos e inoculação de *Candidatus* Liberibacter asiaticus com *D. citri*: expressão gênica do sistema de defesa e detecção de *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Plantas tratadas com os peptídeos e que tiveram psilídeos confinados por 48h para inoculação de Las, tiveram menor expressão dos genes em estudo no período de 6 dias após confinamento quando comparadas a plantas expostas a psilídeos sadios (Figura 14). Este perfil alterou aos 22 dias após confinamento, quando as plantas expostas aos psilídeos sadios tiveram menor expressão comparativamente a planta em que o psilídeo inoculou Las, porém em que não foi aspergido nenhum peptídeo (tratamento água).

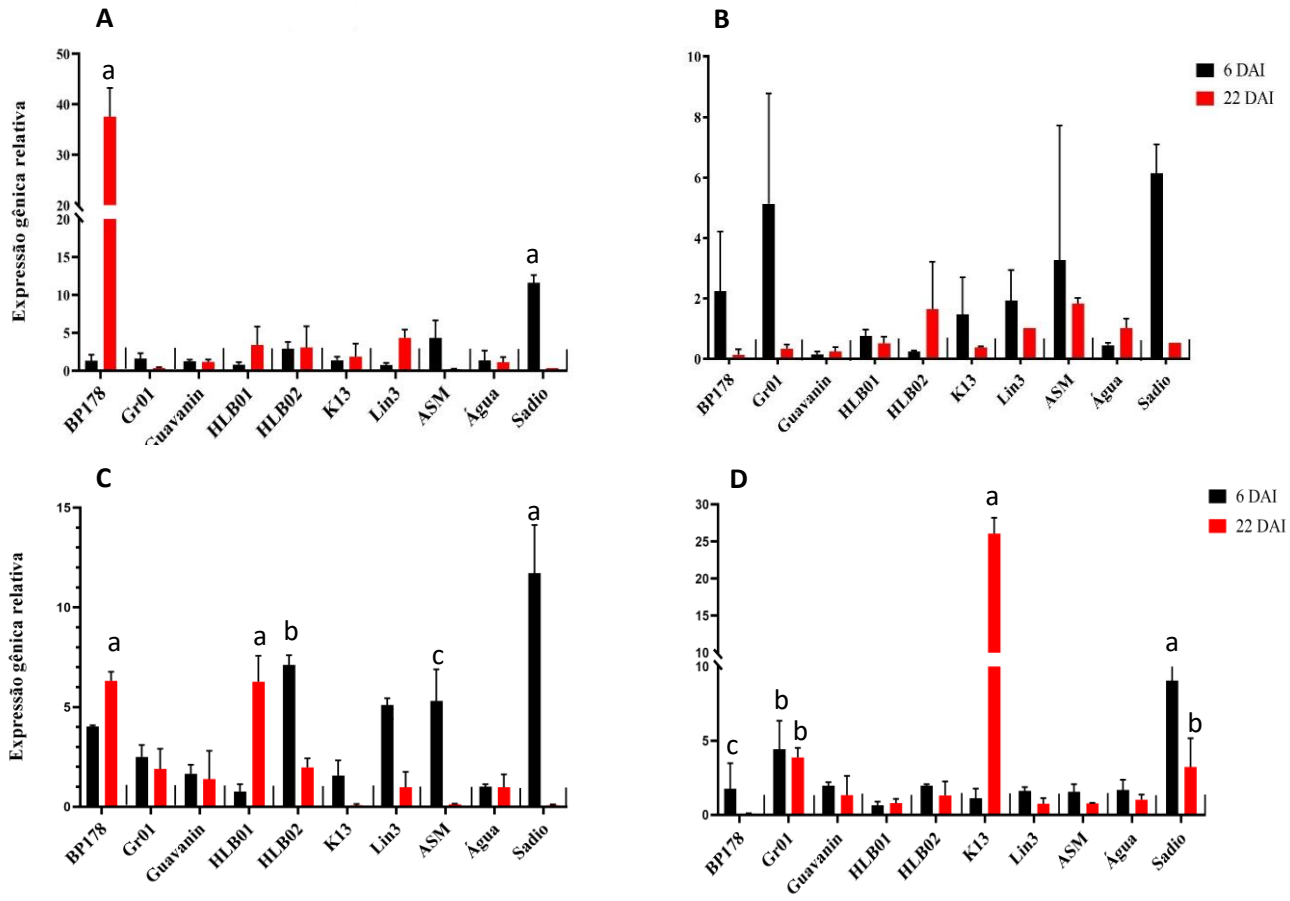
No tempo de 22 DAI, a aplicação de BP178 induziu o aumento da expressão de NPR1 em 37,55 vezes, quando comparada com o controle (água), com diferença significativa de expressão entre os demais tratamentos e as plantas que foram expostas aos insetos sadios, enquanto os demais peptídeos induziram baixa expressão desse gene.

O perfil transcricional do gene BSMT1 6 dias após a inoculação (DAI), teve aumento da expressão em 2,24; 5,14; 1,48; 1,93 e 3,26 vezes nos tratamentos BP178, Gr01, K13, Lin3 e ASM, respectivamente, porém, de menor intensidade do que em plantas sadias. Em 22 DAI houve baixa expressão de BSMT1.

No tempo de 22 DAI, a aplicação de BP178 e HLB01 promoveram o aumento na expressão de PR2 em 6,87 e 6,99 x, respectivamente, com diferença significativa para a expressão obtida no tratamento controle (água) e nos demais tratamentos peptídicos.

Aos 22 DAI a aplicação de K13 promoveu o aumento de 26,07 vezes na transcrição dos genes LOX, com diferença significativa à transcrição observada nas plantas que foram expostas aos insetos sadios, e aos demais tratamentos peptídicos. No mesmo período de avaliação, BP178 e HLB01 promoveram o aumento da expressão em 6,32 e 6,27 vezes, respectivamente.

Figura 14. Nível de expressão do gene A) NPR1, B) BSMT1, C) PR2, D) LOX em plântulas de laranja doce 'Pera' tratados com os peptídeos [100 µmol.L^{-1}] BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 e [16 µmol.L^{-1}] dos peptídeos HLB01 e HLB02 nos tempos de 6 e 22 dias após a inoculação de Las via psilídeo. A expressão relativa foi analisada por RT-qPCR usando o método ΔΔCt e normalizada com os endógenos Actina e GAPC2. Controle negativo (Água): plântulas de 'Pera' tratadas com água e expostos aos psilídeos infectivos; controle positivo (ASM): plântulas de 'Pera' tratadas com indutor de sistema de defesa vegetal comecial; sadio: plântulas de 'Pera' expostos aos psilídeos sadios. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo dia, avaliados pelo teste de Tuckey (P<0,05).

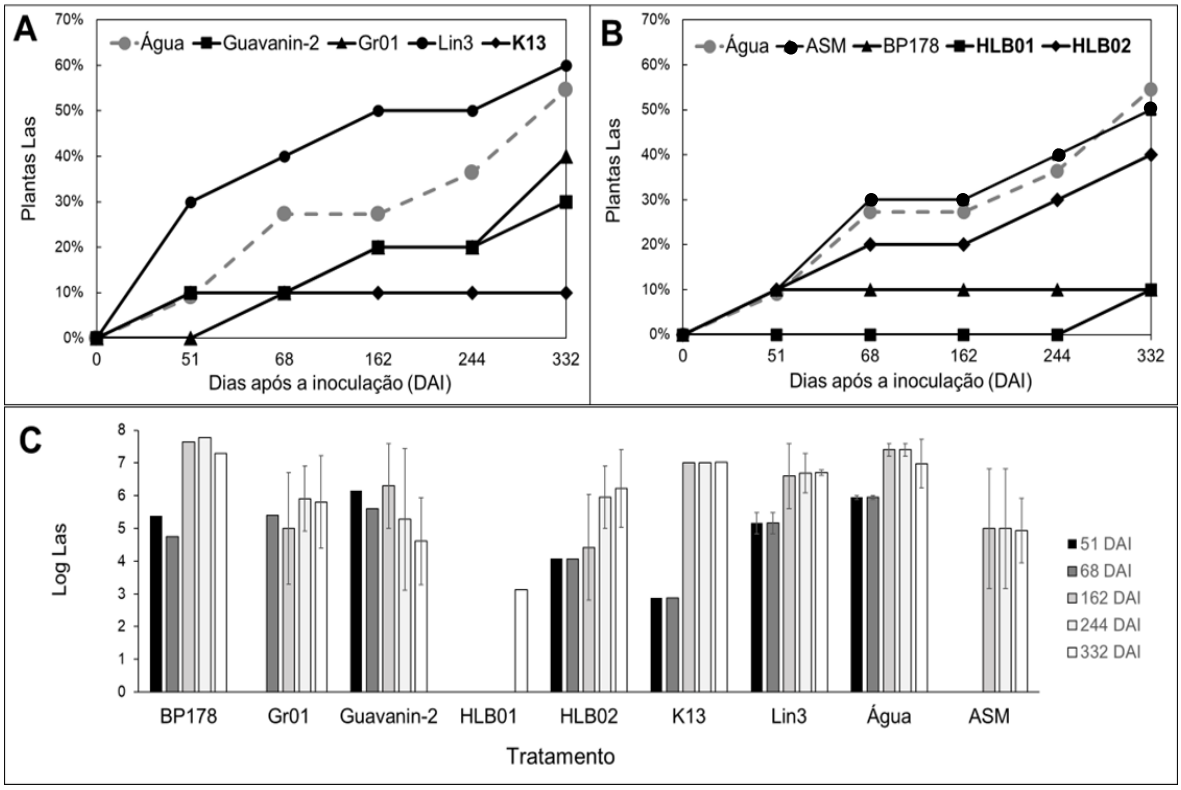


Houve incremento progressivo na infecção por Las das plantas tratadas com os peptídeos Guavanin-2, Gr01 e Lin3, enquanto no caso do peptídeo K13, em somente uma das 10 plantas tratadas (10%), Las foi detectada (Figura 15A). Nos tratamentos com os peptídeos Guavanin-2, Gr01, Lin3 (Figura 15A), foram detectadas 30, 40, 60% das plantas com a presença de Las ao final do período avaliado (332 DAI), enquanto no controle de infecção (água), 50% das plantas estavam com a presença de Las, consideradas positivas para HLB aos 332 DAI. De maneira similar a K13, na Figura 15B, o peptídeo BP178 teve somente uma planta com detecção de Las, e em ambos os tratamentos esta única planta foi detectada na primeira amostragem, aos 51 dias após a inoculação.

Nas plantas tratadas com o peptídeo HLB01, somente na última amostragem, aos 332 DAI, apenas 1 das 10 plantas tratadas com tal peptídeo que foram amostradas foi detectada Las. HLB02 teve perfil similar ao controle de infecção, e o indutor ASM foi similar ao controle água. Aos 332 DAI, 40 e 50% das plantas com HLB02 e ASM estavam infectadas com Las (Figura 15B). Assim, os peptídeos K13, BP178 e HLB01 se destacam positivamente na prevenção da infecção de Las, uma vez que foi possível detectar a presença de Las em apenas 10% das plantas inoculadas de cada tratamento, enquanto nos demais casos, não houve controle do estabelecimento da infecção de Las nas plantas. A taxa de infectividade dos psilídeos (determinada via qPCR) determinou que 87% dos insetos Las+ tratados com água estavam infectivos e com Log Las médio de 6,50, sendo este um valor suficiente para promover a transmissão de Las via psilídeo para uma planta sadia seja eficiente (LOPES e CIFUENTES-ARENAS, 2021).

Salientamos a diferença significativa para os resultados da variável título de Las (Log_{10} Las) encontrada nas plantas tratadas com o peptídeo HLB01: neste tratamento detectou-se uma planta positiva para Las apenas no último tempo de coleta avaliado (332 DAI), além de apresentar o menor título, indicando que apesar da planta estar infectada com Las, a quantidade de bactéria encontrada nos tecidos foliares foi pequena e significativamente inferior àquela obtida nos demais tratamentos. De maneira similar, a única planta infectada com Las no tratamento com o peptídeo K13 também teve baixo título, entretanto somente nas duas primeiras amostragens. Enquanto no caso do peptídeo HLB02 o número de plantas apresentou incremento com o tempo, o título nas duas primeiras amostragens foi intermediário entre as plantas tratadas com água e os peptídeos HLB01 e K13 (Figura 15C).

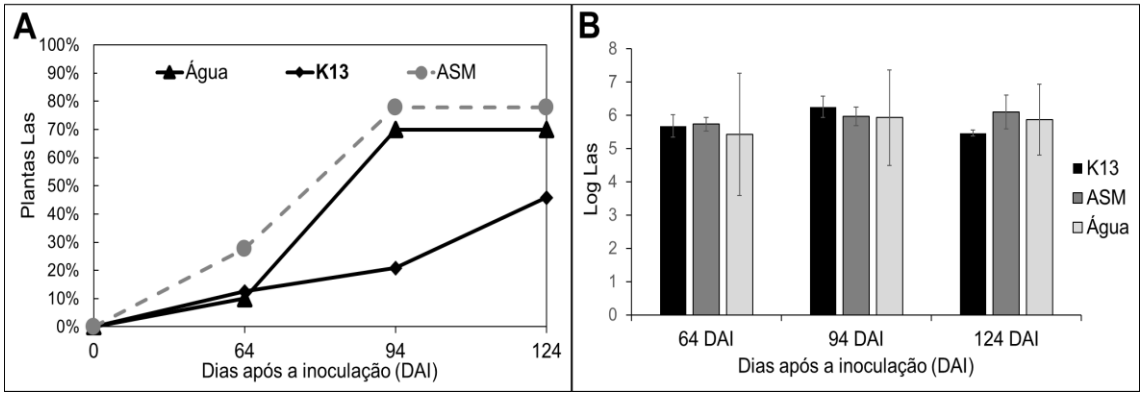
Figura 15. Progressão de plantas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) com tratadas com peptídeos previamente à inoculação por *Diaphorina citri*. Porcentagem de plantas com a presença de Las nos períodos amostrais, aspergidos com os peptídeos (**A**) Guavanin-2, Gr01, Lin3, K13 e (**B**) BP178, HLB01 e HLB 02 e controle positivo da infecção (água). ASM foi utilizado como indutor de expressão gênica. **C**. Título de Las (Log_{10} ± erro padrão de células de Las.g^{-1} de tecido fresco, transformados a partir dos valores de *Ct*) nos períodos amostrais. BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 foram aspergidos nas plântulas de 'Pera' na concentração de 100 µmol.L^{-1}, enquanto os peptídeos HLB01 e HLB02 foram aspergidos na concentração de 16 µmol.L^{-1}.



*DAI: dias após a inoculação da bactéria Las; **Log Las: (Log de céls. Las).(g^{-1} de tecido foliar); ***Nº plantas Las+: número de plantas detectadas positivas para *Candidatus* Liberibacter asiaticus por meio de qPCR, utilizando *Ct* limite de 34,0.

Em um segundo ensaio, o peptídeo K13 apresentou menor incidência acumulada de plantas detectadas com Las nos tempos avaliados de 64, 94 e 124 DAI, em comparação aos controles de infecção (água) e indutor de expressão gênica (ASM) (Figura 16A). A diferença na avaliação dessa mesma variável se torna ainda mais prevalente no tempo de 94 DAI, quando observamos que 20% das plantas tratadas com o peptídeo K13 foram detectadas com Las enquanto nos controles o patamar foi de 70%. Entretanto, neste segundo ensaio não houve alteração no título de Las mediante o tratamento com o peptídeo K13 em relação aos controles (Figura 16B).

Figura 16. Progressão de plantas com *Candidatus* Liberibacter asiaticus (Las) com tratamentos com peptídeos previamente à inoculação por *Diaphorina citri*. (**A)** Porcentagem de plantas com a presença de Las nos períodos amostrais, aspergidos com o peptídeo K13, ASM utilizado como indutor de expressão gênica e controle positivo da infecção (água). (**B**) Título de Las (Log_{10} ± erro padrão de células de Las.g^{-1} de tecido fresco, transformados a partir dos valores de *Ct*) nos períodos amostrais de plantas tratadas com K13 (concentração de 175 µmol.L^{-1}), ASM (0,8 g.L^{-1}) e controle de infecção (água).



*DAI: dias após a inoculação da bactéria Las; **Log Las: (Log de céls.Las).(g^{-1} de tecido foliar); ***DP: desvio padrão;****Plantas Las+: número de plantas detectadas positivas para *Candidatus* Liberibacter asiaticus por meio de qPCR, utilizando *Ct* limite de 34,0.

Por meio deste resultado foi possível observar que o peptídeo K13 se destaca, em comparação aos controles positivo (água) e negativo (ASM) como o tratamento que alcançou menor incidência acumulada de plantas detectadas com Las em todos os tempos avaliados 64, 94 e 124 DAI. A diferença na avaliação dessa mesma variável se torna ainda mais prevalente no tempo de 94 DAI, quando observamos que 5 plantas tratadas com o peptídeo K13 foram detectadas com Las (20%) enquanto nos tratamentos água e ASM, 13 e 14 (70 e 80%) plantas já haviam sido detectadas com a bactéria, respectivamente.

4.9 Ontogenia de plantas de *Citrus sinensis* tratadas com K13

No acompanhamento do desenvolvimento de brotos em plantas tratadas com o peptídeo K13 em comparação com plantas tratadas com água, 86 dias após a poda, foi observado que os brotos provenientes do 2º fluxo vegetativo das plantas controle, aspergidas com água, haviam crescido em média de 37,00 cm, enquanto 5 plantas haviam completado o ciclo de fenologia do broto, atingindo o estágio vegetativo V6, quando o tecido foliar passa a ser considerado maduro (Quadro 4). Três plantas ainda estavam no estágio vegetativo V5, onde as folhas dos brotos estão completamente expandidas, porém o tecido ainda é tenro, considerado jovem; e duas plantas estavam no estágio

intermediário (V5/V6). Também foi possível observar que a partir de 62 dias após a poda, todas as plantas já estavam com o 2º fluxo vegetativo em estágios iniciais de brotação.

Quadro 4. Ontogenia do segundo fluxo dos brotos de 'Valencia' x 'Cravo' após a aspersão de (A) água e (B) peptídeo K13 (100 µmol.L^{-1}). Parâmetros avaliados: estágio vegetativo e comprimento (cm) do broto

A

Planta	37 DAP	44 DAP	49 DAP	56 DAP	62 DAP	73 DAP	81 DAP	86 DAP
	Comprimento do broto (cm) e estágio vegetativo							
1	1,2	4,5	11,2	25,5	28	33	37,43	39,87
2		2,3	3	19	31,4	35	36,55	40,54
3	0,7	1,1	3,4	9,2	23	32	34,65	40,56
4		0,5	3			3,2	6,9	28,83
5	1,2	2,5	4,2	7,5	17,6	29,4	34,23	39,99
6	0,8	1,6	3,7	8,3	5,2	16,73	30,14	37,87
7	0,9	3,1	5,2	4	11	19,89	29,94	40,45
8	2,2	3,5	5,6		8,3	21,33	28,77	36,67
9	1,1	2,1				2,4	10,34	30,21
10						3,2	15,14	32,43
11					6,5	18,99	39,45	41,43

B

Planta	37 DAP	44 DAP	49 DAP	56 DAP	62 DAP	73 DAP	81 DAP	86 DAP
	Comprimento do broto (cm) e estágio vegetativo							
1	0,6	1,3	1,7	3,2	5	11,43	24,34	27,77
2	0,8	4,3	13,45	23	27	34,35	36,54	37,03
3	1,3	3,7	15,65	27	29	32	34,78	35,56
4		3,4	4,5	20,12	18,89	35,67	39,98	39,76
5	0,8	2,3	4,5	4,7	9,2	11,23	26,88	27,55
6		2,1	3,45	3,56	4,01	12,34	26,73	27,87
7	1,1	3,2	1,6	1,9	5,78	7,86	24,45	29,9
8	1,2	3,3	4,1	8,7	13,4	17,89	28,89	30,23
9	0,8	2,1	2,5	9,97	18,45	24,32	31,11	33,45
10			3,2	3,9	10,23	16,78	30,23	33,44
11	0,7	2,4	2,77	3,2	7,91	7,78	27,78	29,9
12	1,2	2,9	3,1	17,65	27	34,78	37,99	39,45

zero	V1	V2	V3	V4	V5	V5/V6	V6

*DAP: dias após a poda drástica

Estágios vegetativos baseados em CIFUENTES-ARENAS et al., 2018).

Os brotos provenientes do 2º fluxo vegetativo das plantas tratadas com o peptídeo K13 haviam crescido em média 32,65 cm aos 86 DAP (Quadro 4): 10 plantas atingiram expansão foliar e maturidade completa. Também foi possível observar que a partir de 49 dias após a poda, todas as plantas já estavam com o 2º fluxo vegetativo em estágios iniciais de brotação.

Nas plantas tratadas com o peptídeo K13, o dobro de plantas teve sua brotação atingindo o estágio V6 e com uma média de 5,13 cm menores do que as brotações de plantas controle tratadas com água.

5. DISCUSSÃO

Com o advento da síntese peptídica em fase sólida (SPFS), estudos na área de peptídeos vem ganhando destaque na biotecnologia humana e vegetal. O desenvolvimento de métodos eficientes para a síntese de peptídeos e seus análogos, coleções de peptídeos e bibliotecas, resultou em avanços substanciais na identificação e caracterização de peptídeos bioativos.

Os peptídeos são macromoléculas amplamente distribuídas na natureza e apresentam variadas propriedades terapêuticas promissoras. Trabalhar com peptídeos produzidos pela síntese química pode trazer vantagens como promover racionalmente modificações, adições, deleções e alterações na sequência de aminoácidos e na conformação final do peptídeo, além de possibilitar estudos computacionais direcionados a síntese, visando aprimorar sua especificidade contra alvos em patógenos, toxicidade reduzida contra células vegetais ou animais, maior estabilidade ou modulação do espectro de ação (MARCOS et al., 2008).

Peptídeos lineares podem ser sintetizados eficientemente em síntese em fase sólida, empregando o sistema de proteção ortogonal, que permite a construção do peptídeo com cadeias laterais reativas protegidas, especialmente o grupamento protetor de derivados *t*-butílicos (*t*-Butil) lábil em meio ácido. Já o grupamento amínico do aminoácido é protegido pelo protetor Fmoc (fluorenilmetoxicarbonil), que é lábil em meio básico (SANTOS, 2016). Assim, a principal estratégia empregada na SPFS (Fmoc/*t*-butila), foi utilizada para a produção das sequências desenvolvidas no presente trabalho. A identificação e purificação das 7 macromoléculas foi obtida e confirmada experimentalmente através de cromatografia líquida e espectrometria de massas.

Restringir uma cadeia peptídica em uma conformação definida por meio de reações de ciclização é uma estratégia adotada pela natureza e, mais recentemente, pela química sintética. Apesar de intensos esforços e desenvolvimento de novos métodos, a ciclização de peptídeos continua sendo uma etapa desafiadora (SANTOS, 2016). O interesse em promover a ciclização de peptídeos está relacionado ao aumento de estabilidade enzimática e afinidade/especificidade por bioreceptores (RAMALHO et al., 2018; SANTOS, 2016).

Existem estratégias na promoção química da ciclização da macromolécula, que é determinada dependendo dos grupos funcionais do peptídeo em questão: cabeça-cauda (C-terminal ao N-terminal), cadeia lateral-cauda, cabeça-cadeia lateral e cadeia lateral-cadeia-lateral. Neste trabalho a estratégia de produção do peptídeo linear e posterior ciclização via "cabeça-cauda" em solução foi empregada com sucesso e demonstrado através de análise de espectrometria de massas.

A seleção adequada dos aminoácidos que compõem as extremidades do peptídeo linear (ponto de desconexão do anel) pode ter auxiliado no direcionamento da reação de macrociclização, facilitando significativamente a obtenção de maiores concentrações do produto de interesse final, evitando reações intermoleculares indesejadas e contaminantes do processo (SANTOS, 2016). Além disso, a sequência de Citrusina III apresenta 2 resíduos Prolina (P), iminoácido que apresenta a capacidade de inserir uma dobra na cadeia polipeptídica, possivelmente facilitando a ciclização (CHAMPE et al., 2009).

Fatores como promover a ciclização em solução em alta diluição e o emprego de agentes de acoplamento e condensação altamente eficientes (DIEA e HBTU) também podem ter favorecido o direcionamento da reação, reduzindo o possível impedimento estérico da macromolécula linear (CHAN et al., 2004; DAVIES et al., 2004). Essa estratégia de ciclização é a mais comumente utilizada e traz benefícios como o aumento do rendimento final e a facilidade de purificação do material ciclizado (SANTOS, 2016).

Peptídeos são macromoléculas facilmente sintetizadas, podem ser utilizadas para a expressão genética em plantas, são sustentáveis, têm alta estabilidade e atividade antibiótica (MARCOS et al., 2008). Sua aplicabilidade para o controle de microrganismos e/ou organismos que acometem a agricultura já foi reportado anteriormente: Kish e colaboradores (2018) avaliaram o uso de peptídeos antimicrobianos da família das cercropinas e mangaínas para controle *in vitro* de *Xanthomonas citri* subsp. *ciri*, Flitches e colaboradores (2023) avaliaram o potencial inseticida de um peptídeo derivado do veneno de aranha HxTx fusionado com uma proteína GNA por meio de um *linker*. Estudos que relatam a aplicação *in vitro* e *in planta* para o controle de *Candidatus* Liberibacter asiaticus também foram avaliados por HUANG et al., 2021 e MERFA et al., 2022.

Em geral, peptídeos antibióticos apresentam como alvo estruturas relacionadas à manutenção física e/ou bioquímica dos microrganismos. Nesta perspectiva, a membrana

plasmática bacteriana, estrutura que apresenta a função de definição de estruturação e proteção contra agentes externos, se tornou alvo de peptídeos que apresentam o modo de ação membranolítico. A membrana plasmática de bactérias Gram-negativas é composta majoritariamente por lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos e a superfície da membrana de LPS é negativa, o que possibilita a interação com amostras catiônicas (JAIN, et al., 2022; TORTORA et al., 2014).

Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Xathomonas citri* apresentam a membrana plasmática bem elucidada e composta majoritariamente por lipopolissacarídeo (TORTORA et al., 2014). Ambas bactérias são descritas como sensíveis à ação de peptídeos membranoliticos e catiônicos, como os três peptídeos antimicrobianos análogos à Hylina1 com atividade *in vitro* frente à Xcc (KISHI et al., 2018), e ao peptídeo CAP18 (HABIBOLAHI et al., 2022).

Bactérias como Las e Lcr apresentam o genoma reduzido, ~1,25 Mpb e ~1,5 Mpb respectivamente. Contudo, apesar de apresentarem o metabolismo de síntese das paredes celulares incompletos, apresentam genes relacionados à biossíntese de lipopolissacarídeos (SHAPIRO et al., 2013; JAIN et al., 2022), tornando-as passíveis do ataque de peptídeos que atuam rompendo essas membranas, especialmente os peptídeos catiônicos.

Os peptídeos Guavanin-2, Gr01 e K13 atuam lisando a membrana plasmática de microrganismos, apresentando carga final positiva, ou seja, são peptídeos catiônicos (PORTO et al., 2018; RAMADA et al., 2019 e CONCEIÇÃO, 2018). Os peptídeos antibacterianos Guavanin-2 e Gr01 foram caracterizados frente a *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (PORTO et al., 2018; RAMADA et al., 2018) aplicados a bactérias que causam doenças para a saúde humana, contudo este é o primeiro relato de antibiose a bactérias patogênicas em citros, determinando o ineditismo do trabalho e a versatilidade dessas macromoléculas. O peptídeo K13 é inédito, porém seu análogo, Pantinin-1, também apresenta alta atividade antibiótica, especialmente frente a bactérias Gram-negativas (CRUSCA et al., 2018).

Outro tipo de mecanismo de ação dos peptídeos se dá pela inibição de processos regulatórios e essenciais para a duplicação do material genético para os microrganismos, como seria a inibição da atividade de topoisomerases. As topoisomerases são enzimas que promovem a clivagem do duplex cíclico do DNA durante o processo de duplicação do

material genético, regulando o desenovelamento da dupla fita (BUSH; EVANSROBERTS; MAXWELL, 2015). Esta é uma enzima onipresente nos microrganismos e a inibição de sua atividade pode acarretar na morte celular (POMMIER et al., 2016).

O peptídeo Lin3 é descrito como um representante da classe de peptídeos que têm alvo intracelular e, neste caso, ele atua provocando a inibição da atividade das enzimas topoisomerases TopoIV e DNA girase, presentes nos genomas bacterianos (ANGELO, 2021; ROCHA, 2018). Lin3 é descrito por apresentar alta atividade antimicrobiana frente a bactérias responsáveis por causar doenças em humanos, como por exemplo *E. coli* e *S. aureus.* Comparativamente, TopoIV (subunidade A) de *Escherichia coli* (*PDB Number*: 3FV5) apresenta 47, 42 e 68% de homologia com TopoIV de *Liberibacter crescens*, *Candidatus* Liberibacter asiaticus e *Xanthomonas citri*, enquanto a sequência de DNA girase de *Escherichia coli* (*PDB Number*: 1EI10), apresenta porcentagem de homologia de 40, 46 e 62% respectivamente, para as bactérias *Liberibacter crescens*, *Candidatus* Liberibacter asiaticus e *Xanthomonas citri*, justificando a eficiência da atividade de Lin3 para a aplicação antibiótica. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Assim, corroborando com a literatura, este peptídeo teve atividade antibiótica *in vitro* para todas as bactérias testadas. Ademais a essa situação, Lin3 é considerado um peptídeo catiônico (BOLDT, PINILLA, SEGALL, 2004; KLEMM et al., 2000), que justifica, mais uma vez, seu alto potencial de interação com a membrana de *L. crescens*, permitindo sua permeação e atividade intracelular.

O desenvolvimento de novos antimicrobianos requer necessariamente que eles não atuem nas células eucariotas (LORENZÓN, 2015). De acordo com o *National Institute of Heath* (NIH) descrito pela empresa Carefusion (http://www.carefusion.com) o valor limite aceitável de hemólise para produtos aprovados na área da saúde é menor que 5%.

A teoria mais aceita defende que a toxicidade de uma macromolécula pode se tornar um problema somente em casos onde o peptídeo seja administrado sistemicamente (aplicações injetáveis), indicando que a ingestão dessas moléculas não ocasiona riscos, uma vez que os peptídeos são quebrados no momento da ingestão, como ocorre com outros peptídeos presentes nos alimentos (FOX et al, 2012). No entanto, outra vertente determina que peptídeos tóxicos para os eritrócitos podem dificultar o funcionamento das

enzimas que atuam no trato gastrointestinal, indicando a necessidade em buscar macromoléculas atóxicas (KURODA e CAPUTO, 2013).

Para o presente projeto, os testes de hemólise dos peptídeos têm o objetivo de evitar o investimento em identificação e seleção de peptídeos para aplicação no controle de doenças em citros que não satisfaçam a questão de segurança de uso humano, características atendidas pelos peptídeos que apresentaram atividade antibiótica Guavanin-2, e K13, Lin3 e não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações trabalhadas. Para os peptídeos Guavanin-2 e Lin3 essa informação não é inédita e corroboram com a literatura (PORTO et al., 2018; ROCHA, 2018; ANGELO, 2021).

Para o peptídeo K13, no contexto da atividade hemolítica, é importante comentar que esta macromolécula é um análogo ao peptídeo Pantinin-1, peptídeo extraído do veneno de escorpião, que inicialmente apresenta alta atividade antibiótica, e alta atividade hemolítica também (CRUSCA et al., 2018; ZENG et al., 2013). Para diminuir essa atividade hemolítica e vialibilizar sua aplicação, foi realizada uma modificação pontual do aminoácido isoleucina (I) por uma lisina (K) na 13ª posição da sequência primária (porção apolar), por meio de estudos de dinâmica molecular e design racional de peptídeos (CRUSCA et al., no prelo). Esta modificação proporcionou a manutenção da atividade antibiótica clássica do peptídeo frente à bactérias Gram-negativas, porém a redução da atividade hemolítica. Estudos com esta finalidade estão cada vez mais frequentes e eficientes, tornando o mundo dos peptídeos cada vez mais versátil, útil e com alto potencial biotecnológico.

O peptídeo encriptado Gr01 apresentou atividade hemolítica nas concentrações de 50 e 100 $\mu.mol.L^{-1}$, e este dado corrobora com a literatura (RAMADA, et al., 2018), porém, como tal concentração está acima da CIM, pode-se inferir que o peptídeo Gr01 se manteve um alvo potencial para os demais estudos do presente trabalho.

Para determinar o modo de ação dos peptídeos, foram propostos os experimentos de miméticos lipídicos de membrana bacteriana e microscopia eletrônica de transmissão. Dentre todos os peptídeos, Gr01 foi aquele que apresentou maior potencial membranolítico, sendo responsável por romper 100% dos miméticos, coincidindo com a predição estrutural determinada por Ramada et al (2018), que propunha um modo de ação lítico para Gr01. O peptídeo K13, também apresentou alta porcentagem para lisar os miméticos produzidos, indicando que tal macromolécula apresenta modo de ação membranolítica, assim como os peptídeos da classe das pantininas (CRUSCA et al., 2018;

ALMAAYTAH et al., 2014). Já Guavanin-2 apresentou perfil de formação de “poro carpete”, hiperpolarizando a membrana bacterina, característica associada ao aumento gradativo da permeabilidade em função do tempo, formando um gradiente de permeabilização

Em contrapartida, Lin3 apresentou menor capacidade de permeabilizar os miméticos, porém apresentam atividade antibiótica frente às bactérias testadas. Isso pode indicar que tal macromolécula apresenta mais de um tipo de modo de ação: Lin3 é um peptídeo que tem como principal modo de ação atingir alvos intracelulares, o que justifica sua baixa taxa de permeabilidade (ROY et al., 2011).

Os resultados obtidos por meio da microscopia eletrônica de transmissão corroboram com o ensaio de miméticos de membrana uma vez que os peptídeos Gr01 e K13, que apresentam modo de ação lítico, foram capazes de romper a parede celular de Lcr, onde foi possível observar que a estrutura morfológica das células está desorganizada (“desfeita”). Em contrapartida, para o peptídeo encriptado Guavanin-2, podemos dizer que existe um extravasamento celular “pontual”, e indica que neste local houve o maior “acúmulo” peptídico, levando a célula bacteriana à lise por meio da hiperpolarização (instabilidade) da parede celular e, a partir daí, à morte.

Para Lin3, que apresenta o mecanismo de ação intracelular, a estrutura da bactéria foi mantida, ou seja, a morfologia da bactéria encontra-se bem definida e semelhante ao controle negativo do experimento (bactéria sem tratamento). É possível inferir que a presença da solução peptídica não causou grandes perturbações na parede celular bacteriana, assim que o contato foi promovido.

A busca por novas moléculas naturais é, atualmente, uma das principais áreas da indústria agrícola no mundo. Já existem pesquisas que comprovam a eficácia dos peptídeos frente à Xcc (KISHI et al., 2018; STOVER et al., 2013), porém, esses estudos não contemplam ensaios em casa de vegetação (*in planta*).

A importância em realizar ensaios *in planta* para estudos relacionados às bactérias que acometem a agricultura decorrem da necessidade de testar a permeabilidade, estudar a atividade fitotóxica, estabilidade físico-química, incompatibilidade entre químicos, disponibilidade do material, dinâmica natural da competição bacteriana e viabilidade de aplicação da determinada macromolécula. Para obter essas informações, os peptídeos foram utilizados em um teste *in planta*, em escala de “casa de vegetação”, frente a Xcc.

O cancro cítrico não é uma doença sistêmica, mas sim, local às folhas, ramos e frutos. As bactérias colonizam a superfície das plantas hospedeiras de maneira epífita (sem causar doença), mas quando adentram (por meio de fatores bióticos e abióticos) o espaço mesofílico das folhas, ativam a expressão de genes ligados à patogenicidade e se multiplicam nos espaços intercelulares das plantas (VAN GIJSEGEM et al., 1993; CARVALHO, 2006; JACIANI, 2008). Com a presença de umidade na região lesionada, a bactéria é exsudada, possibilitando sua dispersão (GOTTWALD et al., 2002; FAVARO et al., 2017).

Hoje em dia, o principal manejo do cancro cítrico é de caráter preventivo e se dá pelas aplicações frequentes de cobre formulado concentração de 350 $g.L^{-1}$ de cobre metálico (insolúvel) e 588 $g.L^{-1}$ de oxicloreto de cobre (solúvel), administrado na concentração recomendada na bula de 2 $mL.L^{-1}$ (0,6 $g.L^{-1}$ de cobre metálico) com o objetivo de desenvolver uma barreira física e química de proteção dos novos fluxos vegetativos e frutos até o estágio de menor suscetibilidade a doença, o estágio da maturação (MACHADO et al., 2021).

Pelo fato de o cobre ser amplamente empregado para o manejo preventivo de cancro, existem relatos que determinam o surgimento de bactérias de Xcc resistentes a esse metal, o que compromete a eficácia das aplicações (SUNDIN et al., 1989). Os genes presentes no genoma das bactérias resistentes atuam em conjunto, formando o *operón cop*ABCD e *cop*LAB, que conferem resistência às bactérias (COOKSEY et al., 1993; BEHLAU et al., 2020). Sabendo disso, estudar novas moléculas para o controle do desenvolvimento de Xcc torna-se peça chave para manutenção da qualidade do manejo de cancro.

Os peptídeos altamente membranolíticos Gr01 e K13 atuaram inibindo o desenvolvimento de Xcc *in* planta. Nessa perspectiva, esses peptídeos adotaram posição de destaque pois apresentaram porcentagem de eficiência de controle da bactéria de 87,3 e 75%, estatisticamente similares ao controle promovido pelo cobre. Este resultado promissor pode estar atrelado ao fato que os peptídeos membranolíticos que atuam como "detergente" costumam ter o modo de ação rápido quando ocorre a interação com a membrana alvo. Os peptídeos Guavanin-2 e Lin3 não apresentaram resultados satisfatórios para o controle de cancro *in planta*: Guavanin-2 tem alvo membranolítico porém atua hiperpolarizando a membrana plasmática das bactérias, ou seja, com o acúmulo dos peptídeos na membrana plasmática da bactéria em função do tempo existe

a lise pontual da membrana, expondo o conteúdo citoplasmático e levando a bactéria à morte celular. Lin3, diferente dos demais peptídeos avaliados, têm alvos intracelulares e também apresentam a tendência de levar a morte celular em função do tempo de exposição ao produto. Este resultado ainda é preliminar e mais estudos precisam ser realizados para comprovar a real eficiência desses peptídeos frente ao patossistema avaliado, porém, por meio dele é possível observar uma tendência para a maior eficiência no uso de peptídeos com modo de ação lítico para controle e morte de bactérias que apresentam o modo de colonização local, como seria o caso da Xcc.

No momento da chegada de um fitopatógeno invasor (bactéria, fungo, vírus) as plantas são capazes de reconhecê-los por meio dos PAMP's, MAMP's e expressar genes que podem codificar a secreção de substâncias antibióticas e/ou ativar o sistema de defesa vegetal. Entre as macromoléculas secretadas, os peptídeos se destacam: existem variadas classes de peptídeos de origem vegetal que têm propriedade antimicrobianas e são superexpressos no momento da competição microbiana (RAMIREZ-ESTRADA et al., 2016), como seria o caso das defensinas, cisteíno-peptidases, entre outras.

Alguns "peptídeos de defesa" sinalizam a resposta vegetal por meio da regulação de rotas bioquímicas: genes que determinam a expressão de hormônios reguladores como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ), etileno (ET) e ácido absísico (ABA) são ativados. A ativação desses metabolismos está relacionada ao sistema de resistência adquirida (SRA). Além desse mecanismo, quando a sinalização dessas vias metabólicas é feita artificialmente, antes da chegada do patógeno, as plantas apresentam uma tendência a responder ao ataque de maneira mais rápida e eficiente quando, futuramente, a infecção ou colonização se instalar nos tecidos vegetais (CONRATH et al., 2015), caracterizando o fenômeno de "*priming* vegetal".

Proteínas da família das flagelinas (flg22) são descritas como macromoléculas antibióticas, porém também apresentam a característica de eliciar o sistema de defesa de plantas (CHANG et al., 2017; CIARRONI et al., 2018, BLEVE et al., 2018). O peptídeo antibacteriano BP178, sequência quimérica composta por um fragmento do peptídeo mangaína + peptídeo BP100, apresenta atividade eliciadora do sistema de defesa vegetal de tomateiros e amendoeiras (MONTESINOS et al., 2021, BARÓ et al., 2022) quando acometidas pela bactéria *X. fastidiosa*, bactéria que também acomete a citricultura, causando a Clorose Variegada dos Citros (CVC). O peptídeo MaSamp, descrito como

antibiótico frente à *Candidatus* Liberibacter asiaticus também apresentou atividade eliciadora do sistema de defesa vegetal de plantas de *Citrus* (HUANG et al., 2021).

No presente estudo, foi reportado pela primeira vez que após a aplicação dos peptídeos antibióticos Gr01, K13 e Lin3 em plantas sadias, observou-se também a ativação da expressão dos alvos NPR1, BSMT1, PR2 e LOX, relacionados às vias de defesa do sistema de defesa vegetal , indicando uma possível dualidade da função dessas moléculas. Para os peptídeos eliciadores de defesa vegetal, HLB01 e HLB02 também foi detectada tal atividade, conforme esperado (MONTESINOS et al., no prelo). Assim como a literatura, não foi observada indução do sistema de defesa de plantas sadias após a aplicação de BP178, uma vez que tal peptídeo costuma ativar a indução dos genes de defesa vegetal na presença de um agente invasor (MONTESINOS et al., 2017; MOLL et al., 2021; OLIVERAS et al., 2022; BADOSA et al., 2022).

O gene NPR1 promove a regulação central da via do ácido salicílico na rota da resistência sistêmica adquirida (RSA), pela via da *isochorismate synthase* (ICS1) e é responsável por ativar a expressão de variados genes de resposta à resistência do patógeno ("PR-genes"). Dessa forma, a literatura aponta que a ativação de genes como NPR1 está diretamente relacionado com a ativação das proteínas relacionadas à patogênese PR1, PR2 e PR5, enquanto o aumento da expressão das proteínas PR3, PR4 e PR12 representam a ativação do metabolismo de ácido jasmônico (AJ) em plantas (HUANG et al., 2021; ALI et al., 2018; FU et al., 2013).

Analisando a expressão gênica de NPR1 promovida pelos peptídeos estudados, observou-se diferenças significativas no nível de expressão relativa 1 dia após a aspersão dos peptídeos, especialmente para os peptídeos Gr01, Guavanin-2 e Lin3, quando comparadas com o controle positivo (indutor ASM). Esse resultado viabiliza aplicações de ativação do sistema de defesa de laranjeiras, especialmente voltados para o patossistema do cancro cítrico, uma vez que *X. citri* demora 8-12 horas para colonizar o tecido vegetal (CARVALHO, 2006). Nesse contexto, a expressão precoce de genes de defesa vegetal após 24 horas da aspersão pode ser vantajosa.

Ademais, NPR1 foi superexpresso no tempo de 15 dias após a aspersão dos peptídeos Gr01 e HLB01. Considerando o patossistema do HLB, esse estímulo "tardio" dos genes de defesa se torna interessante, uma vez que segundo ALVES et al (2021), a curva de crescimento bactéria Las nas plantas se torna mais proeminente e inicia a fase

exponencial, após 12 dias da inoculação via psílideo. Esse tempo de sinalização mais longo também vislumbra aplicações de liberação/ativação prolongada, trazendo benefícios no contexto dos pomares e experimentos em campo.

O gene BSMT1 está relacionado à via do ácido salicílico, uma vez que é capaz de sinalizar as modificações de glicosilação e de metilação do AS, produzindo o éster glicosilado ou ácido salicílico glucosídeo e o metil salicilato (MeSA) (BOATWRIGHT, PAJEROWSKA-MUKHTAR et al., 2013). Muitos desses conjugados foram identificados como formas necessárias para aumentar a manipulação temporal e espacial de processos regulatórios da planta, principalmente, aqueles vinculados às possíveis respostas de defesa específicas de patógenos (LOAKE, GRANT., 2007). Os peptídeos HLB01, HLB02, Lin3 e o indutor ASM promoveram a superexpressão deste gene.

O gene PR2, que promove a síntese de 1,3-β-glucanases, enzimas capazes de degradar a parede celular de fungos, faz parte de uma classe complexa de "PR proteínas" (PASCHOLATI et al., 2008). O termo "proteínas PR" indica um grupo de diversas proteínas que são induzidas por fitopatógenos, bem como moléculas de sinalização relacionadas à defesa (MARTINS, et al., 2008). Nas vias naturais, após o desafio do patógeno, ocorre primeiramente a ativação das vias de sinalização de defesa, como ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA) (AMORIM et al., 2018). Em segundo plano, e de maneira mais específica, ocorre o acúmulo de proteínas PR que minimizam a carga de patógenos ou o início da doença em órgãos vegetais não infectados (ALI et al., 2018). Plantas tratadas com Gr01, Guavanin-2 e ASM, no tempo de 15 dias após a aspersão, promoveram a superexpressão de PR2. Essa ativação do sistema de defesa vegetal "tardio" corrobora, mais uma vez, para aplicações deste peptídeo no patossistema do HLB.

Os jasmonatos são dependentes de lipoxigenase (LOX) para o processo de oxidação do ácido linolênico e formação do ácido 13-(S)-hidroxiperoxi-octadecatrienóico, que será, posteriormente, metabolizado pela enzima aleno oxido sintase (AOS). Para LOX, os peptídeos HLB01 e HLB02 se destacaram no tempo de 15 DAA, com destaque para superexpressão pronunciada para o tratamento HLB01.

Após avaliar que os peptídeos do presente trabalho apresentavam atividade elicitora do sistema de defesa de laranjeiras saudáveis, foi proposto um experimento com plantas infectadas por Las, para desafiar e determinar a atividade elicitora de defesa dos

peptídeos no comportamento natural do patossistema de HLB, bem como, avaliar o efeito *priming* que a macromolécula pode produzir no sistema vegetal em questão.

Investigações de interações planta-inseto usando pulgões e afídeos (como modelo de insetos que se alimentam da seiva das plantas) descreveram que tais indivíduos são capazes de induzir a resposta imune dependente da ativação das vias do AS e AJ em plantas (WALLING, L. L, 2008). Investigações semelhantes e com foco em psilídeos corroboram com tais pesquisas e demonstraram sua capacidade de ativar o sistema de defesa vegetal (associados aos DAMPS, do inglês, "*damage associated molecular pattern*") e de induzir o acúmulo de AS e AJ em plantas (IBANEZ et al., 2022; IBANEZ et al., 2019).

Essa atividade eliciadora do sistema de defesa de plantas promovida pela presença do inseto infectado sadio também foi observada, onde, em 6 DAI, plantas que receberam os tratamentos peptídicos e plantas expostas aos insetos sadios induziram igualmente a expressão e produção do gene BSMT1, de acordo com as análises estatísticas. Essa afirmação indica que o reconhecimento dos DAMPs do psilídeo por meio dos receptores das laranjeiras foram capazes de ativar a produção de genes que estão relacionados à conversão do ácido salicílico em suas formas metiladas, que também são translocadas via floema (KAWANO e BOUTEOU, 2013).

Já para 22 DAI, foi possível observar que os tratamentos que promoveram maior destaque na expressão de BSMT1 (HLB02, Lin3 e ASM) tiveram a mesma indução observada nas plantas tratadas com água. Esse resultado indica que os peptídeos estudados não foram capazes de promover o aumento significativo da expressão do gene BSMT1.

Em 22 DAI nas plantas, de acordo com Alves e colaboradores (2021), a bactéria já conseguiu estabelecer a infecção e está aumentando exponencialmente o número de células/tecido foliar. Avaliando a expressão gênica de BSMT1, esse resultado evidencia, novamente, que os peptídeos estudados não foram capazes de promover o efeito *priming* e/ou antibiótico nas laranjeiras, nos tempos e condições avaliadas.

Para NPR1, no tempo de 22 DAI, o peptídeo BP178 foi eficiente para induzir o aumento da produção do gene, em plantas agora infectadas por Las. O gene NPR1 pode regular o sistema de defesa vegetal das plantas de Citrus por interagir com alguns fatores de transcrição e sua atividade de co-ativar processos de transcrição de genes do sistema

de resistência adquirida (SAR). Além disso, no momento da infecção (especialmente por microrganismos hemibiotróficos), NPR1 também age induzindo a expressão dos genes relacionados à patogênese (os 'PR-genes') (IBANEZ, F. et al., 2019; SUGANO, S. et al., 2010; WANG, et al., 2006; DELANEY, et al., 1995).

O peptídeo BP178 trata-se de uma quimera que apresenta função antibiótica e capacidade de induzir o sistema de defesa de plantas como tomateiros e amendoeiros (BARÓ et al., 2022; MONTESINOS, et al., 2021a; MONTESINOS, et al., 2021b). De acordo com o resultado do transcriptoma das amendoeiras infectadas com *Xylella fastidiosa*, bactéria causadora de uma doença que ataque o xilema das plantas, o tratamento com BP178 (via injeção), promoveu a superexpressão de 72 genes, sendo 31 deles relacionados ao metabolismo do AS, especialmente genes relacionados ao reconhecimento de patógenos e os 'PR-genes'.

Para PR2, no tempo de 22 DAI observamos que os peptídeos BP178 e HLB01 se destacaram na superexpressão do gene e tiveram diferença significativa entre os demais tratamentos (e controles) avaliados, contudo, ambos peptídeos induziram a transcrição de PR2 na mesma proporção. Para BP178 esse resultado corrobora com a literatura, uma vez que BP178 apresenta altas taxas de expressão de ‘PR-genes’, ligados ao metabolismo de AS (BARÓ et al., 2022). Para HLB01, essa atividade também é esperada, uma vez que tal peptídeo apresenta ação descrita como eliciador do sistema de defesa vegetal, especialmente para proteínas relacionadas à via biossintética do AS.

Para LOX, em 6 DAI, pode-se observar que a chegada do inseto sadio nas plantas destaca a indução do sistema de defesa das plantas, e que o inseto, sozinho, já foi capaz de produzir significativo aumento da indução do gene LOX nas plantas. Esse resultado também foi reportado no trabalho de Killiny e Nehela (2017), que indicaram que as plantas expostas aos ACP sadios tiveram maior ativação do ácido α-linoleico (precursor da via de AJ) em comparação às plantas expostas aos psilídeos Las+. Pode-se inferir ainda, que os tratamentos peptídicos se mostraram menos eficientes na expressão de tal gene, neste tempo de coleta.

Além disso, foi possível observar que a chegada da bactéria Las no floema das plantas pode suprimir o sistema de defesa das mesmas, observado pela repressão na expressão dos transcritos de LOX no tratamento controle (plantas tratadas com água:psilídeo Las+), no tempo avaliado. Esse efeito de supressão de genes mediada por

Las já foi descrito por Jain e colaboradores (2019; 2018 e 2015), avaliando que a bactéria reprime a expressão de peroxidases para evitar o efeito da peroxidação lipídica *in planta* induzida por ROS, prevenindo o acúmulo de oxilipinas e atrasa a ativação do sistema de defesa vegetal. Esse efeito pode ser mediado pelo gene LasBCP (CLIBASIA_RS00445), conservado em todas as sequências de *Candidatus* Liberibacter asiaticus descritos (JAIN et al., 2018).

Diferentemente, em 22 DAI, o peptídeo K13 se mostra como uma opção em destaque para possivelmente ativar a expressão de LOX e sinalizar a via do ácido jasmônico. A literatura aponta que a regulação da via de AJ nesses organismos pode exercer um papel importante na dificuldade do estabelecimento/bloqueio de infecções causadas por microrganismos (especialmente os necrotróficos) e herbívoros demonstrando assim, a relevância desse hormônio no tema indução de sistemas de defesa de organismos vegetais (BARI e JONES, 2009).

O gene LOX codifica a enzima lipoxygenase, que atua nos cloroplastos das folhas e a supressão deste gene em folhas de laranjeiras sugere as dificuldades na regulação e acúmulo do fitohormômio AJ (SUH et al., 2018), representando assim a importância desse gene na indução do sistema de defesa nas plantas. Os níveis de LOX são pouco expressos em plantas infectadas com Las (NWUGO et al., 2016; FAN et al 2011) e apesar de ter sido detectado que a presença de ACP sadio aumenta a expressão de LOX nas plantas, esse nível de transcritos é rapidamente atenuado com a chegada da bactéria (por meio de ensaios com borbulha infectadas e/ou insetos infectados) (KILLINY e NEHELA, 2017). Isso indica que a seleção de moléculas capazes de induzir o aumento da expressão de AJ em plantas infectadas com Las pode contribuir, indiretamente, para o controle do HLB, pelo menos nos estágios iniciais da infecção (JAIN et al., 2019).

Coincidentemente, os peptídeos BP178, K13 e HLB01, que adotaram posições de destaque na superexpressão dos genes de defesa vegetal, também apresentaram capacidade de atrasar e/ou reduzir a multiplicação da bactéria nas plantas, se tornando alvos em potencial para o manejo preventivo do patossistema do HLB, devido ao baixo número de plantas detectadas com Las mesmo 332 dias após a inoculação da bactéria (via psilídeo). Resultados semelhantes foram observados para BP178 (via endoterapia) frente à bactéria *Xylella fastidiosa* em amendoeiras, bactéria que também coloniza o xilema de laranjeiras, agente etiológico doença CVC (clorose variegada dos citros) (MOLL et al., 2022). Já os resultados obtidos para os peptídeos K13 e HLB01 são inéditos.

O peptídeo HLB01 desperta ainda maior interesse no manejo de HLB pois além de somente 10% das plantas tratadas estarem com a presença de Las, o título bacteriano nestas plantas foi no máximo de Log_{10}=3. Reduções no título de Las desta ordem de magnitude somente são atingidas em plantas cultivadas a 38°C (LOPES et al., 2009) e uma relação com o título bacteriano para aquisição de Las pode ser estabelecida. Esse resultado abre caminhos para outras reflexões: de acordo com Lopes e Cifuentes-Arenas (2021), psilídeos sadios alimentados de plantas (especialmente brotos jovens) com título Las igual a Log_{10}=3,12 apresentam aproximadamente 20% de probabilidade de adquirir Las, reduzindo as chances de disseminação de Las. Além disso, plantas com baixos títulos de Las apresentam menor severidade dos sintomas de HLB, quando comparadas com plantas que apresentam altos títulos da bactéria (DOUD et al., 2017).

Para explorar de maneira mais detalhada os efeitos do peptídeo K13 frente ao patossistema do HLB *in planta*, foi proposto um segundo experimento, mais criterioso e com maior número amostral. Neste experimento, observou-se em 94 DAI um total de 5 (que corresponde a 20%) plantas infectadas com Las, resultado este similar e coerente com o observado anteriormente, onde em 105 DAI detectou-se 10% de plantas positivas para Las. Além disso, no tempo de 94 DAI, foi observada a maior diferença do resultado de incidência acumulada para as amostras tratadas com K13 e controles, indicando que talvez este seja o tempo limite necessário para realizar uma nova aplicação do peptídeo, em experimentos futuros onde sejam avaliados a frequência de aplicação *x* viabilidade do uso dessas macromoléculas em grande escala.

Com base nos resultados expostos, pode-se afirmar que K13 apresenta-se como uma molécula peptídica candidata a ter mais estudos relacionados ao controle e manejo do HLB em plantas. Para isso, estudos futuros verificando a frequência de aplicação, formas variadas de *delivery* da molécula até o alvo (floema da planta) por meio de tecnologias de endoterapia e transformação genética de plantas, uso de tecnologias relacionadas ao aprimoramento da formulação, como nanotecnologia e/ou ancoragem com outras macromoléculas para favorecer o período de fixação dos peptídeos nas plantas (DILARRI, 2021), ou ainda, estudos mais aprofundados que relacionam a resposta biológica do psilídeo infectado com Las após a aplicação do peptídeo em plantas, entre outros, podem ser caminhos interessantes a serem percorridos neste horizonte.

Nos estudos de ontogenia (Quadros 4 e 5), os brotos tratados com K13 se desenvolveram de maneira mais rápida, ou seja, atingiram a maturidade do tecido foliar mais rapidamente que os brotos de plantas tratadas com água. É sabido que os psilídeos têm preferência por se alimentarem de brotos jovens, especialmente até os estágios V4 (SULE et al., 2012), assim como Las migram preferencialmente para tecidos jovens (RAIOL-JUNIOR, et al., 2021). Consequentemente, reduzir o tempo de exposição desses brotos à chegada dos insetos infectivos pode reduzir a taxa de transmissão de HLB entre as laranjeiras.

Apesar de menos reportado na literatura, além de atuarem no sistema de defesa e imunidade das plantas, foi determinado que alguns peptídeos vegetais se agrupam na família XI, que compreende receptores envolvidos no desenvolvimento e diferenciação das plantas. Isto poderia ser uma indicação de que os peptídeos poderiam operar em vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento das plantas sinalizando a indução de hormônios eu regulam o desenvolvimento das plantas, como seria o caso das auxinas e giberelinas, além da via indutora de resistência vegetal (BARTELS et al., 2013).

K13, que não é um peptídeo vegetal, contudo, também foi capaz de induzir a superexpressão de LOX em plantas infectadas, o que indica que ele pode estar sendo reconhecido como um ‘gatilho’ para o reconhecimento e transcrição de vegetais (PROPEPS), assim como ferimentos e genes relacionados a síntese de ácido jasmônico (AJ) (YAMAGUCHI et al., 2010). Acredita-se que os PROPEPS são clivados por peptídeos vegetais, e a partir dessa interação química, são permeados pela a membrana celular vegetal por dois receptores homólogos PEPR1 e PEPR2 (HUFFAKER et al., 2006).

Essa estratégia certamente seria insuficiente para ‘acabar’ com o HLB nos pomares, contudo, poderia ser aplicada, em conjunto com outros manejos, como uma medida para mitigar e reduzir os efeitos da doença. Para isso, estudos mais aprofundados avaliando a biologia do inseto em plantas que receberam o peptídeo deveriam ser realizados para afirmar, de maneira mais robusta, o efeito de K13 na aceleração do desenvolvimento foliar.

Devido à situação alarmante do *greening* nos EUA, o uso do antibiótico oxitetraciclina (OTC), molécula descoberta em 1948, foi aprovado para uso em pomares de laranjeiras desde 2017 pelo governo americano como opção para o manejo do HLB

(EPA, *Emergency Exemptions provisions of Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide*; WANG et al., 2015): por apresentar uma estrutura molecular reduzida e liberação prolongada, tal antibiótico consegue translocar bem na planta, sendo encontrados resíduos do produto no xilema, floema, folhas e raízes das laranjeiras (AL-RIMAWI, F. et al., 2019). Apesar da liberação americana no uso do produto, a literatura aponta que a endoterapia trata-se do único método eficiente para o controle e redução do título de Las no floema das plantas, de maneira que a aplicação foliar não permitiu a penetração de oxitetraciclina em concentrações suficientes, mesmo que feita juntamente com o uso de adjuvantes (VINCENT, et al., 2022).

Outra discussão a respeito do emprego da OTC nos pomares está relacionada ao seu amplo uso na alimentação animal, especialmente na piscicultura e avicultura, bem como, sua relação com o desenvolvimento do fenômeno de resistência microbiana, que pode se tornar, em breve, um problema de saúde pública devido ao uso indiscriminado do antibiótico. (ZURHELLE et al., 2000; MOG et al., 2020; IGBINOSA et al., 2016)

Propondo um comparativo entre o modo de ação da OTC e dos peptídeos descritos neste trabalho, é sabido que a OTC é uma representante da família das tetraciclinas, apresenta modo de ação conhecido como "intracelular", inibindo a síntese de proteínas, processo metabólico indispensável para a manutenção celular (DOWLING et al., 2017). Os mecanismos de resistência à OTC desenvolvidos pelas bactérias envolvem, principalmente: bomba de efluxo e mudança nos aminoácidos alvos da ligação com o ligante (DOWLING et al., 2017; CHOPRA et al., 2001). Diferentemente dos antibióticos tradicionais, os peptídeos membranolíticos (modo de ação de BP178, K13 e HLB01) fazem parte da 4ª (e última) geração de antibióticos: eles interagem e rompem drasticamente as membranas celulares por diferença de carga e polaridade, causando a morte celular, reduzindo a possibilidade de resistência bacteriana às macromoléculas (VENTURA.e NETO, 2023; WANG, G., 2015). A tendência para desenvolvimento de resistência bacteriana frente a moléculas membranolíticas é significativamente menor que àquela comparada aos mecanismos intracelulares.

Em outros patossistemas, o uso de produtos conhecidos como 'biológicos' , definido como a inibição direta ou indireta da doença, ou do patógeno causador da doença, por outro microrganismo endofítico (antagonista) ou pelos subprodutos antibióticos produzidos pela via fermentativa de microrganismos endofíticos de plantas, vem ganhando destaque e potencial aplicação biotecnológica. No trabalho de Dang e

colaboradores (2019) foram descritas que bactérias endofíticas do gênero *Bacillus spp*. de plantas do gênero Citrus apresentaram potencial antibiótico frente à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Contudo esse é um horizonte ainda pouco explorado no patossistema do HLB.

Diante desse contexto, entre as vantagens no uso de peptídeos para o manejo do HLB e outras doenças que atingem as plantas, destacam-se: são moléculas pequenas, sustentáveis, seletivas a um grupo de organismos, podem apresentar bifuncionalidade (como é o caso de BP178, K13 e HLB01) costumam ser a parte mais ativa de proteínas antibióticas, são facilmente sintetizadas quimicamente, o que agiliza os processos de *screening* e estudos de *docking*, apresentam potencial biotecnológico a ser aproveitado pelas estratégias de transformação de plantas e, eventualmente, CRISPr. Apesar dos peptídeos serem macromoléculas caras , seu emprego na indústria farmacêutica já é uma realidade , além disso, o desenvolvimento de novas estratégias para 'baratear' o processo de síntese química e purificação justificam a continuidade no investimento em pesquisas na área (STECKBECK et al., 2014; MENEGUZZI et al., 2017; HUANG et al., 2021; KORDI et al., 2023).

6. CONCLUSÕES

A metodologia de síntese química em fase sólida (SPPS) proposta para a produção das sequências peptídicas descritas foi eficiente. Todos os peptídeos foram devidamente identificados, caracterizados e purificados de acordo com os métodos definidos pelas técnicas de CLAE-FR e Espectrometria de Massas.

Os testes microbiológicos determinaram que os peptídeos Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Liberibacter crescens BT-1* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O modo de ação dos peptídeos BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 foi determinado como membranolítico, enquanto Lin3 é o único representante peptídico com alvo intracelular.

Os peptídeos Gr01 e K13 apresentaram maior eficiência no controle do desenvolvimento da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em casa vegetação, quando comparado com os demais peptídeos.

A atividade eliciadora de defesa vegetal em plantas sadias foi eficientemente determinada pelo método de expressão gênica. Conclui-se que em todos os alvos avaliados, algum peptídeo foi capaz de promover a superexpressão do gene: para BSMT1, HLB02 se destacou no tempo avaliado de 1 DAA. Já para LOX, HLB01 promoveu aumento significativo na expressão do gene foi promovido 15 DAA. Para NPR1, com 1 DAA o peptídeo Lin3 se destacou promovendo altos níveis de superexpressão do alvo, enquanto em 15 DAA o destaque foi para Gr01. Para finalizar, com relação a PR2, os peptídeos Gr01 e HLB01 se destacaram entre os demais sendo capazes de promover o aumento significativo da expressão do gene.

Para plantas infectadas com Las, no tempo de 6 DAI, os peptídeos induziram menores níveis de transcrição dos genes alvo que as plantas expostas aos insetos sadios. Já para 22 DAI, o gene LOX foi superexpresso em plantas tratadas com K13, enquanto BP178 foi o peptídeo promoveu maior superexpressão de NPR1. Para PR2, BP178 e HLB01 induziram maior expressão do gene. Para BSMT1, os peptídeos os tratamentos "controle" foram mais eficientes na indução da expressão do alvo.

Para a abordagem protetiva, os peptídeos que trouxeram resultados mais animadores foram BP178, K13 e HLB01 apresentando baixa incidência acumulada de

plantas infectadas por Las até o tempo de 332 DAI. K13, por sua vez, peptídeo que foi escolhido para ser avaliado em uma segunda sessão de experimentos com maior número amostral, demonstrou ter eficiência no controle do estabelecimento da infecção em até 94 DAI.

REFERÊNCIAS

ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. **Curr. Opin. Chem. Biol**., v. 8, p. 211-221, 2004.

ALI, S., GANAI, B.A., KAMILI, A.N., BHAT, A.A., MIR, Z.A., BHAT, J.A, GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212, p. 29-37, 2018.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**, v. 51, p. 35-45, 2014.

AL-RIMAWI, F, HIJAZ, F., NEHELA, Y., BATUMAN, O., KILLINY, N. Uptake, translocation, and stability of oxytetracycline and streptomycin in citrus plants. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 196, 2019.

ALVES, M.N., CIFUENTES-ARENAS, J., RAIOL-JUNIOR, L.L., FERRO, J.A., PENÃ, L. Early population dynamics of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" in susceptible and resistant genotypes after inoculation with infected *Diaphorina citri* feeding on young shoots. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 683923, 2021.

AMBLARD, M., FEHRENTZ, J.A., MARTINEZ, J., SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Peptide synthesis and applications,** p.3-24, 2005.

AMMAR, E. D.; RICHARDSON, M. L.; ABDO, Z.; HALL, D. G.; SHATTERS-JR, R. G. Differences in stylet sheath occurrence and the fibrous ring (sclerenchyma) between x Citroncirus plants relatively resistant or susceptible to adults of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **PLoS One**, v. 9, n.10, 2014.

AMORIM L., PASCHOLATI S., Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: Amorim L,Rezende JAM, Bergamin Filho A, 5ª Edição. **Manual de Fitopatologia: Príncipios e Conceitos** - vol I. Piracicaba, SP: Ceres, 46–70, 2018

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43-57, 2016.

ANGELO, J. M. de A. **Estudos de dimerização de peptídeos e os efeitos na inibição da atividade de DNA topoisomerases**. 137f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2021.

Anuáriao da Agricultura Brasileira, **AGRIANUAL**, 27ª Edição, 2022.

ATTARAN, E., ZEIER, T. E., GRIEBEL, T., ZEIER, J. Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, n. 3, p. 954-971, 2009.

BADOSA, E. FERRE, R., PLANAS, M., FELIU, L., BESLÁU, E., CABREFIGA, J., MONTESINOS, E. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. **Peptides**, v. 28, n. 12, p. 2276-2285, 2007.

BARBOSA, L.C.B. **Peptídeos derivados da toxina ParE: síntese, estrutura e ação inibitória sobre a atividade de topoisomerases.** Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2012.

BARI, R. A; JONES, J.D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant molecular biology**, v. 69, p. 473-488, 2009.

BARÓ, A., SALDARELLI, P., SAPONARI, M., MONTESINOS, E., MONTESINOS, L. *Nicotiana benthamiana* as a model plant host for Xylella fastidiosa: Control of infections by transient expression and endotherapy with a bifunctional peptide. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1061463, 2022.

BARTELS, S., LORI, M., MBENGUE, M., VAN VERK, M., KLAUSER, D., HANDER, T., BOLLER, T. The family of Peps and their precursors in Arabidopsis: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 17, p. 5309-5321, 2013.

BASSANEZI, R. B; MONTESINO, L. S.; STUCHI, E.S. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 565-572, 2009.

BAYSAL, Ö.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato *seedlings* against bacterial canker caused by Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis. **Plant pathology**, v. 52, n. 6, p. 747-753, 2003.

BEHLAU, F. E BELASQUE, J. Cancro Citrico – A Doença e Seu Controle. Araraquara, Brazil: **Fundecitrus**, 2014.

BEHLAU, F., SCANDELAI, L. H. M., SILVA JUNIOR, G. J., LANZA, F. E. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Prot**. n. 89, p. 185-191, 2017.

BEHLAU, F.; GOCHEZ, A. M.; JONES, J. B. Diversity and copper resistance of Xanthomonas affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 200-212, 2020.

BEHLAU, F.; LANZA, F.E.; DA SILVA SCAPIN, M.; SCANDELAIS, L.H.; SILVA JUNIOR, G.J. Spray volume and rate based on the tree row volume for a sustainable use of copper in the control of citrus canker. **Plant Disease**, v. 105, n. 1, p. 183-192, 2021.

BEIRIGO, S. P. J., TORQUATO, H. F., DOS SANTOS, C. H., CARVALHO, M. G. D., CASTRO, R. N., PAREDES-GAMERO, E. J., DA SILVA, V. C.[1-8-NαC]-Zanriorb A1, a Proapoptotic Orbitide from Leaves of *Zanthoxylum riedelianum*. **Journal of natural products**, v.5, n. 79, p. 1454-1458, 2016.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lisogenic Escherichia coli. **Journal Bacteriology**, v. 62, p. 293-300, 1951.

BLEVE, G., GALLO, A., ALTOMARE, C., VURRO, M., MAIORANO, G., CARDINALI, A. *In vitro* activity of antimicrobial compounds against *Xylella fastidiosa*, the causal agent of the olive quick decline syndrome in Apulia. **FEMS Microbiol**. 2018.

BOATWRIGHT, J. L.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. Salicylic acid: an old hormone up to new tricks. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 6, p. 623-634, 2013.

BOLDT, J. L.; PINILLA, C.; SEGALL, A. M. Reversible inhibitors of λ integrase-mediated recombination efficiently trap holiday junction intermediates and form the basis of a novel assay for junction resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3472-3483, 2004.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. J. **Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p.7-37, 2006.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: **Interação planta-patógeno**. v.13. Piracicaba:FEALQ, 2008. cap 9, p.305-346.

BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews microbiology,** v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BRUNETT, P.G.G., YOUNG, L.W., OLIVIA, C.M., JADHAV, P.D., OKINYO-OWITI, D.P., REANEY, M.J.T. Novel flax orbitide derived from genetic deletion. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 90, 2018.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x, 2004

BURCKHARDT, D.; OUVRARD, D.; PERCY, D. M. An updated classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) integrating molecular and morphological evidence**. European Journal of Taxonomy**, v. 736, p. 137-182, 2021.

BUSH, N.; EVANS-ROBERTS, K.; MAXWELL, A. DNA Topoisomerases. **EcoSal Plus**, 6, n.2, 2015.

CANALE, M.C.; KOMADA, K.M.A.; LOPES, J.R.S. Latency and incubation of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' in citrus after vector inoculation. **Trop. Plant Pathol**., n. 45, p. 320-326, 2019.

CAPOOR, S.P.; RAO, D.G.; VISWANATH, S.M. Diaphorina citri Kuwayama, a vector of the *Greening* disease of citrus in India. **Indian J. Agric. Sci**., 37: 572-576, 1967.

CARAVACA-FUENTES, P., CAMÓ, C., OLIVERAS, À., BARÓ, A., FRANCÉS, J., BADOSA, E. A Bifunctional peptide conjugate that controls infections of *Erwinia amylovora* in pear plants. **Molecules**. 2021.

CARRIJO, R.S. **Caracterização funcional e estrutural da toxina GhoT de *Salmonella enterica* e de peptídeos sintéticos derivados com potencial capacidade de interação**

com membranas biológicas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Química, Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 73f. 2018.

CARVALHO, Flávia Maria de Souza. **Expressão gênica em Xanthomonas axonopodis pv. citri controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 2006. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CASSELL, G.; KLEMM, M.; PINILLA, C.; SEGALL, A. Dissection of bacteriophage lambda site-specific recombination using synthetic peptide combinatorial libraries. **Journal of molecular biology**, 299, n. 5, p. 1193-1202, 2000.

CHAMPE, P. C., HARVEY R. A., FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada.** 4ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach, New York, **Oxford University Press**, 2000.

CHAN, W.C., EHITE, P.D. Fmoc solid phase peptide synthesis. United States, **New York: Oxford University Press**, 2004.

CHANG, X., SEO, M., TAKEBAYASHI, Y., KAMIYA, Y., RIEMANN, M., NICK, P. Jasmonates are induced by the PAMP flg22 but not the cell death-inducing elicitor Harpin in Vitis rupestris**. Protoplasma** 254, 271–283. 2017.

CHEN, C. H.; LU, T. K. Development and challenges of antimicrobial peptides for therapeutic applications. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 24, 2020.

CHEN, F., D'AURIA, J. C., THOLL, D., ROSS, J. R., GERSHENZON, J., NOEL, J. P., e PICHERSKY, E. An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. **The Plant Journal**, v. 36, n.5, p. 577-588, 2003.

CHEN, M.H.; MIYAKAWA, T.; MATSUI, C. Citrus Likubin pathogens in salivary glands of *Diaphorina citri.* **Phytopathol.,** 63: 194-195, 1973.

CHEN, Z., ZHENG, Z., HUANG, J., LAI, Z., FAN, B. Biosynthesis of salicylic acid in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 6, p. 493-496, 2009.

CHOPRA, I; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CIARRONI, S., CLARK, C. R., LIU, H., ECKSHTAIN-LEVI, N., MAZZAGLIA, A., BALESTRA, G. M. A recombinant flagellin fragment, which includes the epitopes flg22 and flgII-28, provides a useful tool to study flagellin-triggered immunity. **J. Gen. Plant Pathol**. v, 84, p. 169–175, 2018.

CIFUENTES-ARENAS, J. C., BEATTIE, G. A. C., PEÑA, L., LOPES, S. A. *Murraya paniculata* and *Swinglea glutinosa* as short-term transient hosts of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' and implications for the spread of huanglongbing. **Phytopathology**, v. 109, n. 12, p. 2064-2073, 2019.

CIFUENTES-ARENAS, J. C.; DE GOES, A.; MIRANDA, M. P.; BEATTIE, G.A.; LOPES, S. A. Citrus flush shoot ontogeny modulates biotic potential of *Diaphorina citri*. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0190563, 2018.

CLSI. *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute*. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards-6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA., 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja, Terceiro Levantamento. Brasília: **CONAB**, p. 11, 2013.

CONCEIÇÃO, M. B da. **Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2018.

CONRATH, U., BECKERS, G. J. M., LANGEBACH, C. J. G., JASKIEWICZ, M. R. Priming for enhanced defense. **Annu. Rev. Phytopathol**. 53, 97–119. 2015.

COOKSEY D. A. Copper uptake and resistance in bacteria. **Molecular Microbiology**, 1993.

CREELMAN, Robert A.; MULLET, John E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual review of plant biology**, v. 48, n. 1, p. 355-381, 1997.

CRUSCA JR, E.; BASSO, L.G.; ALTEI, W.F.; MARCHETTO, R. Biophysical characterization and antitumor activity of synthetic Pantinin peptides from scorpion's venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 11, p. 2155-2165, 2018.

DALA-PAULA, B. M.; PLOTTO, A.M.; BAI, J.; MANTHEY, J.A.; BALDWIN, E.A.; FERRAREZI, R.S.; GLORIA, M.B.A. Effect of huanglongbing or *greening* disease on orange juice quality, a review. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1976, 2019.

DANG, H. A.; NGUYEN, D. K.; LE, N. X. T. Selection of carrier materials for formulation of the antagonistic Bacillus spp. against rice bacterial leaf blight. **Can Tho University Journal of Science**, v. 11, n. 3, p. 19-27, 2019.

DAROLT, J. C., FASSINI, C. G., WULFF, N. A., DI PIERO, R. M. Gene expression of salicylic acid and jasmonic acid pathways and photosynthesis parameters of sweet orange trees in response to acibenzolar-S-methyl. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 691-700, 2020.

DATTA, S.; ROY, A. Antimicrobial Peptides as Potential Therapeutic Agents: A Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, p. 555–577, 2021.

DAUNGFU, O; YOUPENSUK, S; LUMYONG, S. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants**. Tropical life sciences research**, v. 30, n. 1, p. 73, 2019.

DAVIES, J.S. The cyclization of peptides and depsipeptides. **Journal of peptide sciences**, v.9, n.8, 2003.

DELANEY, T. P.; FRIEDRICH, L.; RYALS, J. A. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 14, p. 6602-6606, 1995.

DEMPSEY, D. M. A.; VLOT, A. C.; WILDERMUTH, M. C.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. **The Arabidopsis Book**, 2001.

DEMPSEY, D.'M., VLOT, A. C., WILDERMUTH, M. C., KLESSIG, D. F. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. **The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologist**s, v. 9, 2011.

DERKSEN, H.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Signaling cross-talk in plant disease resistance. **Plant science**, v. 207, p. 79-87, 2013.

DILARRI, Guilherme. **Proteção de citros com peptídeos antibacterianos e galatos.** Tese de Doutorado (Programa de Microbiologia Agrícola). 133f. 2021.

DOUD, M. M., WANG, Y., HOFFMAN, M. T., LATZA, C. L., LUO, W., ARMSTRONG, C. M., DUAN, Y. Solar thermotherapy reduces the titer of *Candidatus* Liberibacter asiaticus and enhances canopy growth by altering gene expression profiles in HLB-affected citrus plants. **Horticulture Research**, v. 4, 2017.

DOWLING, A.; O'DWYER, J.; ADLEY, C. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. **Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs**, v. 1, p. 536-545, 2017.

DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. G.; WILLIAMS K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. **Molecular Plantmicrobe Interactions**, v. 22, n. 8, p.1011-1020, 2009.

DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D.G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C.M.; GABRIEL, D.W.; WILLIAMS, K.P. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. **Mol. Plant Microbe Interact**.v. 22, p.1011–1120, 2009.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual review of phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 235-264, 1986.

FAGEN J, LEONARD MT, MCCULLOUGH CM, TRIPLETT EW, DAVIS MJ. Liberibacter crescens gen.nov; sp. nov. first cultured member of the Liberibacter genus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, 2012.

FAN, J., CHEN, C., YU, Q., BRLANSKY, R. H., LI, Z. G., GMITTER JR, F. G. Comparative iTRAQ proteome and transcriptome analyses of sweet orange infected by "*Candidatus* Liberibacter asiaticus". **Physiologia plantarum**, v. 143, n. 3, p. 235-245, 2011.

FELISBERTO, Patrícia Aparecida de Carvalho. **Rutáceas como potenciais hospedeiros de Diaphorina citri e reservatório de *Candidatus* Liberibacter asiaticus**. Tese

(Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2018

FERENCE, C. M., GOCHEZ, A. M., BEHLAU, F., WANG, N., GRAHAM, J.H., JONES, J.B. Recent advances in the understanding of Xanthomonas citri ssp. citri pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 6, p. 1302, 2018.

FEUSSNER, I., Wasternack, C., Kindl, H., & Kühn, H. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 25, p. 11849-11853, 1995.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nat. Rev. Drug. Discov**., v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020). Faostat. Available at: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. [Accessed out. 2023].

FOX, M. A. et al. Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. **Peptides**, v. 33, n. 2, p. 197-205, 2012.

FRANCIS, M., REDONDO, A., BURNS, J. K., GRAHAM, J. H. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 283-292, 2009.

FU, Z. Q., DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 839-863, 2013.

FUKUSHIMA, R.S., WEIMER, P.J. AND KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic Clostridium species. **Brazilian Journal of Microbiology**, p .22-26, 2003.

FUNDECITRUS, **Pesquisa de Estimativa de Safra, PES**. Disponível em:< https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0423_Fechamento_da_Safra_de_Laranja.pdf > Acesso: out, 2023

FUNDECITRUS. **Fundo De Defesa Da Citricultura**. Disponível em: < https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202324-docinturao-citricola-de-sp-e-mg-e-estimada-em-30934-milhoes-de-caixas/1317> - Acesso em out. 2023

GOTTWALD, T. R.; GRAÇA, J. V. da; BASSANEZI, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress,** v. 8, n. 1, p. 31, 2007.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus Canker: The Pathogen and Its Impact Plant Health Progress Plant Health Progress. **Plant Management Network**., v. 1993, p. 48824, 2002.

GOTTWALD, T.; GRAHAM, J. A Device for Precise and Nondisruptive Stomatal Inoculation of Leaf Tissue with Bacterial Pathogens. **Phytopathology**. v. 82, p.930-935 p. 1992.

GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P. Lack of Control of Citrus Canker by Induced Systemic Resistance Compounds. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 745-750, 2004.

GÜELL, I., CABREFIGA. J., BADOSA. E., FERRE. R., TALLEDA. M., BARDAJI. E., MONTESINOS. E. Improvement of the efficacy of linear undecapeptides against plant-pathogenic bacteria by incorporation of D-amino acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 8, p. 2667-2675, 2011.

HABIBOLAHI, F.; HOSSEINIPOUR, A.; LOHRASBI-NEJAD, A. Antibacterial activity of the CAP18 peptide against *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, the causative agent of citrus canker, as evaluated by in vitro and in silico studies. **Annals of Applied Biology**, 2022.

HALBERT, S., MANJUNATH, K., RAMADUGU, C., LEE, R. F. Incidence of huanglongbing-associated 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in Diaphorina citri (Hemiptera: Psyllidae) collected from plants for sale in Florida. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 3, p. 617-624, 2012.

HILDEBRAND, David F. Lipoxygenases. **Physiologia Plantarum**, v. 76, n. 2, p. 249-253, 1989.

HU, Y., ZHI, L., LI, P., T HANCOCK, J. T., HU, X. The role of Salicylic acid signal in plant growth, development and abiotic stress. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**, v. 91, n. 12, 2022.

HUANG, C. et al. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, 2021.

HUANG, C. Y., ARAUJO, K., SÁNCHEZ, J. N., KUND, G., TRUMBLE, J., ROPER, C., JIN, H. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing**. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, 2021.

HUANG, H. W. DAPTOMYCIN, its membrane-active mechanism vs. that of other antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1862, n. 10, p. 183395, 2020.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 26, p. 10098-10103, 2006.

IBANEZ, F., SUH, J. H., WANG, Y., RIVERA, M., SETAMOU, M., STELINSKI, L. L. Salicylic acid mediated immune response of *Citrus sinensis* to varying frequencies of herbivory and pathogen inoculation. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-16, 2022.

IBANEZ, F., SUH, J. H., WANG, Y., STELINSKI, L. L.Long-term, sustained feeding by Asian citrus psyllid disrupts salicylic acid homeostasis in sweet orange. **BMC plant biology,** v. 19, n. 1, p. 1-15, 2019.

IGBINOSA, E. O. Detection and antimicrobial resistance of Vibrio isolates in aquaculture environments: implications for public health. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 3, p. 238-245, 2016.

IRIGOYEN, S., RAMASAMY, M., PLANT, S., NIRAULA, P., BEDRE, R., GURUNG, M., MADADI, K.K. Plant hairy roots enable high throughput identification of antimicrobials against *Candidatus* Liberibacter spp. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.

JACIANI, Fabrício José. **Diversidade genética de espécies de Xanthomonas patogênicas a citros baseada em genes avr e leucine protein.** 2008. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinárias. Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

JAIN, M., CAI, L., BLACK, I., AZADI, P., CARLSON, R.W., JONES, K., GABRIEL, D. W. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus'-encoded BCP peroxiredoxin suppresses lipopolysaccharide-mediated defense signaling and nitrosative stress in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 35, n. 3, p. 257-273, 2022.

JAIN, M.; FLEITES, L. A.; GABRIEL, D. W. Prophage-encoded peroxidase in *'Candidatus* Liberibacter asiaticus' is a secreted effector that suppresses plant defenses. **Mol. Plant Microbe Interact**., v. 28, p.1330–1337, 2015.

JAIN, MUKESH, MUNOZ-BODNAR, A., ZHANG, S., GABRIEL, D. W. A secreted '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' peroxiredoxin simultaneously suppresses both localized and systemic innate immune responses in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 12, p. 1312-1322, 2018.

JAIN, MUKESH; FLEITES, LAURA A.; GABRIEL, DEAN W. Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is a secreted effector that suppresses plant defenses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 12, p. 1330-1337, 2015.

JAIN, MUKESH; MUNOZ-BODNAR, ALEJANDRA; GABRIEL, DEAN W. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' peroxiredoxin (LasBCP) suppresses oxylipin-mediated defense signaling in citrus. **Journal of plant physiology**, v. 236, p. 61-65, 2019.

JENSSEN, H.; HAMIL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. Clinical **Microbiology Reviews**, https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05, 2020

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v.34 n.2 1970.

KAWANO T, BOUTEAU F. Salicylic Acid-Induced Local and Long-Distance Signaling Models in Plants. **In: Baluška F (ed) Long-Distance Systemic Signaling and Communication in Plants**. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 23–52, 2013.

KILLINY, N.; NEHELA, Y. Metabolomic response to Huanglongbing: Role of carboxylic compounds in *Citrus sinensis* response to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' and its vector, *Diaphorina citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 8, p. 666-678, 2017.

KIM, J-S, UMA S. S., JACQUELINE K. B., JIAN-LIANG L, e NIAN W. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' infection: microscopy and microarray analyses. **Phytopathology**, n. 1, v. 99, p.50-57, 2009.

KISHI, R. N., STACH-MACHADO, D., SINGULANI, J. D. L., DOS SANTOS, C. T., FUSCO-ALMEIDA, A. M., CILLI, E. M., MACHADO, M. A. Evaluation of cytotoxicity features of antimicrobial peptides with potential to control bacterial diseases of citrus. **PLoS One**, v. 13, n. 9, 2018.

KISHI, R.N.I., MACHADO, D.S., SINGULANI, J.L., dos SANTOS, T.V., FUSCO-ALMEIDA, A.M., CILLI, E.M., FREITAS-ASTÚA, J., PICCHI, S.C., MACHADO, M.A. Evaluation of cytotoxicity features of antimicrobial peptides with potential to control bacterial diseases of citrus. **PloS one**, v. 13, n. 9, p. e0203451, 2018.

KLEMM, M.; CHENG, C.; CASSELL, G.; SHUMAN, S. et al. Peptide inhibitors of DNA cleavage by tyrosine recombinases and topoisomerases. **Journal of Molecular Biology**, 299, n. 5, p. 1203-1216, 2000.

KORDI, M., BORZOUYI, S., CHITSAZ, S. Antimicrobial peptides with anticancer activity: Today status, trends and their computational design. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 733, p. 109484, 2023.

KRETZSCHMAR, Ruben et al. Experimental determination of colloid deposition rates and collision efficiencies in natural porous media. **Water Resources Research**, v. 33, n. 5, p. 1129-1137, 1997.

LE, T., YU, H., ZHAO, Z., WEI. W. Development of a monoclonal antibody-based ELISA for the detection of oxytetracycline and 4-epi-oxytetracycline residues in chicken tissues. **Analytical letters**, v. 45, n. 4, p. 386-394, 2012.

LEE, T.; HOFFEREK, V.; SEPAROVIC, F.; REID, G. E.; AGUILAR, M. The role of bacterial lipid diversity and membrane properties in modulating antimicrobial peptide activity and drug resistance. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 52, p. 85-92, 2019.

LEONARD, M. T.; FAGEN, J. R.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DAVIS, M. J.; TRIPLETT, E. W. Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, p. 271-283, 2012.

LI, J., PANG, Z., TRIVEDI, P., ZHOU, X., YING, X., JIA, H., WANG, N. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' encodes a functional salicylic acid (SA) hydroxylase that degrades SA to suppress plant defenses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 8, p. 620-630, 2017.

LI, J.; PANG, Z.; TRIVEDI, P.; ZHOU, X.; YING, X.; JIA, H.; WANG, N. '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' encodes a functional salicylic acid (SA) hydroxylase that degrades sa to suppress plant defenses. **Mol Plant Microbe Interact**., v. 30, n. 8, p. 620-630, 2017

LI, N., HAN, X., FENG, D., YUAN, D., e HUANG, L. J. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 671, 2019.

LI, S., WU, F., DUAN, Y., SINGERMAN, A., GUAN, Z. Citrus *greening*: Management strategies and their economic impact. **HortScience**, v. 55, n. 5, p. 604-612, 2020.

LI, S.; WANG, Y.; XUE, Z.; JIA, Y.; LI, R.; HE, C.; CHEN, H. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 103-115, 2021

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. **Journal of microbiological methods**, v. 66, n. 1, p. 104-115, 2006.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus Huanglongbing. **J. Microbiological Methods**, v. 66, p. 104–115, 2006.

LIEVENS, L., POLLIER, J., GOOSSENS, A., BEYAERT, R., e STAAL, J. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 587, 2017.

LOAKE, G., GRANT, M. Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. **Current opinion in plant biology**, v.10, p.5, 466-472, 2007.

LOPES, S. A., CIFUENTES-ARENAS, J.C. Protocol for successful transmission of '*Candidatus* liberibacter asiaticus' from citrus to citrus using *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, v. 111, n. 12, p. 2367-2374, 2021.

LOPES, S. A., FRARE, G. F., BERTOLINI, E., CAMBRA, M., FERNANDES, N. G., AYRES, A. J., BOVÉ, J. M. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant,'Ca. L. americanus' is heat sensitive. **Plant Disease**, v. 93, n. 3, p. 257-262, 2009.

LORENZÓN, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dos peptídeos antimicrobianos Aureína 1.2 e Magainina 2.** 116f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2015.

LORENZÓN, E. N. **Efeitos da dimerização na estrutura e atividade biológica dospeptídeos antimicobianos Aureína 1.2 e Magainina 2**. 2015. 117 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

MA, W., PANG, Z., HUANG, X., XU, J., PADEY, S. S., LI, J., WANG, N. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. **Nature Communications**, n. 13, p. 1-13, 2022.

MACHADO, F.J., MARIN, T. G. D. S., CANÔAS, F., DA SILVA JUNIOR, G. J., BEHLAU, F. Timing of copper sprays to protect mechanical wounds against infection by

Xanthomonas citri subsp. *citri*, causal agent of citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 683-692, 2021.

MAFRA, V., KUBO, K. S., ALVES-FERREIRA, M., RIBEIRO-ALVES, M., STUART, R. M., BOAVA, L. P., MACHADO, M. A. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions**. PloS one**, v.7, n. 2012.

MAFRA, V.; KUBO, K.S.; ALVES-FERREIRA, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; STUART, R.M.; BOAVA, L.P.; RODRIGUES, C.M.; MACHADO, M. A. Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. **Plos one**, v. 7, n. 2, 2012.

MALIK, A. N. A.; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 963, 2020.

MANJUNATH, K. L.; HALBERT, S. E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R. F. Detection of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus Huanglongbing in Florida. **Phytopathology**, v. 98, p. 387-396, 2008.

MARCOS, J. F., MUNOZ, A., PÉREZ-PAYÁ, E., MISRA, S., LÓPEZ-GARCÍA, B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. **Annu. Rev. Phytopathol**., v. 46, p. 273-301, 2008.

MARIN, T. G. S., GALVANIN, A. L., LANZA, F. E., & BEHLAU, F. Description of copper tolerant Xanthomonas citri subsp. citri and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. **Plant Pathology**, v. 68, n. 6, p. 1088-1098, 2019.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self defence? Magainins and tachyplesins as archetypes, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, p.1-10, 1999.

MCCLEAN, A.P.D.; OBERHOLZER, P.C.J. (1965). Citrus psylla, a vector of the *greening* disease of sweet orange. **South. Afr. J. Agric. Sci.,** 8: 297-298.

MENEGUZZI, M., PISSETTI, C., REBELATTO, R., KUCHIISHI, S.S., COSTA, A.T.R., GUEDES, R. M.C, LEAO, J.A., KICH, J.D. Resistência a colistina em isolados de Salmonella de casos clínicos de suínos no Brasil. **XVIII Congresso da ABRAVES**, 2017.

MENGER, R. F., REHBERG, R.A., TRIVEDI, P., HENRY, C.S., BORCH, T High Spatial Resolution Fluorescence Imagery for Optimized Pest Management in a Huanglongbing-Infected Citrus Grove. **Phytopathology**, v. 112, n. 1, p. 173-179, 2022.

MERFA, M. V.; FISCHER, E.R.; DE SOUZA E SILVA, M.; FRANCISCO, C.S.; DELLA COLETTA-FILHO, H.; DE SOUZA, A.A. Probing the application of OmpA-

derived peptides to disrupt the acquisition of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' by *Diaphorina citri***. Phytopathology**, v. 112, n. 1, p. 163-172, 2022.

MERFA, M.V., PÉREZ-LÓPEZ, E., NARANJO, E., JAIN, M., GABRIEL, D.W., DE LA FUENTE, L. Progress and obstacles in culturing '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', the bacterium associ-ated with huanglongbing. **Phytopathology**, 2019

MERI, S. Complement activation in diseases presenting with thrombotic microangiopathy. **European journal of internal medicine**, v. 24, n. 6, p. 496-502, 2013.

MOG, M., NGASOTTER, S., TESIA, S., WAIKHOM, D., PANDA, P., SHARMA, S., VARSHNEY, S. Problems of antibiotic resistance associated with oxytetracycline use in aquaculture: A review. **J. Entomol. Zool. Stud**, v. 8, p. 1075-1082, 2020.

MOLL, L.; BARÓ, A.; MONTESINOS, L.; BADOSA, E.; BONATERRA; A., MONTESINOS, E. Induction of defense responses and protection of almond plants against *Xylella fastidiosa* by endotherapy with a bifunctional peptide. **Phytopathology,** 2021.

MONTESINOS, L, L., BARÓ, A., GASCÓN, B., MONTESINOS, E. Bactericidal and plant defense elicitation activities of Eucalyptus oil decrease the severity of infections by Xylella fastidiosa on almond plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1122218, 2023.

MONTESINOS, L., BUNDÓ, M., BADOSA, E., SAN SEGUNDO, B., COCA, M., MONTESINOS, E. Production of BP178, a derivative of the synthetic antibacterial peptide BP100, in the rice seed endosperm. **BMC plant biology**, v.17, p.1-14, 2017.

MORÃO, Luana Galvão. **Chalconas e curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cítrico e alguns patógenos de interesse clínico**. 145f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Rio Claro, Instituto Biológico, UNESP, 2018.

MUR, L. A. J., PRATS, E., PIERRE, S., HALL, M. A., e HEBELSTRUP, K. H. Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 215, 2013.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W. F Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids RES**., V, 8, P.4321-4325, 1980.

MURZYN, K.; RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Phosphatidylethanolamine phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. **Biophys. J.,** v. 88, n. 2, p. 1091-1103, 2005.

MURZYN, K.; RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Phosphatidylethanolamine phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. **Biophys.J**., v. 88, n. 2, p. 1091-1103, 2005.

NAEEM, A., NAEEM, A., AFZAL, M. B. S., FREED, S., HAFEEZ, F., ZAKA, S. M., ALI, Q., NAWAZ, M. First report of thiamethoxam resistance selection, cross resistance to various insecticides and realized heritability in Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* from Pakistan. **Crop Protection**, v. 121, p. 11-17, 2019.

NEVES, M. F.; TROMBIN, N. G. **Anuário da Citricultura**. São Paulo: CitrusBR, 2017, 57p. 2017

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; KALAKI, R. Peeling back the citrus in Brazil: mapping and quantification of the brazilian citrus chain. **Citrus Research & Technology**, v. 35, n. 2, p. 45-60, 2017.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 369-389, 1992.

NWUGO, CHIKA C., DOUD, M. S., DUAN, Y. P., LIN, H. Proteomics analysis reveals novel host molecular mechanisms associated with thermotherapy of '*Ca.* Liberibacter asiaticus'-infected citrus plants. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2016.

O'BRIEN, J.; WLSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry,** West Sussex, v. 267, n.17, p.5421-5426, 2000.

OLIVA, R.; CHINO, M.; PANE, K.; PISTORIO, V.; PETRACCONE, L. Exploring the role of unnatural amino acids in antimicrobial peptides. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

OLIVEIRA, T. B., , DE OLIVEIRA, M. C. N., de ALVARENGA, A. A., HOFFMANN-CAMPO, C. B., AMAURI ALVES DE ALVARENGA. Acúmulo de compostos fenólicos na indução de resistência a *Phakopsora pachyrhizi*. **Encontro brasileiro de ecologia química**, v. 8, p. 4-4, 2013.

OLIVERAS, À., CAMÓ, C., CARAVACA-FUENTES, P., MOLL, L., RIESCO-LLACH, G., GIL-CABALLERO, S., PLANAS, M. Peptide Conjugates Derived from flg15, Pep13, and PIP1 That Are Active against Plant-Pathogenic Bacteria and Trigger Plant Defense Responses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 12, 2022.

ONUMA, Y.; SATAKE, M... YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PARK, S. W., KAIMOYO, E., KUMAR, D., MOSHER, S., & KLESSIG, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 113-116, 2007.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B., STANGARLIN, J. R., CIA, P. **Interação Planta Patógeno–Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Volume 13. Piracicaba: FEALQ, 2008.

PIETERSE, C. M., VAN WEES, S. C., HOFFLAND, E., VAN PELT, J. A., VAN LOON, L. C. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent

of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **The Plant Cell**, v. 8, n. 8, p. 1225-1237, 1996.

PINTO, Meri Emili Ferreira. **Peptídeos cíclicos em espécies do semiárido brasileiro e uma cultivada: caracterização e atividade biológica.** 2013. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

POMMIER, Y.; SUN, Y.; HUANG, S.-Y. N.; NITISS, J. L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 17, n. 11, p. 703-721, 2016.

PORTO, W. F.; IRAZAZABAL, L., ALVES, E.S., RIBEIRO, S.M., MATOS, C.O., PIRES, A.S. *In silico* optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.

Proteínas relacionadas à patogênese. In. MARTINS, E.M.F. **Interação planta-patógeno. Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba:FEALQ, 2008.p.387-410.

RAIOL-JUNIOR, L. L., CIFUENTES-ARENAS, J. C., CUNNIFFE, N. J., TURGEON, R., & LOPES, S. A. Modeling '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' movement within citrus plants. **Phytopathology,** v. 111, n. 10, p. 1711-1719, 2021.

RAMADA, M. H. S., BRAND, G. D., ABRÃO, F. Y., OLIVEIRA, M., CARDOZO FILHO, J. L., GALBIERI, R., BLOCH, C. Encrypted antimicrobial peptides from plant proteins. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 13263, 2017.

RAMALHO, S. D. et al. Biologically active orbitides from the Euphorbiaceae family. **Planta medica**, v. 84, n. 09/10, p. 558-567, 2018.

RAMALHO, S. D., WANG, C. K., KING, G. J., BYRIEL, K. A., HUANG, Y. H., BOLZANI, V. S., & CRAIK, D. J. Synthesis, racemic X-ray crystallographic, and permeability studies of bioactive orbitides from Jatropha species. **Journal of natural products**, v. 81, n. 11, p. 2436-2445, 2018.

RAMIREZ-ESTRADA, K., VIDAL-LIMON, H., HIDALGO, D., MOYANO, E., GOLENIOSWKI, M., CUSIDÓ, R. M., PALAZON, J. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 182, 2016.

ROCHA, C.A. **Síntese, estrutura e atividade biológica do peptídeo WRWYCRCK e de seus análogos diméricos**. 174f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2018.

RODRÍGUEZ, A., SHIMADA, T., CERVERA, M., ALQUÉZAR, B., GADEA, J., GÓMEZ-CADENAS, A., PEÑA, L. Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens. **Plant Physiology**, v. 164, n. 1, p. 321-339, 2014.

ROY, A., D'ANNESSA, I., NIELSEN, C. J., TORDRUP, D., LAURSEN, R. R., KNUDSEN, B. R., ANDERSEN, F. F. Peptide inhibition of topoisomerase IB from *Plasmodium falciparum*. **Molecular biology international**, v. 2011, 2011.

RUIZ, C., NADAL, A., MONTESINOS, E., PLA, M. Novel Rosaceae plant elicitor peptides as sustainable tools to control *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* spp. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 2, p. 418-431, 2018.

SANTOS, Gabriela Bianchi dos. **Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 143f. 2016

SECATTO, Marcelo. Desenvolvimento da síntese total do (±)-ácido jasmônico visando aplicação em escala industrial. Dissertação de Mestrado (Mestre Profissional em Química). 143f. 2013

SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

SHIVAJI, R., CAMAS, A., ANKALA, A., ENGELBERTH, J., TUMLINSON, J. H., WILLIAMS, W. P., LUTHE, D. S. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar-resistant maize. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 179-191, 2010.

SOARES, Giuliana Cristina Mourão. **Efeito do ácido salicílico no metabolismo primário e secundário de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar.** Tese (Universidade Federal de Viçosa), MG, 120f. 2016.

STECKBECK, J. D.; DESLOUCHES, B.; MONTELARO, R. C. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? **Expert opinion on biological therapy**, v. 14, n. 1, p. 11-14, 2014.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. In: MERRIFIELD, R. B. (Ed.) Solid Phase Peptide Synthesis, **New York: Pierce Chemical Company**, 2ª Ed., 1984.

STOVER, E. D., STANGE, R. R., MCCOLLUM, T. G., JAYNES, J., IREY, M., & MIRKOV, E. Screening antimicrobial peptides in vitro for use in developing transgenic citrus resistant to huanglongbing and citrus canker. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** v. 138, n. 2, p. 142-148, 2013.

STUMPF P. K, CONN E. E. Secondary plant products, the biochemistry of plants. **New York: Academic Press**. vol. 7, 1981.

SUGANO, S, MIYAZAWA, S. I., MASUMOTO, C., YAZAWA, K., HAYASHI, N., TAKATSUJI, H. Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genome-wide expression analysis. **Plant molecular biology**, v. 74, p. 549-562, 2010.

SUH, J. H., NIU, Y. S., WANG, Z., GMITTER JR, F. G, WANG, Y. Metabolic analysis reveals altered long-chain fatty acid metabolism in the host by Huanglongbing disease. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n.5, p.1296-1304, 2018.

SUKIRAN, N. A PYATI, P., WILLIS, C. E., BROWN, A. P., READSHAW, J. J., FITCHES, E. C. Enhancing the oral and topical insecticidal efficacy of a commercialized spider venom peptide biopesticide via fusion to the carrier snowdrop lectin (*Galanthus nivalis agglutinin*). **Pest Management Science**, v. 79, n. 1, p. 284-294, 2023.

SULE, H., MUHAMAD, R., OMAR, D., HEE, A. K. W. Response of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to volatiles emitted from leaves of two rutaceous plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 6, p. 152, 2012.

SUN, S., ZHAO, G., HUANG, Y., CAI, M., SHAN, Y., WANG, H., & CHEN, Y. Specificity and mechanism of action of alpha-helical membrane-active peptides interacting with model and biological membranes by single-molecule force spectroscopy. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 29145, 2016.

SUNDIN G.; JONES A.; FULBRIGHT D. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. syringae from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. **Phytopathology**, 1989.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JR., M. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the "*Candidatus*" Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes,** v.13, p. 173-179. 2005.

TIAN, F., X., RIZVI, S. A. H., LI, C., ZENG, X. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Guangdong of China. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 12587, 2018.

TORTORA, G. J. FUNKE, B. R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 12a Edição, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 964 p.

TOUNEKTI, T.; HERNÁNDEZ, I.; MUNNÉ-BOSCH, S. Salicylic acid biosynthesis and role in modulating terpenoid and flavonoid metabolism in plant responses to abiotic stress. **Salicylic Acid: Plant Growth and Development**, p. 141-162, 2013.

VARYMPOPI, A.; DIMOPOULOU, A.; PAPAFOTIS, D.; AVRAMIDIS, P.; SARRIS, I.; KARAMANIDOU, T.; SKANDALIS, N Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles against *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in Tomato Plants. **International journal of molecular sciences,** v. 23, n. 8, p. 4080, 2022.

VENTURA, L. C.; NETO, J. P. B. Peptídeos antimicrobianos na descoberta de novos fármacos e aplicações no tratamento de doenças. **Pesquisas e avanços em genética e biologia molecular**, p. 39, 2023.

VERLANDER, M. Large-scale synthesis of peptides. **Chim. Oggi**, p. 62-70, 2002.

VINCENT, C. I., HIJAZ, F., PIERRE, M., KILLINY, N. Systemic uptake of oxytetracycline and streptomycin in huanglongbing-affected citrus groves after foliar application and trunk injection. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1092, 2022.

WALLING, L. L. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 859-866, 2008.

WANG, D.; AMORNSIRIPANITCH, N.; DONG, X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. **PLoS pathogens**, v.2, n.11, p.123, 2006.

WANG, G. Improved methods for classification, prediction, and design of antimicrobial peptides. **Computational peptidology**, p. 43-66, 2015.

WANG, N., PANKAJ T. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, v. 103, n. 7, p. 652-665, 2013.

WANG. W., WITHERS. J., LI. H., ZWACK., P. J., RUSNAC., D. V., SHI, H., ZHENG, N. Structural basis of salicylic acid perception by Arabidopsis NPR proteins. **Nature**, v. 586, n. 7828, p. 311-316, 2020.

WENZEL, M., CHIRIAC, A. I., OTTO, A., ZWEYTICK, D., MAY, C., SCHUMACHER, C., BANDOW, J. E. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci**. U. S. A., v. 111, n. 14, p. 1409-1418, 2014.

WILDERMUTH, M. C., DEWDNEY, J., WU, G., AUSUBEL, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 562-565, 2001.

WULFF, N.A., ZHANG, S., SETUBAL, J.C., ALMEIDA, N.F., MARTINS, E.C., HARAKAVA, R., GABRIEL, D.W. The complete genome sequence of '*Candidatus* Liberibacter americanus' associated with citrus huanglongbing. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.27, n.2, p.163-176, 2014.

YAMAGUCHI, Y., HUFFAKER, A., BRYAN, A. C., TAX, F. E., RYAN, C. A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 508-522, 2010.

YAMAMOTO P.T., FELIPPE M.R., GARBIM L.F., COELHO J.H.C., MARTINS E.C., LEITE A.P.R., SOUSA M.C., ABRAHÃO D.P., BRAZ J.D., *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllydae): Vector of the bacterium *Candidatus* Liberibacter americanus. In: Proceedings of Huanglongbing – ***Greening*** **International Workshop**, Ribeirão Preto, Brazil, Fundecitrus, 25-6, 2006.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 1277, n. 1, p. 127-138, 2013.

YU, X.; SUN, D. Macrocyclic drugs and synthetic methodologies towards macrocycles. **Molecules,** v.18, n.6, 2013

ZACHOWSKI, M.A.; RUDOLPH, K. Characterization of isolates of bacterial blight of cotton (*Xanthomonas axonopodis* pv malvacearum) from nicaragua. **Journal of phytopathology,** Berlin, v. 123, p.344-352, 1988.

ZAMUNER, C. F. C., MARIN, V. R., DILARRI, G., HYPOLITO, G. B., SASS, D. C., FERREIRA, H. Oregano essential oil and its main components Thymol and Carvacrol as alternatives to control citrus canker. **Frontiers in Agronomy**, v. 5, p. 1148969, 2023.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, n.389395, 2002.

ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective. **Experimental Medicine and Biology**. https://doi.org/10.1007/978-981- 13-3588-4_1. 2019

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides: do they have a future as therapeutics? **Antimicrobial Peptides: Role in Human Health and Disease**, p. 147-154, 2016.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085-2103, 2013.

ZHANG, R., ZHENG, F., WEI, S., ZHANG, S., LI, G., CAO, P., ZHAO, S. Evolution of disease defense genes and their regulators in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 335, 2019.

ZHENG, Z., XU, M., BAO, M., WU, F., CHEN. J., DENG, X. Unusual five copies and dual forms of *nrdB* in "*Candidatus* Liberibacter asiaticus": Biological implications and PCR detection application. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39020, 2016.

ZURHELLE, G.; MÜLLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system**. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 739, n. 1, p. 191-203, 2000.