

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 08/01/2026.



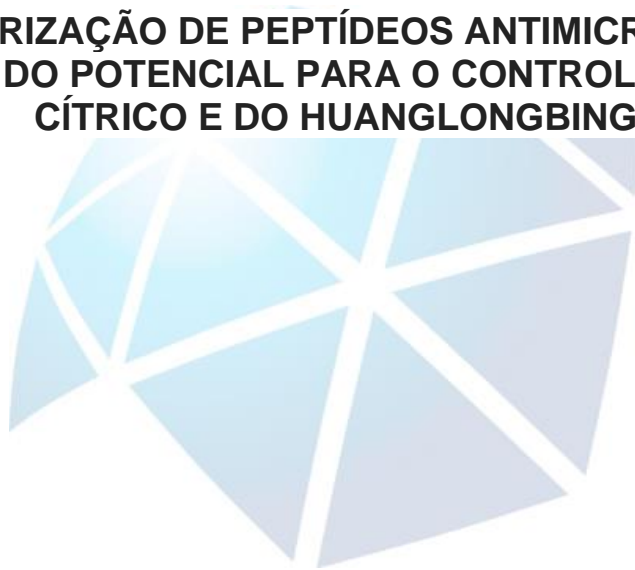
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“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.

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 (Participação Presencial)
Departamento Científico, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara

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

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

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

Dr. FRANKLIN BEHLAU (Participação 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*), microorganisms 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 topoisomerasas 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

1º 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 computational 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 ajustar.

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 Fauller. 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 psílideo *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 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ensaios hemolíticos mostraram que Gr01 apresentou atividade hemolítica somente em concentrações peptídicas superiores a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 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 saudas, 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 $12.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Hemolytical assays showed that Gr01 presented hemolytic activity only at peptide concentrations greater than $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ 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-aminoetanossulfônico

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 ‘Cycle 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 - desoxirribonucleotídeos (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 ‘*microorganism-associated 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 – plantas ‘pé franco’ de laranjeira

SPFS – síntese de peptídeos em fase sólida

SUV - vesícula unilamelar pequena

*t*Bu - *tert*-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 <i>Citrus sinensis</i> no decorrer do experimento de expressão gênica. A: plantas em estágio V3, 1 dia após a aspersão dos peptídeos [$100 \mu\text{mol.L}^{-1}$]; 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 <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por qPCR nas plântulas de laranja doce.	61
Figura 6. Esquema das aplicações do peptídeo K13, inoculação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (Las) por psilídeos e detecção de Las (qPCR) por qPCR em mudas de laranja.	63
Figura 7. Perfis de absorvância 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 $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ 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 $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ 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	

$\mu\text{mol.L}^{-1}$. 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 [$100 \mu\text{mol.L}^{-1}$], 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 ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e cobre ($0,6 \text{ g.L}^{-1}$ 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 [$100 \mu\text{mol.L}^{-1}$] BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 e [$16 \mu\text{mol.L}^{-1}$] 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 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 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 [$100 \mu\text{mol.L}^{-1}$] BP178, Gr01, Guavanin-2, K13 e Lin3 e [$16 \mu\text{mol.L}^{-1}$] dos peptídeos HLB01 e HLB02 nos tempos de 6 e 22 dias após a inoculação de Las via psílideo. A expressão relativa foi analisada por RT-qPCR usando o método $\Delta\Delta\text{Ct}$ e normalizada com os endógenos Actina e GAPC2. Controle negativo (Água): plântulas de ‘Pera’ tratadas com água e expostas aos psilídeos infectivos; controle positivo (ASM): plântulas de ‘Pera’ tratadas com indutor de sistema de defesa vegetal comercial; sadio: plântulas de ‘Pera’ expostas 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 ($\text{Log}_{10} \pm$ 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 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, enquanto os peptídeos HLB01 e HLB02 foram aspergidos na concentração de 16 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 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 ($\text{Log}_{10} \pm$ 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 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), 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 <i>Escherichia coli</i> , <i>Liberibacter crescens</i> e <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	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 $\mu\text{mol.L}^{-1}$]. 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 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 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 <i>priming</i> – 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 <i>Citrus sinensis</i>	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 <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantas em condição de casa de vegetação tratadas com os peptídeos antibióticos.....	60
3.8.1 Criação de <i>D. citri</i> em plantas de citros infectadas com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	60
3.8.2 Inoculação de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> com <i>D. citri</i> 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 <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> com <i>D. citri</i> 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 <i>Citrus sinensis</i> e <i>D. citri</i>	64
3.10 qPCR para detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	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 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 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 <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> com <i>D. citri</i> : expressão gênica do sistema de defesa e detecção de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	78
4.9 Ontogenia de plantas de <i>Citrus sinensis</i> 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 radículas e queda acentuada de folhas. (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007). Frutos provenientes de árvores sintomáticas são menores, mais ácidos, com menores níveis de °BRIX 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 psíldeo. 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 psílideo *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 tapete 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

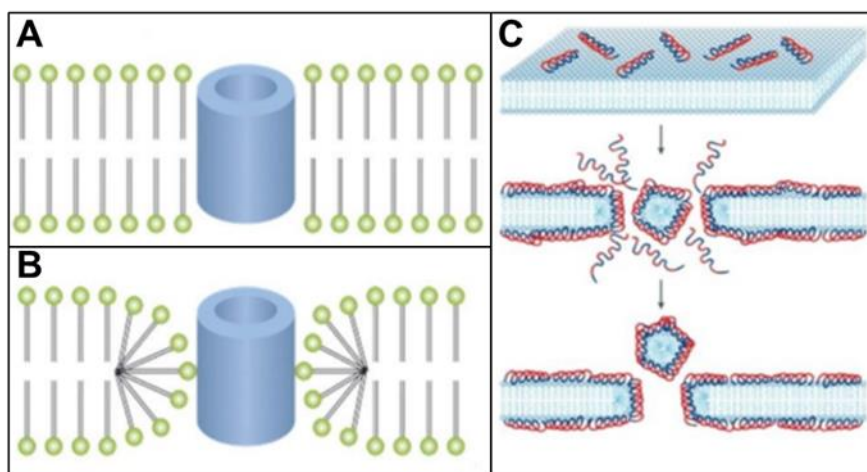
peptídeos podem promover a perturbação da membrana, que pode ocorrer por meio de um dos três modelos conhecidos:

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

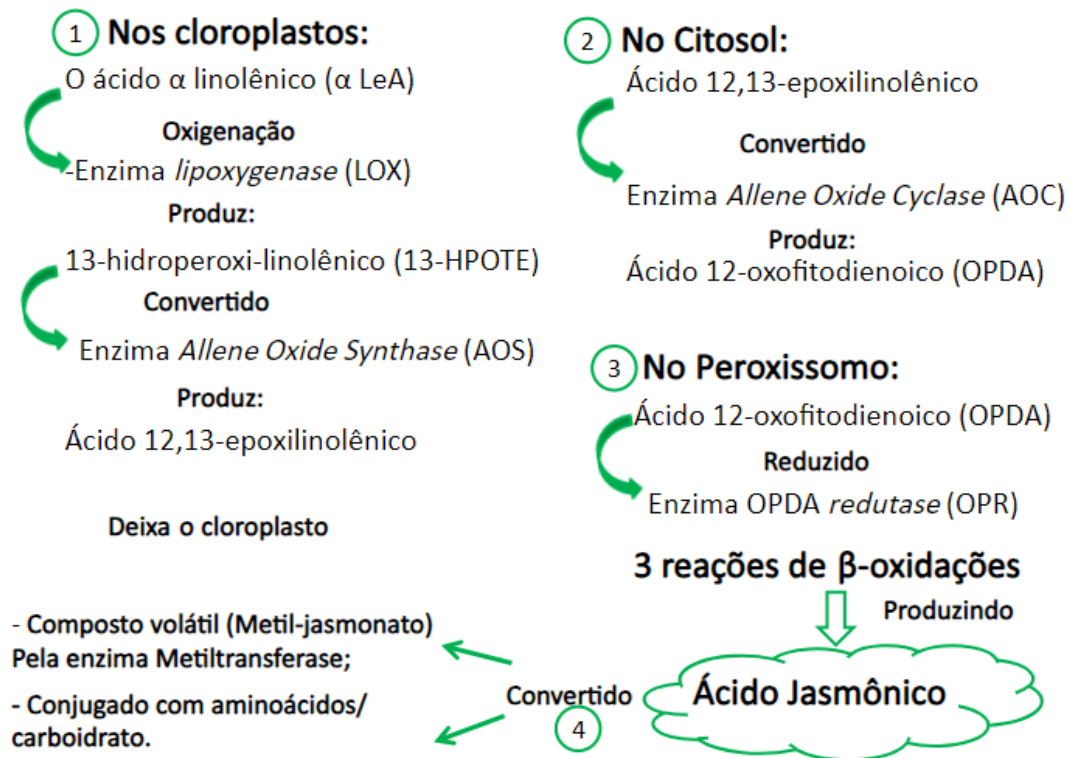
Há relatos da dualidade na função dos peptídeos antimicrobianos: os peptídeos MaSamp (HUANG et al., 2021) e BP178 (MONTESINOS et al., 2022) podem atuar como elicitores do sistema vegetal em laranjeiras e em amendoeiras, respectivamente, e também apresentam propriedade antibacteriana. Essa perspectiva 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).

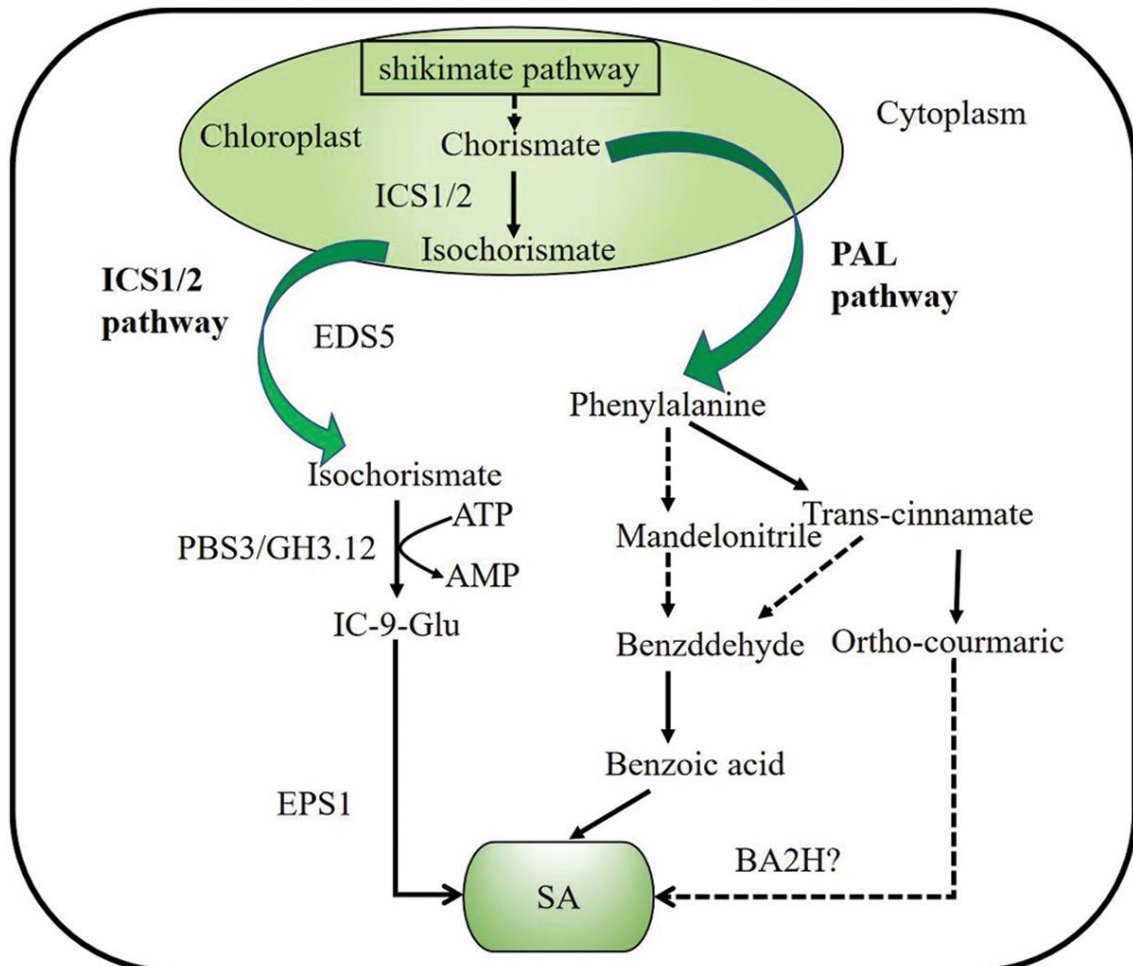
O ácido salicílico ainda pode existir na forma de diferentes conjugados formados pela sulfonatação, hidroxilação, glicosilação, metilação e também por sua conjugação com aminoácidos. Algumas dessas modificações permitem que grandes quantidades de AS sejam armazenadas no vacúolo das plantas. Na metilação, 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., *Burkholderia* 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 à 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, Cetorelix, Corticotropin, Cosyntropin, Cyclosporine, Daptomycin, Desmopressin, Enfuvirtide, 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.

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: Princípios 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 topoisomerasas**. 137f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2021.
- Anuário 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., SCANDELA, 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-NaC]-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., WHITE, 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 Biologists**, 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

ERENCE, C. M., GOCHÉZ, 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.

HABIBOLAH, 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., 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., NIRLA, 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 Agrárias 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.; HOFFERER, 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 dos peptídeos antimicrobianos 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 associated 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 thermoherapy of ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’-infected citrus plants. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2016.

O'BRIEN, J.; WILSON, 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.; MONTEJARO, 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**, 2^a 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.; PAPAFOOTIS, 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: Psyllidae): 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.