

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Alteração no metaboloma e na expressão gênica na via da biossíntese de piranocumarinas em *Citrus sinensis* x *Citrus limonia* em resposta ao Huanglongbing”

Jéssica Cristina Amaral*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

***Bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jéssica Cristina Amaral, realizada em 23/05/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos (FCFRP/USP)

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters (UFSCar)

Prof. Dr. Ian Castro Gamboa (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eliane Maria de Oliveira Amaral e Welington Rocha Amaral, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para minha formação profissional e pessoal. Obrigada por todas as orações, pelo incentivo a ir sempre além do possível e por me encorajarem quando tive medo de prosseguir.

Aos meus irmãos Wellington Rocha Amaral Júnior (in memoriam) e Gabriel Henrique Amaral, por servirem de inspiração para a concretização de mais uma etapa da minha vida.

Ao meu noivo Thiago de Souza Mendonça por ser fonte de amor e meu grande incentivador.

À toda minha família, por tanto carinho.

*"Uma pessoa nunca repara o que foi feito, mas sim o que ainda precisa ser feito.
Devemos manter a nossa certeza de que depois dos dias ruins, os bons virão
novamente."*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento as minhas forças e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada. Vem dEle tudo o que sou, o que tenho e o que espero. Se cheguei até aqui foi porque Ele me sustentou!

Aos meus pais Eliane M. de Oliveira Amaral e Wellington Rocha Amaral, que sempre me deram muito amor, intercederam por mim, me deram força, coragem e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui e ser o que sou. Vocês são meu exemplo e meu alicerce. Obrigada por tudo e por tanto!

Ao meu irmão Gabriel que se mostrou o meu companheiro para todas as horas, sempre à espera dos meus retornos para casa e sempre me enchendo de carinho. Ao meu anjinho Wellington Rocha Amaral Júnior (in memoriam), que apesar de não estar mais presente aqui comigo é minha inspiração e força para superar os desafios que surgem.

Aos meus avós e demais familiares, que sempre torceram por mim, o apoio de vocês foi fundamental.

Ao meu noivo Thiago de Souza Mendonça, por compreender a minha ausência por diversas vezes. Obrigada por suportar a distância e por estar sempre comigo; me dando amor e apoio emocional.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Fátima, por ser fonte de grande inspiração, pela orientação e pelos grandes ensinamentos. Obrigada por ter confiado em mim desde o início e acreditado que eu seria capaz de desenvolver este trabalho. Sou grata por todas as oportunidades concedidas.

Aos professores do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, pelos ensinamentos, suporte e colaboração. Aos professores e técnicos do DQ - UFSCar que tiveram participações fundamentais para que esta conquista fosse possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de desenvolver o Doutorado em Química Orgânica. Às secretárias do PPGQ – UFSCar: Ariane Leonardo, Cristina Motta e Luciani Juarez, meu muito obrigada por estarem sempre dispostas a me auxiliar e me orientar nas burocracias necessárias.

À CAPES, pois sem o apoio financeiro não seria possível à realização deste estudo. Processo CAPES/INCT - 88887.141938/2017-00.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais UFSCar pela amizade, apoio, troca de experiências e maravilhoso convívio. Em especial à técnica Dra Dorai Periotto Zandonai, por não medir esforços para me auxiliar no que fosse preciso.

À minha companheira de uma árdua jornada, Danielle da Silva, pelo tempo dedicado em prol dos experimentos, troca de experiências e pelos muitos risos que demos juntas. Sem você a conclusão deste trabalho não seria possível.

Ao Luciano da Silva e ao Luciano Rodrigues pelos ensinamentos, discussões científicas, pela companhia, pela ajuda e por sempre levantarem meu astral quando não me sentia bem. Obrigada por todo apoio a mim dedicado e por serem minha família em todo o tempo que estive em São Carlos.

Aos meus grandes amigos de perto e de longe que se fizeram presentes em alguns momentos e compartilharam comigo desta conquista.

Ao Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas - LAFIMP da Universidade de Campinas - UNICAMP, em especial ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera e ao aluno de doutorado Dr. Juan Pablo por todo apoio durante a realização dos experimentos de avaliação de expressão gênica.

À FUNDECITRUS, em especial ao Dr. Silvio Aparecido Lopes e à Fernanda Bedito, por todo o auxílio, ensinamentos e suporte em todos os experimentos com CLas realizados.

Ao Laboratoire agronomie et environnement (LAE) – Université de Lorraine, França, em especial ao Prof. Dr. Alain Hehn, que abriu as portas do laboratório e me recebeu tão bem. Obrigada por acreditar no meu potencial desde quando o conheci. Obrigada por expandir os meus conhecimentos em Biologia Molecular. Gostaria de agradecer também à Dra. Marwa Roumani, Dr. Alex Olry, Dr. Jérémy e ao Clément Charles por me acompanharem nos experimentos e por tanta paciência ao me ensinar. Obrigada aos amigos e companheiros de rotina diária Alan, Alex, Camille, Yuka, Sophie, Andréina, David, Flórent, Lóic, Lucile e Omar, vocês fizeram meus dias mais leves e mais felizes enquanto estive longe do meu país.

Enfim agradeço a todos que durante esta caminhada estiveram presentes e tiveram paciência comigo, pois muita das vezes este percurso é estressante e doloroso, porém muito gratificante e cheio de aprendizados.

LISTA DE ABREVIATURAS

4CL: *4-Coumaroyl-CoA ligases*
AGP: Amilase – amido sintase
AMS: Amilase – amido hidrolase
ATP: *Adenosine triphosphate*
C2'H: *Cinnamate 2-hydroxylase*
C4'H: *Cinnamate 4-hydroxylase*
CBIP: Controle Biorracional de Insetos Praga
CCD: Cromatografia em Camada Delgada
CheBI: *Chemical Entities of Biological Interest*
CHI: *Chalcone Isomerase*
CHS: *Chalcone Synthase*
CL: *Citrus limonia*
CLaf: *Candidatus Liberibacter africanus*
CLam: *Candidatus Liberibacter americanus*
CLas: *Candidatus Liberibacter asiaticus*
CLL: *Citrus limonia* leaves
CLR: *Citrus limonia* roots
CLS: *Citrus limonia* steam
COX: *Cyclooxygenase*
CRISP: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CS: *Citrus sinensis*
CSL: *Citrus sinensis* leaves
CsNPR1: *Non-expresser of Pathogenesis-related Genes 1*
CSR: *Citrus sinensis* roots
CSS: *Citrus sinensis* steam
Ct: *Cycle Threshold*
CVC: Clorose Variegada dos Citros
CYP: *Cytocrome P450*
DMAPP: *Dimethylallyl pyrophosphate*
DNA: Deoxyribonucleic Acid
DXP: *1-deoxyxylose-5-phosphate*
DXR: *1-deoxyxylose-5-phosphate reductase*
DXS: *1-deoxyxylose-5-phosphate synthase*

ESI: *Electrospray ionization*
FBMN: *Feature-based Molecular Networking*
FCs: *Furanocumarinas*
GA-3P: *Glyceraldehyde 3-phosphate*
GFP: *Green Fluorescent Protein*
GNPS: *Global Natural Products Social Molecular Networking*
GPC: *Gel Permeation Chromatography*
HCA: *Hierarchical Component Analysis*
HCT: *Hydroxycinnamoyl Transferase*
HLB: *Huanglongbing*
HMBPP: *4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Diphosphate Reductase*
IAC: *Instituto Agronômico de Campinas*
INCT: *Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia*
IOMT: *Isoflavone 7-O-methyltransferase*
IPP: *Isopentenyl pyrophosphate*
LC-HRMS: *Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry*
LC-MS: *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
LC-SPE-MS/NMR: *Liquid Chromatography hyphenated to Solid Phase Extraction, Mass Spectrometry and nuclear Magnetic Resonance*
LLE: *Liquid-Liquid Extraction*
MEP: *Methylerythritol Phosphate*
MEV: *Mevalonate*
MN: *Molecular Networking*
MSI: *Imaging by Mass Spectrometry*
MWASE: *Microwave Assisted Sequential Extraction*
NANPDB: *Northern African Natural Products Database*
NIST: *National Institute of Standards and Technology*
PAL: *Phenylalanine Ammonia-lyase*
PCA: *Principal Component Analysis*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PCs: *Piranocumarinas*
PCs: *Principal Components*
PEP: *Phosphoenolpyruvate*
PES: *Pesquisa de Estimativa de Safra*

PI: Planta Infectada
PN: Produtos Naturais
PS: Planta Sadia
PT: Preniltransferase
QS: *Quorum Sensing*
QuEChERS: *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*
R: Raiz
Rd: Radicela
RdPI: Radicela de Planta Infectada
RdPS: Radicela de Planta Sadia
RMN: *Nuclear Magnetic Resonance*
ROR: *Reactive Oxygen Species*
RPI: Raiz de Planta Infectada
RPI_{iv}: Raiz de Planta Infectada cultivada *invitro*
RPS: Raiz de Planta Sadia
RPS_{iv}: Raiz de Planta Sadia cultivada *invitro*
SAM: *S-adenosyl-L-methionine*
CRISPR/Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9*
SPE: *Solid Phase Extraction*
SPME: *Solid Phase Microextraction*
TCA: *Tricarboxylic acid*
TPP: *Thiamine pyrophosphate*
UASE: *Ultrasonic Assisted Solvent Extraction*
UNPD: *Universal Natural Products Database*
UPLC-Q-TOF/MS: *Ultra-high Performance Liquid Chromatography-quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry*
UV: Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1.1. Composição do Meio MS basal MURASHIGE; SKOOG, 1962. | 39 |
| Tabela 1.2. Valores de C ^t referente as análises de qPCR para a detecção de <i>C. liberibacter</i> em <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> . Nota: PI = plantas sintomáticas infectadas com CLas. | 47 |
| Tabela 1.3. Valores de C ^t referente as análises de qPCR para a detecção de <i>C. liberibacter</i> em plântulas de <i>C. sinensis</i> cultivadas <i>in vitro</i> | 50 |
| Tabela 1.4. Dados de RMN de ¹ H para a xantiletina isolada da raiz de <i>citrus</i> | 52 |
| Tabela 1.5. Dados de RMN de ¹ H para a seselina isolada da raiz de <i>citrus</i> | 53 |
| Tabela 1.6. Íons anotados via LC-HRMS/q-TOF e sua abundância nos tratamentos avaliados: RPS, RPI, RdPS, RdPI. | 146 |
| Tabela 1.7. Valores de C ^t obtidos nas análises de qPCR para ensaio da atividade microbiológica de piranocumarinas e seus intermediários em <i>C. sinensis</i> frente a CLas. | 152 |
| | |
| Tabela 2.1. Primers para os genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas em <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> | 177 |
| Tabela 2.2. Quantificação de RNA das raízes de 4 plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> | 177 |
| Tabela 2.3. Resultados para a curva de eficiência para os genes DXR, DXS2, PT1, PT2 e os genes de referência UPL7 e GAPC2. | 180 |
| Tabela 2.4. Avaliação do nível de expressão dos genes PT1 e PT2 em raiz (CSR e CLR), caule (CSS e CLS) e folha (CSL e CLL) de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> | 183 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1. Diferentes tipos de métodos tradicionais de enxerto: Enxertia por garfagem e enxertia por borbulha..... | 4 |
| Figura 1.2. Composição química de <i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus limonia</i> | 7 |
| Figura 1.3. Produção de laranja de 1988/89 a 2020/21 e estimativa da safra 2021/22. Fonte: CitrusBR (1988/89 a 2014/15) e Fundecitrus (2015/16 a 2021/22). Retirado de FUNDECITRUS 2020 ⁵⁹ | 9 |
| Figura 1.4. Histórico de surtos das principais doenças de citros no Brasil. | 10 |
| Figura 1.5. a) Processo de disseminação do Huanglongbing (HLB), transmitida pelos vetores psílídeos e sintomas característicos da doença. b,c) vetores transmissores <i>D. citri</i> , <i>T. erytrae</i> respectivamente. d-g) Sintomas característicos de HLB. Retirado de: Pre-HLB, A. Fereres and Fundecitrus. Adaptado de Alquézar et al., 2021 ⁶⁴ | 11 |
| Figura 1.6. A biossíntese de cumarinas. Adaptado de ^{95,99,102,106,108} | 20 |
| Figura 1.7. Biossíntese de xantiletina e seselina após a incorporação de glicose-1- ¹³ C]. Adaptado de ¹⁴² | 22 |
| Figura 1.8. Etapas para geração de redes moleculares a partir de dados MS não direcionados com a plataforma web GNPS: MN classical e FBMN. Adaptado de Nothias 2017 e Panda 20187. | 28 |
| Figura 1.9. Visualização de rede usando VOSviewer, referente a palavras-chave utilizando a palavra de entrada <i>Citrus</i> . Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica a ocorrência (ou seja, o número de vezes que a palavra-chave ocorre), (2) o link entre os nós representa a co-ocorrência entre as palavras-chave. | 30 |
| Figura 1.10. . Visualização de rede usando VOSviewer, referente a autores e países utilizando a palavra <i>Citrus</i> . Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica o número de publicações por autor/país, (2) o link entre os nós representa as colaborações entre autores/países. | 33 |
| Figura 1.11. Visualização de rede usando VOSviewer, referente a palavras-chave utilizando a palavra de entrada HLB. Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica a ocorrência (ou seja, o número de vezes que a palavra-chave ocorre), (2) o link entre os nós representa a co-ocorrência entre as palavras-chave. | 34 |
| Figura 1.12. Visualização de rede usando VOSviewer, referente a autores e países utilizando a palavra HLB. Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica o número de publicações por autor/país, (2) o link entre os nós representa as colaborações entre autores/países..... | 35 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.13. Inoculação de psilídeos <i>D. citri</i> infectados com <i>C. liberibacter</i> em plântulas de <i>C. sinensis</i> cultivadas <i>in vitro</i> | 40 |
| Figura 1.14. Esquema da metodologia de extração para obtenção de extratos das plântulas de <i>C. sinensis</i> cultivadas <i>in vitro</i> | 43 |
| Figura 1.15. Plantas de <i>C. sinensis</i> sadias (PS) e plantas sintomáticas infectadas com CLas (PI)..... | 48 |
| Figura 1.16. Espectro de RMN de ¹ H - MeoD referente a xantiletina isolada da raiz de <i>citrus</i> | 52 |
| Figura 1.17. Espectro de RMN de ¹ H - MeoD referente a seselina isolada da raiz de <i>citrus</i> | 53 |
| Figura 1.18. Cromatograma TIC – MS no modo positivo de ionização das raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com HLB cultivadas em casa de vegetação e de raízes de plântulas sadias e infectadas com HLB cultivadas <i>in vitro</i> , obtidos usando UHPLC-HRMS no modo de ionização positiva (ESI+). | 54 |
| Figura 1.19. Cromatograma TIC – MS no modo negativo de ionização das raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com HLB cultivadas em casa de vegetação e de raízes de plântulas sadias e infectadas com HLB cultivadas <i>in vitro</i> , obtidos usando UHPLC-HRMS no modo de ionização negativa (ESI-). | 55 |
| Figura 1.20. Rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação. | 57 |
| Figura 1.21. Cluster da umbeliferona da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPS e RdPS) de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI)..... | 58 |
| Figura 1.22. Cluster da xantiletina e seselina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPS e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI) | 59 |
| Figura 1.23. Cluster do ostol e clausarina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPS e PdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI)..... | 60 |
| Figura 1.24. Cluster da limonina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPS e PdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI). | 60 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.25. Rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes de plântulas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv) cultivadas <i>in vitro</i> | 61 |
| Figura 1.26. Cluster da xantiletina e seselina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv). | 62 |
| Figura 1.27. Sinal analítico em MS referente a umbeliferona após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, de $[M + H]^+$ 163,0393 e $R_t = 4,12$ min. | 63 |
| Figura 1.28. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da umbeliferona $[M + H]^+$ 163,0393 - $R_t = 4,12$ min em EC = 20V e 22V. | 64 |
| Figura 1.29. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a umbeliferona $[M + H]^+$ 163,0393..... | 64 |
| Figura 1.30. Variação na concentração relativa de umbeliferona em: A) radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas <i>in vitro</i> | 65 |
| Figura 1.31. Sinal analítico em MS referente a herniarina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 177,0546 e $R_t = 9,27$ min. | 66 |
| Figura 1.32. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da herniarina $[M + H]^+$ 177,0546 - $R_t = 9,27$ min em EC = 20V..... | 67 |
| Figura 1.33. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a herniarina $[M + H]^+$ 177,0546..... | 68 |
| Figura 1.34. Variação na concentração relativa de herniarina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 69 |
| Figura 1.35. Sinal analítico em MS referente a 3-acetilcumarina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 189,0555 e $R_t = 17,33$ min. | 70 |
| Figura 1.36. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da 3-acetilcumarina $[M + H]^+$ 189,0555 - $R_t = 17,33$ min em EC = 20V..... | 70 |
| Figura 1.37. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a 3-acetilcumarina $[M + H]^+$ 189,0555..... | 71 |
| Figura 1.38. Variação na concentração relativa de 3-acetilcumarina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 72 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.39. Sinal analítico em MS referente ao citropteno após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 207,0649 e $R_t = 7,90$ min. | 73 |
| Figura 1.40. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do citropteno $[M + H]^+$ 207,0649 - $R_t = 7,90$ min em EC = 22 e 18V..... | 74 |
| Figura 1.41. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o citropteno $[M + H]^+$ 207,0649..... | 74 |
| Figura 1.42. Variação na concentração relativa de citropteno em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 75 |
| Figura 1.43. Sinal analítico em MS referente a esquimina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 325,0920 e $R_t = 4,0$ min. | 76 |
| Figura 1.44. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da esquimina $[M+H]^+$ 325,0920 - $R_t = 4,0$ min em EC = 18 e 20V..... | 77 |
| Figura 1.45. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a esquimina $[M+H]^+$ 325,0920..... | 77 |
| Figura 1.46. Variação na concentração relativa de esquimina em A) radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas <i>in vitro</i> | 78 |
| Figura 1.47. Sinal analítico em MS referente ao aurapteno após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 299,1642 e $R_t = 22,75$ min. | 79 |
| Figura 1.48. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do aurapteno $[M + H]^+$ 299,1642 - $R_t = 4,0$ min em EC = 20 e 22V..... | 80 |
| Figura 1.49. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o aurapteno $[M + H]^+$ de 299,1640..... | 80 |
| Figura 1.50. Variação na concentração relativa de aurapteno em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 81 |
| Figura 1.51. Sinal analítico em MS referente a suberosina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 245,1170 e $R_t = 16,69$ min. | 82 |
| Figura 1.52. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da suberosina $[M + H]^+$ 245,1170 - $R_t = 18,69$ min em EC = 20 e 25V..... | 83 |
| Figura 1.53. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a suberosina $[M+H]^+$ de 245,1170..... | 84 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. 54. Variação na concentração relativa de suberosina em A) radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas <i>in vitro</i> | 85 |
| Figura 1.55. Sinal analítico em MS referente ao ostenol após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 245,1166 e $R_t = 17,33$ min. | 86 |
| Figura 1.56. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do ostol $[M+H]^+$ 245,1166 - $R_t = 17,33$ min em EC = 20 e 25V..... | 87 |
| Figura 1.57. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o ostol $[M+H]^+$ 245,1166..... | 87 |
| Figura 1.58. Variação na concentração relativa de ostol em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. | 89 |
| Figura 1.59. Sinal analítico em MS referente ao ostenol após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 261,1123 e $R_t = 9,50$ min. | 90 |
| Figura 1.60. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do suberenol $[M+H]^+$ 261,1123 - $R_t = 9,50$ min em EC = 20 e 25V..... | 91 |
| Figura 1.61. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o suberenol $[M+H]^+$ 261,1123..... | 91 |
| Figura 1. 62. Variação na concentração relativa de suberenol em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 92 |
| Figura 1.63. Sinal analítico em MS referente a xantiletina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 229,0865 e $R_t = 4,38$ min. | 93 |
| Figura 1.64. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da xantiletina $[M + H]^+$ 229,0865 - $R_t = 4,38$ min em EC = 20 e 25V..... | 94 |
| Figura 1.65. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a xantiletina $[M+H]^+$ 229,0865..... | 95 |
| Figura 1.66. Variação na concentração relativa de xantiletina em A) radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas <i>in vitro</i> | 96 |
| Figura 1.67. Sinal analítico em MS referente a seselina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 229,0862 e $R_t = 4,61$ min. | 97 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1.68. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da seselina [M+H] ⁺ 229,0862 - Rt = 4,31 min em EC = 20 e 25V..... | 98 |
| Figura 1.69. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a seselina [M+H] ⁺ 229,0862..... | 98 |
| Figura 1.70. Variação na concentração relativa de seselina em A) radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas <i>in vitro</i> | 99 |
| Figura 1.71. Sinal analítico em MS referente a xantoxiletina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, [M + H] ⁺ 259,0960 e Rt= 15,60 min. | 101 |
| Figura 1.72. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da xantoxiletina [M+H] ⁺ 259,0960 - Rt = 15,60 min em EC = 22 e 25V..... | 102 |
| Figura 1.73. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a xantoxiletina [M+H] ⁺ 259,0960..... | 102 |
| Figura 1.74. Variação na concentração relativa de xantoxiletina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 103 |
| Figura 1.75. Sinal analítico em MS referente a 5-metóxiseselina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, [M + H] ⁺ 259,0962 e Rt= 16,58 min. | 104 |
| Figura 1.76. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da 5-metóxiseselina [M+H] ⁺ 259,0962 - Rt = 16,58 min em EC = 22 e 25V..... | 106 |
| Figura 1.77. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a 5-metóxiseselina [M+H] ⁺ 259,0962..... | 106 |
| Figura 1.78. Variação na concentração relativa de 5-metóxiseselina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 107 |
| Figura 1.79. Sinal analítico em MS referente a nordentatina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, [M + H] ⁺ 313,1434 e Rt= 21,88 min. | 108 |
| Figura 1.80. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, nordentatina [M+H] ⁺ 313,1434 - Rt = 21,88 min em EC = 25 e 22V..... | 109 |
| Figura 1.81. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a nordentatina [M+H] ⁺ 313,1434..... | 110 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1.82. Variação na concentração relativa de nordentatina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 111 |
| Figura 1.83. Sinal analítico em MS referente a clausarina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 381,2063 e $R_t= 26,29$ min. | 112 |
| Figura 1.84. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da clausarina $[M+H]^+$ 381,2063 - $R_t = 26,29$ min em EC = 20 e 25V..... | 113 |
| Figura 1.85. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a clausarina $[M + H]^+$ 381,2063..... | 113 |
| Figura 1.86. Variação na concentração relativa de clausarina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 115 |
| Figura 1.87. Sinal analítico em MS referente a limonina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 471,2028 e $R_t= 12,83$ min. | 116 |
| Figura 1.88. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da limonina $[M+H]^+$ m/z 471,2028- $R_t = 12,83$ min em EC = 25 e 22V..... | 117 |
| Figura 1.89. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a limonina $[M+H]^+$ 471,2028..... | 117 |
| Figura 1.90. Variação na concentração relativa de limonina em A) radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas <i>in vitro</i> | 118 |
| Figura 1.91. Sinal analítico em MS referente ao acetato de limonina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 515,2272 e $R_t= 14,58$ min..... | 119 |
| Figura 1.92. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do acetato de limonina $[M+H]^+$ 515,2272 - $R_t = 14,58$ min em EC = 20 e 25V..... | 120 |
| Figura 1.93. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o acetato de limonina $[M+H]^+$ 515,2272..... | 121 |
| Figura 1.94. Variação na concentração relativa de acetato de limonina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 122 |
| Figura 1.95. Sinal analítico em MS referente a deoxilimonina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 455,2066 e $R_t= 15,52$ min. | 123 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1.96. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da deoxilimonina [M+H] ⁺ 455,2066- Rt = 15,52 min em EC = 20 e 25V..... | 124 |
| Figura 1.97. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a deoxilimonina [M+H] ⁺ 455,2066..... | 125 |
| Figura 1.98. Variação na concentração relativa de deoxilimonina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 126 |
| Figura 1.99. Rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação..... | 127 |
| Figura 1.100. Cluster do ácido <i>p</i> -cumárico e cluster do ostenol e demetilsuberosina da rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPS e PdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI). | 128 |
| Figura 1.101. Rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização em raízes de plântulas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv) cultivadas <i>in vitro</i> | 129 |
| Figura 1.102. Sinal analítico em MS referente ao ácido <i>p</i> -cumárico após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, [M - H] ⁻ 163,0396 e Rt= 5,70 min..... | 130 |
| Figura 1.103. Espectro de massas MS/MS ESI - negativo, do ácido <i>p</i> -cumárico [M-H] ⁻ 163,0396- Rt = 5,70 min em EC = 22 e 20V. | 131 |
| Figura 1. 104. Proposta de fragmentação ESI - negativo, para o ácido <i>p</i> -cumárico [M-H] ⁻ 163,0396. | 131 |
| Figura 1.105. Variação na concentração relativa de ácido <i>p</i> -cumárico em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 132 |
| Figura 1.106. Sinal analítico MS referente a demetilsuberosina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, [M - H] ⁻ 229,0861 e Rt= 11,18 min..... | 133 |
| Figura 1.107. Espectro de massas MS/MS ESI - negativo, da demetilsuberosina [M - H] ⁻ 229,0861- Rt = 11,18 min em EC = 22 e 20V. | 134 |
| Figura 1.108. Proposta de fragmentação ESI - negativo, para a demetilsuberosina [M-H] ⁻ 229,0861. | 134 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1.109. Variação na concentração relativa de demetilsuberósina em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação..... | 135 |
| Figura 1.110. Sinal analítico em MS referente ao ostenol após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, m/z 229,0855 e $R_t = 10,06$ min. | 136 |
| Figura 1.111. Espectro de massas MS/MS ESI - negativo, do ostenol $[M-H]^-$ m/z 163,0396- $R_t = 5,70$ min em EC = 22 e 20V..... | 137 |
| Figura 1.112. Proposta de fragmentação ESI - negativo, para o ostenol $[M-H]^-$ de m/z 229,0855..... | 137 |
| Figura 1.113. Variação na concentração de ostenol em radículas e raízes de plantas <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. | 138 |
| Figura 1.114. Análise de PCA em <i>loadings</i> (A) e <i>scores</i> (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação..... | 140 |
| Figura 1.115. Análise de PCA em <i>loadings</i> (A) e <i>scores</i> (B) para PC1 x PC3 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação. | 141 |
| Figura 1.116. Análise de PCA em <i>loadings</i> (A) e <i>scores</i> (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação..... | 142 |
| Figura 1.117. Análise de PCA em <i>loadings</i> (A) e <i>scores</i> (B) para PC1 x PC4 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação..... | 143 |
| Figura 1.118. Análise de PCA em <i>loadings</i> (A) e <i>scores</i> (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo positivo de ionização em raízes | |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| de plântulas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv) cultivadas <i>in vitro</i> | 144 |
| Figura 1.119. Análise de PCA em <i>loadings</i> (A) e <i>scores</i> (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo negativo de ionização em raízes de plântulas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv) cultivadas <i>in vitro</i> | 145 |
| Figura 1. 120. Proposta de biogênese para cumarinas e piranocumarinas e a interferência na cascata biossintética como resposta de defesa de <i>C. sinensis</i> x <i>C.limonia</i> frente a Clas. | 148 |
| Figura 1.121. Curva de calibração para as piranocumarinas: xantiletina e seselina..... | 149 |
| Figura 1.122. Cromatogramas das amostras de radículas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> A) sadias B) sintomáticas infectadas com Clas..... | 149 |
| Figura 1. 123. Concentração das piranocumarinas: xantiletina e seselina em <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias e sintomáticas infectadas com Clas..... | 150 |
| | |
| Figura 2.1. Participação nas vendas de pesticidas..... | 156 |
| Figura 2.2. Caminho biossintético para isoprenoides via MEP. Retirado de FRANK & GROLL, 2016 ²⁰⁵ | 160 |
| Figura 2.3. Representação esquemática da via biossintética de furanocumarinaa e as etapas enzimáticas envolvidas | 165 |
| Figura 2.4. Esquema de extração de RNA em raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> .. | 169 |
| Figura 2.5 Mapa do vetor de clonagem pCR8™/GW/TOPO®..... | 172 |
| Figura 2.6. Representação do T-DNA dos vetor pEAQ-HT-DTS1 contendo o CPMV-HT cassette de expressão, o supressor P19 e o gene de resistência à canamicina NPTII. | 173 |
| Figura 2.7. <i>Design</i> experimental para pEAQ para clonagem e expressão da proteína de interesse..... | 174 |
| Figura 2.8. Sequências encontradas no genoma de <i>C. sinensis</i> para A) DXS e B) DXR..... | 176 |
| Figura 2.9. Sequências encontradas no genoma de <i>C. sinensis</i> para PT. | 176 |
| Figura 2.10. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo referente ao RNA extraído das raízes de 4 plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> | 178 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 2.11. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo para os produtos da reação de PCR com RNA diluído 10x das amostras 1, 2, 3 e 4 de raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> dos genes candidatos para a DXR, DXS e PT. | 178 |
| Figura 2.12. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo para os produtos da reação de PCR com RNA sem diluição das amostras 1, 2, 3 e 4 de raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> dos genes candidatos para a DXR, DXS e PT. . | 179 |
| Figura 2.13. Gráficos de amplificação referente à curva de eficiência para os genes DXR, DXS2, PT1, PT2 e GAPC2..... | 180 |
| Figura 2.14. Expressão gênica para os genes candidatos envolvidos da biossíntese de piranocumarinas: DXR, DXS2, PT1 e PT2 em raízes de plantas de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> sadias (RPS) e sintomáticas infectadas com CLas (RPI). | 181 |
| Figura 2.15. Análise de expressão dos genes PT1 e PT2 em raiz (CSR e CLR), caule (CSS e CLS) e folha (CSL e CLL) de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> | 183 |
| Figura 2.16. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo dos produtos de PCR para isolamento e <i>clean up</i> dos genes PT1 e PT2 extraídos de CSR e CLR..... | 184 |
| Figura 2.17. Colônias de <i>E. coli</i> clonadas com os genes PT1 e PT2, extraídos de raízes de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> | 185 |
| Figura 2.18. Foto da revelação do gel de agarose em câmara de UV dos produtos de PCR utilizando <i>Saphire Amp</i> após a clonagem de CSR PT1, CLR PT1, CSR PT2 e CLR PT2 em <i>E. coli</i> | 185 |
| Figura 2.19. Alinhamento das sequências peptídicas: PT1 de CSR e CLR, PT1 de citros (XP_006483446 LOC102619418 mRNA) e de KM017083, KM017084 e AB825956..... | 186 |
| Figura 2. 20. Alinhamento da sequências peptídicas: PT2 de CSR e CLR, PT2 de citros (XP_006483444 LOC102618825 mRNA) e de KM017083, KM017084 e AB825956..... | 187 |
| Figura 2.21. Resultados do procedimento de agroinfiltração em <i>N. benthamiana</i> .. | 189 |
| Figura 2.22. Espectro de massas para o produto da reação na fração microsossomal utilizando umbeliferona + DMAPP. | 189 |
| Figura 2. 23. Espectro de massas para o produto da reação na fração microsossomal utilizando herniarina + DMAPP..... | 190 |
| Figura 2. 24. Espectro de massas para o produto da reação na fração microsossomal utilizando 4-metil-umbeliferona + DMAPP. | 190 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 2. 25. Espectro de massas para o produto da reação na fração microsomal utilizando escopoletina + DMAPP..... | 190 |
| Figura 2. 26. Espectro de massas para o produto da reação na fração microsomal utilizando esquimina + DMAPP. | 191 |
| Figura 2.27. Via biossintética parcial de furano- e piranocumarinas. Nota: Em verde, as etapas que foram caracterizadas pelo grupo do pesquisador Hehn A. Em vermelho, as etapas para as quais ainda não há enzimas associadas. Em amarelo, as etapas para as quais as moléculas ainda não foram identificadas. Em azul, as etapas consideradas até o momento..... | 192 |

RESUMO

ALTERAÇÃO NO METABOLOMA E NA EXPRESSÃO GÊNICA NA VIA DA BIOSÍNTESE DE PIRANOCUMARINAS EM *Citrus sinensis* X *Citrus limonia* EM RESPOSTA AO HUANGLONGBING. O Greening (Huanglongbing/HLB) é a doença mais destrutiva dos citros. É causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *C. Liberibacter africanus* e *C. Liberibacter americanus* e transmitida pelo inseto vetor psilídeo *Diaphorina citri*. Não há variedade comercial de planta de copa ou porta-enxerto resistente à doença e plantas contaminadas não podem ser curadas. Apesar de pesquisas consideráveis, pouco se sabe sobre os processos envolvidos na infecção e colonização de plantas por CLas. O estudo da interação planta/bactéria CLas foi desenvolvido por LC-HRMS/qTOF nos modos positivo e negativo de ionização. Raízes centrais e radículas de plantas saudáveis e infectadas com CLas de *C. sinensis* x *C. limonia* cultivadas em casa de vegetação, e raízes de plântulas saudáveis e infectadas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro* foram analisadas. Através da análise da rede molecular via GNPS, foi possível observar um aumento na concentração de alguns metabólitos em plantas infectadas com HLB. Diferenças significativas usando o teste t em par de médias foram observadas na concentração de demetilsuberósina, ostenol, 5-metoxisseselina, xantiletina, seselina e limonina para plantas cultivadas em casa de vegetação e para xantiletina, seselina e limonina em plântulas cultivadas *in vitro*. Os compostos citados acima, foram os responsáveis pela classificação observada na Análise de Componentes Principais (PCA), que classificou as amostras em quatro grupos: raízes, radículas, radículas de plantas saudáveis e radículas de plantas infectadas. Foi realizada a quantificação da expressão dos genes DXR, DXS2, PT1 e PT2 por qPCR, em raízes de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* saudáveis e sintomáticas infectadas com CLas. Houve uma diminuição na expressão dos genes DXR, DXS2 e PT1, nas plantas infectadas com CLas frente às saudáveis. Para a DXR observou-se uma diminuição na expressão gênica de duas vezes, para DXS2 de 5,7 vezes e para PT1 de 3,6 vezes. Para o gene PT2 houve o aumento na expressão relativa para as plantas infectadas frente às saudáveis de 2,6 vezes. Os resultados mostram que a planta responde produzindo alguns metabólitos em maior ou menor quantidade na presença da bactéria CLas além de provocar alterações na expressão gênica na via da biossíntese de piranocumarinas. Observa-se portanto, uma reação da planta inibindo a biossíntese de derivados lineares de cumarinas em favor daqueles angulares, que são prenilados em C-8.

ABSTRACT

VARIATION IN METABOLOME AND GENE EXPRESSION OF THE PYRANOCOUMARINS BIOSYNTHESIS PATHWAY IN *Citrus sinensis* X *Citrus limonia* IN RESPONSE TO HUANGLONGBING. Greening (Huanglongbing/HLB) is the most destructive citrus disease. It is caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *C. Liberibacter africanus* and *C. Liberibacter americanus* and it is transmitted by the insect vector psyllid *Diaphorina citri*. There is no commercial variety of crown plant or rootstock resistant to disease and contaminated plants cannot be cured. Despite of considerable research, there is little knowledge about the processes involved in plant infection and colonization by CL. A study of the plant/bacteria interaction CLas was developed by LC-HRMS/qTOF in positive and negative ionization modes. Central and lateral roots of healthy and CLas-infected plants of *C. sinensis* x *C. limonia* cultivated in a greenhouse, and the roots of healthy and infected *C. sinensis* seedlings cultivated *in vitro* were analyzed. Through the analysis of the molecular network, it was possible to observe an increase in the concentration of some metabolites in plants infected with HLB. Significant differences using the paired two sample t-test were observed in the concentration of demethylsuberosin, osthenol, 5-methoxyseselin, xanthylethin, seselin and limonin for plants grown in a greenhouse and for xanthylethin, seselin and limonin in seedlings grown *in vitro*. The compounds mentioned above, were responsible for the classification observed in the PCA analysis, that classified the samples in four groups: roots, lateral roots, lateral roots of health plants and lateral roots of infected plants. The quantification of the expression of DXR, DXS2, PT1 and PT2 genes was carried out by qPCR, in *C. sinensis* x *C. limonia* roots of healthy and symptomatic plants infected with CLas. There was a decrease in the expression of the DXR, DXS2 and PT1 genes in plants infected with CLas compared to healthy ones. For DXR, a two-fold decrease in gene expression was observed, for DXS2 by 5.7-fold and for PT1 by 3.6-fold. For the PT2 gene, there was an increase in relative expression for infected plants compared to healthy ones of 2.6 times. These results show that the plant responds by producing some metabolites in greater or lesser quantities in the presence of CLas bacteria, in addition to causing changes in gene expression in the pyranocoumarin biosynthesis pathway. Therefore, a plant reaction is observed inhibiting the biosynthesis of linear coumarin derivatives in favor of angular ones, which are prenylated at C-8.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1.1 <i>A origem e taxonomia dos Citros</i> | 2 |
| 1.1.2 <i>A enxertia</i> | 3 |
| 1.1.3 <i>O perfil fitoquímico dos citros</i> | 6 |
| 1.1.4 <i>A citricultura no Brasil e no mundo</i> | 8 |
| 1.1.5 <i>Huanglonbing</i> | 11 |
| 1.1.6 <i>Estratégias de combate ao HLB através do estudo metabolômicos e genômicos</i> | 14 |
| 1.1.7 <i>As cumarinas</i> | 18 |
| 1.1.8 <i>A metabolômica de plantas e o uso da plataforma GNPS</i> | 22 |
| 1.1.9 <i>Uma análise bibliométrica para citricultura e o HLB</i> | 29 |
| 1.2 OBJETIVOS | 36 |
| 1.2.1 <i>Objetivo geral</i> | 36 |
| 1.2.2 <i>Objetivos específicos</i> | 36 |
| 1.3 MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 1.3.1 <i>Obtenção de plantas de C. sinensis x C. limonia em casa de vegetação</i> | 38 |
| 1.3.2 <i>Obtenção das plântulas de C. sinensis in vitro</i> | 38 |
| 1.3.3 <i>Inoculação de C. liberibacter em plantas de C. sinensis x C. limonia</i> | 39 |
| 1.3.4 <i>Inoculação de C. liberibacter em plântulas de C. sinensis cultivadas in vitro</i> | 39 |
| 1.3.5 <i>Isolamento dos padrões xantiletina e seselina de raízes de citros</i> | 41 |
| 1.3.6 <i>Análises em LC-HRMS - q TOF</i> | 42 |
| 1.3.7 <i>Pré-processamento e análise dos dados de LC-HRMS</i> | 44 |
| 1.3.8 <i>Análise Químiométrica de Componente Principal (PCA)</i> | 45 |
| 1.3.9 <i>Quantificação de piranocumarinas na raiz de C. sinensis x C. limonia</i> | 45 |
| 1.3.10 <i>Ensaio de atividade microbiológica de piranocumarinas e seus intermediários em Citrus sinensis frente a Candidatus liberibacter asiaticus</i> | 46 |
| 1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 1.4.1 <i>Obtenção de plantas de C. sinensis x C. limonia em casa de vegetação e inoculação da bactéria C. liberibacter</i> | 47 |
| 1.4.2 <i>Obtenção das plântulas de C. sinensis in vitro e inoculação da bactéria C. liberibacter</i> | 48 |
| 1.4.3 <i>Isolamento dos padrões de xantiletina e seselina de raízes de citros</i> | 51 |
| 1.4.4 <i>Análise metabolômica via LC-HRMS/q-TOF</i> | 54 |
| 1.4.5 <i>Rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização</i> | 55 |
| 1.4.6 <i>Rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização</i> | 126 |
| 1.4.7 <i>Análise Químiométrica de Componente Principal (PCA)</i> | 139 |
| 1.4.8 <i>Quantificação de piranocumarinas nas radículas de C. sinensis x C. limonia via HPLC-UV</i> | 149 |
| 1.4.9 <i>Ensaio de atividade microbiológica de piranocumarinas e seus intermediários em Citrus sinensis frente a Candidatus liberibacter asiaticus</i> | 151 |
| 1.5 CONCLUSÃO | 154 |
| CAPÍTULO 2..... | 155 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.1 INTRODUÇÃO..... | 156 |
| 2.1.1 A contribuição da engenharia genética para resistência de plantas frente ao ataque de fitopatógenos e insetos..... | 156 |
| 2.1.2 As enzimas 1-deoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS) e 1-deoxixilose-5-fosfato redutase (DXR) envolvidas na biossíntese de IPP/DMAPP via MEP | 159 |
| 2.1.3. As enzimas preniltransferases e os avanços em estudos biossintéticos de furanocumarinas..... | 161 |
| 2.2 OBJETIVOS | 167 |
| 2.2.1 Objetivo geral | 167 |
| 2.2.2 Objetivos específicos..... | 167 |
| 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS | 168 |
| 2.3.1 Análises <i>in silico</i> no genoma de <i>C. sinensis</i> e desenho de primers | 168 |
| 2.3.2 Extração de RNA e obtenção de cDNA de raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C. limonia</i> | 168 |
| 2.3.3 Análises de PCR dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C.limonia</i> | 169 |
| 2.3.4 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C.limonia</i> sadias e infectadas com CLas | 170 |
| 2.3.5 Extração de RNA, obtenção de cDNA para caracterização molecular de preniltransferases de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> | 170 |
| 2.3.6 Isolamento e purificação dos genes para caracterização molecular de preniltransferases de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> | 171 |
| 2.3.7 Clonagem dos genes candidatos de preniltransferases PT1 e PT2 de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> em <i>E. coli</i> | 171 |
| 2.3.8 Expressão heteróloga dos genes candidatos de preniltransferases de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> por agroinfiltração em <i>N. benthamiana</i> | 172 |
| 2.3.9 Extração dos produtos de reação e análises via LC/MS | 174 |
| 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 176 |
| 2.4.1 Análises <i>in silico</i> no genoma de <i>C. sinensis</i> | 176 |
| 2.4.2 Extração de RNA das raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C.limonia</i> e análises dos produtos de PCR para os genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas..... | 177 |
| 2.4.3 Avaliação da expressão gênica por RT-qPCR dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas em raízes de <i>C. sinensis</i> x <i>C.limonia</i> sadias e infectadas com CLas | 179 |
| 2.4.4 Extração de RNA, obtenção de cDNA, isolamento e purificação dos genes para caracterização molecular de preniltransferases de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> | 183 |
| 2.4.5 Clonagem dos genes candidatos de preniltransferases PT1 e PT2 de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> em <i>E. coli</i> | 184 |
| 2.4.6 Expressão heteróloga dos genes candidatos de preniltransferases de <i>C. sinensis</i> e <i>C. limonia</i> por agroinfiltração em <i>N. benthamiana</i> | 188 |
| 2.5 CONCLUSÃO | 193 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 194 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Anexo I - Alinhamento das sequências para DXS, DXR e PT encontradas no genoma de C. sinensis com aquelas utilizadas nas análises in sílico.....</i> | <i>209</i> |
| <i>Anexo II – Sequências das PT KM017083, KM017084, AB825956, XM_006483446, XM_006483444, CSR PT1-18, CLR PT1-11, CSR PT2-15 e CLR PT2-3</i> | <i>212</i> |
| <i>Anexo III - Primers desenhados para os genes PT1 e PT2 para a caracterização molecular</i> | <i>217</i> |
| <i>Anexo IV – Alinhamento para as sequências para PT1, isoladas das raízes de C. limonia, clonadas e extraídas de diferentes colônias de E. coli.....</i> | <i>218</i> |
| <i>Anexo V - Mecanismo para a biossíntese de piranocumarinas via intermediário geranilado.....</i> | <i>219</i> |

Capítulo 1

**Análise metabolômica das raízes e
radicelas de *Citrus sinensis* x *Citrus
limonia* em resposta ao Huanglongbing**

1.1 Introdução

1.1.1 A origem e taxonomia dos Citros

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae e à Ordem Sapindales¹. Esta é uma família de angiospermas que contém aproximadamente 2040 espécies, 170 gêneros e nas classificações recentes (MORTON, C. M. & TELMER, C., 2014) foi dividida em quatro subfamílias: Amiridoideae, Aurantioideae, Cneoroideae e Rutoideae². APPELHANS, M. S.; et al., 2021 através de estudos filogenéticos baseado em seis marcadores nucleares e plastídicos, incluindo 87,7% dos gêneros atualmente aceitos, propõe uma nova classificação de subfamília para Rutaceae que compreende as subfamílias Amyridoideae, Aurantioideae, Cneoroideae, Haplophylloideae, Rutoideae e Zanthoxyloideae³.

O táxon mais importante economicamente é a Aurantioideae, também conhecido como subfamília do *Citrus* à qual é composta por duas tribos, a Clausenesae e o Citreae⁴. A tribo Citreae, mais comumente conhecida por conter o gênero *Citrus* L., inclui muitas espécies notáveis ou híbridas como a laranja [*C. sinensis* (L.) Osbeck], limão [*C. limonia* (L.) Osbeck], toranja [*C. aurantium* L.], mandarina [*C. reticulata* Blanco] e lima [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle]⁵.

As plantas cítricas são originárias das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático e ilhas adjacentes. Embora a origem geográfica seja estimada, o tempo e dispersão de espécies cítricas entre o sudeste da Ásia permanece obscuro⁶. Para resolver estas incertezas o grande impasse é a falta de compreensão da complexa genealogia de citros cultivados^{6,7}.

Os citros possuem características botânicas que são muito difíceis de classificar. Além disso, a delimitação taxonômica de espécies do gênero também é muito complicada pelo alto grau de poliembrionia¹. Outro fator é que alguns citrinos são propagados através da clonagem por apomixia, ou seja, o desenvolvimento de embriões não sexuais que contém exclusivamente os cromossomos somáticos maternos⁸, e esse processo natural também pode ter ocorrido durante a domesticação.

A taxonomia caótica de citros, requer um entendimento completo da natureza híbrida e de mistura de espécies de citros cultivadas⁶. Dentro deste cenário, as análises de sequências genômicas de diversos citros têm sido alternativa

para caracterizar a diversidade e evolução dos citros em nível de espécie e para identificar misturas cítricas e híbridos interespecíficos¹.

A maioria das espécies de *Citrus* são consideradas como resultado da hibridização natural. A espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, que representa as laranjas doces, é uma variedade de frutas cítricas que é bem aceita no mercado comercial e predominam na maioria dos países citrícolas devido ao seu alto valor econômico e nutricional⁹. Sua origem é proposta por SWINGLE, 1967, considerando o cruzamento de *C. grandis* x *C. reticulata*^{4,6}. Dados citoplasmáticos sugerem a contribuição materna de *C. grandis* na formação de *C. sinensis*⁴.

A espécie *Citrus limonia* Osbeck, produz frutos pequenos não comerciais e muito ácidos de cor laranja. É usado principalmente como porta-enxerto e planta ornamental⁶. Possui três tipos de cruzamentos propostos entre *C. medica* x *C. lima* x espécie não idetinficada, *C. medica* x lima e *C. medica* x limão rugoso⁴. O emprego deste porta-enxerto recebe um grande incentivo pois apresenta algumas vantagens como: tolerância a seca, antecipação do início de produção, aumento da produtividade, mudas praticamente idênticas à planta-mãe e uniformidades das mudas^{4,10}.

1.1.2 A enxertia

O enxerto de plantas é uma técnica de propagação vegetativa que conecta dois segmentos diferentes de planta que sobrevive como um novo indivíduo^{11,12}. Esta técnica consiste em transplantar uma planta considerada como cavaleiro ou enxerto que possui características nobres que se quer reproduzir no cavalo ou porta-enxerto que é a planta que contribui com o sistema radicular, assegurando a nutrição mineral e resistência¹³. As novas plantas enxertadas são obtidas pelo processo assexuado através da intervenção humana, obtendo uma associação simbiótica de dois indivíduos geneticamente diferentes^{11,14,15} (Figura 1.1).

A enxertia é uma técnica de horticultura praticada há séculos, mas não era amplamente praticada na citricultura até o final de 1800 ou início de 1900¹⁶. A era "moderna" do uso de porta-enxertos de citros pode ser descrita a partir do início do século 20. Programas de melhoramento formal começaram a surgir e usam novas tecnologias, como hibridização somática e marcadores moleculares que estão alterando e expandindo o leque de possibilidades de manipulação genética levando

a porta-enxertos aprimorados¹⁶. O uso de enxertia, por afetar inúmeras características hortícolas e patológicas da cultivar e é uma prática considerada essencial na citricultura¹⁷.

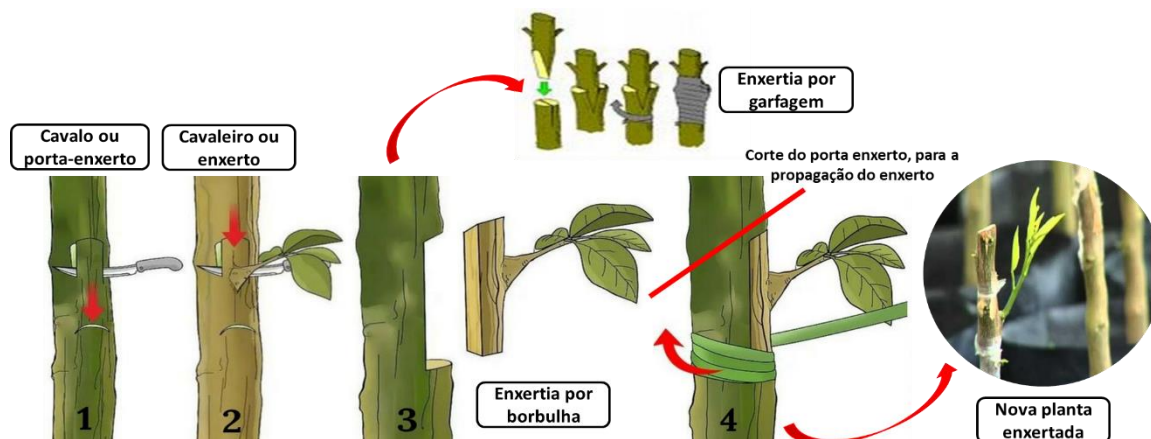


Figura 1.1. Diferentes tipos de métodos tradicionais de enxerto: Enxertia por garfagem e enxertia por borbulha.

A técnica de enxertia não só desempenha um papel vital na melhoria da resistência aos estresses bióticos e abióticos das plantas, mas também afeta o tamanho da copa, a produção e a qualidade dos frutos e até mesmo na fotossíntese e na produção de metabólitos primários e secundários^{18,19,20,21}. O cultivo de citros no Brasil, ainda está limitado ao uso do Limão Cravo (*C. limonia*) como porta-enxerto, mas já existem vários tipos de porta-enxertos sendo implantados e desenvolvidos para produção de citros no Brasil, dentre eles os principais são citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), tangerina Cleopatra (*C. reticulata*), tangerina Sunki Maravilha e Tropical (*C. sunki*)^{10,22,23,24,25}.

A maioria das laranjas e tangerinas de melhores qualidade são obtidas de enxertos das mesmas sobre o limão Cravo o qual é conhecido também pelos nomes de Rosa, Selvagem, Vinagre, Vermelho, Limpa-tacho e Bugre. O emprego deste como porta-enxerto, recebe um grande incentivo pois apresenta algumas vantagens tais como resistência ao vírus da tristeza dos citros, à seca e ao frio, facilidade de obtenção de sementes, precocidade no início de produção, compatibilidade com todas as cultivares copas e aumento da produtividade, além de obter-se mudas praticamente idênticas à planta-mãe e uniformes, uma vez que os porta-enxertos são poliembriônicos⁴.

Sendo assim, o limão Cravo é o principal porta-enxerto sobre o qual a citricultura brasileira foi constituída, estando presente em quase 40% das plantas cítricas²⁶, por possuir uma melhor tolerância à seca em comparação com outros porta-enxertos de citros. Porém a pesquisa e a experimentação vêm mostrando que a utilização de outros porta-enxertos como tangerina Cleópatra, Sunki e o trifoliata permitem também obter frutos de boa qualidade e maturação mais tardia, resultando em benefícios financeiros ao produtor^{26,10}. Em 2015, o percentual das variedades de porta-enxertos utilizados nos pomares paulistas foi de 46,2% limão Cravo, 19,4% citrumelo 'Swingle', 4,6% tangerina 'Sunki' e 2,5% tangerina Cleopatra. No entanto este cenário tende a sofrer alterações, pois em 2016, 50% dos cerca de 10,5 milhões de mudas produzidas nos viveiros paulistas foram enxertadas em citrumelo 'Swingle', com apenas 33% das mudas enxertadas em limão Cravo²⁵.

A laranja Pêra é a principal variedade de citros do país, pois seus frutos apresentam excelente qualidade. O seu cultivo consiste em cerca de 38% em relação ao número total existente para laranjas doces. Essa participação já atingiu índices maiores, superando 50%. A provável explicação para esse menor interesse pela laranja Pêra está na hipótese de que esta é uma variedade de laranja que mais apresenta surtos vegetativos. Entretanto, a espécimen de laranja Pêra enxertada sobre o limão cravo ainda é uma das plantas mais utilizadas na citricultura brasileira nos últimos anos⁴. Porém o uso de laranja Valência como copa tem se expandido, atualmente 35% dos pomares no cinturão citrícola estão plantados com esta variedade²⁷. Esta cultivar ocupa lugar de destaque entre os produtores, pela boa produtividade e tamanho adequado dos frutos que são características priorizadas para o consumo fresco e para a industrialização²⁸.

A grande maioria dos pomares cítricos comerciais plantados em todo o mundo são propagados por enxertia, permitindo elevados ganhos de produtividade. Existe uma grande variedade de métodos de enxertia em citrinos: enxertia por aproximação ou encostia, por garfagem, via borbulha e a microenxertia^{11,25,29} (Figura 1.1).

A busca por novos porta-enxertos de citros com melhor desempenho do que os utilizados atualmente é o principal objetivo da citricultura em muitos países³⁰. Novas doenças, a disseminação de doenças já conhecidas e a cultura de citrus em diferentes condições ambientais forçam a demanda por novos porta-enxertos, devido a isso tentativas para solucionar esses problemas têm sido

realizadas por meio de programas de melhoramento de porta-enxertos de citros^{11,16,30,31}.

1.1.3 O perfil fitoquímico dos citros

Estudos de produtos naturais levaram à descoberta de um enorme número de compostos com uma variedade de estruturas químicas, muitos deles bioativos, todos os quais estão presentes na composição química dos organismos vivos³². A quimiosistemática inclui a química como parte da história natural da planta com referência à sua relação com outras similares e sua interação com seu ambiente, tanto vivo como não vivo, fundindo-se a fitoquímica³³. A enorme variedade de constituintes químicos isolados de plantas combinadas com os dados morfológicos e citológicos assumem o seu lugar como parte da história natural geral do organismo em seu ambiente³³.

A evolução em instrumentação analítica, em particular a cromatografia³⁴ aliada a métodos acoplados e automatizados de separação e detecção, como cromatografia líquida hifenada à extração de fase sólida (LC - SPE - MS/NMR³⁵, seguida de métodos de detecção como a espectrometria de massas (LC-MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN), aceleraram os estudos fitoquímicos, culminando no estudo do perfil metabólico^{33,36}. Os avanços rápidos na espectroscopia e a ordenação aprimorada através das análises de rede molecular^{37,38} permitiram a caracterização da variação metabolômica entre as comunidades vegetais contribuindo para a melhora da nossa compreensão da evolução fitoquímica em escalas taxonômicas³⁹. Além disso, as abordagens espectroscópicas estruturais como a RMN podem amplificar o nosso conhecimento com relação a variação estrutural em uma ampla gama de classes de metabólitos^{35,39}.

Desde os primórdios da química que envolve metabolismo secundário de plantas, a família Rutaceae têm recebido muita atenção. Esta família é relativamente bem estudada e bem conhecida por sua alta diversidade de metabólitos secundários. A quimiosistemática desta família foi revisada por SILVA, M. F. G. F.; et al., 1988, sugerindo uma taxonomia com uma interpretação evolutiva da família; mostrando que a mesma se baseia principalmente em alcaloides derivados do ácido antranílico, cumarinas, lignanas, flavonoides e limonoides⁴⁰. O

gênero *Citrus* é o representante comercial mais importante da família Rutaceae e seu perfil químico é caracterizado pela presença de cumarinas, limonoides, flavonoides e demonstra escassez em quantidade e diversidade de alcaloides derivados do ácido antranílico, sendo proeminente a presença de inúmeros compostos prenilados⁴¹.

O Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar – INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), vem há anos trabalhando com estudos de isolamento e elucidação estrutural da composição química dos citros. Em um dos trabalhos do grupo, foi possível isolar e identificar 34 metabólitos das folhas, caule e raízes de *Citrus sinensis* x *Citrus limonia*⁴¹. O estudo da parte superior do enxerto propiciou o isolamento quase que exclusivamente de flavonoides (1-8). Apenas duas cumarinas foram isoladas: xantiletina (13) e xantoxiletina (14) nas folhas e caule. O limonoide, limonina (31), foi encontrado nas folhas e o triterpeno, friedelina (33), nas folhas e caule. Na sessão caalejada do enxerto, onde foi analisado apenas o caule de *C. limonia* foram encontradas as cumarinas xantiletina (13), seselina (15), suberosina (16), crenulatina (17) e tamarina (18); os flavonoides limonianina (10), lupinifolina (11) e eritrisenegalona (12); e o alcalóide de acridona atalafilidina (34). Nas raízes a os compostos de maior representatividade são as cumarinas (13-30), apenas dois limonoides: limonina (31) e acetato de limonina (32) foram isolados e identificados neste tecido da planta (Figura 1.2).

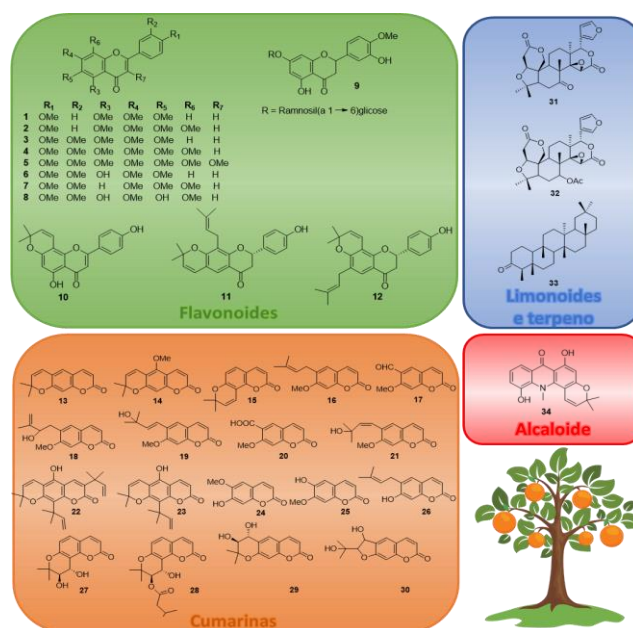


Figura 1.2. Composição química de *Citrus sinensis* x *Citrus limonia*.

Diversos outros estudos e revisões tem reportado o isolamento e identificação de flavonoides nas partes superiores e frutos de citros^{42,43,44,45,46,47}, furanocumarinas^{48,49} e terpenos^{50,51} no fruto e casca do fruto e a presença majoritária de cumarinas e piranocumarinas nas raízes e caule^{49,52,53}.

1.1.4 A citricultura no Brasil e no mundo

A citricultura é uma das principais atividades agrícolas do mundo⁵⁴. São produzidos cerca de 100 milhões de toneladas de frutas cítricas por estação sendo considerado o maior setor de produção de fruta do mundo, no qual cerca de 34% dos citrinos são usados para fazer sucos⁵⁵. Os mais importantes países produtores de frutas cítricas são o Brasil, responsável por cerca de 24% da produção mundial, China também com 24% seguida pelos Estados Unidos com 11%. O Brasil aparece em primeiro novamente, como sendo um dos maiores produtores de laranja no mundo (29%), seguido pelos Estados Unidos (11%), Índia e China com cerca de 8% cada⁵⁶.

O comércio entre as nações e as guerras ajudaram a expandir o cultivo dos citros, de modo que, na Idade Média, a laranja foi levada pelos árabes para a Europa⁵⁷. Em seguida nos anos de 1500, através das expedições de Cristóvão Colombo, mudas de frutas cítricas foram trazidas para o continente americano. Introduzida no Brasil logo no início da colonização, a laranja encontrou no país melhores condições para crescer e frutificar do que nas próprias regiões de origem, expandindo-se por todo o território nacional⁵⁷. Os citros chegaram ao Brasil durante as primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia, sendo que em 1540 já havia relatos de laranjas espalhadas por todo o litoral do país⁵⁸.

O Brasil, desde a década de 80, é detentor do título de um dos maiores produtores mundial de laranja. A cultura dos citros atualmente encontra-se disseminada em todo território brasileiro, e com grande importância econômica e social para vários estados como São Paulo que é o maior produtor nacional, responsável por 72% da produção, seguido por Bahia 6,7%, Minas Gerais 6,5%, Paraná 5,5%, Sergipe 3,3% , Rio Grande do Sul 2,7%, Pará 1,3% dentre outros (Carvalho et al., 2019). As maiores plantações são de laranja Pêra (*Citrus sinensis*), tangerina (*C. reticulata*), toranja (*C. paradisi*) e o limão Cravo (*C. limonia*). E as menores plantações são de lima (*C. aurantifolia*) e cidra (*C. medica*)⁵⁷.

Dados apresentados pela Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR) realizada pelo Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus 2021²⁷, a safra 2019/2020 foi finalizada em 386,79 milhões de caixas de 40,8 quilos em todo o cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro. Esta safra foi 35,3% maior do que a anterior (2018/2019) e nos últimos 30 anos, apenas quatro safras foram maiores do que essa (FUNDECITRUS, 2020)⁵⁹. Em comparação à safra (2020/2021), que foi finalizada em 268,63 milhões de caixas, a projeção para a safra (2021/2022) estima um crescimento de 9,51%, mas ainda fica abaixo da média das últimas dez safras, o que equivale a uma queda de 10,53% (Figura 1.3).

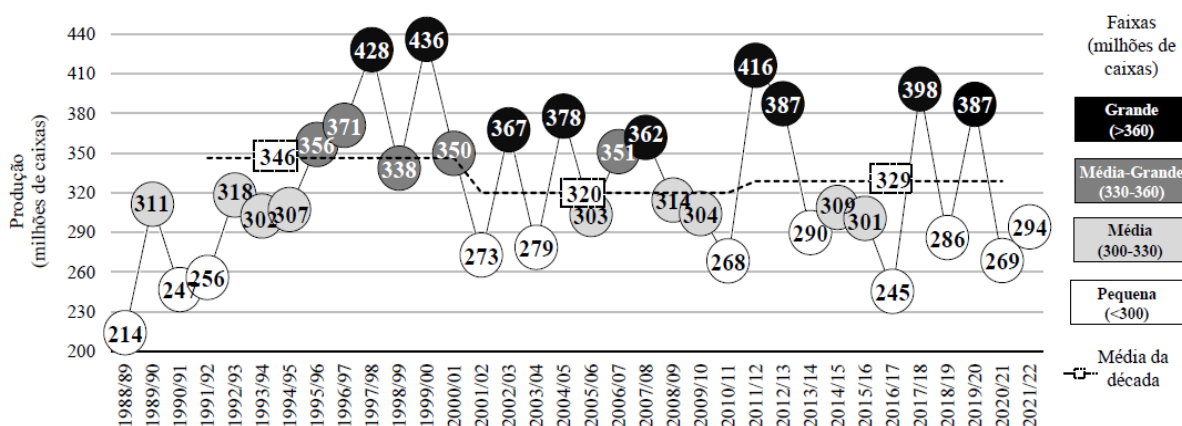


Figura 1.3. Produção de laranja de 1988/89 a 2020/21 e estimativa da safra 2021/22. Fonte: CitrusBR (1988/89 a 2014/15) e Fundecitrus (2015/16 a 2021/22). Retirado de FUNDECITRUS 2020⁵⁹.

A taxa média de queda de frutos do cinturão citrícola, acumulada desde o início da safra 2019/2020, foi de 17,63%, a mais alta já medida pelo Fundecitrus. As principais causas foram queda natural, atividades mecanizadas ou condições climáticas adversas (5,15%); HLB (4,39%); bicho-furão e moscas-das-frutas (4,29%); pinta preta (2,12%); leprose (1,30%); e cancro cítrico (0,38%)⁵⁹.

Os citros estão sujeitos a problemas sanitários através do ataque de diversos patógenos acarretando uma série de doenças, sendo estes considerados como fatores limitantes para o cultivo⁴. Além de perdas na produção, tais fatores causam diminuição da qualidade do fruto e até destruição de pomares inteiros. A doença que acomete a cultura é definida como um distúrbio fisiológico, resultado de uma irritação contínua causada por agentes bióticos ou abióticos. Dentre estes destaca-se os agentes bióticos, que podem ser fungos e bactérias, além dos vírus,

viroides e nematoides que dentro de alguns anos, pode se espalhar e têm um grande impacto econômico⁶⁰.

As plantas cítricas são atacadas por insetos que são vetores de uma série de doenças danosas a cultura de citros, tais como ácaros, cochonilhas, coleobrocas (besouros que perfuram tronco e ramos), pulgões, moscas-das-frutas, lagartas, cochonilhas, formigas e cigarrinhas⁴. Estes são vetores de doenças comuns a citricultura, causadas por:

- Vírus: tristeza dos citros, morte súbita dos citros, leprose dos citros, sorose e xiloprose
- Fungos: verrugose, gomose, melanose, rubelose, mancha preta e podridão de *Alternaria alternata*.
- Bactérias: cancro cítrico, clorose variegada dos citros (CVC) e huanglongbing (HLB).

A Figura 1.4 mostra uma linha do tempo contendo as principais doenças que atacam a cultura com informações sobre os primeiros casos no Brasil, os danos, os vetores e patógenos causais (AMARAL, J. C., 2017)⁶¹. Acredita-se que numerosas doenças têm atacado as plantas cítricas já na sua região de origem e que a sua ocorrência generalizada é a consequência humana das viagens internacionais e do comércio. Muitas das doenças têm sido qualificadas como devastadoras. Isso não é exagero, considerando que algumas delas quase causaram a destruição da indústria cítrica, ocasionalmente em alguma parte do mundo, em um momento ou outro⁵⁷.

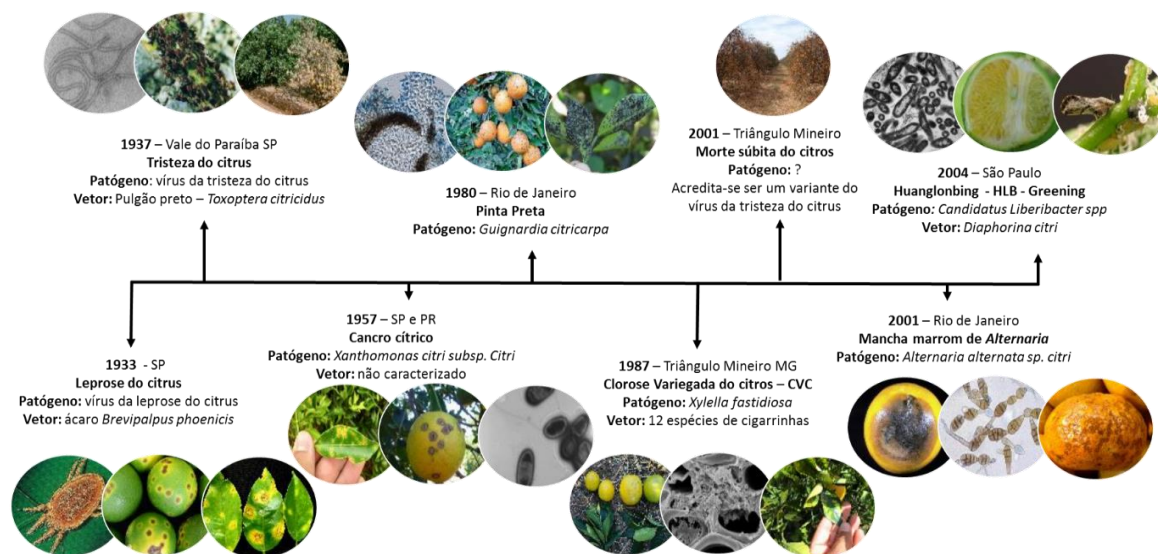


Figura 1.4. Histórico de surtos das principais doenças de citros no Brasil.

1.1.5 Huanglongbing

O greening (*huanglongbing*/HLB) é a mais destrutiva doença dos citros no Brasil. Não há variedade comercial de copa ou porta-enxerto resistente à doença e as plantas contaminadas não podem ser curadas. As bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) e *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) são as responsáveis por causar a doença⁶². Essas bactérias são pertencentes a três espécies de procariotos gram negativos, de colonização restrita ao floema das plantas e são transmitidas para os citros pelos psílídeos *Diaphorina citri* que é o principal inseto vetor de da doença na Ásia, Brasil e EUA e *Trioza erytreae* que é o principal vetor nos países africanos⁶³. A combinação mais agressiva de vetor *Candidatus Liberibacter* (CL) é constituída por CLAs e *D. citri*^{64,65} sendo esta que tem afetado os pomares de citros no Brasil⁶⁶ (Figura 1.5).

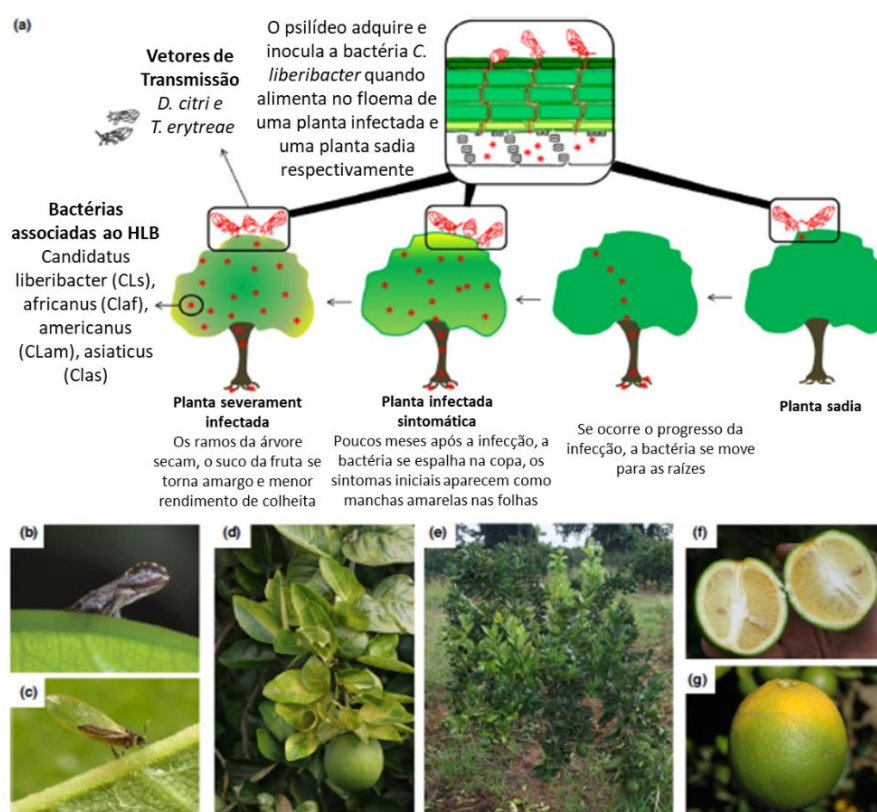


Figura 1.5. **a)** Processo de disseminação do Huanglongbing (HLB), transmitida pelos vetores psílídeos e sintomas característicos da doença. **b,c)** vetores transmissores *D. citri*, *T. erytreae* respectivamente. **d-g)** Sintomas característicos de HLB. Retirado de: Pre-HLB, A. Ferreres and Fundecitrus. Adaptado de Alquézar et al., 2021⁶⁴.

Essa doença surgiu na Ásia há mais de cem anos e foi identificada no Brasil em 2004, em plantas de pomares localizados na região de Araraquara, Estado de São Paulo, sendo esta a primeira detecção da doença no continente americano. Em 2005 ocorreu a primeira detecção da doença em Minas Gerais e em 2007 no Paraná⁶².

A bactéria CL multiplica-se e é levada por meio do fluxo da seiva para toda a planta. Quando há sintomas na extremidade dos galhos, ela pode ficar alojada em vários pontos, inclusive na parte baixa do tronco e nas raízes, o que torna a poda inútil e perigosa. Além de não curar a planta, as brotações que surgem após a poda servem como fonte para novas infecções⁶⁷. A bactéria no floema impede a condução da seiva elaborada, fazendo com que plantas novas contaminadas não produzam e plantas adultas tornam-se improdutivas em 2 a 5 anos⁶⁸.

O HLB é caracterizado pelo aparecimento de sintomas foliares, como manchas irregulares e manchas de clorose severa, muitas vezes parecidas com deficiências nutricionais de zinco ou outras. Ocorre o declínio da árvore e redução na qualidade e rendimento da fruta. As árvores contaminadas pela doença não chegam a produzir e as que produzem sofrem uma grande queda de frutos²¹. O controle é difícil pois a doença é de rápida disseminação e é altamente destrutiva para os pomares, causando grandes prejuízos na citricultura⁶⁵.

Os sintomas incluem também disfunção do floema e declínio da raiz⁶⁴. O movimento bacteriano ocorre pelo floema⁶³, indo do local de alimentação inicial do inseto até as raízes onde se replica. O sistema radicular do hospedeiro é danificado primeiro e posteriormente espalha-se para o resto do copa. As raízes são danificadas pela infecção da bactéria antes do desenvolvimento de sintomas foliares visíveis, implicando na detecção tardia da doença na planta^{69,70}. Nos estudos realizados por BRASWELL, W. E.; et al., 2020 foi demonstrado que detecção do patógeno ocorre mais cedo, de forma mais consistente e mais frequentemente em amostras de raízes do que nas folhas⁷⁰.

Depois que os citros são infectados com CL, os elementos de tubo crivado do floema e os plasmodesmos são bloqueados, resultando no inchaço da célula crivada, causando um bloqueio do transporte de produtos fotossintéticos e um acúmulo excessivo de amido nos tecidos cítricos^{71,72}. Isso leva o cloroplasto a destruição e conseqüentemente ao amarelamento das folhas. Sendo assim, inibir ou

aliviar o acúmulo de grãos de amido pode ser uma estratégia eficaz para aliviar os sintomas da doença⁷³.

O acúmulo de amido foi comprovado por XIE, Z.; et al., 2020 através da quantificação de amido, expressão gênica de AMS (amido hidrolase) e AGP (amido sintase) em plantas de *C. sinensis* infectadas com HLB com sintomas entre 2 e 10 meses de infecção comparadas a plantas saudas. A quantidade de amido em nervuras centrais, células mesofílicas e nas raízes de plantas afetadas por HLB foi 2 vezes maior do que as plantas controle. Da mesma maneira o nível de expressão do gene AMS foi supregulado nas nervuras centrais e raízes, enquanto o nível de expressão do gene AGP foi infraregulado⁷³.

Apesar dos extensivos esforços em pesquisas, ainda não há medidas de controle que sejam efetivas e de baixo custo, nem mesmo existem métodos curativos, para o HLB. Isto deve-se ao fato da difícil compreensão da interação planta-bactéria e também devido a CL ser uma bactéria que ainda não é cultivada em condições laboratoriais⁶⁴. Desta forma, a prevenção da infecção das plantas, que uma vez afetadas são fontes de inóculo para outras plantas, é fundamental para o controle do HLB. O controle é preventivo e baseado em três recomendações: eliminação da fonte de inóculo por remoção de árvores afetadas; tratamentos químicos e biológicos para diminuir a população do inseto vetor e eliminação total de *Murraya paniculata*, o hospedeiro preferido de *D. citri*^{65,74,66}.

Um levantamento realizado em 2017 aponta que a doença está presente em 16,73% das laranjeiras. O número é semelhante ao do ano de 2016 que foi de 16,92% e de 2015 que foi de 17,89%. Nos últimos 3 anos a doença se mostra estável desde que o levantamento foi iniciado. O motivo é a alta taxa de eliminação de plantas doentes por parte dos citricultores que estão fazendo o manejo rigoroso do HLB⁶⁶.

De acordo com a Pesquisa de Estimativa de Safra (PES), foram erradicados 21,3 mil hectares de laranja entre abril de 2015 e março de 2016, dos quais 57% eram de pomares acima de 10 anos. Em contrapartida, foram plantados 9,5 mil hectares com laranja no período. Houve uma eliminação de pomares velhos e doentes, que deixaram de ser produtivos por causa do HLB, ao mesmo tempo em que mudas saudas foram plantadas, isso fez com que a doença se mantivesse no mesmo patamar⁶⁷. Este é o único caminho a seguir enquanto medidas novas, mais duráveis e sustentáveis não estiverem disponíveis⁷⁵.

1.1.6 Estratégias de combate ao HLB através do estudo metabolômicos e genômicos

Para o controle fitossanitário, o uso de pesticidas contribui para o aumento da produtividade agrícola, mas também tem sido responsável por efeitos adversos sobre o meio ambiente e a saúde humana⁷⁶. Os danos causados pelos pesticidas convencionais são bem conhecidos, incluindo resistência a pragas, perda de antagonistas naturais de pragas, contaminações do solo, poluição do meio ambiente levando à perda de flora e fauna. Dentro deste cenário a comunidade agrícola está se movendo para reduzir a dependência de pesticidas convencionais a fim de melhorar a produção⁷⁷.

Atualmente, com o avanço da agricultura de base agroecológica, novas medidas para o controle de pragas e doenças vêm apresentando destaque, tal como a busca de plantas e porta enxertos que possuam resistência e sejam, portanto, menos suscetíveis ao ataque de patógenos⁴. Além disso, faz-se necessário avaliar o perfil metabolômico de plantas doentes x plantas saudáveis e detectar possíveis metabólitos que sejam responsivos à infecção. A produção de muitos metabólitos secundários é aumentada durante a infecção, fornecendo uma vantagem de sobrevivência para a planta hospedeira durante a invasão do patógeno. Sendo assim, as interações entre genes, transcritos, proteínas e metabólitos definem o resultado final do fenótipo de defesa da planta⁷⁷.

Estresses bióticos e abióticos induzem alterações fisiológicas, transcriptômicas e metabolômicas nas plantas. Atualmente, muitas abordagens biotecnológicas estão disponíveis para aumentar a produção de metabólitos secundários em plantas. Portanto os estudos biossintéticos, metabolômicos, proteômicos e de engenharia genética, possibilitam a realização do melhoramento genético para obtenção de plantas mais resistentes frente às doenças que acometem a cultura⁷⁶. Através da correlação da expressão gênica e acúmulo de metabólito, muitas vezes obtêm-se indicadores de genes específicos que estão envolvidos na biossíntese de metabólitos. Esta é uma estratégia poderosa para identificar novos genes comprometidos em um caminho biossintético específico. As funções de vários genes são identificadas e caracterizadas por metabolômica e muitas vezes em conjunto com transcriptômica^{78,79}.

A metabolômica pode ser usada para oferecer respostas se há uma etapa da via que é regulada de forma diferente devido a uma perturbação, até que ponto as mudanças genéticas ou ambientais alteram o metabolismo e quais genes estão subjacentes ao acúmulo de um metabólito. O perfil metabólico comparativo de plantas infectadas e saudáveis identifica redes metabólicas complexas relacionadas à interação planta-patógeno^{80,81}.

A resposta de defesa das plantas envolve compostos naturais bioativos que reconhecem, intervêm e neutralizam os patógenos invasores. Metabólitos secundários de plantas desempenham papéis em diferentes estágios de infecção e progressão da doença. Estudos mostram que a síntese de metabólitos específicos confere resistência ou tolerância dependendo da gravidade da doença e outros fatores relacionados. O surgimento das diversas abordagens ômicas de última geração e a disponibilidade de plataformas metabolômicas possibilitam a agilidade dos estudos nessa direção⁷⁷.

O Huanglonbing por ser uma doença devastadora na cultura de citros, vem sendo amplamente estudada com o objetivo de entender os mecanismos de infecção da bactéria a fim de obter alternativas sustentáveis para controlar os surtos da doença nos pomares. No estudo realizado por GOBETTI, M. F. S., 2021, utilizando UPLC-Q-TOF/MS e análise multivariada, foi possível confirmar que houve um aumento na produção de seselina em *C. sinensis* na presença da bactéria CLas, enquanto o flavonoide hesperidina tem sua concentração reduzida drasticamente na presença da bactéria. Os dados sugerem economia de energia, e esta pode estar sendo canalizada para a biossíntese de cumarinas. As cumarinas estão presentes nas partes inferiores do enxerto e devem ter potencial bactericida frente CLas⁸².

No trabalho desenvolvido por BELLETE, B. S., 2013, observou-se que planta de citros aumenta a produtividade de xantiletina e outras cumarinas, em resposta à CLas, somente nos extratos das raízes. Tal fato sugere que a defesa da planta frente à bactéria causadora do HLB, parece estar nas raízes, inibindo o caminho do ácido cinâmico que leva aos flavonoides nos demais órgãos, para ativar aquele que conduz às cumarinas. A ativação do caminho que leva às cumarinas sugere estas terem a função de sinalização na defesa contra a bactéria⁸³.

No estudo utilizando imagem por espectrometria de massa (MSI) desenvolvido por PONTES, J. G. M; et al., 2020, foi possível identificar metabólitos que participam do processo de infecção por CLas e defesa da planta, como

fitohormônios, ácidos orgânicos, carboidratos, flavonoides e aminoácidos. Foi observado o aumento da concentração de metabólitos em citros associados à doença HLB, incluindo ácido quínico, fenilalanina, nobiletina e sacarose. Os metabólitos ácido abieta-8,11,13-trien-18-óico e 4-acetil-1-metilciclohexeno apresentaram maior distribuição nas folhas sintomáticas e foram diretamente associados à doença⁸⁴. Em outro estudo realizado por HIJAZ, F. M.; et al., 2013, diferenças no perfil metabolômico via LC-MS, entre as folhas de plantas de citrus controle e as de plantas infectadas com CLas foram evidentes. Entre esses compostos estão flavonoides glicosilados, flavonas polimetoxiladas e hidroxicinamatos⁸⁵.

Em estudos recentes publicado por KILLINY, N. & NEHELA, Y., 2017, foi demonstrado o impacto da infecção por CLas em *C. sinensis* usando GC-MS seguido pela análise de expressão gênica de 37 genes envolvidos no caminho biossintético do ácido jasmônico, ácido salicílico e prolina-glutamina. A quantidade de glicina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, ácido benzóico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido salicílico e ácido succínico aumentou após a infecção por CLas. Concomitantemente as análises de expressão gênica suportaram estes resultados obtidos, sugerindo que os aminoácidos estão envolvidos na defesa da planta frente ao HLB através da ativação da via do ácido salicílico⁸⁶.

Através da investigação metabolômica via ¹H-NMR realizada por SLISZ, A. M.; et al., 2012, realizando a comparação do suco obtido a partir de laranjas colhidas de árvores infectadas com CLas sintomáticas e assintomáticas e de árvores saudáveis revelou diferenças significativas nas concentrações de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, limonina glicosilada e limonina⁸⁷.

Diversos estudos tem sido direcionados para encontrar respostas de acordo com alterações no metaboloma, proteoma e transcriptoma dos citros frente a infecção de CLas. Há relatos de que proteínas relacionadas à defesa, como peroxidases, proteases e inibidores de proteases, foram induzidas na presença da bactéria⁸⁸, que as plantas transgênicas que superexpressam CsNPR1 (do inglês *non-expresser of pathogenesis-related genes 1*) possuem maior tolerância contra HLB^{89,90} e que a expressão de genes de biossintese de flavonóides e genes induzidos por auxina são suprimidos⁹¹. A expressão de genes 4CL, HCT, CHI, CHS, CYP e C12R envolvidos na via de fenilpropanóides foi aumentada nas folhas de

citros em período assintomático e precoce de infecção por HLB, ao passo que a concentração de nove compostos da via dos fenilpropanoides também aumentou. Posteriormente foi observado a diminuição na expressão destes genes e na quantidade destes metabólitos em folhas de infecção tardia com HLB⁹².

Após vários anos de pesquisa sobre o HLB, ainda há uma demanda urgente de soluções satisfatórias para controlar sua disseminação e incidência. Para o desenho de estratégias biotecnológicas a fim de estimular a resistência da planta frente a bactéria é necessário desvendar as interações entre CLas e plantas. Embora muitos trabalhos científicos tenham sido publicados, os desafios de trabalhar com plantas de desenvolvimento lento e bactérias não cultiváveis em condições laboratoriais têm limitado a aquisição de conhecimento sobre esse patossistema⁶⁴.

Um estudo recente mostrou que as raízes peludas das plantas, também chamada de cultura de raiz transformada, suportam o crescimento de patógenos exigentes como CLas *in vitro*. Utilizando estas raízes peludas microbianas de citros para uma triagem de eficácia rápida e reprodutível, foram identificados seis peptídeos antimicrobianos: dois reguladores imunológicos vegetais e oito produtos químicos que inibem CLas. nos tecidos vegetais⁹³. Isso permite a triagem de alto rendimento de potenciais moléculas anti-CLas, estratégias de modificação genética e identificação inequívoca de fatores de virulência de CL. Além disso, espera-se que pesquisas sobre genótipos resistentes ao HLB gerem novas informações relacionadas à suscetibilidade bacteriana ou genes de resistência⁶⁴.

Apesar da vasta quantidade de trabalhos publicados, ainda há uma necessidade da comunidade científica reunir esforços a fim de encontrar uma estratégia viável e sustentável para combater o HLB. Com o objetivo de alcançar sucesso neste âmbito, além de otimizar meios de crescimento artificiais e condições de cultura para cultivar esta bactéria; é necessário desenvolver o citros *in vitro* a partir da semente e promover a infecção da plântula com CLas. Além disso é necessário promover estudos genômicos, transcriptômicos e metabolômicos em raízes de citros, visto que esta parte vegetal possui um papel importante na disseminação da bactéria na planta, porém estudos com esta abordagem ainda não foram reportados.

1.1.7 As cumarinas

Existem mais de 1300 cumarinas diferentes descritas em plantas, fungos e bactérias⁹⁴. Dentro das células vegetais, se acumulam no compartimento vacuolar⁹⁵ e são essencialmente sintetizadas nas raízes mas estão presentes em diferentes órgãos vegetais, incluindo folhas, frutos, flores e também nos exsudatos das raízes das plantas⁹⁶. São substâncias que constituem uma classe química, na qual o primeiro representante foi isolado por Vogel, em 1820, da espécie *Coumarona odorata*. Estão distribuídas em diferentes famílias como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae nas quais são encontradas com ampla ocorrência. Também estão presentes em Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae, entre outras, onde possuem menor ocorrência⁹⁷. São importantes para a adaptação de plantas aos estresses bióticos ou abióticos e são importantes protetores de plantas contra fitopatógenos e insetos⁹⁸.

As cumarinas são 1,2-benzopironas que consistem em um anel benzênico ligado a um anel pirona. São relatados quatro subtipos que incluem cumarinas simples (hidroxiladas, alcoxiladas, alquiladas e suas formas glicosídicas), furanocumarinas (anel cumarina ligado a anel furano), piranocumarina (anel cumarina ligado a anel pirona) e pirona substituídas (substituição no anel de pirona em C-3 ou C-4)⁹⁹. São metabólitos secundários de plantas de baixo peso molecular, em alguns casos fluorescentes por absorverem luz UV e são sintetizadas pela via do chiquimato, também conhecida como via dos fenilpropanóides¹⁰⁰.

Muitas etapas enzimáticas importantes da biossíntese desta classe já foram elucidadas, que inclui liases, transferases, ligases, oxigenases e redutases, muitas das quais são codificadas por superfamílias de genes, como as citocromo P450, 2-oxoglutarato dioxigenase (2-OGD) e as redutases dependente de NADPH. Entretanto muitas destas ainda são desconhecidas e muitas reações dependentes de P450, ainda não foram resolvidas¹⁰¹.

O caminho do chiquimato inicia-se pelo acoplamento do fosfoenol piruvato (PEP) proveniente da via glicolítica, com a eritrose-4-fosfato proveniente da via da pentose fosfato, seguindo por várias etapas até a formação do ácido chiquímico que posteriormente é fosforilado. Após a fosforilação do ácido chiquímico, ocorre mais uma incorporação de fosfoenol piruvato (PEP) seguida de eliminação de

ácido fosfórico. Mais uma eliminação de ácido fosfórico ocorre através de uma eliminação concertada levando ao produto ácido corísmico^{102,100}

Em sequência ocorre um rearranjo de Claisen, transformando o ácido corísmico em ácido prefênico. A L-fenilalanina, que é precursora de uma ampla variedade de produtos naturais é então formada a partir do ácido prefênico, em dois passos reacionais. Uma eliminação da amônia da cadeia lateral catalisada pela fenilalanina amonialiase (PAL)^{103,104} gera o ácido trans-cinânico que ao sofrer uma para hidroxilação mediada pela cinamato 4-hidroxilase (C4'H)^{105,106}, forma o ácido p-cumárico. Em seguida a enzima 4-cumarate:CoA ligase (4CL)^{107,108} promove a formação do ácido p-cumaroilCoA. Este intermediário é posteriormente hidroxilado por uma 2'-hidroxilase (C2'H)⁹⁸ e finalmente a umbeliferona é produzida seguida de uma *trans* - *cis* isomerização e uma lactonização espontânea^{96,102} (Figura 1.6).

Entre as cumarinas, a umbeliferona ocupa uma posição central na biossíntese e a grande diversidade estrutural desta classe é devido principalmente a incorporação de unidades prenila no anel benzênico. A prenilação da umbeliferona em C-6 leva a formação de pirano e furanocumarinas lineares e em C-8 à formação de pirano e furano cumarinas angulares^{100,109,110}. Derivados mais complexos posteriormente são formados através de sucessivas reações de hidroxilação e/ou metoxilação e até mesmo por outras prenilações.

As cumarinas apresentam-se como fitoalexinas^{111,112} ou fitoanticipinas⁹⁶ associadas à resistência de plantas a patógenos causadores de diversas doenças como, *Ralstonia solanacearum*¹¹³, *Penicillium digitatum*¹¹⁴, *Phytophthora citrophthora*¹¹¹, *Xylella fastidiosa*^{41,53}, *Xanthomonas campestris*¹¹⁵, *Alternaria alternata*¹¹⁶, *Candidatus liberibacter*^{82,83} entre outras. As cumarinas mostram-se eficazes no controle de patógenos de plantas devido a sua capacidade de bloquear os sistemas de sinalização *quorum sensing* (QS) e de inibir a formação de biofilmes, portanto esta classe de produtos naturais estão surgindo como uma estratégia promissora para combater infecções bacterianas na nova era da resistência antimicrobiana¹¹⁷.

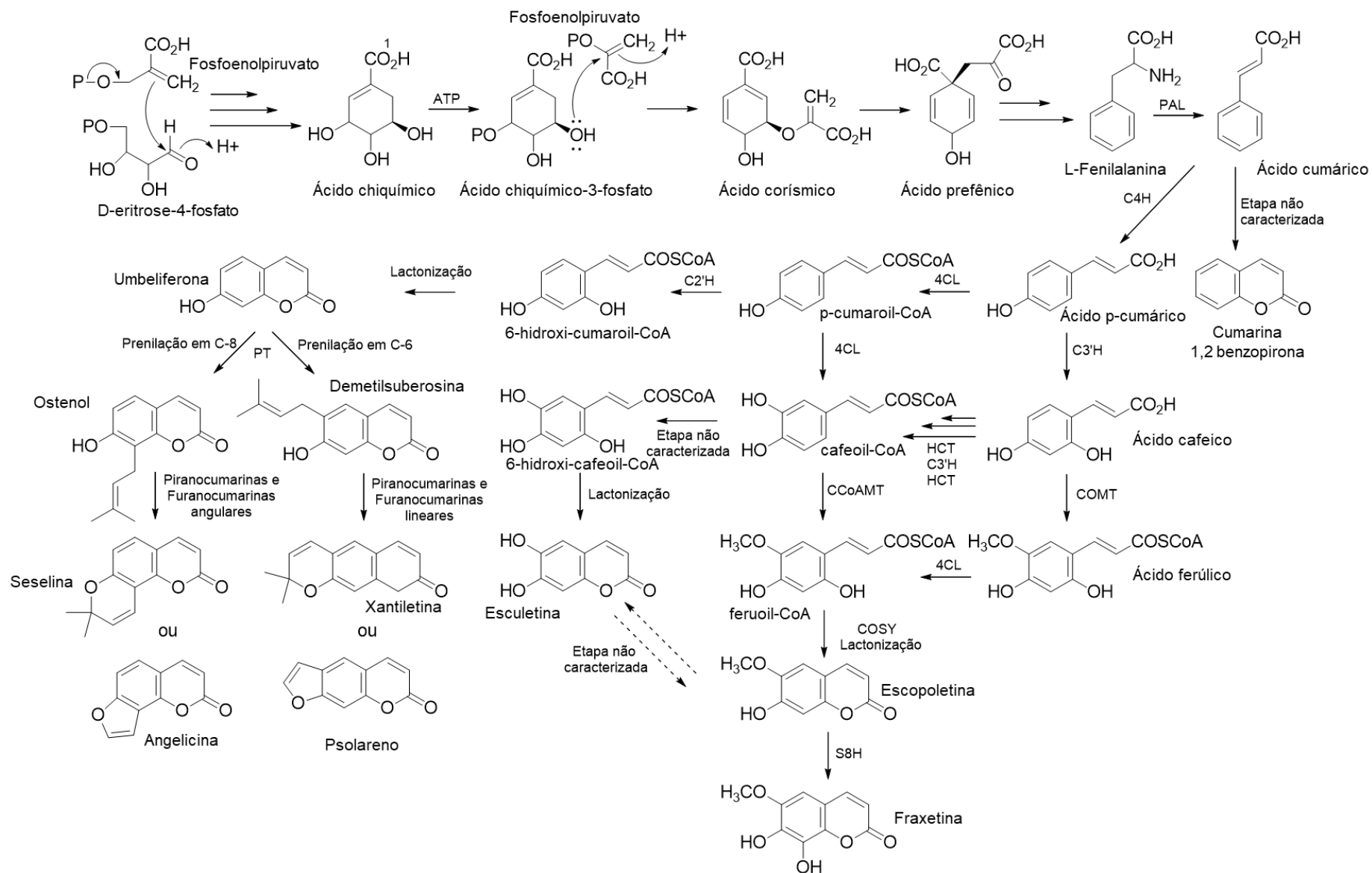


Figura 1.6. A biossíntese de cumarinas. Adaptado de ^{95,99,102,106,108}.

Recentemente as cumarinas foram associadas a absorção de nutrientes e na comunicação raiz-microbioma pois são secretadas na rizosfera sob baixa biodisponibilidade de ferro. Análises de proteômica quantitativa revelaram que a abundância de várias enzimas relacionadas à via biossintética geral dos fenilpropanóides em raízes é fortemente responsiva a deficiência de ferro, em particular, a PAL e a 4CL^{118,119,120,121}.

Além desta variedade de aplicações na área agrônômica, as cumarinas também possuem aplicações nas ciências médicas por exibirem uma ampla atividade farmacológica^{122,123} que variam de antimicrobiana^{124,113,125}, antiviral (incluindo anti HIV, influenza, dengue e Chikungunya)^{126,127}, antifúngica¹²⁸, antiprotozoária auxiliando no combate à Leishmaniose¹²⁹, antioxidante^{130,131}, dentre outras. Por serem inibidoras da ciclooxigenase (COX) possuem propriedade anti-inflamatória¹³², inibem as colinesterases auxiliando no tratamento de Alzheimer¹³³ e possuem também atividade anticoagulante auxiliando no tratamento de doenças cardiovasculares e trombose¹³⁴. Por serem substâncias que regulam espécies de oxigênio reativas (ROR), afetam as proteínas associadas à apoptose e terem atividade inibitória da angiogênese tumoral¹³⁰, as cumarinas são reportadas por terem atividade anti-cancerígena para os mais diversos tipos de tumores^{135,136}.

Dentro desta classe as piranocumarinas (PCs) são um sub-grupo de mais de 1300 cumarinas naturais, essencialmente encontradas em quatro famílias de plantas superiores: Apiaceae, Rutaceae, Fabaceae, Moraceae⁹⁷ e aparecem como substâncias majoritárias em raízes de citros^{41,53}. As piranocumarinas possuem um importante papel no mecanismo de defesa das plantas contra patógenos¹³⁷, apresentam-se como inibidoras do fungo simbiótico das formigas¹³⁸ além de possuir atividade antinociceptiva¹³⁹ e anti-HIV^{140,141}. As piranocumarinas, como a xantiletina e seselina, são descritas principalmente em Rutaceae e Apiaceae e são consideradas os principais metabólitos de *Petroselinum crispum* e *Ammi visnaga*¹⁰⁰.

As piranocumarinas (PCs) também existem como lineares e angulares assim como as furanocumarinas (FCs). Embora muitos trabalhos são reportados na literatura sobre a biossíntese de FCs, poucas informações foram publicadas sobre a produção de PCs. Há poucos estudos relatados na literatura sobre a biossíntese do anel 2,2-dimetilpirano em piranocumarinas de Rutaceae. Esta informação, juntamente com a ambiguidade quanto à biossíntese de IPP e DMAPP em Rutaceae, levou¹⁴² a investigar a biossíntese de xantiletina e seselina em *C. sinensis*

e *C. limonia*. A unidade de difosfato de isopentil (IPP) que participa da prenilação da umbeliferona em C-6 e C-8, levando às piranocumarinas lineares e angulares, respectivamente, foi confirmada como sendo do 2-C-metil-D-eritritol- 4 (MEP), descartando a via do mevalonato (MEV) ou via mista, após confirmar a via biossintética da unidade terpênica de xantiletina e seselina. O padrão de enriquecimento foi determinado comparando-se os espectros quantitativos de ¹³C-RMN desses compostos isolados das raízes de *C. sinensis* e *C. limonia*, determinando que a porção isopreno deriva exclusivamente da via MEP, pois apenas o C-4' e C-5 ' da unidade IPP de xantiletina e seselina foram enriquecidos em ambas as espécies cítricas (Figura 1.7)¹⁴².

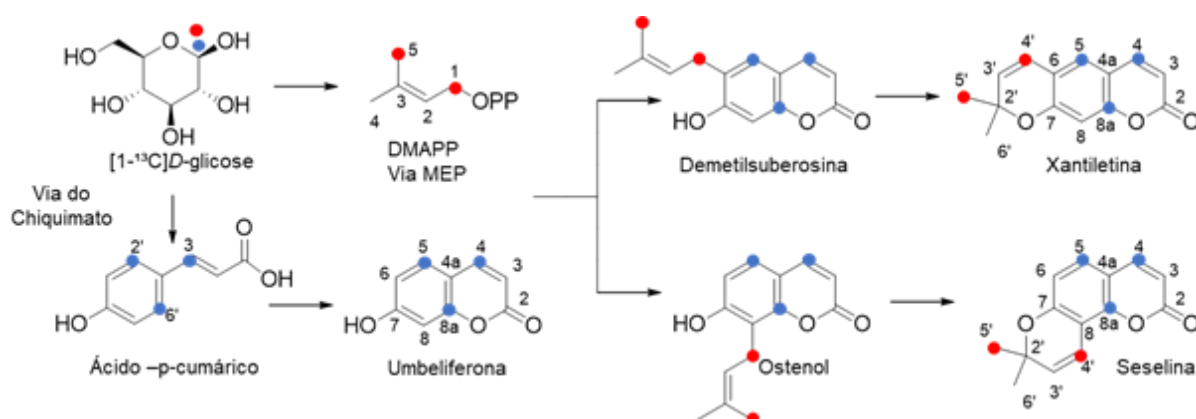


Figura 1.7. Biossíntese de xantiletina e seselina após a incorporação de glicose-1-¹³C]. Adaptado de¹⁴².

Há um vasto interesse nesta classe de substâncias pois são facilmente isoladas em raízes de citros além do fato de que as piranocumarinas xantiletina e seselina e seus intermediários prenilados demetilsuberosina/suberosina e ostenol/ostol são compostos responsivos ao ataque de várias doenças que acometem a citricultura como já mencionado. Para induzir resistência a CLAs, necessita-se de um estudo aprofundado da interação planta-bactéria por LC-HRMS utilizando a rede molecular GNPS e a caracterização das enzimas envolvidas na biossíntese de piranocumarinas.

1.1.8 A metabolômica de plantas e o uso da plataforma GNPS

A Metabolômica refere-se a uma análise abrangente e oferece um conhecimento sobre a composição de metabólitos de qualquer sistema biológico. É geralmente definida como uma análise qualitativa e quantitativa holística de todos os

metabólitos presentes em um sistema biológico sob condições específicas¹⁴³. É o perfil dos metabólitos de um organismo em diferentes condições ambientais. Portanto, esta abordagem nos ajuda a entender melhor os vários produtos naturais, na descoberta de candidatos a fármacos naturais, quimiotaxonomia, filogenia e as alterações de metabólitos em resposta a estresses abióticos e bióticos nas plantas¹⁴⁴. A metabolômica tornou-se uma ferramenta poderosa que aprofunda nosso conhecimento sobre o metabolismo primário e secundário da planta¹⁴⁵.

A pesquisa com o objetivo de compreender os mecanismos de defesa das plantas tem se beneficiado do desenvolvimento de métodos de perfilamento de metabólitos ou da metabolômica. Vários metabólitos estão inter-relacionados e formam redes metabólicas mais complexas, portanto, abordagens metabolômicas integradas são necessárias para obter um conhecimento abrangente das configurações e alterações dos metabólitos nas plantas⁷⁷. A metabolômica pode identificar os efeitos fenotípicos dos estresses nas plantas medindo a abundância de metabólitos, fornecendo uma resposta eficiente das alterações fenotípicas frente a estresses ambientais¹⁴³. Uma das grandes contribuições dos estudos nesta área é a identificação da diferença de composição metabólica entre duas amostras induzidas por alterações bióticas ou abióticas, onde a análise destes dados é adicionalmente complicada devido à complexidade das amostras de plantas¹⁴⁴.

Os metabólitos produzidos sob estresse biótico das plantas incluem metabólitos primários diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas, como açúcares, aminoácidos, lipídios e intermediários da fotossíntese, glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e essas alterações são consideradas como um indicativo de disfunção fotossintética e reajuste osmótico¹⁴⁴. Por outro lado, os metabólitos que não estão diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas respondem a condições particulares de estresse são conhecidos como metabólitos secundários que podem ser alcalóides, flavonóides, cumarinas, terpenos, limonoides entre outros¹⁴⁶.

O desenvolvimento das plataformas analíticas, especialmente a melhoria da sensibilidade e resolução da instrumentação MS, permitiu a detecção e identificação de milhares de metabólitos⁷⁸. A enorme quantidade de dados produzidos por essas tecnologias requer métodos avançados de análise de dados para extrair informações relevantes. A correta aplicação dessas metodologias

culminou na possibilidade de identificação de novos biomarcadores e a elaboração de novas hipóteses sobre as consequências dos fenômenos estudados^{81,147}.

As abordagens metabolômicas atuais utilizando cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massa de alta resolução UPLC-HRMS dizem respeito principalmente a três tipos de análises: *targeted*, *semitargeted* e *untargeted*. Nas análises *targeted* e *semitargeted*, a identidade química dos metabólitos a serem analisados são conhecidas antes da aquisição de dados, e o desenvolvimento dos métodos analíticos são direcionados para fornecer uma melhor seletividade e maior precisão¹⁴⁴. Já na abordagem *untargeted*, são desenvolvidos métodos analíticos adequados para adquirir dados sobre diversos metabólitos e só é possível de ser realizada em um equipamento de espectrometria de massas de alta resolução^{147,148}.

Uma dificuldade na interpretação dos dados resultantes da análise *untargeted* é o grande número de picos determinados que não podem ser relacionados a uma estrutura química específica e, portanto, não podem ser relacionadas a uma determinada via bioquímica. A grande vantagem de análise direcionada, por outro lado, é que o usuário tem uma noção prévia do que vai ser analisado, o que fornece melhores resultados interpretáveis em um contexto biológico⁸¹.

O desenvolvimento das ciências ômicas favoreceu a popularização de abordagens não direcionadas/*untarget*, nas quais é realizada a determinação do número máximo possível de compostos sem uma hipótese prévia. Para processar a enorme quantidade de dados obtidos usando essas poderosas técnicas, diferentes ferramentas quimiométricas são usadas para extrair informações quantitativas e qualitativas relevantes^{146,149}.

Algumas das ferramentas quimiométricas mais populares usadas em metabolômica incluem análise de componentes principais (PCA), análise de variância (ANOVA), análise de agrupamento hierárquico (HCA) entre diversas outras¹⁴⁸. A PCA é uma ferramenta matemática que visa representar a variação presente no conjunto de dados. É a abordagem estatística multivariada mais utilizada como método de redução de dimensão que identifica a variância entre amostras, classificando todas as variações substanciais em diferentes componentes principais (PCs) onde cada PC representa uma tendência significativa de variação independente. Viabiliza a redução de grande parte das variáveis de um conjunto de

dados em poucos componentes principais que explicam grande parte da variação dos dados¹⁵⁰.

Há uma série de cuidados a serem considerados na execução de análises metabolômicas e as etapas principais envolvidas no projeto experimental são: o preparo de amostra, aquisição de dados por meio de estratégias analíticas e utilização de técnicas quimiométricas adequadas para mineração de dados. O primeiro deles é com relação ao preparo de amostra que possui um tremendo impacto sobre os resultados finais^{144,151}.

A técnica escolhida para preparo de amostra deve ser rápida, econômica, simples e deve manter a integridade da amostra. A preparação da amostra de plantas para as análises envolve três etapas: coleta do material vegetal, extração e *clean up*. A coleta do material vegetal deve ser realizada com cautela, pois o metaboloma da planta é sensível a reações enzimáticas que podem degradar vários metabólitos⁸⁰. Normalmente, o material vegetal é armazenado em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta a fim de evitar qualquer alteração metabólica.

A escolha do solvente de extração também é muito importante e deve ser selecionado com cautela, levando em consideração o tipo de amostra e o tipo de análise que pretende-se realizar. Dentro do preparo de amostra é de extrema importância realizar o *clean-up* para eliminar possíveis interferentes e para promover a separação e enriquecimento de moléculas alvo em amostras complexas, com o objetivo de minimizar danos instrumentais, obter melhor resolução e maior sensibilidade. As técnicas mais utilizadas são a extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (LLE), cromatografia de permeação em gel (GPC), *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe* (QuEChERS), microextração em fase sólida (SPME), extração de solvente assistida por ultra-som (UASE) e extração sequencial assistida por micro-ondas (MWASE)^{152,153,154}.

A aquisição dos dados é o segundo desafio a ser enfrentado nas análises metabolômicas utilizando LC-HRMS. Dois instrumentos principais de HRMS são frequentemente utilizados em estudos metabolômicos: o orbital ion trap (Orbitrap) e analisadores de massa de tempo de voo quadrupolo (Q-ToF), que podem atingir precisões de massa abaixo de 2 ppm¹⁵¹. Assim, para obter bons resultados nas análises é extremamente necessário otimizar de maneira refinada os parâmetros do equipamento, tais como a composição da fase móvel, vazão, temperatura e fluxo do gás para nebulização, modo de ionização, energia de colisão

dentre outros. Todas estas configurações precisam ser aprimorados durante o desenvolvimento do método de análise garantindo alta sensibilidade, alta seletividade, reprodutibilidade e conseqüentemente análises de boa qualidade que permitem um bom processamento e mineração de dados^{151,155}.

O pré-processamento de dados brutos com certeza é o maior desafio a ser enfrentado na metabolômica e precisa ser realizado com muita cautela. Esta etapa inclui filtragem de ruído (*background*), correção de linha de base, detecção de pico, deconvolução, normalização, alinhamento e identificação (Figura 1.8)¹⁵⁶. A filtragem de ruído e a correção da linha de base são definidas para reduzir ou separar sinais originados de sinais de fundo causados por interferência química ou instrumental. A detecção de pico lida principalmente com a identificação correta de um sinal e sua intensidade juntamente com a deconvolução espectral de massa onde os picos sobrepostos também podem ser resolvidos através do agrupamento de acordo com a contribuição isotópica de cada sinal¹⁴⁴.

O alinhamento consiste na correção dos tempos de retenção de picos com mesmo *m/z*, alinhando as características detectadas em diferentes amostras visando remover deslocamentos para um determinado sinal e assim, garantir a extração de informações úteis. A normalização remove variações atribuídas a fontes experimentais, como ruído analítico ou erro experimental e retém variações relevantes atribuídas a eventos biológicos. Remove a variação sistemática indesejada entre amostras, podendo aumentar a “importância” de compostos pouco abundantes¹⁵⁶. Vários softwares de processamento de dados têm sido usados para auxiliar no pré-processamento de dados metabolômicos e os mais utilizados são o XCMS¹⁵⁷, MZMine¹⁵⁸, MSDIAL¹⁵⁹, OpenMS¹⁶⁰, entre outros.

A partir do século XXI, começou a surgir as novas tendências ômicas combinadas com os avanços na espectrometria, levando a popularização da aplicação de estudos em metabolômica¹⁴⁵. Dentro deste cenário diversas ferramentas combinadas ao uso do LC-HRMS surgiram na tentativa de resolver grandes problemas na mineração de dados, avaliação de dados, processamento de dados e interpretação de dados. Para auxiliar na etapa final de todo este processo, que é a etapa de identificação, a rede molecular/*molecular networking classical* (MN) ou *feature-based molecular networking* (FBMN) dentro da plataforma da web Global Natural Products Social (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>) tem sido utilizada para a análise de dados de espectrometria de massas *untargeted*¹⁶¹.

O GNPS foi introduzido em 2012 e tornou-se públicamente acessível em 2013. É uma plataforma alimentada por mais de 3.000 núcleos de CPU na Universidade da Califórnia San Diego Center para Espectrometria de Massas Computacional e o repositório de dados MassIVE, fornecendo aos pesquisadores de mais de 150 países a capacidade de realizar o MN/FBMN¹⁶². A rede molecular utilizando a plataforma GNPS tem se tornado uma ferramenta de bioinformática essencial para visualizar e anotar dados de espectrometria de massa *untargeted*. O conjunto de dados adicionado ao repositório GNPS consiste em uma análise automática, onde cada dezenas de milhões de espectros em conjuntos de dados é combinado com bibliotecas espectrais de referência para anotar moléculas e descobrir possíveis análogos (Figura 1.8). Inclui bibliotecas espectrais MS/MS disponíveis para produtos naturais como o MassBank, ReSpect e NIST¹⁶¹.

O MN *classical* baseia-se no princípio de que estruturas semelhantes tendem a se agrupar pois formam padrões semelhantes em espectros de fragmentação de massa (MS/MS). A FBMN consiste no mesmo princípio, porém possui um pré-processamento utilizando um software bem estabelecido, melhorando o MN *classical*, permitindo uma análise quantitativa relativa, resolução de isômeros e facilita a anotação espectral^{37,162}. O MN/FBMN é construído por meio de comparações espectrais em pares de um conjunto de dados, criando uma rede espectral de espectros de segunda ordem (MS/MS). Esta rede é então enriquecida pela anotação dos espectros experimentais MS² contra bibliotecas espectrais MS/MS ou bancos de dados³⁷. A visualização e a análise são auxiliadas pela organização de semelhanças de MS/MS par a par em redes moleculares, nas quais nós representam compostos e links entre nós representam pontuações de semelhança³⁵, conectando moléculas relacionadas por sua semelhança espectral e as agrupando em clusters (Figura 1.8).

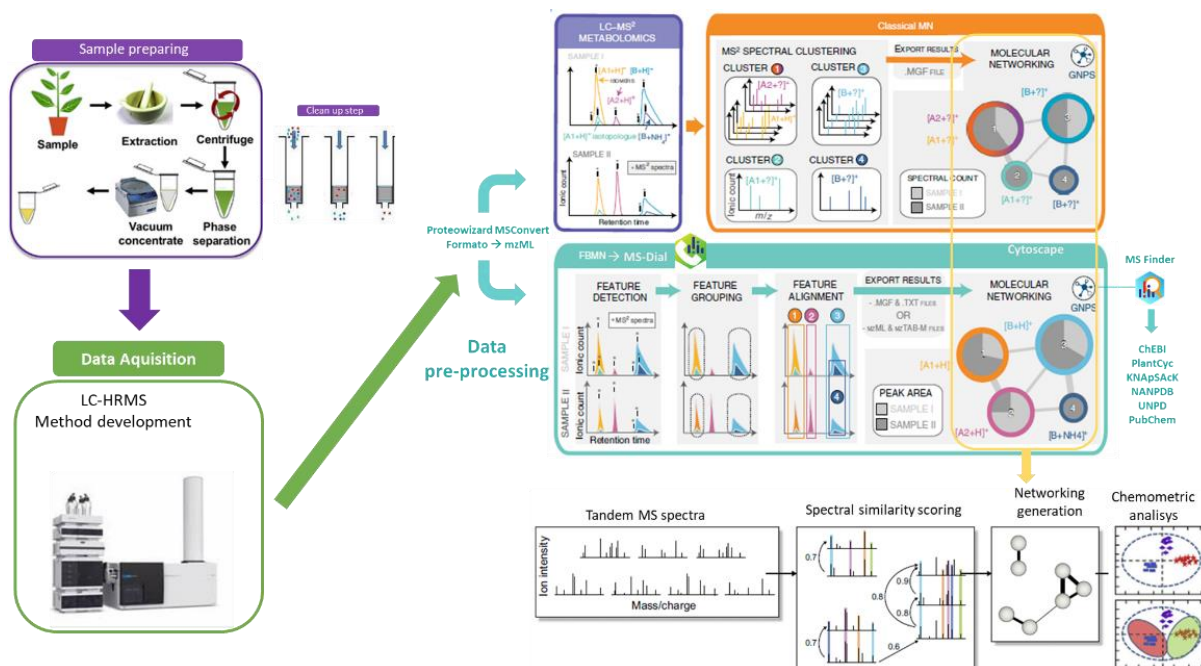


Figura 1.8. Etapas para geração de redes moleculares a partir de dados MS não direcionados com a plataforma web GNPS: MN classical e FBMN. Adaptado de Nothias 2017 e Panda 20187.

Em paralelo a este avanço da plataforma gratuita e digital GNPS, uma ferramenta adicional que tem auxiliado na resolução de problemas com identificação, permitindo a elucidação de nodos pertencentes a um cluster do MN/FBMN é o MSFinder (Figura 1.8). Os espectros podem ser anotados por suas fórmulas elementares de acordo com a contribuição isotópica e fragmentação espectral de dados experimentais versus *in silico*, integrando estruturas e fórmulas para 224622 metabólitos conhecidos¹⁶³. Esta abordagem utiliza cálculos matemáticos e inclui os bancos de dados disponíveis gratuitamente: ChEBI, PlantCyc, KNApSack, NANPDB, UNPD, PubChem dentre outros.

É indiscutível as vantagens que esta abordagem trouxe para os estudos em metabolômica, fornecendo um espaço de conhecimento liderado pela comunidade científica, no qual os dados com relação aos produtos naturais podem ser compartilhados, analisados e anotados por pesquisadores em todo o mundo, de maneira pública e gratuita. Atualmente, o GNPS contém espectros para apenas cerca de 3% de produtos naturais conhecidos, mas o banco de dados vem se expandindo progressivamente, fortalecendo a capacidade dos pesquisadores de fundamentar seus conjuntos de dados desconhecidos com espectros de referência³⁸.

1.1.9 Uma análise bibliométrica para citricultura e o HLB

A bibliometria pode contribuir fundamentalmente para uma análise de como as disciplinas estão se desenvolvendo e como as evidências estão conectadas, revelando a estrutura de campos de estudos. É um método popular e rigoroso para explorar e analisar grandes volumes de dados científicos. Além disso, fornece informações sobre o status atual do conhecimento e apoia o desenvolvimento de futuras linhas de pesquisa¹⁶⁴. Isso porque este tipo de análise pode ajudar os pesquisadores a compreender melhor o estado da arte de um determinado campo de pesquisa, identificando lacunas e tendências.

O número de publicações no âmbito científico vem aumentando exponencialmente e os pesquisadores necessitam de revisões informativas para se manterem atualizados, sendo assim, a bibliometria descreve a estrutura da literatura científica usando informações sobre autores tais como citações ou palavras-chave compartilhadas entre artigos e fator de impacto das revistas publicadas¹⁶⁵.

É uma abordagem que determina a estrutura dos campos de pesquisa por meio de análise de desempenho, que estabelece o ranking de autores científicos por meio de medidas de produtividade (por exemplo, números de publicação ao longo do tempo, citações, índice H) e por meio de redes bibliométricas que representam a estrutura dentro da literatura científica, analisando conexões entre autores, instituições e palavras-chave¹⁶⁴. Responde questões sobre quais são os assuntos mais publicados em determinado campo de pesquisa, quem são os autores mais influentes e que países e instituições colaboram entre si.

Este tipo de análise de mapeamento bibliométrico utiliza softwares de visualização de dados como CiteSpace¹⁶⁶, Gephi, Leximancer, VOSviewer¹⁶⁷, CitNetExplorer¹⁶⁸ e bancos de dados científicos como Scopus e Web of Science¹⁶⁹. O software O VOSviewer é considerado uma das ferramentas mais utilizadas atualmente, aborda uma representação gráfica e é especialmente útil para exibir grandes mapas bibliométricos de maneira fácil de interpretar¹⁷⁰.

Para a análise bibliométrica a fim de observar as tendências no estado da arte que envolve os temas *citrus* e HLB, que são duas palavras-chave centrais ao tema abordado no presente trabalho, foi utilizado o software VOS viewer e o banco de dados da Scopus. Foram selecionados todos os papers publicados com estes temas a partir do ano de 2000 até 2021.

A Figura 1.9, mostra o mapeamento bibliométrico para a palavra de entrada *citrus*. O tamanho de cada um dos nodos representa a relevância de cada palavra de acordo com a frequência que aparecem e o tamanho da linha que liga os nodos refere-se a intensidade com que eles se correlacionam. É possível observar que há a formação de quatro clusters principais com as palavras *Citrus* em verde, *Citrus fruits* em vermelho *Chemistry* em amarelo e *metabolism* em azul. Todos estes clusters estão correlacionados, demonstrando que todos as áreas de pesquisa abordando o tema citrus estão interligadas.

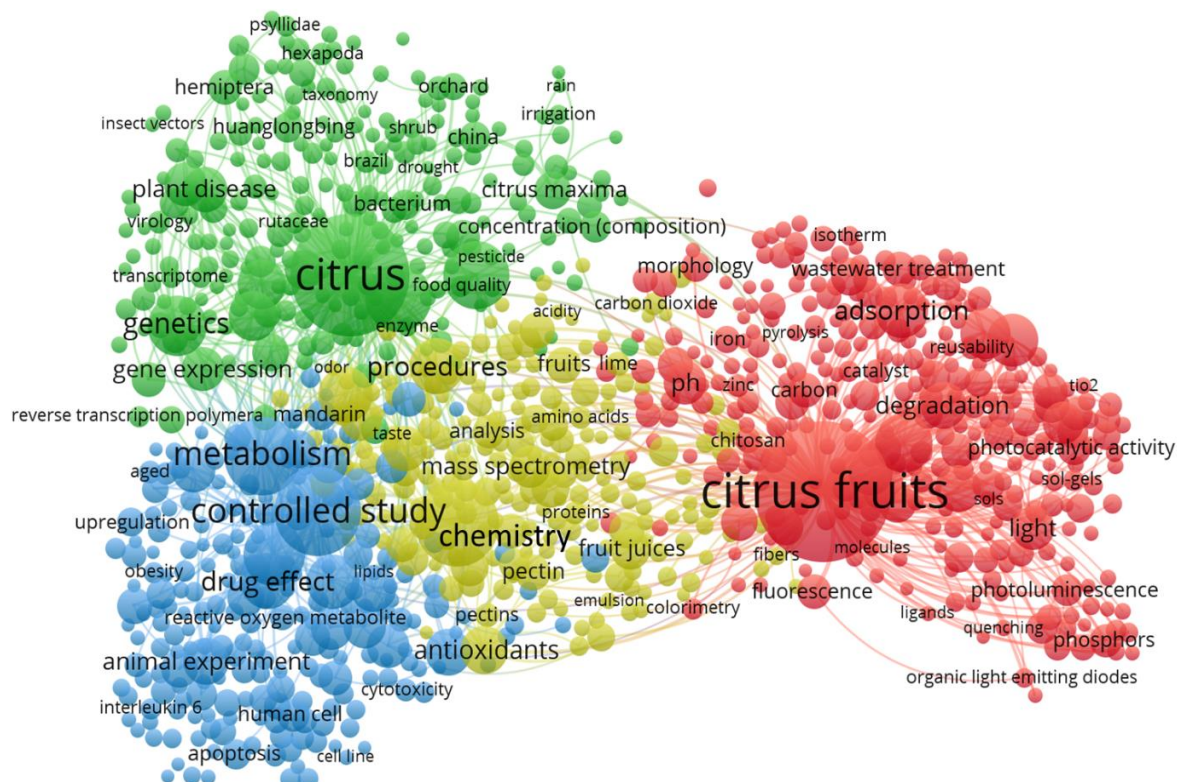


Figura 1.9. Visualização de rede usando VOSviewer, referente a palavras-chave utilizando a palavra de entrada *Citrus*. Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica a ocorrência (ou seja, o número de vezes que a palavra-chave ocorre), (2) o link entre os nós representa a co-ocorrência entre as palavras-chave.

Para o cluster em verde com a palavra *citrus* podemos destacar as palavras-chave que aparecem com maior frequência como *genetics*, *gene expression*, *transcriptome*, *plant disease*, *pesticide*, *huanglonbing*, *psyllidae*, *insect vector*, *hemiptera*, *bacterium*, *virology* dentre outras. Através desta análise é possível observar que como foco de estudo dentro da citricultura está a problemática ao ataque de patógenos, especialmente vírus e bactérias e a doença do HLB. Outra

importante constatação é sobre a alta tendência de estudos transcriptômicos, genômicos e de expressão gênica para resolver as problemáticas dentro do setor. As palavras *Brazil* e *China* também aparecem como destaque neste cluster, talvez por serem os países líderes em produção de citrus no mundo e por se destacarem na pesquisa científica dentro deste âmbito.

O cluster em vermelho referindo-se a palavra *Citrus fruits*, enfatiza o setor de processamento de frutos, que vai desde a produção até a geração de resíduo e suas possíveis aplicações. Há a ocorrência das palavras *adsorption, waste treatment, reusability, degradation, chitosan, fibers, zinc, phosphors, iron, pH, ligands, molecules, etc.* Este cluster destaca principalmente o crescente interesse na utilização de frutas cítricas e conseqüentemente a geração de resíduos que vem aumentando relativamente. Há uma grande preocupação aos impactos ambientais gerados, devido a isso a comunidade científica tem concentrado esforços para o emprego da economia circular, a fim de reutilizar estes resíduos que possuem propriedades adsorventes e que são ricos em pectina, quistosana, antioxidantes e polifenóis. Estes resíduos são fonte potencial de matéria-prima nos setores de alimentos, cosméticos, farmacêutico, embalagens e outros setores não alimentícios.

O cluster em amarelo, onde temos a palavra *Chemistry* como destaque, mostra a importância dos estudos químicos realizados no setor citrícola. Destacam-se as palavras *mass spectrometry, analysis, procedures, fruit juices, antioxidants, pectins, amino acids, etc.* Podemos destacar a importância da espectrometria de massas nos estudos científicos que envolvem a química dos citros, seja para a análise das partes vegetais, dos frutos, em estudos de isolamento e identificação de metabólitos e de interação planta-patógeno. O cluster em azul que destaca a palavra *Metabolism*, está intimamente interligado ao cluster em amarelo. Para este é evidenciado a química como ciência central para a contribuição/utilização dos citros no metabolismo humano, gerando impactos positivos na saúde humana e aplicações nas ciências médicas. Cofirmando estas afirmações podemos observar a maior ocorrência das palavras *controled study, drug effect, cytotoxicity, reative oxygen metabolite, apoptosis, human cell, upregulation, animal experiment, metabolite, obesity*, dentre outras.

Através dessa análise foi possível extrair informações relevantes sobre os países que mais publicam sobre o tema e os autores em destaque no ranking. Os países que se destacam no número de publicações são China, Estados Unidos,

Índia, Brasil, Espanha, Itália, Irã, Japão, Coréia do Sul, Paquistão, Turquia, França, Reino Unido e Austrália, respectivamente (Figura 1.10). Observa-se que a colaboração científica mais forte é entre China e Estados Unidos. O país que tem mais conexões de colaboração com outros países é a China, seguida dos Estados Unidos. O Brasil é um dos países com maior número de colaborações com outros países, tendo os Estados Unidos, Espanha, México e China como as mais expressivas, respectivamente. Para a classificação de países que mais publicam foi possível observar a formação de oito *clusters*. O vermelho composto por 25 países, o verde por 29, o azul escuro por 13, o amarelo por 12, o roxo por 10, o azul claro por 7, o laranja por 5 e por fim o marrom por 1 país.

A Figura 1.10, mostra que os autores com o maior número de publicações a nível mundial é o Wang Y., Zhang H., Wang Z., Chen S., Zhou Y., Deng X., entre diversos outros. Um aspecto que atrai bastante atenção é que um série de pesquisadores brasileiros aparecem como destaque nesta análise. O pesquisador brasileiro mais influente na área de *Citrus* é o Machado M. A., do Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC. Outros pesquisadores da mesma instituição também aparecem como de Souza A. A., Cristofani-Yali M., Lopes J. R. S., Coletta-Filho H.

Pesquisadores do Grupo de Produtos Naturais da UFSCar que faz parte do Programa de Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia – Controle Biorracional de Insetos Pragas e Fitopatógenos INCT/CBIP, também aparecem em destaque e mostra que estabelecem colaborações com o Instituto Agrônomo de Campinas IAC: Forim M. R e Fernandes J. B. Outro pesquisador que aparece como destaque é o Lopes S. A. da Fundecitrus. A presença de 27 clusters é observada, onde o cluster em azul claro representa em sua grande maioria pesquisadores do Brasil e América Latina.

O INCT-CBIP foi fundado em dezembro de 2008 e está envolvido em Ensino, Pesquisa, Inovação e Extensão, orientado para a formação de pesquisadores qualificados e para a geração de conhecimentos de produtos agroquímicos através das seguintes linhas de pesquisa: produtos naturais como fontes de novos pesticidas; modificações semissintéticas; o modo de ação de pesticidas sintéticos e naturais por inibição de enzimas: enzimas imobilizadas em reatores; a nanotecnologia para melhorar a atividade, solubilidade e estabilidade; as doenças cítricas e mecanismos de resistência.

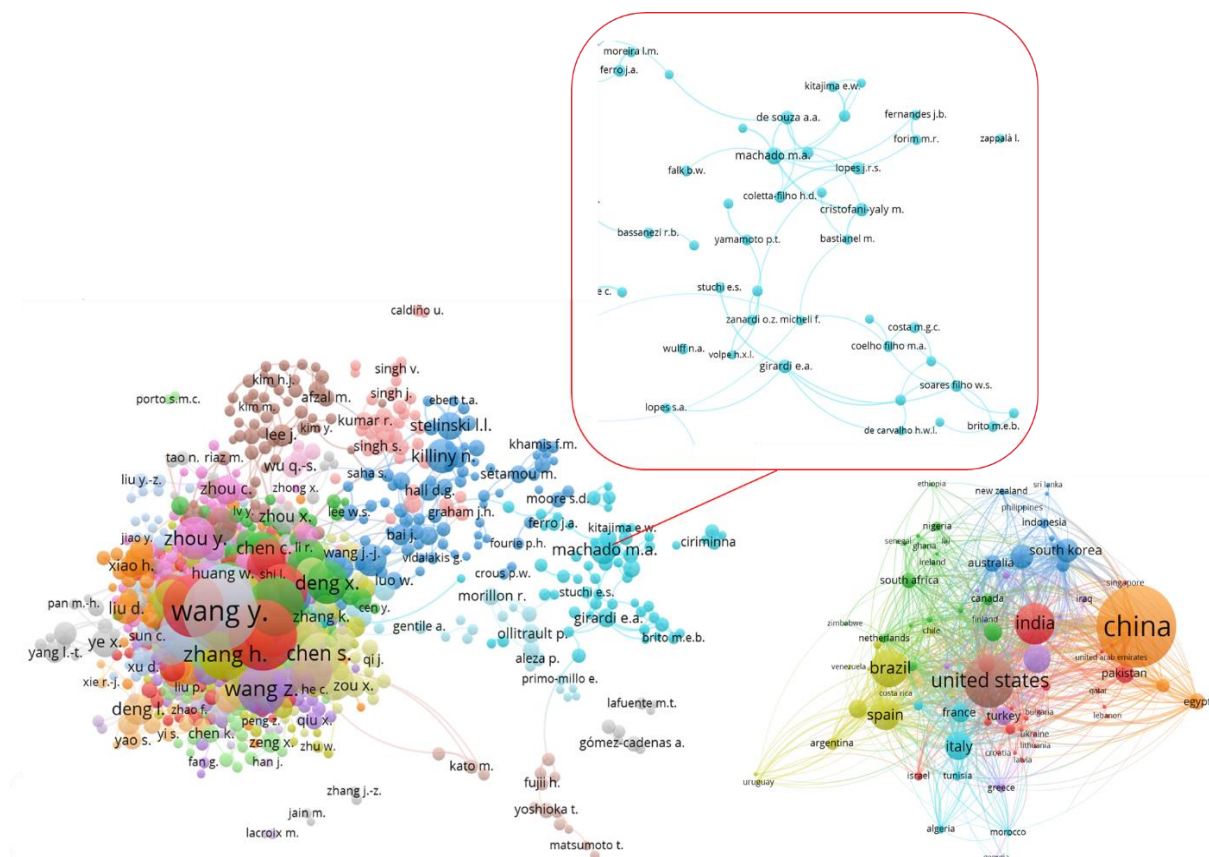


Figura 1.10. . Visualização de rede usando VOSviewer, referente a autores e países utilizando a palavra *Citrus*. Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica o número de publicações por autor/país, (2) o link entre os nós representa as colaborações entre autores/países.

Um outro mapeamento foi realizado utilizando a palavra de entrada HLB, utilizando a plataforma Scopus, com data de 2000 até 2021, onde múltiplas vertentes foram identificadas para um amplo espectro de estudos. É possível observar que há a formação de quatro clusters principais com as palavras *citrus* em vermelho, *genetics* em azul, *chemistry* em amarelo e *solid phase extraction* em verde (Figura 1.11). Através desta visualização de dados infere-se que a química e a genética estão extensivamente presentes nos estudos mais importantes envolvendo esta doença que tem devastado a citricultura. No âmbito destas duas grandes áreas da ciência, estudos utilizando cromatografia líquida, cromatografia gasosa, espectrometria de massas, reação de cadeia polimerase (PCR), estudos *in vitro*, agentes anti-bacterianos, microbiologia, tem se mostrado como fortes tendências durante estes 20 últimos anos.

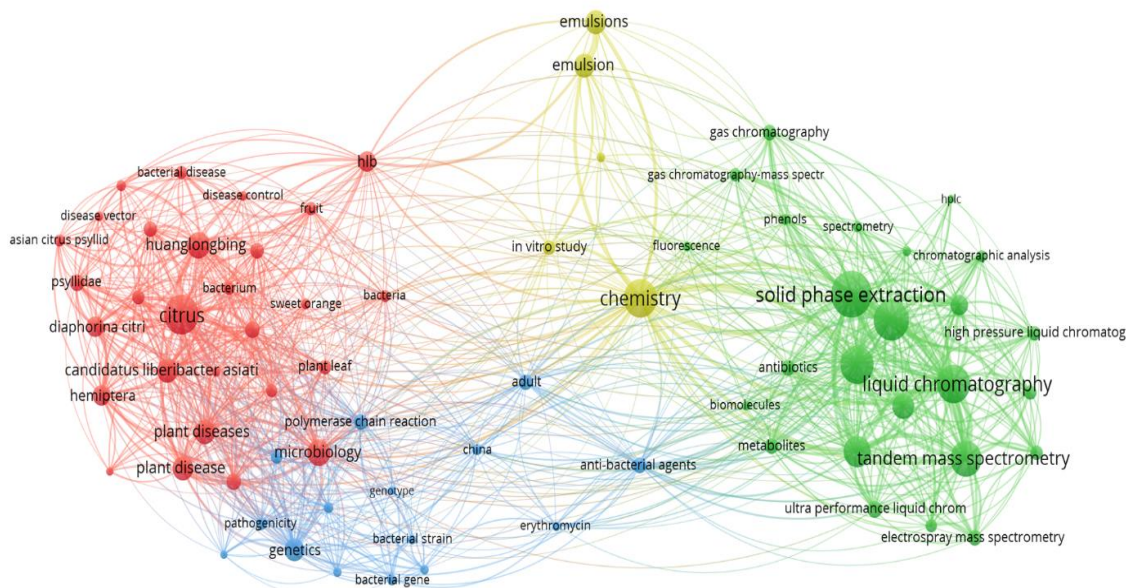


Figura 1.11. Visualização de rede usando VOSviewer, referente a palavras-chave utilizando a palavra de entrada HLB. Nota: Cada nó em uma rede representa uma palavra-chave em que: (1) o tamanho do nó indica a ocorrência (ou seja, o número de vezes que a palavra-chave ocorre), (2) o link entre os nós representa a co-ocorrência entre as palavras-chave.

Os países que possuem o maior número de publicações em pesquisa científica sobre o HLB são China, Estados Unidos, Espanha, Brasil, Japão, Reino Unido e Alemanha. A partir da formação de 9 clusters e suas ligações, é possível constatar que os países que possuem cooperação científica de maior expressão é China e Estados Unidos. O Brasil, assim como na pesquisa para o tema citrus, o tema HLB apresenta maiores colaborações com Estados Unidos, seguido da Espanha, México e China (Figura 1.12).

No levantamento realizado para autores com maior número de publicações relevantes sobre HLB é possível observar uma complexa clusterização, composta por 29 clusters. Os nomes que mais aparecem são Zhang Y., Wang J., Wang I., Wang N., Chen D., Duan Y., Killini N. Por sua vez, os pesquisadores brasileiros recebem grande destaque nesta temática, mostrado no cluster em azul escuro. Os nomes que aparecem com maior relevância mais uma vez são Machado M. M, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira e o Lopes S. A. da Fundecitrus. Outros nomes importantes surgem como o pesquisador Parra J. R. P. e Yamamoto P. T, da ESALQ-USP, Bassanezi R. B. e Wulff N. A., da Fundecitrus (Figura 1.12).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Identificar metabólitos que sejam responsivos a infecção da bactéria *Candidatus liberibacter* através do estudo metabolômico via LC-HRMS utilizando a plataforma GNPS e análises quimiométricas, em raiz central e radicela de *Citrus sinensis* x *Citrus limonia* de plantas sadias e plantas sintomáticas infectadas com HLB cultivadas em casa de vegetação e raiz de plântulas de *Citrus sinensis* sadias e infectadas com HLB cultivadas *in vitro*.

1.2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, os objetivos específicos serão:

- Preparar mudas de *Citrus sinensis* x *Citrus limonia* em casa de vegetação e plântulas de *Citrus sinensis* *in vitro*.
- Inocular a *C. liberibacter* em *C. sinensis* x *C. limonia* cultivadas em casa de vegetação através de borbulhas infectadas com a bactéria.
- Inocular a *C. liberibacter* em *C. sinensis* cultivadas *in vitro*, através de psilídeos *Diaphorina Citri* infectados com a bactéria.
- Realizar análises de PCR em todas as plantas utilizadas neste estudo a fim de confirmar a ausência e a presença da bactéria *C. liberibacter*.
- Isolar as piranocumarinas xantiletina e seselina das raízes de citros para obtenção de padrões para posterior análises em LC-HRMS e quantificação em HPLC-UV.
- Realizar análises em LC-HRMS q-ToF para obter respostas sobre metabólitos que possam ser responsivos à infecção da bactéria *C. liberibacter* em raiz central (R) e radicela (Rd) de *C. sinensis* x *C. limonia* de plantas sadias (PS) e plantas sintomáticas infectadas com HLB (PI) cultivadas em casa de vegetação e de plântulas de *Citrus sinensis* sadias (RPS_{iv}) e infectadas com HLB (RPI_{iv}) cultivadas *in vitro*.
- Realizar estudos metabolômicos aplicando o pré-tratamento de dados obtidos na análise via LC-HRMS Q-ToF utilizando o software MSDial e

posterior análise de rede molecular para notação de metabólitos utilizando a plataforma GNPS.

- Identificar os metabólitos que são responsivos a infecção de *C. Liberibacter* em todas as plantas avaliadas neste estudo, utilizando análises quimiométricas de PCA e HCA utilizando o software Pirouette®.
- Quantificação das piranocumarinas xantiletina e seselina nas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia* de plantas sadias (RPS) e de plantas sintomáticas infectadas com HLB (RPI) cultivadas em casa de vegetação.

1.3 Materiais e métodos

1.3.1 Obtenção de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* em casa de vegetação

As mudas certificadas de *C. sinensis* x *C. limonia* foram adquiridas na SaniCitrus – Araras-SP. As plantas de aproximadamente 8 meses, foram mantidas em casa de vegetação, para posterior extração dos padrões de xantiletina e seselina das raízes e posterior inserção de borbulhas contaminadas com *C. liberibacter*.

1.3.2 Obtenção das plântulas de *C. sinensis* *in vitro*

As sementes de *C. sinensis* foram cedidas pela Dra. Mariângela Cristofani-Yali do Centro de Citricultura do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), localizado no município de Cordeirópolis-SP. Foram obtidas 500g de sementes de *C. sinensis*, provenientes do lote de matrizes da Fazenda Itapuá.

As sementes de *C. sinensis* foram submetidas a assepsia com solução de Captan (Orthocide® 500) e Tiofanato-metilico (Cercobin® 700WP) a 1% e mantidas sob agitação a 90 rpm por 30 min. Posteriormente foram imersas em 100 mL de hipoclorito de sódio (0,5%) por 15 min sob agitação e lavadas com água destilada (3 vezes). Após esses procedimentos foi realizada a inoculação destas em meio MS basal semissólido com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel®, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e nutrientes de acordo com o protocolo de MURASHIGE; SKOOG, 1962¹⁷¹ (Tabela 1.1)

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de cultura a 25 ± 2 °C, com 55-60% de umidade relativa e controle de foto período com 16h de luz e 8h em ausência de luz, para a germinação. A cada 30 dias, as plântulas foram transplantadas para novas cubetas para a manutenção da suplementação necessária para o crescimento adequado da cultura *in vitro*.

Tabela 1.1. Composição do Meio MS basal MURASHIGE; SKOOG, 1962.

| Constituintes do Meio MS basal | | | |
|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------|-------------------|
| Constituintes | Quantidade (mg/L) | Constituintes | Quantidade (mg/L) |
| KNO ₃ | 1900,0 | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,250 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,0 | CoCl ₂ .2H ₂ O | 0,025 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370,0 | FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440,0 | Na ₂ EDTDA | 37,3 |
| KH ₂ PO ₄ | 170,0 | MiolInositol | 100,0 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 | Tiamina HCl | 0,10 |
| KI | 0,83 | Ácido nicotínico | 0,50 |
| H ₂ BO ₃ | 6,20 | Glicina | 2,0 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,60 | Piridoxina HCl | 0,50 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 | Sucrose | 30000,0 |

1.3.3 Inoculação de *C. liberibacter* em plantas de *C. sinensis* x *C. limonia*

Borbulhas de *C. sinensis* x *C. limonia* de plantas diagnosticadas com a doença HLB, foram coletadas e mantidas em água. Em seguida estas foram inseridas em 10 mudas sadias de *C. sinensis* x *C. limonia* através de um corte vertical. O local onde foi realizada a introdução da borbulha foi protegido com plástico Parafilm® durante 20 dias para cicatrização do tecido vegetal. As plantas foram mantidas por 8 meses em casa de vegetação e posteriormente submetidas a avaliação da presença da bactéria CLas por qPCR.

1.3.4 Inoculação de *C. liberibacter* em plântulas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro*

Os psilídeos *D. citri* mantidos em plantas de citros contaminadas com CLas foram coletados com o auxílio de sugadores e introduzidos em cubetas contendo plântulas de 2 meses cultivadas em meio MS basal *in vitro* a 27°C (Figura 1.13). Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar sob as devidas condições de assepsia. Foram mantidos 5 psilídeos em cada uma das plântulas *in*

in vitro durante 5, 10, 15 e 20 dias. Em cada um destes tempos, foram retiradas amostras de folhas para avaliação da presença da bactéria por qPCR.



Figura 1.13. Inoculação de psilídeos *D. citri* infectados com *C. liberibacter* em plântulas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro*.

As amostras de DNA foram extraídas de 0,3 g de tecido vegetal das folhas que foram finamente cortadas e colocadas em tubos Eppendorf® de 2,0 mL, adicionando-se 2,0 mL de solução de tampão de extração concentrado (CTAB) + 0,2% de β -mercaptoetanol de acordo com o protocolo de MURRAY & THOMPSON, 1980. O material foi então macerado com triturador Tissuelyser II - Qiagen® por 45 segundos e posteriormente incubados a 65°C em banho por 30 min. Seguiu-se para mais uma etapa onde as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 5 min a 25°C.

Foram transferidos 0,9 mL do sobrenadante para um novo tubo Eppendorf® com 0,9 ml de clorofórmio-isoamílico 24:1 que em seguida foi homogeneizado em vortex e centrifugado a 12.000g por 5 min. Foram transferidos para um novo tubo Eppendorf®, 0,8 mL da fase aquosa que foi recuperada e adicionou-se 0,48 mL de isopropanol para promover a precipitação do DNA.

Após a precipitação do DNA, as amostras foram incubadas por 30 minutos a -20°C e centrifugadas por 20 min a 12.000g na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi realizada duas etapas de lavagem com 0,9 mL de etanol 70% e centrifugado a 12000g por 10 minutos. O DNA foi colocado por 8 minutos em um sistema a vácuo *speed-vac* e ressuscitado em 0,05 mL de água Milli-Q® previamente autoclavada e deixada em *overnight* a 4°C.

Para a detecção do DNA de *CLas*, utilizou-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), por ser considerada mais sensível que a PCR convencional na detecção da bactéria. As análises foram conduzidas no equipamento StepOne Plus Thermocycler - Applied Biosystems®. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Li et al. 2006¹⁷², através do uso de oligonucleotídeos e sonda com base na região do DNA ribossomal 16S (DNAr 16S – número de acesso GenBank: L22532 para *CLas*) . As reações de qPCR foram preparadas para um volume final 12 µL, resultado da adição de 1 µL de DNA da planta sem diluição, 6 µL de Path ID Master Mix - Ambion®, 0,5 µM dos primers e sondas específicas. A reação iniciou-se com o processo com a desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido de 1 ciclo de desnaturação a 95 °C por 15s e 40 ciclos para anelamento e extensão a 58 °C por 60 s.

1.3.5 Isolamento dos padrões xantiletina e seselina de raízes de citros

As raízes plantas de citros certificadas, obtidas da Sanicitrus, foram cortadas e secas em estufa de circulação à 40°C durante 7 dias e trituradas em moinho de facas tipo Willye da marca Tecnal. Em seguida 200 g de material seco foi submetido a uma sequência de 3 extrações com o auxílio de um homogeneizador/dispersor, T-10 standard ULTRA-TURRAX da IKA a 10.000 rpm durante 2 min em 500 mL etanol. O sobrenadante foi então filtrado, com auxílio de bomba à vácuo, e o restante da biomassa submetida a 3 lavagens com 150 mL de etanol. Por fim, os extratos foram secos à vácuo em evaporador rotativo BUCHI, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5° e armazenados à 4°C em recipientes fechados. O extrato etanólico obtido, foi ressuspensionado em 200 mL de metanol e fracionado através de uma extração líquido/líquido com hexano (3 x 300 mL). Desta foram obtidas as frações hexânica e etanólica.

A fração hexânica foi submetida à fracionamento em cartuchos SPE C-18 Supelco®, 10 g, 60 mL e partícula de 60 µm em manifold a vácuo, com gradiente de eluição H₂O/ACN (90:10, 80:10, 70:30, 50:50, 20:80, 0:100). As frações foram coletadas e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). As piranocumarinas de interesse foram encontradas na fração 90:10. Esta fração foi

submetida a separação por cromatografia líquida preparativa, utilizando o equipamento Shimadzu® 20AR sistema binário de bombas, com DAD e coletor de frações FRC 10A, coluna C-18 Gemini Phenomenex® (250 x 10 mm), com tamanho de poro de 110Å, diâmetro de partícula de 5 µm. Foi utilizado método isocrático de eluição 50:50 H₂O/ACN em 30 min, com um volume de injeção de 100µL a uma vazão de 3mL/min. Foram coletadas 6 frações que foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

A xantiletina e seselina foram encontradas na Fração 3, que foi submetida a separação em cromatografia líquida analítica para a purificação de ambas as substâncias. As análises foram realizadas em cromatógrafo Líquido Agilent® 1260 com sistema quaternário de bombas, amostrador automático, detector UV e coletor de frações. Foi utilizado método isocrático de eluição 50:50 H₂O/ACN em 30 min, a uma vazão de 0,8 mL/min, com volume de injeção de 20µL, temperatura da coluna de 35°C, utilizando coluna C-18 Gemini Phenomenex®, (150 x 4,6 mm), com diâmetro de partícula de 5µm. Em seguida a pureza das substâncias isoladas foram submetidas a análise de RMN de ¹H no equipamento Bruker DRX - 9,8 T (400 MHz para RMN ¹H), equipado com autoinjeter de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®) e bobina de gradiente de campo em z, unidade geradora de gradiente de campo e unidade de temperatura variável.

1.3.6 Análises em LC-HRMS - q TOF

A raiz central (R) e as radículas (Rd) das plantas cultivadas em casa de vegetação, referentes aos tratamentos de planta sadia (PS) e planta infectada (PI), foram separadas e submetidas a extração como descrito no item 1.3.5, até a etapa de secagem à vácuo em evaporador rotativo e armazenagem à 4°C em recipientes fechados. As raízes das plântulas cultivadas in vitro, referente aos tratamentos de plântulas sadias (RPSiv) e plântulas infectadas (RPIiv) foram retiradas do meio MS basal e trituradas com auxílio de almofariz de pistilo. Posteriormente foram armazenadas em erlenmeyers de 500 mL para extração com 250 mL de etanol durante 24h. O sobrenadante foi então filtrado em papel de filtro comum e por fim, os extratos foram concentrados à vácuo em evaporador rotativo BUCHI, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C, e armazenados a 4°C (Figura 1.14).



Figura 1.14. Esquema da metodologia de extração para obtenção de extratos das plântulas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro*.

Todas as amostras foram ressuspendidas na concentração de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 5:95 e submetidas a *clean up* em cartuchos SPE C-18 Supelco® de 1 g, 6 mL e diâmetro de partícula de 40 μm em manifold a vácuo. Foi realizada a eluição das amostras nos cartuchos com 50mL $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 5:95, a fim de remover quaisquer interferentes que possam danificar o sistema cromatográfico posteriormente. As amostras foram secas em gás nitrogênio e ressuspendidas em ACN grau MS, a uma concentração final de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e por fim filtradas em filtros PTFE de 0,22 μm . Foram utilizadas 4 réplicas biológicas para cada tratamento que foram preparadas em triplicata, para posterior análise metabolômica. Foram também injetados padrões de xantiletina e seselina na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para auxiliar no alinhamento e normalização na etapa de pré-processamento dos dados.

As análises foram realizadas em LC-HMRS Q-TOF Agilent - 6545 com coluna Agilent®, Zorbax Eclipse Plus C-18 (2,1 x 50 mm) - 1,8 μm , utilizando gradiente de eluição de H_2O + 0,1% ac. fórmico e ACN + 0,1% ácido fórmico 95:5 à 60:40 em 10 min, 50:50 em 16 min, 0:100 em 25 min e mantido nestas condições até 30 min de análise, a uma vazão de 0,250 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com volume de injeção de 3,0 μL e temperatura da coluna de 30°C.

Os espectros de massas foram adquiridos em modo positivo (+) e negativo (-) de ionização ESI com faixa de massa de m/z 150 – 1500 Da para o MS e modo auto MS/MS para os 12 íons mais intensos na aquisição dos espectros MS/MS com faixa de massa m/z de 70 - 1500 Da, com voltagem do capilar de 3000V, voltagem do nozzle de 1500V, temperatura de gás 350°C, fluxo de gás secante de 12 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, pressão do gás de nebulização de 35 psi, sheath gas 300°C, voltagem do fragmentor 110V, voltagem do skimmer 80V e rampa linear de energia de colisão de acordo com a faixa de massa m/z : 150 = 20eV, 500 = 30eV, 1000 = 50eV e 1500 = 60eV. Foram realizadas também, análises *targeted* para o modo positivo ESI de ionização, utilizando as mesmas condições mencionadas acima, selecionando o íon para aquisição de espectros MS e MS/MS com m/z 229,0965, que corresponde as

duas piranocumarinas principais deste estudo: xantiletina e seselina. O software utilizado para processamento dos dados foi o Qualitative Navigator B.08.00.

1.3.7 Pré-processamento e análise dos dados de LC-HRMS

Os dados obtidos na análise de LC-HRMS foram convertidos para o formato MzML aplicando o filtro *Peak picking* e o Algoritmo Vendor utilizando o software MSConvert. Em seguida os dados foram pré-processados no software MS-DIAL, aplicando filtragem de ruído baseado no branco (*background*), correção de linha de base, detecção de pico, deconvolução, normalização e alinhamento, resultando assim na construção de uma única matriz de dados (.mgf) para posterior análise via FBMN na plataforma GNPS. Além disso foi realizada uma análise multivariada por análise de componentes principais (PCA).

Os parâmetros ajustados neste processamento foi de acurácia de massa de $\pm 0,02$ Da no MS e de $\pm 0,06$ Da em MS/MS, para o parâmetro centroide espectral. A média móvel ponderada linear foi utilizada para a detecção de pico para determinar com precisão as bordas esquerda e direita do pico, com nível de suavização de 3 scans, altura mínima de pico com amplitude de 10000 e a largura da fatia de massa foi definida para 0,1 Da. Para o processo de convoluções, foi estabelecido uma janela Sigma de $\pm 0,5$ e um corte de abundância em MS/MS de amplitude 30 para reduzir os ruídos. Foram selecionados todos os adutos possíveis para cada modo de ionização e todos os dados das amostras analisadas, foram alinhados com tolerâncias de tempo de retenção (RT) de $\pm 0,2$ min e de $\pm 0,02$ min para MS e MS/MS, respectivamente.

A rede molecular foi criada a partir dos dados da matriz pré-processada no software MS-DIAL a partir da submissão do projeto na plataforma GNPS - The Global Natural Product Social Molecular Networking (<https://gnps.ucsd.edu/>). Foi utilizado como fator de agrupamento de espectros MS a tolerância de massa de 0,02 Da e para MS/MS de 0,06 Da. O match espectral com o banco de dados do GNPS foi selecionado para levar em consideração a similaridade de pelo menos quatro íons-fragmento com um score para threshold de $\pm 0,7$. Além da notação gerada pelo GNPS, a matriz de dados geradas pelo MS-DIAL foi exportada no formato .msp para realizar a busca nas bibliotecas experimentais e *in silico* (HMDB – Human/ Serum – Human, YMDB – Yeast, FooDB – Food, STOFF – Environment,

NANPDB – Natural product, KNAPSAcK – Natural product, Urine – Human, CSF – Human, ECMDB – E. coli, PlantCyc – Plant, BLEXp – Boob exponentsome, COCNUT – Natural product, PubChem – Biomolecules, Saliva – Human, SMPDB – Human, BMDB – Bovine, ChEBI – Biomolecules, NPA – Natural Product Atlas, UNPD – Natural product, Feces – Human, LipidMAPS – Lipids, DrugBank – Drug e T3DB – Toxin) disponíveis no software MS-FINDER.

Os tratamentos avaliados nas análises metabolômicas foram:

- RPS = raiz de planta sadia
- RPI = raiz de planta infectada
- RdPS = radicela de planta sadia
- RdPI = radicela de planta infectada
- RPS_{iv} = raiz de planta sadia *in vitro*
- RPI_{iv} = raiz de planta infectada *in vitro*

1.3.8 Análise Quimiométrica de Componente Principal (PCA)

Os dados foram processados por análise de componentes principais (PCA) para obter mapas de pontuações e investigar as diferenças entre os tratamentos avaliados. Os sinais de *m/z* foram selecionados a partir do conjunto de dados espectrais e calculada a área do sinal para cada íon. Todos os cálculos de PCA e processamento de dados foram realizados usando o software Pirouette®. Para o processamento e avaliação dos dados, foram realizadas as seguintes etapas:

- Preparação de dados e cálculo de modelos univariados utilizando Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EUA);
- Análises empregando modelos multivariados utilizando Pirouette versão 4.5 (Infometrix, Bothell, WA, EUA);
- Construção de gráficos referentes a PCA através do Orange (Universidade de Ljubljana, Eslovênia).

1.3.9 Quantificação de piranocumarinas na raiz de *C. sinensis* x *C. limonia*

O método utilizado na quantificação foi o de padronização externa, que consistiu na construção de curva analítica para os padrões alvo: xantiletina e

seselina. Foram preparadas soluções estoque, diluindo-se 500 mg do padrão xantiletina e 500 mg seselina em 1 mL de MeOH grau MS e a partir desta, foram preparadas as soluções padrão à 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 35,0; 50,0; 70,0; e 80,0 µg/mL para construção da curva analítica. Foram analisados 12 genótipos de *C. sinensis* e 12 genótipos de *C. limonia*. As amostras foram preparadas a uma concentração de 3 mg/mL e as piranocumarinas foram quantificadas por HPLC utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent® 1260, acoplado a sistema quaternário de bombas, detector UV/VIS, injetor automático e software Class VP; com coluna analítica Phenomenex®, Gemini C18 (150 x 4,6 mm, partícula de 5µm). As análises cromatográficas foram realizadas com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ no modo gradiente de eluição usando H₂O:ACN como fase móvel (Tabela 3.3.1), onde a linha A é referente a H₂O e a linha B à ACN. O acompanhamento cromatográfico foi feito com detector de UV em comprimento de onda de 254 nm.

1.3.10 Ensaio de atividade microbiológica de piranocumarinas e seus intermediários em *Citrus sinensis* frente a *Candidatus liberibacter asiaticus*

Plântulas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro* em meio MS basal, conforme descrito no item 1.3.2, foram transferidas para cubetas contendo meio MS basal + 0,0250 mg/mL em DMSO de cada uma das substâncias testadas. Foram testados os seguintes tratamentos em triplicata: 5-metoxipsolareno (Sigma Aldrich® 69664-25), ostol (Sigma Aldrich® PHL89747), xantiletina e seselina (isoladas e identificadas de acordo com o item 1.3.5), DMSO e controle (somente com meio MS basal). Após 48h de incubação das plântulas em cada um dos tratamentos avaliados, as mesmas foram inoculadas com a bactéria CLas utilizando o psílideo *D. citri* conforme descrito no item 1.3.4. Após um período de incubação de 25 dias, as plântulas de todos os tratamentos foram coletadas e submetidas a análise de PCR conforme descrito no item 1.3.4 e assim foi feita a avaliação da atividade microbiológica de cada um dos compostos testados através dos valores de Ct (*cycle threshold*) obtidos.

1.4 Resultados e discussão

1.4.1 Obtenção de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* em casa de vegetação e inoculação da bactéria *C. liberibacter*

Para os estudos de metabolômica via LC-HRMS afim de obter respostas sobre metabólitos que possam ser responsivos à infecção da bactéria CLas em raíz central (R) e radicela (Rd) de *C. sinensis* x *C. limonia*. Fora utilizadas plantas sadias (PS) e plantas sintomáticas infectadas com HLB (PI) cultivadas em casa de vegetação, foi realizada a inoculação de borbulhas infectadas com CLas em 5 mudas de 12 meses.

A CLas é essencialmente detectada por PCR usando primers desenvolvidos a partir de sequências de DNA genômico, principalmente do gene 16S rRNA¹⁷³. A técnica utiliza o SYBR *green* como corante fluorescente que se liga ao DNA. Deste modo, quanto maior a quantidade de DNA de fita dupla em solução, maior o sinal fluorescente. Então é medido o valor de Ct, que é o número do ciclo em que o sinal de fluorescência emitido durante o qPCR atinge um limiar significativamente acima da fluorescência de fundo. Menores valores de Ct indicam maiores níveis de expressão, pois são necessários menos ciclos de amplificação para atingir o limiar.

Os resultados de qPCR, mostram que todas as mudas escolhidas para o estudo, após 10 meses de enxertia das borbulhas detectadas com CLas, estavam contaminadas com a bactéria causadora do HLB, mostrando um valor de “cycle threshold” Ct abaixo de 32 e valores semelhantes, garantindo menor variação para as análises metabolômicas (Tabela 1.2).

Tabela 1.2. Valores de Ct referente as análises de qPCR para a detecção de *C. liberibacter* em *C. sinensis* x *C. limonia*. Nota: PI = plantas sintomáticas infectadas com CLas.

| nº de identificação PI | Ct |
|------------------------|-------|
| 1 | 18,30 |
| 2 | 17,60 |
| 3 | 18,10 |
| 4 | 19,84 |
| 5 | 18,47 |

A figura 1.15, mostra as plantas de *C. sinensis* referentes ao dois tratamentos utilizados neste estudo: Planta sadia (PS) e planta sintomática infectada com CLas (PI). É possível observar que todas as plantas contaminadas com a bactéria utilizadas mostram sintomas foliares visíveis.

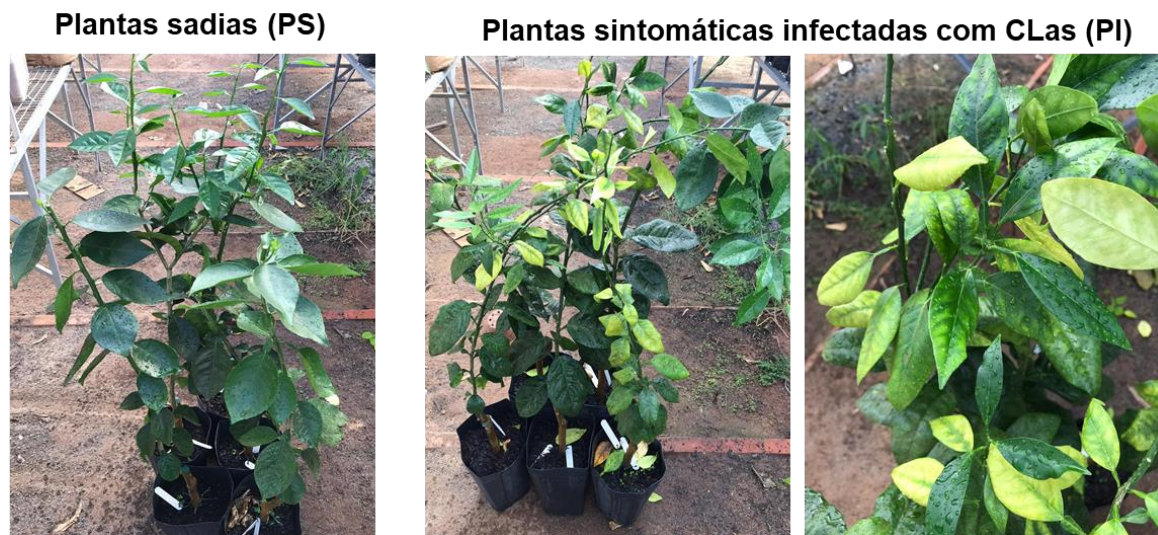


Figura 1.15. Plantas de *C. sinensis* sadias (PS) e plantas sintomáticas infectadas com CLas (PI).

1.4.2 .Obtenção das plântulas de *C. sinensis in vitro* e inoculação da bactéria *C. liberibacter*

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica que permite a regeneração de qualquer parte de uma planta em tecidos, órgãos ou mesmo plantas inteiras, controlando os fatores nutricionais e ambientais *in vitro*. É uma abordagem que vem sendo amplamente utilizada para multiplicação de plantas em larga escala ¹⁷⁴.

A capacidade de culturas de células, tecidos e órgãos de plantas para produzir e acumular muitos, mas nem sempre todos os mesmos compostos químicos da planta na natureza têm sido reconhecidos desde o início da tecnologia *in vitro*. O desenvolvimento da cultura de tecidos *in vitro* abriu o caminho para novas pesquisas que exploram a expressão de produtos secundários *in vitro*. Além de existir uma série de vantagens distintas na produção de um metabólito secundário de grande interesse comercial, a cultura *in vitro* permite que o isolamento do fitoquímico ocorra de forma mais rápida e eficiente quando comparado com a extração dos mesmos de plantas *in vivo*. Outro fator que desperta grande interesse, é que as culturas

celulares podem ser cultivadas em ambiente controlado e em meios de cultura com marcação isotópica, de modo que os produtos secundários acumulados possam ser biossinteticamente rastreados ¹⁷⁵.

É indiscutível as vantagens que a cultura de tecidos de plantas trouxe para a experimentação em diferentes abordagens. Uma das mais interessantes na atualidade é que esta tecnologia facilitou a edição do genoma em plantas conduzida pela entrega de reagentes, como “*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*” com Cas 9 endonuclease - CRISPR/Cas9 e *single guide RNAs*^{176,177}. Além disso a possibilidade de realização de experimentos biológicos planta x patógeno se torna mais fácil, mais rápida e mais eficiente utilizando este sistema.

A germinação das sementes de *C. sinensis* em meio MS basal sólido em ambiente controlado, começou a ocorrer 40 dias após a inoculação das mesmas. A metodologia adotada apresentou-se eficiente para o cultivo, apresentando baixa porcentagem de contaminação e alta porcentagem de germinação.

Após 2 meses da germinação completa das sementes, as plântulas cultivadas *in vitro* apresentando brotos foram selecionadas na tentativa de inocular a bactéria nas mesmas. Este experimento foi elaborado com o intuito de facilitar os experimentos de interação planta x CLas para a execução da análise metabolômica via LC-HRMS, até então nunca reportados na literatura utilizando este sistema. Os dados apresentados na Tabela 1.3, mostram os valores de C^t obtidos no experimento de inoculação da bactéria na planta utilizando insetos contaminados com CLas. Foram avaliadas 5 plântulas para 5, 10, 15 e 20 dias de exposição ao psilídeo *D. citri*. Através destes resultados pode-se concluir que o psilídeo, ao se alimentar dos brotos foi capaz de transmitir a bactéria às plântulas *in vitro*.

Através da análise dos dados é possível observar que com somente 5 dias de exposição ao psilídeo infectado com CLas, as plântulas já apresentaram contaminação com a bactéria. Em plantas cultivadas em casa de vegetação a detecção da doença nas plantas demora cerca de 3 a 4 meses e de 8 a 12 meses para o aparecimento de sintomas. Isso mostra a eficiência dos experimentos conduzidos através da cultura de tecidos *in vitro*, que podem levar a resultados mais rápidos, mais robustos devido ao controle das condições de execução e com maior facilidade de manejo e execução. Estes resultados também abrem possibilidades para ensaios biológicos frente a bactéria, visto que a mesma ainda permanece incultivável em condições laboratoriais.

Todos os tratamentos apresentaram valores de C^t abaixo de 32,0 (Tabela 1.3); indicando níveis de expressão significativos que demonstram a presença da bactéria nas plantas avaliadas expostas ao inseto contaminado a CLas. As plantas submetidas aos insetos que não estavam infectados com a bactéria, apresentaram valores de C^t acima de 35,0 ou não detectado, comprovando a eficácia do experimento de inoculação da bactéria, frente à plântulas do tratamento controle. A inoculação da bactéria mostrou-se 100% eficiente nas plantas que sobreviveram, sendo que durante a execução do experimento somente duas plântulas morreram devido a contaminação exógena.

Tabela 1.3. Valores de C^t referente as análises de qPCR para a detecção de *C. liberibacter* em plântulas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro*.

| Plantas Sadias | | | Plantas Infectadas | | |
|--------------------|--------------|-------|--------------------|--------------|-------|
| Código das Plantas | Tempo (dias) | C^t | Código das Plantas | Tempo (dias) | C^t |
| PSiv-1 | 5 | und | PIiv-1 | 5 | 33.09 |
| PSiv-2 | | und | PIiv-2 | | 29.5 |
| PSiv-3 | | 38,44 | PIiv-3 | | 28.3 |
| PSiv-4 | | und | PIiv-4 | | 27.17 |
| PSiv-5 | | und | PIiv-5 | | 29.78 |
| PSiv-1 | 10 | und | PIiv-1 | 10 | - |
| PSiv-2 | | 38,31 | PIiv-2 | | 28.87 |
| PSiv-3 | | und | PIiv-3 | | 24.05 |
| PSiv-4 | | und | PIiv-4 | | 29.85 |
| PSiv-5 | | und | PIiv-5 | | 30.11 |
| PSiv-1 | 15 | und | PIiv-1 | 15 | 20.35 |
| PSiv-2 | | 38.85 | PIiv-2 | | - |
| PSiv-3 | | und | PIiv-3 | | 20.25 |
| PSiv-4 | | 38.53 | PIiv-4 | | 28.24 |
| PSiv-5 | | und | PIiv-5 | | 31.19 |
| PSiv-1 | 20 | und | PIiv-1 | 20 | 27.42 |
| PSiv-2 | | und | PIiv-2 | | 30.21 |
| PSiv-3 | | und | PIiv-3 | | 31.64 |
| PSiv-4 | | und | PIiv-4 | | 29.95 |
| PSiv-5 | | und | PIiv-5 | | 31.26 |

Nota: PSiv = plântulas sadias cultivadas *in vitro*; PIiv = plântulas infectadas com CLas cultivadas *in vitro*.

Estudos conduzidos por LOPES, S. A., et al., 2021; mostram a validação de um protocolo para transmitir com sucesso o patógeno do huanglongbing (HLB), CLas, de plantas cítricas para outras plantas cítricas usando o

psilídeo *D. citri*. Adultos podem transmitir CLas em uma média de 56,5% para plântulas com brotos crescendo em tubos de 0,3 L, e de 80,5% para plantas com crescendo em vasos com substrato de solo de 4,7 L¹⁷⁸. Infecção de plantas utilizando o psilídeo infectado com bactéria já foram reportados, porém nenhum experimento *in vitro* ainda foi desenvolvido e publicado.

Outro estudo conduzido por MENDIS H. C., et al; 2019, mostrou que a solução ternária (TSOL) é uma nova formulação antimicrobiana sistêmica à base de quelato de Zn metálico projetada para o tratamento de patógenos bacterianos cítricos. A pulverização foliar de TSOL mostrou um movimento sistêmico em plantas cítricas, sugerindo que TSOL é um composto antimicrobiano promissor para controlar patógenos de plantas vasculares, como CLas. A injeção no tronco de ativadores de defesa vegetal e antibióticos foi testada e mostrou redução nas populações de CLas e na expressão de sintomas de HLB. No entanto, a injeção de troncos é trabalhosa e não é uma estratégia economicamente sustentável¹⁷⁹. Portanto, neste sentido o cultivo *in vitro* de plântulas contaminadas com CLas, pode trazer vários avanços, auxiliando na descobertas de novos antibióticos que possam combater a ação desta bactéria devastadora para a cultura de *citrus*.

1.4.3 Isolamento dos padrões de xantiletina e seselina de raízes de citros

A metodologia de separação empregada propiciou o isolamento dos padrões de xantiletina e seselina, a fim de realizar análises com injeção de padrão via LC-HRMS e quantificar as piranocumarinas em raíz e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas

A Figura 1.16 mostra o espectro de ¹H para a xantiletina que apresentou sinais que caracterizam a classe estrutural das cumarinas. Os dubletos com sinais em δH 7,82 (1H, *d*) e 6,21 (1H, *d*), cuja constante de acoplamento entre eles é de 9,47 Hz, estão associados respectivamente aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel pirona, sendo estes hidrogênios pertencentes a uma ligação dupla que está conjugada com a carboxila da lactona. No espectro de RMN ¹H também foi possível verificar a presença de mais dois dubletos em δH 6,43 (1H, *d*) e 5,79 (1H, *d*) com *J* = 9,96 Hz e um singlete em δH 1,45 integrando para 6 hidrogênios (equivalente a duas metilas de C sp³). Aos dubletos mais desblindados, um em δH 6,43 ppm foi atribuído

ao hidrogênio H-4', e o outro em δ H 5,79 ao H-3' (Tabela 1.4). Observa-se ainda a presença de dois singletos em δ H 7,26 ppm e 6,63 ppm referente aos hidrogênios H-5 e H-8, que não possuem hidrogênio ligado ao carbono vizinho a eles, indicando que o anel pirano é linear, estando ligado às posições C-6 e C-7 do anel aromático do esqueleto cumarínico.

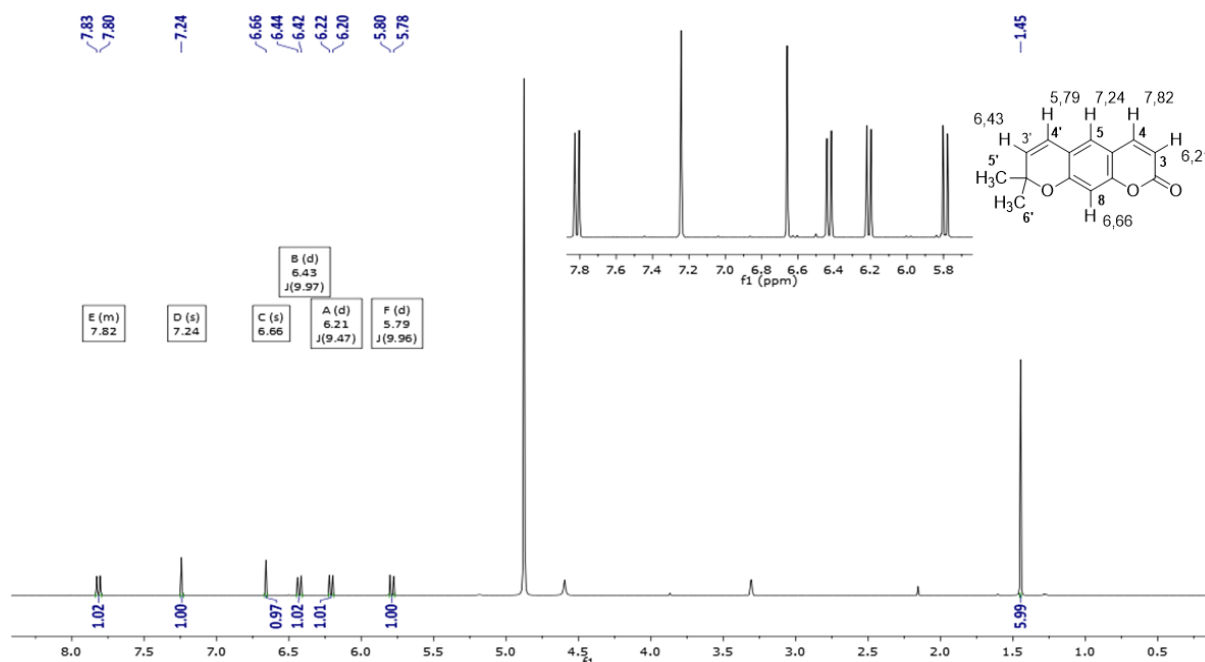


Figura 1.16. Espectro de RMN de ^1H - MeoD referente a xantiletina isolada da raiz de *citrus*.

Tabela 1.4. Dados de RMN de ^1H para a xantiletina isolada da raiz de *citrus*.

| nº de H | δ | J (Hz) |
|---------|---------------|--------|
| 3 | 6,21 <i>d</i> | 9,47 |
| 4 | 7,82 <i>d</i> | 9,47 |
| 5 | 7,24 <i>s</i> | - |
| 8 | 6,66 <i>s</i> | - |
| 3' | 5,79 <i>d</i> | 9,96 |
| 4' | 6,43 <i>d</i> | 9,96 |
| 5' e 6' | 1,45 <i>s</i> | - |

A Figura 1.17 mostra o espectro de ^1H para a seselina, onde é possível observar 6 dubletos e um singlete com δ 1,47 ppm, referentes aos hidrogênios das duas metilas 5' e 6'. Há a presença de sinais que caracterizam a classe estrutural das cumarinas, como dois dubletos característicos em δ 6,22 ppm e 7,83 ppm referentes aos hidrogênios do anel pirano H-3 e H-4. Foi possível identificar também os sinais dos hidrogênios referentes ao anel pirano, proveniente da ciclização de

uma prenila. Estes consistem em um par de dubletos em δ 5,85 ppm e 6,80 ppm, que correspondem a H-3' e H-4', respectivamente.

Verificou-se também a presença de mais dois dubletos em δ 6,74 (*d*, $J = 8,44$ Hz) e 7,36 (*d*, $J = 8,44$ Hz) referentes aos hidrogênios H-6 e H-5 respectivamente (Tabela 1.5). Os dubletos com constante de acoplamento de 8,56 Hz é característico de grupos “orto” de anel aromático. Sugere-se dessa maneira que o anel pirano encontra-se dessa vez nas posições C-7 e C-8 do anel aromático do esqueleto da cumarina, levando a piranocumarina angular, seselina.

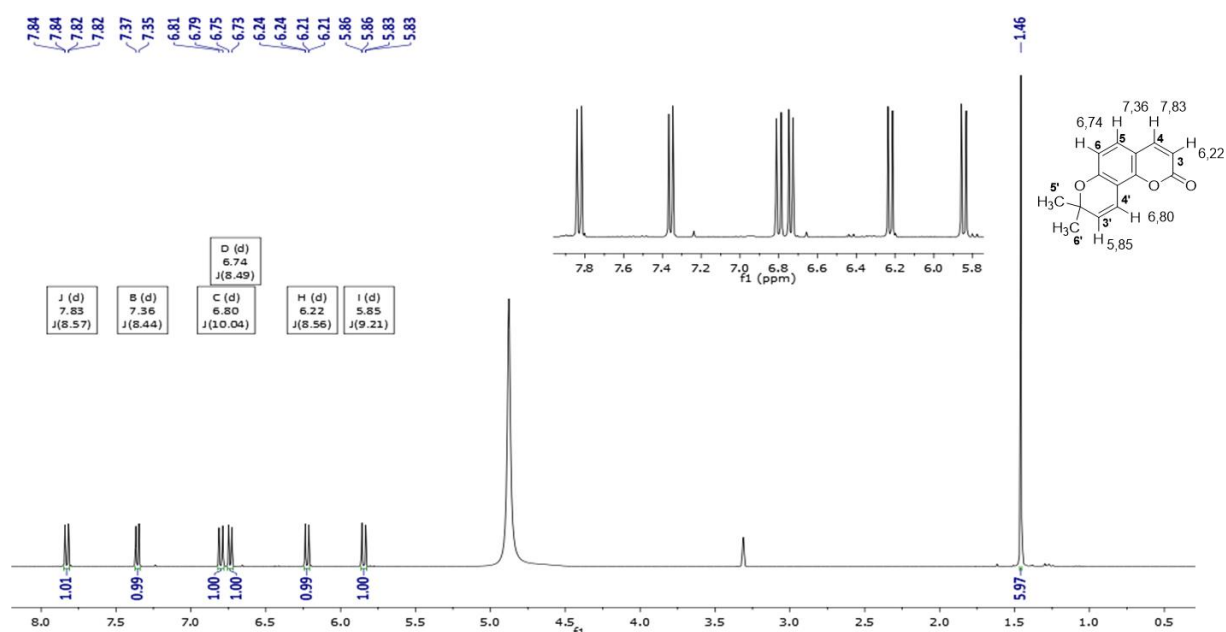


Figura 1.17. Espectro de RMN de ¹H - MeOD referente a seselina isolada da raiz de citrus.

Tabela 1. 5. Dados de RMN de ¹H para a seselina isolada da raiz de citrus.

| nº de H | δ | J (Hz) |
|---------|---------------|--------|
| 3 | 6,22 <i>d</i> | 8,56 |
| 4 | 7,83 <i>d</i> | 8,56 |
| 5 | 7,36 <i>d</i> | 8,44 |
| 6 | 6,74 <i>d</i> | 8,44 |
| 3' | 5,85 <i>d</i> | 9,21 |
| 4' | 6,80 <i>d</i> | 9,96 |
| 5' e 6' | 1,45 <i>s</i> | 10.04 |

1.4.4 Análise metabolômica via LC-HRMS/q-TOF

As análises para estudos metabolômicos foram realizadas no modo positivo e negativo de ionização por LC-HRMS/Q-ToF. A Figura 1.18, mostra a sobreposição dos cromatogramas TIC referentes aos tratamentos de RPS, RPI, RdPS, RdPI, RPS_{iv} e RPI_{iv} analisadas em modo positivo de ionização. Através da análise visual dos cromatogramas é possível observar que há diferenças no perfil químico entre os tratamentos avaliados. Há diferenças entre raízes e radículas, entre infectadas e sadias, e como esperado, diferenças entre raízes de plantas cultivadas em casa de vegetação e *in vitro*.

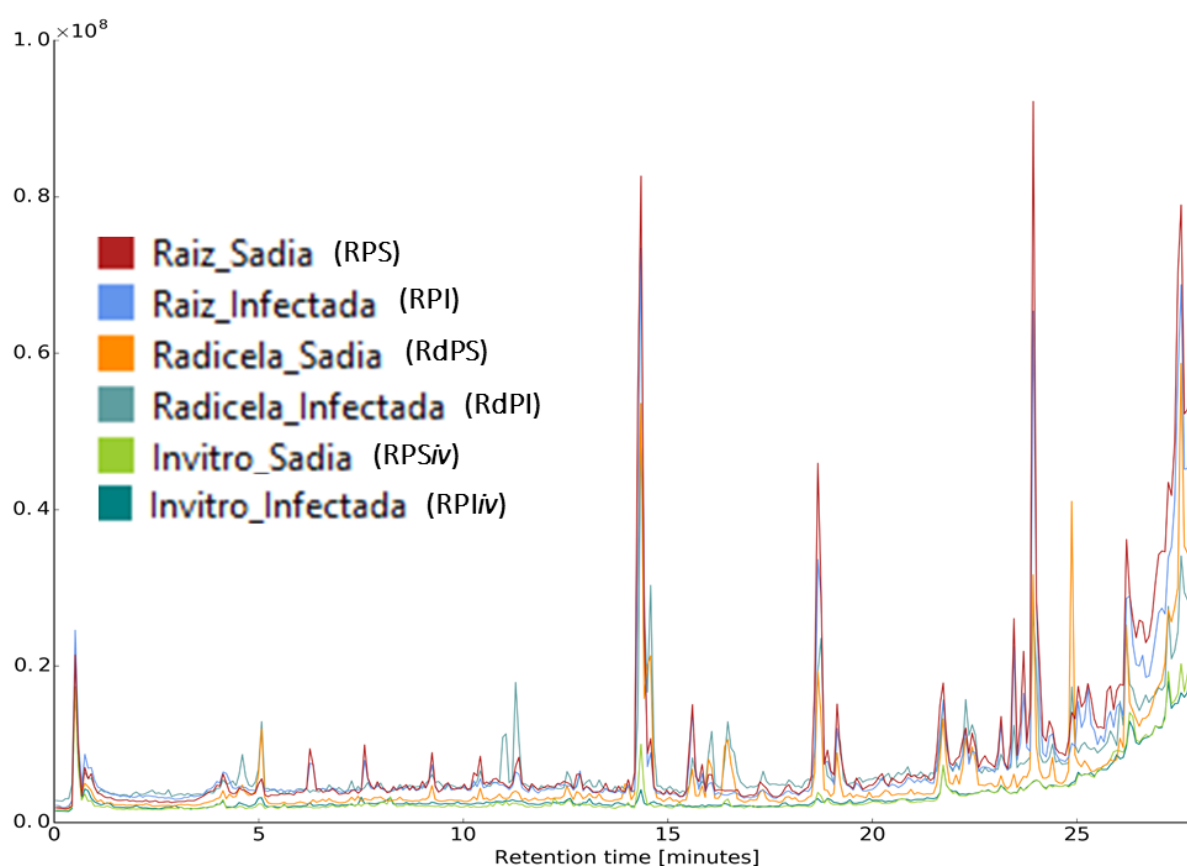


Figura 1.18. Cromatograma TIC – MS no modo positivo de ionização das raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com HLB cultivadas em casa de vegetação e de raízes de plântulas sadias e infectadas com HLB cultivadas *in vitro*, obtidos usando UHPLC-HRMS no modo de ionização positiva (ESI+).

A Figura 1.19 mostra a sobreposição dos cromatogramas TIC referentes aos tratamentos de RPS, PPI, RdPS, RdPI, RPS_{iv} e RPI_{iv} analisadas em modo negativo de ionização. Através da análise visual dos cromatogramas é

possível observar que para este modo há uma menor quantidade de metabólitos detectados frente ao modo positivo de ionização. É possível observar também diferenças em composição e quantidade de metabólitos entre os tratamentos avaliados.

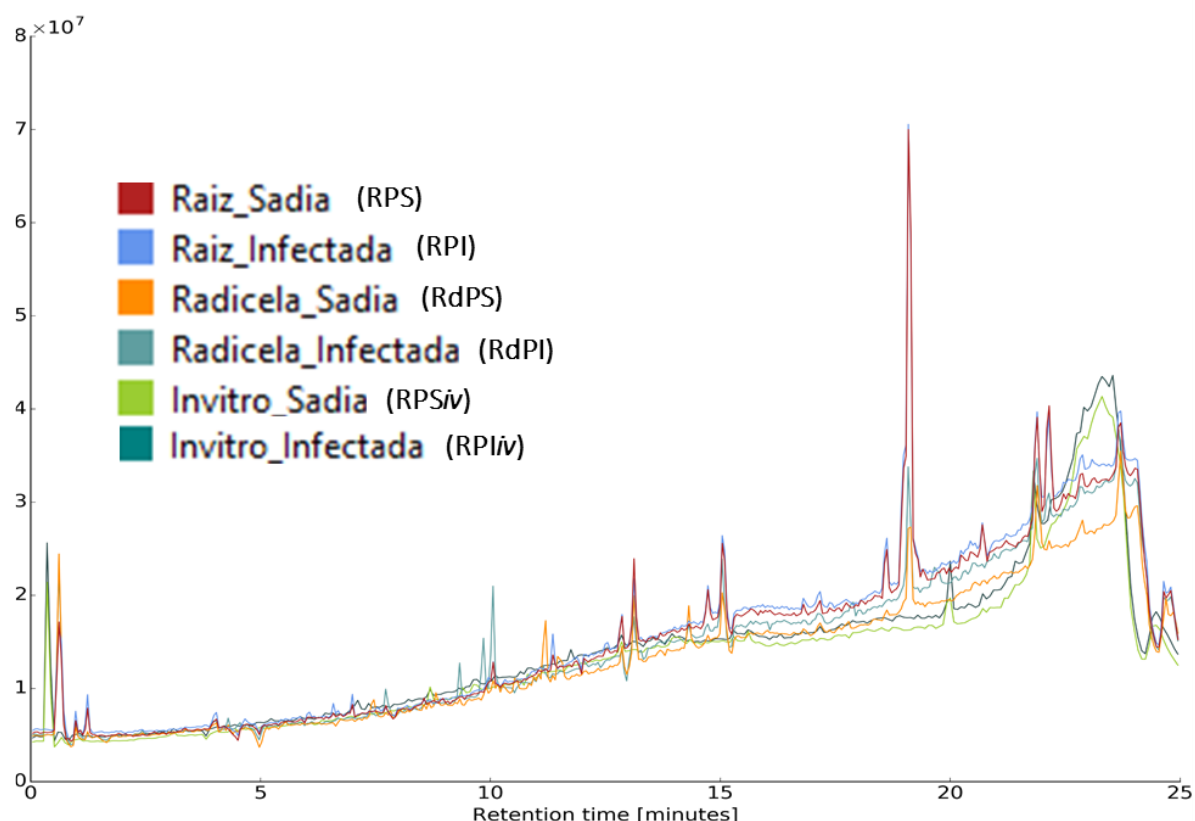


Figura 1.19. Cromatograma TIC – MS no modo negativo de ionização das raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com HLB cultivadas em casa de vegetação e de raízes de plântulas saudas e infectadas com HLB cultivadas *in vitro*, obtidos usando UHPLC-HRMS no modo de ionização negativo (ESI-).

1.4.5 Rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização

Com o intuito de entender estas diferenças e anotar os compostos que sejam responsivos a infecção por CLas em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* cultivadas em casa de vegetação, e raízes de plântulas de *C. sinensis* saudas e infectadas cultivadas *in vitro*, foi realizado o pré processamento dos dados utilizando o software MS Dial para a avaliação dos mesmos através de rede molecular utilizando a plataforma GNPS.

A Figura 1.20 mostra a rede molecular obtida no modo positivo de ionização para RPS em azul, RPI em amarelo, RdPS em verde e Rdpl em vermelho.

Cada nodo corresponde a um agrupamento de íons que estão presentes em uma ou mais amostras e foram alinhados a partir da sua relação m/z , onde cada nodo está representado em diferentes cores de acordo com a distribuição destes íons em cada um dos tratamentos avaliados. A distribuição dos íons foi realizada de acordo com a área do seu respectivo sinal analítico em MS, sendo esta considerada uma análise quantitativa relativa. É possível observar que foram obtidos como resultado do processamento e procedimento de deconvolução espectral utilizando a abordagem FBMN, 1219 íons, agrupados em 50 clusters com 3 ou mais nodos e 26 clusters com 2 nodos. Destes 1219 íons observados, 601 íons não foram agrupados em nenhum dos clusters da rede molecular.

Para esta análise foram anotados 18 íons dentre eles a: umbeliferona m/z 163,0384; herniarina m/z 177,0545; 3-acetil-cumarina m/z 189,0544 e citropteno m/z 207,0563 estão agrupados no cluster da umbeliferona (Figura 1.21). A xantiletina m/z 229,0885; seselina m/z 229,0858; suberosina m/z 245, 1188; xantoxiletina m/z 259,0963; 5-metóxiseselina m/z 259,0961; suberenol m/z 261,1121; aurapteno m/z 299,1636 e esquimina m/z 325,0919 apareceram agrupadas no cluster da xantiletina e seselina (Figura 1.22). O ostol m/z 245,1172; nordentatina m/z 313,1428 e clausarina m/z 381,2087 no cluster do ostol e clausarina (Figura 1.23). A deoxilimonina m/z 455,2066; limonina m/z 471,2001 e acetato de limonina m/z 515,2268 no cluster da limonina (Figura 1.24).

O mesmo foi realizado no modo positivo de ionização, utilizando a abordagem do FBMN via plataforma GNPS, para RPS_{iv} em verde, RPI_{iv} em vermelho (Figura 1.25). Através da análise da rede molecular obtida na plataforma GNPS após o processamento e deconvolução espectral utilizando a abordagem FBMN, foram observados 441 íons, agrupados em 16 clusters contendo três ou mais íons e 17 clusters compostos por apenas dois íons/nodos. Desse total de íons, 232 deles não foram agrupados em nenhum cluster e encontram-se isolados na rede molecular. Foram anotados 3 metabólitos agrupados em um cluster denominado cluster da xantiletina e seselina e outros 3 metabólitos sem clusterização (Figura 1.26): umbeliferona m/z 163,0388 suberenol m/z 245,1172, xantiletina 229,0857, seselina m/z 229,0872, esquimina m/z 325,0915 e limonina m/z 471,2010.

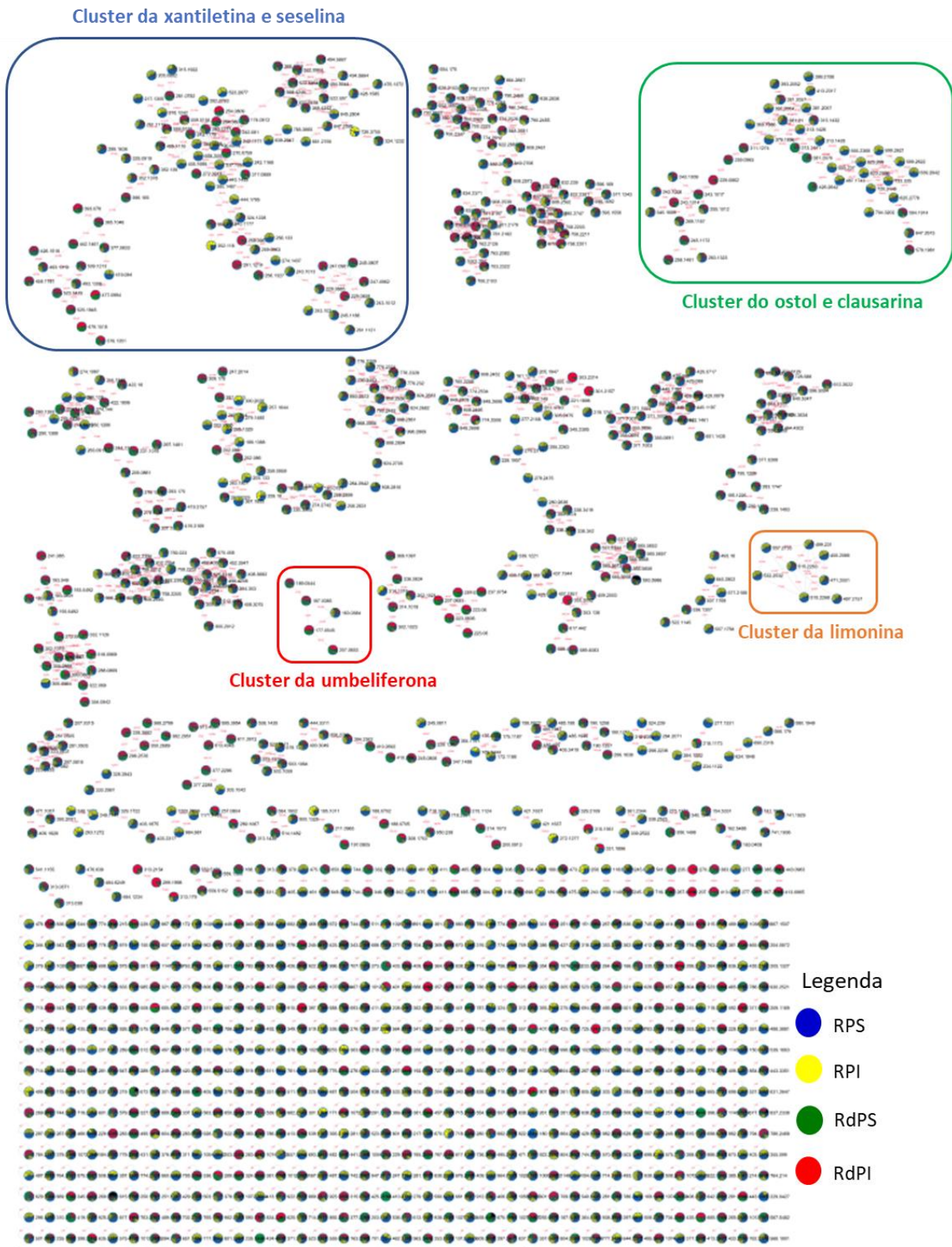


Figura 1.20. Rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radicelas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação.

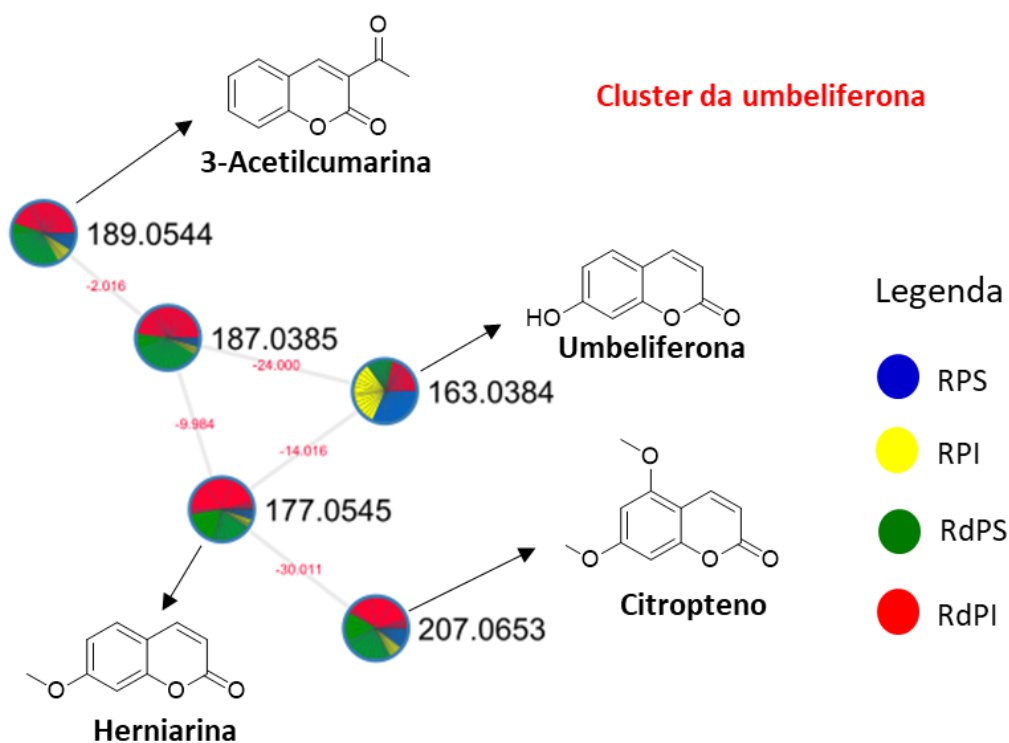


Figura 1.21. Cluster da umbeliferona da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS e RdPS) de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI).

É importante ressaltar que todas as anotações foram realizadas dentro da faixa de erro aceitável de 5 ppm para MS e MS/MS e todos estes compostos já foram isolados e caracterizados anteriormente em plantas cítricas pelo Laboratório de Produtos Naturais PN – CBIP, desenvolvidos por RIBEIRO, A. B.; et al., 2008⁴¹, SOARES, M. S.; et al., 2020⁵³, BELLETE, B. S., 2013⁸³, CERQUEIRA, C. N., 2016¹⁸⁰, GOBETTI, M. F. S., 2021⁸², dentre outros. Dessa maneira garantimos a certificação de anotação correta dos íons, conseguindo monitorar as diferenças de massa entre os compostos, representados por nodos, pertencentes a cada cluster da rede molecular.

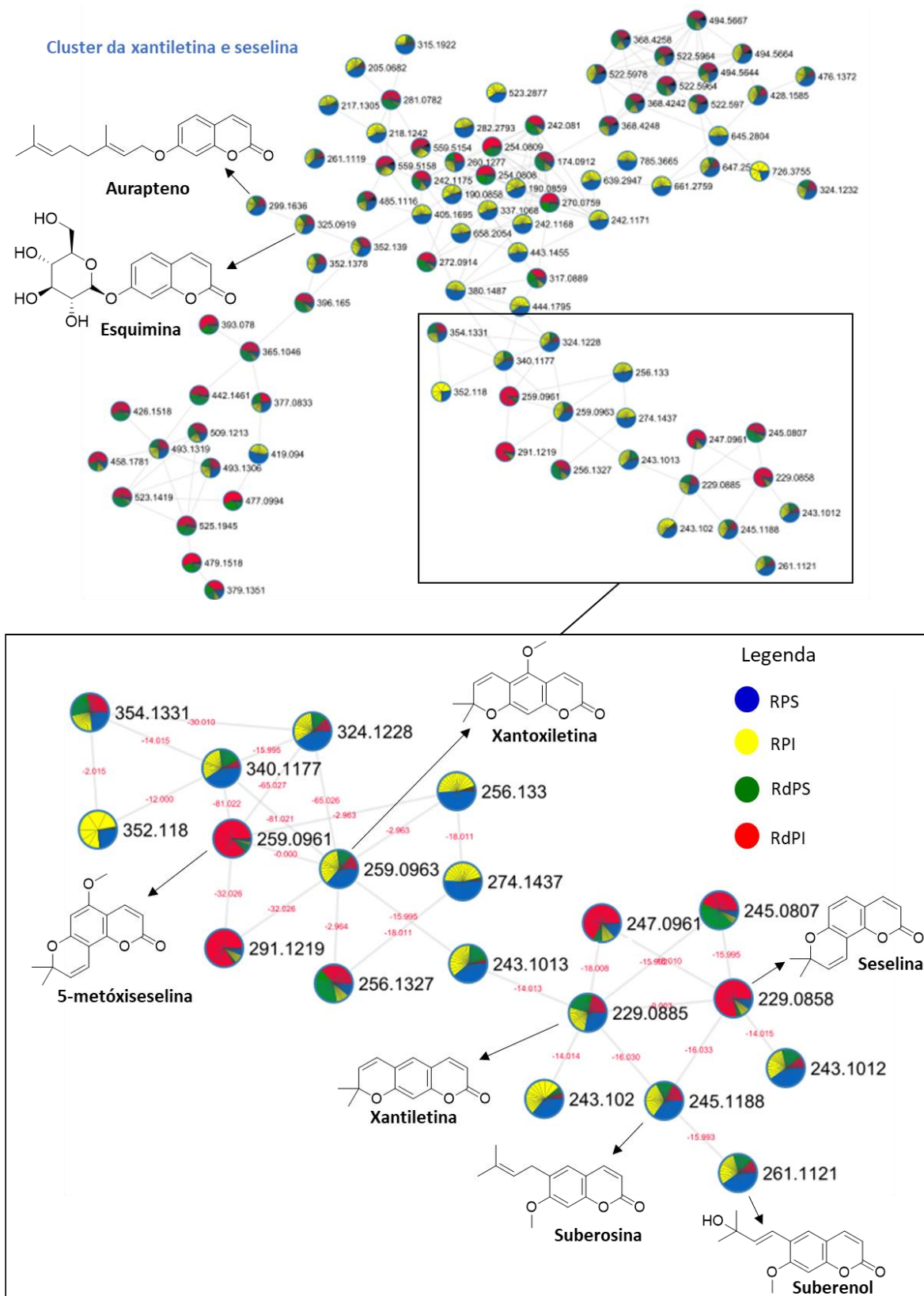


Figura 1.22. Cluster da xantiletina e seselina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLAs (RPI e RdPI).

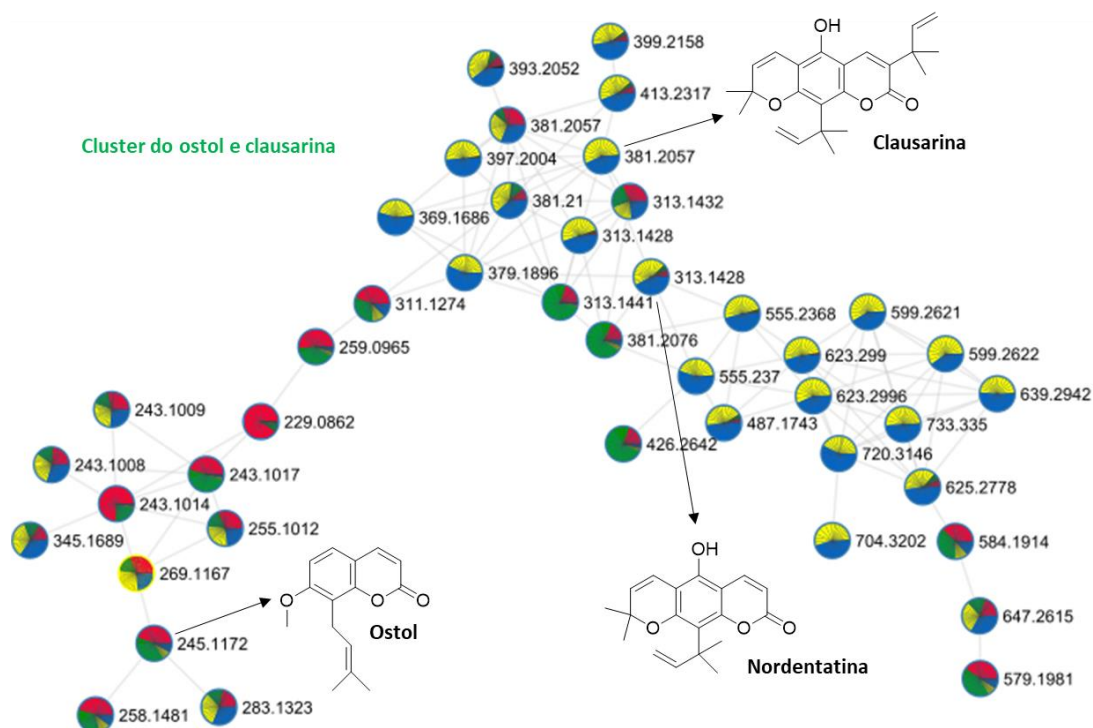


Figura 1.23. Cluster do ostol e clausarina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS e PdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI).

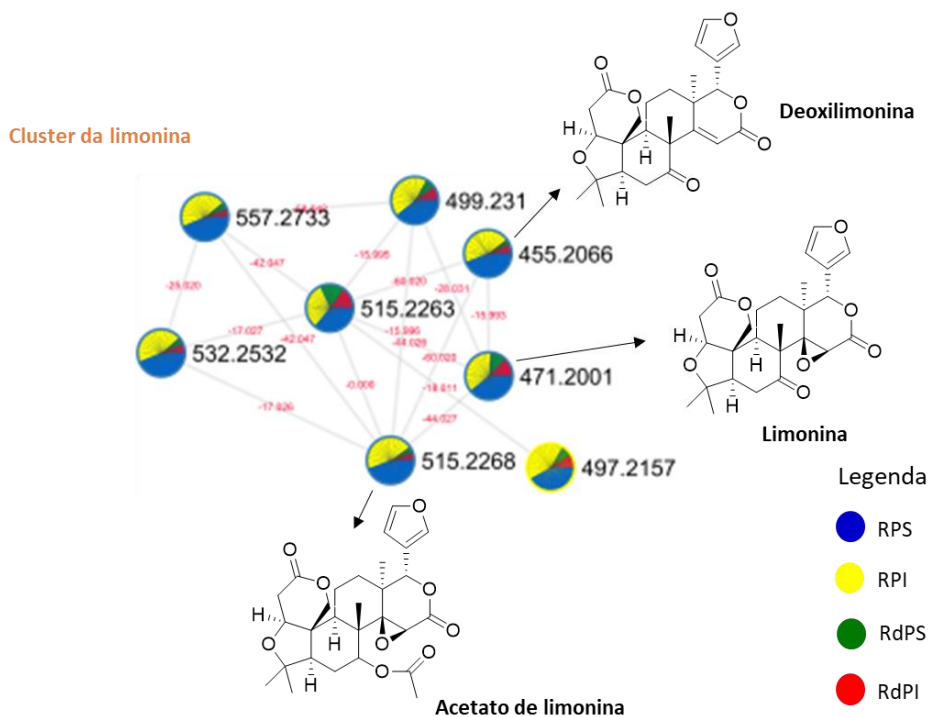


Figura 1.24. Cluster da limonina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS e PdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI).

Cluster da xantiletina e seselina

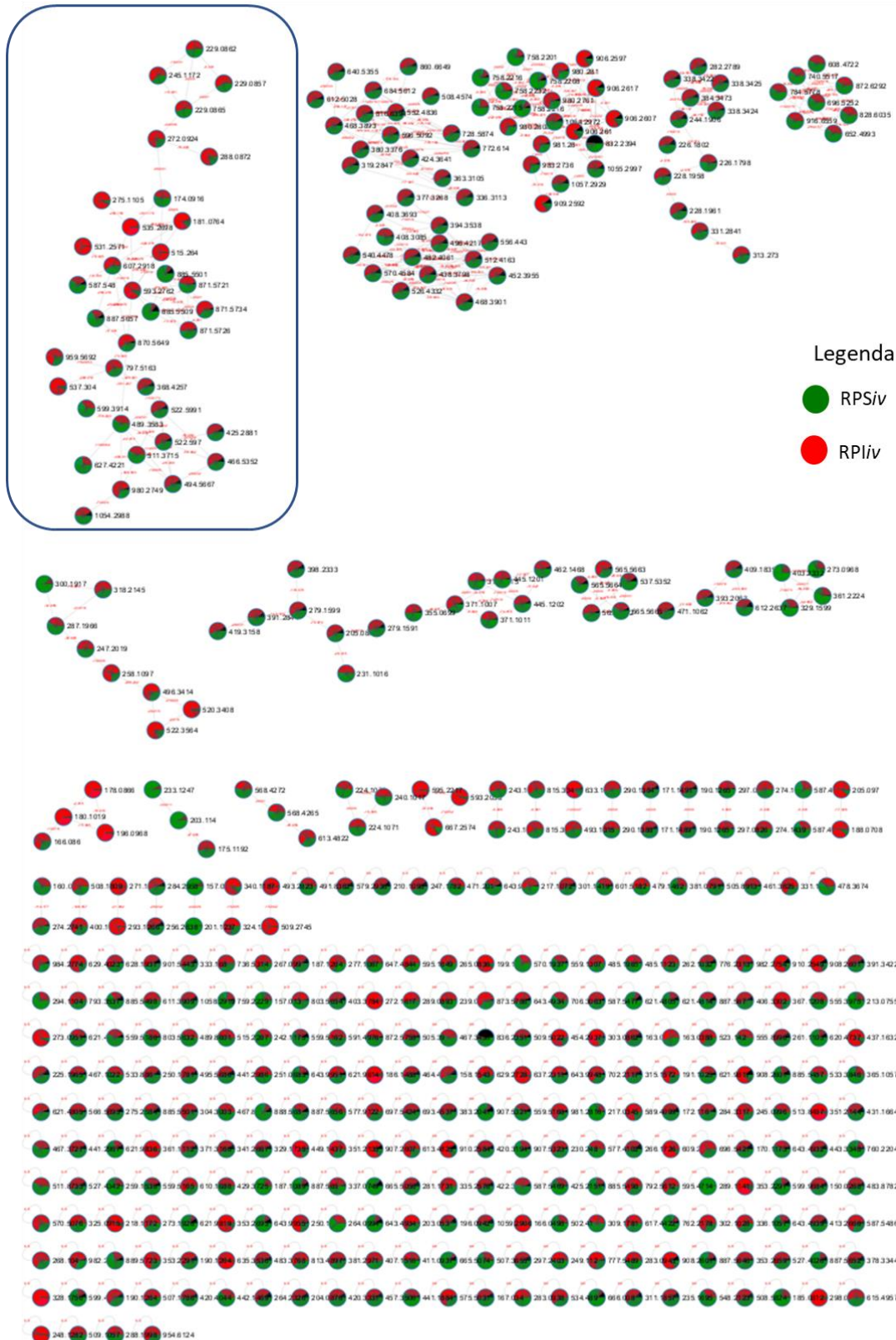


Figura 1.25. Rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes de plântulas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLAs (RPIiv) cultivadas *in vitro*.

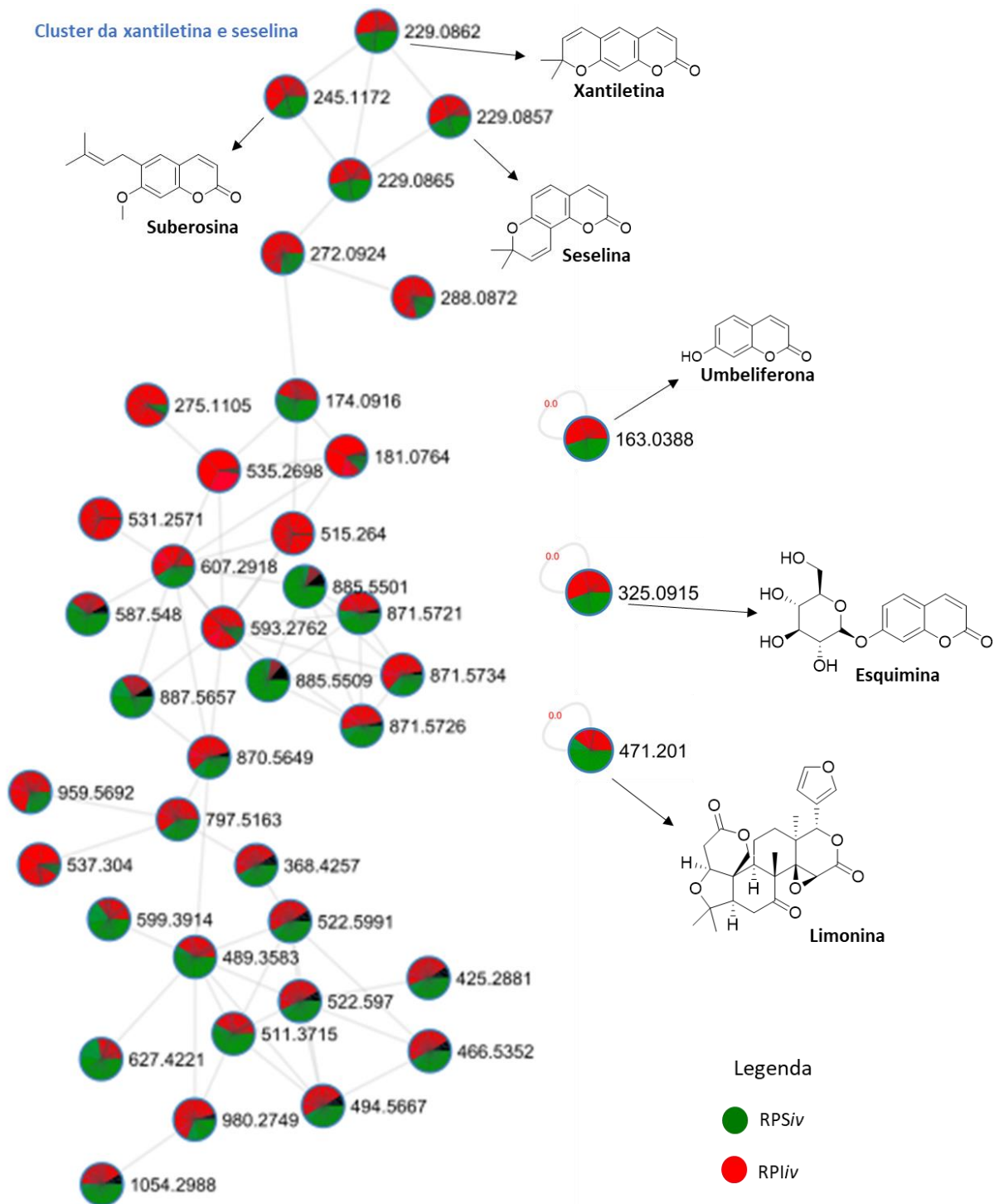


Figura 1.26. Cluster da xantiletina e seselina da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização em raízes de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLAs (RPIiv).

1.4.5.1. Anotação para umbeliferona

Após o processo de deconvolução espectral, normalização e alinhamento, foi possível observar um sinal com $R_t = 4,12$ min e $[M + H]^+$ 163,0393 (Figura 1.27), sendo este referente a fórmula molecular $C_9H_6O_3$, com íon precursor $[C_9H_7O_3]^+$. Este composto foi anotado como umbeliferona que possui $[M + H]^+$ teórico de m/z 163,0395; apresentando um erro de -1,23 ppm.

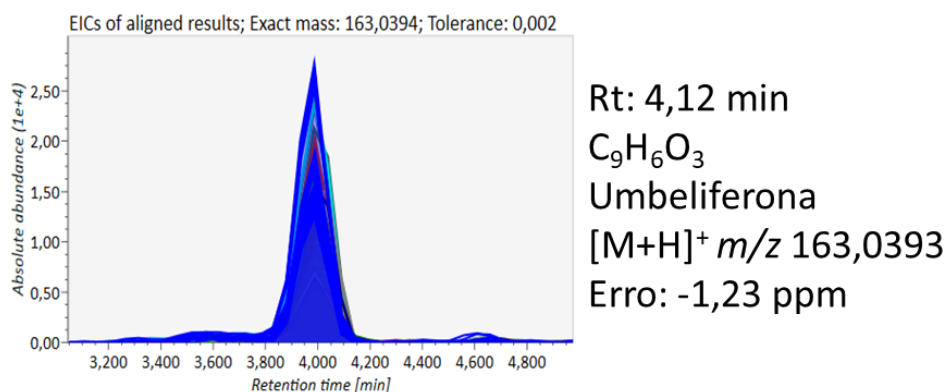


Figura 1.27. Sinal analítico em MS referente a umbeliferona após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, de $[M + H]^+$ 163,0393 e $R_t = 4,12$ min.

A partir do espectro de MS/MS (Figura 1.28) foi possível elaborar uma proposta de fragmentação para a umbeliferona (Figura 1.29). A partir do íon precursor ocorre a formação de um fragmento de íon produto m/z 135,0447 $[C_8H_7O_2]^+$; referente a perda de CO $[M + H - 27,99]^+$. O íon base m/z 107,0489 $[C_7H_7O]^+$; é então formado a partir de mais uma perda de CO (-27,99 Da). Este íon de m/z 107,0489 sofre rearranjos e posteriormente é observado a perda de mais uma unidade de CO, formando o íon produto m/z 79,0534 $[C_6H_7]^+$ (-27,99 Da) que após a perda de H_2 retorna a aromaticidade do fragmento na forma de cátion benzila levando ao íon m/z 77,0382 $[C_6H_5]^+$ (-30,01 Da), como proposto na Figura 1.29.

Através da análise do espectro de MS/MS; é possível observar também que ocorre a perda de CO_2 $[M+H - 43,99 Da]^+$, levando ao íon produto m/z 119,0492 $[C_8H_7O]^+$. Este último pode perder CO e posteriormente sofrer rearranjos formando o íon tropílio m/z 91,0540 $[C_7H_7]^+$. Todos os principais fragmentos formados através da fragmentação em MS/MS, foram justificados a partir da proposta de fragmentação sugerida.

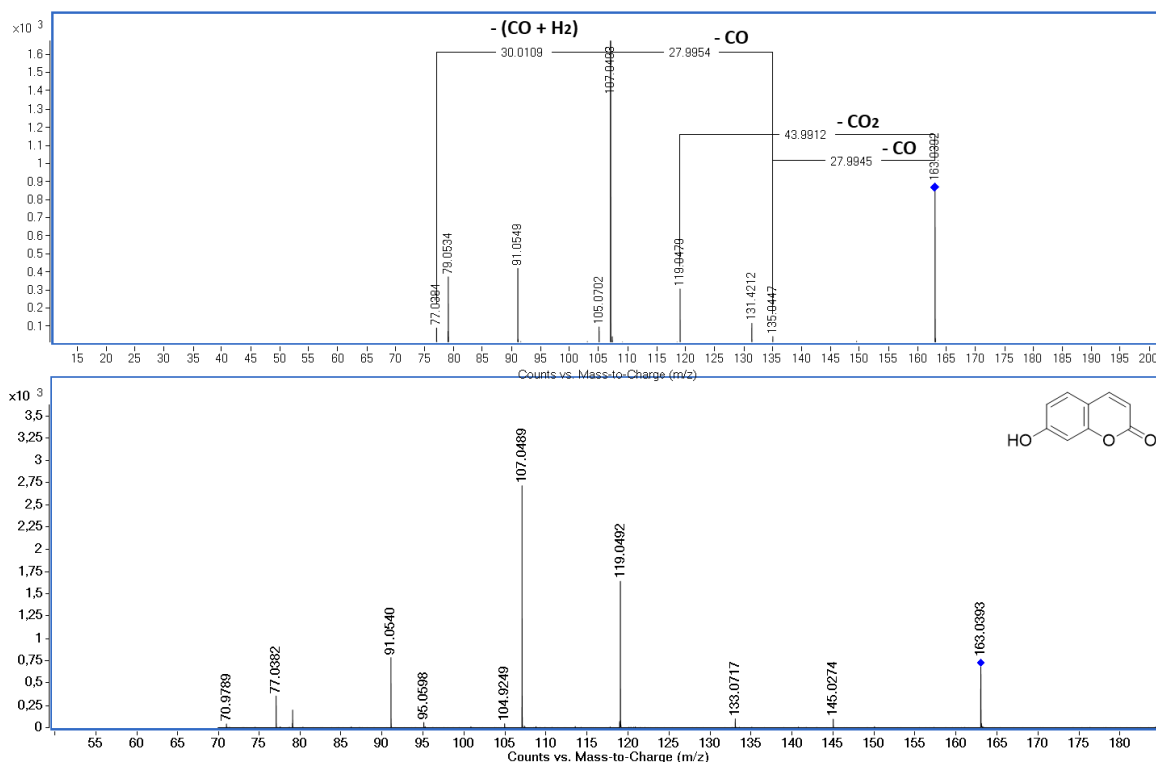


Figura 1.28. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da umbeliferona [M + H]⁺ 163,0393 - Rt = 4,12 min em EC = 20V e 22V.

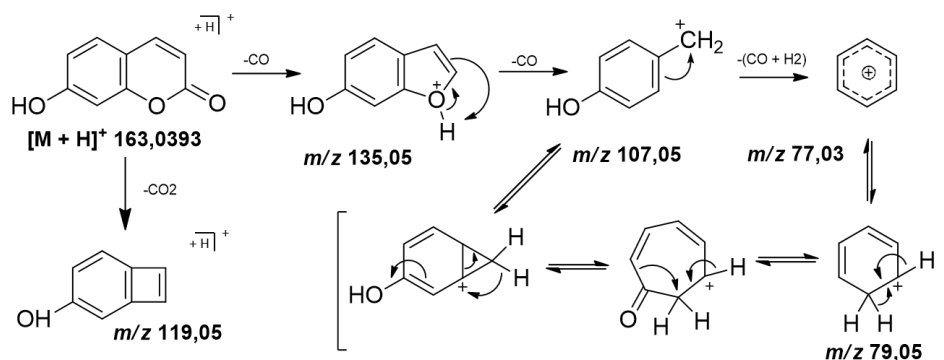


Figura 1.29. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a umbeliferona [M + H]⁺ 163,0393.

A partir da área do íon precursor extraído com uma janela de 5 ppm em MS referente a umbeliferona, foi feita análise estatística empregando o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%. Foram comparados os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. Foram também comparados os pares: RPS_{iv} e RPI_{iv} e raízes de plântulas sadias e infectadas cultivadas *in vitro* (Figura 1.30).

A partir da análise do gráfico e através da análise estatística, pode-se concluir que a produção de umbeliferona é maior nas raízes de *citrus*, quando comparado as radículas. Com relação a radículas de plantas saudias e infectadas com CLas, não há diferença significativa estatisticamente ao nível de 95% de confiança, mas nas raízes a produção de umbeliferona é maior e estatisticamente diferente quando as plantas estão infectadas com a bactéria frente as plantas saudias. Sendo assim podemos inferir que a planta, especialmente nas raízes tem uma reação frente a doença de aumentar a produção deste metabólito, o qual é portanto considerado uma fitoanticipina, atuando como resposta dos citros frente a doença HLB.

Nas raízes de plântulas saudias e infectadas com CLas, cultivadas *in vitro*, não há diferença na produção de umbeliferona entre os tratamentos, ou seja, não há evidências de nenhuma reação da planta frente a doença do HLB.

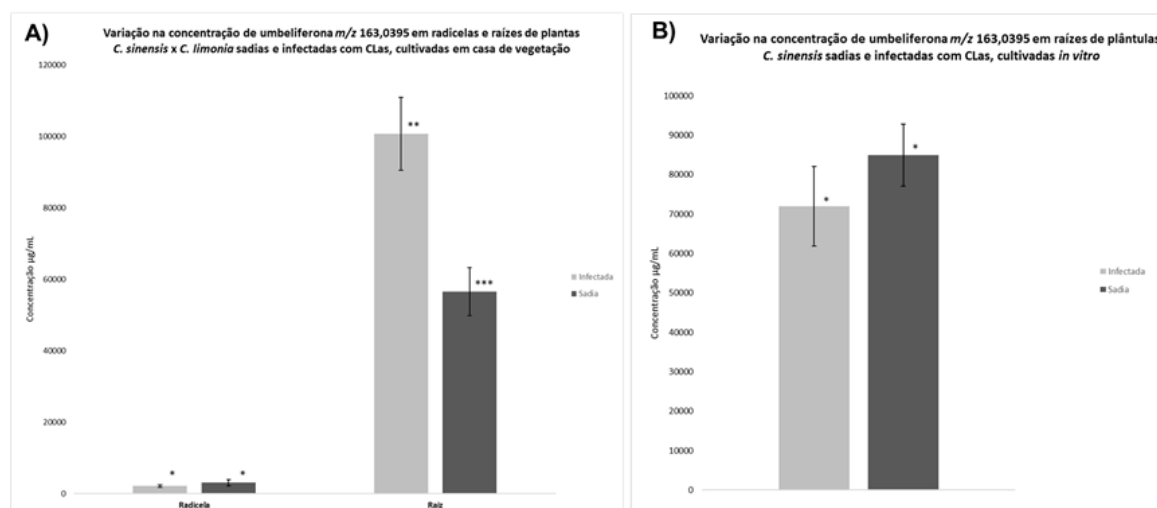


Figura 1.30. Variação na concentração relativa de umbeliferona em: A) radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas *in vitro*.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, a RPS e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, a RPI_{iv} e RPS_{iv}, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.2. Anotação para herniarina

Após os processamentos necessários, foi anotado o composto com Rt= 9,27 min de [M + H]⁺ 177,0546, como sendo a herniarina, que possui fórmula molecular de C₁₀H₈O₃ e um erro de -3,39 ppm. A herniarina foi anotada a partir do

match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, de análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar – INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente a herniarina contacta-se com o nodo de m/z 163,0393; identificado como sendo a umbeliferona (Figura 1.21). A diferença de massa entre os dois nodos é de 14,02 Da, indicando ser um derivado da umbeliferona O-metilada na posição C-7, conhecido como a herniarina. A Figura 1.31 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{10}H_9O_3]^+$.

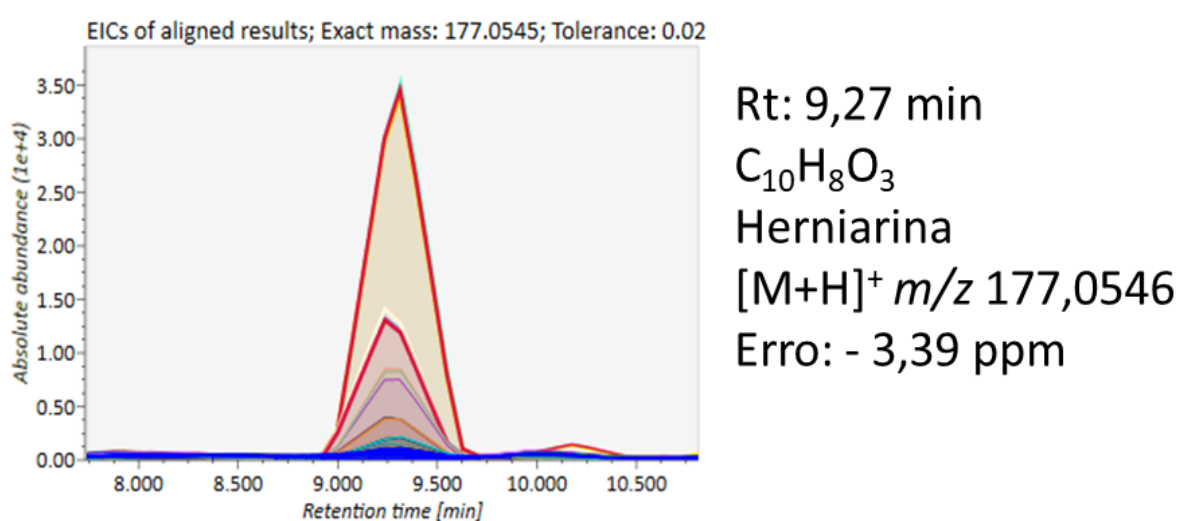


Figura 1.31. Sinal analítico em MS referente a herniarina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 177,0546 e $Rt=$ 9,27 min.

O espectro de massas MS/MS em energia de colisão de 20V referente a herniarina, está demonstrado na Figura 1.32. Observa-se a presença do íon fragmento m/z 162,0317 $[C_9H_6O_3]^+$, referente a quebra homolítica da metila do grupo metoxila ($-CH_3$) com perda de massa $[M + H - 15,02 Da]^+$, com mecanismo de fragmentação representado na Figura 1.33. Há também a formação do íon produto com m/z 133,0647 $[C_9H_9O_2]^+$ devido a perda de CO_2 na molécula $[M + H - 43,99 Da]^+$. No modo ESI positivo de ionização, a perda tanto de CO, quanto de CO_2 no anel pirona do esqueleto cumaríco é característica, sendo comumente observada.

O íon base de m/z 121,0645 $[C_8H_9O]^+$ referente a $[M + H - 55,99 Da]^+$ é gerado devido a duas perdas sequenciais de CO a partir do íon precursor, que está representada na Figura 1.33. Perdas de -30,01 Da é comumente observada em compostos metoxilados, sendo assim em seguida ocorre a perda de CH_2O , mediada

por rearranjos na molécula, propiciando a formação do íon tropílio de m/z 91,0534 $[C_7H_7]^+$. A formação deste só é possível, devido ao efeito de estabilização por ressonância e é um fragmento característico no padrão de fragmentação do esqueleto cumarínico.

O mecanismo de fragmentação foi proposto de acordo com referências reportadas na literatura para núcleos cumarínicos^{53,181}, considerando os princípios de reações de fragmentação utilizando ionização eletrospray em espectrometria de massas¹⁸² e os princípios de química orgânica. Os fragmentos gerados a partir do espectro de MS/MS e dos mecanismos propostos são precisos e estão dentro da faixa de erro aceitável para LC-HRMS.

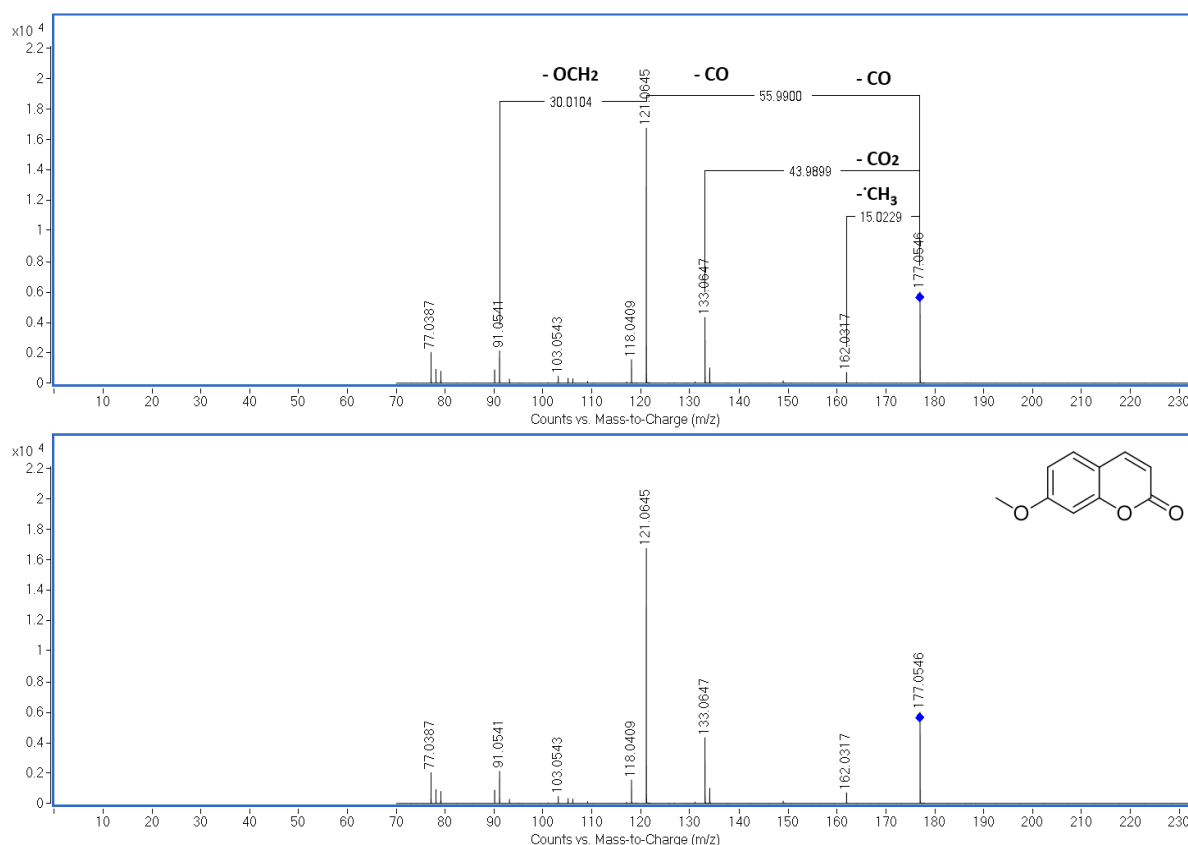


Figura 1.32. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da herniarina $[M + H]^+$ 177,0546 - Rt = 9,27 min em EC = 20V.

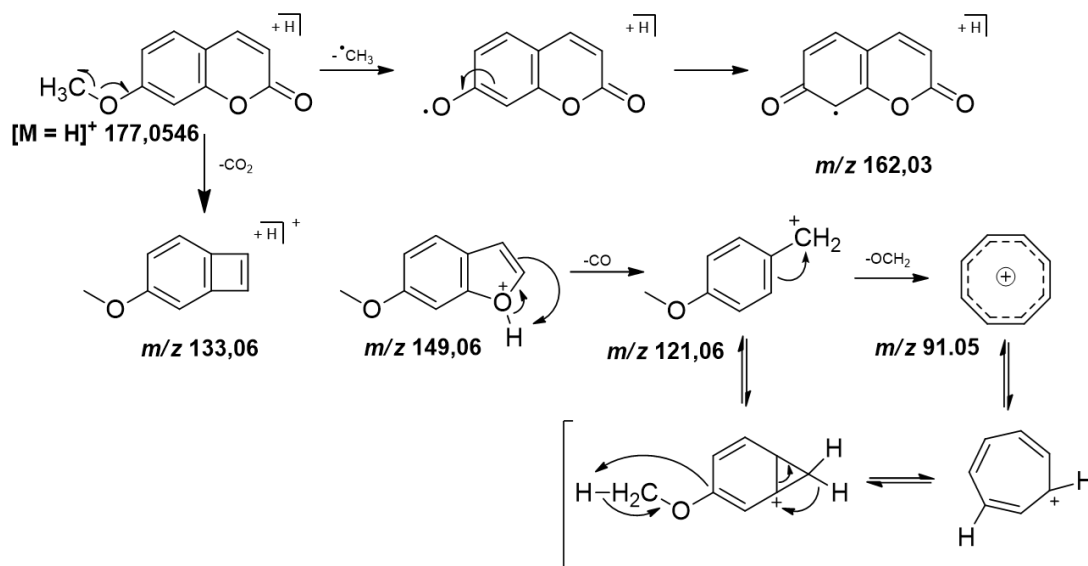


Figura 1.33. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a herniarina $[M + H]^+$ 177,0546.

Após a caracterização da herniarina por LC-MS utilizando a plataforma GNPS e o tratamento de dados utilizando o software MS-DIAL, a área referente ao pico em MS com $R_t = 9,27$ min foi determinada para as amostras de raízes e radículas de plantas saudas e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. A herniarina não foi detectada nas plântulas cultivadas *in vitro*. Estes dados foram tabulados e plotados, como mostra a Figura 1.34. Foi também empregado o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação.

Através da análise dos dados é possível concluir que há uma maior quantidade relativa de herniarina em radículas de plantas infectadas com CLas frente radículas de plantas saudas, sendo essa diferença significativa estatisticamente aplicando o teste t a um nível de 95% de confiança. Outra diferença significativa observada entre os tratamentos comparados é que a produção desta substância é muito maior nas radículas quando comparado com as raízes. Há uma diferença entre radículas plantas sadia e infectadas com CLas e com relação a acumulação desta substância nos tecidos da planta, mas com relação a saudas e infectadas, para as raízes de plantas saudas e infectadas com CLas, não há diferença estatística evidenciada. Portanto a herniarina é considerada como um metabólito responsivo a doença HLB.

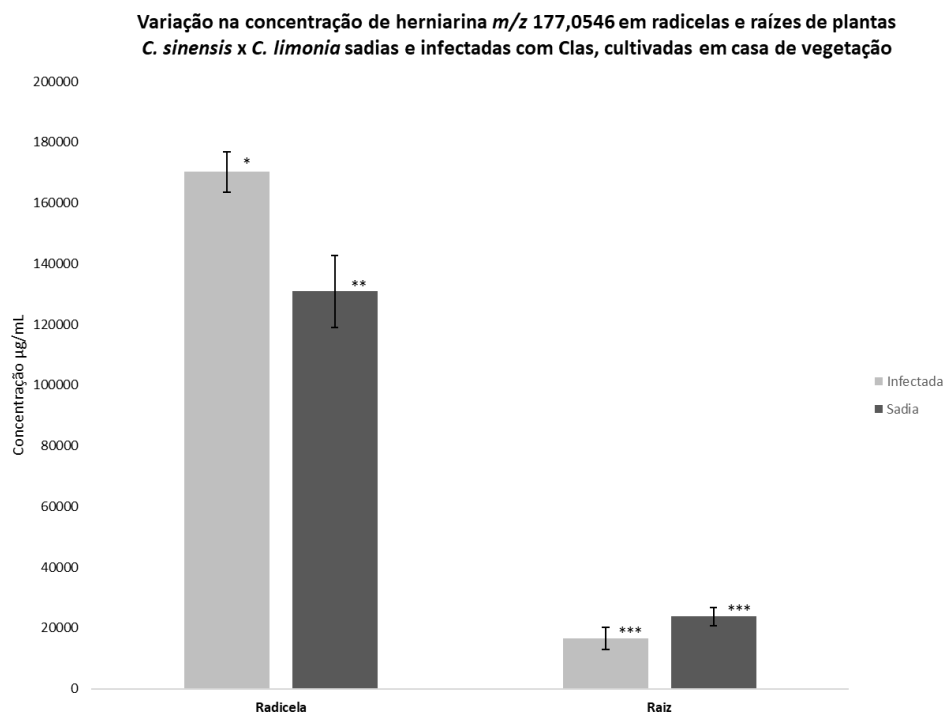


Figura 1.34. Variação na concentração relativa de herniarina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.3. Anotação para 3-acetilcumarina

Após os processamentos necessários, foi anotado o composto com $R_t = 17,33$ min de $[M + H]^+$ 189,0555, como sendo a 3-acetilcumarina, que possui fórmula molecular de $C_{11}H_8O_3$ e um erro de 1,59 ppm. A 3-acetilcumarina foi anotada a partir do match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente a esta substância conecta-se com o nodo da umbeliferona 163,0393, através de um nodo 187,0385 (Figura 1.21). A diferença de massa entre os nodos é de 26,02 Da, indicando que a diferença é atribuída por um grupo hidroxila a menos e adição de um grupo acetil, levando portanto, a anotação da 3-acetilcumarina. A Figura 1.35 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon precursor $[C_{11}H_9O_3]^+$. O espectro de massas MS/MS referente a 3-acetilcumarina, utilizando energia de colisão de 20V está demonstrado na Figura 1.36.

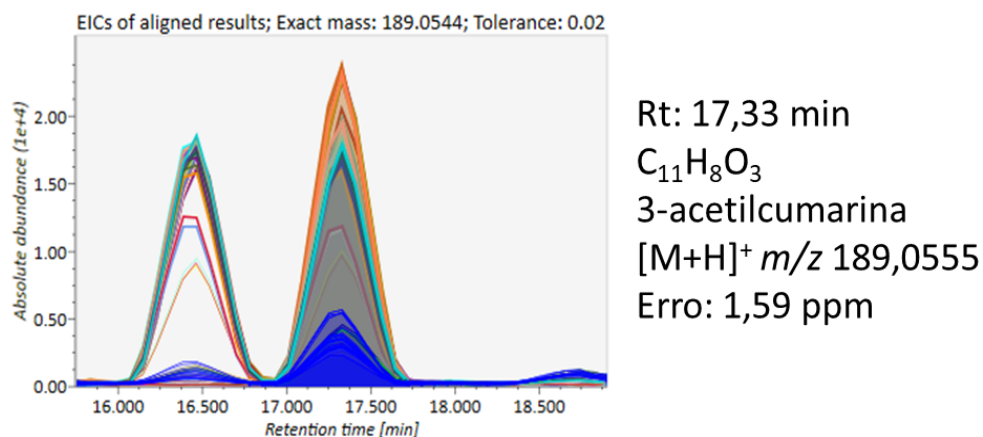


Figura 1.35. Sinal analítico em MS referente a 3-acetilcumarina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 189,0555 e $R_t = 17,33$ min.

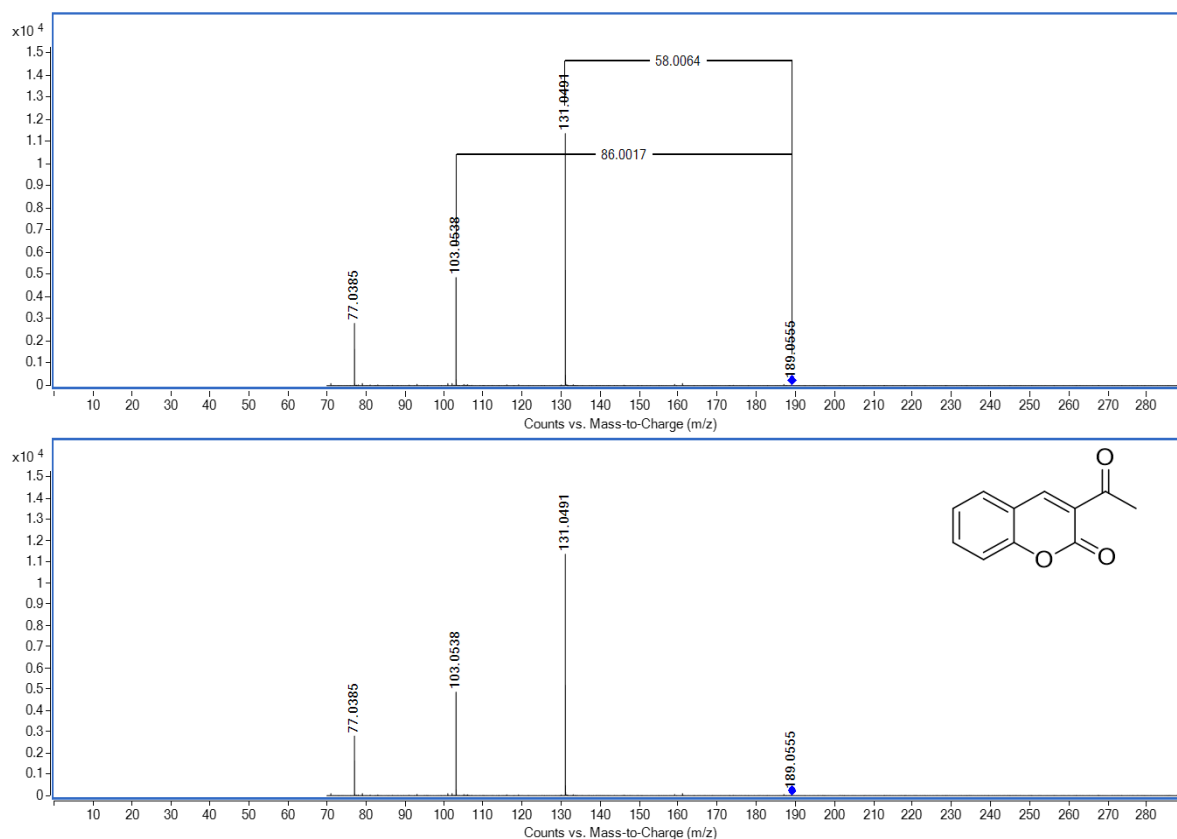


Figura 1.36. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da 3-acetilcumarina $[M + H]^+$ 189,0555 - $R_t = 17,33$ min em $EC = 20V$.

Observa-se a presença do íon fragmento m/z 103,0538 $[C_8H_7]^+$, referente a perda de massa $[M + H - 86,01 Da]^+$, que corresponde a perda inicial da unidade acetila (C_2H_2O), seguida de perda de CO_2 no anel pirona, conforme representado no mecanismo de fragmentação na Figura 1.37. Subsequentemente ocorre a perda de C_2H_2 , levando a formação do íon benzenonium $[C_6H_7]^+$ de m/z

77,0385. A formação do íon base de m/z 131,0538 $[C_9H_7O]^+$, devido a perda de CO_2CH_2 a partir do íon precursor, correspondente a $[M + H - 58,01 Da]^+$, foi ser observada, mas não foi possível propor um mecanismo de fragmentação plausível para este.

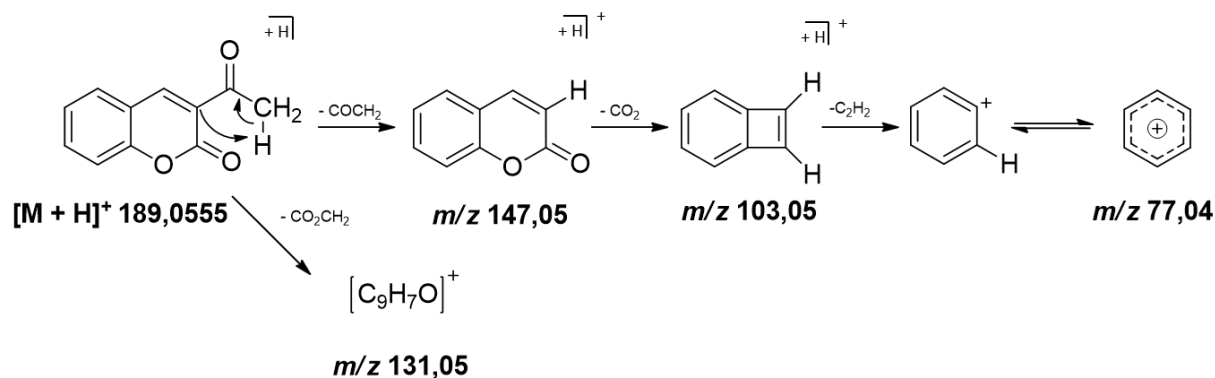


Figura 1.37. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a 3-acetilcumarina $[M + H]^+ 189,0555$.

Após a caracterização da 3-acetilcumarina por LC-MS utilizando a plataforma GNPS e o tratamento de dados pelo software MS-DIAL, a área referente ao pico em MS com $R_t = 17,33$ min para as amostras de raízes e radículas de plantas sadias e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. A herniarina não foi detectada nas plântulas cultivadas in vitro. Estes dados foram tabulados e plotados, como mostra a Figura 1.34. Foi também empregado o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação.

Através da análise dos dados, foi possível concluir que não há diferença significativa na quantidade de 3-acetilcumarina entre plantas sadias e infectadas com CLas. Portanto este metabólito não é considerado responsivo frente a doença HLB. Há uma diferença observada somente com relação a produção desta substância entre os tecidos das raízes e radículas, onde a acumulação da mesma é muito maior nas radículas frente as raízes. O mesmo ocorre para a herniarina, enquanto que para a umbeliferona, observa-se o contrário. É possível inferir que as modificações estruturais podem estar ocorrendo com maior frequência nas raízes secundárias da planta, pois as enzimas responsáveis por catalisar as etapas de

modificação estrutural do esqueleto cumarínico podem ter uma maior expressão gênica neste tecido.

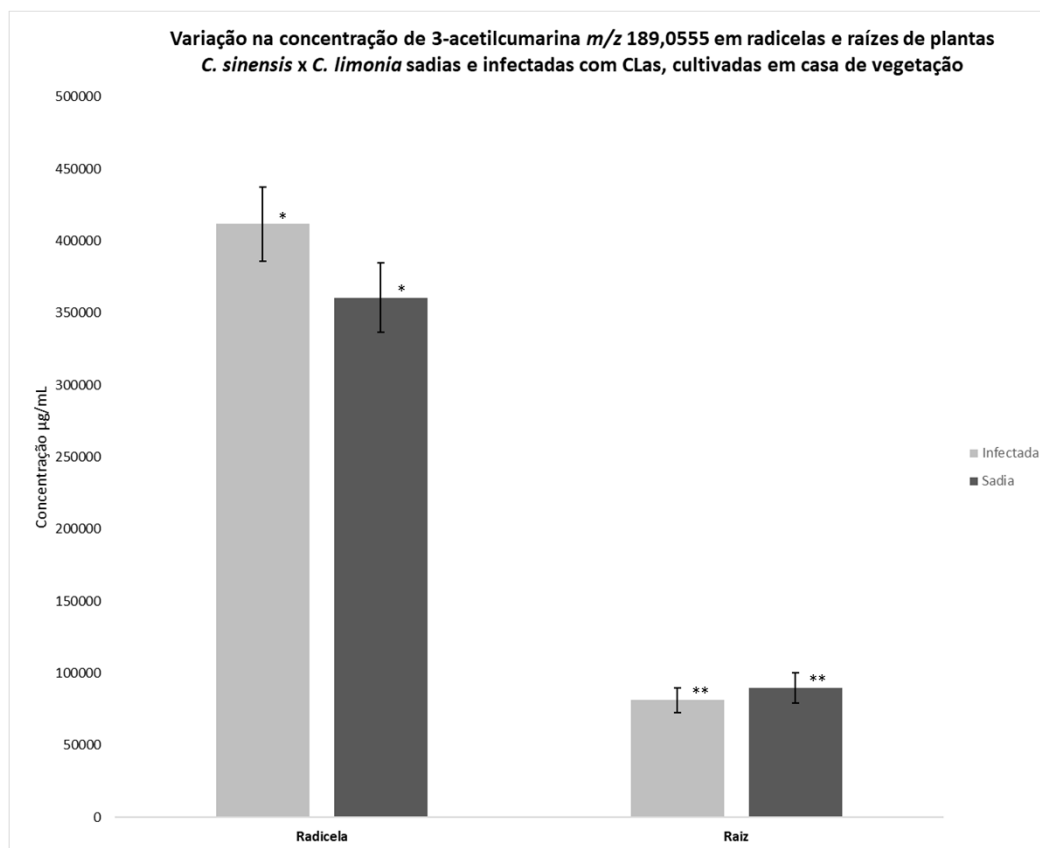


Figura 1.38. Variação na concentração relativa de 3-acetilcumarina em radicelas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.4. Anotação para citropteno

Após o processo de deconvolução espectral, normalização e alinhamento, foi possível observar um sinal com $R_t = 7,90$ min e $[M + H]^+ 207,0649$, sendo este referente a fórmula molecular $C_{11}H_{10}O_4$, com íon precursor $[C_{11}H_{11}O_4]^+$. Este composto foi anotado como sendo citropteno que possui $[M + H]^+$ teórico de 207.0657; apresentando um erro de -3,86 ppm. O metabólito foi anotado a partir do match espectral com as bibliotecas espectrais utilizadas, pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente ao citropteno conecta-se com o nodo 177,0546, identificado como sendo a herniarina

(Figura 1.21). A diferença de massa entre os dois nodos é de 30,01 Da, indicando que houve a adição de mais uma metoxila na posição 5, levando portanto, a identificação do citropteno. A Figura 1.39 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{11}H_{11}O_4]^+$.

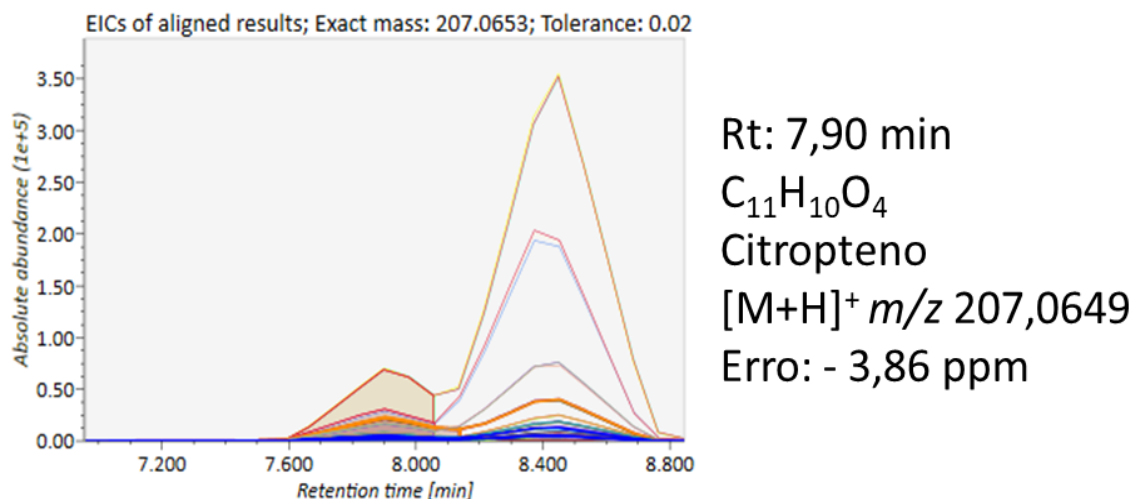


Figura 1.39. Sinal analítico em MS referente ao citropteno após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 207,0649 e $Rt= 7,90$ min.

O espectro de massas MS/MS em energia de colisão de 20V referente ao citropteno, está demonstrado na Figura 1.40. É possível observar que a partir do íon precursor uma perda de $[M + H - 15.02 \text{ Da}]^+$, levando ao íon base de m/z 192,0415 $[C_{10}H_8O_4]^+$, referente a perda radicalar de $\cdot CH_3$ como demonstrado na Figura 1.41. Outro íon fragmento $[C_{10}H_{11}O_2]^+$ de m/z 163,0387 é observado e é característico da perda de CO_2 do anel pirona, que é um padrão de fragmentação comumente esperada para cumarinas.

A partir do íon precursor também é observado um fragmento de $[M + H - 30,01 \text{ Da}]^+$ de m/z 177,05531 correspondente ao íon $[C_{10}H_9O_3]^+$ devido a perda de OCH_2 . Em seguida uma perda CO no anel pirona que equivale a $-27,99 \text{ Da}$ propicia a formação do íon fragmento $[C_9H_9O_2]^+$ de m/z 149,0573 e subsequentemente, ocorre mais uma perda de CO que corresponde a $-27,99 \text{ Da}$, para formar o íon fragmento $[C_8H_9O]^+$ de m/z 121,0649. Este último perde OCH_2 que corresponde a $-30,01 \text{ Da}$ e posteriormente sofrer rearranjos formando o íon tropílio $[C_7H_7]^+$ de m/z 91.0540 (Figura 1.40 e 1.41).

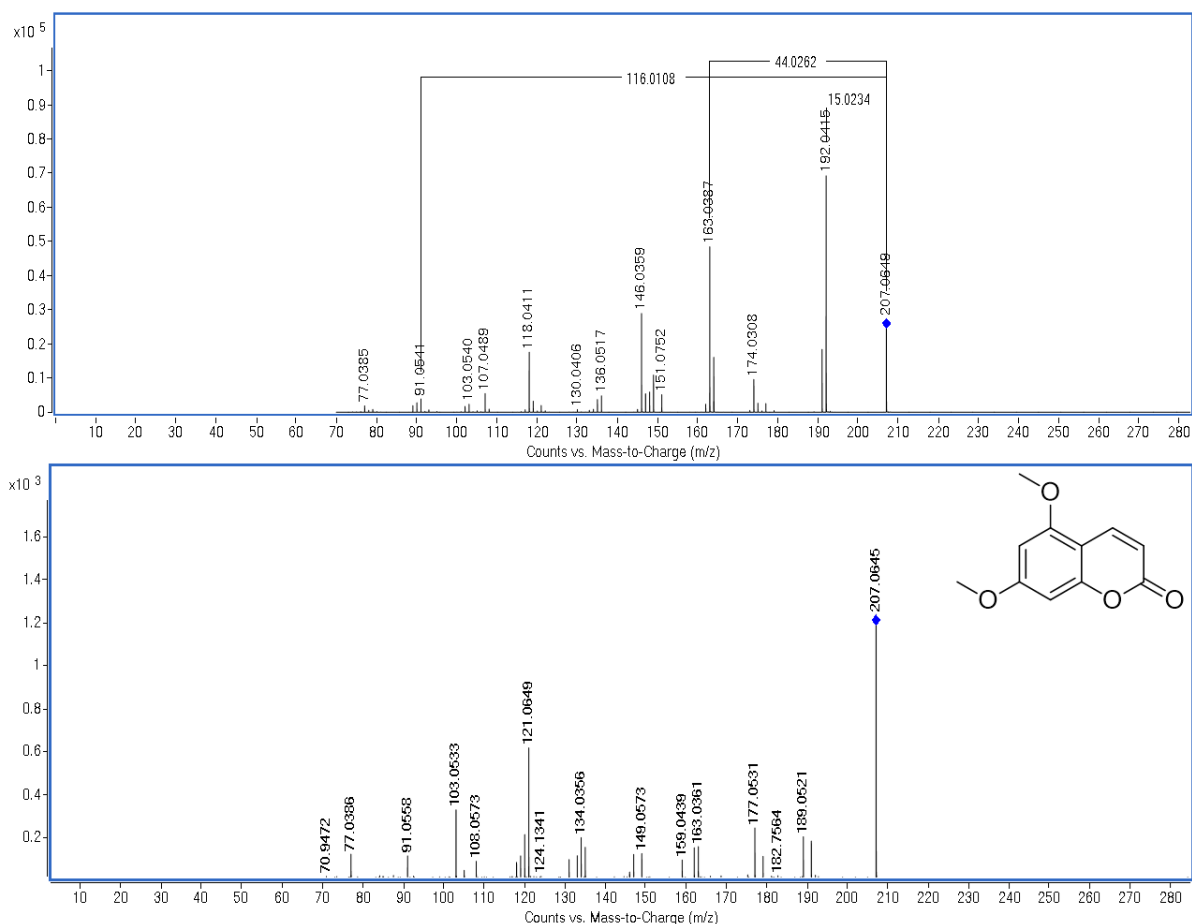


Figura 1.40. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do citropteno $[M + H]^+$ 207,0649 - Rt = 7,90 min em EC = 22 e 18V.

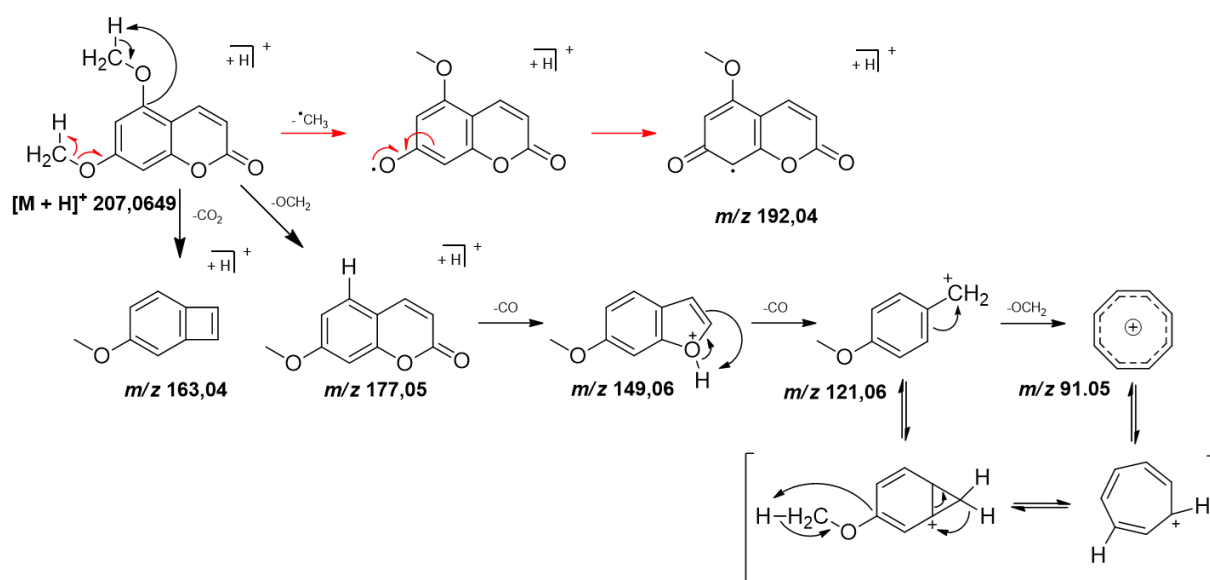


Figura 1.41. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o citropteno $[M + H]^+$ 207,0649.

Após o tratamento dos dados e plotagem do gráfico utilizando o pico em MS de m/z 207,0649 e $R_t = 7,90$ min referente aos tratamentos RPS, RPI, RdPS e RdPI, é possível observar que não há diferença estatisticamente significativa a 95% de confiança aplicando o teste t pareado em par de médias entre raíz de plantas sadias e infectadas e entre radículas de plantas sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

A única diferença estatisticamente significativa observada é que há uma diferença na produção e acumulação de citropteno entre raízes e radículas de citros. A quantidade da substância é muito maior nas radículas frente as raízes, levando a inferir que os genes responsáveis pela biossíntese desta podem ter uma maior expressão gênica nos tecidos das radículas. Portanto podemos constatar que todas as modificações estruturais do esqueleto cumarínico observadas até aqui, ocorrem majoritariamente nas radículas, também chamadas de raízes secundárias. É importante ressaltar que o citropteno não foi detectado nas raízes de plântulas cultivadas *in vitro*.

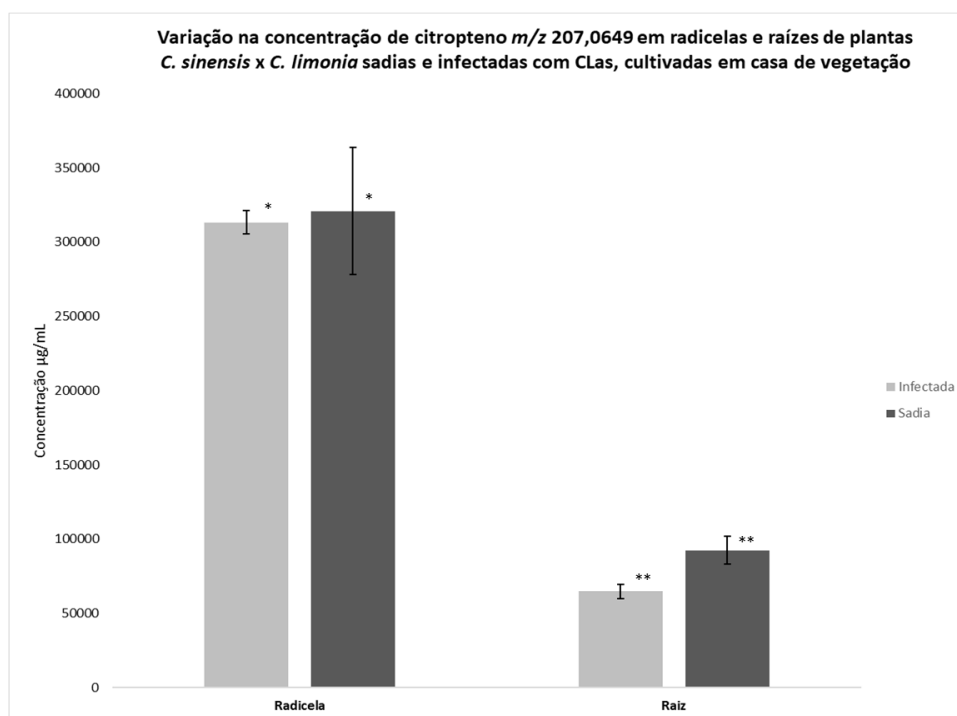


Figura 1.42. Variação na concentração relativa de citropteno em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.5. Anotação para esquimina

Após o tratamento dos dados de espectrometria de massas em MS e MS/MS e a construção da rede molecular via GNPS em modo positivo de ionização, o nodo de $[M + H]^+$ 325,0920, foi notado como sendo o glicosídeo de umbeliferona, esquimina com fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_8$, apresentando um erro de -0,92 ppm. O pico referente a esquimina de íon precursor $[C_{15}H_{17}O_8]^+$ obtido após o processamento e deconvolução espectral em MS está demonstrado na Figura 1.43. O metabólito foi anotado a partir do match espectral com as bibliotecas espectrais utilizadas, pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente à esquimina é encontrado no cluster da xantiletina e seselina e pode ser visualizado na Figura 1.22.

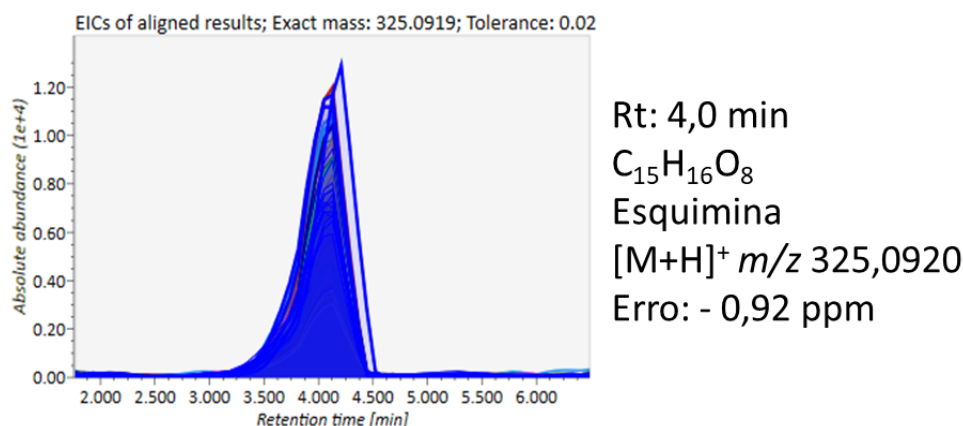


Figura 1.43. Sinal analítico em MS referente a esquimina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 325,0920 e Rt= 4,0 min.

O espectro de massas MS/MS em energia de colisão de 18 e 20V referente a esquimina, está demonstrado na Figura 1.44. É possível observar que a partir do íon precursor uma perda de $[M + H - 162,0534 Da]^+$, levando ao íon base de m/z 163,0386 $[C_9H_7O_3]^+$, referente a perda do glicosídeo como demonstrado no mecanismo de fragmentação na Figura 1.45. A partir deste, é observado a formação do íon fragmento $[C_8H_7O_2]^+$ de m/z 135,0486 que corresponde a perda de CO do anel pirona, que é um padrão de fragmentação comumente esperada para cumarinas. Subsequentemente foi observado mais uma perda de CO que corresponde a - 27,99 Da, gerando o íon fragmento $[C_7H_7O]^+$ de m/z 107,0491 (Figura 1.44 e 1.45). A partir do íon base observa-se também a perda de CO_2 que

equivale a perda de massa de - 43,99 Da, gerando o íon fragmento de m/z 119,0487 $[C_8H_7O]^+$ (Figura 1.44).

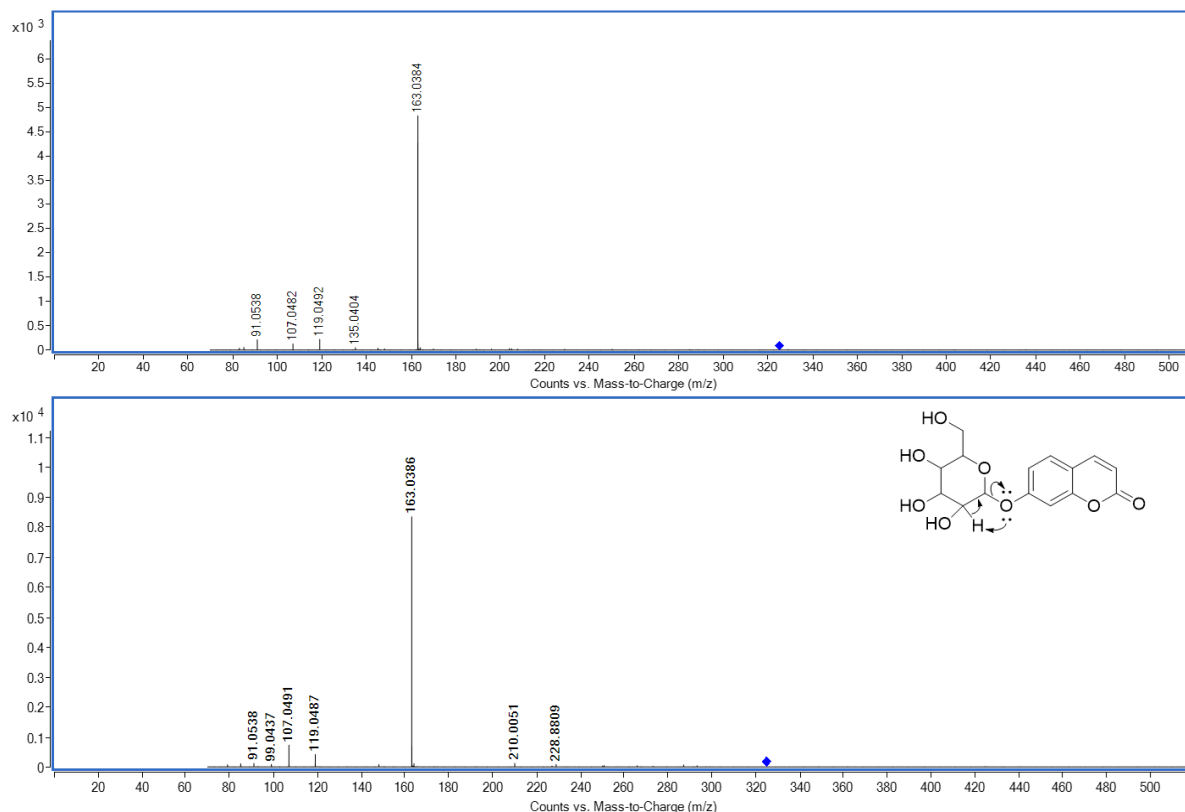


Figura 1.44. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da esquimina $[M+H]^+$ 325,0920 - Rt = 4,0 min em EC = 18 e 20V.

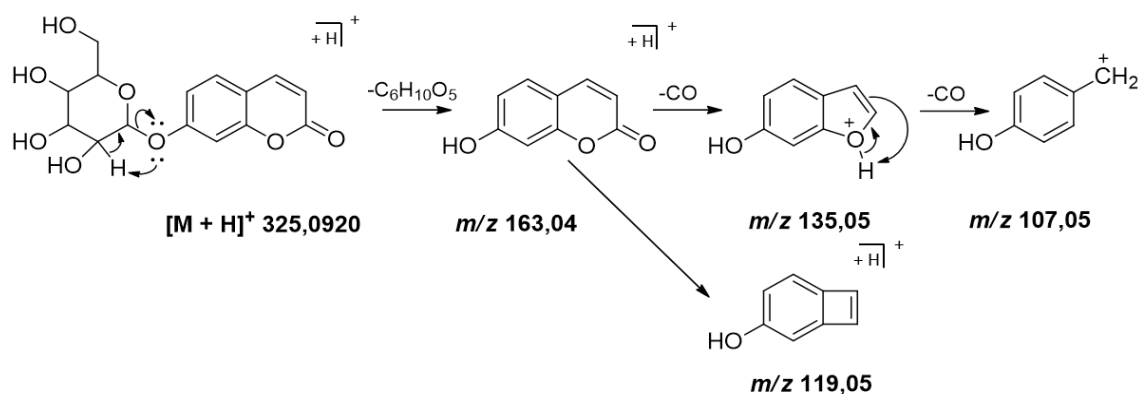


Figura 1.45. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a esquimina $[M+H]^+$ 325,0920.

Aplicando o tratamento de dados, após a tabulação dos mesmos, obtidos a partir da área do pico em MS com Rt = 4,0 min para as amostras de raízes e radículas de plantas sadias e infectadas com CLas cultivadas em casa de

vegetação e raiz de plântulas saudias e infectadas com CLas cultivadas *in vitro*, foi construído o gráfico representado na Figura 1.46. Foi empregado o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação e os tratamentos RPS_{iv} e RPI_{iv} referentes as raízes de plântulas saudias e infectadas com CLas cultivadas *in vitro*.

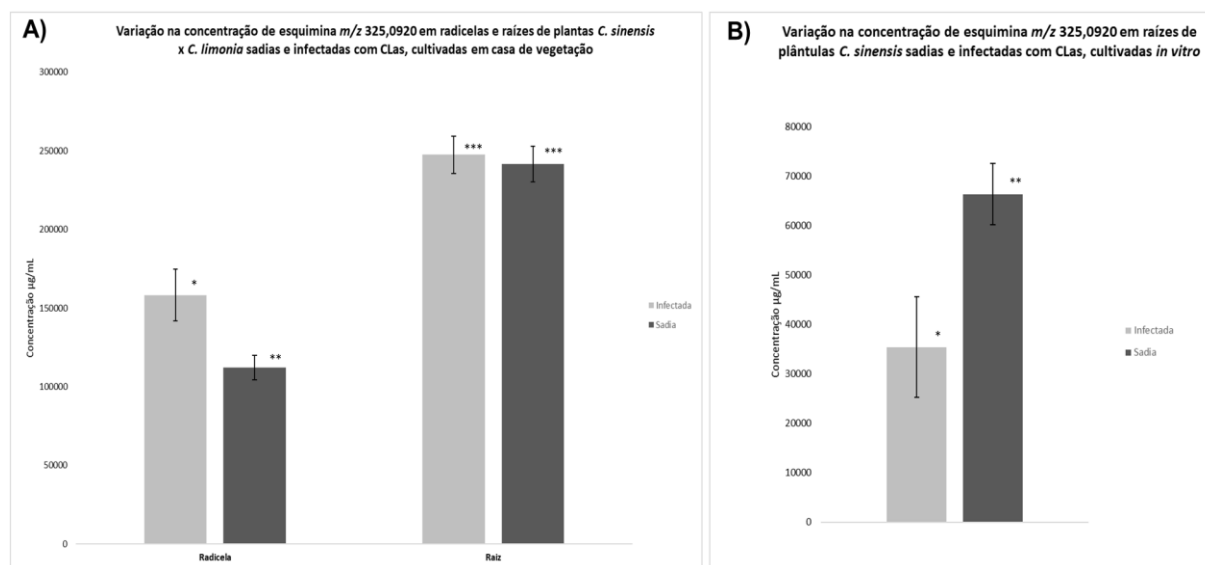


Figura 1.46. Variação na concentração relativa de esquimina em A) radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas *in vitro*.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RPI_{iv} e RPS_{iv}, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

Através da análise dos dados, foi possível concluir que há diferença significativa na quantidade de esquimina entre radículas de plantas saudias e infectadas com CLas, mas não há diferença significativa entre raízes de plantas saudias e infectadas com CLas. Portanto este metabólito é considerado responsivo frente a doença HLB nas radículas de plantas cítricas. Observa-se também uma diferença significativa com relação a produção desta substância entre os tecidos da planta, onde a quantidade de equimina é muito maior na raiz frente as radículas.

Outra observação é que nas plantas de *C. sinensis* cultivadas *in vitro* há diferença significativa na produção de esquimina entre raízes de plantas sadias e infectadas com CLAs, sendo esta substância um marcador da doença HLB em plantas envolvidas neste tratamento experimental.

1.4.5.6. Anotação para aurapteno

Após o processo de deconvolução espectral, normalização e alinhamento, foi observado um sinal no modo positivo de ionização com $R_t = 22,75$ min e $[M + H]^+$ 299,1642, sendo este referente a fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_3$, com íon molecular $[C_{19}H_{23}O_3]^+$. Este composto foi anotado como sendo o aurapteno que possui $[M + H]^+$ teórico de m/z 299,1647; apresentando um erro de -1,67 ppm.

O metabólito foi anotado a partir do match espectral com as bibliotecas espectrais utilizadas, pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente ao aurapteno encontra-se no cluster da xantiletina e seselina e contacta-se com o nodo 325,0920, identificado como esquimina (Figura 1.22). A diferença de massa entre os dois nodos é de 25,93 Da, indicando que houve a substituição da unidade glicosídica da esquimina por uma unidade geranil na posição 5, levando portanto, a identificação do aurapteno. A Figura 1.47 mostra o sinal analítico em MS para este composto.

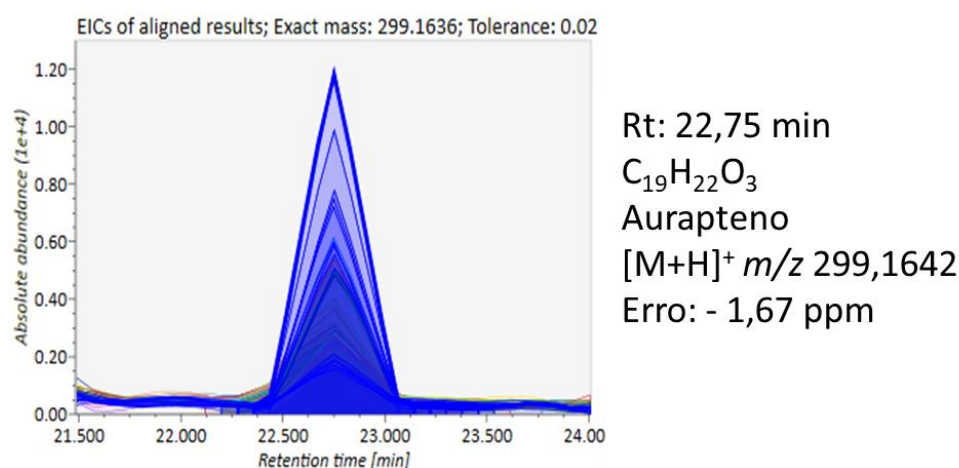


Figura 1.47. Sinal analítico em MS referente ao aurapteno após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 299,1642 e $R_t = 22,75$ min.

O espectro em MS/MS - ESI positivo em energia de colisão de 20 e 22V do aurapteno está demonstrado na Figura 1.48. É possível observar o íon precursor

de m/z 299,1642 e o íon base $[C_9H_7O_3]^+$ de m/z 163,0387 referente a perda de massa de - 136,12 Da que equivale a um grupo geranila como demonstrado no mecanismo de fragmentação de massa (Figura 1.49). Em seguida ocorre duas fragmentações sequenciais levando a perda de massa de - 55,99 Da que equivale a duas perdas de CO, levando ao íon produto $[C_7H_7O]^+$ de m/z 107,0482.

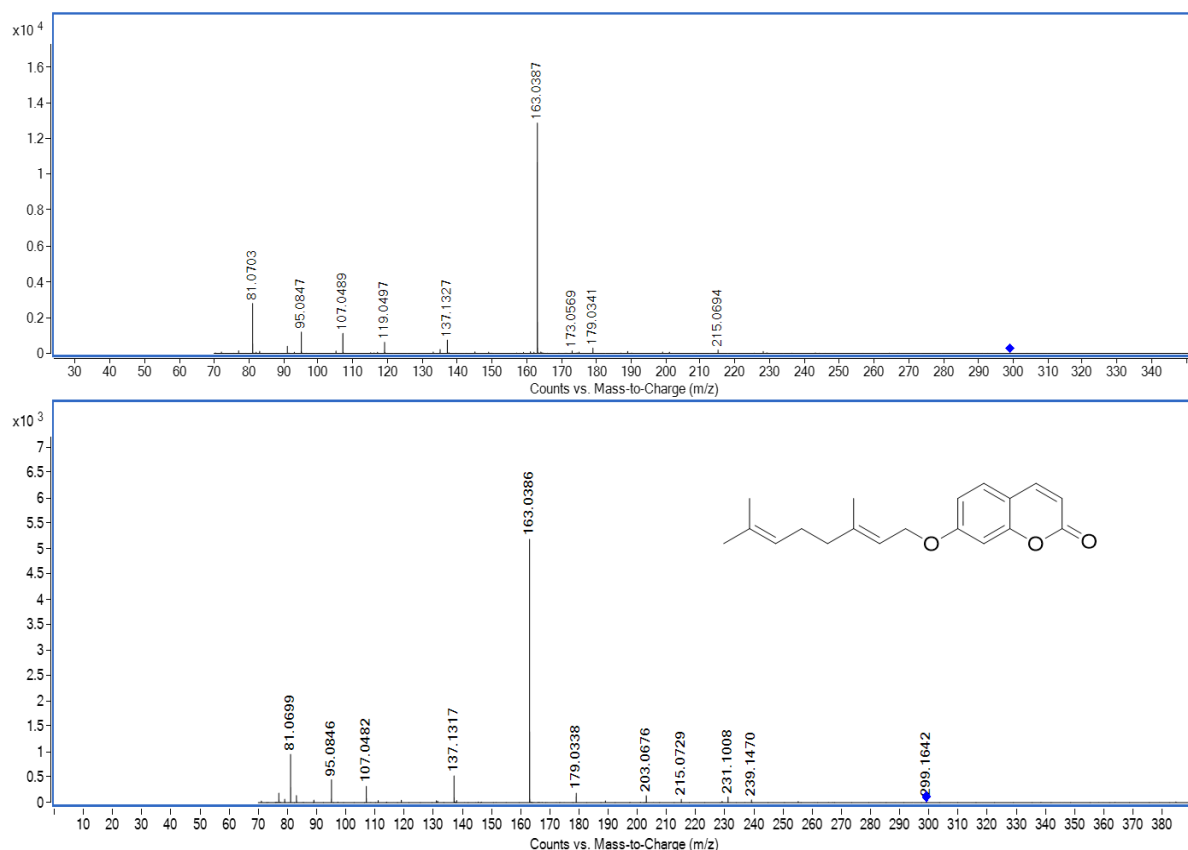


Figura 1.48. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do aurapteno $[M + H]^+$ 299,1642 - $R_t = 4,0$ min em EC = 20 e 22V.

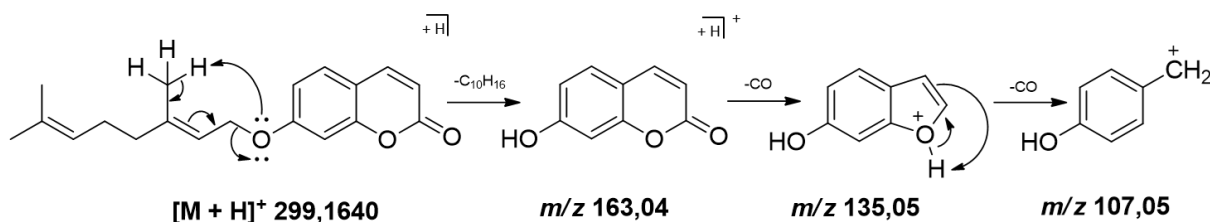


Figura 1.49. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o aurapteno $[M + H]^+$ de 299,1640.

Após o tratamento dos dados em MS e aplicação do teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS

e RdPI, referentes a raízes e radículas de plantas saudáveis e sintomáticas infectadas com CLAs cultivadas em casa de vegetação é possível concluir que não há diferença significativa na quantidade de aurapteno nem com relação a infecção de CLAs, nem na quantidade desta substância nos tecidos avaliados: raízes e radículas. Outra observação importante a se destacar é que o aurapteno não foi detectado nas plântulas cultivadas *in vitro*.

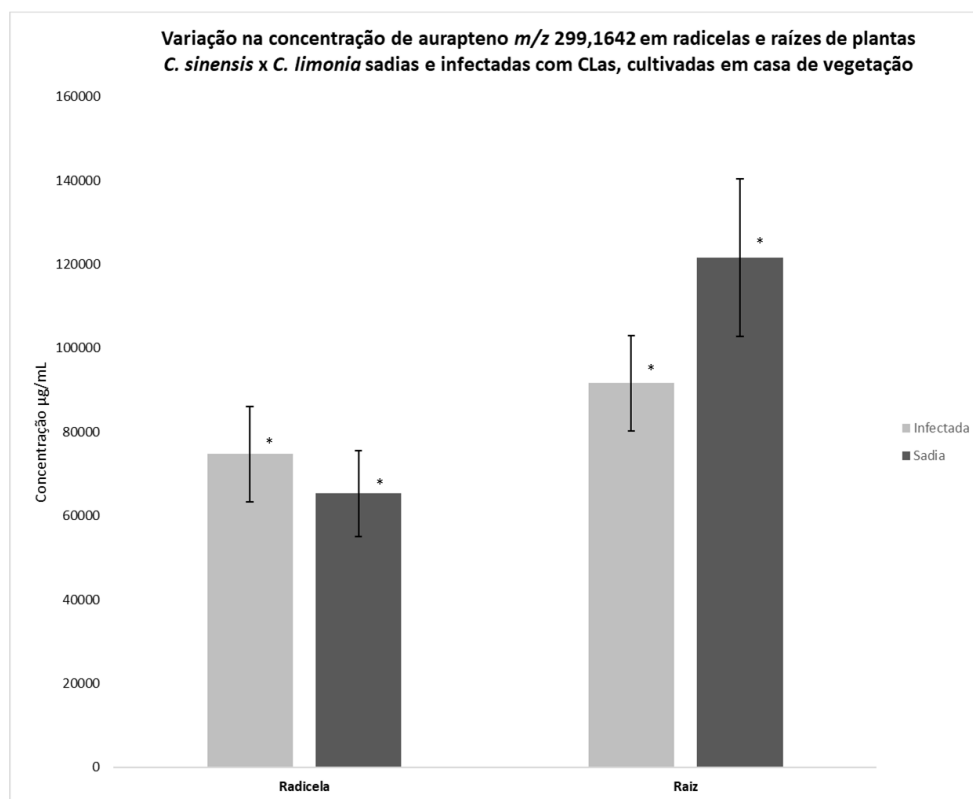


Figura 1.50. Variação na concentração relativa de aurapteno em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudáveis e infectadas com CLAs, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, a RdPS e RPS, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. As duas amostras, RdPI e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.7. Anotação para suberosina

Após os processamentos necessários, foi anotado o composto com $R_t = 18,69$ min de $[M + H]^+$ 245,1170, como a substância suberosina, que possui fórmula molecular de $C_{15}H_{16}O_3$ e um erro de -3,26 ppm. A suberosina foi anotada a partir do match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, de análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar – INCT Controle

Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente a suberosina está localizado no cluster da xantiletina e seselina, cluster no qual foram anotados exclusivamente piranocumarinas angulares e lineares, substituídas e seus intermediários (Figura 1.22). A Figura 1.51 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon precursor $[C_{15}H_{17}O_3]^+$.

A identificação da suberosina foi determinada e só foi possível, devido a abordagem FBMN, que auxilia na deconvolução espectral possibilitando a anotação correta para isômeros. Neste caso determinou-se que o sinal analítico em MS corresponde à suberosina, devido ao íon base de m/z 187,0387, que é o íon mais estável formado durante a fragmentação em MS/MS desta substância.

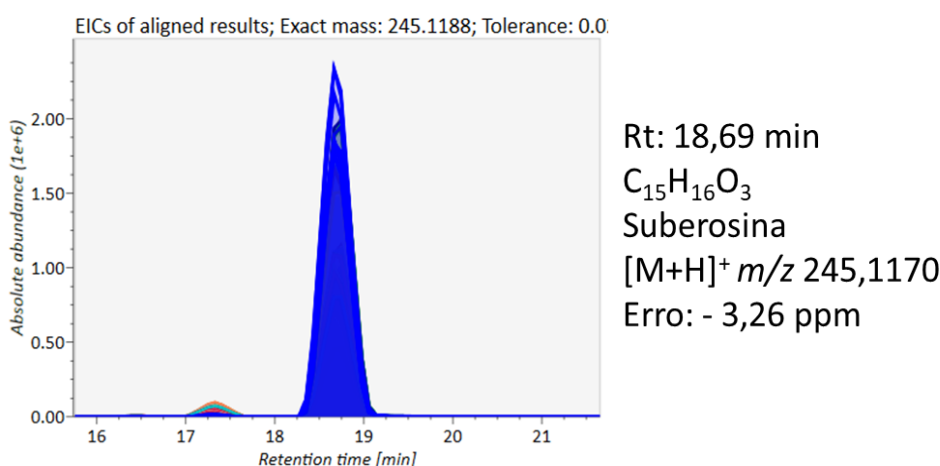


Figura 1.51. Sinal analítico em MS referente a suberosina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 245,1170 e $R_t = 18,69$ min.

O espectro de massas MS/MS em energia de colisão de 20 e 25V referente a suberosina, está demonstrado na Figura 1.52. É possível observar a partir do íon precursor, uma perda de $[M + H - 43.99 \text{ Da}]^+$, levando ao íon base de m/z 201,0540 $[C_{14}H_{17}O]^+$, característico da perda de CO_2 no anel pirona, como demonstrado na Figura 1.53.

Outro íon fragmento $[C_{14}H_{13}O_3]^+$ de m/z 229,0855, que também é formado a partir do íon precursor, com perda de -16,03 Da é observado e corresponde a um mecanismo de ciclização levando a formação do anel pirano e propiciando a perda de CH_4 . Subsequentemente ocorre a perda de massa de - 42,04 Da, gerando o íon fragmento $[C_{11}H_7O_3]^+$ de m/z 187,0387, que equivale a perda do substituinte C_3H_6 do anel furano. A partir deste íon fragmento, ocorre um perda de - 27,99 Da que equivale a monóxido de carbono (CO) do anel pirona, levando a

formação do íon fragmento $[C_{10}H_7O_2]^+$ de m/z 159,0436. Em seguida, ocorre mais uma perda de -27,99 que corresponde a unidade de CO, levando a formação do íon fragmento $[C_9H_7O]^+$ de m/z 131,0489, como mostrado no espectro de massas MS/MS na Figura 1.52 e no mecanismo de fragmentação de massa na Figura 1.53.

A partir do íon precursor também é observado um fragmento de $[M + H - 30,01 \text{ Da}]^+$ de m/z 177,05531 correspondente ao íon $[C_{10}H_9O_3]^+$ devido a perda de CH_2O na posição 7. A partir do íon precursor mais uma fragmentação ocorre levando ao íon fragmento $[C_{10}H_9O_3]^+$ de m/z 177,0644, devido a perda de -68,06 Da. Este último, após sofrer perdas sequenciais de duas unidades de CO e uma unidade de OCH_2 que corresponde a -86,00 Da e sofrer rearranjos, leva a formação do íon tropílio $[C_7H_7]^+$ de m/z 91.0542 (Figura 1.52 e 1.53).

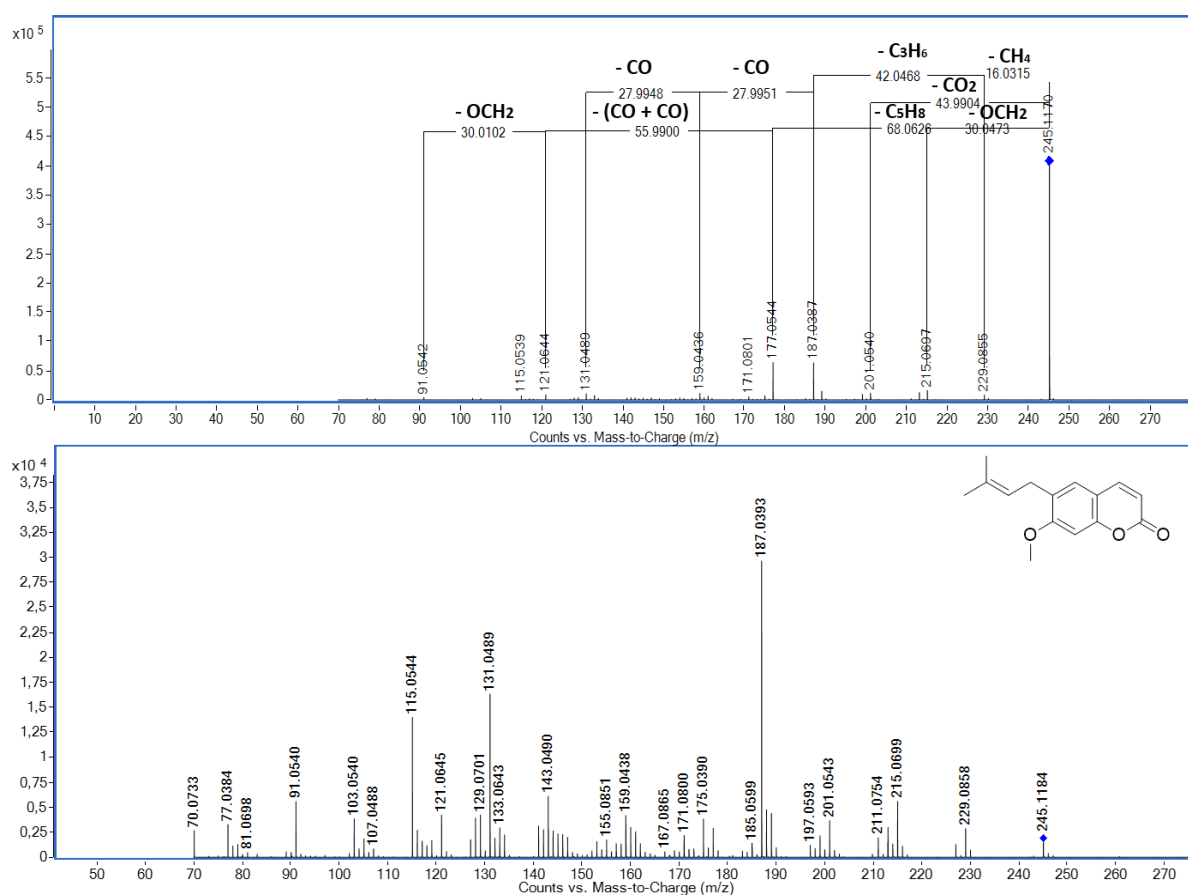


Figura 1.52. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da suberosina $[M + H]^+$ 245,1170 - R_t = 18,69 min em EC = 20 e 25V.

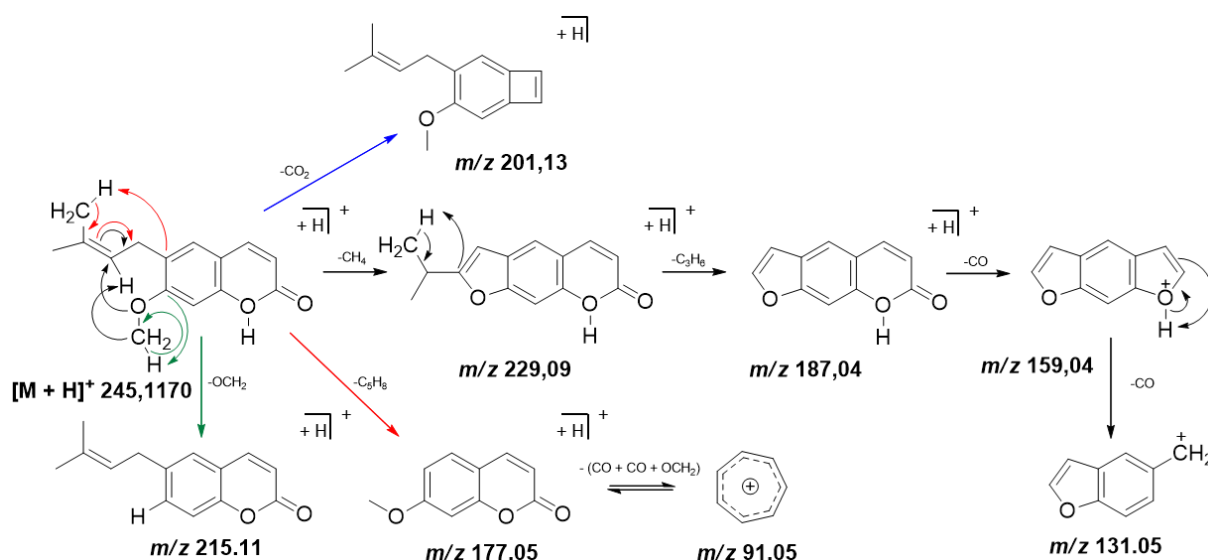


Figura 1.53. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a suberosina [M+H]⁺ de 245,1170.

Analisando os dados em MS referente a suberosina e empregando o teste t pareado em par de médias a um nível de significância de 95%, foram comparados os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. Foram também comparados os pares: RPS_{iv} e RPI_{iv} e raízes de plântulas saudas e infectadas cultivadas *in vitro* (Figura 1.54).

A partir da análise do gráfico (Figura 1.54) conclui-se que não há diferença entre raiz e radículas de plantas saudas frente à plantas infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação, nem entre raiz de plântulas saudas e infectadas cultivadas *in vitro*. Portanto a suberosina, um intermediário de piranocumarinas lineares, com uma metoxila na posição 7, não é um metabólito considerado como um marcador da doença HLB.

É possível observar que a única diferença estatisticamente significativa a um nível de 95%, é com relação a produção e acumulação deste metabólito entre os tecidos, raiz e radícula, de citros. Há uma maior quantidade de suberosina na raiz frente as radículas, sendo assim, podemos inferir que os genes responsáveis pela biossíntese de precursores de piranocumarinas lineares podem estar sendo mais expressos na raiz principal que nas raízes secundárias (Figura 1.54).

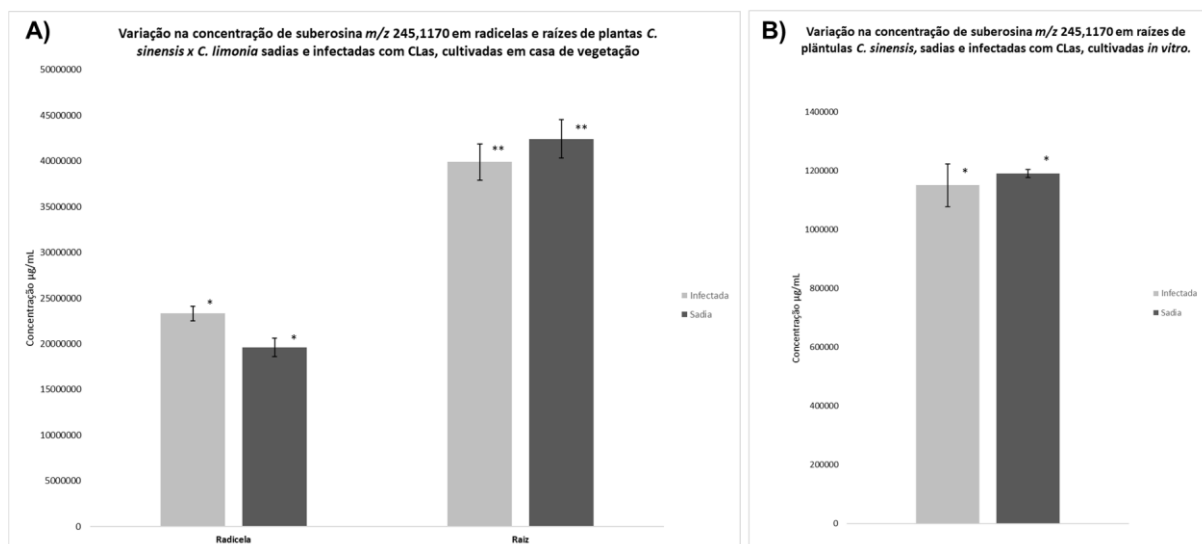


Figura 1. 54. Variação na concentração relativa de suberosina em A) radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas *in vitro*.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RPI_{iv} e RPS_{iv}, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

1.4.5.8. Anotação para ostol

A partir do processo de deconvolução espectral, aplicando as ferramentas necessárias para molecular networking, foi possível atribuir que íon $[M + H]^+$ 245,1166 e com $R_t = 17,33$ min corresponde ao ostol. O ostol, possui fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_3$ e uma massa molecular teórica de 245,1178 que corresponde ao íon precursor $[C_{15}H_{16}O_3]^+$, portanto para esta análise há um erro de massa de -4,90 ppm, que é aceitável, para anotação de um metabólito.

O nodo referente ao ostol está localizado no cluster do ostol e da clausarina (Figura 1.23), e a diferenciação deste metabólito (que é uma cumarina angular, prenilada em C-8 e metoxilada em C-7) do seu isômero suberosina que é uma cumarina linear, prenilada em C-6 e metoxilada em C-7, só foi possível devido o processamento aplicado, utilizando a abordagem FBMN. A diferença entre os dois isômeros está na posição da prenila, na suberosina ela se encontra em C-6 e no ostol em C-8 e isto leva a propriedades físicas e químicas distintas, onde observa-se que o ostol é uma molécula mais polar. A Figura 1.55 mostra o sinal analítico em MS para este composto.

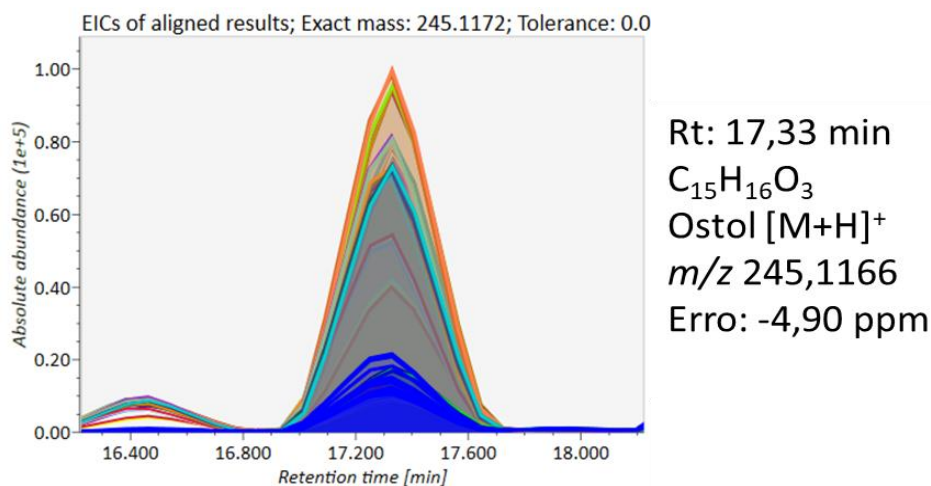


Figura 1.55. Sinal analítico em MS referente ao ostol após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, [M + H]⁺ 245,1166 e Rt= 17,33 min.

A caracterização do ostol foi confirmada baseando-se no match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, no espectro de massas em MS/MS juntamente com o mecanismo de fragmentação da molécula (Figura 1.56 e 1.57). As fragmentações por ESI no modo positivo de ionização apresentou poucos íons produtos similares entre os dois isômeros (suberosina e ostol). Analisando os perfis de fragmentação para ambos os metabólitos, observa-se que o íon m/z 203,0716 característico apenas para o derivado angular. A proposta mecanística demonstrada na Figura 1.57 justifica a presença deste íon fragmento para o ostol.

Outra observação é que o íon base de m/z 189,0548 e m/z 131,0480 têm se formado mais comumente nas cumarinas 8-C prenil substituídas (angulares), levando a inferir que a grande intensidade desses íons deve-se estabilidade dos fragmentos, devido a conjugação do sistema aromático formado, logo ocorrem sucessivas fragmentações até a formação do íon cíclico de 7 membros conjugado ao anel furânico (Figura 1.57).

A partir do íon molecular observa-se a perda de [M + H - 16,03 Da]⁺ que corresponde a perda de CH₄, levando a formação do íon fragmento [C₁₄H₁₃O₃]⁺ de m/z 229,0535. Em seguida, através de uma Retro-Diels-Alder, que promove a abertura do anel pirano, ocorre a perda de - 40,03 Da que corresponde a perda de C₃H₄ levando a formação do íon fragmento [C₁₁H₉O₃]⁺ de m/z 189,0548. Posteriormente uma perda de -30,01 Da que corresponde a unidade de CH₂O, propicia a formação do íon fragmento [C₁₀H₇O₂]⁺ de m/z 159,0446 que em seguida

através de uma perda de CO no anel pirona que equivale a – 27,99 Da, leva a formação do íon tropílio de m/z 131,0480.

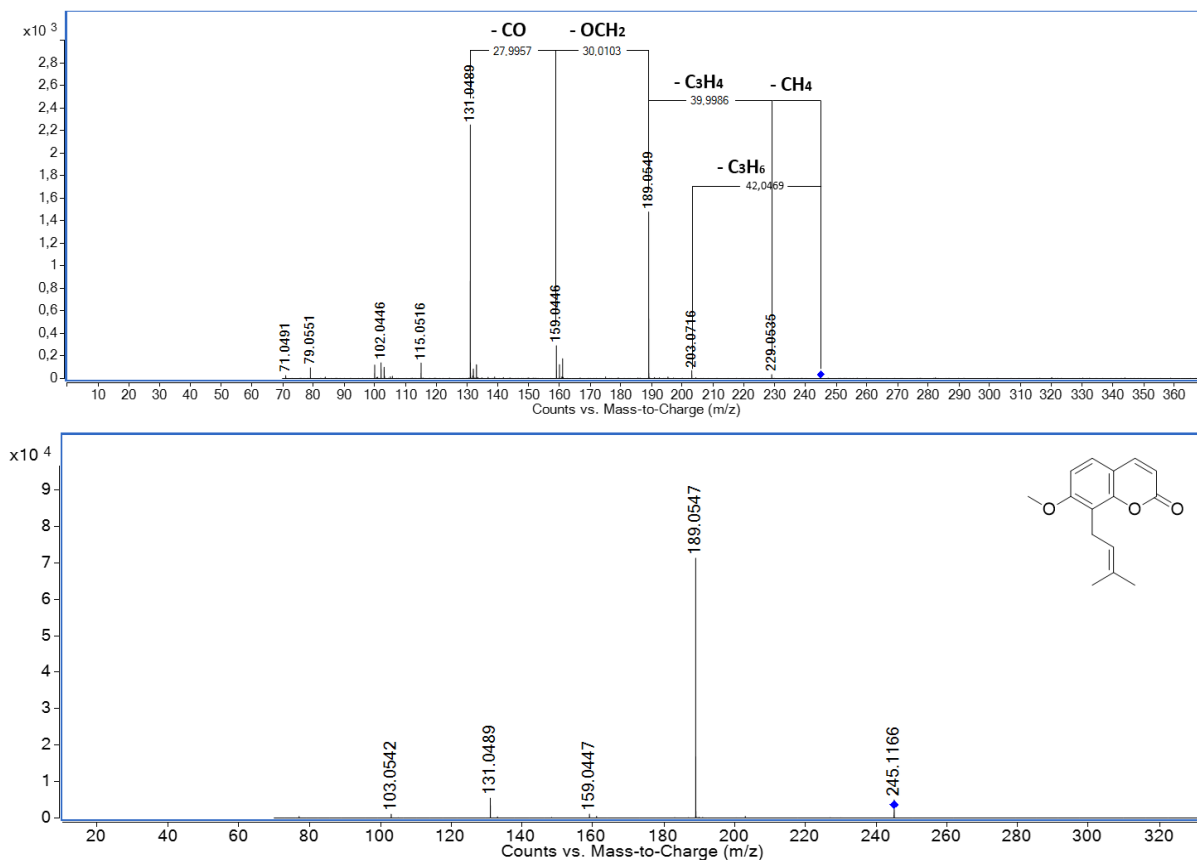


Figura 1.56. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do ostol $[M+H]^+$ 245,1166 - $R_t = 17,33$ min em EC = 20 e 25V.

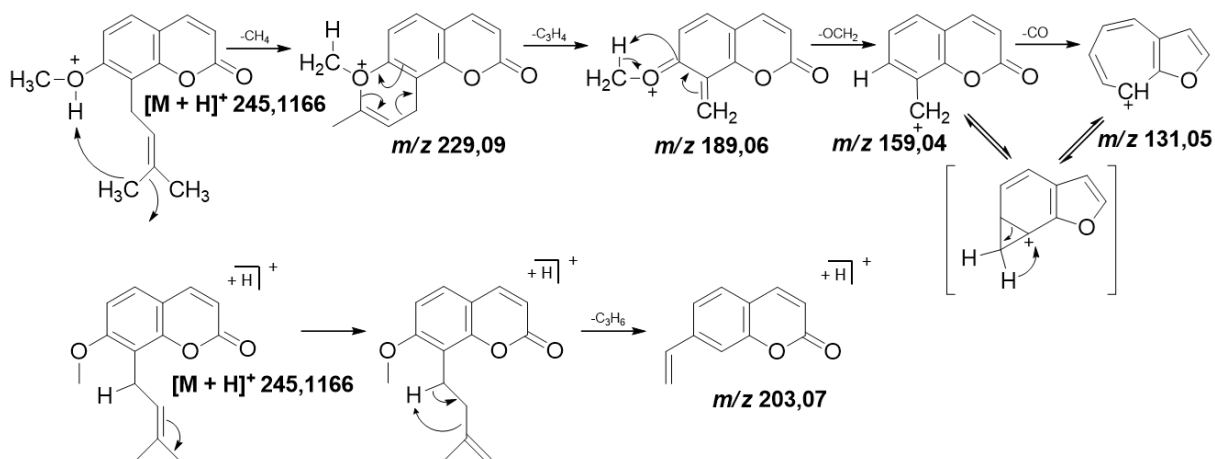


Figura 1.57. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o ostol $[M+H]^+$ 245,1166.

A partir do íon precursor, também é possível observar a perda $[M + H - 42,05 \text{ Da}]^+$ que equivale a perda da unidade C₃H₆, promovida por um rearranjo da

unidade prenila na posição C-8, com o oxigênio da posição C-1, originando o íon $[C_{12}H_{11}O_3]^+$ de m/z 203,0716 (Figura 1.56 e 1.57). É importante ressaltar que a formação desse íon é propiciada devido a posição da prenila em C-8, quando a prenila está em C-6 o rearranjo seguido da perda de C_3H_6 não é possível.

Após a caracterização do ostol por LC-MS utilizando a plataforma GNPS e o tratamento de dados pelo software MS-DIAL, foi determinada a área referente ao pico em MS com $R_t = 17,33$ min para as amostras de raízes e radículas de plantas saudas e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. O ostol não foi detectado nas plântulas cultivadas *in vitro*. Estes dados foram tabulados e plotados, como mostra a Figura 1.58. Foi também empregado o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação.

Através da análise do gráfico mostrado na Figura 1.58 conclui-se que há diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança, na acumulação e quantidade deste metabólito com relação aos tecidos da planta. Nas radículas de citros, a produção deste é aproximadamente 5 vezes maior quando comparado às raízes. Dentro deste cenário, é possível correlacionar que a produção de derivados de cumarinas angulares tem maior produção nas radículas que nas raízes, sendo assim, podemos inferir que o gene responsável pela prenilação em C-8 possui maior expressão e acumulação nas radículas da planta.

Além disso observa-se que, comparando radículas saudas e infectadas com CLas, a produção de ostol é estatisticamente significativa a um nível de 95%. A quantidade deste metabólito é muito maior em radículas de plantas contaminadas com a bactéria causadora do greening. Sendo assim, este derivado angular é um marcador da doença HLB em radículas de plantas de citros. Estes dados reforçam a proposta de que a presença do patógeno induz a inibição da rota de prenilação em C-6 em favor daquela em C-8 nas radículas de citros. Com relação a quantidade de ostol nas raízes de plantas saudas e infectadas com CLas, não há diferença na produção deste, a acumulação neste tecido equipara-se comparando os tratamentos avaliados (Figura 1.58).

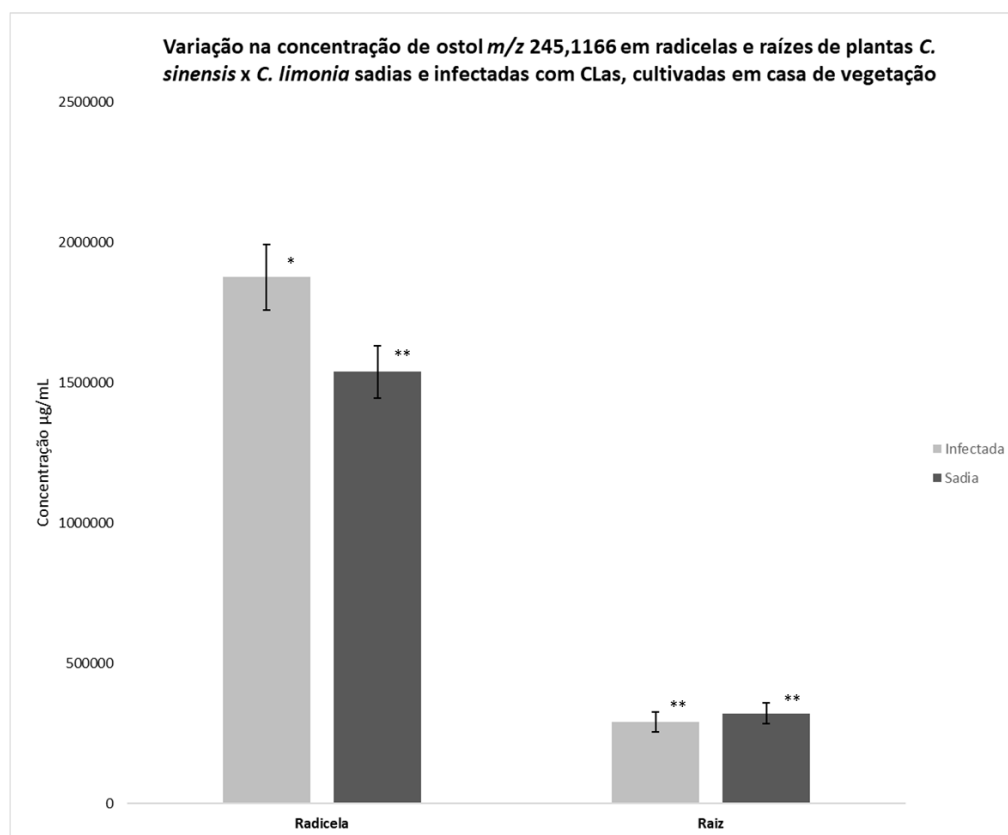


Figura 1.58. Variação na concentração relativa de ostol em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLAs, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.9. Anotação para suberenol

Ao analisar a rede molecular obtida após o tratamento dos dados e o processo de deconvolução espectral é possível observar o nodo referente à $[M + H]^+$ 261,1123 com $R_t = 9,50$, localizado no cluster da xantiletina e seselina (Figura 1.22). Após o match espectral com as bibliotecas utilizadas e análises preliminares do análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar - INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação este nodo foi anotado para o suberenol, apresentando um erro de massa de -1,53 ppm. O nodo correspondente ao suberenol conecta-se com o nodo de $[M + H]^+$ 245,1170; identificado como suberosina (Figura 1.21). A diferença de massa entre os dois nodos é de 15,99 Da, indicando que houve um incremento de um átomo de

oxigênio, sendo assim concluiu-se que houve uma substituição do H por hidroxila (-OH) na unidade prenila, levando portanto, a identificação do suberenol. A Figura 1.59 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{15}H_{17}O_4]^+$.

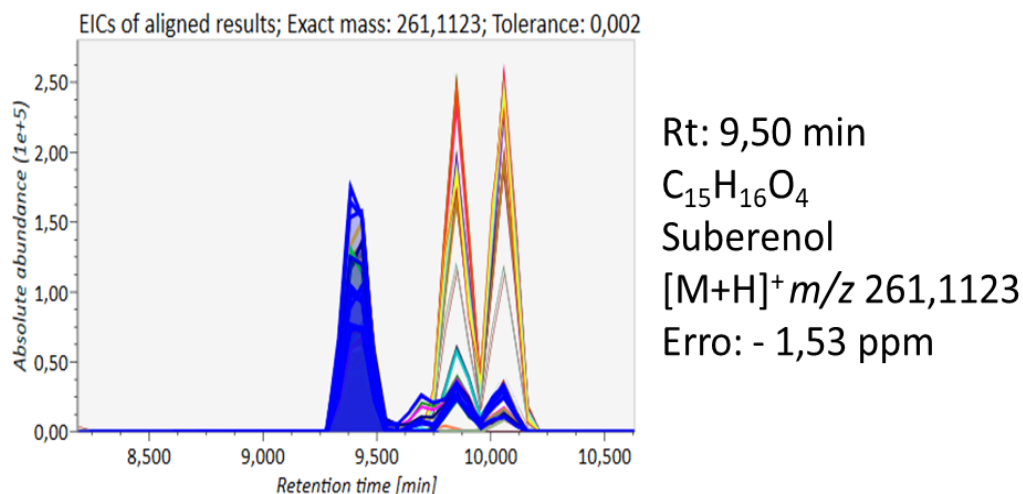


Figura 1.59. Sinal analítico em MS referente ao ostenol após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 261,1123 e $R_t = 9,50$ min.

O espectro de massas em MS/MS, mostra o íon base de m/z 203,0695 gerado a partir do íon precursor. A perda de massa de - 58,02 Da, corresponde a perda neutra de etanona $CO(CH_3)_2$, a partir de um rearranjo de hidrogênio envolvendo a unidade prenila na posição C-6, conforme mostrado na Figura 1.60 e no mecanismo de fragmentação proposto na Figura 1.61. Nas estruturas encontradas no banco de dados e em análises posteriores realizadas pelo CBIP - Grupo de Produtos Naturais da UFSCar, a única que permite essa perda é o suberenol, gerando o íon base $[C_{12}H_{11}O_3]^+$.

É possível também observar, outras duas perdas a partir do íon precursor: uma que corresponde a $[M + H - 14,99 \text{ Da}]^{*+}$ e outra de $[M + H - 16,01 \text{ Da}]^+$. Estas fragmentações observadas, correspondem a perda radicalar de $\cdot CH_3$ e a perda de CH_4 respectivamente, levando a formação dos íons fragmentos $[C_{14}H_{14}O_4]^+$ de m/z 246,0877 e $[C_{14}H_{14}O_4]^+$ de m/z 245,0796. O mecanismo de fragmentação envolvendo a perda de CH_4 é promovida por um rearranjo seguido de uma etapa de ciclização, envolvendo a unidade prenila da posição 6 e a metoxila na posição 7, que propicia a formação do anel pirano, conforme mostrado na Figura 1.61.

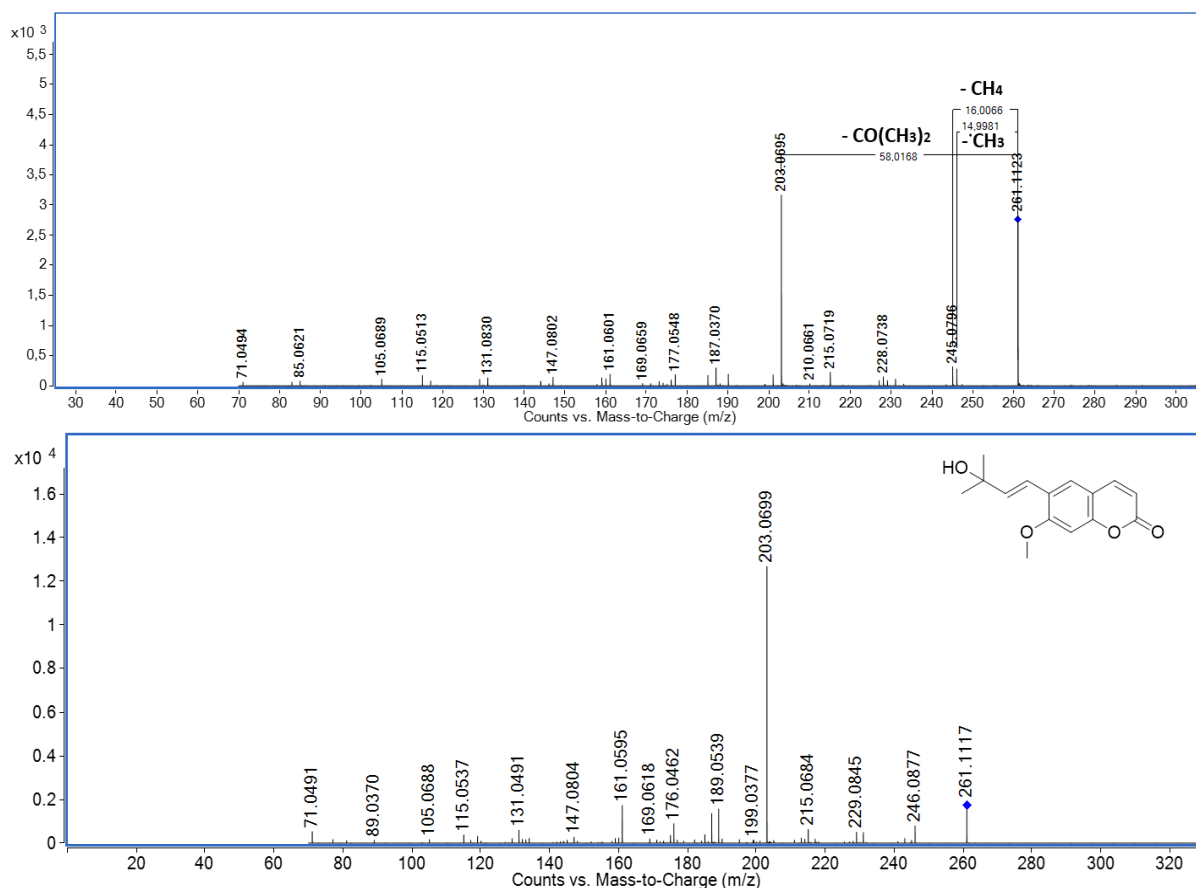


Figura 1.60. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do suberenol $[M+H]^+$ 261,1123 - Rt = 9,50 min em EC = 20 e 25V.

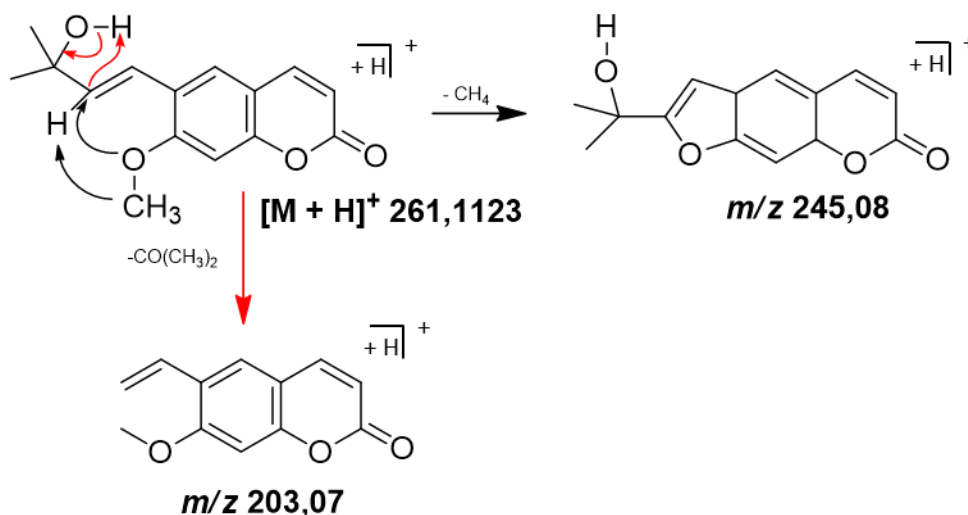


Figura 1.61. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o suberenol $[M+H]^+$ 261,1123.

O gráfico mostrado na Figura 1.62, mostra a área em MS referente ao íon de m/z 261,1123 de Rt = 9,50 min, para os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e

RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. Os dados mostram uma maior área com diferença estatisticamente significativa aplicando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95% para as raízes frente as radículas, onde a quantidade deste metabólito nas raízes é aproximadamente 2 vezes maior frente as radículas. Nas análises realizadas, é possível observar uma maior tendência da produção e acumulação de cumarinas e seus derivados lineares nas raízes, inferindo que a enzima responsável pela prenilação do esqueleto cumarínico, pode estar sendo mais expressa neste tecido.

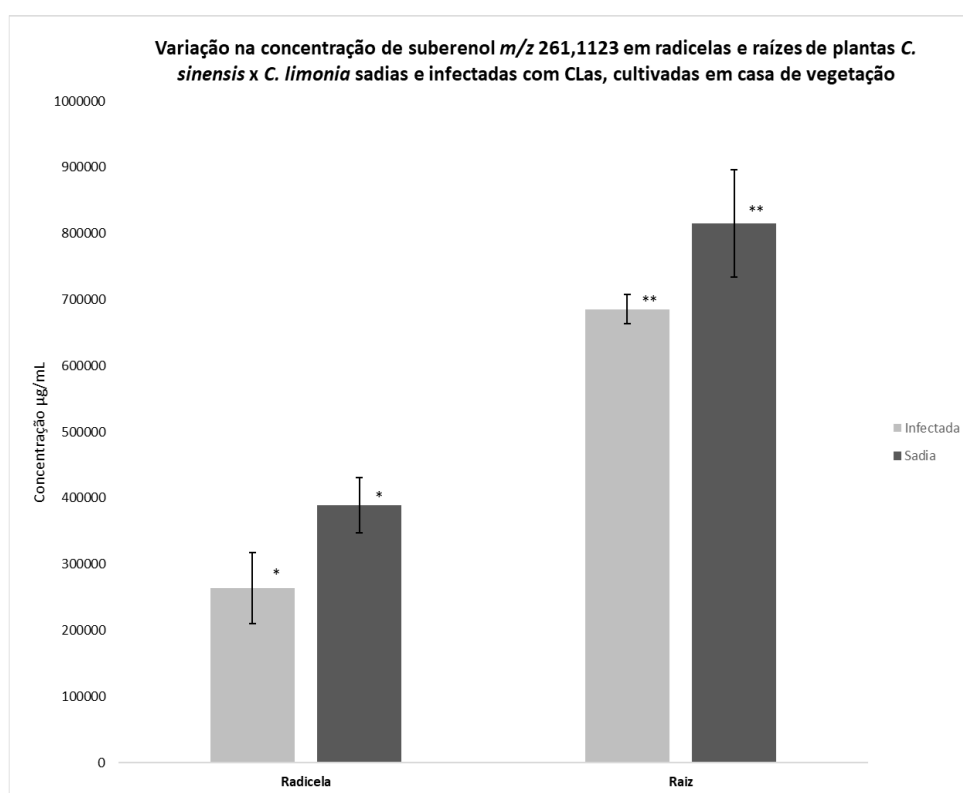


Figura 1. 62. Variação na concentração relativa de suberenol em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

Com relação a comparação dos tratamentos referentes às radículas sadias e infectadas com CLas e referente às raízes sadias e infectadas com CLas, não há diferença estatisticamente significativa (Figura 1.62). Mais uma vez, este

resultado comprova que a presença do patógeno inibe a preniação em C-6, para favorecer aquela em C-8. Outra observação importante, é que este metabólito não foi identificado nas plântulas cultivadas *in vitro*.

1.4.5.10 Anotação para xantiletina

Após os processamentos necessários, foi anotado como xantiletina o composto de $R_t = 4,38$ min e de $[M + H]^+ 229,0865$. A xantiletina possui fórmula molecular de $C_{14}H_{12}O_3$ e massa teórica de 229,0862, apresentando para esta análise um erro de 0,00 ppm. Este metabólito foi anotado a partir do match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, de análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar – INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação em MS/MS e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente a xantiletina está localizado no cluster da xantiletina e seselina, cluster no qual foram anotados exclusivamente piranocumarinas angulares e lineares, substituídas e seus intermediários (Figura 1.22). A Figura 1.51 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{15}H_{17}O_3]^+$.

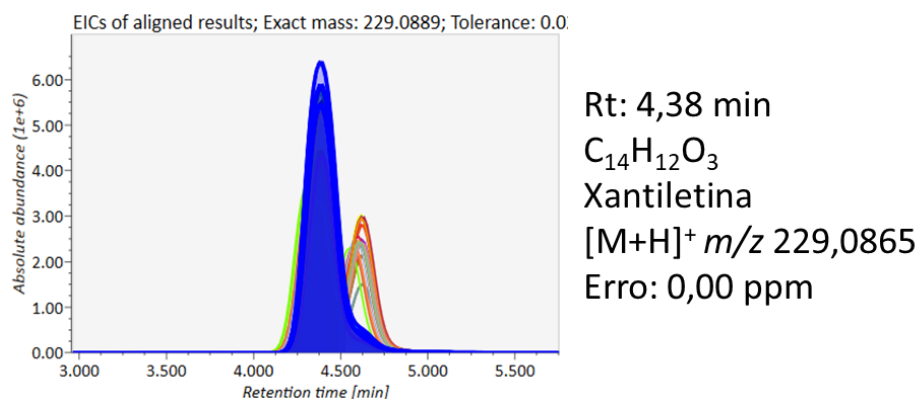


Figura 1.63. Sinal analítico em MS referente a xantiletina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+ 229,0865$ e $R_t = 4,38$ min.

A identificação da xantiletina foi possível devido a utilização da abordagem FBMN, que auxilia na deconvolução espectral possibilitando a anotação correta para isômeros e foi confirmada pela injeção de padrão da substância. Neste caso determinou-se que este sinal analítico corresponde à xantiletina, devido ao íon base de $m/z 213,0547$, que é o íon característico e mais abundante formado durante a fragmentação em MS/MS desta substância.

O espectro em MS/MS para a xantiletina em energia de colisão de 20 e 25V, pode ser observado na Figura 1.64. A partir do íon precursor ocorre a perda de massa de -15,03 Da, que gera o íon base $[C_{13}H_9O_3]^+$ de m/z 213,0547, que corresponde a perda de CH_4 . Em seguida uma perda de -27,99 Da propicia a formação do íon fragmento $[C_{12}H_9O_2]^+$ de m/z 185,0601, que é referente a perda de CO no anel pirona. Posteriormente uma perda de CO e de C_2H_2 no anel pirano que corresponde a - 54,01 Da. Esta fragmentação envolve a abertura do anel pirano para a perda de CO, levando a formação de um anel de 5 membros. Concomitantemente ocorre um rearranjo para a formação de um íon cíclico de 7 membros condensado ao anel furano, altamente estável, favorecendo a perda de C_2H_2 para formação do íon $[C_9H_7O]^+$ de m/z 131,0489, conforme mostrado no espectro em MS/MS na Figura 1.64 e no mecanismo de fragmentação proposto na Figura 1.65.

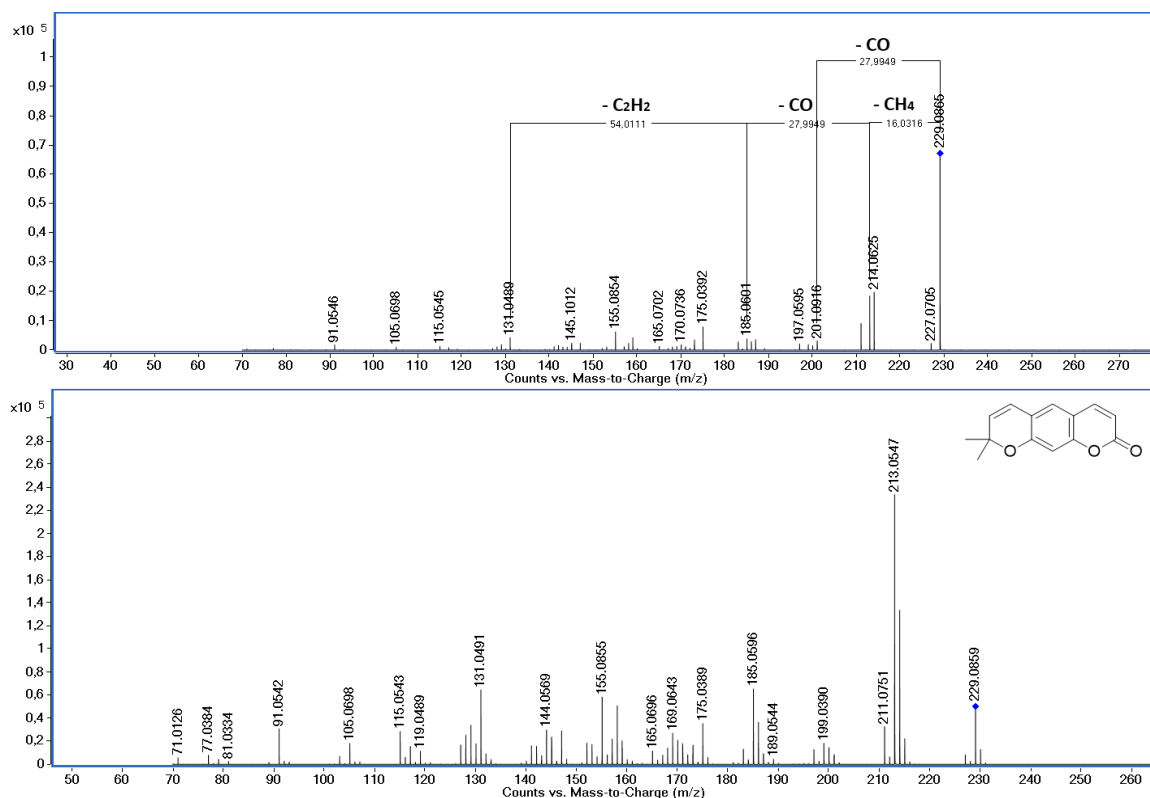


Figura 1.64. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da xantiletina $[M + H]^+$ 229,0865 - Rt = 4,38 min em EC = 20 e 25V.

A partir do íon precursor é possível observar que também ocorre a formação do íon $[C_{12}H_9O]^+$ de m/z 169,0643 que equivale a uma perda inicial de - 16,06 Da, seguido da perda de -43,99 Da. De acordo com o mecanismo de fragmentação proposto na Figura 1.65 podemos observar que a formação deste íon

fragmento ocorre por uma perda de CH_4 e em seguida a perda de CO_2 no anel pirona, sendo esta característica em esqueletos cumarínicos. A partir do íon precursor, também é observado a formação do íon fragmento $[\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$ de m/z 201,0916 que corresponde a perda de massa de -27,99 Da. Conforme já discutido anteriormente, esta perda de massa corresponde a unidade de CO no anel pirona, que já é esperada para esqueletos cumarínicos (Figura 1.65).

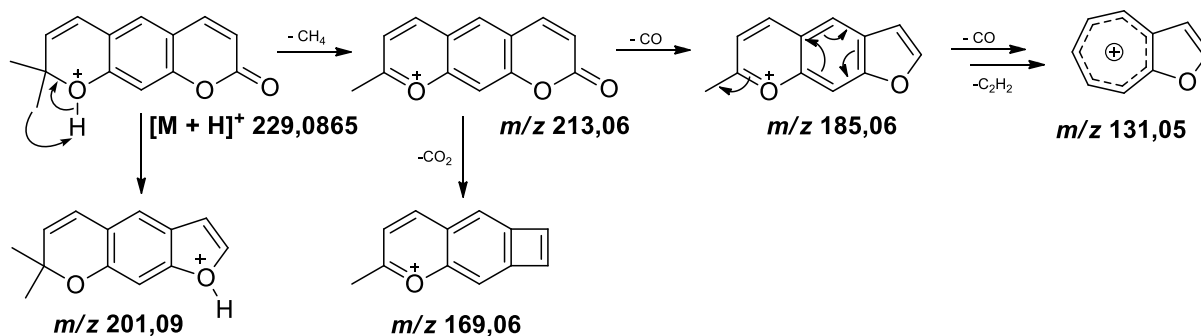


Figura 1.65. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a xantiletina $[\text{M} + \text{H}]^+$ 229,0865.

O gráfico mostrado na Figura 1.66, mostra a área em MS referente ao íon de m/z 229,0865 com $R_t = 4,38$ min e o resultado do teste t pareado em par de médias a 95% de confiança, para os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. O gráfico também mostra os resultados obtidos para os tratamentos: RPSiv e RPIiv e raízes de plântulas sadias e infectadas cultivadas *in vitro*. Os dados mostram uma maior quantidade de xantiletina nas raízes frente as radículas, com diferença estatisticamente significativa aplicando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95%. Através das análises realizadas, mais uma vez é possível observar uma maior tendência da produção e acumulação de cumarinas e seu derivados lineares nas raízes, inferindo que a enzima responsável pela prenilação do esqueleto cumarínico em C-6, pode estar sendo mais expressa neste tecido.

Comparando raízes e radículas de plantas sadias e infectadas com CLas, é possível observar que há uma maior quantidade de xantiletina nos tratamentos de plantas sadias, frente às plantas na presença do patógeno, porém não há uma diferença estatisticamente significativa aplicando o teste t pareado em par de médias a 95% de confiança. Sendo assim este metabólito não é considerado

um marcador para a doença. Mas já ao analisarmos as plantas cultivadas *in vitro*, há uma produção muito maior deste metabólito nas plantas saudias, frente as plantas infectadas, com diferença estatisticamente significativa. Dentro deste contexto, podemos inferir que há uma tendência na planta em inibir a prenilação em C-6 e posterior ciclização que leva a esta piranocumarina (Figura 1.66).

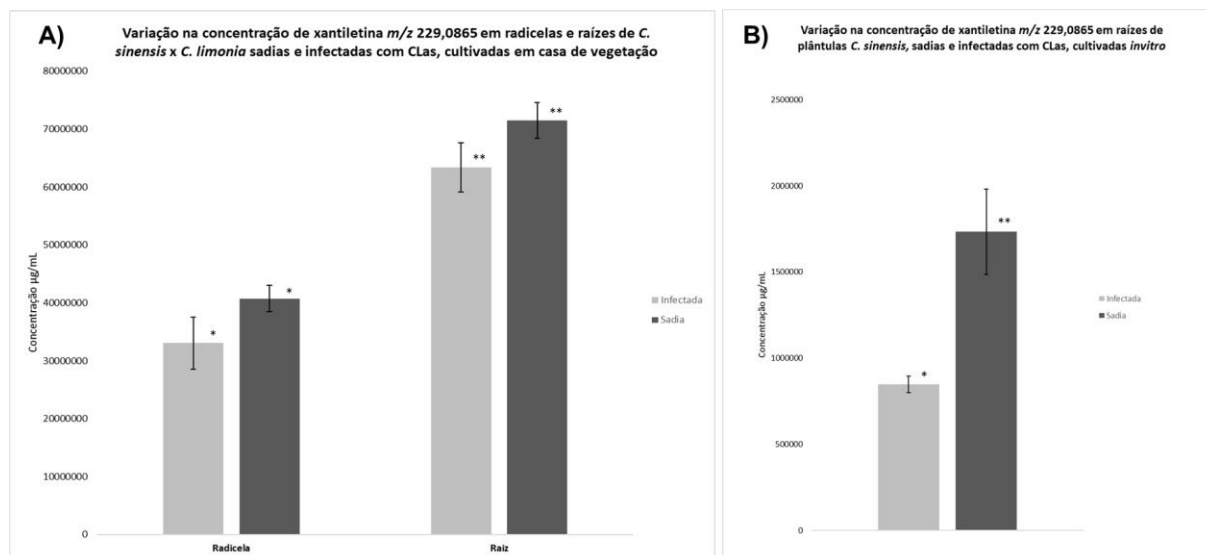


Figura 1.66. Variação na concentração relativa de xantiletina em A) radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLAs, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLAs, cultivadas *in vitro*.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RPI_{iv} e RPS_{iv}, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado

1.4.5.11 Anotação para seselina

Após o processo de deconvolução espectral, normalização e alinhamento, foi possível observar um sinal com $R_t = 4,61$ min e $[M + H]^+ 229,0862$ (Figura 1.67), sendo este referente a fórmula molecular $C_9H_6O_3$, com íon precursor $[C_9H_7O_3]^+$. Este composto foi anotado como seselina, com $[M + H]^+$ teórico de 229,0865 apresentando um erro de -1,31 ppm. A Figura 1.67 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon precursor $[C_{14}H_{13}O_3]^+$.

O nodo referente a seselina está localizado no cluster da xantiletina e seselina e conceta-se com o nodo da xantiletina de $[M + H]^+ 229,0865$ (Figura 1.22). A diferenciação deste metabólito, que é uma piranocumarina angular prenilada em

C-8, do seu isômero xantiletina, que é uma piranocumarina linear prenilada em C-6, só foi possível devido o processamento aplicado, utilizando a abordagem FBMN e a injeção de padrão.

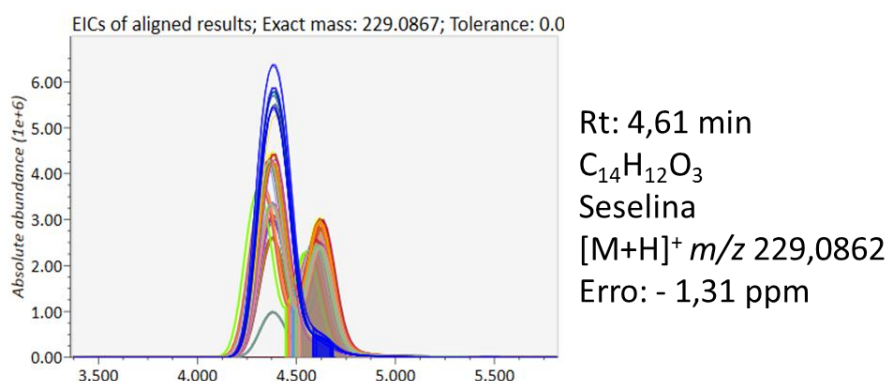


Figura 1.67. Sinal analítico em MS referente a seselina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 229,0862 e $R_t = 4,61$ min.

Determinou-se que este sinal analítico corresponde à seselina, devido ao íon base de m/z 175,0387, que é o íon característico e mais abundante formado durante a fragmentação em MS/MS desta substância. O espectro em MS/MS para a xantiletina em energia de colisão de 20 e 25V, pode ser observado na Figura 1.68.

A partir do íon precursor ocorre a perda de massa de -54,04 Da, que gera o íon base $[C_{10}H_7O_3]^+$ de m/z 175,0387, que corresponde a perda de C_4H_6 através da abertura do anel pirano seguido de rearranjo de hidrogênio e migração intramolecular de CH_3 , conforme mostrado no mecanismo de fragmentação proposto na Figura 1.69. Essa migração de um átomo e de um grupo de átomos através da estrutura da molécula por meio de quebra-formação da ligação via eletrospray na energia de colisão empregada, favorecem o rearranjo na molécula para a formação deste fragmento.

Em estudos anteriores, as propostas demonstravam que o íon de m/z 175, era devido a perda de $(CO + C_2H_2)$ no anel pirona, mas através da obtenção de espectros de MS/MS de massa exata utilizando espectrometria de massas de alta resolução, chegamos a conclusão de que este mecanismo não é de ocorrência plausível, pois a formação deste íon base é devido a perda de -54,05 Da e não de -54,01 Da, que geraria o íon de m/z 175,0759. Se a perda fosse referente ao que era proposto até então, a partir do íon base observado no espectro de MS/MS e a massa teórica calculada para o fragmento gerado a partir dessa perda, o erro de massa seria de -215,91 ppm, sendo assim é impossível atribuir que o fragmento gerado é

devido a perda de (CO + C₂H₂), desse modo foi proposto a perda de C₄H₆ que apresenta um erro de massa de apenas - 4,57 ppm.

A partir do íon base, observa-se uma perda de -27,99 Da, que propicia a formação do íon fragmento [C₉H₇O₂]⁺ de *m/z* 147,0436, que é referente a perda de CO no anel pirona. A partir do íon base, também pode ocorrer uma perda de CO₂ no anel pirona que corresponde a - 43,99 Da. Esta fragmentação envolve a abertura do anel pirona para a perda de CO₂ levando a formação de um anel de 4 membros condensado a um íon cíclico de 7 membros estabilizado por ressonância, formando o íon fragmento [C₉H₇O]⁺ de *m/z* 131,0486, conforme mostrado no espectro em MS/MS na Figura 1.68 e no mecanismo de fragmentação proposto na Figura 1.69.

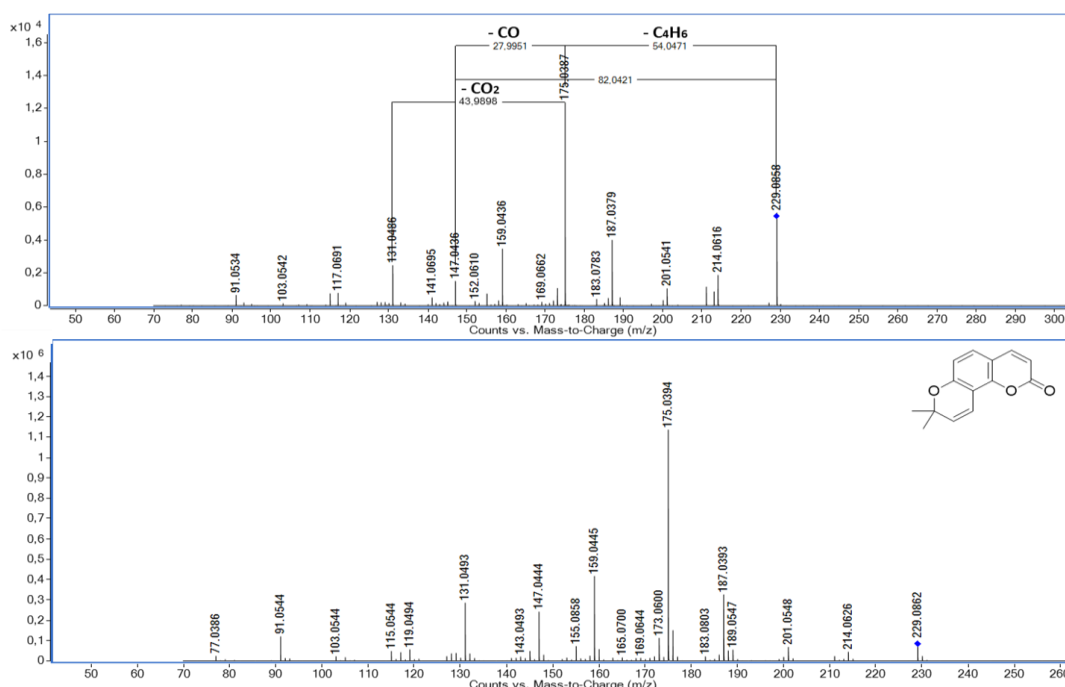


Figura 1.68. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da seselina [M+H]⁺ 229,0862 - Rt = 4,31 min em EC = 20 e 25V.

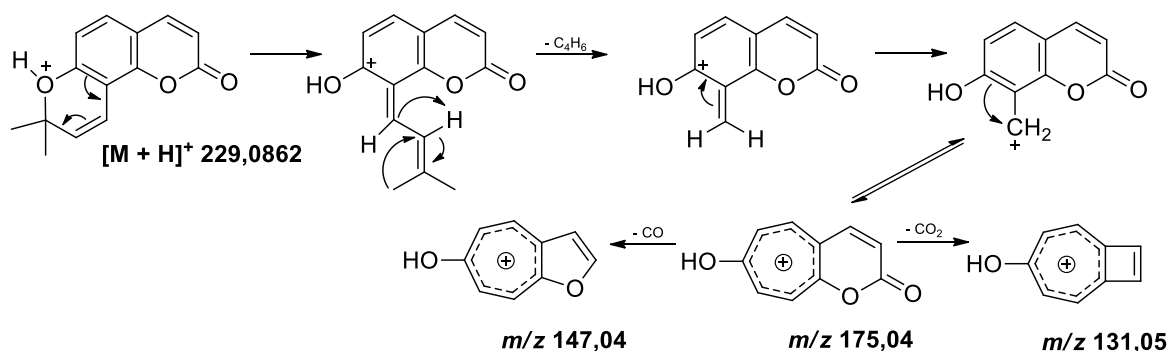


Figura 1.69. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a seselina [M+H]⁺ 229,0862.

O gráfico mostrado na Figura 1.70, mostra a área em MS referente ao íon de m/z 229,0862 com $R_t = 4,61$ min e o resultado do teste t pareado em par de médias a 95% de confiança, para os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. O gráfico também mostra os resultados para os tratamentos: RPSiv e RPIiv e raízes de plântulas saudias e infectadas cultivadas *in vitro*.

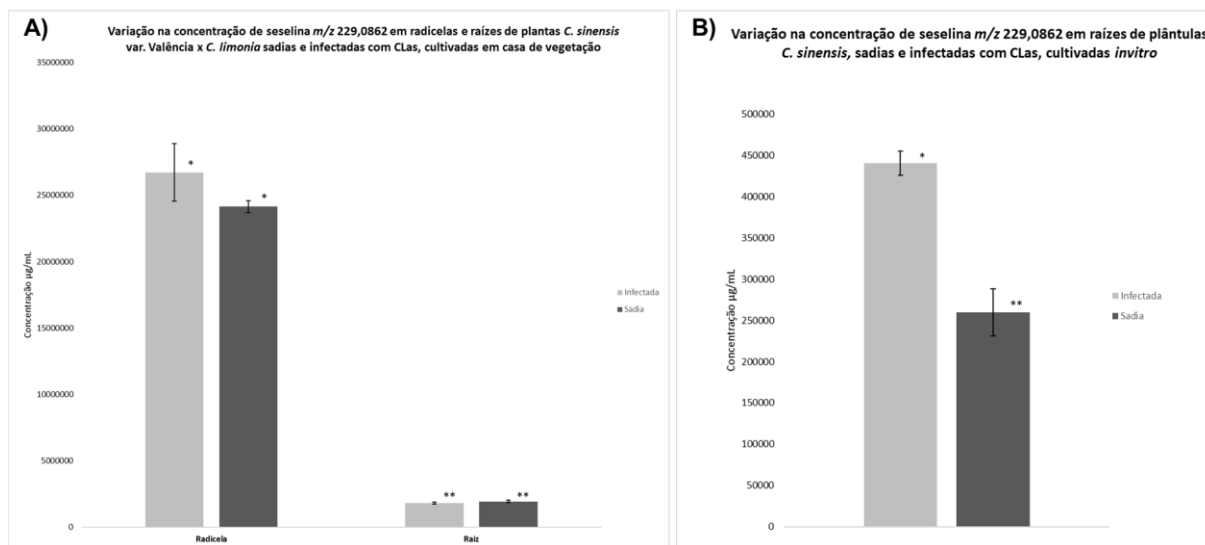


Figura 1.70. Variação na concentração relativa de seselina em A) radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas *in vitro*.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RPIiv e RPSiv, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado

Os dados mostram uma maior quantidade de seselina nas raízes frente as radículas, com diferença estatisticamente significativa aplicando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95%. Através das análises realizadas, mais uma vez é possível observar uma maior tendência da produção e acumulação de cumarinas e seu derivados angulares nas radículas, inferindo que a enzima responsável pela prenilação do esqueleto cumarínico em C-8, pode estar sendo mais expressa neste tecido.

Através da análise dos dados observa-se que apesar da produção de seselina nas radículas de plantas infectadas frente as radículas de plantas saudias

cultivadas em casa de vegetação ser consideravelmente maior, não há uma diferença estatística evidenciada aplicando o teste t pareado em par de médias. Uma diferença estatisticamente significativa também não é constatada quando comparado raízes de plantas sadias e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação.

No entanto, quando é comparado os tratamentos de raízes de plântulas sadias e infectadas com CLas cultivadas *in vitro* observa-se que a produção de seselina é estatisticamente maior naquelas em que há a presença do patógeno. Sendo assim é possível inferir que este metabólito é um marcador da doença HLB em plântulas de citrus cultivadas *in vitro*.

1.4.5.12 Anotação para a xantoxiletina

Após os processamentos necessários, a xantoxiletina foi anotada como a substância com $R_t = 15,60$ min e $[M + H]^+$ 259,0960. A xantoxiletina é uma piranocumarina angular metoxilada na posição C-5, possui fórmula molecular de $C_{15}H_{14}O_4$ e $[M + H]^+$ teórico de 259,0970, apresentando para esta análise um erro de -3,86 ppm. Este metabólito foi anotado a partir do match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, de análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar – INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação e através da avaliação da rede molecular. O nodo correspondente a xantoxiletina está localizado no cluster da xantiletina e seselina, cluster no qual foram anotados exclusivamente piranocumarinas angulares e lineares, substituídas e seus intermediários (Figura 1.22).

O nodo correspondente a xantoxiletina conecta-se com o nodo de $[M + H]^+$ 229,0865; identificado como xantiletina, através do nodo de $[M + H]^+$ 243,1013 (Figura 1.22). A diferença de massa entre os nodos é de 30,11 Da, indicando que houve a substituição de um hidrogênio na posição C-5 por uma metoxila, levando portanto, a identificação da xantoxiletina. A Figura 1.71 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{15}H_{15}O_4]^+$.

A identificação da xantoxiletina foi determinada e só foi possível, devido a abordagem FBMN, que auxilia na deconvolução espectral possibilitando a anotação correta para isômeros. Neste caso determinou-se que o sinal analítico em MS corresponde à xantoxiletina, devido ao íon base de m/z 229,0488, que é o íon mais estável formado durante a fragmentação em MS/MS desta substância.

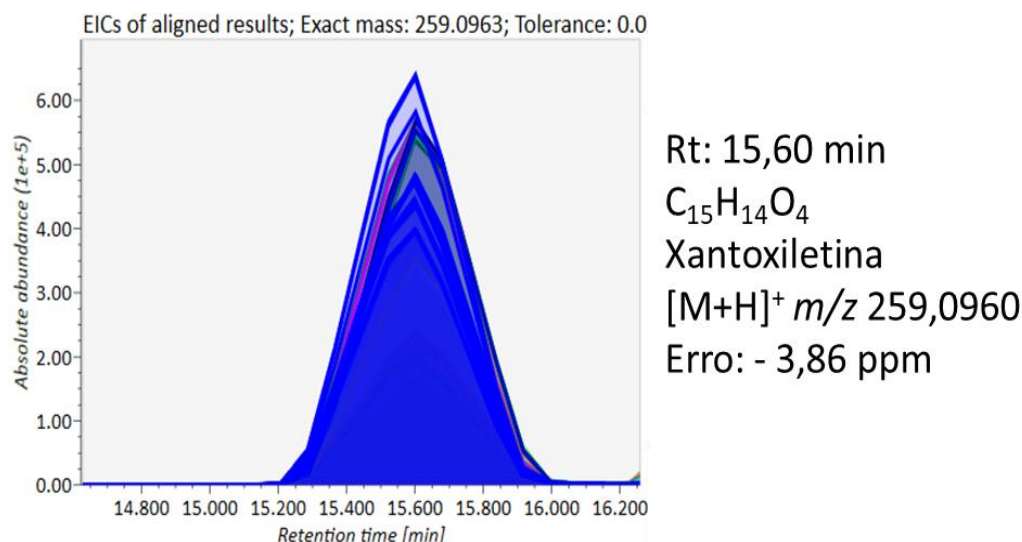


Figura 1.71. Sinal analítico em MS referente a xantoxiletina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 259,0960 e $R_t = 15,60$ min.

A Figura 1.72 mostra o espectro de massas em MS/MS no modo positivo de ionização em energia de colisão de 22 e 25 V para a xantoxiletina que possui íon precursor de m/z 259,0960. Através da análise deste, observa-se que a partir do íon precursor há a formação do íon fragmento $[C_{14}H_{12}O_4]^+$ de m/z 244,0714, que ocorre devido a perda de massa de - 15,02 Da, que corresponde a perda radicalar de $\cdot CH_3$, conforme proposto no mecanismo de fragmentação de massa apresentado na Figura 1.73. Em seguida há mais uma perda radicalar $\cdot CH_3$, gera o íon base $[C_{13}H_9O_4]^+$ de m/z 229,0488. A partir deste, a perda de uma unidade de CO no anel pirona, que corresponde a perda de massa de - 27,99 Da, e gera o íon fragmento $[C_{12}H_9O_3]^+$ de m/z 201,0545.

A partir do íon precursor observa-se a perda de massa de - 46,04 Da devido a perda de $(OCH_2 + CH_4)$. Sendo assim, há a formação do íon base $[C_{13}H_9O_4]^+$ de m/z 229,0488 conforme observado no espectro em MS/MS mostrado na Figura 1.72 e no mecanismo de fragmentação de massas proposto na Figura 1.73.

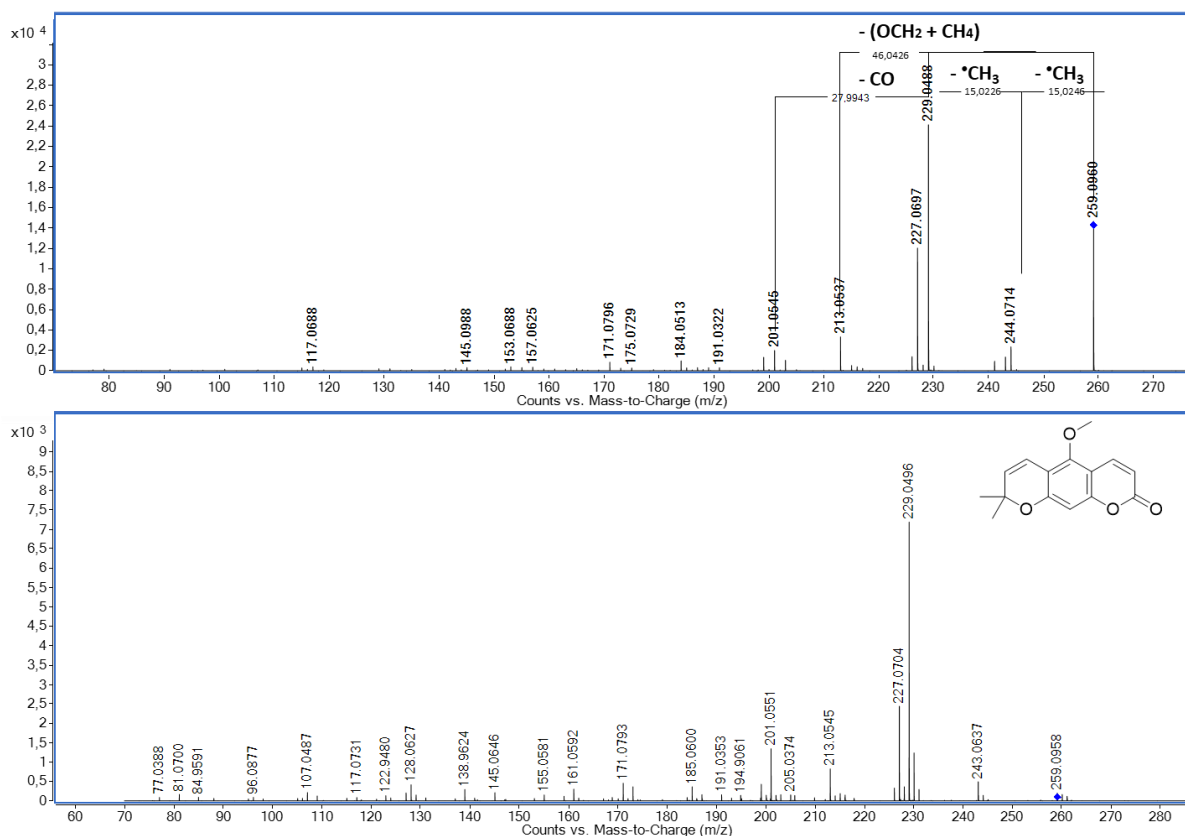


Figura 1.72. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da xantoxiletina $[M+H]^+$ 259,0960 - Rt = 15,60 min em EC = 22 e 25V.

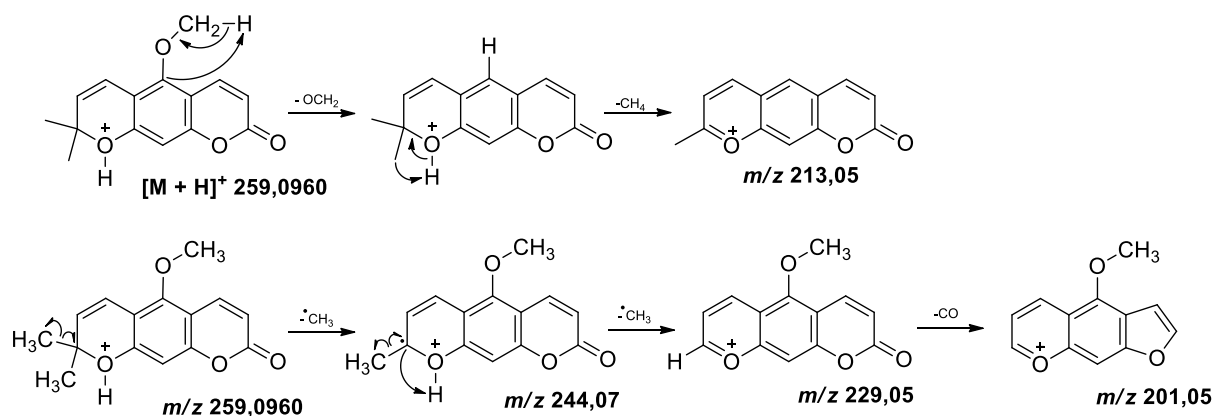


Figura 1.73. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a xantoxiletina $[M+H]^+$ 259,0960.

Aplicando o tratamento de dados, após a tabulação dos mesmos, obtidos a partir da área do pico em MS com Rt = 4,0 min para as amostras de raízes e radículas de plantas saudas e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação, foi construído o gráfico representado na Figura 1.74. Foi empregado o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de

95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. A xantoxiletina não foi detectada nas plântulas cultivadas *in vitro*.

Através da análise dos dados é possível observar que há uma diferença estatisticamente significativa na produção deste metabólito nas plantas cultivadas em casa de vegetação, onde a concentração é cerca de 3 vezes maior nas raízes frente as radículas. Mais uma vez, há a constatação que derivados lineares, ou seja, aqueles inicialmente prenilados na posição C-6, são produzidos em maior quantidade na raiz principal de citros.

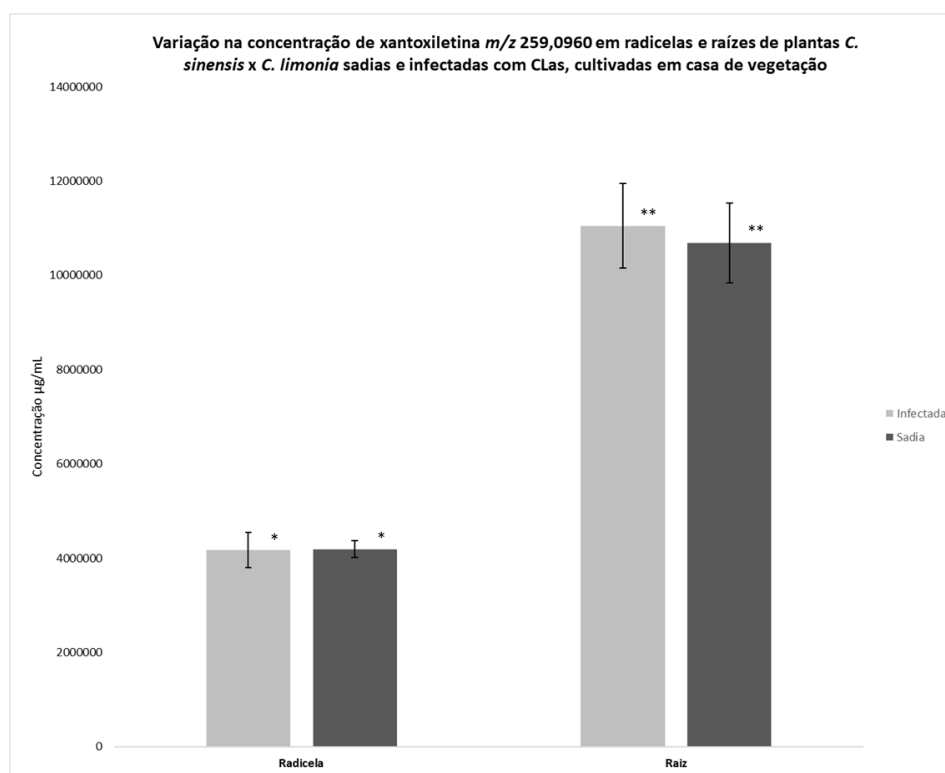


Figura 1.74. Variação na concentração relativa de xantoxiletina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

Quando é realizada a comparação entre radículas de plantas sadias e infectadas com CLas e raízes de plantas sadias e infectadas com CLas, não há diferença estatisticamente significativa aplicando o teste t pareado em par de médias

a um nível de 95% de confiança. Sendo assim conclui-se que este metabólito não é responsivo ao ataque do patógeno.

1.4.5.13 Anotação para a 5-metóxiseselina

A partir do processo de deconvolução espectral, aplicando as ferramentas necessárias para molecular networking, foi possível atribuir que o íon de $[M + H]^+$ 259,0962 e com $R_t = 16,58$ min corresponde a 5-metóxiseselina. Esta possui fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_4$ e uma massa molecular teórica de 259,0970 que corresponde ao íon precursor $[C_{15}H_{14}O_4]^+$, portanto para esta análise há um erro de massa de -3,09 ppm, que é um valor aceitável em MS/MS para anotação de um metabólito.

O nodo referente ao ostol está localizado no cluster da xantiletina e seselina (Figura 1.22) e conecta-se com o nodo da xantoxiletina. A diferenciação deste metabólito que é uma cumarina angular, prenilada em C-8 e metoxilada em C-5 do seu isômero xantoxiletina que é uma cumarina linear, prenilada em C-6 e metoxilada em C-5, só foi possível devido o processamento aplicado, utilizando a abordagem FBMN. A diferença entre os dois isômeros está na posição da prenila, na xantoxiletina ela se encontra em C-6 e após a ciclização leva a um derivado de piranocumarina linear, enquanto que na 5-metóxiseselina em C-8 e após a ciclização leva a um derivado de piranocumarina angular. A Figura 1.75 mostra o sinal analítico em MS para esta substância.

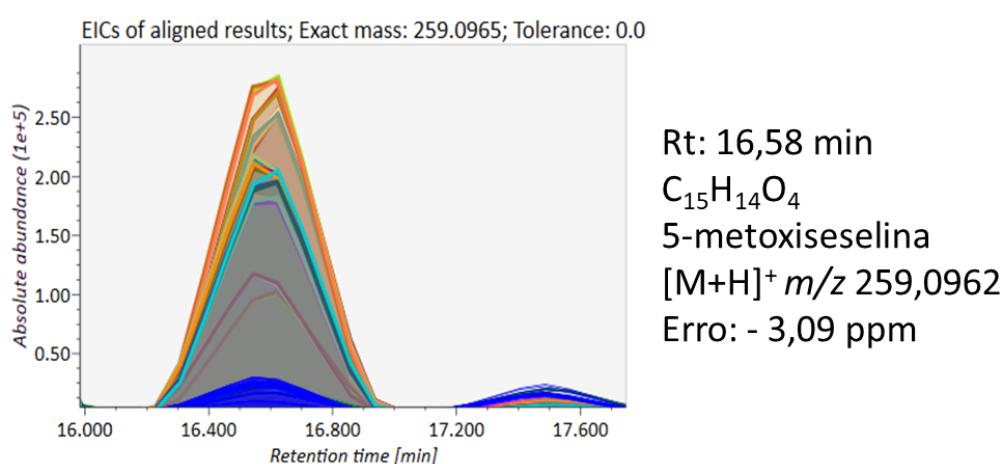


Figura 1.75. Sinal analítico em MS referente a 5-metóxiseselina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 259,0962 e $R_t = 16,58$ min.

A caracterização da 5-metóxiseselina foi confirmada baseando-se no match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, no espectro de massas em

MS/MS, juntamente com o mecanismo de fragmentação da molécula (Figura 1.76 e 1.77). As fragmentações por ESI no modo positivo de ionização apresentou poucos íons produtos similares entre os dois isômeros (xantoxiletina e 5-metóxiseselina). Analisando os perfis de fragmentação para ambos os metabólitos, observa-se que o íon m/z 205,0490 é característico apenas para o derivado angular, portanto, a proposta mecanística envolvendo o anel pirano justifica a presença deste íon fragmento apenas na 5-metóxiseselina.

Outra observação é que o íon base de m/z 189,0544 e m/z 177,0552 têm se formado mais comumente nas cumarinas 8-C prenil substituídas (angulares), levando a inferir que a grande intensidade desses íons deve-se à estabilidade dos fragmentos, devido a conjugação do sistema aromático formado, logo ocorrem sucessivas fragmentações até a formação do íon cíclico de 7 membros conjugado ao anel furânico (Figura 1.77).

A partir do íon precursor observa-se duas perdas radiculares de $\cdot\text{CH}_3$ consecutivas, assim como é observado para a xantoxiletina. A primeira perda de massa que corresponde a - 15,02 Da levou a formação do íon fragmento $[\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4]^+$ de m/z 244,0728. A segunda perda de massa que corresponde a -15,02 Da gera o íon fragmento $[\text{C}_{13}\text{H}_9\text{O}_4]^+$ de m/z 229,0488.

Outra fragmentação a partir do íon precursor é observada. Ocorre a perda de massa de - 42,05 Da que corresponde a perda do fragmento C_3H_6 no anel pirano, levando a formação do íon fragmento $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_4]^+$ de m/z 217,0490. Em seguida, através da perda de CO no anel pirano que equivale a - 27,99 Da, um rearranjo gera um anel furano, levando a formação do íon fragmento $[\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_3]^+$ de m/z 189,0548, conforme mostrado no mecanismo de fragmentação proposto da Figura 1.77.

O íon base $[\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_4]^+$ de m/z 205,0501 é gerado a partir da perda de massa de - 54,05 Da do íon molecular, desse modo foi proposto a perda de C_4H_6 , assim como aquela que ocorre para a piranocumarina angular xantiletina. Em seguida, a partir do íon base, observa-se uma perda de -27,99 Da, que propicia a formação do íon fragmento $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3]^+$ de m/z 177,0552, que é referente a perda de CO no anel pirona, esta fragmentação envolve a abertura do anel pirona para a perda de CO levando a formação de um anel furano condensado a um íon cíclico de 7 membros estabilizado por ressonância, conforme mostrado no espectro em MS/MS na Figura 1.76 e no mecanismo de fragmentação proposto na Figura 1.77.

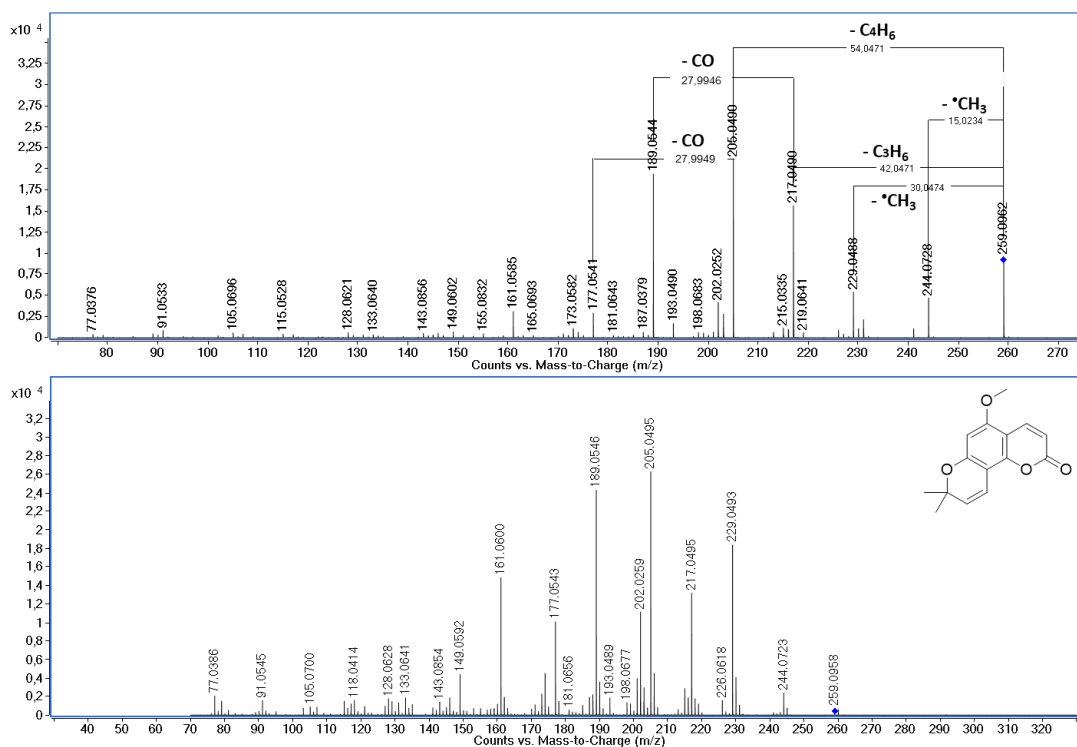


Figura 1.76. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da 5-metóxiseselinina $[M+H]^+$ 259,0962 - $R_t = 16,58$ min em EC = 22 e 25V.

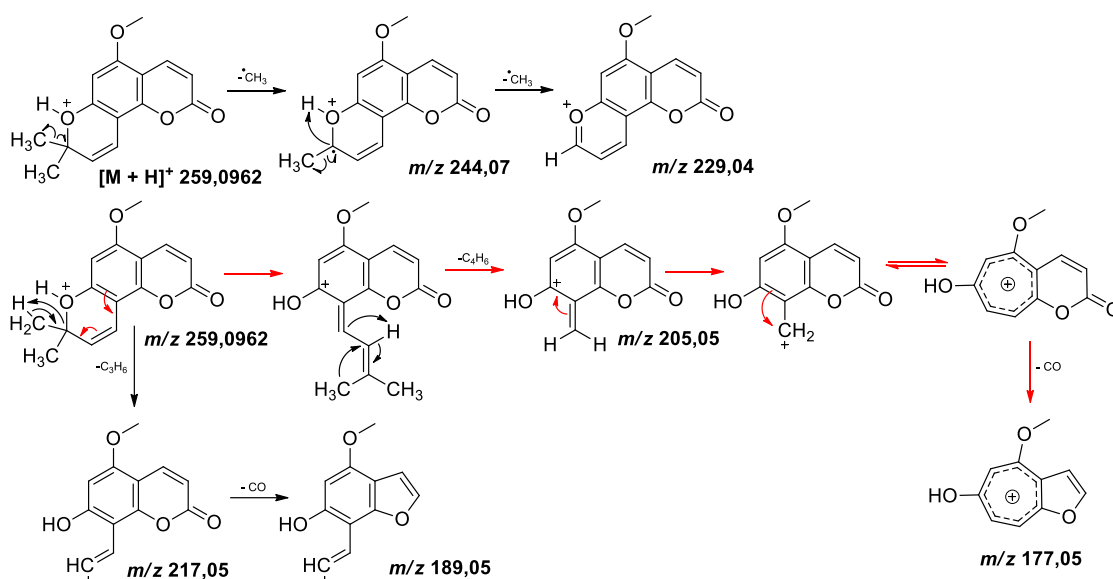


Figura 1.77. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a 5-metóxiseselinina $[M+H]^+$ 259,0962.

Os dados referentes a 5-metóxiseselinina em MS com $R_t = 16,58$ min foram tabulados e estão representados no gráfico da Figura 1.78. Estes dados referentes aos tratamentos avaliados foram submetidos a análise estatística empregando o teste t pareado em par de médias a 95% de confiança. A partir da

interpretação destes observa-se que há uma diferença na concentração de 5-metóxiseselinina entre as radículas de plantas sadias e infectadas com CLAs, onde há uma quantidade maior desta substância em radículas de plantas na presença do patógeno frente aquelas sadias. Sendo assim, este metabólito é considerado um marcador da doença HLB e possivelmente pode apresentar um efeito bactericida, pois a planta responde à infestação da bactéria nos vasos da planta, aumentando a produção desta substância como um mecanismo de defesa. Em contrapartida, nas raízes não há diferença na concentração de 5-metóxiseselinina entre plantas sadias e infectadas com CLAs.

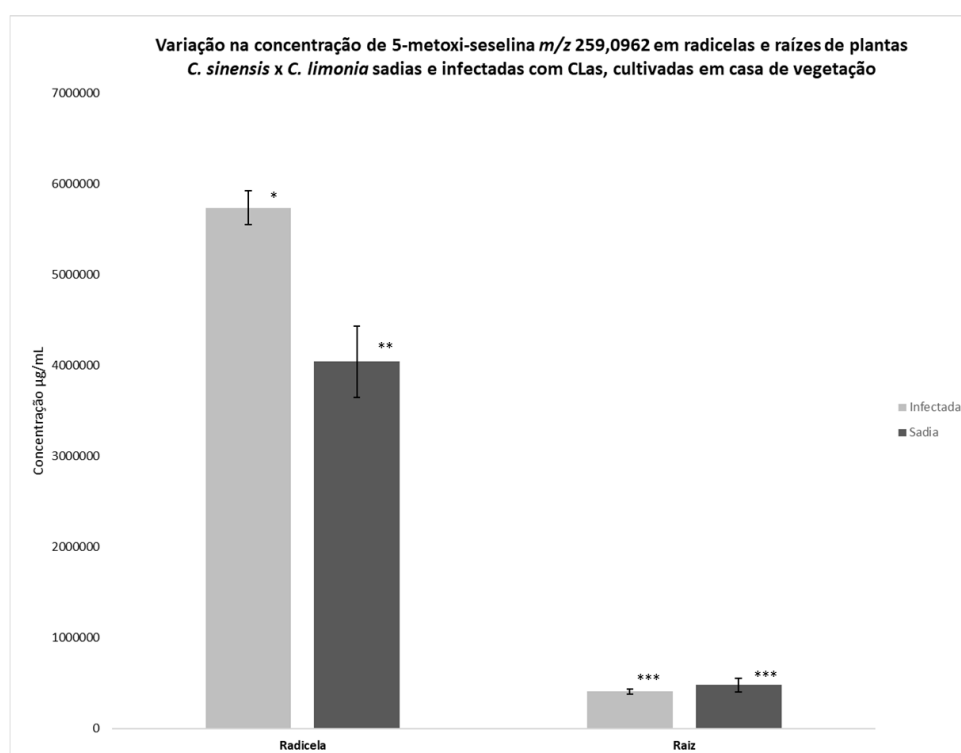


Figura 1.78. Variação na concentração relativa de 5-metóxiseselinina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLAs, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

Novamente, mais uma observação importante foi constatada com relação a quantidade e acumulação de derivados de cumarinas angulares, onde a concentração deste é sempre maior nas radícula. Para a 5-metóxiseselinina não foi diferente, há uma acumulação 4 vezes maior deste metabólito nas radículas frente

as raízes. Podemos inferir que os genes que codificam as enzimas responsáveis pela prenilação em C-8 são mais expressas neste órgão da planta. Outra informação importante é que a 5-metóxiseselina não foi detectada nas plântulas cultivadas *in vitro*.

1.4.5.14 Anotação para a nordentatina

O processamento dos dados de espectrometria de massas em MS e MS/MS, foi realizado e a partir da rede molecular gerada, foi possível observar um nodo de $[M + H]^+$ 313,1434 com $R_t = 21,88$ min, no cluster do ostol e da clausarina (Figura 1.23). Após o match espectral com as bases de dados utilizadas, estudo de fragmentação em MS/MS e de estudos anteriores realizados pelo Laboratório de Produtos Naturais PN – CBIP, este íon molecular que corresponde a $[C_{19}H_{21}O_4]^+$ foi anotado como nordentatina.

A nordentatina que é uma piranocumarina linear substituída em C-5 por uma hidroxila e em C-8 por uma unidade 1,1-dimetilalil, possui fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_4$ e um $[M + H]^+$ teórico de 313,1440, portanto para esta análise foi observado um erro de -1,92 ppm. A Figura 1.79 mostra o sinal analítico em MS para esta substância.

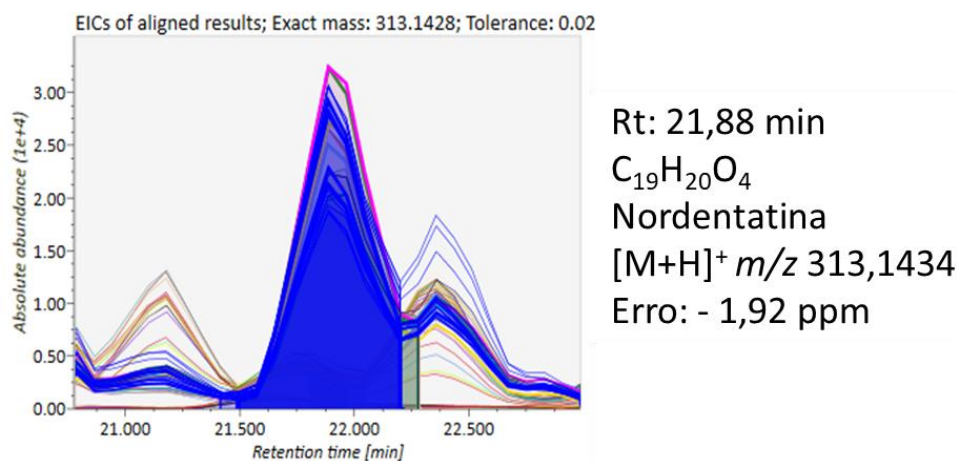


Figura 1.79. Sinal analítico em MS referente a nordentatina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 313,1434 e $R_t = 21,88$ min.

A Figura 1.80 mostra o espectro de massas em MS/MS no modo positivo de ionização em energia de colisão de 25 e 22 V para a nordentatina que possui íon molecular de $[M + H]^+$ 313,1434. Através da análise deste, observa-se que a partir do íon precursor há a formação do íon fragmento $[C_{16}H_{15}O_4]^+$ de m/z

271,0961, que ocorre devido a perda de massa de - 42,05 Da, que corresponde a perda de C₃H₆ a partir da abertura do anel pirano, conforme proposto no mecanismo de fragmentação de massas apresentado na Figura 1.81. Em seguida uma perda de CO no anel pirona, que corresponde a -27,99 Da, gera o íon fragmento [C₁₅H₁₅O₃]⁺ de *m/z* 243,1013.

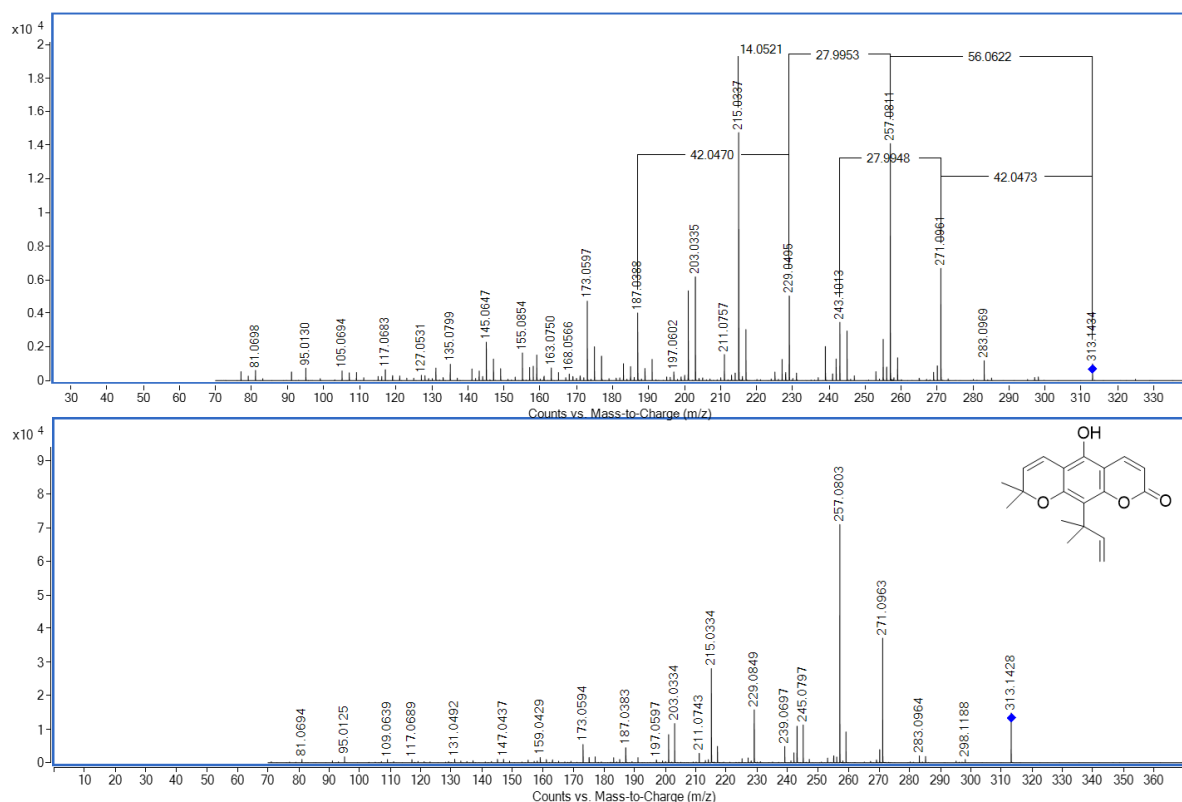


Figura 1.80. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, nordentatina [M+H]⁺ 313,1434 - Rt = 21,88 min em EC = 25 e 22V.

A partir do íon precursor observa-se também a perda de massa de 56,06 Da devido a perda de C₄H₈, através do mecanismo de fragmentação de massas mostrado na Figura 1.81, sugere-se um rearranjo da unidade 1,1-dimetilalil em C-8 para posteriormente permitir a saída da unidade C₄H₈. Sendo assim, há a formação do íon base [C₁₅H₁₃O₄]⁺ de *m/z* 257,0811. Em seguida, através da perda de C₃H₆ que corresponde a -42,05 Da a partir da abertura do anel pirano, é formado o íon [C₁₂H₇O₄]⁺ de *m/z* 215,0337. Uma perda de CO no anel pirona, leva ao íon fragmento [C₁₁H₇O₃]⁺ de *m/z* 187,0383. A partir do íon de *m/z* 257,0811; também é observado uma perda -27,99 Da que equivale a perda de uma unidade de CO no anel pirona, gera o íon fragmento [C₁₄H₁₃O₃]⁺ de *m/z* 229,0859.

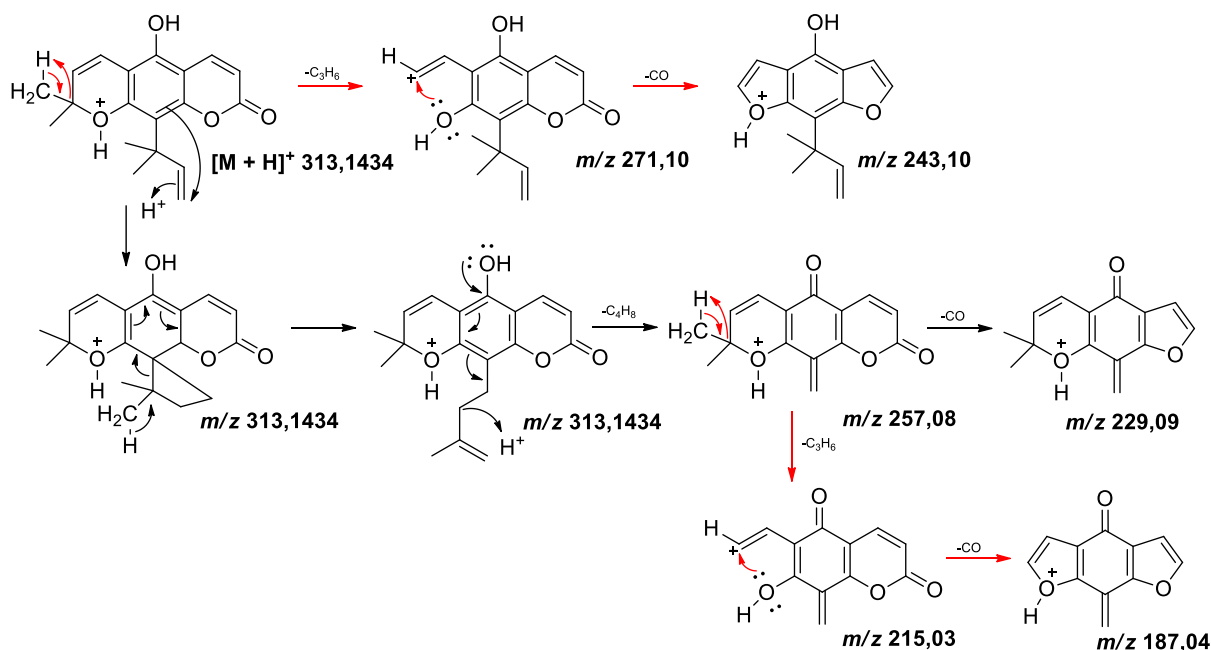


Figura 1.81. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a nordentatina $[M+H]^+$ 313,1434.

Diante da notação da nordentatina, foram plotados os dados referente a área do pico em MS para esta substância e os mesmos foram avaliados por análise estatística empregando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95 % de confiança, para todos os tratamentos monitorados. A análise foi realizada comparando os seguintes pares: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. A nordentatina não foi detectada nas plântulas cultivadas *in vitro*.

Os resultados desta análise e o gráfico obtido estão demonstrados na Figura 1.82. A partir deste gráfico, pode-se observar que não houve diferença estatística na quantidade de nordentatina entre as radículas de plantas saudas e infectadas com CLas. O mesmo também é observado quando é comparado as raízes de plantas saudas e na presença da bactéria. Mesmo que seja constatada uma maior produção deste metabólito quando as plantas estão sujeitas a infecção com a bactéria, não há uma diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança entre os tratamentos. Sendo assim, a clausarina não é considerada como um marcador da doença HLB e nem com uma possível atividade bactericida.

A única diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança observada, é que a produção desta piranocumarina linear é maior nas raízes frente as radículas. Portanto, mais uma vez há a evidência de que os derivados lineares, que sofrem a reação da enzima responsável pela prenilação em C-6 para posterior ciclização, são produzidos em maior quantidade e acumulados preferencialmente nas raízes. Tal fato pode ser explicado por uma possível maior expressão dos genes que codificam estas enzimas que são responsáveis pela formação da clausarina, nas raízes do que nas radículas em plantas de *C. sinensis* x *C. limonia*

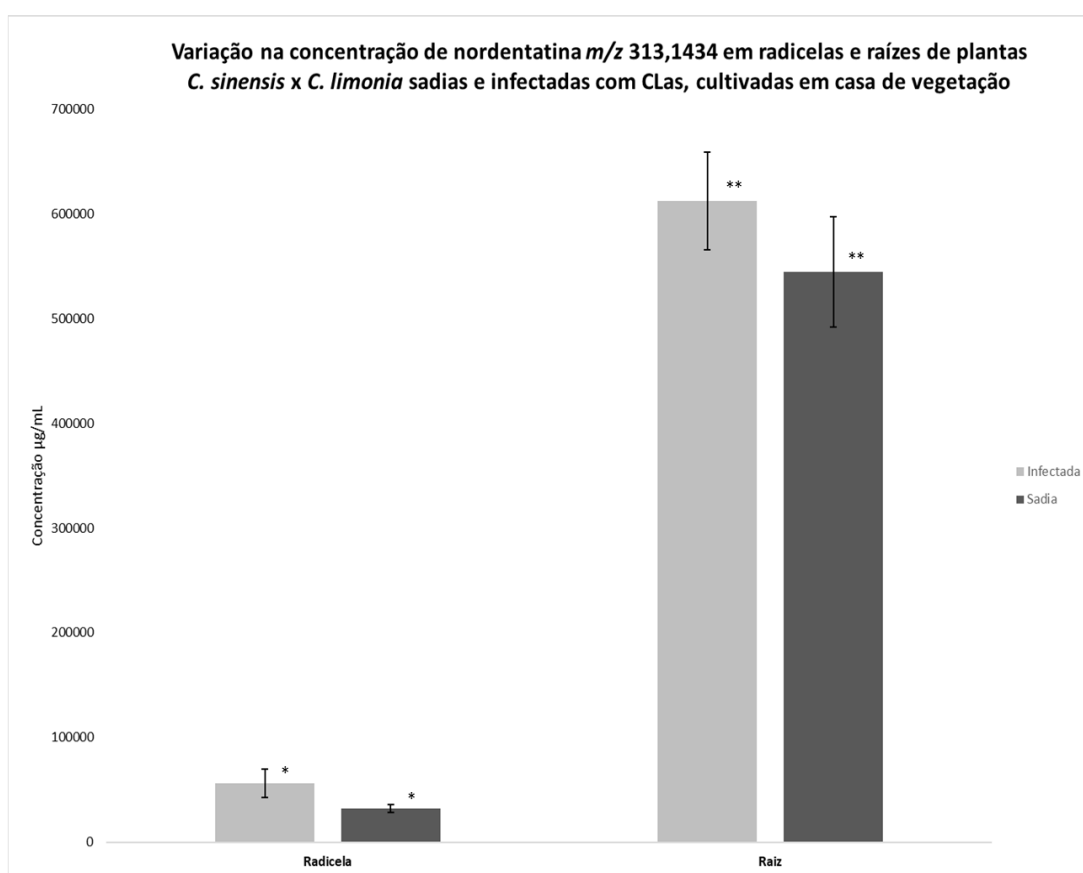


Figura 1.82. Variação na concentração relativa de nordentatina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.15 Anotação para a clausarina

A partir do processo de deconvolução espectral, aplicando as ferramentas necessárias para molecular networking, foi possível atribuir que o íon de $[M + H]^+$ 381,2063 e com $R_t = 26,29$ min corresponde a clausarina. Esta substância é uma piranocumarina linear substituída em C-5 por uma hidroxila e em C-8 e C-2 por uma unidade de 1,1-dimetilalil. Esta possui fórmula molecular $C_{24}H_{28}O_4$ e uma massa molecular protonada teórica de 381,2066 que corresponde ao íon precursor $[C_{24}H_{29}O_4]^+$, portanto para esta análise há um erro de massa de -0,79 ppm, que é um valor aceitável para anotação de um metabólito.

O nodo referente a clausarina que está localizado no cluster denominado cluster do ostol e da clausarina (Figura 1.23); conecta-se com o nodo da nordentatina que possui $[M + H]^+$ de 313,1434. A diferença de massa entre os dois nodos é de 68,06 Da, indicando que ocorreu uma sequência da biossíntese de nordentatina, onde houve a substituição de um hidrogênio na posição C-5 por uma unidade de 1,1-dimetilalil levando então a formação da clausarina. A Figura 1.75 mostra o sinal analítico em MS para a clausarina.

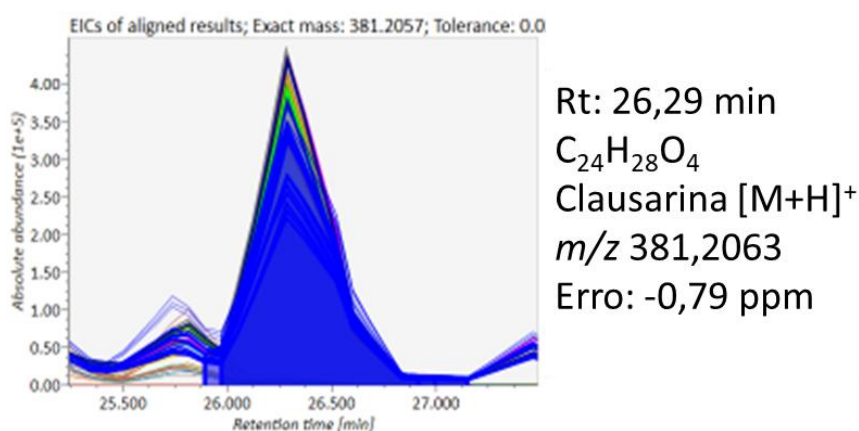


Figura 1.83. Sinal analítico em MS referente a clausarina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 381,2063 e $R_t = 26,29$ min.

A caracterização da clausarina foi confirmada baseando-se no match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, no espectro de massas em MS/MS juntamente com o mecanismo de fragmentação da molécula, que pode ser visto nas Figuras 1.84 e 1.85. As fragmentações em MS/MS por ESI no modo positivo de ionização apresentou a formação do íon fragmento $[C_{23}H_{29}O_3]^+$ de m/z 353,2115, que corresponde a perda de CO do anel pirona a partir do íon molecular.

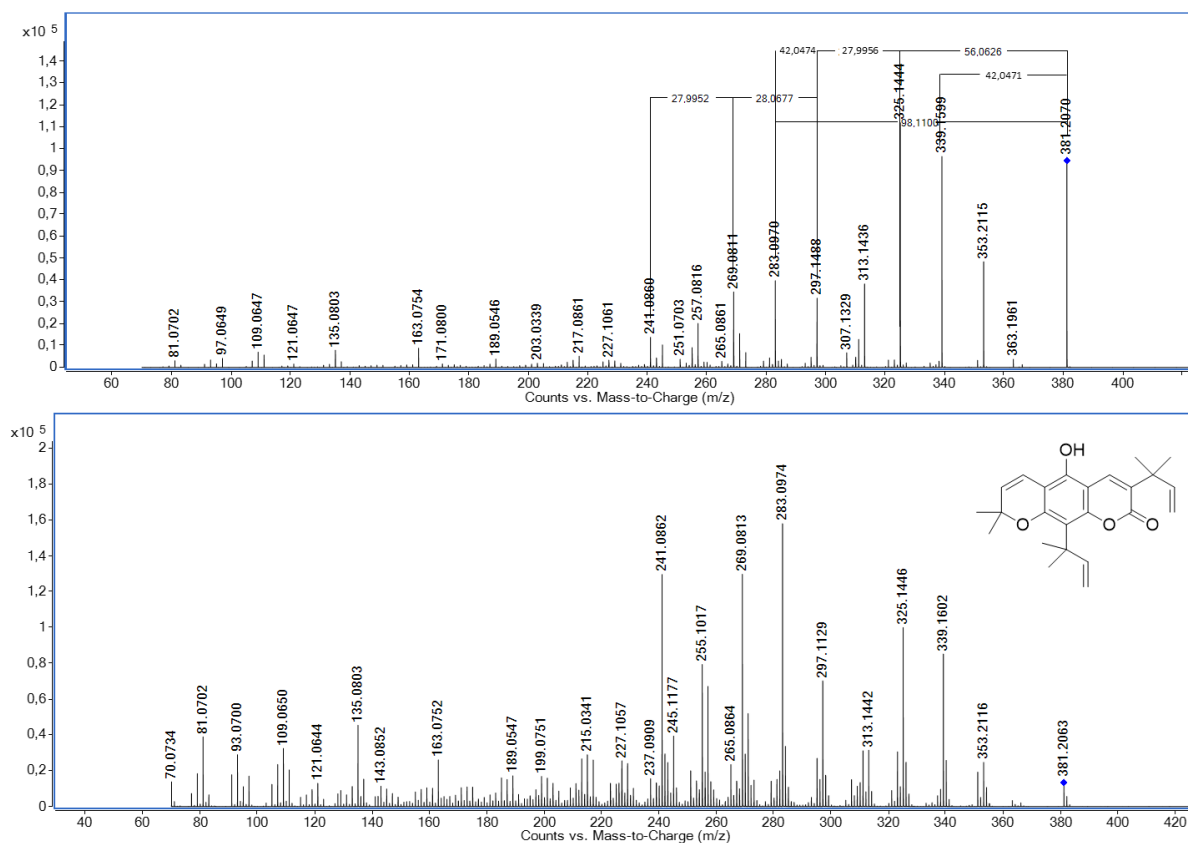


Figura 1.84. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da clausarina $[M+H]^+$ 381,2063 - Rt = 26,29 min em EC = 20 e 25V.

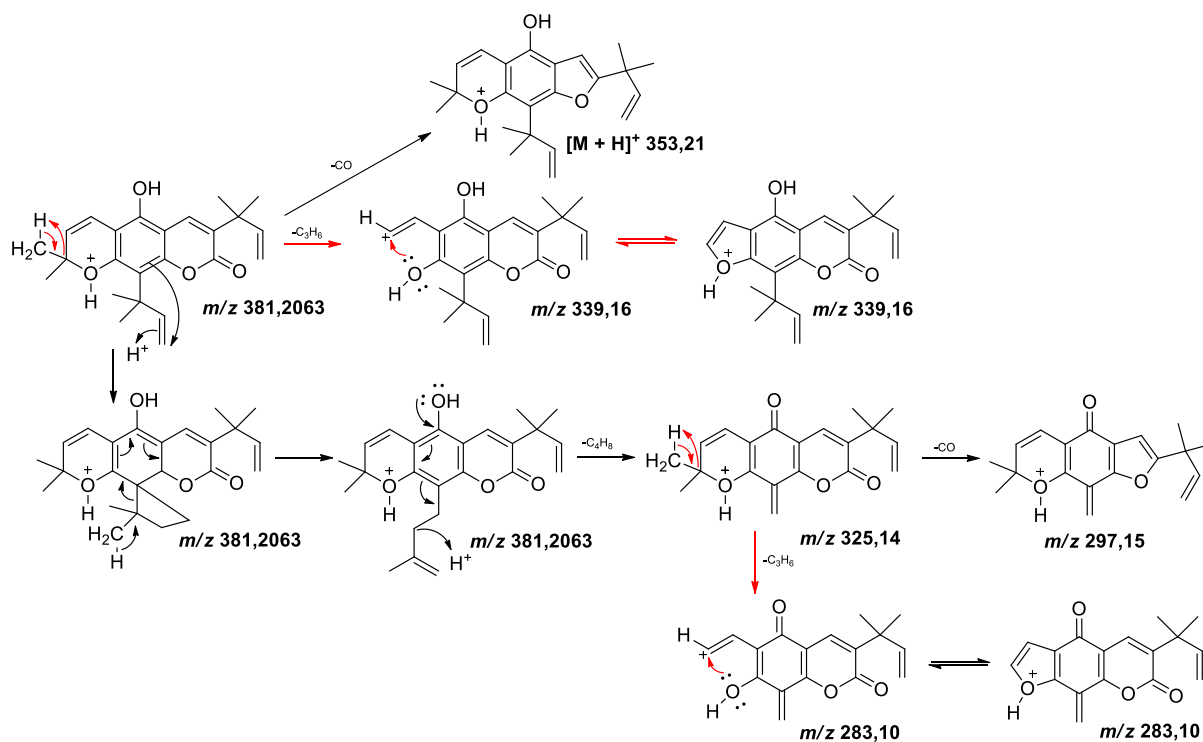


Figura 1.85. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a clausarina $[M + H]^+$ 381,2063.

Além desta, é possível observar também a perda de 42,05 Da a partir do íon precursor, que corresponde a perda de C₃H₆, levando a formação do íon [C₂₁H₂₃O₄]⁺ de *m/z* 339,1599. Outra fragmentação também pode ser observada a partir do íon precursor, devido a perda de C₄H₈ que equivale a - 56,06 Da. Essa perda ocorre através de um rearranjo da unidade 1,1-dimetilalil em C-8 para posteriormente permitir a saída da unidade C₄H₈. Sendo assim é observada a formação do íon fragmento [C₂₀H₂₁O₄]⁺ de *m/z* 325,1444. Em seguida uma perda de CO no anel pirona que equivale a -27,99 Da ocorre, gerando o íon fragmento [C₁₉H₂₁O₃]⁺ de *m/z* 297,1488.

A formação do íon base [C₁₇H₁₅O₄]⁺ de *m/z* 283,0970, ocorre a partir do íon de *m/z* 325,1444 devido a perda de C₃H₆ que equivale a - 42,05 Da. A formação desse fragmento ocorre a partir da abertura do anel pirano para a perda deste fragmento e posterior ciclização para a estabilização do íon gerado, formando um anel furano.

Após a caracterização da clausarina por LC-MS utilizando a plataforma GNPS e o tratamento de dados pelo software MS-DIAL, a área referente ao pico em MS com *Rt* = 26,29 min foi determinada para as amostras de raízes e radículas de plantas saudas e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. Estes dados foram tabulados e plotados, como mostra a Figura 1.86. Foi também empregado o teste t pareado para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes pares de tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. A clausarina não foi detectada nas plântulas cultivadas *in vitro*.

Através da análise do gráfico mostrado na Figura 1.86 conclui-se que há diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança, na acumulação e quantidade deste metabólito com relação aos tecidos da planta. Nas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*, a produção deste é aproximadamente 70 vezes maior quando comparado às radículas. Dentro deste cenário, é possível correlacionar mais uma vez que a produção de derivados de cumarinas lineares tem maior produção e acumulação nas raízes do que nas radículas, sendo assim, podemos inferir que o gene responsável pela prenilação em C-6 possui maior expressão nas radículas da planta.

Além disso observa-se que, comparando radículas sadias e infectadas com CLas, a produção de clausarina não é estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança. O mesmo é observado com relação a quantidade de clausarina nas raízes de plantas sadias e infectadas com CLas, não há diferença na produção deste, a acumulação neste tecido equipara-se comparando os tratamentos avaliados (Figura 1.86).

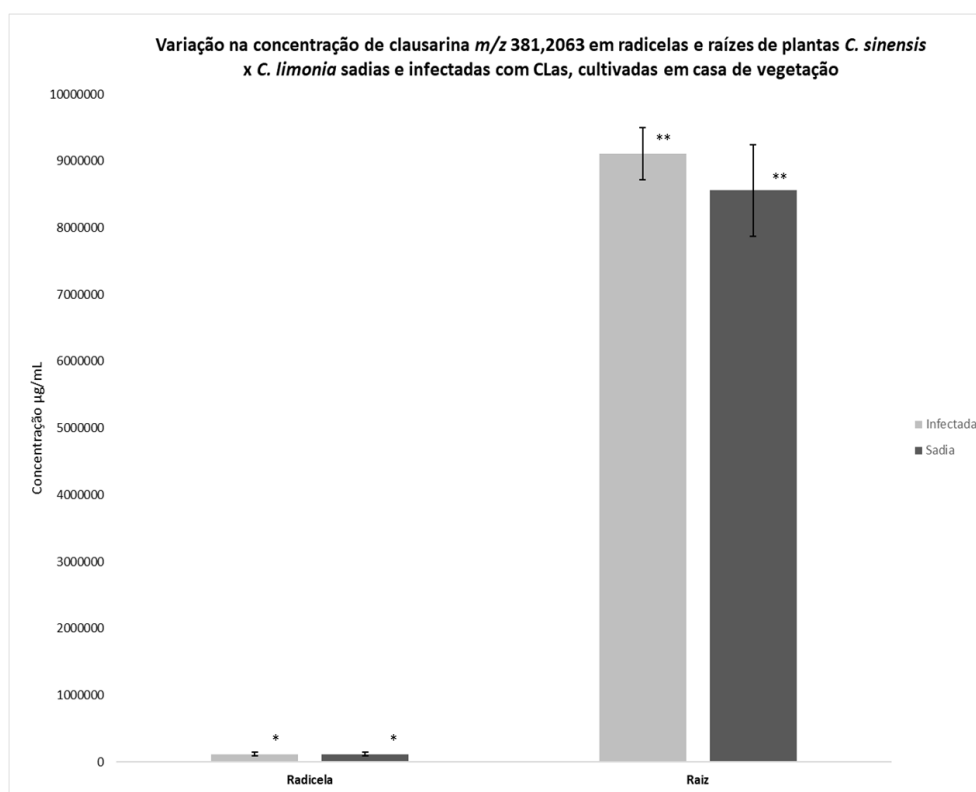


Figura 1.86. Variação na concentração relativa de clausarina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.5.16 Anotação para limonina

Através da análise da rede molecular via GNPS, obtida a partir do processamento de deconvolução espectral é possível observar um cluster apenas com limonoides que foi denominado como cluster da limonina. Neste cluster foi observado um nodo de $[M + H]^+$ 471,2028 com $R_t = 12,83$ min. Este nodo foi

anotado como limonina que possui fórmula molecular de $C_{26}H_{30}O_8$ e um m/z teórico de 471,2019. Portanto para esta análise referente ao íon precursor $[C_{26}H_{31}O_8]^+$, foi observado um erro de 1,91 ppm, que é um valor aceitável para a anotação de um metabólito. A Figura 1.87, mostra o pico referente a limonina extraído a partir do espectro de massas EIC em MS.

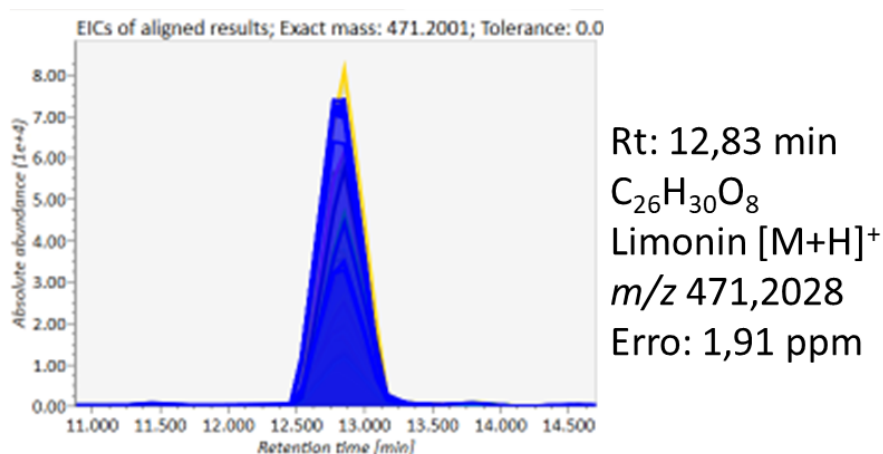


Figura 1.87. Sinal analítico em MS referente a limonina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 471,2028 e $R_t = 12,83$ min.

A limonina foi anotada a partir do match espectral com as bibliotecas utilizada, do estudo de fragmentação proposto para a substância a partir do seu espectro de massa em MS/MS e através da comparação de resultados anteriores obtidos através de estudos realizados pelo Laboratório de Produtos Naturais – CBIP da UFSCar. O espectro de massas em modo positivo de ionização por eletrospray, utilizando energias de colisão de 25 e 22V respectivamente está demonstrado na Figura 1.88 e o mecanismo de fragmentação de massas proposto pode ser visto na Figura 1.89.

Através da análise do espectro de massas em MS/MS para a limonina, não é observado a formação de muitos íons com intensidade considerável. Fica evidenciado a formação do íon base $[C_{10}H_9O_2]^+$ de m/z 161,0694 que é característico do perfil de fragmentação de limonoides e é gerado a partir de uma perda de massa de -310,1434 Da. Em seguida a perda do anel furano que equivale a - 66,01 Da, gera o íon fragmento $[C_6H_7O]^+$ de m/z 95,0597 (Figura 1.88 e 1.89).

O íon fragmento $[C_{25}H_{29}O_3]^+$ de m/z 425,1964 também é observado. Este é gerado devido a perda de HCOOH equivalente a - 46,01 Da, conforme demonstrado nas Figuras 1.88 e 1.89.

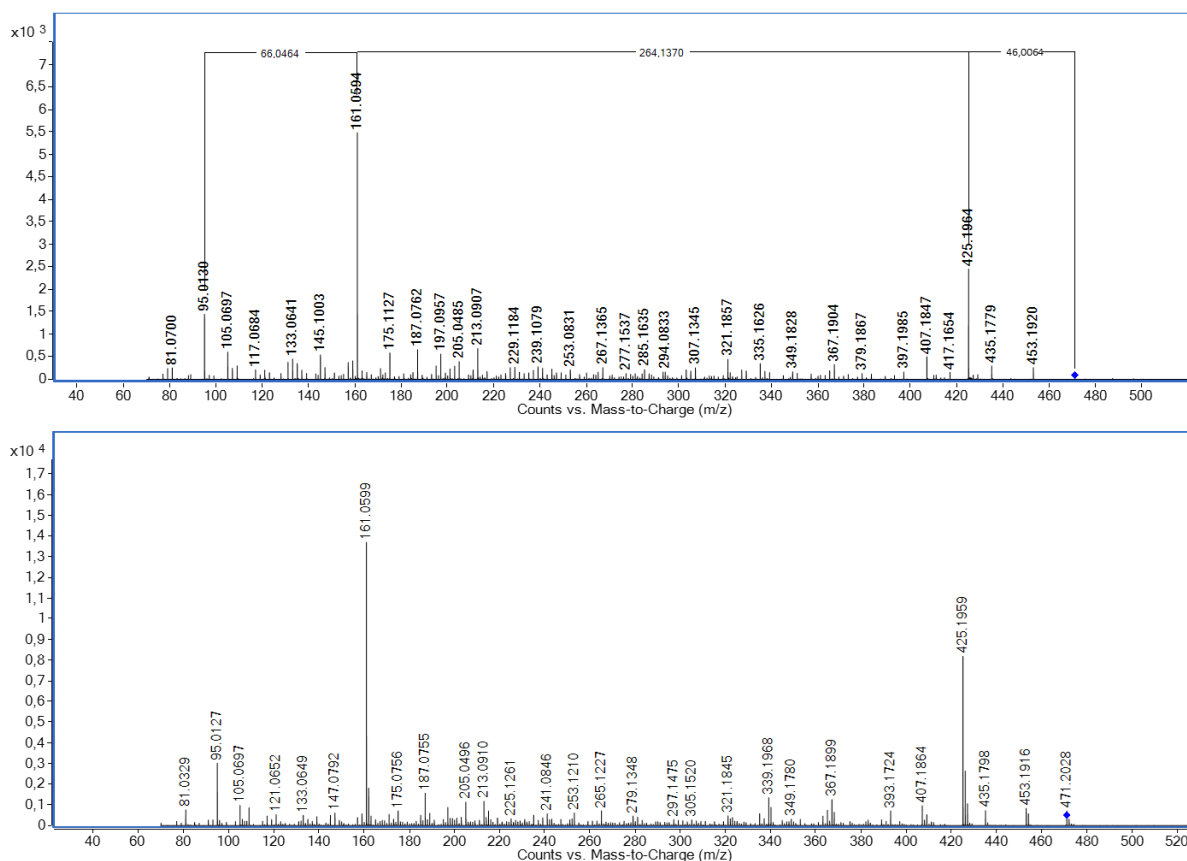


Figura 1.88. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da limonina $[M+H]^+$ m/z 471,2028- Rt = 12,83 min em EC = 25 e 22V.

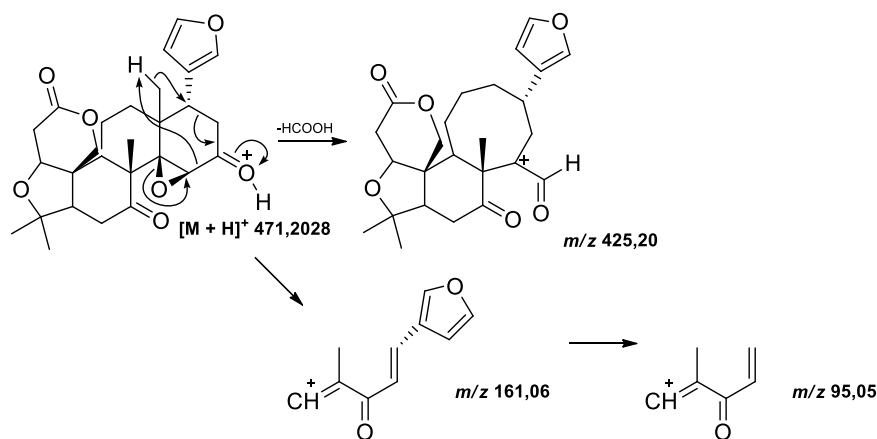


Figura 1.89. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a limonina $[M+H]^+$ 471,2028.

O gráfico mostrado na Figura 1.90, mostra a área em MS referente ao íon de $[M+H]^+$ 471,2028 com Rt = 12,83 min e o resultado do teste t pareado em par de médias a 95% de confiança, para os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudáveis e sintomáticas infectadas com CLAs cultivadas em casa de vegetação, assim como

para os tratamentos: RPSiv e RPIiv e raízes de plântulas saudias e infectadas cultivadas *in vitro*. Os dados mostram quantidade maior de limonina nas raízes frente as radículas, com diferença estatisticamente significativa aplicando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95%. Através das análises realizadas, é possível observar uma maior tendência da produção e acumulação deste metabólito nas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*.

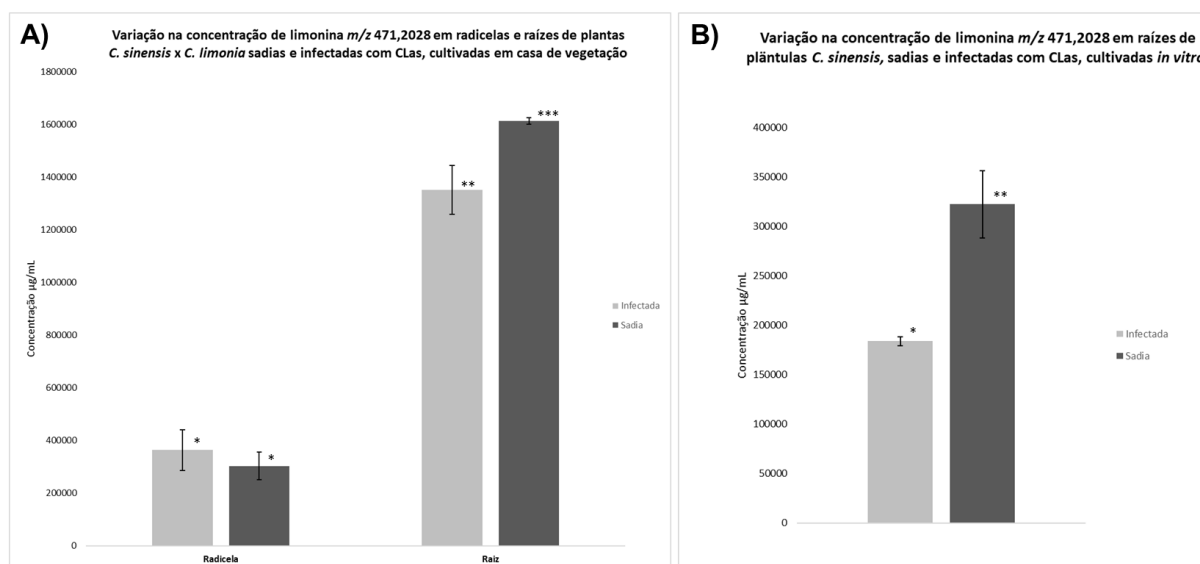


Figura 1.90. Variação na concentração relativa de limonina em A) radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação. B) raízes de plântulas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas *in vitro*.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RPIiv e RPSiv, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado

Comparando as radículas de plantas saudias e infectadas com CLas, não é possível observar uma diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança empregando o teste t em par de médias. Mas quando analisamos as raízes de plantas saudias e infectadas com CLas, observa-se que há uma maior quantidade de limonina nas plantas saudias frente às plantas na presença do patógeno. Sendo assim observa-se uma tendência da planta diminuir a produção deste metabólito quando infectada com a doença HLB.

Ao analisarmos as raízes de plantas cultivadas *in vitro*, observa-se a mesma tendência observada em raízes de plantas cultivadas em casa de vegetação, onde há uma produção muito maior deste metabólito nas plantas saudias frente as

plantas infectadas com CLAs, apresentando uma diferença estatisticamente significativa. Dentro deste contexto, podemos inferir que há uma tendência na planta em inibir a produção de limonina quando infectada com a bactéria causadora do HLB (Figura 1.90).

1.4.5.17 Anotação para acetato de limonina

A partir do processo de deconvolução espectral, aplicando as ferramentas necessárias para molecular networking, foi possível atribuir que o íon de $[M + H]^+$ 515,2272 e com $R_t = 14,58$ min corresponde ao acetato de limonina. Esta substância possui fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_9$ e uma massa molecular teórica de 515,2281 que corresponde ao íon precursor $[C_{28}H_{35}O_9]^+$, portanto para esta análise há um erro de massa de -1,75 ppm, que é um valor aceitável para anotação de um metabólito. A Figura 1.75 mostra o sinal analítico em MS para o acetato limonina.

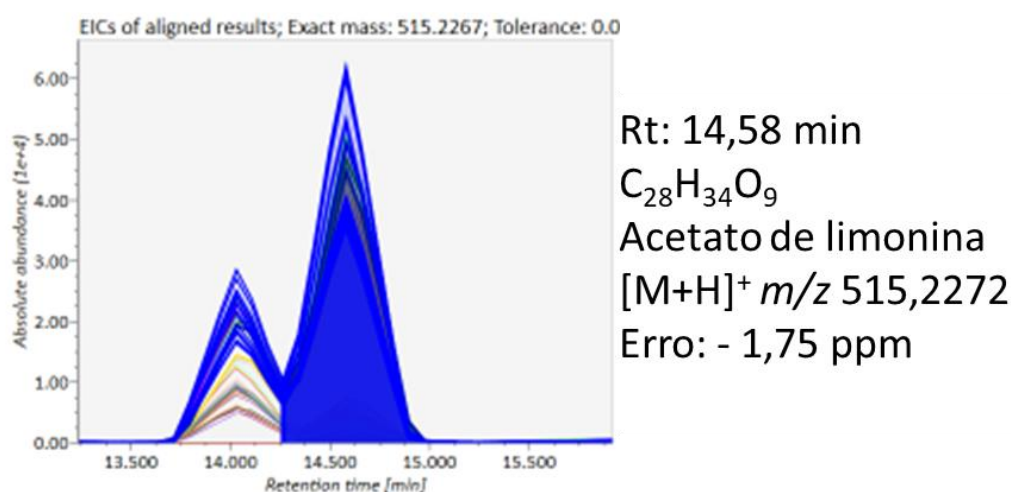


Figura 1.91. Sinal analítico em MS referente ao acetato de limonina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 515,2272 e $R_t = 14,58$ min.

O nodo referente ao acetato de limonina que está localizado no cluster denominado cluster da limonina (Figura 1.24); conecta-se com o nodo da limonina que possui $[M + H]^+$ de 471,2028. A diferença de massa entre os dois nodos é de 44,02 Da, indicando que ocorreu uma sequência da biossíntese da limonina, onde houve a substituição de um hidrogênio no anel B por uma unidade ($-C_2H_3O$), levando portanto a formação do acetato de limonina.

A anotação do acetato de limonina foi realizada através da análise da rede molecular, match espectral com as bibliotecas utilizadas no processamento dos dados e o estudo de fragmentação proposto através do espectro em MS/MS para este metabólito (Figura 1.92 e 1.93). A partir da análise do espectro de massas em MS/MS com energia de colisão de 20 e 25 V; é possível observar que a partir do íon precursor, ocorre uma perda de uma unidade de acetato ($C_2H_4O_2$) que equivale a - 60,02 Da, levando a formação do íon fragmento $[C_{26}H_{31}O_7]^+$ de m/z 455,2064. Em seguida uma perda de H_2O que equivale a - 18,01 Da, ocorre através da abertura do anel éter cíclico A, gerando o íon fragmento $[C_{26}H_{29}O_6]^+$ de m/z 437,1951. Posteriormente a abertura do anel D promove a perda de CO_2 que equivale a - 43,99 Da, gerando o íon fragmento $[C_{25}H_{29}O_4]^+$ de m/z 393,2062. Finalmente a perda de - 40,03 Da que corresponde a C_3H_4 ; propicia a formação do íon $[C_{22}H_{25}O_4]^+$ de m/z 353,1749, conforme observado nas Figuras 1.92 e 1.93.

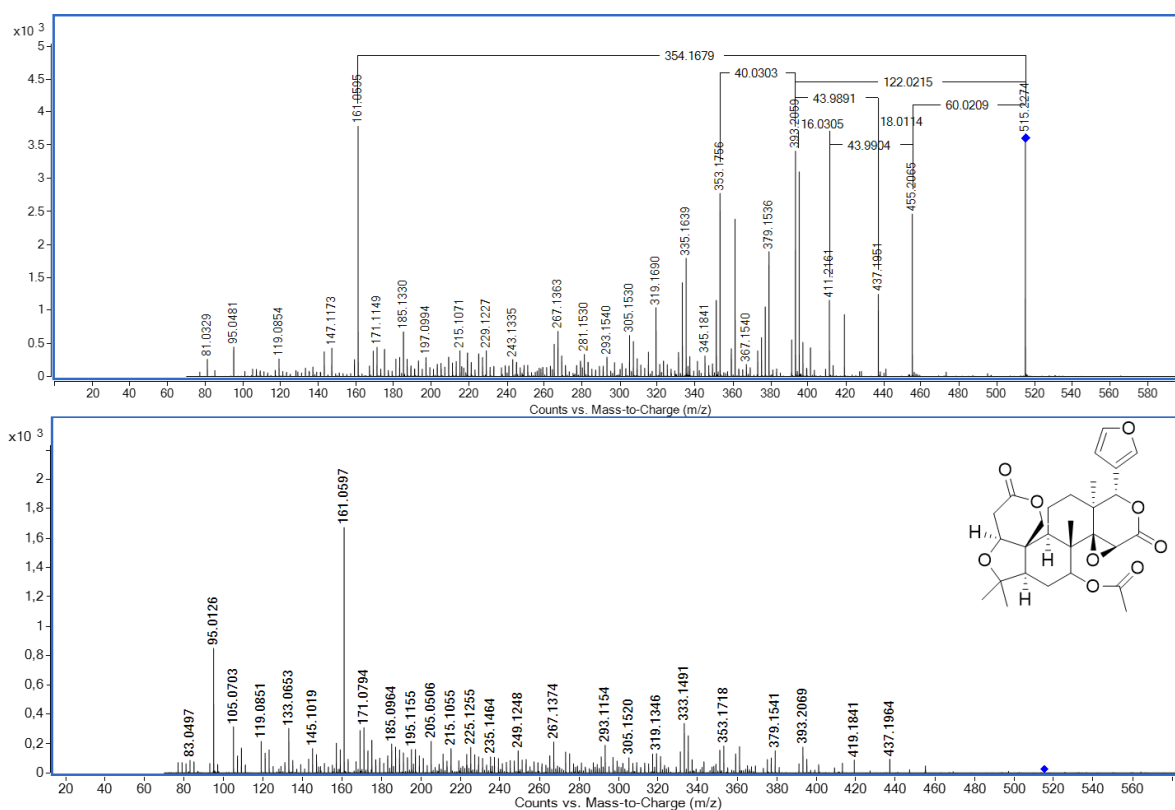


Figura 1.92. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, do acetato de limonina $[M+H]^+$ 515,2272 - Rt = 14,58 min em EC = 20 e 25V.

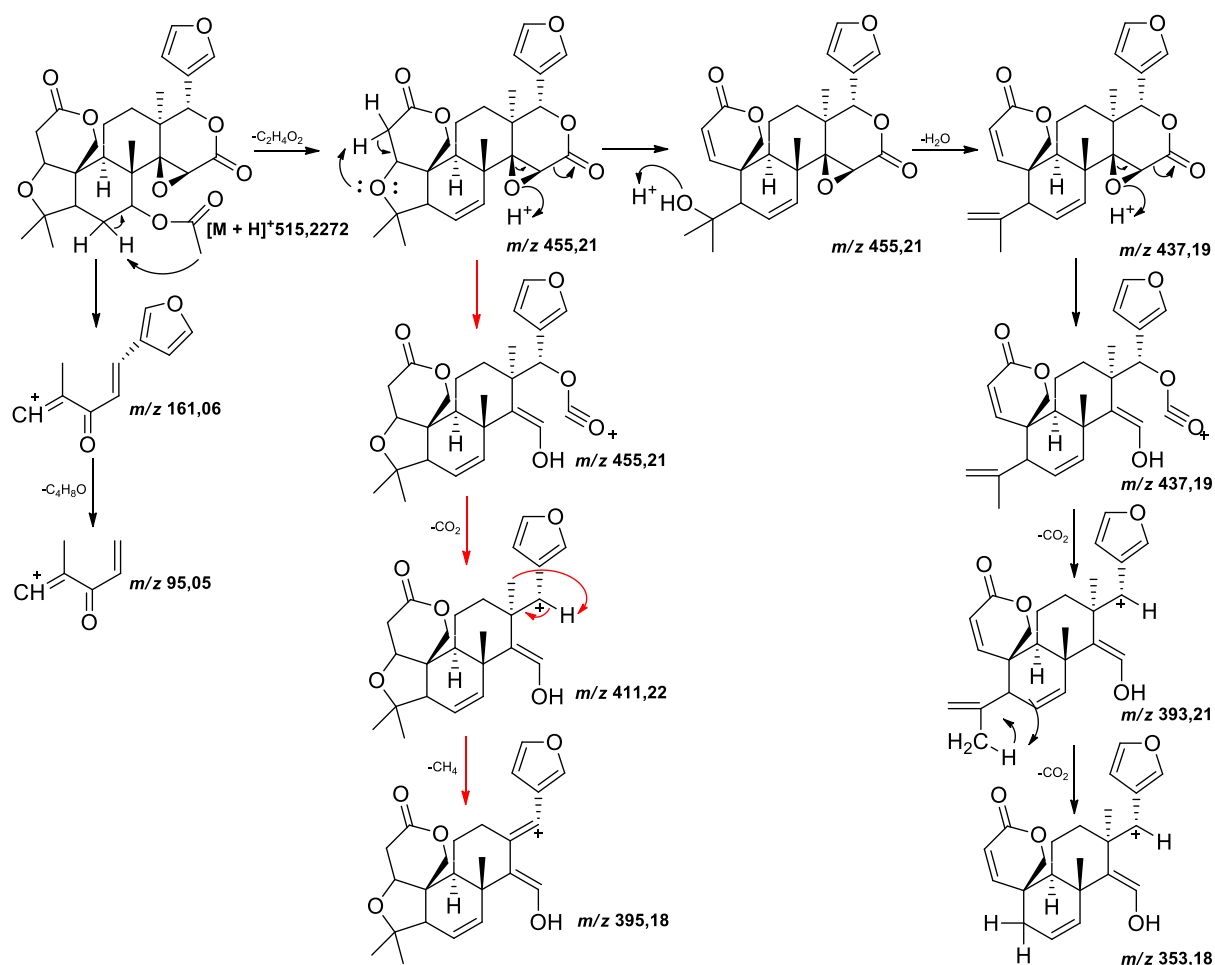


Figura 1.93. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para o acetato de limonina $[M+H]^+$ 515,2272.

A partir do íon fragmento de m/z 455,2064; é proposto a ocorrência da abertura do anel D para posterior perda de uma unidade de CO_2 ; que equivale a perda de massa de - 43,99 Da, levando a formação do íon $[C_{25}H_{31}O_5]^+$ de m/z 411,2161. Subseqüentemente a perda de CH_4 promovida a partir da captura de um hidrogênio pelo carbono da metila ligada ao anel D, gera o íon fragmento $[C_{24}H_{27}O_5]^+$ de m/z 395,1856.

Outra fragmentação a partir do íon precursor ocorre para gerar o íon base $[C_{10}H_9O_2]^+$ de m/z 161,0596. Este íon é altamente estável, o que justifica sua elevada intensidade observada no espectro de MS/MS e é característico do perfil de fragmentação de limonoides onde sua formação é esperada para esta classe de metabólitos. Em seguida a perda do anel furano gera o íon fragmento $[C_6H_7O]^+$ de m/z 95,0481.

Os dados em MS para o acetato de limonina foram tabulados e submetidos a análise estatística empregando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95% de confiança. O gráfico referente a esta análise está demonstrado na Figura 1.94; onde foram comparados os tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas sadias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação.

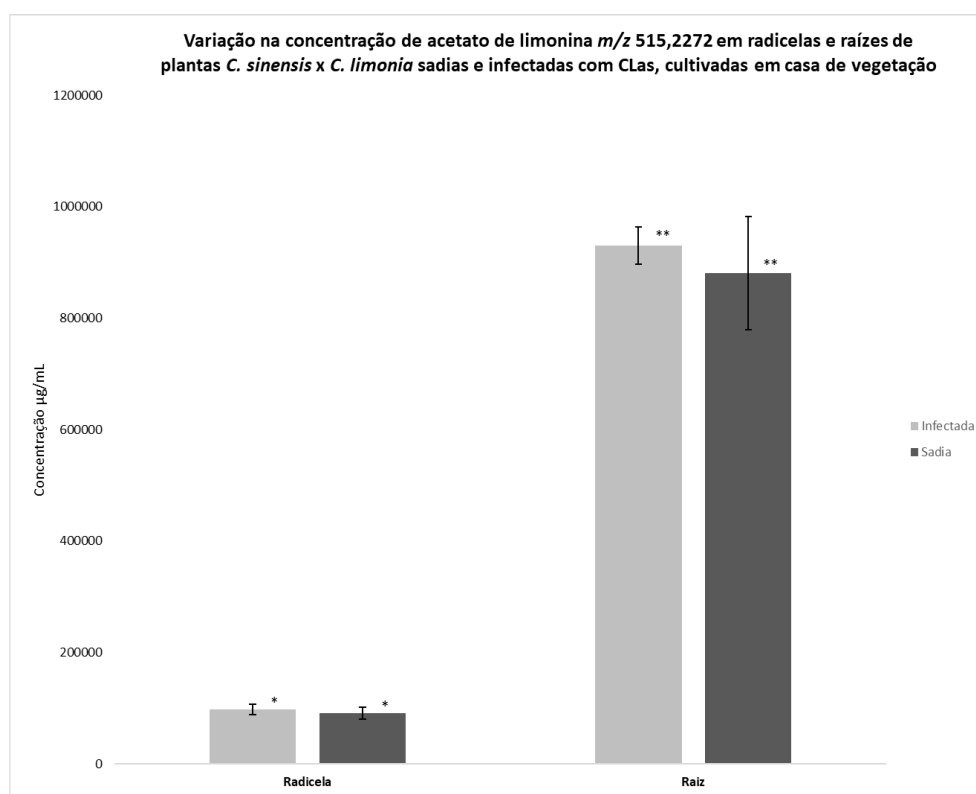


Figura 1.94. Variação na concentração relativa de acetato de limonina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

Analisando o gráfico observa-se que a produção de acetato de limonina não se difere de forma estatisticamente significativa quando compara-se radículas de plantas sadia frente àquelas infectadas com CLas, nem quando compara-se raízes de plantas sadias frente aquelas infectadas. Este metabólito portanto não é considerado responsivo à doença HLB.

A única diferença observada é que durante a comparação entre a produção de acetato de limonina nas raízes frente as radículas de *C. sinensis* x *C. limonia*, a produção deste metabólito é aproximadamente 10 vezes maior nas raízes. Dessa maneira, conclui-se que a produção e acumulação de limonoides tem uma tendência de ser maior na raiz principal, inferindo que os genes responsáveis pela biossíntese desta classe são mais expressos neste tecido da planta.

1.4.5.18 Anotação para deoxilimonina

Após os processamentos necessários, foi anotado o composto com $R_t = 15,52$ min de $[M + H]^+$ 455,2066, como a substância deoxilimonina, que possui fórmula molecular de $C_{26}H_{30}O_7$ e um erro de -0,88 ppm. A deoxilimonina foi anotada a partir do match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, de análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar – INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação de massas e através da avaliação da rede molecular.

O nodo correspondente a deoxilimonina está localizado no cluster da limonina, cluster no qual foram anotados exclusivamente limonoides (Figura 1.24), e conecta-se com o nodo da limonina de $[M + H]^+$ 471,2028. A diferença de massa entre os dois nodos é de 15,99 Da, possibilitando atribuir que essa diferença de massa devido a ausência do oxigênio na forma de epóxido no anel D, levando portanto a anotação da deoxilimonina. A Figura 1.95 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{26}H_{30}O_7]^+$.

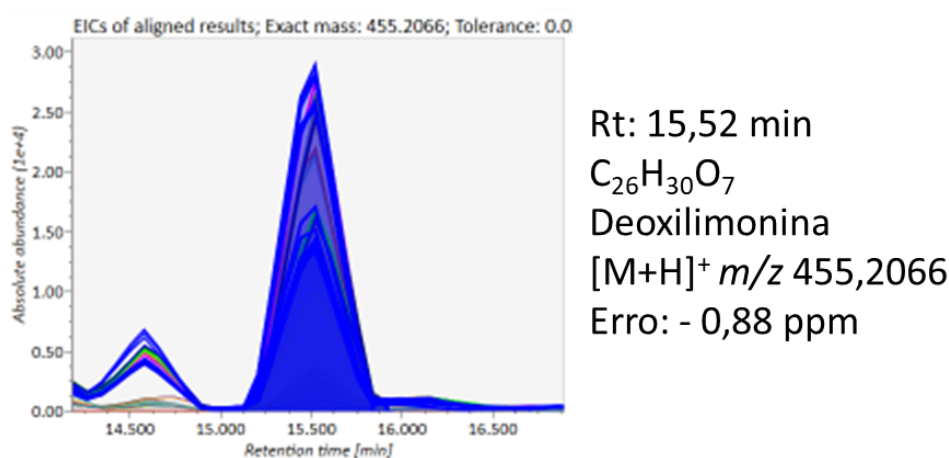


Figura 1.95. Sinal analítico em MS referente a deoxilimonina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M + H]^+$ 455,2066 e $R_t = 15,52$ min.

A anotação da deoxilimonina foi determinada e só foi possível a partir da análise do espectro de massas em MS/MS, obtido em energia de colisão de 20 e 25 V (Figura 1.96). De acordo com os fragmentos observados foi proposto o mecanismo de fragmentação de massas para esta substância, conforme apresentado na Figura 1.97.

A partir do íon precursor observa-se a perda de H₂O que equivale a - 18,01 Da. Esta perda ocorre através da abertura do anel furano A, gerando o íon fragmento [C₂₆H₂₉O₆]⁺ de *m/z* 437,1956. Posteriormente a abertura do anel D promove a perda de CO que equivale a - 43,99 Da, levando a formação de um anel éter cíclico A. Sendo assim é gerado o íon fragmento [C₂₅H₂₉O₄]⁺ de *m/z* 393,2062 (Figura 1.96 e 1.97).

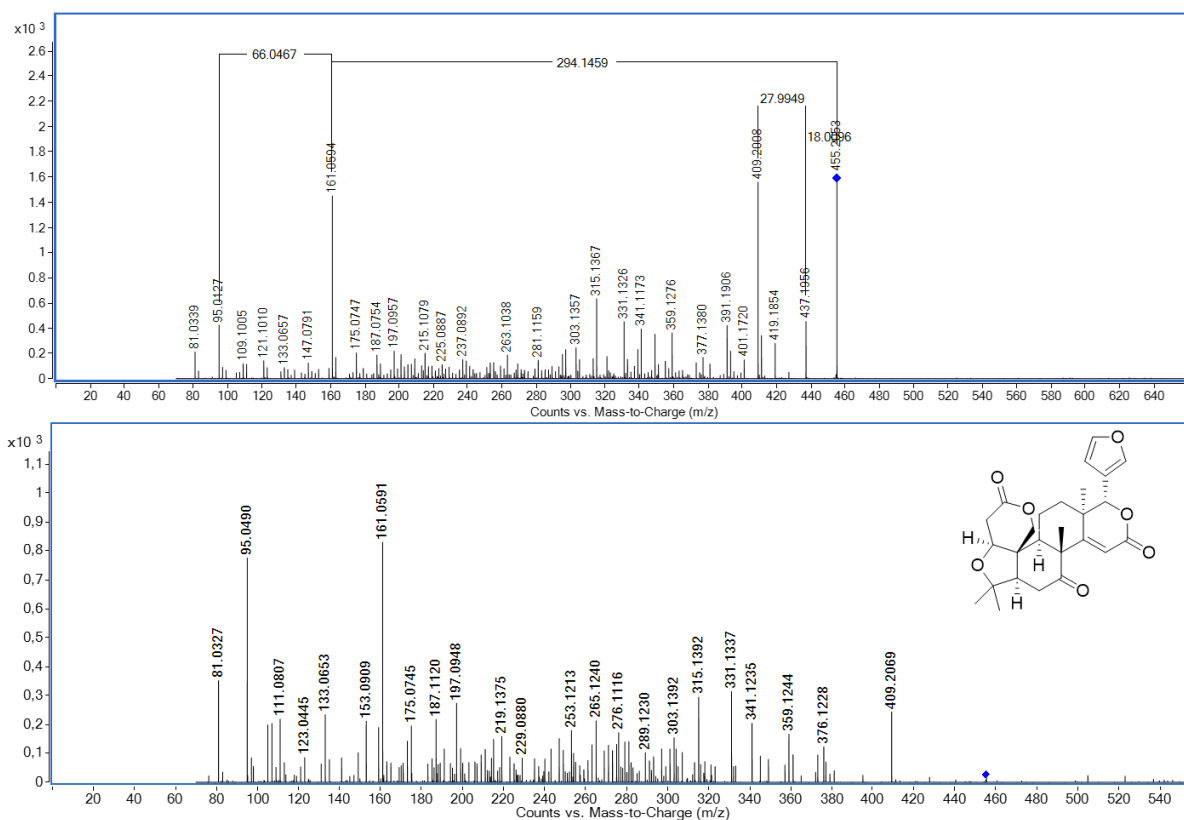


Figura 1.96. Espectro de massas MS/MS ESI - positivo, da deoxilimonina [M+H]⁺ 455,2066- Rt = 15,52 min em EC = 20 e 25V.

Outra fragmentação a partir do íon precursor ocorre para gerar o íon base [C₁₀H₉O₂]⁺ de *m/z* 161,0596, conforme já demonstrado anteriormente para os demais limonoides anotados. Este íon é altamente estável, o que justifica sua elevada intensidade observada no espectro de MS/MS e é característico do perfil de fragmentação de limonoides onde sua formação é esperada para esta classe de

metabólitos. Em seguida a perda do anel furano gera o íon fragmento $[C_6H_7O]^+$ de m/z 95,0481 (Figura 1.96 e 1.97).

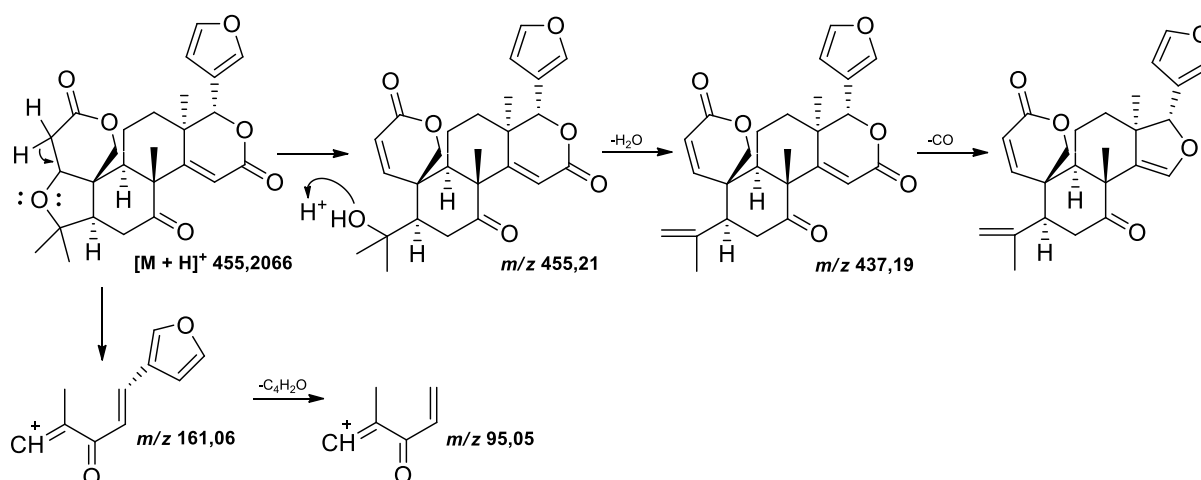


Figura 1.97. Proposta de fragmentação ESI - positivo, para a deoxilimonina $[M+H]^+$ 455,2066.

Após a anotação para a deoxilimonina; os dados em MS com $R_t = 15,52$ min e m/z 455,2066 para todas as amostras e para todos os tratamentos avaliados; foram tabelados e apresentados em forma gráfica conforme mostrado na Figura 1.98. Os dados também foram submetidos à análise estatística empregando o teste t pareado em par de médias e foram comparados os seguintes pares: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudáveis e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. A deoxilimonina não foi detectada nas raízes de plantas saudáveis e infectadas com CLas cultivadas *in vitro*.

Analisando o gráfico da Figura 1.98 observa-se que não há diferença estatisticamente significativa na quantidade de deoxilimonina entre os tratamentos referentes a plantas saudáveis e infectadas com CLas; tanto para as raízes quanto para as radículas de *C. sinensis* x *C. limonia*. A única diferença evidenciada é com relação a quantidade de deoxilimonina distribuída e acumulada nos tecidos avaliados, é possível observar que a concentração desta substância é muito maior nas raízes quando comparada com as radículas; sendo assim é comprovado mais uma vez a tendência de acumulação de limonoides preferencialmente nas raízes principais de citrus. Há fortes evidências de que os genes responsáveis pela biossíntese desta classe de substâncias são mais expressos nas raízes de citrus.

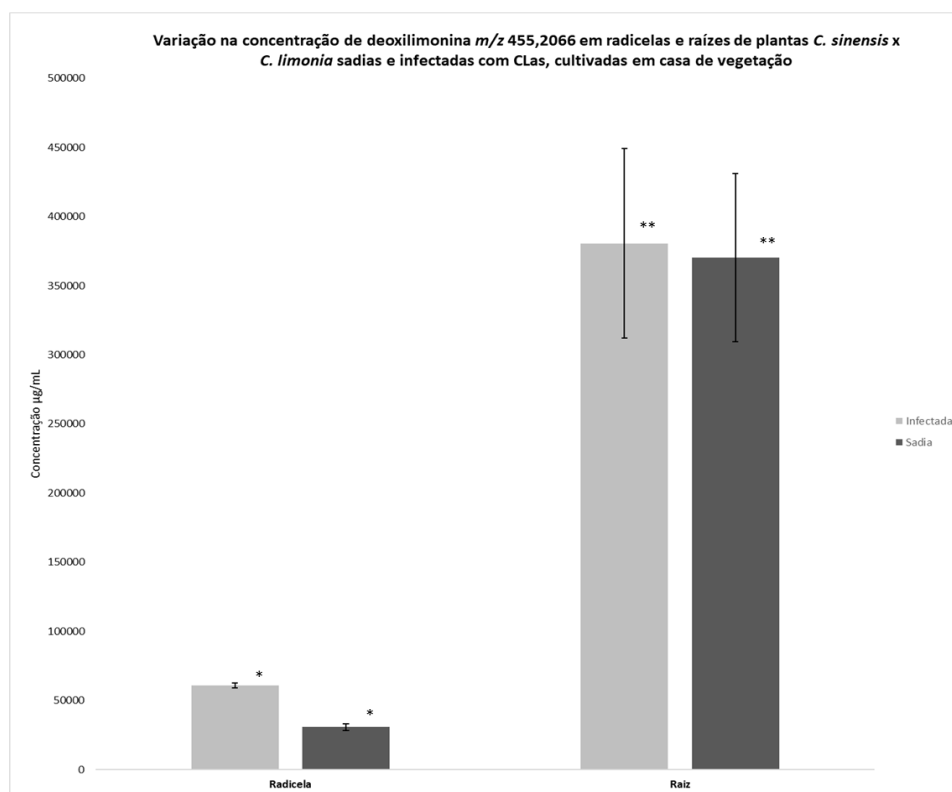


Figura 1.98. Variação na concentração relativa de deoxilimonina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLAs, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.6 Rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização

Com o intuito de entender estas diferenças e identificar os compostos que sejam responsivos a infecção por CLAs em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* cultivadas em casa de vegetação e raízes de plântulas de *C. sinensis* sadias e infectadas cultivadas *in vitro*, foi realizado o pré processamento dos dados utilizando o software MS Dial para a avaliação dos mesmos através de rede molecular utilizando a plataforma GNPS.

A Figura 1.99 mostra a rede molecular obtida no modo negativo de ionização para RPS em azul, RPI em amarelo, RdPS em verde e Rdpl em vermelho. Cada nodo corresponde a um íons com determinada relação *m/z* e cada nodo está

representado em diferentes cores de acordo com a distribuição destes íons em cada um dos tratamentos avaliados.

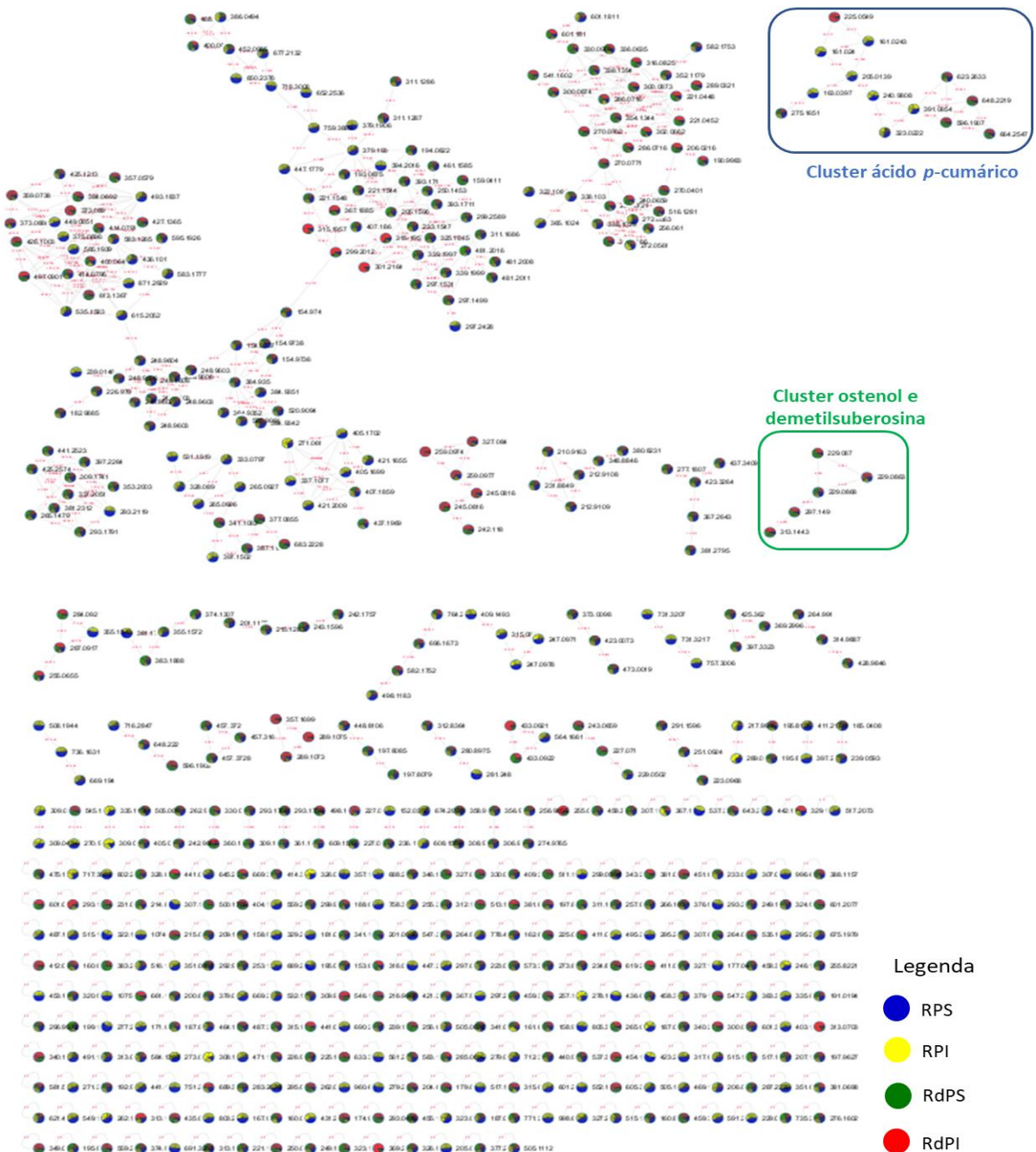


Figura 1.99. Rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação.

A distribuição dos íons foi realizada de acordo com a área do seu respectivo sinal analítico em MS, sendo esta considerada uma análise quantitativa relativa. É possível observar que foram obtidos como resultado do processamento e

procedimento de deconvolução espectral utilizando a abordagem FBMN, 523 íons, agrupados em 28 clusters com 3 ou mais nodos e 19 clusters com 2 nodos. Destes 523 íons observados, 240 íons não foram agrupados em nenhum dos clusters da rede molecular. Para esta análise foram anotados 3 íons dentre eles: o ácido *p*-cumárico m/z 163,0397; no cluster do ácido *p*-cumárico (Figura 1.100). A demetilsuberosina m/z 229,0870 e o ostenol m/z 229,0863; no cluster da demetilsuberosina e ostenol (Figura 1.100). É importante destacar que alguns íons que foram anotados a partir das análises no modo positivo de ionização também foram anotados no modo negativo de ionização, mas não serão discutidos nem apresentados por já terem sido discutidos anteriormente.

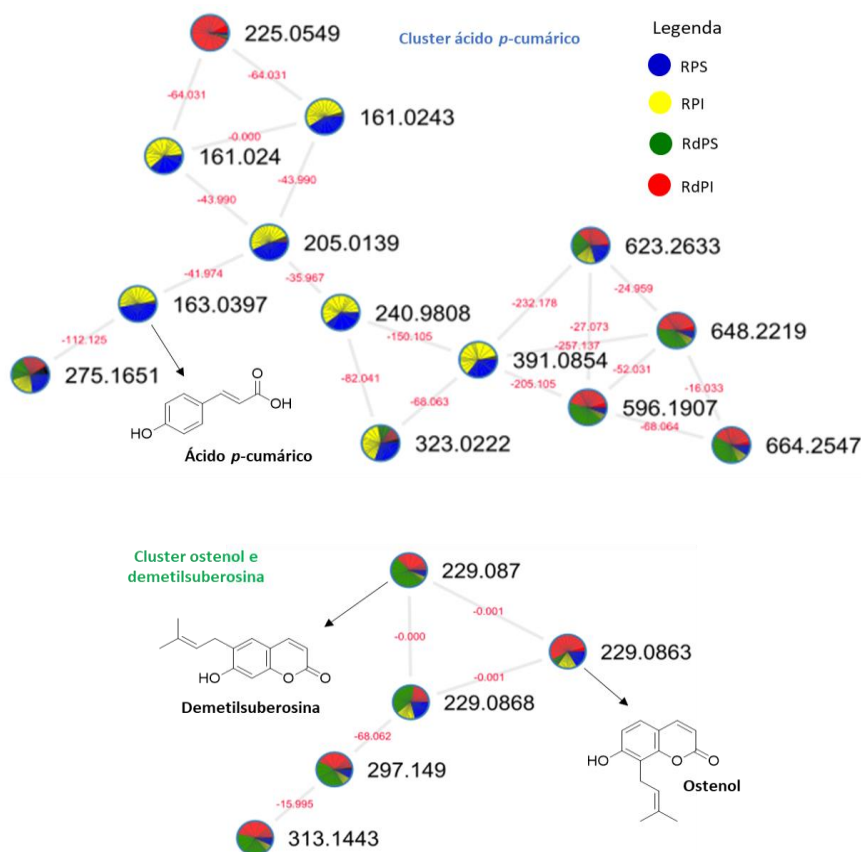


Figura 1.100. Cluster do ácido *p*-cumárico e cluster do ostenol e demetilsuberosina da rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS e PdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI).

O mesmo foi realizado para modo negativo de ionização, utilizando a abordagem do FBMN via plataforma GNPS, para RPS_{iv} em verde, RPI_{iv} em vermelho (Figura 1.101).

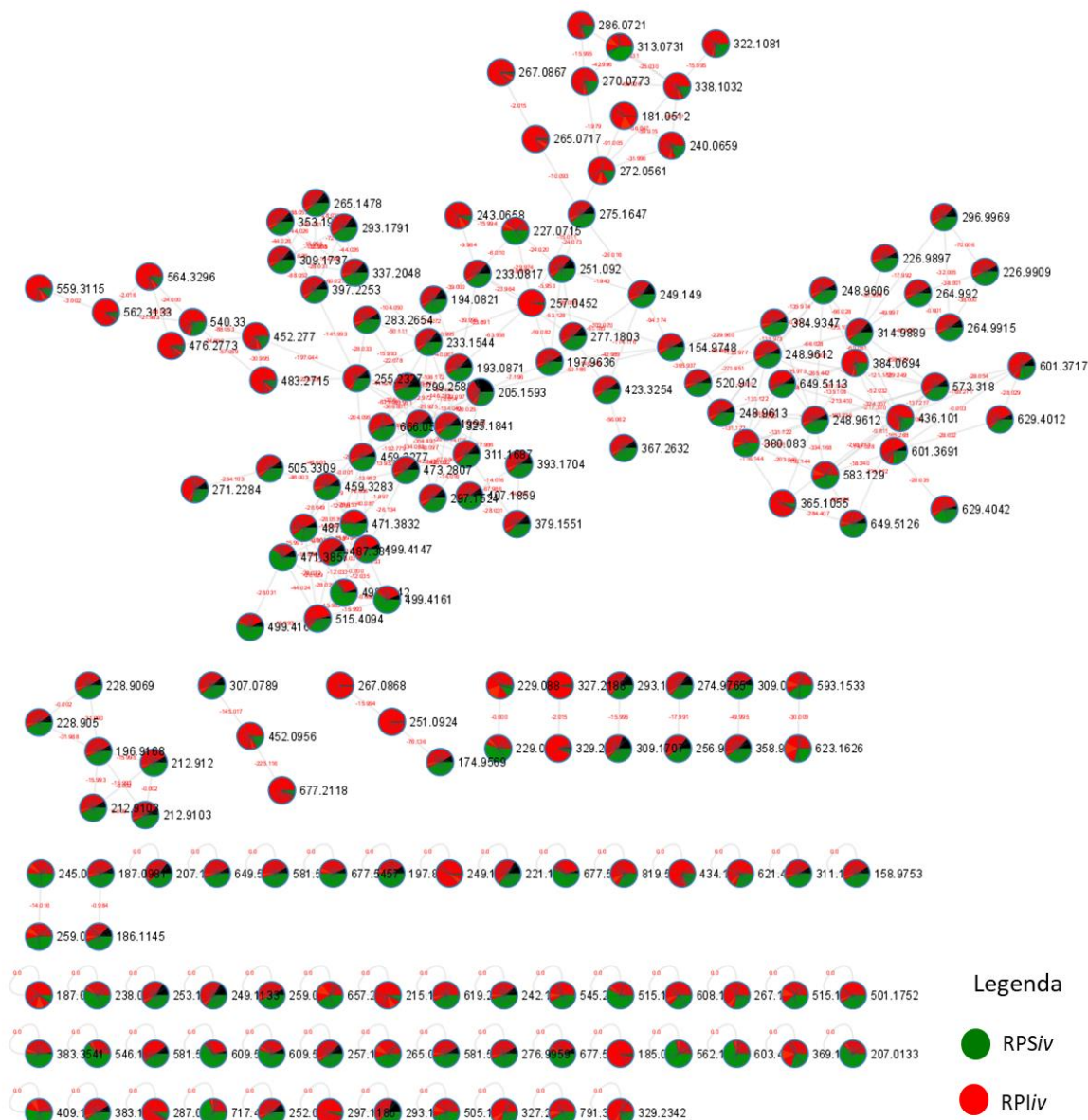


Figura 1.101. Rede molecular via GNPS em modo negativo de ionização em raízes de plântulas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLAs (RPliv) cultivadas *in vitro*.

Através da análise da rede molecular obtida na plataforma GNPS após o processamento e deconvolução espectral utilizando a abordagem FBMN. Foram observados 171 íons, agrupados em 4 clusters contendo três ou mais íons e 8 clusters compostos por apenas dois íons/nodos. Desse total de íons, 54 íons não foram agrupados em nenhum cluster e encontram-se isolados na rede molecular. A partir da análise da rede molecular obtida para os íons detectados na análise de espectrometria de massas em amostras de raízes de plantas sadias e infectadas

com CLas cultivadas *in vitro*, não foi possível anotar nenhum metabólito (Figura 1.101).

1.4.6.1. Anotação para o ácido *p*-cumárico

A partir do processo de deconvolução espectral, aplicando as ferramentas necessárias para molecular networking, foi possível atribuir que o íon de $[M - H]^-$ 163,0396 e com $R_t = 5,70$ min corresponde ao ácido *p*-cumárico. Esta substância possui fórmula molecular $C_9H_8O_3$ e uma massa molecular teórica desprotonada de 163,0395 que corresponde ao íon precursor $[C_9H_7O_3]^-$, portanto para esta análise há um erro de massa de 0,61 ppm, que é um valor aceitável para anotação de um metabólito. O nodo desta substância está localizado no cluster denominado cluster do ácido *p*-cumárico (Figura 1.100). A Figura 1.102 mostra o sinal analítico em MS para o ácido *p*-cumárico.

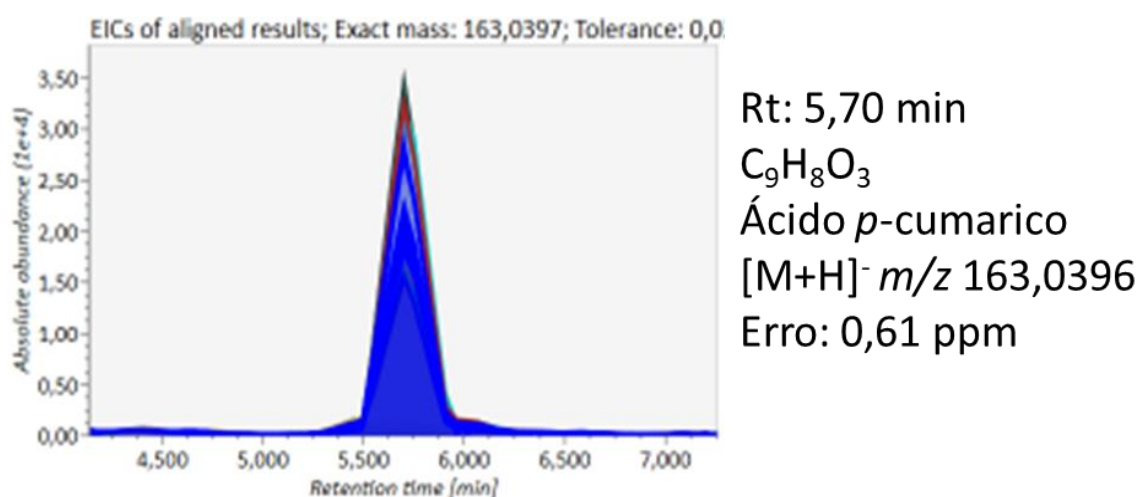


Figura 1.102. Sinal analítico em MS referente ao ácido *p*-cumárico após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M - H]^-$ 163,0396 e $R_t = 5,70$ min.

A Figura 1.101 mostra o espectro de massas em MS/MS no modo negativo de ionização em energia de colisão de 22 e 20V respectivamente; para o ácido *p*-cumárico. Através da análise deste, observa-se que a partir do íon precursor há a formação do íon fragmento $[C_8H_7O]^-$ de m/z 119,0502, que ocorre devido a perda de massa de - 43,99 Da, que corresponde a perda de CO_2 , conforme proposto no mecanismo de fragmentação de massas apresentado na Figura 1.104. Em seguida uma perda de C_2H_2 , que corresponde a -26,02 Da, gera o íon fragmento $[C_6H_5O]^-$ de m/z 93,0343.

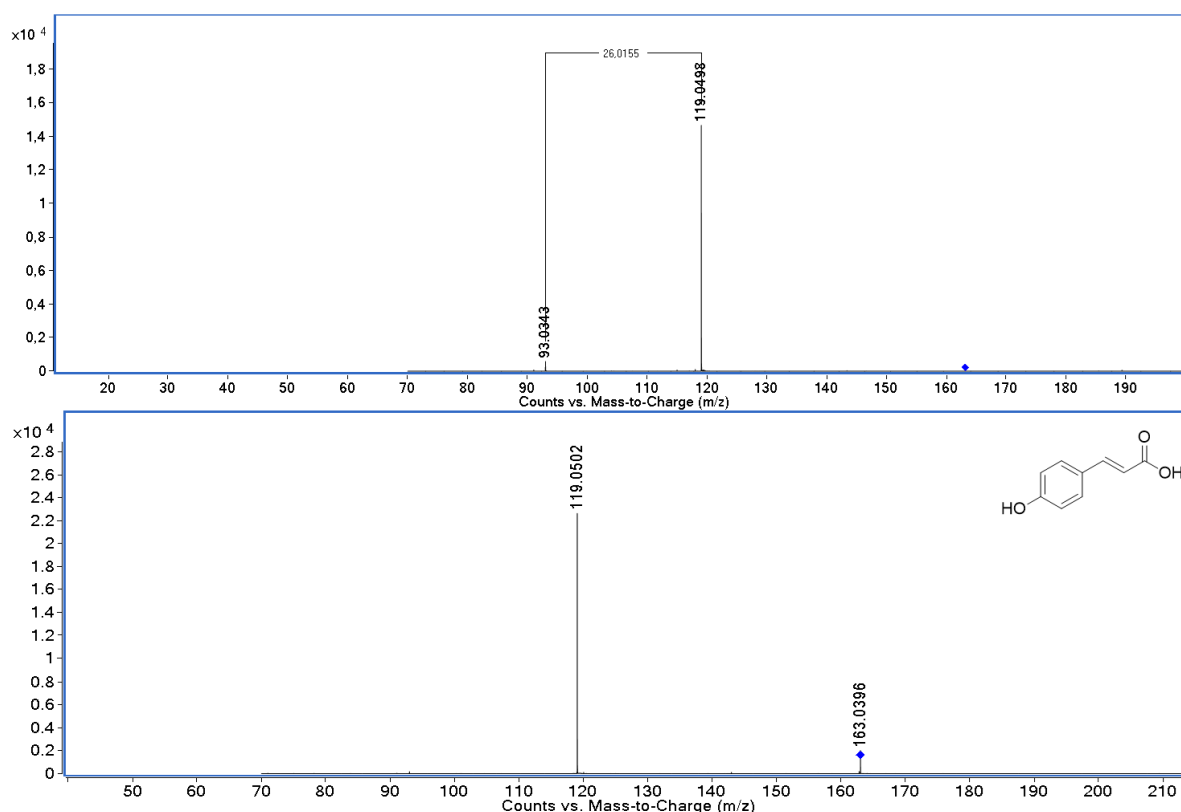


Figura 1.103. Espectro de massas MS/MS ESI - negativo, do ácido *p*-cumárico [M-H]⁻ 163,0396- Rt = 5,70 min em EC = 22 e 20V.

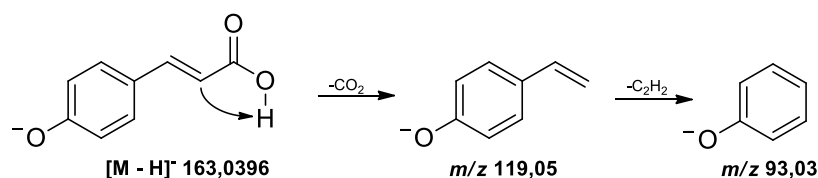


Figura 1. 104. Proposta de fragmentação ESI - negativo, para o ácido *p*-cumárico [M-H]⁻ 163,0396.

Diante da notação do ácido *p*-cumárico, foram plotados os dados referente a área do pico em MS para esta substância e os mesmos foram avaliados por análise estatística empregando o teste t pareado em par de médias a um nível de 95 % de confiança, para todos os tratamentos monitorados. A análise foi realizada comparando os seguintes pares: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudas e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. O ácido *p*-cumárico não foi detectado nas plântulas cultivadas *in vitro*.

Os resultados desta análise e o gráfico obtido estão demonstrados na Figura 1.105. A partir deste gráfico, pode-se observar que não houve diferença

estatística na quantidade de ácido *p*-cumárico entre as radículas de plantas saudas e infectadas com CLas. O mesmo também é observado quando é comparado as raízes de plantas saudas e na presença da bactéria; portanto, este metabólito não é considerado como um marcador para a doença HLB.

A única diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança observada, é que a produção deste metabólito é maior nas raízes frente as radículas em plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* cultivadas em casa de vegetação.

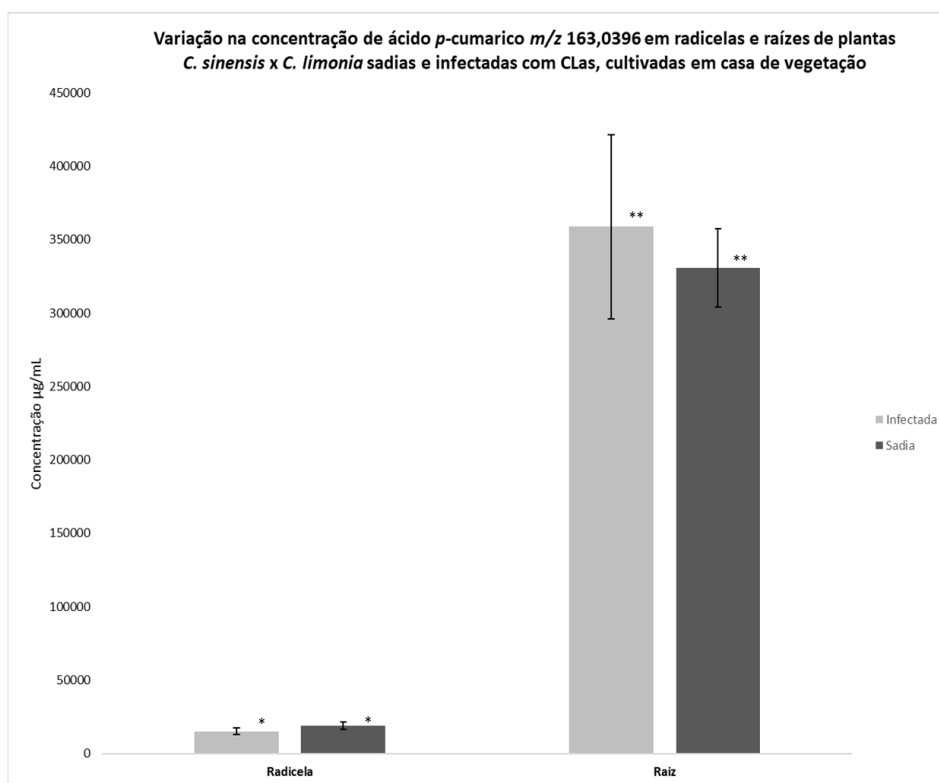


Figura 1.105. Variação na concentração relativa de ácido *p*-cumárico em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudas e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.6.2. Anotação para a demetilsuberosina

Ao analisar a rede molecular obtida após o tratamento dos dados e o processo de deconvolução espectral é possível observar o nodo de [M - H]⁻ 229,0861 com Rt = 11,18 min, localizado no cluster da demetilsuberosina e ostenol

(Figura 1.100). Após o match espectral com as bibliotecas utilizadas e análises preliminares das análises anteriores realizadas pelo Grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar - INCT Controle Biorracional de Insetos Praga (CBIP), pelo estudo de fragmentação este nodo foi anotado para a demetilsuberosina apresentando um erro de massa de -1,75 ppm. Este metabólito é uma 7-hidroxicumarina substituída na posição C-6 por um grupo 3-metilbut-2-en-1-il e é um intermediário prenilado responsável pela biossíntese de piranocumarinas lineares. A Figura 1.106 mostra o sinal analítico em MS para este composto que apresenta íon molecular $[C_{14}H_{13}O_3]^-$.

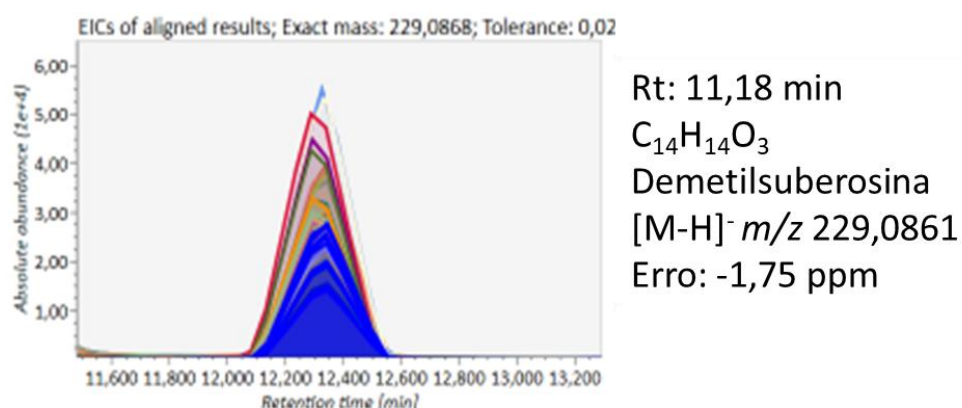


Figura 1.106. Sinal analítico MS referente a demetilsuberosina após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, $[M - H]^-$ 229,0861 e $R_t = 11,18$ min.

A caracterização da demetilsuberosina foi confirmada baseando-se no match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, no espectro de massas em MS/MS juntamente com o mecanismo de fragmentação da molécula, que pode ser visto nas Figuras 1.107 e 1.108. As fragmentações em MS/MS por ESI no modo negativo de ionização com energia de colisão de 22 e 20V apresentou a formação do íon fragmento $[C_{13}H_{10}O_3]^-$ de m/z 214,0639, que corresponde a perda radicalar de $\cdot CH_3$ a partir do íon precursor. Em seguida ocorre uma reação radicalar, promovendo a perda de C_3H_4 , gerando o íon base altamente estável $[C_{10}H_6O_3]^-$ de m/z 174,0315. Em seguida a perda de CO_2 no anel pirona gera um anel de 4 membros; formando o íon fragmento $[C_9H_6O]^-$ de m/z 130,0423.

Além desta, é possível observar também a perda de -27,99 Da a partir do íon base, que corresponde a perda de CO através da abertura do anel pirona e posterior ciclização para a formação de um anel furano, leva a formação do íon $[C_9H_6O_2]^-$ de m/z 146,0359. Sendo esta uma perda esperada por ser característica de esqueletos cumarínicos (Figura 1.107 e 1.108).

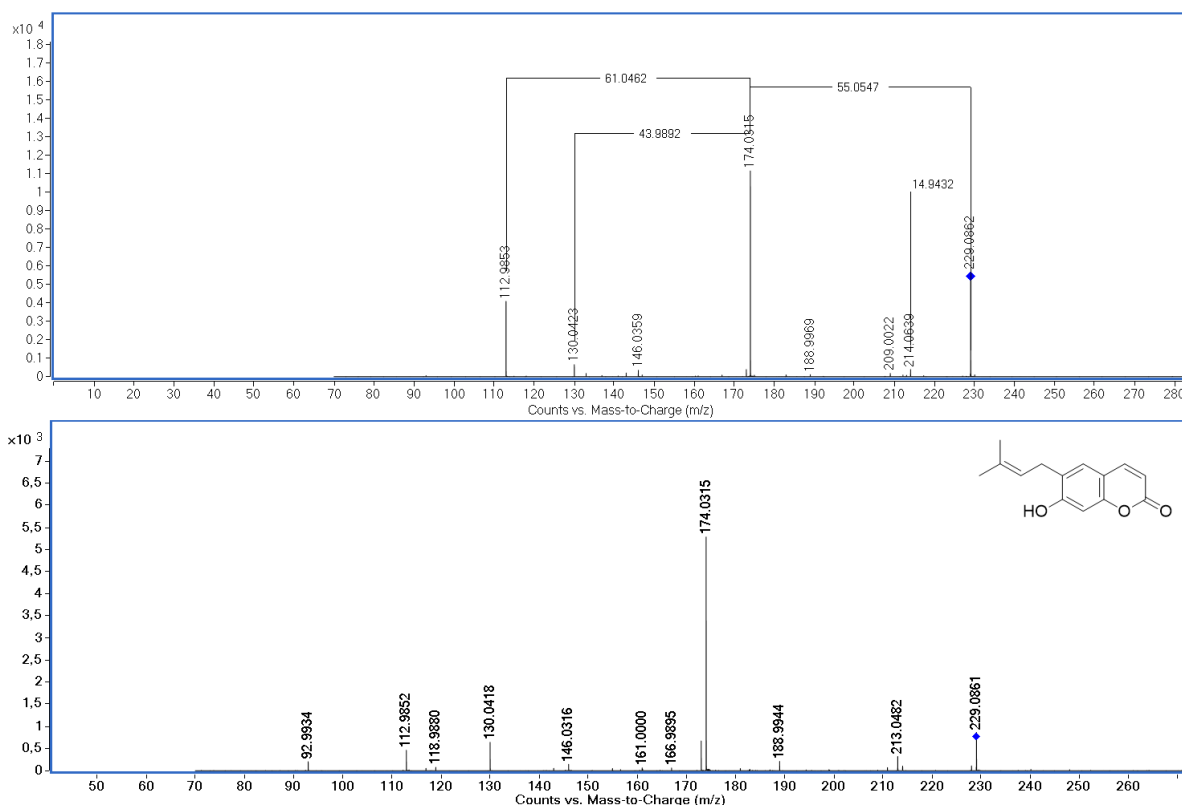


Figura 1.107. Espectro de massas MS/MS ESI - negativo, da demetilsuberosina $[M - H]^-$ 163,0396- Rt = 5,70 min em EC = 22 e 20V.

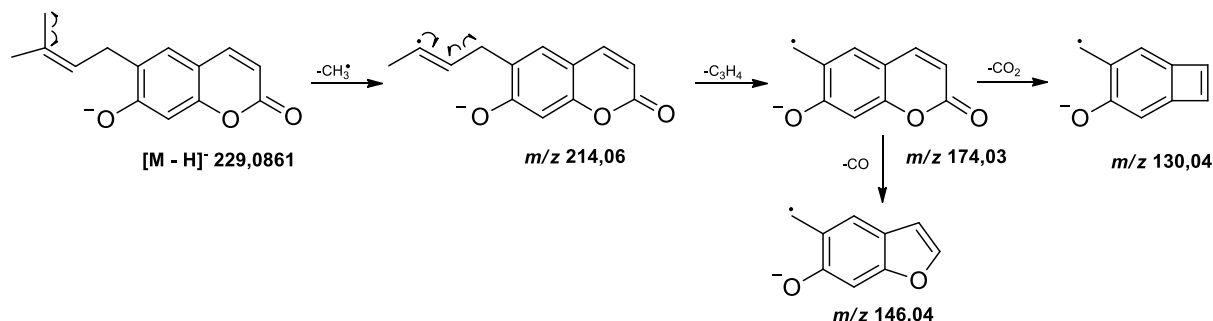


Figura 1.108. Proposta de fragmentação ESI - negativo, para a demetilsuberosina $[M-H]^-$ 229,0861.

Através da análise do gráfico mostrado na Figura 1.109 conclui-se que há diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança, na acumulação e quantidade deste metabólito com relação aos tecidos da planta. Nas radículas de *C. sinensis* x *C. limonia*, a produção deste é maior quando comparado às raízes.

Além disso observa-se que, comparando radículas sadias e infectadas com CLas, a produção de demetilsuberosina é estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança. Há uma resposta da planta na presença do patógeno;

em inibir a produção deste metabólito, onde a quantidade do mesmo quando a planta está infectada com CLas é aproximadamente 6 vezes menor frente àquelas sadias. Já em relação a quantidade de demetilsuberosina nas raízes de plantas sadias e infectadas com CLas, não há diferença estatisticamente significativa, pois a acumulação neste tecido equipara-se comparando os tratamentos avaliados (Figura 1.109).

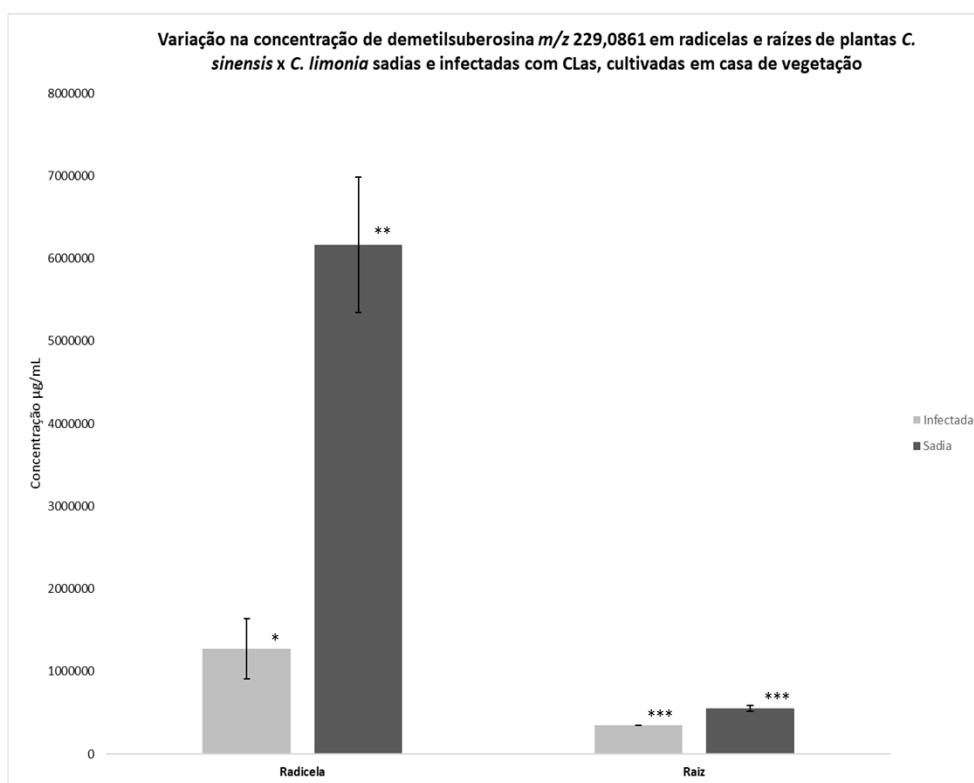


Figura 1.109. Variação na concentração relativa de demetilsuberosina em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.6.3. Anotação para o ostenol

A partir do processo de deconvolução espectral, aplicando as ferramentas necessárias para molecular networking, foi possível atribuir que o íon de m/z 229,0855 e com $R_t = 10,05$ min corresponde ao ostenol. O ostenol, possui fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_3$ e uma massa molecular teórica de m/z 245,1178 que corresponde ao íon precursor $[C_{14}H_{15}O_3]^-$, portanto para esta análise há um erro de

massa de -4,37 ppm, que é aceitável em MS, para anotação de um metabólito. Este metabólito é uma 7-hidroxycumarina substituída na posição C-8 por um grupo 3-metilbut-2-en-1-il e é um intermediário prenilado responsável pela biossíntese de piranocumarinas angulares.

O nodo referente ao ostenol está localizado no cluster do osteno e demetilsuberosina (Figura 1.100), e a diferenciação deste metabólito que é uma cumarina angular, prenilada em C-8 e hidroxilada em C-7 do seu isômero demetilsuberosina que é uma cumarina linear, prenilada em C-6 e hidroxilada em C-7, só foi possível devido o processamento aplicado, utilizando a abordagem FBMN. A diferença entre os dois isômeros está na posição da prenila, na demetilsuberosina ela se encontra em C-6 e no ostenol em C-8. A Figura 1.110 mostra o sinal analítico em MS para este composto.

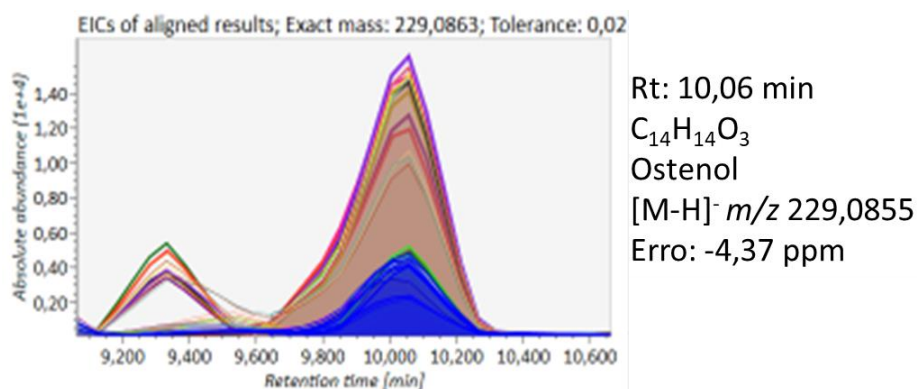


Figura 1.110. Sinal analítico em MS referente ao ostenol após deconvolução espectral, normalização e alinhamento, m/z 229,0855 e $Rt=$ 10,06 min.

A caracterização do ostenol foi confirmada baseando-se no match espectral com bibliotecas espectrais utilizadas, no espectro de massas em MS/MS juntamente com o mecanismo de fragmentação da molécula (Figura 1.111 e 1.112). As fragmentações por ESI no modo negativo de ionização apresentou poucos íons produtos diferentes entre os dois isômeros (demetilsuberosina e ostenol). O que foi determinante para a anotação correta de ambos os isômeros foi a presença do íon de m/z 214,0639 devido a perda de $\cdot\text{CH}_3$ ser observada somente para o derivado linear e a diferença da intensidade dos íons de m/z 174,03 e 112,98 entre os dois isômeros.

A partir do íon precursor observa-se a perda de $[\text{M} + \text{H} - 55,05 \text{ Da}]^+$ que corresponde a reação radicalar que promove a perda de C_4H_7 , levando a formação

do íon fragmento $[C_{10}H_6O_3]^-$ de m/z 174,0320. Em seguida, através da abertura do anel pirona, ocorre a perda de - 43,99 Da que corresponde a perda de CO_2 levando a formação do íon fragmento $[C_9H_6O]^-$ de m/z 130,0376.

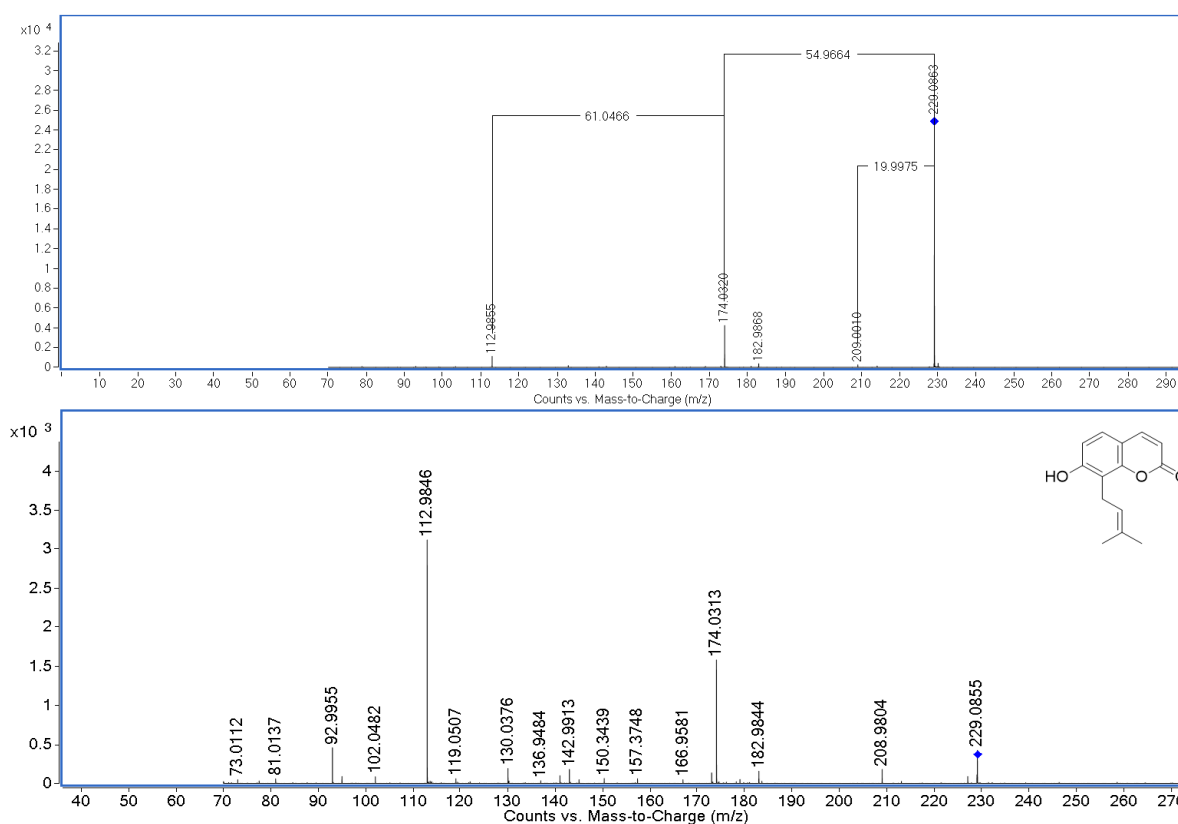


Figura 1.111. Espectro de massas MS/MS ESI - negativo, do ostenol $[M-H]^-$ m/z 163,0396- R_t = 5,70 min em EC = 22 e 20V.

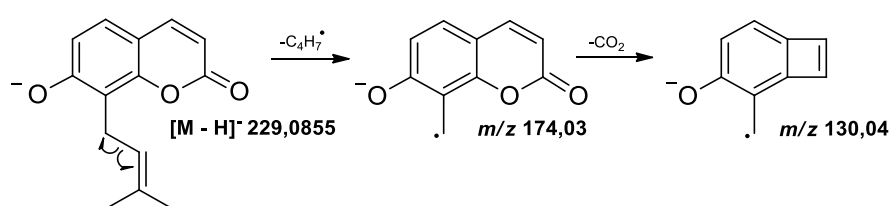


Figura 1.112. Proposta de fragmentação ESI - negativo, para o ostenol $[M-H]^-$ de m/z 229,0855.

Após a caracterização do ostenol por LC-MS utilizando a plataforma GNPS e o tratamento de dados pelo software MS-DIAL, a área referente ao pico em MS com R_t = 17,33 min foi determinada para as amostras de raízes e radículas de plantas sadias e infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação. O ostenol não foi detectado nas plântulas cultivadas *in vitro*. Estes dados foram tabulados e plotados, como mostra a Figura 1.113. Foi também empregado o teste t pareado

para duas amostras em par de médias a um nível de significância de 95%, comparando os seguintes tratamentos: RPS e RdPS, RPI e RdPI, RPS e RPI, RdPS e RdPI referentes a raízes e radículas de plantas saudias e sintomáticas infectadas com CLas cultivadas em casa de vegetação.

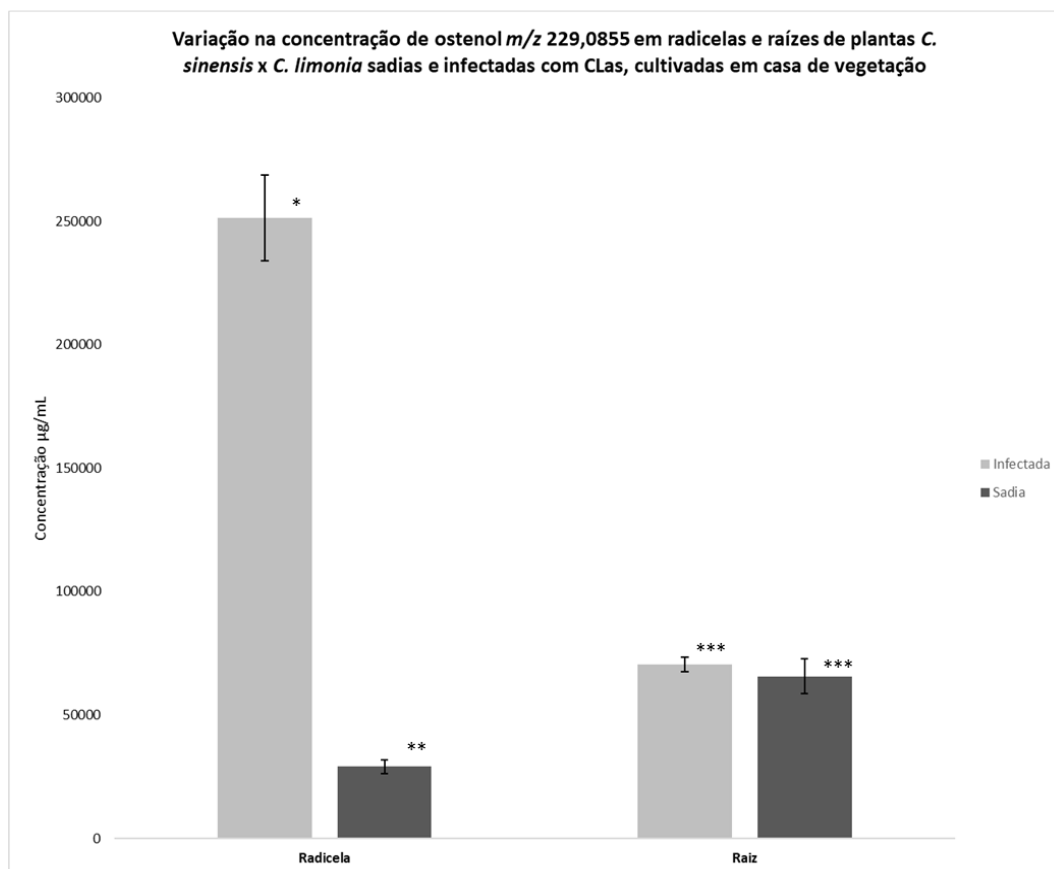


Figura 1.113. Variação na concentração de ostenol em radículas e raízes de plantas *C. sinensis* x *C. limonia* saudias e infectadas com CLas, cultivadas em casa de vegetação.

As duas amostras, a RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .
 As duas amostras, a RPS e RPI, não são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, a RdPS e RPS, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.
 As duas amostras, RdPI e RPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

Através da análise do gráfico mostrado na Figura 1.113 conclui-se que há diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança, na acumulação e quantidade deste metabólito com relação aos tecidos da planta. Nas radículas de citros, a produção deste é aproximadamente 5 vezes maior quando comparado às raízes. Dentro deste cenário, é possível correlacionar que a produção de derivados de cumarinas angulares tem maior produção nas radículas que nas

raízes, sendo assim, podemos inferir que o gene responsável pela prenitação em C-8 possui maior expressão e acumulação nas radículas da planta.

Além disso observa-se que, comparando radículas saudáveis e infectadas com CLAs, a produção de ostol é estatisticamente significativa a um nível de 95%. A quantidade deste metabólito é muito maior em radículas de plantas contaminadas com a bactéria causadora do greening. Sendo assim, este derivado angular é um marcador da doença HLB em radículas de plantas de citros. Estes dados reforçam a proposta de que a presença do patógeno induz a inibição da rota de prenitação em C-6 em favor daquela em C-8 nas radículas de citros. Com relação a quantidade de ostol nas raízes de plantas saudáveis e infectadas com CLAs, não há diferença na produção deste, a acumulação neste tecido equipara-se comparando os tratamentos avaliados (Figura 1.58).

1.4.7 Análise Quimiométrica de Componente Principal (PCA)

Para entender a relação da quantidade de cada metabólito através dos espectros de massas obtidos nas análises de LC-HRMS para os modos positivo e negativo de ionização, em todos os tratamentos avaliados, o conjunto de dados referente a área de todos os picos detectados em MS foram deconvoluídos e posteriormente analisados por análise quimiométrica de PCA.

O gráfico de *loadings* da PCA para PC1 x PC2, referente à média dos espectros em MS para o modo positivo de ionização é mostrado na Figura 1.114 - A, e os *scores* são mostradas na Figura 1.114 - B. A variância explicada devido ao primeiro e segundo componentes principais (PCs) foi de 67,6% (PC1 54,5%; PC2 13,4%). A análise dos gráficos de *scores* mostra uma segregação predominante na parte negativa da PC1 referente às radículas saudáveis e infectadas (losangos verdes e vermelhos) e uma segregação predominante na parte positiva da PC1 referente às raízes saudáveis e infectadas (círculos azuis e amarelos), sendo possível observar a discriminação de dois grandes grupos. Há portanto uma diferenciação na composição de metabólitos em relação a sua quantidade entre raízes e radículas. Para as radículas é possível observar também que houve uma diferenciação na composição das amostras saudáveis e infectadas, mas que é melhor explicada quando avaliamos a PC1 x PC3 (Figura 1.115 - B).

Quando avaliamos o gráfico de *loadings* (Figura 1.114 - A), é demonstrado a influência das variáveis sobre as amostras, permitindo a atribuição de quais íons, dos quais foram identificados no presente trabalho, foram os responsáveis por essa classificação das amostras em PC1 x PC2. O comportamento distinto apresentado entre as amostras de raízes e radículas ou seja, a discriminação da composição química entre as mesmas, foi causada pelos íons referentes a: esquimina, umbeliferona, aurapteno, xantiletina, suberosina, xantoxiletina, suberenol, clausarina, nordentatina, limonina, deoxilimonina e acetato de limonia para as raízes. Basicamente os limonoides, cumarinas simples, piranocumarinas lineares e seu intermediário, foram os responsáveis por esta discriminação. Para as radículas esta discriminação foi causada pelos íons referentes a: 3- acetilcumarina, citropteno, herniarina, seselina, ostol e 5-metoxiseselina, ou seja, algumas cumarinas simples e principalmente por piranocumarinas angulares e seu intermediário.

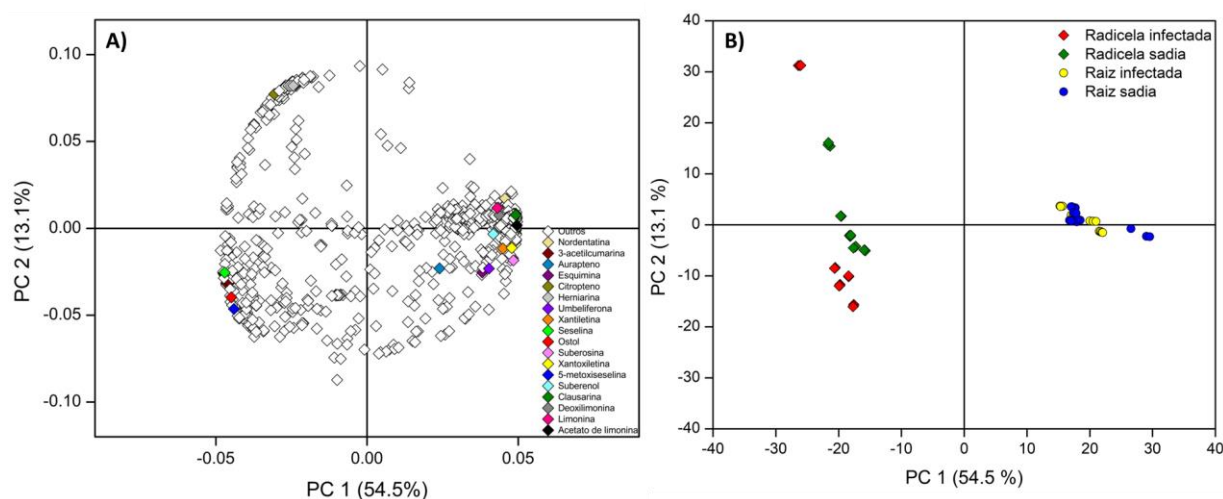


Figura 1.114. Análise de PCA em *loadings* (A) e *scores* (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação.

Analisando o gráfico de *loadings* da PCA para PC1 x PC3, referente à média dos espectros em MS para o modo positivo de ionização é mostrado na Figura 1.115 - A, e os *scores* são mostradas na Figura 1. 115 - B. A variância explicada devido ao primeiro e segundo componentes principais (PCs) foi de 61,3% (PC1 54,5%; PC3 6,8%). A análise dos gráficos de *scores* mostra mais uma vez uma segregação predominante na parte negativa da PC1 referente às radículas sadias e

infectadas (losangos verdes e vermelhos) e uma segregação predominante na parte positiva da PC1 referente às raízes sadias e infectadas (círculos azuis e amarelos), sendo possível observar a discriminação de dois grandes grupos: raiz e radículas.

Para as radículas é possível observar também que houve uma diferenciação na composição das amostras sadias e infectadas, há uma segregação predominante na parte negativa da PC3 referente às radículas sadias (losangos verdes) e na parte positiva da PC3 referente às radículas infectadas (losangos vermelhos) (Figura 1.115 - B). Já para as raízes não houve diferenciação na classificação entre sadias e infectadas, tanto para PC1 x PC2 (Figura 114 – B), como PC1 x PC3.

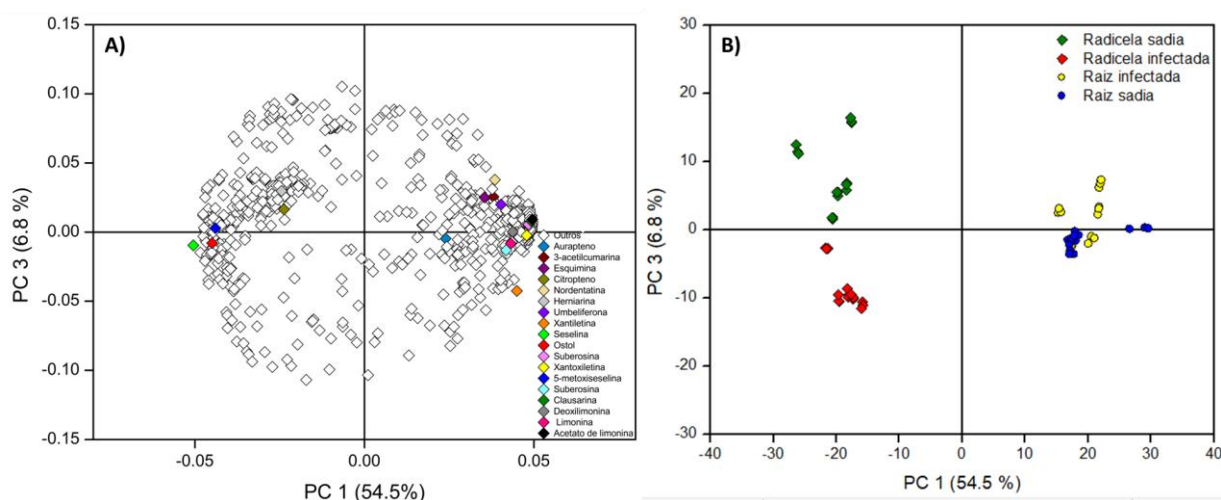


Figura 1. 115. Análise de PCA em *loadings* (A) e *scores* (B) para PC1 x PC3 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo positivo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação.

Quando avaliamos o gráfico de *loadings* (Figura 1.115 - A), é possível atribuir quais os íons, que foram identificados no presente trabalho, foram os responsáveis pela classificação das amostras. Para a diferenciação entre raízes e radículas, esta foi causada pelos mesmo íons observados em PC1 x PC2 (Figura 1.114 – A), com exceção do íon referente a 3-acetilcumarina. Para as amostras de radículas sadias os íons envolvidos nessa classificação foi o íon referente à herniarina e ao Citropteno, duas cumarinas simples. Para as amostras de radículas infectadas os íons responsáveis por esta classificação foram os referentes a: seselina, ostol e 5-metóxiseselina, duas piranocumarinas angulares e seu intermediário. Sendo assim,

há a comprovação da evidência de que piranocumarinas angulares e seu intermediário são responsivos à doença HLB em citros.

As mesmas análises também foram realizadas para o modo negativo de ionização. O gráfico de *loadings* da PCA para PC1 x PC2, referente à média dos espectros em MS para o modo negativo de ionização é mostrado na Figura 1.117 - A, e os *scores* são mostradas na Figura 1.117 - B. A variância explicada devido ao primeiro e segundo componentes principais (PCs) foi de 57,1% (PC1 38,1%; PC2 19,0%).

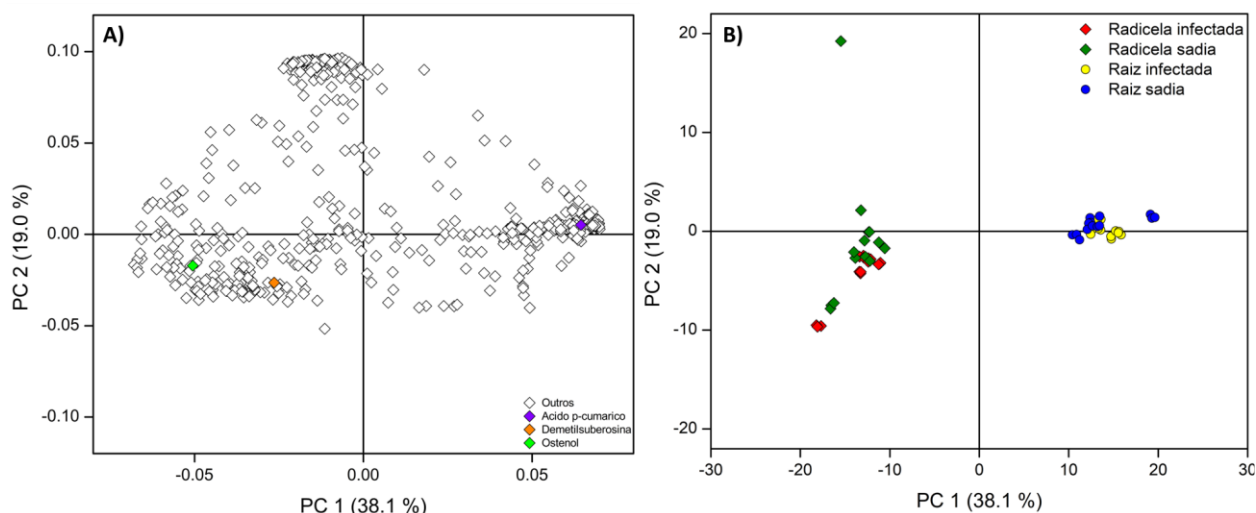


Figura 1.116. Análise de PCA em *loadings* (A) e *scores* (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação.

A partir da análise dos gráficos de *scores* é demonstrado uma segregação predominante na parte negativa da PC1 referente às radículas sadias e infectadas (losangos verdes e vermelhos) e uma segregação predominante na parte positiva da PC1 referente às raízes sadias e infectadas (círculos azuis e amarelos), sendo possível observar a discriminação de dois grandes grupos. Há, portanto, uma diferenciação na composição de metabólitos em relação a sua quantidade entre raízes e radículas. Tanto para as radículas quanto para as raízes, não é possível observar uma diferenciação na composição entre as amostras sadias e infectadas.

Ao realizar a análise do gráfico de *loadings* (Figura 1.116 - A), é demonstrado a influência das variáveis sobre as amostras, permitindo a atribuição dos íons, dos quais foram identificados no presente trabalho, foram os responsáveis

por essa classificação das amostras em PC1 x PC2. O comportamento distinto apresentado entre as amostras de raízes e radículas ou seja, a discriminação da composição química entre as mesmas, foi causada pelos íons referentes a: demetilsuberosina e ostenol para as radículas e do íon referente ao ácido *p*-cumárico para as raízes.

Os gráficos de *loadings* para PC1 x PC4, é mostrado na Figura 1.117 - A, e os *scores* são mostradas na Figura 1.117 - B. A variância explicada devido ao primeiro e segundo componentes principais (PCs) foi de 43,7% (PC1 38,1%; PC4 5,6%). A análise dos gráficos de *scores* de PC1 x PC4, assim como para PC1 x PC2 (Figura 116 – B), mostra uma segregação predominante na parte negativa da PC1 referente às radículas sadias e infectadas (losangos verdes e vermelhos) e uma segregação predominante na parte positiva da PC1 referente às raízes. Quando analisamos o gráfico de *loadings* é possível concluir que os íons responsáveis por esta classificação, também foram os mesmos observados na PC1 x PC2.

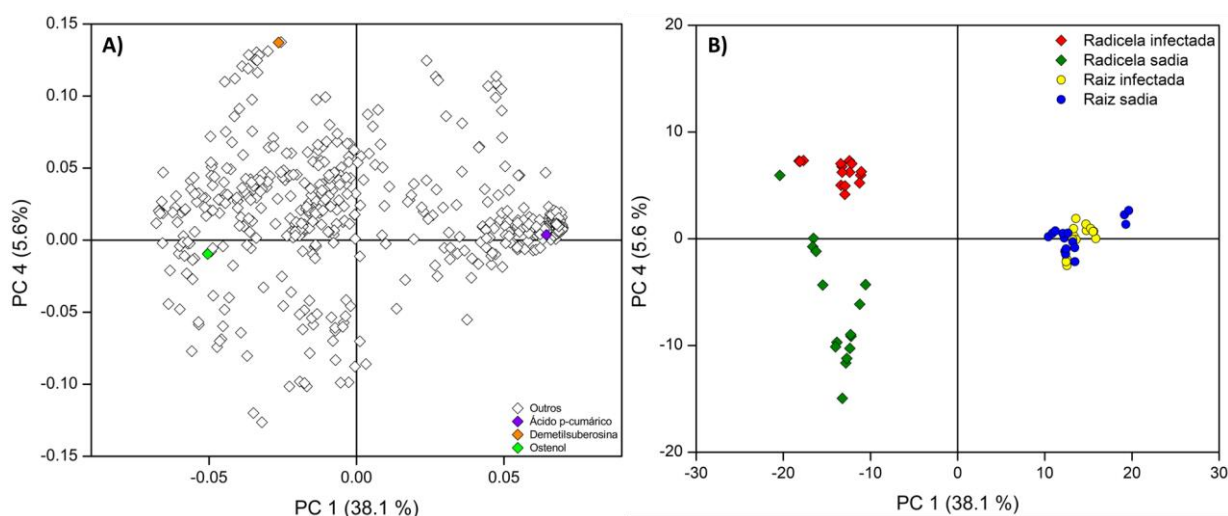


Figura 1.117. Análise de PCA em *loadings* (A) e *scores* (B) para PC1 x PC4 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo negativo de ionização em raízes e radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPs e RdPS) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPI e RdPI), cultivadas em casa de vegetação.

Para as amostras das raízes, não há uma classificação devido a diferença de composição entre sadias e infectadas. Porém, para as amostras de radículas já foi possível observar uma classificação referente a diferenciação da composição entre sadias e infectadas, conforme observado no gráfico de *scores* da Figura 1.117 - B. Quando analisamos o gráfico de *loadings* demonstrado na Figura 1.117 - A, podemos atribuir que o íon referente a demetilsuberosina foi o

responsável para a classificação das amostras de radículas sadias e o íon referente ao ostenol foi o responsável pela classificação das amostras de radículas infectadas. Com estes resultados podemos concluir que o intermediário de piranocumarinas lineares é mais abundante em radículas de plantas sadias, enquanto que o intermediário de piranocumarinas angulares é mais abundante em radículas de plantas infectadas. Sendo assim; mais uma vez; há a comprovação da evidência de que piranocumarinas angulares e seu intermediário são responsivos à infecção dos citros com a bactéria causadora de HLB.

Para as plântulas cultivadas *in vitro* foi avaliado os gráficos de *loadings* e *scores* para o modo positivo de ionização (Figura 1.118 A e B) com variância explicada devido ao primeiro e segundo componentes principais (PCs) de 41,3% (PC1 26,3%; PC2 15,0%) e para o modo negativo de ionização (Figura 1.119 A e B) com 36,8% (PC1 21,8%; PC2 15,0%).

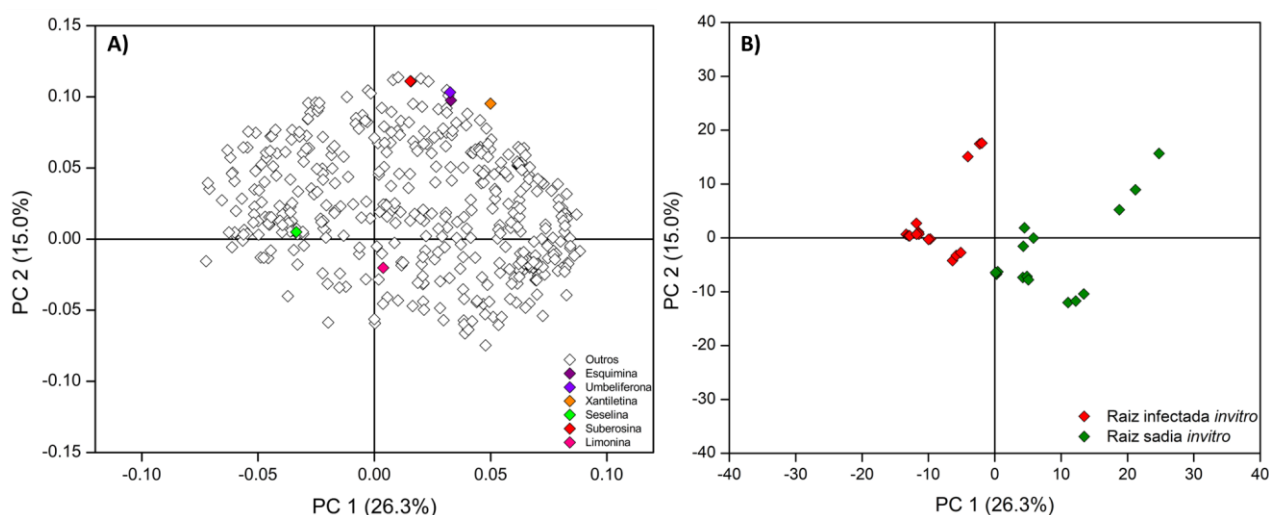


Figura 1.118. Análise de PCA em *loadings* (A) e *scores* (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo positivo de ionização em raízes de plântulas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv) cultivadas *in vitro*.

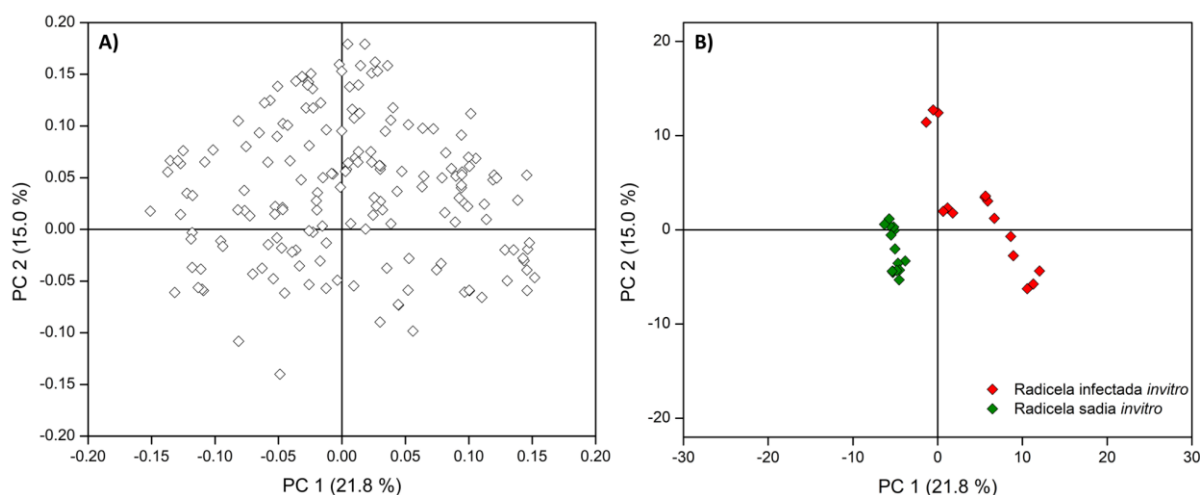


Figura 1.119. Análise de PCA em *loadings* (A) e *scores* (B) para PC1 x PC2 referente aos dados obtidos via LC-HRMS em modo negativo de ionização em raízes de plântulas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPSiv) e de plantas sintomáticas infectadas com CLas (RPIiv) cultivadas *in vitro*.

Para as análises em LC-HRMS/q-TOF tanto no modo positivo quanto no modo negativo de ionização, foi possível através das análises de PCA, classificar as amostras de plântulas cultivadas *in vitro* em sadias e infectadas. É perceptível as alterações no metabolismo de citrus quando as plântulas cultivadas *in vitro* estão contaminadas com a bactéria causadora do HLB. Foi possível identificar através do gráfico de *loadings* (Figura 1.118 – A), que a piranocumarina angular seselina foi uma das substâncias responsáveis para a classificação das amostras de plântulas infectadas, quando avaliado o modo positivo de ionização. Para o modo negativo de ionização, não foi possível determinar nenhuma substância responsável pela classificação das plântulas em sadias e infectadas (Figura 1.119), visto que através da abordagem de metabolômica empregada não foi possível anotar nenhum íon com precisão.

A fim de contextualizar todas as informações obtidas através do estudo de metabolômica via LC-HRMS/Q-ToF e as análises de PCA, a tabela 1.6 mostra um resumo de todos os dados já discutidos até aqui e contém as informações de *m/z* de todas as substâncias anotadas, erro em ppm e abundância das mesmas nos tratamentos avaliados: raiz central (R) e radícula (Rd) de *C. sinensis* x *C. limonia* de plantas sadias (PS) e plantas sintomáticas infectadas com HLB (PI) - RPS, RPI, RdPS, RdPI.

Tabela 1.6. Íons anotados via LC-HRMS/q-TOF e sua abundância nos tratamentos avaliados: RPS, RPI, RdPS, RdPI.

| nº | Substância | Fórmula molecular | Rt (min) | m/z calc | m/z obs | Erro (ppm) | Sadia | HLB | Amostra |
|----|--------------------------|------------------------------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|------------|-------|-----|---------|
| 1 | Umbeliferona | C ₉ H ₆ O ₃ | 4,12 | [M+H] ⁺ 163,0395 | [M+H] ⁺ 163,0393 | -1,23 | - | + | R |
| 2 | Ácido <i>p</i> -cumárico | C ₉ H ₈ O ₃ | 5,70 | [M-H] ⁻ 163,0395 | [M-H] ⁻ 163,0396 | 0,61 | * | * | * |
| 3 | Herniarina | C ₁₀ H ₈ O ₃ | 9,27 | [M+H] ⁺ 177,0552 | [M+H] ⁺ 177,0546 | 3,43 | - | + | Rd |
| 4 | 3-acetilcumarina | C ₁₁ H ₈ O ₃ | 17,33 | [M+H] ⁺ 189,0552 | [M+H] ⁺ 189,0555 | 1,59 | * | * | * |
| 5 | Citropteno | C ₁₁ H ₁₀ O ₄ | 7,90 | [M+H] ⁺ 207,0657 | [M+H] ⁺ 207,0649 | -3,86 | * | * | * |
| 6 | Ostenol | C ₁₄ H ₁₄ O ₃ | 10,06 | [M-H] ⁻ 229,0865 | [M-H] ⁻ 229,0855 | -4,37 | - | + | Rd |
| 7 | Demetilsuberosina | C ₁₄ H ₁₄ O ₃ | 11,18 | [M-H] ⁻ 229,0865 | [M-H] ⁻ 229,0861 | -1,75 | + | - | Rd |
| 8 | Xantiletina | C ₁₄ H ₁₂ O ₃ | 4,38 | [M+H] ⁺ 229,0865 | [M+H] ⁺ 229,0865 | 0,00 | * | * | * |
| 9 | Seselina | C ₁₄ H ₁₂ O ₃ | 4,61 | [M+H] ⁺ 229,0865 | [M+H] ⁺ 229,0862 | -1,31 | * | * | * |
| 10 | Ostol | C ₁₅ H ₁₆ O ₃ | 17,33 | [M+H] ⁺ 245,1178 | [M+H] ⁺ 245,1166 | -4,90 | - | + | Rd |
| 11 | Suberosina | C ₁₅ H ₁₆ O ₃ | 18,69 | [M+H] ⁺ 245,1178 | [M+H] ⁺ 245,1170 | -3,26 | * | * | * |
| 12 | Xantoxiletina | C ₁₅ H ₁₄ O ₄ | 15,60 | [M+H] ⁺ 259,0970 | [M+H] ⁺ 259,0960 | -3,86 | * | * | * |
| 13 | 5-metoxiseselina | C ₁₅ H ₁₄ O ₄ | 16,58 | [M+H] ⁺ 259,0970 | [M+H] ⁺ 259,0962 | -3,09 | - | + | Rd |
| 14 | Suberenol | C ₁₅ H ₁₆ O ₄ | 9,50 | [M+H] ⁺ 261,1127 | [M+H] ⁺ 261,1123 | -1,53 | * | * | * |
| 15 | Aurapteno | C ₁₉ H ₂₂ O ₃ | 22,75 | [M+H] ⁺ 299,1647 | [M+H] ⁺ 299,1642 | -1,67 | * | * | * |
| | Nordentatina | C ₁₉ H ₂₀ O ₄ | 21,88 | [M+H] ⁺ 313,1440 | [M+H] ⁺ 313,1434 | -1,92 | * | * | * |
| 16 | Esquimina | C ₁₅ H ₁₆ O ₈ | 4,00 | [M+H] ⁺ 325,0923 | [M+H] ⁺ 325,0920 | -0,92 | - | + | Rd |
| 17 | Clausarina | C ₂₄ H ₂₈ O ₄ | 26,29 | [M+H] ⁺ 381,2066 | [M+H] ⁺ 381,2063 | -0,79 | * | * | * |
| 18 | Deoxilimonina | C ₂₆ H ₃₀ O ₇ | 15,52 | [M+H] ⁺ 455,2070 | [M+H] ⁺ 455,2066 | -0,88 | * | * | * |
| 19 | Limonina | C ₂₆ H ₃₀ O ₈ | 12,83 | [M+H] ⁺ 471,2019 | [M+H] ⁺ 471,2028 | 1,91 | + | - | R |
| 20 | Acetato de limonina | C ₂₈ H ₃₄ O ₉ | 14,58 | [M+H] ⁺ 515,2272 | [M+H] ⁺ 515,2272 | -1,75 | * | * | * |

+ A concentração da substância na planta aumentou quando a planta está infectada com HLB, com diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

- A concentração da substância na planta diminuiu quando a planta está infectada com HLB, com diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

* A concentração da planta não variou entre os tratamentos avaliados, com diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado .

Na literatura é reportado que plantas tem desenvolvido várias estratégias para combater o ataque de patógenos. Uma delas é a produção de metabólitos secundários capazes de inibirem o desenvolvimento de agentes patogênicos. Ao serem infectadas por algum patógeno, as plantas ativam estes mecanismos de defesa, na tentativa de combater a infestação dos mesmos^{183,184,185}.

Vários compostos naturais, que vão desde os componentes da parede celular até enzimas metabólicas foram relatados como protetores das plantas de infecções por patógenos e, portanto, fornecem resistência específica aos hospedeiros contra patógenos, sendo denominada resistência induzida. Este fenômeno envolve vários componentes bioquímicos, que desempenham um papel importante nos eventos de sinalização que ocorrem antes (elicitação) ou depois da infecção pelo patógeno. Portanto, a alteração na concentração de componentes bioquímicos nas plantas hospedeiras restringe o desenvolvimento da doença. Tais marcadores bioquímicos ou metabólicos podem ser aproveitados para o desenvolvimento de plantas "à prova de patógenos". O acúmulo destes metabólitos responsivos ao ataque destes patógenos é controlado por enzimas biossintéticas relevantes que são induzidas por elicitores bióticos e/ou abióticos gerados por estresse. O aumento da expressão de genes codificadores de enzimas biossintéticas aumenta os níveis dos metabólitos de interesse¹⁸⁴.

A utilização eficaz dos principais marcadores metabólicos baseados em metabólitos pode abrir caminho para a identificação de genes candidatos, que é um dos alvos do presente trabalho. Com as evidências constatadas até aqui, os caminhos estão abertos para a identificação e caracterização dos genes envolvidos na biossíntese de derivados de piranocumarinas angulares. A figura 1.120 contextualiza os dados reportados na tabela 1.6, demonstrando uma proposta de biogênese de cumarinas e piranocumarinas e como a infecção de CLas interfere nesta cascata biossintética para a defesa de *C. sinensis* x *C. limonia* frente a este patógeno. É possível constatar que a planta ativa como mecanismo de defesa o aumento na produção de piranocumarinas angulares, seus intermediários e seus derivados: seselina, ostenol, ostol, 5-metoxiseselina. Além destes, há aumento significativo na produção do metabólito que é considerado o esqueleto central de cumarinas e seu derivado: umbeliferona e herniarina.

É possível sugerir que a planta sintomática infectada com CLas, inibe a produção de piranocumarinas lineares, seus intermediários e derivados,

redirecionando a rota biossintética para a produção dos derivados angulares. Sendo assim, possivelmente está ocorrendo a inibição da preniltransferase que atua na prenilação da umbeliferona na posição 6. Concomitantemente há um aumento na expressão da preniltransferase que possui atividade específica na prenilação da umbeliferona na posição 8, que leva a formação das piranocumarinas angulares. Em paralelo, também há evidências de que ocorre um aumento na atividade das enzimas que atuam na biossíntese da umbeliferona e as O-metiltransferase (O-MT) que estão envolvidas na transferência de um grupo metil para síntese da herniarina, ostol e 5-metoxi-seselina. Dessa maneira, a utilização de mecanismos de resistência a doenças de plantas através de vias de sinalização poderá fornecer novas ideias para a prevenção e controle da doença HLB em citros.

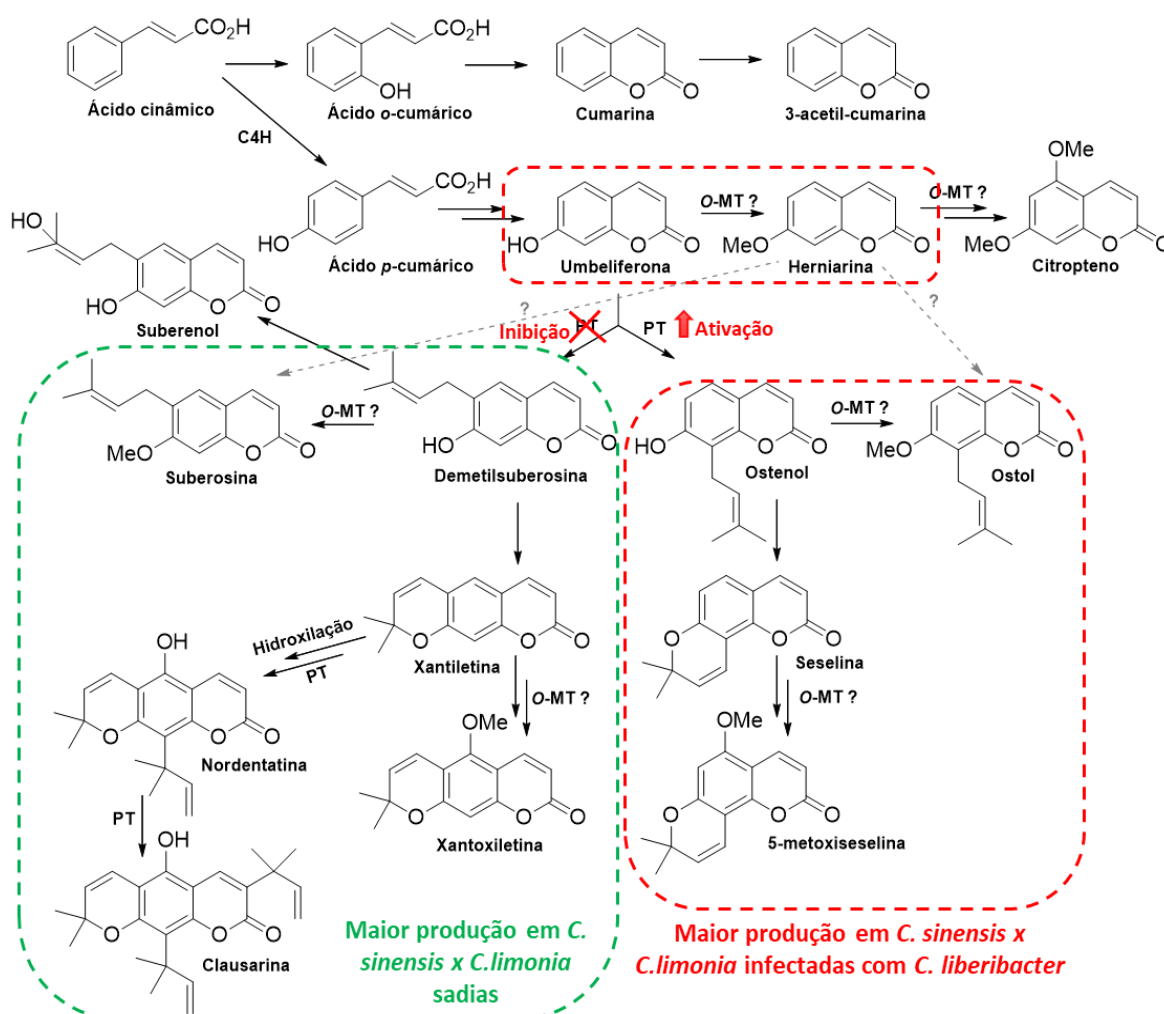


Figura 1. 120. Proposta de biogênese para cumarinas e piranocumarinas e a interferência na cascata biossintética como resposta de defesa de *C. sinensis* x *C. limonia* frente a Clas.

1.4.8 Quantificação de piranocumarinas nas radículas de *C. sinensis* x *C. limonia* via HPLC-UV

A fim de confirmar que há uma diferença significativa na produção de xantiletina e seselina em plantas saudáveis frente àquelas infectadas com CLAs, foi realizado a quantificação de xantiletina e seselina por HPLC-UV nas radículas de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* saudáveis e sintomáticas infectadas com CLAs (RdPS, RdPI). Através das curvas de calibração (Figura 1.121) determinou-se a concentração real de xantiletina e seselina em RdPS, RdPI. A Figura 1.122 mostra os cromatogramas obtidos a partir das análises de todos os tratamentos avaliados (RdPS, RdPI).

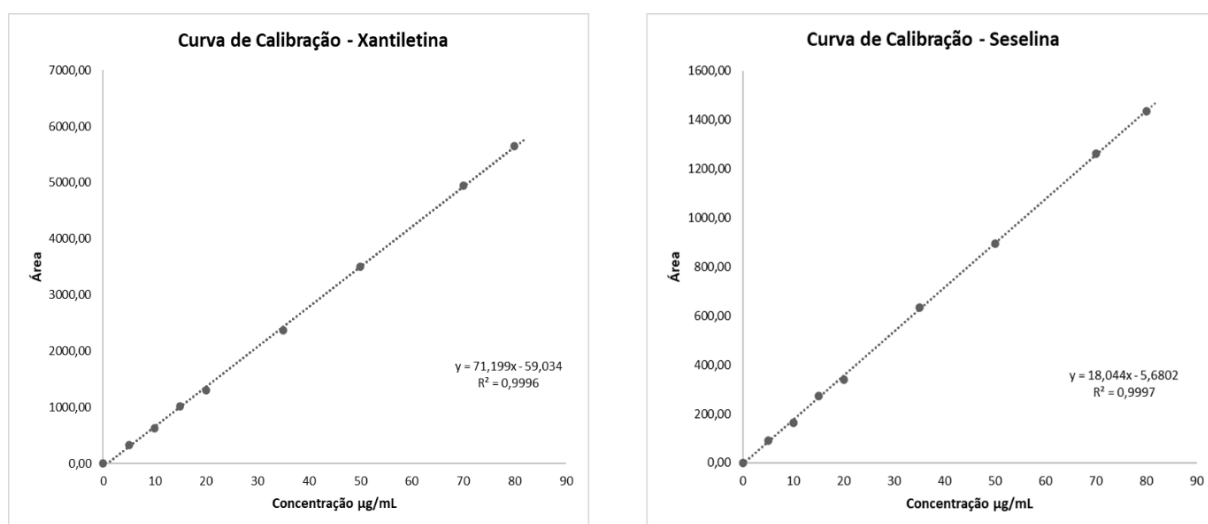


Figura 1.121. Curva de calibração para as piranocumarinas: xantiletina e seselina.

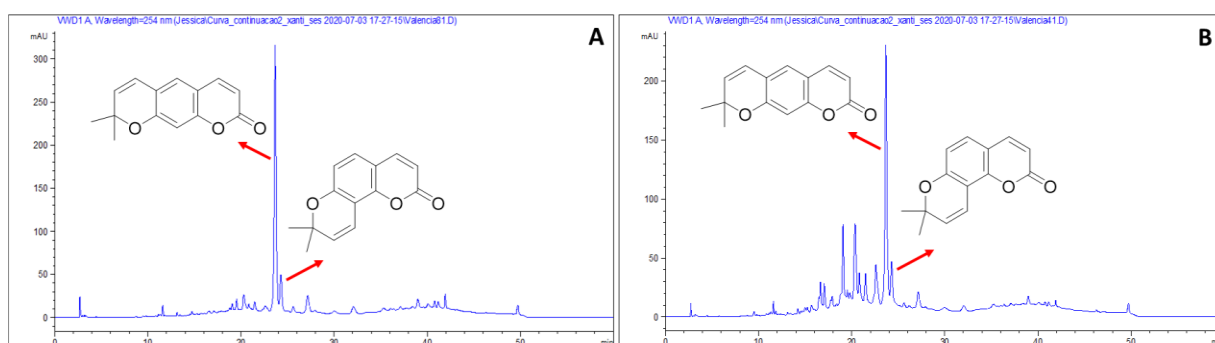


Figura 1.122. Cromatogramas das amostras de radículas de *C. sinensis* x *C. limonia* **A)** saudáveis **B)** sintomáticas infectadas com CLAs.

Dentre as radículas das plantas avaliadas, as RdPS apresentaram uma maior produção de xantiletina frente à RdPI, com $61,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $51,79 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Já as RdPI apresentaram uma maior produção de seselina frente as RdPS, com $32,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $25,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim há uma diminuição estatisticamente significativa a um nível de 95% de confiança empregando o teste t pareado, na produção de xantiletina e um aumento significativo na produção de seselina entre os tratamentos avaliados (Figura 1.123). O objetivo desta análise foi desenvolver um método com maior robustez para avaliar a quantidade destes metabólitos em questão, visto que na quantificação relativa por HPLC-HRMS-QToF foi possível observar que havia alguma diferença entre os tratamentos avaliados (item 1.4.5.10 e 1.4.5.11), porém através da análise estatística empregando o teste t pareado à um nível de 95% de confiança, não houve evidências de diferença estatisticamente significativa.

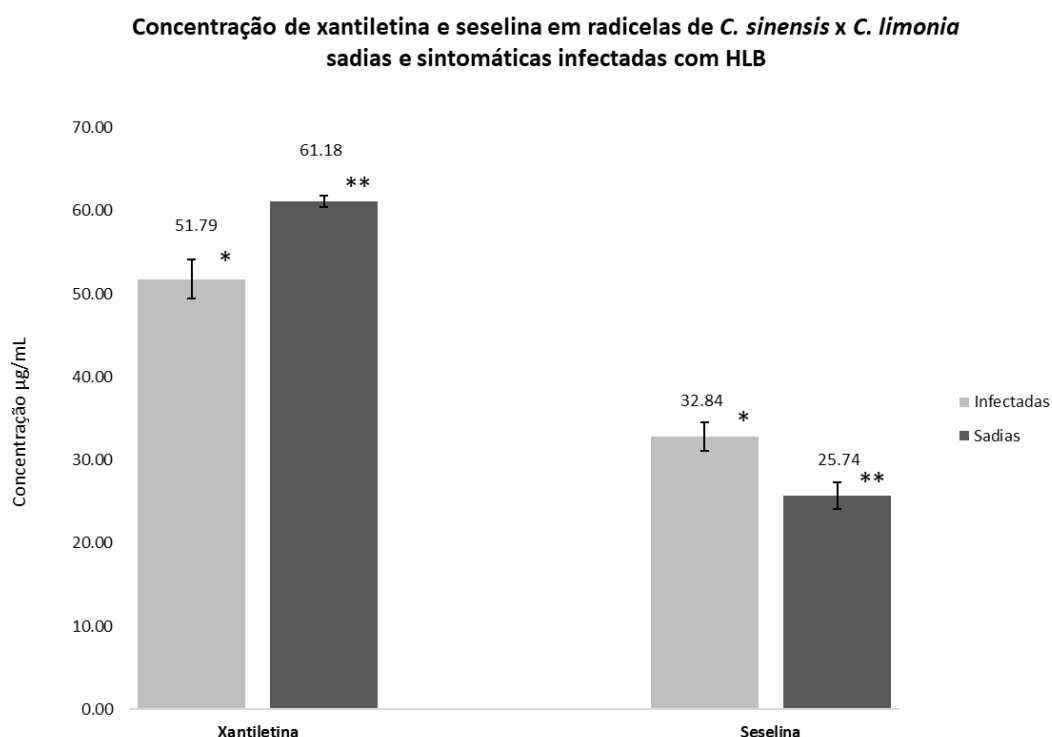


Figura 1. 123. Concentração das piranocumarinas: xantiletina e seselina em *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e sintomáticas infectadas com Clas.

Para a xantiletina, as amostras RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado. Para a seselina, as amostras RdPS e RdPI, são diferentes estatisticamente ao nível de 95% de confiança pelo teste t pareado.

1.4.9 Ensaio de atividade microbiológica de piranocumarinas e seus intermediários em *Citrus sinensis* frente a *Candidatus liberibacter asiaticus*

Nos últimos anos, muito têm se investigado sobre o combate à doença do HLB em citrus. A bactéria causadora da doença, *C. liberibacter asiaticus*, ainda é incultúvel em laboratório. Alguns métodos para ensaiar substâncias que tenham algum efeito antimicrobiano têm sido desenvolvidos. Yang et al., 2016, avaliaram os efeitos do tratamento térmico, formulações químicas e métodos de aplicação sobre bactérias no hospedeiro cítrico, medidos por PCR quantitativo, avaliando os valores de C^t para cada tratamento testado¹⁸⁶. Em um outro trabalho Yang et al. 2018, identificaram via qPCR, 10 substâncias antimicrobianas com efeito curativo que eliminaram/suprimiram parcialmente CLas em plantas tratadas e inoculadas por enxerto¹⁸⁷. Em 2022, Yang and Ancona por análise de viabilidade PMA-qPCR de CLas em estacas cítricas tratados com diferentes concentrações de ampicilina mostraram que todas as concentrações reduziram CLas títulos significativamente a partir de 4 dias após o tratamento inicial, ao contrário do tratamento controle¹⁸⁸.

Zhang et al., 2014 também via qPCR identificaram alguns antibióticos com efeito curativo, eficazes e não fitotóxicos que podem ser candidatos potenciais para o controle do HLB dos citros¹⁸⁹. Huang et al., 2021, constataram por análises de qPCR que uma nova classe de peptídeos antimicrobianos estáveis (SAMPs) reduziu efetivamente a bactéria CLas e os sintomas da doença em árvores HLB-positivas, além de também induzir a imunidade da planta para prevenir e inibir infecções (efeito curativo e preventivo)¹⁹⁰.

Através dos trabalhos citados, podemos observar que a qPCR tem sido amplamente utilizada para avaliar o efeito de substâncias frente a CLas em plantas jovens e adultas de citrus cultivadas em casa de vegetação. A maioria dos trabalhos reportados na literatura, avaliam o efeito curativo, pois utilizam plantas já infectadas com a doença. Poucos trabalhos utilizam a abordagem com um efeito preventivo, visto a dificuldade de realização dos experimentos e a demora na obtenção dos resultados. Utilizando a metodologia descrita nos itens 1.3.4 e 1.3.10, os dados demonstrados na tabela 1.7, mostram relatos inéditos de uma “infecção de CLas em citrus *in vitro*”, além da primeira constatação de realização de teste de efeito antimicrobiano para CLas através de um ensaio sistêmico *in vitro*, com agilidade na

obtenção de evidências de possíveis antimicrobianos com efeitos curativos e preventivos para a doença HLB. A tabela 1.7 mostra os resultados de C^t , obtidos por qPCR, após o tratamento preventivo utilizando o metoxi-psolareno (furanocumarina linear), xantiletina (piranocumarina linear), seselina (piranocumarina angular) e o ostol (derivado do intermediário de piranocumarina angular). Além disso foi feito os testes para o controle, contendo apenas o meio MS basal e para citotoxicidade do DMSO, solvente utilizado para solubilizar todos os compostos testados.

Tabela 1. 7. Valores de C^t obtidos nas análises de qPCR para ensaio da atividade microbiológica de piranocumarinas e seus intermediários em *C. sinensis* frente a Clas.

| Tratamentos | Amostra | Tratamento | C^t | Média | Desv. Pad |
|------------------|---------|------------|------------|---------|-----------|
| Controle | 1 | T1.1 | 29.0770588 | 28.1268 | 1.4408 |
| | 2 | T1.2 | 26.4690151 | | |
| | 3 | T1.3 | 28.8342896 | | |
| DMSO | 4 | T2.1 | 28.5231808 | 28.3867 | 0.2478 |
| | 5 | T2.2 | 28.1007004 | | |
| | 6 | T2.3 | 28.5362015 | | |
| Metoxi-psolareno | 7 | T3.1 | 29.2154789 | 30.0635 | 0.7521 |
| | 8 | T3.2 | 30.3251877 | | |
| | 9 | T3.3 | 30.6498909 | | |
| Xantiletina | 10 | T4.1 | 26.3330097 | 27.5467 | 1.2296 |
| | 11 | T4.2 | 28.7917194 | | |
| | 12 | T4.3 | 27.5153046 | | |
| Seselina | 13 | T5.1 | 33.3786316 | 33.0737 | 0.5924 |
| | 14 | T5.2 | 33.4515953 | | |
| | 15 | T5.3 | 32.3909836 | | |
| Ostol | 16 | T6.1 | 36.2700272 | 36.8879 | 0.5880 |
| | 17 | T6.2 | 37.4407272 | | |
| | 18 | T6.3 | 36.9530182 | | |

Avaliando os valores de C^t do inglês *threshold cycle*, que indica uma medida relativa do ciclo em que a fluorescência ultrapassa o threshold na reação de amplificação. O C^t , permite a correlação do aumento da fluorescência com a quantidade inicial do DNA alvo; onde um menor valor de C^t indica um maior número

de cópias iniciais de DNA. Sendo assim, a partir da análise dos dados podemos observar que o DMSO não apresentou qualquer efeito citotóxico frente a bactéria CLas, visto que o valor de C^t obtido para este tratamento (28,3867) praticamente se equiparou ao valor obtido para o tratamento controle (28,1268). A xantiletina, não apresentou nenhum efeito inibitório frente a CLas em citrus, apresentando um valor médio de C^t de 27,5467, que também quase se equipara ao valor de C^t do tratamento controle.

O metoxi-psolareno apresentou algum efeito inibitório sobre CLas, com um valor de C^t de 30,0635. Foi possível observar que a bactéria se desenvolveu em menor intensidade nas plântulas cultivadas *in vitro* tratadas com o metoxi-psolareno; frente aquelas cultivadas sem utilização de quaisquer substância como efeito preventivo (tratamento controle).

Para as plântulas *in vitro* referente ao tratamento com a piranocumarina angular seselina, a bactéria praticamente não se desenvolveu ($C^t = 33,0737$). Em valores altos de C^t (por exemplo, >30), infere-se que os níveis de CLas são muito baixos ou que CLas não está presente¹⁹¹. Para o tratamento com o ostol, que é um derivado do intermediário de piranocumarina angular, observa-se um valor de C^t de 36,8879, ou seja, não foi constatado a presença do agente causador do HLB. Sendo assim; os dados obtidos frente a seselina e o ostol comprovam as evidências observadas nas análises de metabolômica via LC-HRMS/Q-ToF (item 1.4.4), nas análises de PCA (1.4.7) e na quantificação de piranocumarinas via HPLC-UV (1.4.8), de que a planta aumenta a concentração deste compostos como mecanismo de defesa frente à CLas, sendo consideradas potentes antimicrobianos que podem auxiliar no combate da doença HLB em citrus.

1.5 Conclusões

Através das análises de metabolômica foi possível observar que há diferenças significativas na produção de metabólitos da via das cumarinas e limonoides entre plantas de *C. sinensis* x *C.limonia* sadias e infectadas sintomáticas com HLB. Além disso há diferenças expressivas quanto a abundância destes metabólitos entre as partes vegetais avaliadas: raiz e radículas.

A metabolômica e o uso da plataforma GNPS tem um papel fundamental nas pesquisas ; possibilitando a correlação de dados, permitindo a obtenção de *insights* sobre metabólitos que sejam responsivos à doenças da agricultura e estejam associados a resistência de plantas ao ataque de fitopatógenos.

Por fim, conclui-se que os objetivos do trabalho foram alcançados com êxito, sendo possível determinar metabólitos envolvidos no mecanismo defesa de citros. Este é o primeiro relato sobre a influência de piranocumarinas e limonoides frente a infecção de citros com CLas

Capítulo 2

Avaliação da expressão gênica na via da biossíntese de piranocumarinas em *Citrus sinensis* x *Citrus limonia* em resposta ao Huanglongbing e caracterização molecular de preniltransferases

2.1 Introdução

2.1.1 A contribuição da engenharia genética para resistência de plantas frente ao ataque de fitopatógenos e insetos

A população global está crescendo a uma taxa exponencial e deve chegar a aproximadamente 9,7 bilhões em 2050, principalmente na África e na Ásia. Isso impõe um grande ônus à agricultura e setores aliados para atender à demanda de alimentos, exigindo mais insumos para a produção agrícola¹⁹². Uma das principais estratégias é reduzir a perda da colheita controlando as pragas que ocasionam danos às diferentes culturas. Não é uma tarefa fácil, pois aproximadamente 9.000 espécies de insetos e ácaros, 50.000 de patógenos de plantas, e 8.000 de plantas invasoras prejudicam as lavouras. Os insetos pragas causam aproximadamente 14% de perda nas culturas, os fitopatógenos de 13% e plantas invasoras de 13%. Os dados mostram que quase um terço dos produtos agrícolas é produzido com o uso de pesticidas tradicionais¹⁹³.

Os pesticidas incluem herbicidas, inseticidas, fungicidas, nematicidas, bactericidas e rodenticidas que são usados para combater plantas invasoras, fitopatógenos, nematoides, microrganismos, dentre outros. De acordo com relatórios de pesquisas de mercado, a venda de fungicidas e bactericidas tem sido a maior participação (41,76%) entre os demais agrotóxicos, conforme mostrado a Figura 2.1¹⁹².

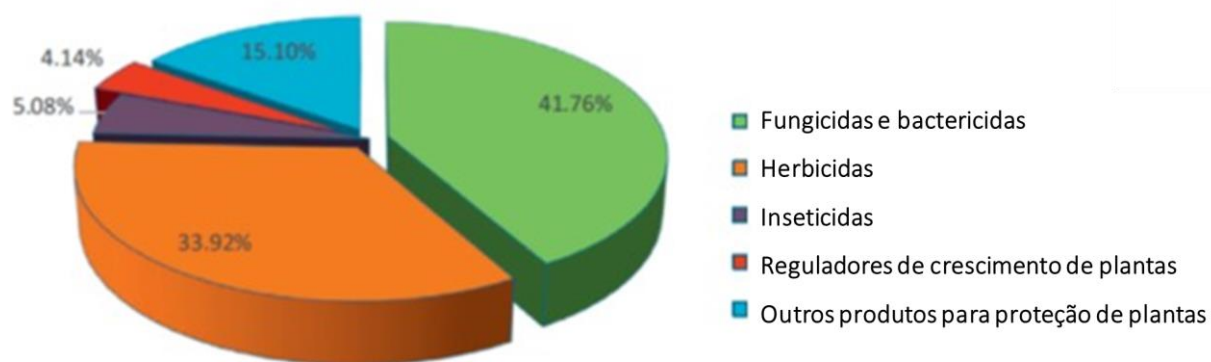


Figura 2.1. Participação nas vendas de pesticidas.

Os pesticidas químicos sintéticos usados na proteção de cultivos, para reduzir os danos causados por patógenos e pragas em campos agrícolas, representam muitas ameaças e riscos de longo prazo para os seres vivos devido aos

seus efeitos colaterais prejudiciais. Eles são conhecidos por causar câncer e deficiências fetais e persistem no meio ambiente por muitos anos, ou seja, não são biodegradáveis. Além disso, com base em sua aplicação excessiva e forte atividade inibitória contra pragas, esses pesticidas sintéticos dominam o mercado e têm um impacto significativo na fabricação de produtos derivados da agricultura. De acordo com a “The Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020”, a Ásia e as Américas são os maiores consumidores de pesticidas, com valores acima da média mundial¹⁹².

Com base nas estatísticas de consumo de pesticidas químicos sintéticos, é imprescindível buscar métodos alternativos que visam diminuir o uso de agrotóxicos. A elucidação da biossíntese de inúmeras fitoalexinas e fitoanticipinas tem permitido o uso de ferramentas de biologia molecular para a exploração dos genes que codificam enzimas de suas vias de síntese e seus reguladores. A manipulação genética de fitoalexinas/fitoanticipinas tem sido investigada para aumentar a resistência de plantas a doenças¹⁹⁴. Por exemplo, a produção do estilbeno resveratrol em tabaco transgênico expressando um gene de estilbeno sintase *VlvSTS* de videira leva ao aumento da resistência a *Botrytis cinerea* e *Erwinia carotovora*¹⁹⁵.

A metiltransferase dependente da S-adenosil-L-metionina (SAM) e a isoflavona O-metiltransferase (IOMT) de alfafa e grão de bico, produzem a 7-O-metil daidzeína (isoformononetina) *in vitro*. No caso da alfafa com superexpressão de IOMT, a fitoanticipina natural do hospedeiro foi superproduzida, permitindo avaliar o papel potencial desse composto na resistência a doenças no hospedeiro natural. O aumento da produção de medicarpina leva à resistência efetiva da alfafa ao patógeno da mancha foliar *P. medicaginis*, fornecendo evidência direta do envolvimento de um composto isoflavonóide na resistência a doenças¹⁹⁶.

Os mecanismos de resistência utilizando genes de resistência foram elucidados por meio de avanços na química e biologia molecular no final do século XX¹⁹⁷. Com os avanços tecnológicos na área de sequenciamento, cada vez mais espécies de plantas têm suas informações genômicas disponíveis. Além disso, os sistemas de edição de genoma possibilitam a edição precisa de genes, abrindo novas oportunidades para aprimorar as culturas agrícolas¹⁹⁸. Dentre as técnicas empregadas, o CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*

Repeats-Cas9) trouxe uma grande evolução para edição de genoma, especialmente em plantas.

O CRISPR/Cas9 surgiu como uma ferramenta poderosa na agricultura devido à sua habilidade incomparável de manipular genomas de plantas com precisão. Essa tecnologia não apenas ajudou a desenvolver novas variedades de plantas com características desejáveis, mas também revolucionou os sistemas de melhoramento existentes. Com o CRISPR/Cas, é possível excluir ou substituir elementos genéticos que são responsáveis por características indesejadas, introduzir mutações de ganho de função por meio de uma edição precisa do genoma bem como o silenciamento e ativação da expressão gênica^{198,199,200}.

Nos últimos anos, o uso do sistema CRISPR/Cas melhorou várias características das culturas, incluindo rendimento, qualidade, resistência a doenças e resistência a herbicidas. Esta tecnologia revolucionou a criação de culturas desde sua primeira aplicação em 2013 e dentre as principais conquistas foram a produção de culturas resistentes a doenças^{199,201}. Pesquisadores geraram linhagens de arroz com resistência à *Xanthomonas oryzae*²⁰² e conferiram resistência a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em citros²⁰³. PENG ET AL., 2019 ao deletarem completamente a sequência EBE_{PthA4} de ambos os alelos *CsLOB1*, obtiveram uma alta resistência ao cancro cítrico; indicando que a edição do promotor de *CsLOB1* mediada pelo sistema CRISPR/Cas9 é uma estratégia eficiente para produzir cultivares cítricos resistentes ao cancro.

Em um trabalho publicado, utilizando *Agrobacterium* para introduzir um sistema CRISPR/Cas9 em tecidos foliares de *Theobroma cacao*, ; identificou-se a presença de deleções em 27% das cópias de *TcNPR3* nos tecidos tratados. O tecido “editado” apresentou maior resistência à infecção pelo patógeno do cacau *Phytophthora tropicalis* e expressão elevada de genes de defesa²⁰⁴. Em outro estudo foi demonstrado que CRISPR/Cas9 pode ser uma ferramenta para mutagênese direcionada no fungo *C. purpúrea*, visando os genes *pyr4* e *TrpE* que codificam a orotidina 5'-fosfato descarboxilase envolvida na biossíntese da pirimidina e a subunidade α da antranilato sintase; envolvida na biossíntese de triptofano. Os mutantes *TrpE* não apresentaram infecção em plantas de centeio devido à redução da auxina, afetando a capacidade do fungo de colonizar plantas de centeio.

O desenvolvimento de novas culturas geneticamente modificadas é amplamente afetado por processos de aprovação regulatória a fim de prevenir danos

à saúde humana e ao meio ambiente, bem como evitar perdas econômicas. Na opinião dos críticos, os alimentos transgênicos podem afetar desfavoravelmente a saúde dos consumidores²⁰¹. Especula-se que os alimentos geneticamente modificados sejam responsáveis pelo desenvolvimento de substâncias tóxicas. Na manipulação genética de fitoalexinas endógenas (fitoanticipinas) da planta hospedeira, a origem e os produtos de expressão dos genes utilizados para modificação são da mesma planta, diminuindo os riscos dos efeitos sobre os organismos vivos, o meio ambiente e a biodiversidade.

Diante dos fatos apresentados, espera-se que os avanços na manipulação genética de fitoalexinas endógenas desempenhem um papel importante na geração de resistência contra fitopatógenos na planta hospedeira, tornando os produtos transgênicos um tema não controverso. Embora ainda existam desafios a serem superados, acredita-se que a tecnologia de edição genética será amplamente utilizada no futuro e desempenhará um papel importante na melhoria da qualidade e resistência das culturas.

2.1.2 As enzimas 1-deoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS) e 1-deoxixilose-5-fosfato redutase (DXR) envolvidas na biossíntese de IPP/DMAPP via MEP

As unidades de isopreno, que possuem 5 carbonos, são nomeadas de difosfato de isopentenil (IPP) e difosfato de dimetilalil (DMAPP). Esta unidade possui duas origens biossintéticas possíveis: via MVA denominada de via do ácido mevalônico, via MEP 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (triose/piruvato)²⁰⁵. A biossíntese desta unidade ainda pode ocorrer de forma mista, onde as duas vias ocorrem concomitantemente²⁰⁶. A via mevalonato era amplamente aceita como a única via de biossíntese de unidades de IPP/DMAPP até o momento em que experimentos com marcação isotópica revelaram inconsistências, indicando uma falta de incorporação do material de partida e intermediários presumidos pela via do MVA. Foi então que na década de 1990, quando uma via nova foi descoberta de maneira independente pela pesquisa dos grupos de ROHMER E ARIGONI²⁰⁵.

As unidades isoprenoides derivadas de IPP sintetizadas pela via MEP através de 7 enzimas; possui a reação inicial envolvendo a participação da tiamina difosfato (TPP) com o piruvato e posterior reação com o C-1 do D-gliceraldeído-3-

fosfato (GA-3P) para produzir 1-deoxixilose-5-fosfato (DXP). Esta primeira etapa é catalisada pela enzima DXP sintase (DXS), uma proteína homodimérica^{205,207}. No segundo passo, um rearranjo intramolecular e redução de DXP produz 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) sob a atividade da enzima DXP redutoisomerase (DXR/IspC). O MEP é então convertido em uma mistura de IPP e DMAPP em cinco etapas enzimáticas adicionais (Figura 2.2)^{205,208}. O acoplamento entre MEP e citidina 5'-trifosfato (CTP) é catalisado pela CDP-ME sintetase (IspD) e produz metileritritol citidil difosfato (CDP-ME)^{205,207}.

Uma enzima dependente de ATP (IspE) intermedia uma fosforilação, e o produto desta reação; o 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP) é ciclizado por meio de uma IspF para 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP). A enzima IspG catalisa a abertura do anel do pirofosfato e uma reação de desidratação e redução de MEcPP para 4-hidroxi-3-metil-butenil-1-difosfato (HMBPP) ocorre. Por fim, a etapa final da via MEP é catalisada por IspH e converte HMBPP em IPP e DMAPP^{207,209}.

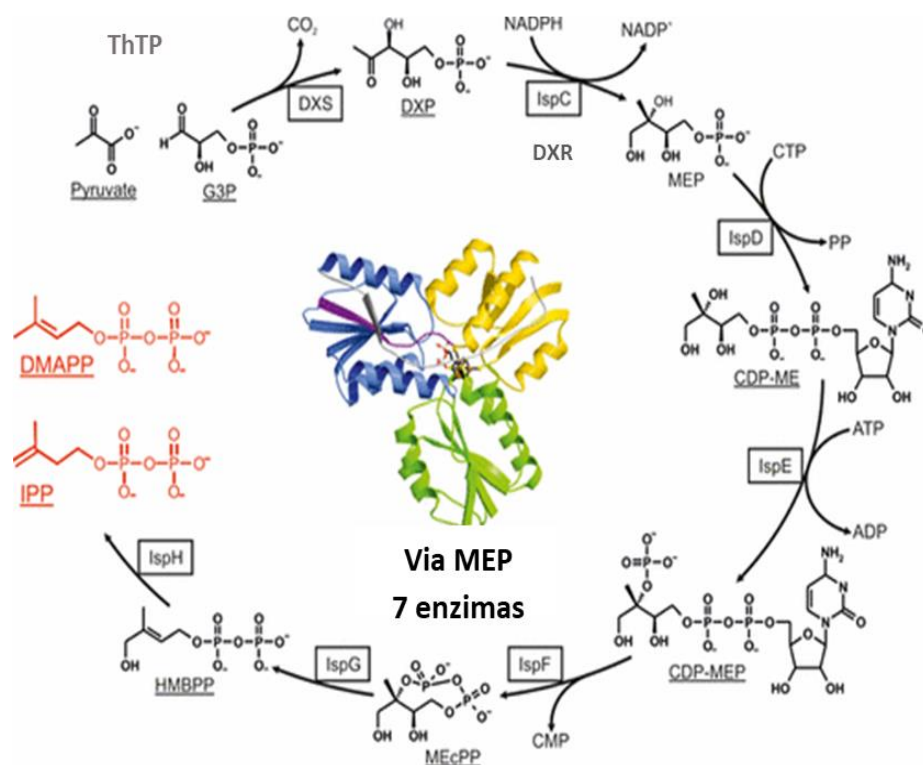


Figura 2.2. Caminho biossintético para isoprenoides via MEP. Retirado de FRANK & GROLL, 2016²⁰⁵.

Todas as sete enzimas de via MEP são codificadas por genes nucleares e importadas para plastídios. Estudos proteômicos realizados até 2017,

identificaram todos estes genes presentes somente na fração estromal. As análises computacionais, no entanto, levaram a propor que DXS e DXR possam ser adicionalmente direcionados à membrana ou lúmen do tilacoide. A superexpressão de qualquer uma dessas duas enzimas nas plantas geralmente resulta em uma acumulação de metabólitos derivados do MEP, sustentando a conclusão de que eles são pontos de controle importantes sobre o fluxo na via MEP^{208,210}.

Na análise das linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, desenvolvida por PULIDO et al. 2013, produzindo uma versão GFP da proteína DXS (linhas 35S: DXS-GFP) ajudou a compreender o controle pós-tradução da distribuição de enzimas, níveis e atividade dentro do plastídio. A fluorescência correspondente à proteína de fusão DXS-GFP mostrou uma distribuição manchada em cloroplastos, provavelmente devido à formação de agregados proteicos, confirmando a localização plastídica da mesma^{208,211}.

Diversos estudos de engenharia genética; a fim de promover a superexpressão gênica dos genes envolvidos na biossíntese de IPP via MEP têm sido reportados; a fim de aumentar os níveis de derivados prenilados e de terpenos. A fim de aumentar a produção de limoneno, duas enzimas endógenas limitantes na via MEP de *E. coli*, DXS e isopentenil difosfato isomerase (IDI), foram superexpressas, resultando em um aumento na produção de limoneno²¹².

Dois genes potenciais da via MEP: *LiDXS* e *LiDXR*, extraídas de Flor-de-lis-da-sibéria, após serem sobreexpressados em plantas de tabaco, possibilitaram um maior acúmulo do diiterpeno, esclareol, em comparação com as plantas transformadas com vetor vazio. O aumento do monoterpeneo, linalol e sesquiterpeno, cariofileno, foi detectado nas linhagens transgênicas *LiDXR*, enquanto a emissão de cariofileno aumentou em uma das linhagens transgênicas de tabaco *LiDXS*, indicando que esses dois genes desempenham papéis significativos na síntese de terpenos nas plantas transgênicas²¹³. Este estudos fornecem novos *insights* sobre a biossíntese de isoprenóides através da biossíntese regulada abrindo novas possibilidades para o aumento da produção dos precursores IDP e DMADP.

2.1.3. As enzimas preniltransferases e os avanços em estudos biossintéticos de furanocumarinas

As preniltransferases são enzimas envolvidas na biossíntese de terpenoides que podem ser: prenil sintase cabeça-cauda, cabeça-cabeça, cabeça-

meio e terpeno ciclase²¹⁴, na biossíntese de alcalóides conhecidas como indol preniltransferases²¹⁵, e de reações que envolvem a prenilação de esqueletos aromáticos por meio de uma alquilação de Friedel–Crafts; estas são conhecidas como grupo de PTs “aromáticos” ligados à membrana pertencentes à superfamília UbiA^{216,217,218}.

Esta última classe de preniltransferases requerem dois substratos, o prenil doador e o prenil receptor. O difosfato de isoprenila (XPP, onde X corresponde a diferentes comprimentos da cadeia isoprenila) comumente atua como substrato doador. Após a clivagem do grupo difosfato (XPP), ocorre a formação de um carbocátion intermediário altamente reativo na extremidade da cadeia isoprenila, que reage com o substrato receptor, dando origem a uma ligação C-C ou C-O, concluindo, assim, o processo de prenilação²¹⁶. Os produtos da preniltransferase aromáticas são amplamente distribuídos na natureza e possuem funções biológicas importantes. Esta classe de enzimas ocupam posição central na biossíntese de cumarinas preniladas, dentre elas as furanocumarinas e piranocumarinas.

As prenilações do anel benzênico da umbeliferona nas posições 6 ou 8 é o passo inicial na biossíntese das furanocumarinas e acredita-se que seja também para piranocumarinas. Aparentemente a biossíntese destas substâncias se difere na etapa de ciclização. A biossíntese das furanocumarinas (FCs), consiste na ciclização do intermediário prenilado formando um anel de 5 membros (Figura 2.3) enquanto as piranocumarinas (PCs) em anel de 6 membros, portanto há fortes evidências de que as enzimas envolvidas na biossíntese de pirano e furanocumarinas sejam semelhantes.

Várias enzimas da via das furanocumarinas (FCs) foram isoladas e caracterizadas, e a maior parte do trabalho nesta área foi conduzida por Hehn A. e colaboradores (VIALART et al., 2012⁹⁸; KARAMAT et al., 2014²¹⁹; LARBAT et al., 2007, 2009^{220,221}; MUNAKATA et al., 2014, 2016, 2021^{219,222,223}; LIMONES-MENDEZ 2020²²⁴). No entanto; PTs envolvidas na biossíntese de piranocumarinas permanecem desconhecidas.

A primeira atividade de prenilação da umbeliferona foi descrita *in vitro* por DHILLON E BROWN, 1976²²⁵. Posteriormente; somente em 2014 o gene responsável pela prenilação de umbeliferona (Figura 2.3) foi identificado por KARAMAT et al. 2014, que comprovaram a atividade da primeira preniltransferase ligada a membrana (PcPT) responsável pela prenilação da umbeliferona na salsa

(*Petroselinum crispum*) e caracterizaram as propriedades do gene que codifica a sua produção. Para isolar e caracterizar o primeiro gene de PT envolvido na síntese de cumarinas, foi desenhado primers degenerados baseando-se nos aminoácidos conservados em outras PTs aromáticas. Usando estes primers, uma estratégia baseada em PCR foi utilizada para clonar uma PT a partir do cDNA das folhas de *P. crispum*, a qual foi nomeado *PcPT* (AB825956). A expressão do gene da *PcPT* foi encontrada em toda a planta de *P. crispum*, e foi aumentada por irradiação UV, com um simultâneo aumento na produção de furanocumarinas. A localização sub-celular do gene *PcPT* foi demonstrada estar presente nos plastídios²¹⁹.

Em um outro estudo desenvolvido pelo grupo de pesquisa de HEHN A., foi realizada a clonagem e caracterização funcional de duas diferentes preniltransferases de *Pastinaca sativa*²²². Essas enzimas foram denominadas *P. sativa* preniltransferase *PsPT1* (KM017083) e *PsPT2* (KM017084) e estão envolvidas em reações de prenilação da umbeliferona. Ambas são enzimas plastídicas e catalisam a síntese de ostenol e demetilsuberósina respectivamente, utilizando como precursores exclusivamente a umbelliferona e o dimetilalilpirofosfato (DMAPP). Utilizando proteínas expressas de forma heteróloga, os autores demonstraram que a *PsPT1* é especializada na formação da demetilsuberósina, enquanto a *PsPT2* está envolvida na síntese do ostenol (Figura 2.3)²²².

Outro novo gene PT de *Citrus limon*, *CIPT1*, foi encontrado e definido como específico para difosfato de geranila como o doador de geranila e a umbeliferona como o receptora de geranila levando ao produto 8-geranilumbeliferona (Figura 2.3). Esse produto resultante da expressão do gene *CIPT1* (produto gênico) é um intermediário cumarínico das cumarinas angulares, e esta enzima foi localizada, através de fusão com a proteína GFP, nos plastídios de células vegetais²¹⁹.

Nos tecidos do flavedo de toranja – *C. sinensis* x *C. paradisi*, foi descrito o isolamento de um gene O-PT aromático, *CpPT1*, pertencente à superfamília *UbiA*. A especificidade de *CpPT1* foi analisada na presença do doador de prenila geranil difosfato (GPP) e demonstrou atividade sobre o begapto; levando a formação de bergamotina (Figura 2.3). A microscopia confocal das células epidérmicas das folhas de *N. benthamiana* expressando esta proteína fundida à GFP, mostrou que esta também está localizada nos cloroplastos; sugerindo que *CpPT1* é consistente com a localização plastidial da via MEP; como via

fornecedora de GPP em células vegetais. Sendo assim este gene mostrou-se responsável pela biossíntese de derivados de cumarina O-prenilados e a análise filogenética de O-PTs sugeriu que a atividade de O-prenilação aromática evoluiu independentemente a partir do mesmo gene ancestral nos táxons de plantas distantes²²³.

As monooxigenases do citocromo P450 (P450s) foram descritas como responsáveis pela formação do anel furano através da clivagem oxidativa da ligação C–C; os genes que codificam essas enzimas incluem *CYP71AJ3*, o qual codifica uma psoraleno sintase (PS)²²⁰ e *CYP71AJ4*, que codifica uma angelicina sintase (AS) em *Pastinaca sativa* (Figura 2.3)²²¹. Outro subtipo de P450 chamado CYP82D foi relatado por estar envolvido na biossíntese de FCs em plantas cítricas . O gene *CYP82D64* é capaz de hidroxilar xantotoxina (8-metoxifuranocumarina linear) para gerar 5-OH-xantotoxina (5-hidroxi,8-metoxifuranocumarina linear) (Figura2.3)²²⁴.

A caracterização de da monooxigenase P450 - *CYP76F112* de *Ficus carica*, uma Moraceae, permitiu a constatação da primeira marmesina sintase. Neste estudo foi possível verificar que *CYP76F112* converte demetilsuberosina na furanocumarina linear marmesina com uma afinidade muito alta (Figura 2.3). Sendo assim o conjunto de quatro enzimas que permite a produção de psoraleno a partir do p-cumaroil CoA foi finalizado; abrindo novas perspectivas sobre a capacidade das enzimas P450 desenvolver novas funções relacionadas à adaptação da planta ao seu ambiente²²⁶.

Os genes envolvidos na via biossintética de alguns compostos de defesa são localizados como clusters funcionais em genomas de plantas. ROSELLI et al., 2016¹¹⁰ investigaram a possibilidade da via biossintética de furanocumarinas ser organizada como um cluster utilizando uma abordagem genômica de cromossomo artificial bacteriano (BAC) e confirmou agrupamento parcial dos genes desta via em *Pastinaca sativa*. Dois genes anteriormente identificados nesta via, *CYP71AJ3*²²⁰ e *CYP71AJ4*²²¹, estavam localizados no mesmo BAC, enquanto um terceiro gene, *PsPT*, foi identificado como pertencente a um clone BAC diferente. O mapeamento cromossômico usando fluorescência *in situ* (FISH) indicou que ao clusters gênicos *PsPT*, *CYP71AJ3* e *CYP71AJ4* estão localizados em dois cromossomos diferentes¹¹⁰.

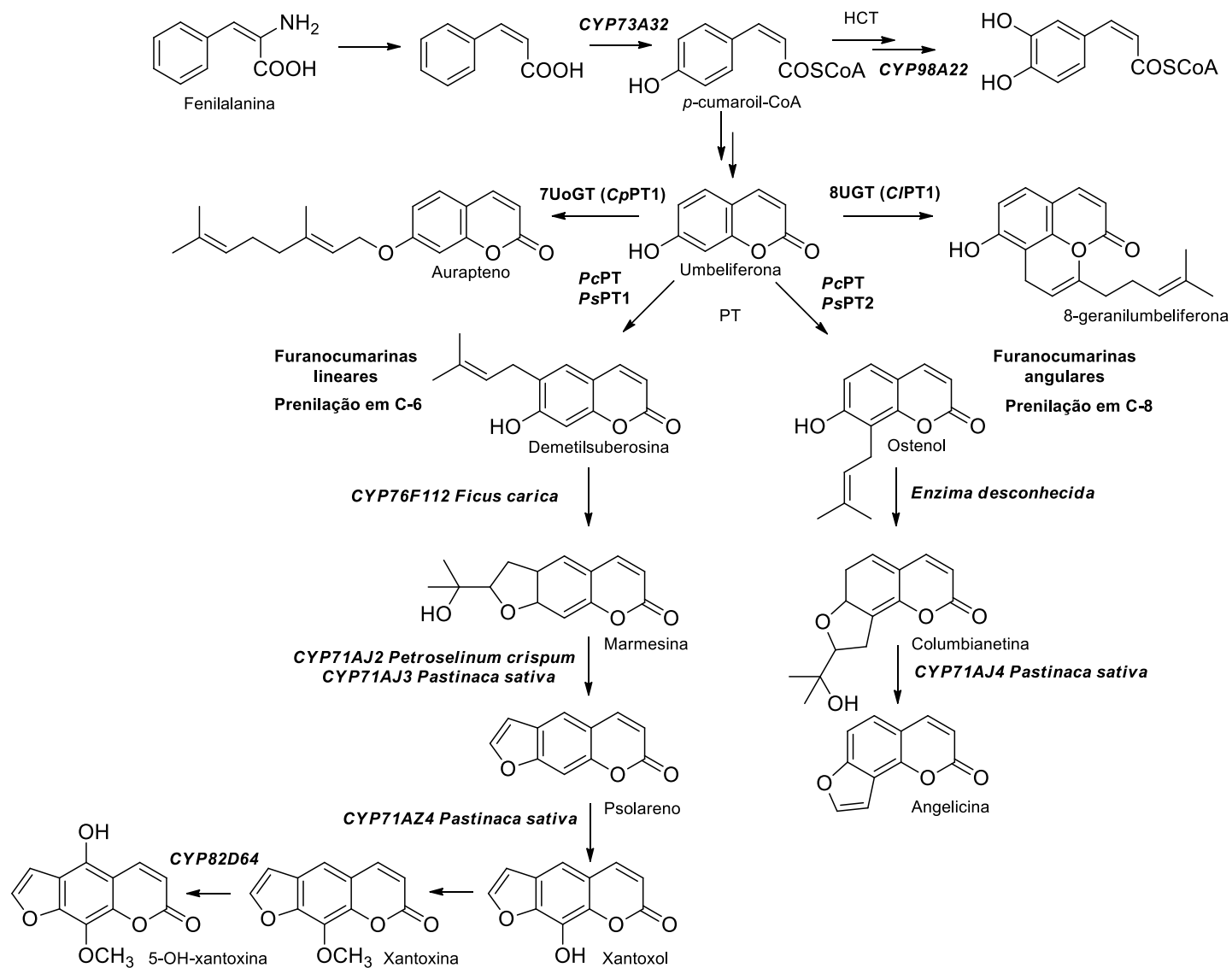


Figura 2.3. Representação esquemática da via biossintética de furanocumarinaa e as etapas enzimáticas envolvidas

BOURGARD et al. 2016, patentaram um método para inibição da produção de furanocumarinas em plantas, em particular em plantas pertencentes à família das Rutaceae, inibindo a expressão de uma proteína chamada *GfPT*, que possui atividade de preniltransferase específica de cumarina. Na presença de umbeliferona, *GfPT*, DMAPP e cátions de cobalto, através de análise em HPLC observou a formação dos intermediários prenilados da biossíntese das furanocumarinas: o ostenol e a demetilsuberosina. Quando é realizado o silenciamento deste gene, não é possível observar a formação dos intermediários. A inibição da produção destas substâncias, torna o gene *GfPT* “defeituoso”, como resultado da deleção, inserção e/ou substituição de um ou mais nucleotídeos.

Dentro deste contexto o diferencial do presente trabalho consiste em delinear perspectivas para a possibilidade de promover um melhoramento genético em espécies de citros não através da inibição do gene de PT como desenvolvido por BOURGARD et al. 2016, mas através do desenvolvimento de um método de superexpressão deste gene para estimular a biossíntese de piranocumarinas nas raízes, na tentativa de gerar plantas e novos porta-enxertos que sejam resistentes ao ataque de doenças em citros, especificamente ao HLB.

A via biossintética das FCs é muito semelhante à das PCs. Desde 2007, diferentes etapas enzimáticas da via FC foram caracterizadas pelo grupo de pesquisa coordenado por HEHN A. (Figura 2.3) permitindo a compreensão de como essas moléculas apareceram em um contexto evolutivo em diferentes famílias de plantas, incluindo Rutaceae e o gênero *Citros*²²⁷. Embora muito trabalho tenha sido feito sobre FCs, pouco foi publicado sobre a produção de PCs e não há nenhuma informação ao nível molecular. Até o momento, a biossíntese de PCs é considerada usando demetilsuberosina ou ostenol como intermediário. Contudo, é de extrema importância descobrir quais as enzimas que estão envolvidas nesta via.

Um fato relevante que justifica o desenvolvimento do presente trabalho é que até o momento, o gene responsável pela prenilação da umbeliferona para a formação de piranocumarinas não foi identificado e ainda não foram isoladas e nem caracterizadas as enzimas envolvidas na formação do anel pirano. Ainda não há evidências de qual intermediário prenilado leva a formação desta classe de substâncias.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

As piranocumarinas xantiletina e seselina estão envolvidas nos mecanismos de defesa de *C. sinensis* frente à bactéria causadora do HLB *C. liberibacter*. Assim, os principais objetivos são a quantificação dos níveis de expressão por qPCR dos genes para DXR, DXS, PT em raízes de *Citrus sinensis* x *Citrus limonia* de plantas saudáveis e plantas sintomáticas infectadas com HLB cultivadas em casa de vegetação e a caracterização molecular das preniltransferases (PT) em *C. sinensis* responsáveis pela prenilação da umbeliferona, levando a formação de demetilsuberossina e ostenol.

2.2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, os objetivos específicos serão:

- Preparar mudas de *Citrus sinensis* x *Citrus limonia* saudáveis e infectadas com CLas em casa de vegetação.
- Através de análises *in silico*, identificar a presença dos genes em *C. sinensis* para DXR, DXS, responsáveis pela biossíntese da unidade de IPP, através da via do MEP.
- Através de análises *in silico*, identificar a presença dos genes em *C. sinensis* para PT responsáveis pela reação de prenilação que leva a formação das piranocumarinas lineares e angulares.
- Realizar experimentos de qPCR para quantificar a expressão dos genes DXR, DXS e PT, nas raízes de plantas saudáveis e plantas infectadas com CLas.
- Caracterização molecular dos genes PT1 e PT2, através de ensaios de atividade enzimática com os intermediários da biossíntese de piranocumarinas.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Análises *in silico* no genoma de *C. sinensis* e desenho de primers

Análises *in silico* para identificar genes envolvidos na biossíntese de piranocumarinas no genoma de *C. sinensis* (Wu et al., 2014)²²⁸, foram realizadas. Sequências de DNA para as enzimas 1-deoxi-D-xilulose 5- fosfato sintase (DXS) e deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase (DXR) envolvidas na biossíntese da unidade de pirofosfato de isopentila (IPP) da via metileritritol (MEP) e para as preniltransferases (PT) que estão envolvidas na reação de prenilação da unidade IPP em umbeliferona depositadas nas bases de dados *Phytozome* e NCBI foram alinhadas ao genoma de *C. sinensis* utilizando os softwares BioEDIT e CLUSTALX. O número de acesso dos genes utilizados nessas análises foram: a) DXS (Genbank EF051346, KJ123647, AB354578, KC818616, AJ429232, KF803334, KM519978, GQ229460, EF507248, EF507248, EF507249, AY25390Y, AJ29113379); b) DXR (Genbank EF051346, NM125674, NM001203671, AY494186, DQ991431, FJ476255, NM001326035, JX518618, JX518617, JX518617, HQ340242, HQ340241); e c) PT (AB825956, KM017083, KM017084). Para cada um dos genes encontrados no genoma de *C. sinensis*, primers para PCR e qPCR foram projetados em regiões não conservadas do CDS (“*coding DNA sequence*”/ região de codificação de um gene) utilizando o software Primer 3.

2.3.2 Extração de RNA e obtenção de cDNA de raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*

As raízes de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia*, sadias e infectadas com CLas, obtidas conforme descrito no item 1.3.1 e 1.3.3, foram lavadas com água para retirar os resíduos de substrato e em seguida maceradas com auxílio de almofariz de pistilo em N₂ líquido, até a formação de um pó bem fino. Em um 1,0g do material vegetal triturado, adicionou-se 1000uL de Buffer de extração + 2% de β-mercaptoetanol. Foi realizada a agitação em vortex e a solução incubada a 65°C por 30 min, sob agitação. Após a incubação, adicionou-se 1000μL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 e centrifugou-se à 1200g por 10min à 4°C. O sobrenadante foi recuperado em 250μL de LiCl 10M e posteriormente mantido em 4°C *overnight*.

A solução foi submetida à centrifugação a 1200g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionou-se 600uL de SSTE + 600uL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1. O material foi centrifugado a 1200g, durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado em um novo tubo, adicionou-se 1000 µL de etanol 100% e a solução foi mantida em -80°C por 2h. Após isso, foi realizada uma etapa de centrifugação a 1200g por 30min a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 1000µL de etanol 75%. Por fim, realizou-se mais uma etapa de centrifugação a 1200g por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet eluído em 30uL de H₂O DEPC.

O RNA foi purificado através de um procedimento de reprecipitação, com sucessivas lavagens com etanol gelado, NaOAc e centrifugação a 1200g a 4°C. Após isso foi realizada a quantificação de RNA em NanoDrop®. Após a obtenção das concentrações de RNA em todas as amostras, a qualidade do mesmo foi avaliada por eletroforese de gel de agarose com brometo de etídeo em uma cuba de 30mL a 70V. Em seguida realizou-se a síntese do cDNA com o tratamento cDNase SIGMA® de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as etapas do procedimento de extração de RNA e síntese de cDNA estão esquematizadas na Figura 2.4.



Figura 2.4. Esquema de extração de RNA em raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*.

2.3.3 Análises de PCR dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*

Em um tubo de PCR de 0,2mL, adicionou-se 1,0µL de cDNA isolado das raízes de *C. sinensis* x *C. limonia* de plantas sadias e infectadas com CLAs, [3,0µg/mL] + 3,2µL de H₂O ultrapura autoclavada + 5,0 µL de SyBR® + 0,4 µL de primer forward + 0,4µL primer reverse, para reação de PCR. Em seguida os tubos foram colocados em termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ Thermal Cycler, 96-Well, com um programa de temperatura para a reação de PCR de: 95°C por 3

min, 95° C em 10s + 56° C em 30s por 40x e 6° C ∞. Posteriormente os produtos da PCR para os genes candidatos da biossíntese de piranocumarinas em citros, foram analisados em gel de agarose com brometo de etídeo reveladas em câmara de UV.

2.3.4 Avaliação da expressão gênica por qPCR dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas

A partir dos resultados obtidos por PCR foi delineado o experimento de qPCR para os genes candidatos (DXS2, DXR, PT1 e PT2) envolvidos na biossíntese de piranocumarinas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias e infectadas com CLas. Para este experimento foi selecionado o gene de referência GAPC2 de acordo com MAFRA et. al., 2012²²⁹. Foram feitas curvas de eficiência para as [cDNA] diluído 5x, 10x, 20x, 30x e 40x e para as proporções de primers forward e reverse [5:5], [5:10], [10:5] e [10:10], em triplicata. Após a determinação da condição ótima para cada cada um dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*, em uma microplaca de PCR de 98 poços foi realizado em triplicata a reação de PCR com 1µL cDNA 5x, 0,4µL de primer forward, 0,4µL de primer reverse, 3,2µL de H₂O, SyBr 5,0µL.

A placa foi submetida a centrifugação na rotação máxima por 30s e em seguida foi colocada no *Real time PCR system* StepOne da Applied BiosystemTM, com programa: *holding stage* a 95° C por 3min, 40 ciclos de *Cycling stage* a 95° C a 10s e 60° C por 30s, *melt curve stage* de 95° C por 5s e 60° C por 30s. A curva de expressão relativa foi obtida e após os cálculos descontando os valores da expressão do gene de referência, podemos quantificar a expressão de cada um dos genes avaliados a partir do valor de $2^{-\Delta Ct}$ de acordo com LIVAK e SCHMITTGEN 2001²³⁰.

2.3.5 Extração de RNA, obtenção de cDNA para caracterização molecular de preniltransferases de *C. sinensis* e *C. limonia*

As amostras de raízes, caule e folhas de *C. sinensis* (CS) e *C. limonia* (CL) foram coletadas no Jardin botanique Jean-Marie Pelt – Nancy, França e na Estação de Pesquisa Agrícola INRA/CIRAD de San Giuliano na Corsica – França, respectivamente. As plantas foram divididas em raíz (CSR e CLR), caule (CSS e

CLS) e folhas (CSL e CLL) e maceradas em almofariz de pistilo com N₂ líquido para a extração do RNA com o kit EZNA® Plant RNA. Em seguida, o RNA extraído foi quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo para avaliar a qualidade do extraído. Posteriormente a retrotranscrição do RNA em cDNA foi feita utilizando o Kit High-Capacity RNA a cDNA da Applied Biosystems®, seguindo as orientações do fabricante.

2.3.6 Isolamento e purificação dos genes para caracterização molecular de preniltransferases de *C. sinensis* e *C. limonia*

Os primers para o genes candidatos de preniltransferase (PT1 e PT2) em citros, foram projetados utilizando o software BioEdit® (Anexo II). Os produtos de amplificação por PCR foram obtidos utilizando o kit DNA Polimerase PrimeStar Max - Takara®, seguindo as orientações do fabricante. Os produtos da reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e observados por fotodocumentador Gel Doc. As bandas com o número esperado de bases para cada gene/amplicom de interesse em cada uma das espécies de citros utilizadas, foram recuperadas do gel de agarose utilizando o kit Nucleospin® para a limpeza/purificação dos produtos da PCR e em seguida o material genético foi quantificado em NanoDrop®.

2.3.7 Clonagem dos genes candidatos de preniltransferases PT1 e PT2 de *C. sinensis* e *C. limonia* em *E. coli*

Após isolados e purificados; 10 µL dos amplicons referentes às preniltransferases (PT1 e PT2) isoladas das raízes de *C. sinensis* (CSR) e *C. limonia* (CLR) +10µL de PCR Master Mix 2x da Thermo Scientific®, foram mantidos a 72°C por 30 min, para adição de Adenina 3'. Em seguida este amplicons foram subclonados no vetor pCR™8/GW/TOPO® (Thermo Fisher Scientific) (Figura 2.5) e mantidos a 20°C overnight.

Os amplicons de PT foram clonados em células estoque de *Escherichia coli* eletrocompetentes. Após 18h de cultura de célula de bactéria em meio sólido LB + spectina à 35°C, foram selecionadas pelo menos 20 colônias de bactéria para as preniltransferases PT1 e PT2 extraídas de raízes *C. sinensis* (CSR) e *C. limonia* (CLR). Estas colônias foram isoladas em uma outra placa de petri com meio LB +

Spectina. A presença do inserto de interesse foi confirmada usando o SapphireAmp Fast PCR e em seguida, selecionou-se as colônias que foram confirmadas com a presença dos insertos desejados. Estas foram cultivadas por 12h a 35° C com agitação em meio líquido LB + spectina. O DNA plasmidial foi então purificado utilizando o Kit Pasmid (NoLid) Nucleospin® e enviado para sequenciamento na Macrogen Europe B.V.

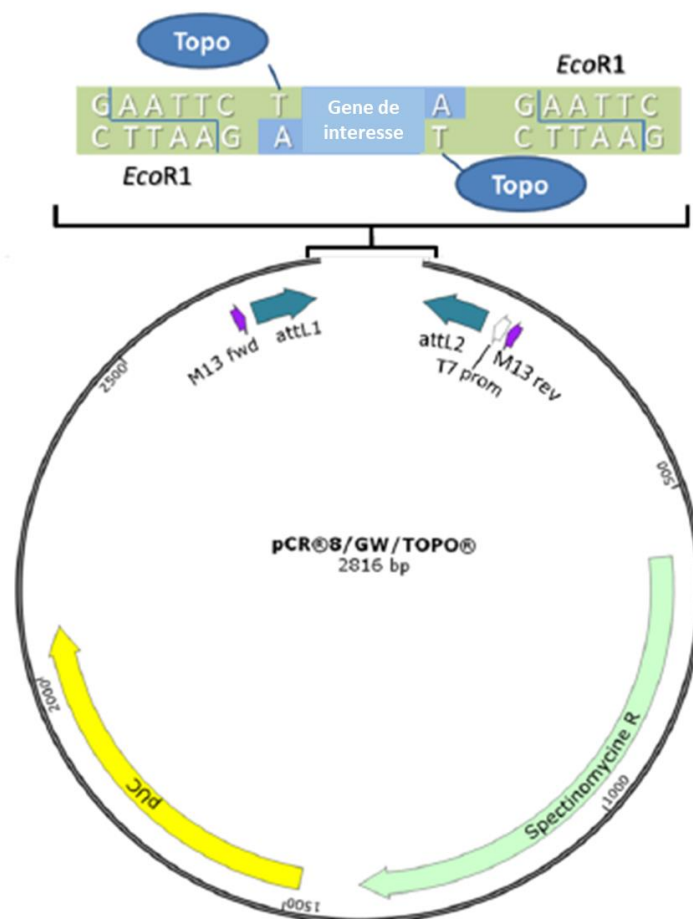


Figura 2.5 Mapa do vetor de clonagem pCR8™/GW/TOPO®

2.3.8 Expressão heteróloga dos genes candidatos de preniltransferases de *C. sinensis* e *C. limonia* por agroinfiltração em *N. benthamiana*

Após a obtenção do sequenciamento; os amplicons referentes aos genes PT1 e PT2 de *C. sinensis* (CSR) e *C. limonia* (CLR) foram inseridos no vetor pEAQ-HT-DEST 1 (Figura 2.6) por recombinação LR para produzir um construto contendo as PT's desejadas. Os plasmídeos que expressaram PTs em pEAQ, pEAQ

“vazio” e pEAQ + GFP (*Green Fluorescent Protein*) foram introduzidos individualmente em *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e em seguida foram cultivadas em placas de petri com meio LB + canamicina + rifamicina. As colônias isoladas de *A. tumefaciens* foram cultivadas em tubo Falcon por 18h, à 180rpm e 28°C em 50 mL de meio LB + Canamicina + rifamicina líquido. As culturas de *A. tumefaciens* transformadas de cada um dos tratamentos, foram submetidos à centrifugação à 6000 rpm por 10 min, onde o sobrenadante foi eliminado e ressuspensionado em 2mL de H₂O deionizada autoclavada. Este procedimento de lavagem foi realizado por 3 vezes. Em seguida o material ressuspensionado foi diluído 100x e realizada a medida de DO à 600nm em GE Healthcare Biochrom™ Ultrospec™ 10 Cell Density Meter.

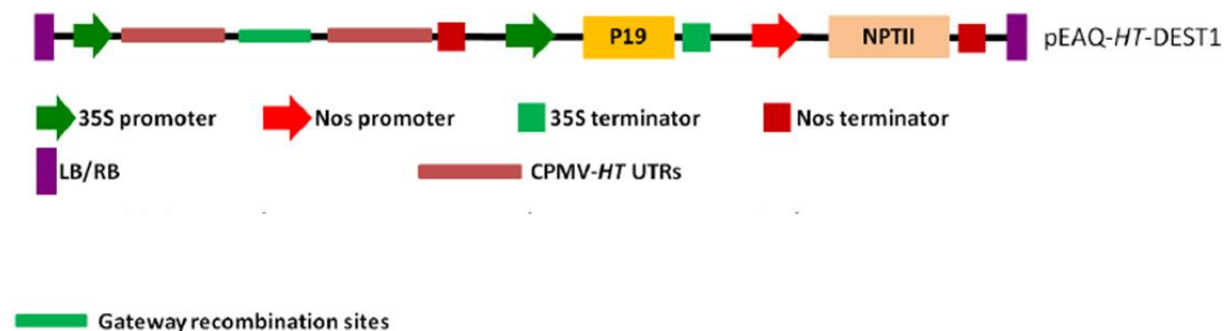


Figura 2.6. Representação do T-DNA dos vetor pEAQ-HT-DTS1 contendo o CPMV-HT cassete de expressão, o supressor P19 e o gene de resistência à canamicina NPTII.

Os transformantes foram diluídos para uma concentração final de 0,4 g/L em 500 mL de H₂O deionizada autoclavada e por fim infiltrados por agroinfiltração nas folhas de *N. benthamiana*. Foram realizadas 5 repetições por tratamento e as plantas de *N. benthamiana* mantidas em caixas umidificadas à 25°C por 96h. As folhas infiltradas foram submetidas a microscopia eletrônica por UV em 354 e 395 nm para confirmar a inserção de peAQ-GFP nas folhas de *N. benthamiana*.

A preparação do microssoma vegetal foi realizado conforme o protocolo desenvolvido por KARAMAT et al., 2014²¹⁹. As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em tampão fosfato 0,1M (Kpi), pH 7,0, contendo 0,1 g L⁻¹ de polivinilpolipirrolidona, inibidor de protease e 1 mM de DTT. Posteriormente foi centrifugado por 30 min a 10000g para remover os detritos seguido por uma etapa de filtração. A solução filtrada foi ultracentrifugada por 1h e 30min em ultracentrífuga

(Sorvall WX80; ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) a 100.000g. O pellet foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. Para rastrear bioquimicamente os potenciais substratos, cada molécula (umbeliferona, herniarina, 4-metil-umbeliferona, escopoletina e esquimina – Sigma Aldrich®) foi adicionada em uma concentração final de 200 μ M em DMSO, 1 mM de DMAPP – Sigma Aldrich®, 1 mM de MgCl₂ e 15 μ l de de microsoma em tampão Tris-HCl 0,1 M. A mistura de reação foi incubada por 8 h, e a reação foi interrompida pela adição de HCl (concentração final de 1%). Todas as etapas envolvidas neste processo estão representadas na Figura 2.7.

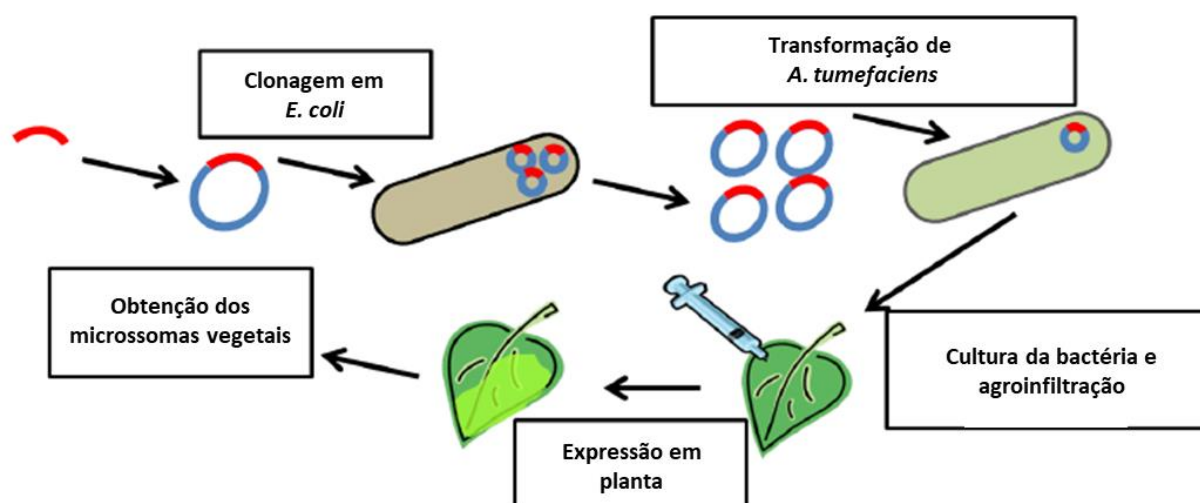


Figura 2.7. Design experimental para pEAQ para clonagem e expressão da proteína de interesse.

2.3.9 Extração dos produtos de reação e análises via LC/MS

Os substratos e os produtos da reação para PT1 e PT2 em CSR e CLR foram extraídos com 500 μ L de acetato de etila. As misturas foram agitadas por 15 min e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. Posteriormente 450 μ l da fase superior/fase orgânica foi coletada. Para triagem de substrato, este procedimento foi repetido mais uma vez usando 500 μ L adicionais de acetato de etila, e a fração de acetato de etila resultante (450 μ L) foi combinada com a primeira fração. O extraído foi evaporado a vácuo e dissolvido em 100 μ L de metanol em vórtex por 15 min. Após centrifugação por 30 min a 2000 rpm, o sobrenadante foi submetido à análise LC/MS.

As análises de LC/MS ESI nos modo positivos e negativo de ionização foram realizadas em UHPLC Thermo LTQ-ORBITRAP (Thermo Fischer Scientific®),

utilizando coluna Phenomenex Kinetex XB-C18 (150 × 2,1 mm, 2,6 μm, Phenomenex, Le Pecq, França). Os compostos foram analisados em modo gradiente de eluição utilizando solvente A (água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico), consistindo em 10% de B de 0 a 1 min, 10% a 50% B até 20 min, 100% B aos 21 min e mantido por 4 min, retorno às condições iniciais aos 26 min até os 30 min, com volume de injeção de 10 μL a uma vazão de 0,2 ml.min⁻¹ a uma temperatura de 40 °C. Os sinais de MS foram escaneados a uma faixa de *m/z* de 100 a 800.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Análises *in silico* no genoma de *C. sinensis*

Três sequências candidatas a DXS foram encontradas no genoma de *C. sinensis* (DXS1: 1g004923m - 734pb, DXS2 - 1g003948m - 764pb e DXS3 - 1g004946m - 640pb), uma para DXR (1g012004m - 474pb) (Figura 2.8) e três para PT (PT1 - XP_006483446 – 1208pb, PT2 - XP_006483444 – 1226pb and PT4 - XP_015387287 - 1223pb) (Anexo I), (Figura 2.9) O resultado do alinhamento das sequências encontradas no genoma de *C. sinensis* com aquelas utilizadas nas análises *in silico*, conforme descrito no item 2.3.1 está demonstrado no Anexo I .

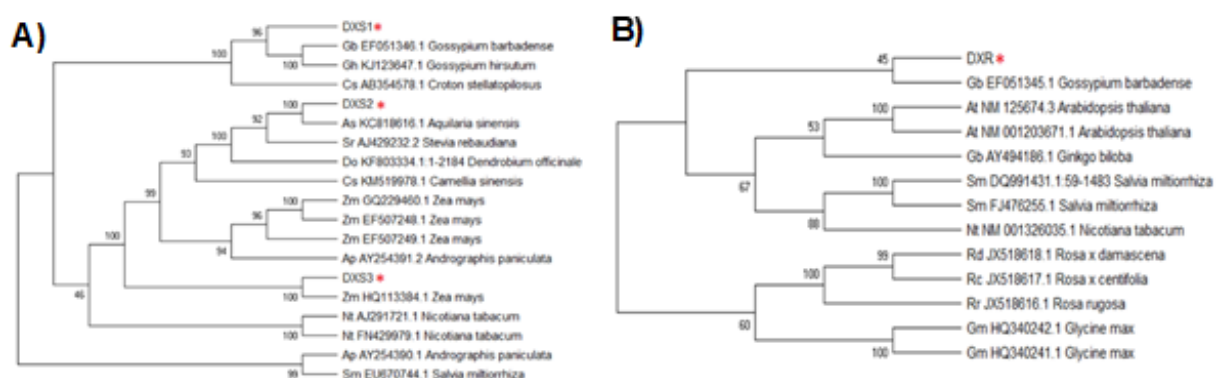


Figura 2.8. Sequências encontradas no genoma de *C. sinensis* para **A)** DXS e **B)** DXR.

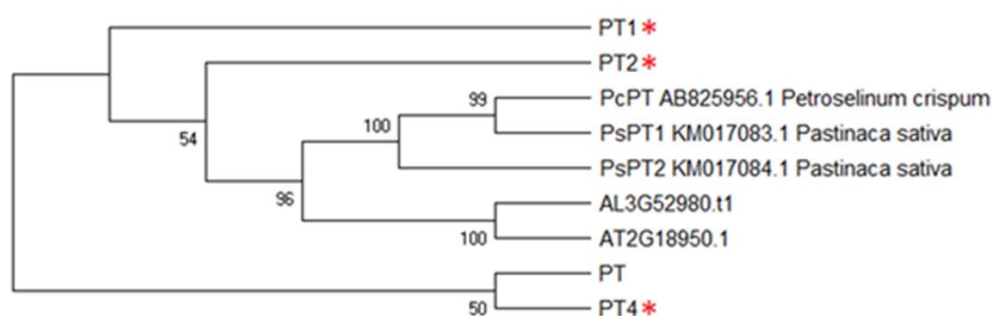


Figura 2.9. Sequências encontradas no genoma de *C. sinensis* para PT.

Para cada um desses genes foram desenhados primers (Tabela 2.1) para posterior análise de PCR e qPCR. Além destes genes de interesse, para as análises de qPCR foram também utilizados os primers para os genes de referência

para *C. sinensis*: UPL7 e GAPC2, de acordo com MAFRA et. al., 2012²²⁹ (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Primers para os genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas em *C. sinensis* x *C. limonia*.

| Primer | Sequência (5' – 3') Fw | Sequência (5' – 3') Rv |
|----------------|------------------------|--------------------------|
| CsDXR | GCTGCTCCGAACTGAACTT | CCTGGTTGTCTCCAAGAAAGAG |
| Cs DXS1 | AGTCAGCACCAGCAAGCAC | CCCAGAAAAGAAAACATCATCACG |
| Cs DXS2 | GGAACAAACAGGTGGAAGACA | GGAACAAACAGGTGGAAGACA |
| Cs DXS3 | CATAAATTCCTGCGTCTGAGC | AGTGGTACTTGGCAGAAGG |
| Cs PT1 | GCAAGCAGCAGAACTGTAAA | AAGCACGCATAAAACGGTAT |
| Cs PT4 | TTCGTGTTTCAGGCCTTCTCAC | GAGTGTTTTCTTCCTCAGATTTTG |
| Cs PT2 | TGAAAACACAAGCAGCAGAAA | CAGGAGAACATCCCAAAGC |
| GAPC2 | TCTTGCCTGCTTTGAATGGA | TGTGAGGTCAACCACTGCGACAT |
| UPL7 | CAAAGAAGTGCAGCGAGAGA | TCAGGAACAGCAAAGCAAG |

2.4.2 Extração de RNA das raízes de *C. sinensis* x *C.limonia* e análises dos produtos de PCR para os genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas

O RNA de raízes de 4 plantas de *C. sinensis* obtidas conforme descrito no item 1.3.1, foi extraído e purificado através do procedimento de reprecipitação descrito na seção 2.5.2. Após isso foi realizada a quantificação de RNA em NanoDrop® e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Quantificação de RNA das raízes de 4 plantas de *C. sinensis* x *C. limonia*.

| Amostra | [RNA] ng/μL |
|----------|-------------|
| 1 | 3013,7 |
| 2 | 3222,8 |
| 3 | 1990,3 |
| 4 | 2618,6 |

Após a obtenção das concentrações de RNA nas quatro amostras, a qualidade do mesmo foi avaliada por eletroforese de gel de agarose com brometo de etídeo. Através da placa do gel revelada em câmara de UV (Figura 2.10)., foi possível observar que somente as duas bandas características de fragmentos de RNA são visualizadas (referentes ao 28S e ao 18S rRNA). Isso indica que o RNA extraído e posteriormente purificado por reprecipitação, possui boa qualidade, não apresenta degradação e está livre de impurezas.

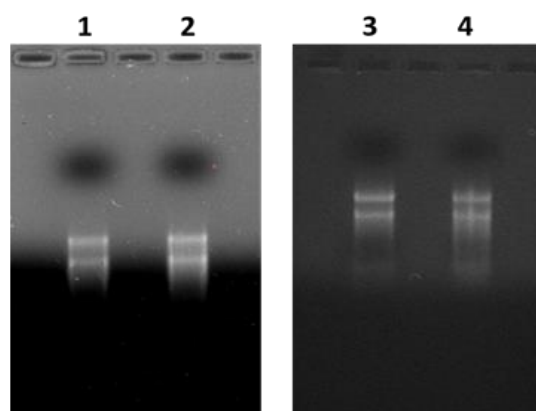


Figura 2.10. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo referente ao RNA extraído das raízes de 4 plantas de *C. sinensis* x *C. limonia*.

A Figura 2.11, mostra a foto do gel de agarose em brometo de etídeo reveladas em câmara de UV, para o produto da reação de PCR para os todos genes candidatos da biossíntese de piranocumarinas encontrados nas análises *insilico* para 4 amostras das raízes de plantas de *C. sinensis* x *C.limonia*. Os primers utilizados na PCR estão reportados na Tabela 2.1..

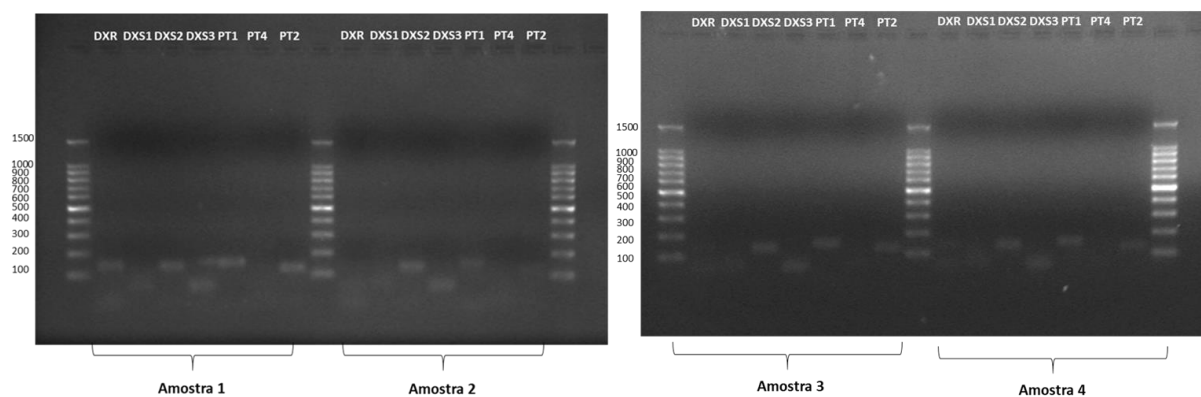


Figura 2.11. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo para os produtos da reação de PCR com RNA diluído 10x das amostras 1, 2, 3 e 4 de raízes de *C. sinensis* x *C. limonia* dos genes candidatos para a DXR, DXS e PT.

É possível observar que houve amplificação somente para os fragmentos dos genes: DXR = 146pb apenas na amostra 1, DXS2 = 141pb e PT1 = 157pb em todas as amostras e PT2 = 130pb em todas as amostras exceto para a 2. Os genes DXS1, DXS3 e PT4, não apresentaram produtos de amplificação após a reação de PCR.

Para certificar que os fragmentos dos genes referentes a DXS1, DXS3, PT4 realmente não estavam sendo expressos e que o gene da DXR e PT2 estavam sendo expressos em todas as amostras testadas, foi realizada uma nova a PCR com cDNA proveniente do RNA sem diluição. Também foi feita reações para os genes de referência de citros: UPL7, GAPC2 e TUB, para verificar a expressão dos mesmos nas raízes de citros (Figura 2.12). Observou-se que em maior concentração de RNA para a síntese do cDNA; os fragmentos para a DXR e PT2 apresentaram o produto de PCR esperado para todas as amostras. Os genes DXS1, DXS3 e PT4 novamente não mostraram os produtos da reação de PCR esperados. Os genes de referência UPL7 e GAPC2 se mostraram como promissores para avaliação de expressão em qPCR.

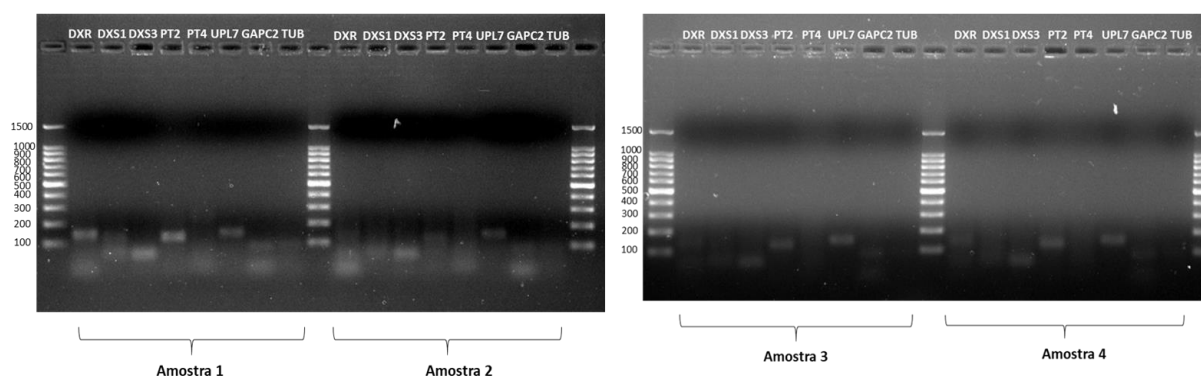


Figura 2.12. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo para os produtos da reação de PCR com RNA sem diluição das amostras 1, 2, 3 e 4 de raízes de *C. sinensis* x *C. limonia* dos genes candidatos para a DXR, DXS e PT.

2.4.3 Avaliação da expressão gênica por qPCR dos genes candidatos envolvidos na biossíntese de piranocumarinas em raízes de *C. sinensis* x *C.limonia* sadias e infectadas com CLas

Através dos resultados obtidos na PCR convencional, prosseguiu-se com as análises de qPCR somente para os genes que apresentaram expressão gênica nas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*: DXR, DXS2, PT1, PT2 utilizando o

gene de referência GAPC2. Antes de realizar a quantificação da expressão gênica por qPCR dos genes candidatos mencionados acima, foram realizados os testes de curva de eficiência conforme descrito no item 2.3.4. A Tabela 2.3, mostra as condições com melhor curva de melt, % de eficiência, valor de Ct e R², para os genes DXR, DXS2, PT., PT2 e GAPC2. A Figura 2.13 mostra os gráficos de amplificação que foram criados quando o sinal fluorescente de cada amostra foi plotado em relação ao número do ciclo; onde os gráficos de amplificação representam o acúmulo de produto em cada ciclo durante o experimento de qPCR.

Tabela 2.3. Resultados para a curva de eficiência para os genes DXR, DXS2, PT1, PT2 e os genes de referência UPL7 e GAPC2.

| Gene | [cDNA] | [primer] Fw:Rv | % eficiência | Ct | R ² |
|--------------|--------|----------------|--------------|------|----------------|
| DXR | 5x | 10:5 | 95,275 | 24,8 | 0,996 |
| DXS2 | 5x | 10:10 | 100,374 | 19,3 | 0,998 |
| PT1 | 5x | 10:10 | 101,085 | 22,7 | 0,994 |
| PT2 | 5x | 5:10 | 94,758 | 27,7 | 0,957 |
| GAPC2 | 5x | 5:10 | 92,257 | 18,6 | 0,996 |

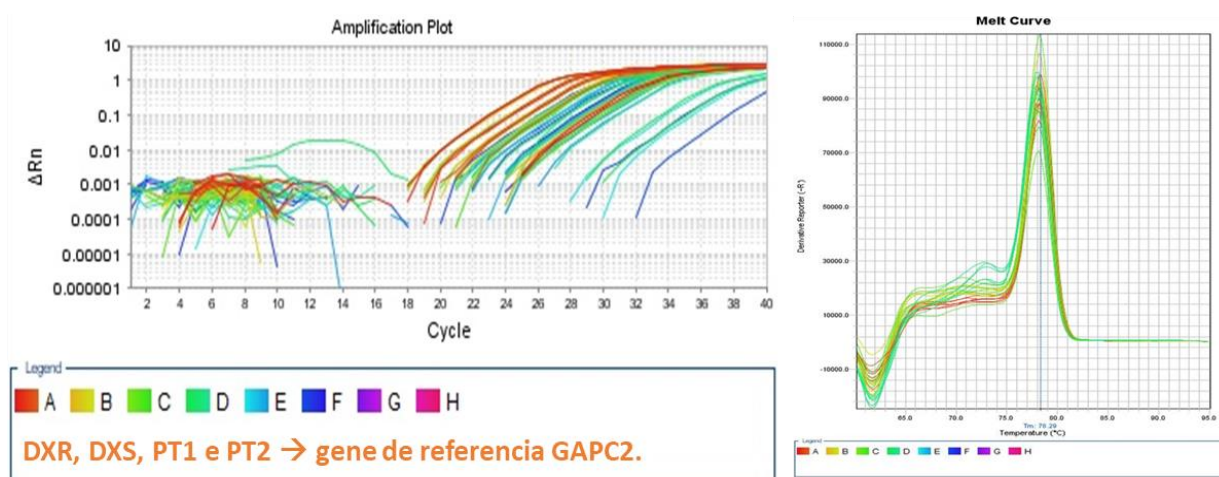


Figura 2.13. Gráficos de amplificação referente à curva de eficiência para os genes DXR, DXS2, PT1, PT2 e GAPC2.

A expressão relativa de cada um dos genes avaliados foi realizada a partir das condições otimizadas apresentadas na Tabela 2.3 e o gene de referência selecionado para a normalização dos níveis de expressão dos genes alvo foi o GAPC2, por possuir maior expressão do que todos os genes avaliados para a

biossíntese de piranocumarinas, melhor porcentagem de eficiência, maior valor de Ct e melhor curva de melt. A curva de expressão relativa foi obtida e após os cálculos descontando os valores da expressão do gene de referência, podemos quantificar a expressão de cada um dos genes avaliados a partir do valor de $2^{-\Delta Ct}$ conforme descrito por LIVAK e SCHMITTGEN 2001²³⁰. Foi quantificada a expressão gênica para os genes DXR, DXS2, PT1 e PT2 em raízes de 5 plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS) e sintomáticas infectadas com CLas (RPI) (Figura 2.14).

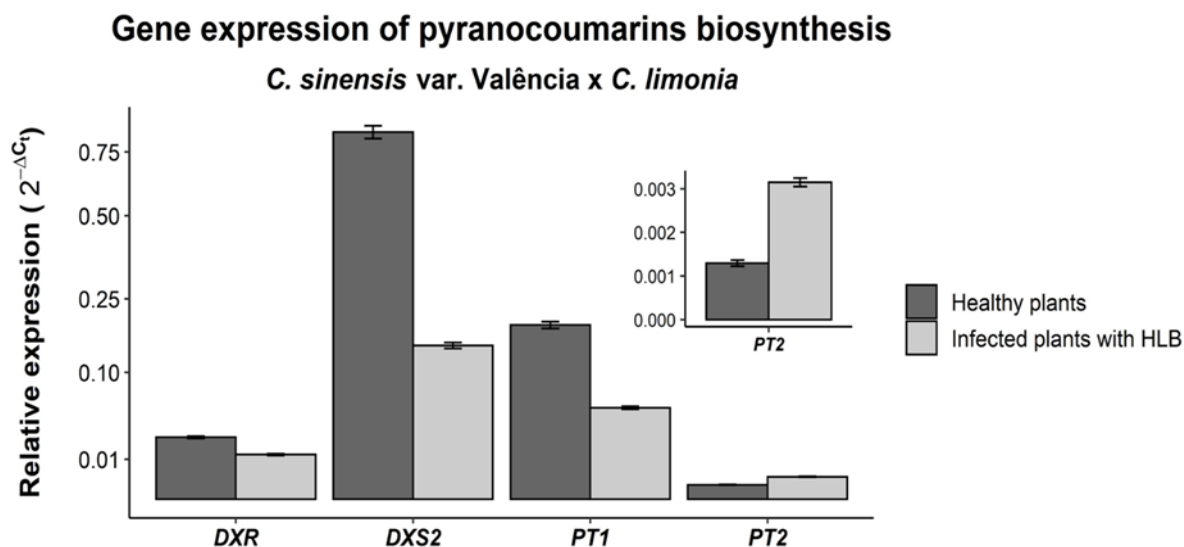


Figura 2.14. Expressão gênica para os genes candidatos envolvidos da biossíntese de piranocumarinas: DXR, DXS2, PT1 e PT2 em raízes de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia* sadias (RPS) e sintomáticas infectadas com CLas (RPI).

A partir da análise dos dados observa-se que o gene mais expresso é o DXS2, conhecido como 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase, responsável pela biossíntese da unidade de IPP via MEP, com valor de $2^{-\Delta Ct}$ de 0.8380. A expressão deste gene nas raízes de *C. sinensis* x *C. limonia*, confirma que a biossíntese da unidade de IPP utilizada na prenilação da umbeliferona, para levar as piranocumarinas, ocorre através da via plastídica MEP. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos nos estudos da marcação isotópica por RMN quantitativo em plântulas submetidas ao cultivo em glicose-1- $[^{13}C]$ ¹⁴².

Outra observação importante é que a preniltransferase PT1 é bem mais expressa que a PT2 nas raízes de citros. Este resultado corrobora com as análises de quantificação de piranocumarinas em *C. sinensis* x *C. limonia* demonstradas na

seção 1.4.8 . Espera-se que realmente um destes genes seja mais expresso que o outro, pois a quantidade do derivado linear (xantiletina) é duas vezes maior do que o derivado angular (seselina) nas raízes de plantas de *C. sinensis* x *C. limonia*.

Houve uma diminuição na expressão dos genes DXR, DXS2 e PT1, nas plantas infectadas com CLas frente àquelas sadias. Para a DXR o valor de $2^{-\Delta Ct}$ foi de 0,0124 e 0,0239, para DXS2 de 0,1471 e 0,8380 e para PT1 de 0,05206 e 0,1888 respectivamente. Para o gene PT2 houve o aumento na expressão relativa para as plantas sintomáticas infectadas com CLas frente às sadias com valores de $2^{-\Delta Ct}$ de 0,0031e de 0,0012 respectivamente.

Foi possível correlacionar os dados da expressão gênica dos genes envolvidos na biossíntese de piranocumarinas com os dados da quantificação de xantiletina e seselina por HPLC-UV RPS demonstrado no item 1.4.8. Dentre as plantas avaliadas, as sintomáticas infectadas com CLas apresentaram uma menor concentração de xantiletina frente as sadias, com 51,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 61,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Para a seselina observou-se um aumento na produção desta substância. As raízes de plantas sintomáticas infectadas com CLas possui 32,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ desta substância; frente a 25,74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para raiz de plantas sadias. Observa-se, portanto, uma diminuição significativa com $p \geq 0,05$ na produção de xantiletina e um aumento significativo na produção de seselina nas raízes de plantas sintomáticas infectadas com CLas.

Sendo assim, podemos observar que os resultados qPCR corroboram com os resultados obtidos na quantificação via HPLC-UV, onde, para as plantas infectadas com CLas observa-se um aumento na expressão do gene PT2 frente as plantas sadias. Observa-se também que a produção de seselina é maior nas plantas afetadas com a doença. Portanto é possível inferir que o gene PT2 pode estar associado a biossíntese da piranocumarina angular: seselina. Há uma diminuição na expressão do gene PT1 e a produção de xantiletina é menor quando as plantas estão infectadas com CLas. É possível inferir que o gene PT1 pode estar associado a biossíntese da piranocumarina linear: xantiletina. Para confirmar se o gene PT1 está envolvido na prenilação da umbeliferona para a formação da xantiletina e PT2 na formação da seselina, necessita-se realizar expressão heteróloga e caracterização molecular.

2.4.4 Extração de RNA, obtenção de cDNA, isolamento e purificação dos genes para caracterização molecular de preniltransferases de *C. sinensis* e *C. limonia*

Na avaliação da expressão dos genes PT1 e PT2 em raízes, caule, e folhas de CS e CL, através da análise do gel de PCR, é possível observar que o gene PT1, que possui 1209pb, é mais expresso que PT2 em ambas as espécies de citros. Para o gene PT1 conclui-se que este gene é mais expresso nas raízes, no caule e nas folhas respectivamente, para ambas as espécies avaliadas. O gene PT2, que possui 1227 pb, é expresso de maneira moderada nas raízes e folhas e pouco expresso no tanto para CS quanto para CL (Figura 2.15 e Tabela 2.4).

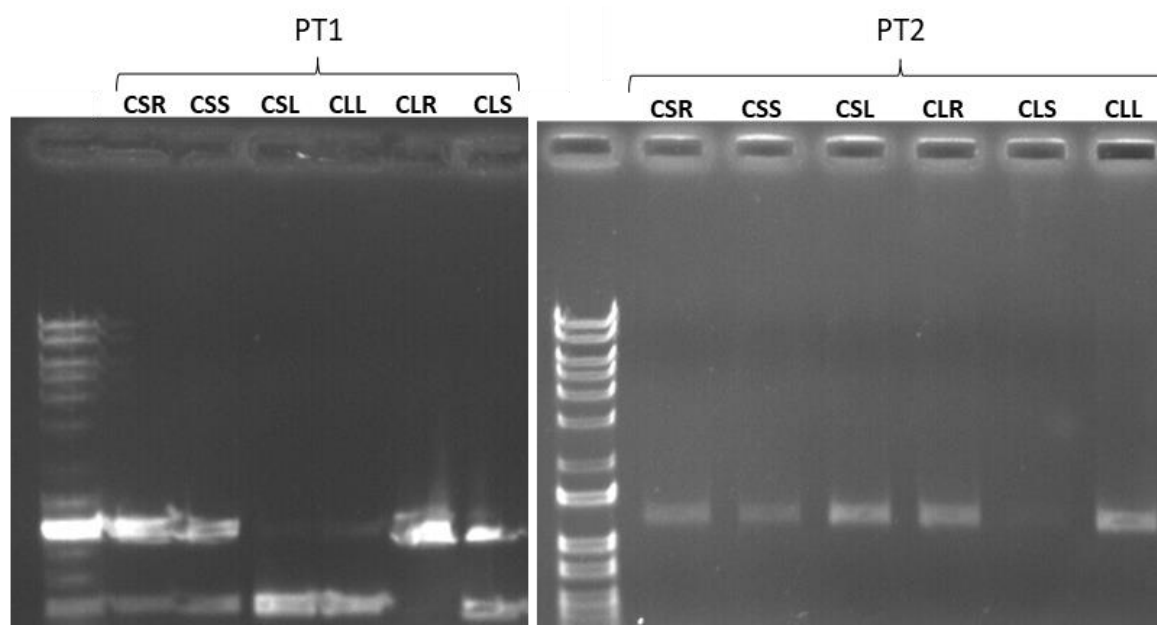


Figura 2.15. Análise de expressão dos genes PT1 e PT2 em raiz (CSR e CLR), caule (CSS e CLS) e folha (CSL e CLL) de *C. sinensis* e *C. limonia*.

Tabela 2.4. Avaliação do nível de expressão dos genes PT1 e PT2 em raiz (CSR e CLR), caule (CSS e CLS) e folha (CSL e CLL) de *C. sinensis* e *C. limonia*.

| Genes | Size (pb) | CSR | CSS | CSL | CLR | CLS | CLL |
|------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| PT1 | 1209 | Alta | Moderada | Baixa | Alta | Moderada | Moderada |
| PT2 | 1227 | Moderada | Baixa | Moderada | Moderada | Baixa | Moderada |

Como a raiz tem um bom nível de expressão para ambos os genes candidatos nas duas espécies avaliadas, selecionou-se este tecido para prosseguir com a purificação dos genes. Foram realizadas 5 reações de PCR para cada gene em cada uma das espécies de citros (Figura 2.16). As bandas com o número esperado de bases para cada gene em uma das espécies de citros utilizada, foram recuperadas do gel com limpeza de PCR Nucleospin® e quantificadas. O gene PT1 de CSR foi isolado a uma concentração de 374 ng/μL e de CLR de 354 ng/μL. O gene PT2 de foi isolado a uma concentração de 392 ng/μL de CSR e de CLR 332 ng/μL.

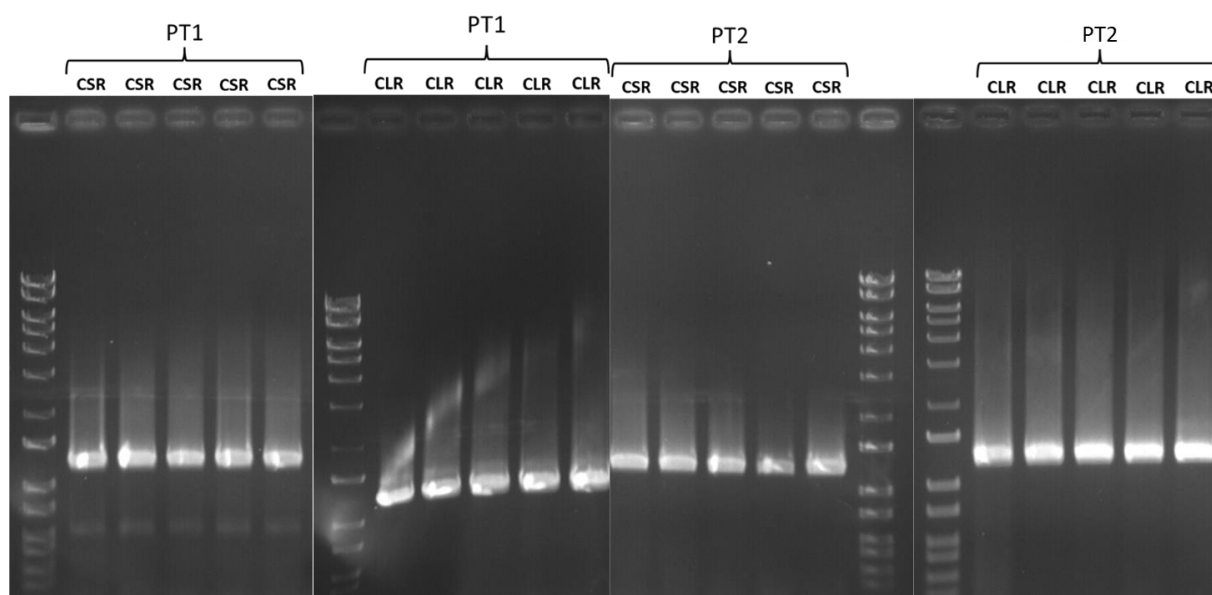


Figura 2.16. Foto da revelação do gel de agarose em brometo de etídeo dos produtos de PCR para isolamento e *clean up* dos genes PT1 e PT2 extraídos de CSR e CLR.

2.4.5 Clonagem dos genes candidatos de prenilttransferases PT1 e PT2 de *C. sinensis* e *C. limonia* em *E. coli*

Os genes isolados foram inseridos no vetor de clonagem pCR™8/GW/TOPO™ e clonados em células estoque de *E. coli* eletrocompetentes. Após 18h de cultura de célula de bactéria em meio sólido LB + spectina à 35°C, foram selecionadas pelo menos 20 colônias de bactéria para PT1 e PT2 extraídos de raízes *C. sinensis* e *C. limonia*. Estas colônias foram isoladas em uma outra placa de petri com meio LB + Spectina (Figura 2.17).

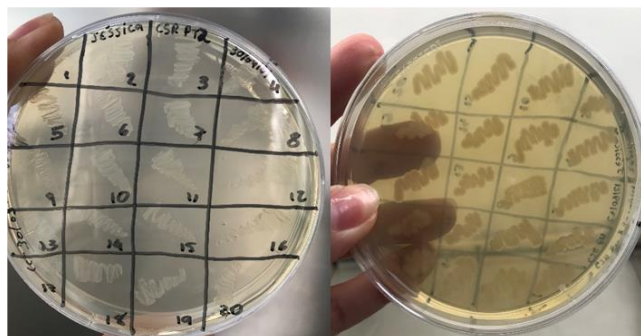


Figura 2.17. Colônias de *E. coli* clonadas com os genes PT1 e PT2, extraídos de raízes de *C. sinensis* e *C. limonia*.

A presença do inserto foi confirmada usando o SaphireAmp Fast PCR (Figura 2.18) e em seguida, selecionou-se as colônias que foram confirmadas com a presença do inserto (CSR PT1 - 18, CSR PT2 - 15, CLR PT1 - 11 e CLR PT2 - 3). Estas foram cultivados por 12h a 35° C com agitação em meio LB + spectina e o DNA plasmidial foi então purificado de acordo com o protocolo descrito na seção 2.3.6. Os resultados do sequenciamento para os insertos Figura 2.19 e 2.20, mostra o alinhamento da sequência peptídica para as proteínas PT1 de CSR e CLR com a PT1 de citros (XP_006483446 LOC102619418 mRNA) e as sequências (KM017083, KM017084 e AB825956) (Anexo II) e de PT2 de CSR e CLR com o gene PT2 de citros (XP_006483444 LOC102618825 mRNA) e as sequências para KM017083, KM017084 e AB825956 (Anexo II), respectivamente.

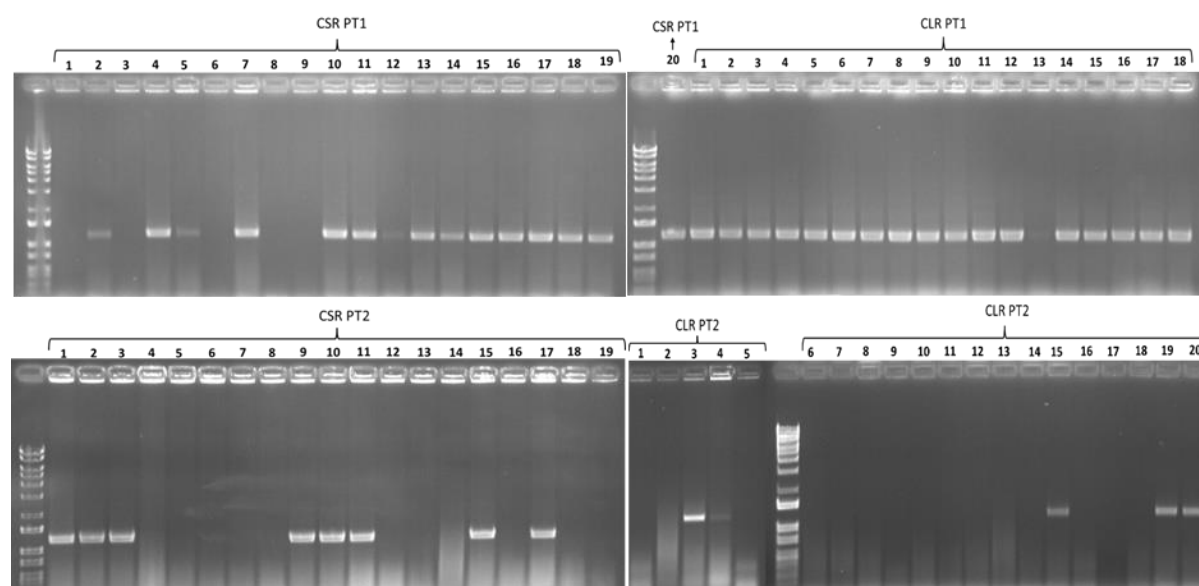


Figura 2.18. Foto da revelação do gel de agarose em câmara de UV dos produtos de PCR utilizando *Saphire Amp* após a clonagem de CSR PT1, CLR PT1, CSR PT2 e CLR PT2 em *E. coli*.

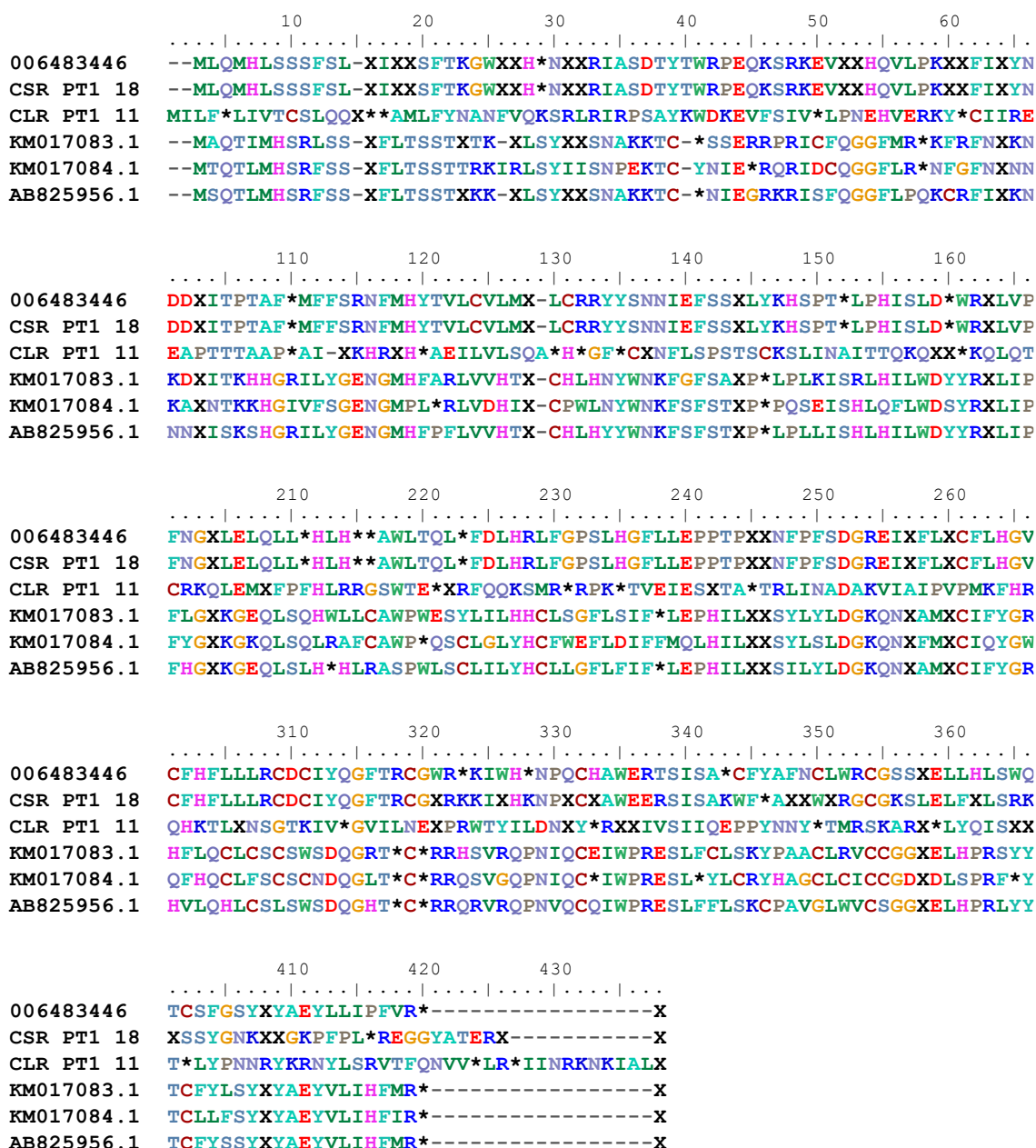


Figura 2.19. Alinhamento das sequências peptídicas: PT1 de CSR e CLR, PT1 de citros (XP_006483446 LOC102619418 mRNA) e de KM017083, KM017084 e AB825956.

Observa-se uma identidade de 91,96% entre o gene PT1-XP_006483446 encontrado no genoma de *C. sinensis* na análise *in silico* e a sequência consenso isolada de CSR PT1 – 18 com alta similaridade até a região de 1170pb (Figura 2.19). Para CLR PT1 – 11, apesar da baixa identidade 51,21% com XP_006483446, esta apresentou um alto percentual de identidade para todas as sequências isoladas, purificadas e clonadas em diferentes colônias de *E. coli* (Anexo IV).

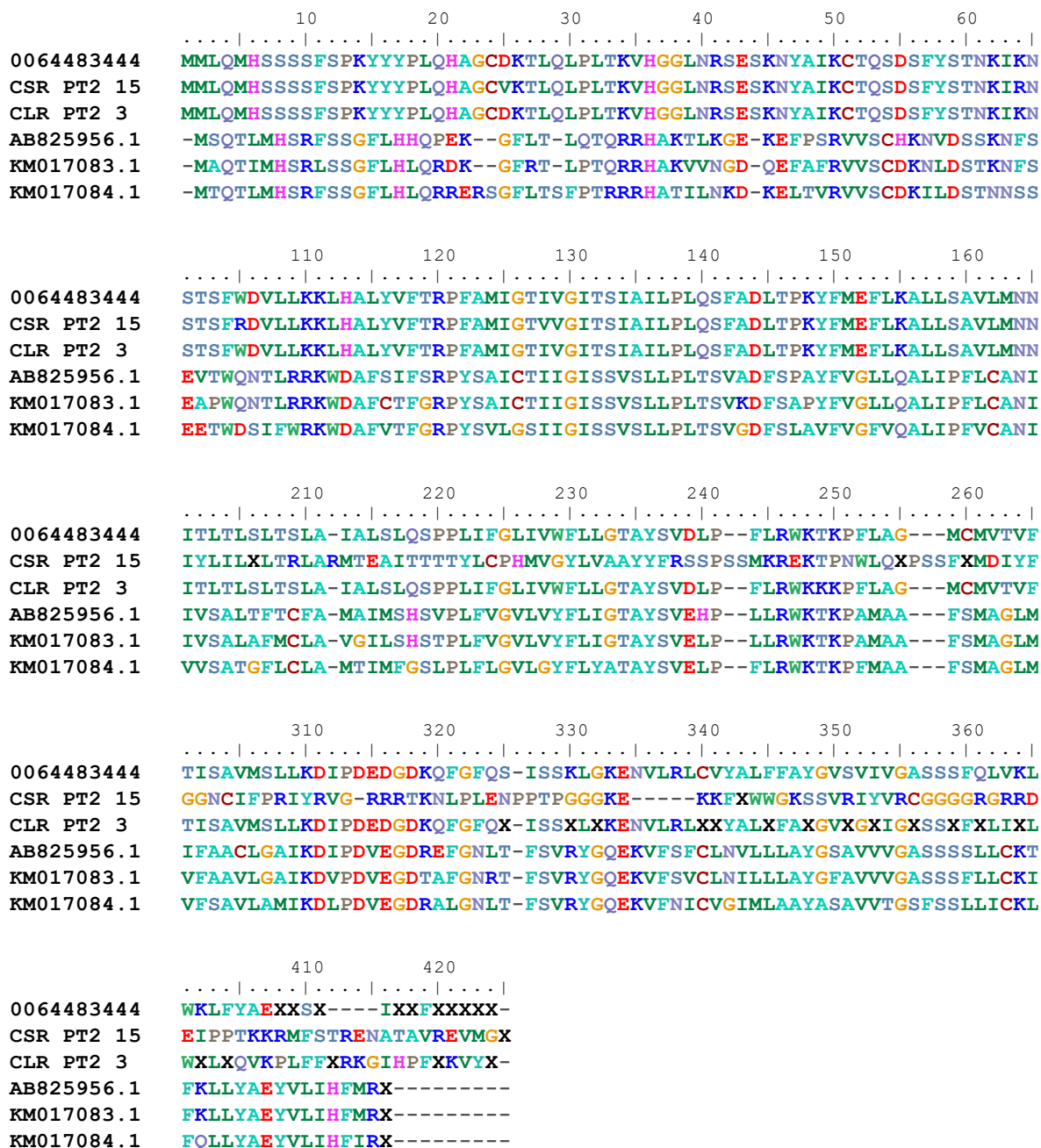


Figura 2. 20. Alinhamento da sequências peptídicas: PT2 de CSR e CLR, PT2 de citros (XP_006483444 LOC102618825 mRNA) e de KM017083, KM017084 e AB825956.

Observa-se uma identidade de 75,33% entre o gene PT2 XP_006483444 encontrado no genoma de *C. sinensis* na análise *in silico* e a sequência consenso isolada de CSR PT2 – 15 com alta similaridade até a região de 630pb. Para CLR PT2 – 3, há uma identidade de 93,36% com XP_006483444, com alta similaridade até a região de 1140pb (Figura 2.20). A partir da obtenção dos dados de sequenciamento e alinhamento das sequências referentes aos genes

isolados e purificados foi possível seguir com as análises de expressão heteróloga. Além das sequências PT1 e PT2 de CS e CL, também foram isolados, purificados e sequenciadas em ambas espécies de citros mais 4 sequências não testadas para PT: NT1, NT2, NT3 e NT4. Estas encontram-se armazenadas no banco de sequências do Laboratoire Agronomie et Enviro (LAE), para estudos futuros.

Através dos experimentos realizados foi possível obter várias sequências de PT isoladas de CSR e CLR. Foi possível ainda clonar estas utilizando o vetor PCR8, em *E. coli* e posteriormente em *A. tumefaciens*.

2.4.6 Expressão heteróloga dos genes candidatos de preniltransferases de *C. sinensis* e *C. limonia* por agroinfiltração em *N. benthamiana*

As análises de microscopia eletrônica por UV; comprovam que o processo de agroinfiltração de *A. tumefaciens* contendo as sequências de PT1 e PT2 de CS e CL foi eficiente. Na Figura 2.21 observa-se em 354 nm os pontos em verde fluorescente referente à proteína verde fluorescente - GFP e a clorofila e demais pigmentos de plantas em vermelho. Para 395 nm; observa-se à GFP como pontos verdes fluorescentes mais intensos e a clorofila e outros pigmentos em um tom verde escuro.

A proteína GFP, foi isolada pela primeira vez do cnidário *Aequorea victoria*. Ela fluoresce devido à sua estrutura terciária, chamada de *beta-can*; é composta por 238 aminoácidos e tem uma massa molecular de aproximadamente 27 kDa. Por estas características mencionadas, sua fácil manipulação genética devido a possibilidade de clonagem e diversos vetores e plasmídeos; a GFP tem sido amplamente utilizada em pesquisas biológicas como uma ferramenta para marcar e rastrear proteínas e células em organismos vivos. Isso é possível porque a proteína pode ser geneticamente modificada para produzir a fluorescência permitindo a visualização em processos biológicos em tempo real²³¹.

Portanto, a partir dos dados de microscopia em UV observa-se que foi possível realizar expressão transiente dos da GFP e dos genes candidatos à PT por agroinfiltração em *N. benthamiana*.

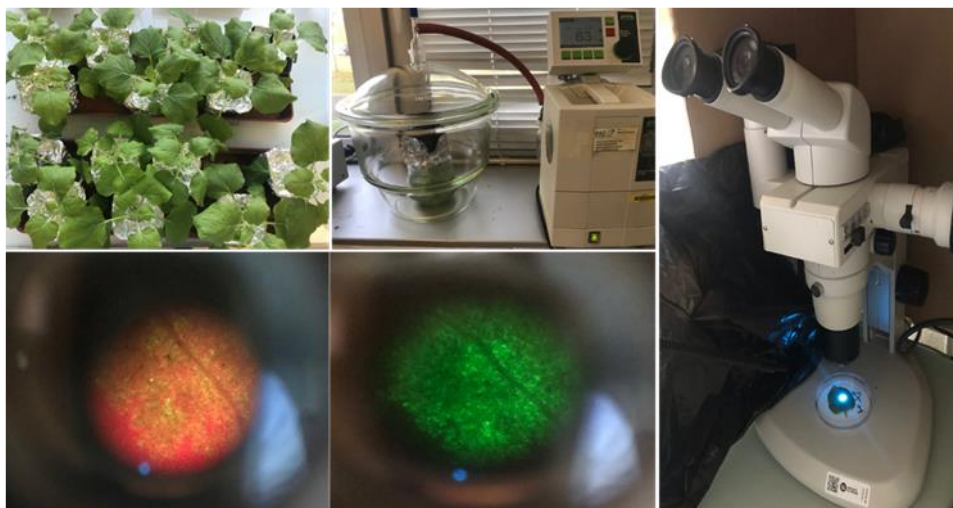


Figura 2.21. Resultados do procedimento de agroinfiltração em *N. benthamiana*.

Os dados de LC/MS mostram os resultados dos produtos da reação na fração microssomal para PT1 e PT2 em CSR e CLR . Utilizando DMAPP para todos os substratos testados: umbeliferona $[M + H]^+$ 163,00 (Figura 2.22), herniarina (Figura 2.23) $[M + H]^+$ 177,08, 3-metil-umbeliferona $[M + H]^+$ 177,08 (Figura 2.24), escopoletina $[M + H]^+$ 193,00 (Figura 2.25), esquimina $[M + H]^+$ 325,08 (Figura 2.26); em nenhuma das proteínas ensaiadas, extraídas das duas espécies de citros; houve atividade confirmada. Analisando os cromatogramas observa-se somente sinais para os íons referentes aos substratos testados; não há nenhum outro sinal que corresponda aos íons dos produtos da reação de prenilação esperados.

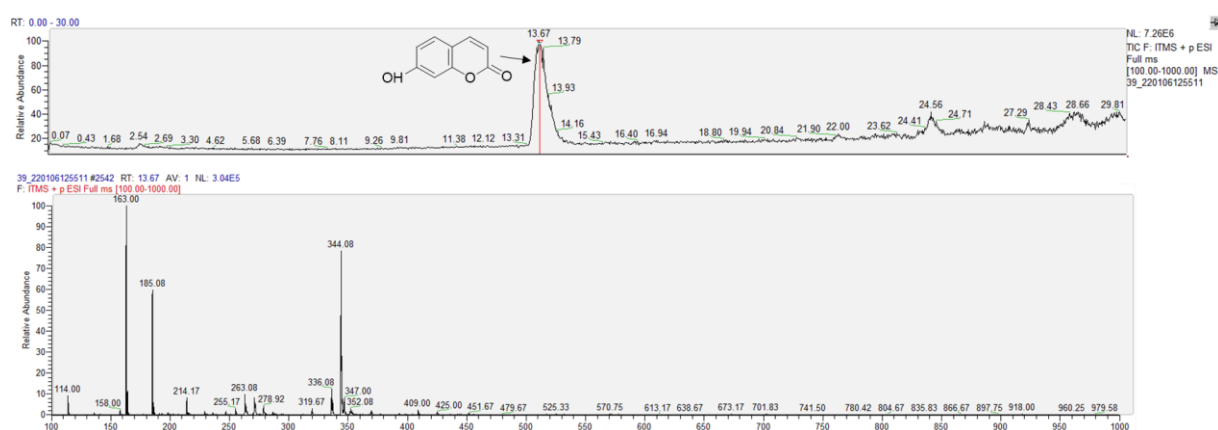


Figura 2.22. Espectro de massas para o produto da reação na fração microssomal utilizando umbeliferona + DMAPP.

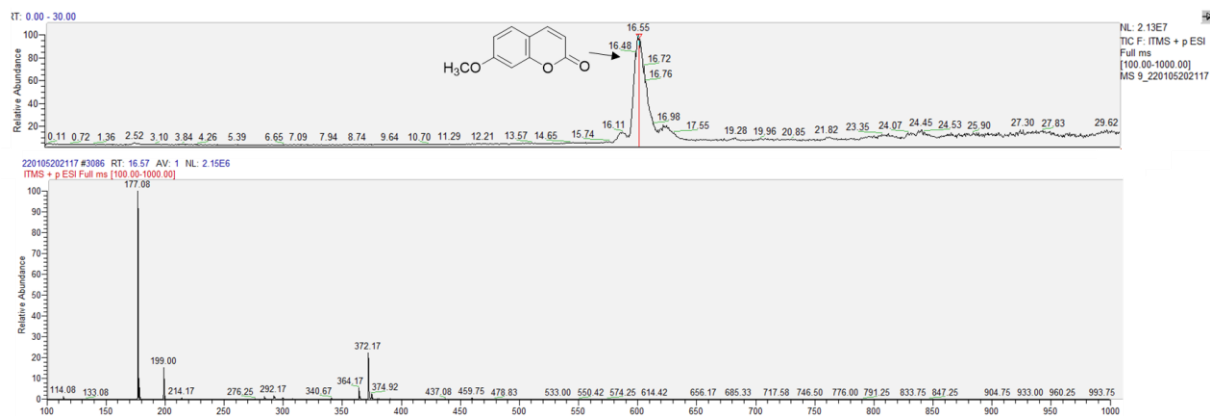


Figura 2. 23. Espectro de massas para o produto da reação na fração microssomal utilizando herniarina + DMAPP.

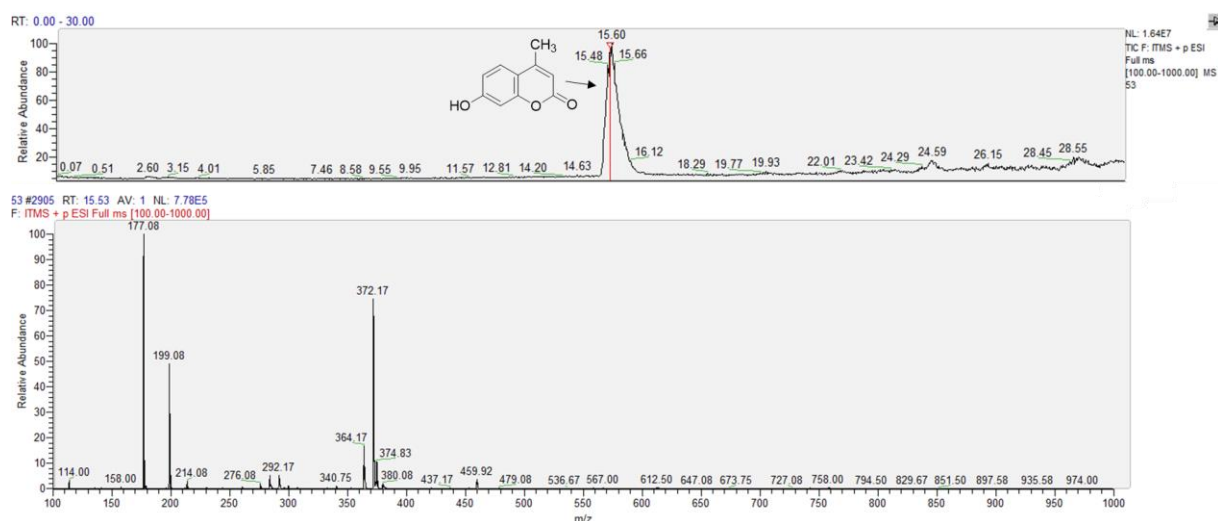


Figura 2. 24. Espectro de massas para o produto da reação na fração microssomal utilizando 4-metil-umbeliferona + DMAPP.

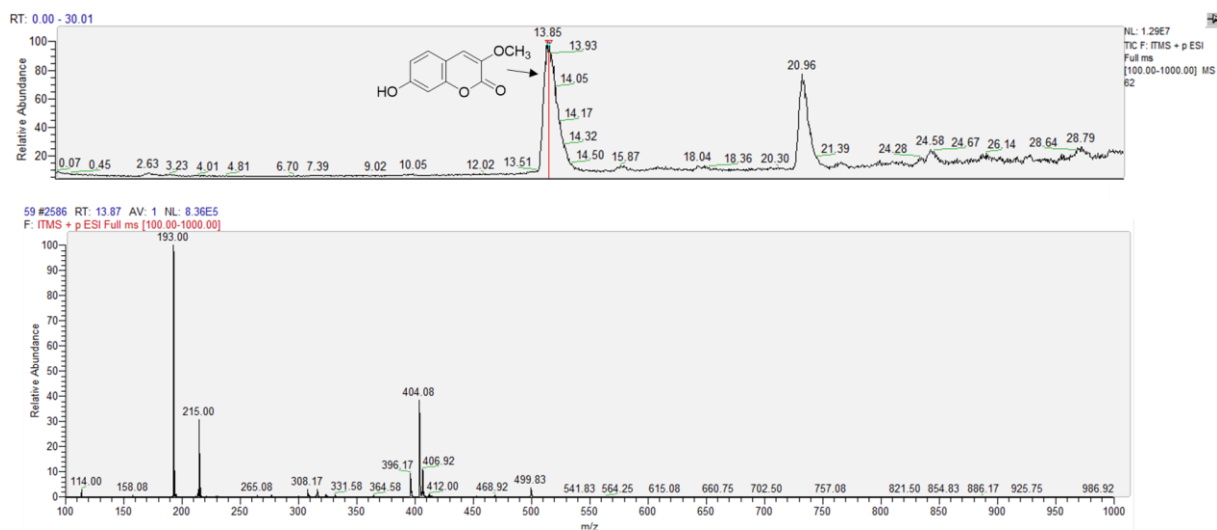


Figura 2. 25. Espectro de massas para o produto da reação na fração microssomal utilizando escopoletina + DMAPP.

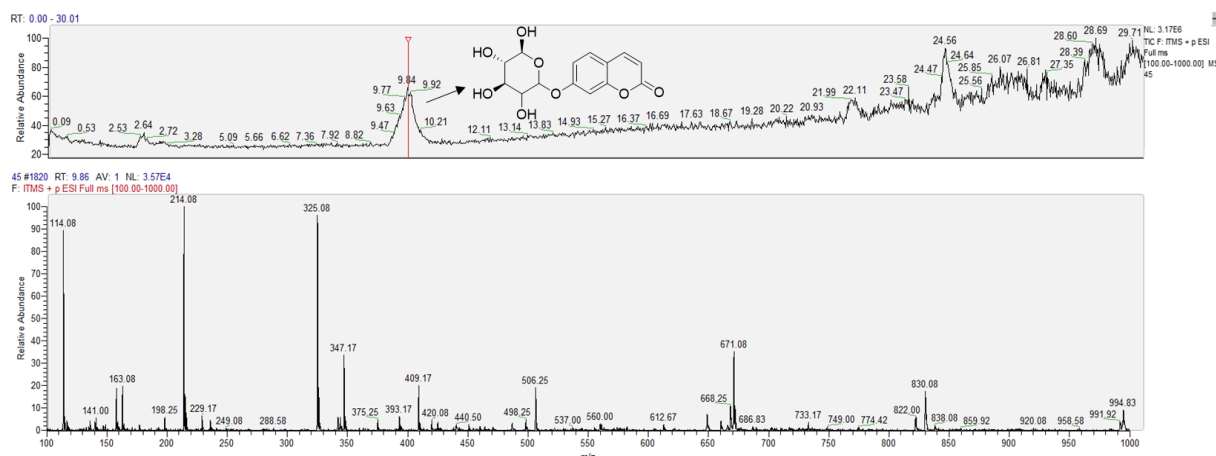


Figura 2. 26. Espectro de massas para o produto da reação na fração microsomal utilizando esquimina + DMAPP.

Há algumas justificativas que suportam a ausência de atividade para as prenilttransferases PT1 e PT2 de CSR e CLR. Uma delas é a necessidade de otimização da concentração dos substratos testados, de microsomas, catalisador e do tempo e condições de incubação para que a reação ocorra. Um controle positivo, eliminaria as dúvidas com relação à execução do ensaio; porém não houve a possibilidade de obtenção do mesmo.

Pode ser também que as sequências PT1 e PT2 isoladas de CSR e CLR não estejam envolvidas na biossíntese de piranocumarinas, e as enzimas codificadas por estas não estejam envolvidas na reação de prenilação da umbeliferona. A presença de um controle positivo, também auxiliaria nesta investigação.

Uma outra justificativa é com relação aos substratos testados. A maioria dos relatos de biogênese de piranocumarinas é que estas substâncias tem como intermediários a demetilsuberossina e o ostenol; porém há especulações de que a biossíntese da piranocumarinas possa ocorrer através da umbeliferona geranilada por intermédio de uma geranilttransferase (Figura 2.27). Para suportar esta sugestão; foi proposto o mecanismo para a biossíntese de piranocumarinas via intermediário geranilado. Para a obtenção do produto final desejado; há um envolvimento de duas enzimas P-450 para promover a ciclização do anel pirano e posteriormente a eliminação de uma unidade C_5H_8O (Anexo V), levando às piranocumarinas xantiletina e seselina. Diante dos resultados obtidos, há a necessidade de uma maior investigação quanto às enzimas envolvidas na biossíntese de piranocumarinas. Os estudos para obtenção dos resultados

esperados estão bem avançados. As próximas etapas serão: a investigação quanto ao processo de ciclização que leva a formação do anel pirano e elucidação sobre os mecanismos de reação envolvidos na atividade de uma ou duas enzimas P-450.

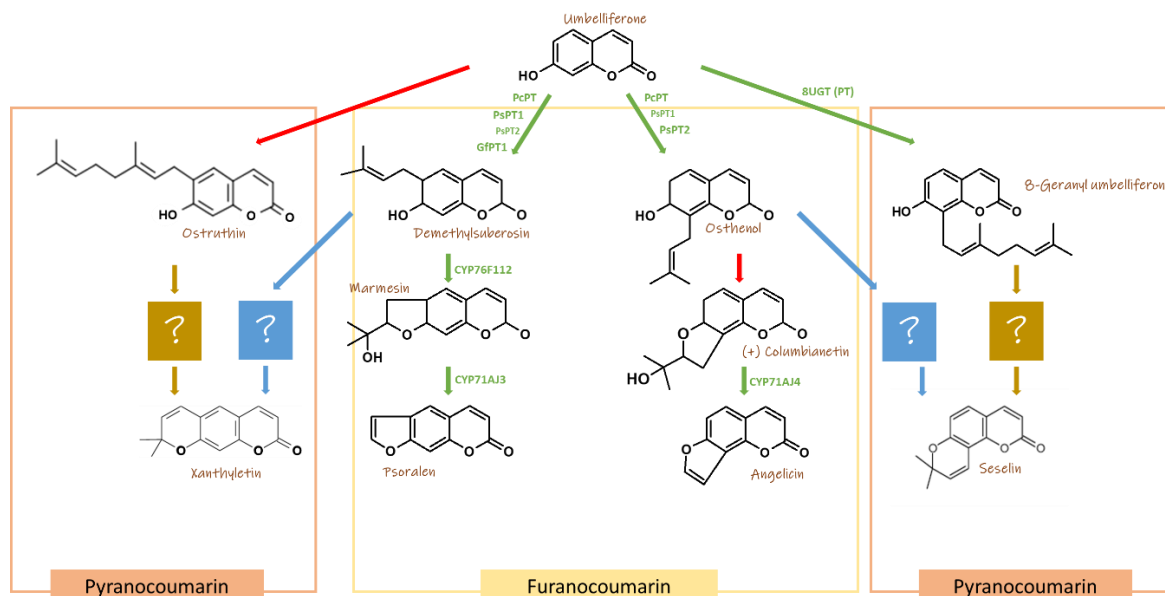


Figura 2.27. Via biossintética parcial de furano- e piranocumarinas. Nota: Em verde, as etapas que foram caracterizadas pelo grupo do pesquisador Hehn A. Em vermelho, as etapas para as quais ainda não há enzimas associadas. Em amarelo, as etapas para as quais as moléculas ainda não foram identificadas. Em azul, as etapas consideradas até o momento.

2.5 Conclusões

Através das análises de quantificação da expressão dos genes envolvidos na biossíntese de piranocumarinas por qPCR; foi possível observar que há diferenças significativas na expressão dos mesmos entre plantas de *C. sinensis* x *C.limonia* sadias e infectadas sintomáticas com CLas.

Utilizando abordagens de bioinformática e de isolamento e purificação de produtos de PCR dos genes referentes à preniltransferases encontradas no genoma de *C. sinensis*, foi possível obter possíveis sequências que sejam responsáveis pela produção dos intermediários da biossíntese de piranocumarinas: demetilsuberósina e ostenol.

Este estudo de identificação de enzimas e genes envolvidos na biossíntese de cumarinas hemiterpenoides em citros fornecerão informações importantes para a engenharia genética a fim de aumentar os níveis desses compostos e, assim, melhorar resistência contra fitopatógenos além de gerar condições para produzir novos bactericidas para proteção de citros. Portanto ainda é necessário confirmar a atividade dos genes envolvidos na prenilação da umbeliferona, para validar com precisão as suas respectivas atividades em citros e com isso tentar induzir a produção de piranocumarinas através de manipulação genética.

Referências Bibliográficas

1. TALON, M., WU, G. A., GMITTER, F. G. & ROKHSAR, D. S. The origin of citrus. *The Genus Citrus* (Elsevier Inc., 2020). doi:10.1016/B978-0-12-812163-4.00002-4.
2. MORTON, C. M. & TELMER, C. New subfamily classification for the rutaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **99**, 620–641 (2014).
3. APPELHANS, M. S., BAYLY, M. J., HESLEWOOD, M. M., GROPPPO, M., VERBOOM, G. A., FORSTER, P. I., DURETTO, M. F. A new subfamily classification of the Citrus family (Rutaceae) based on six nuclear and plastid markers. *Taxon* **70**, 1035–1061 (2021).
4. MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. . *Citros*. (2004).
5. SHIVAKUMAR, V. S., APPELHANS, M. S., JOHNSON, G., CARLSEN, M. & ZIMMER, E. A. Analysis of whole chloroplast genomes from the genera of the Clauseneae, the curry tribe (Rutaceae, Citrus family). *Mol. Phylogenet. Evol.* **117**, 135–140 (2017).
6. WU, G. A. *et al.* Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* **554**, 311–316 (2018).
7. SHIMIZU, T., KITAJIMA, A., NONAKA, K., YOSHIOKA, T., OHTA, S., GOTO, S. & NAKAMURA, Y. Hybrid origins of citrus varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes. *PLoS One* **11**, 1–58 (2016).
8. CRUZ, R. P. DA, FEDERIZZI, L. C. & MILACH, S. C. K. A apomixia no melhoramento de plantas. *Ciência Rural* vol. 28 155–161 (1998).
9. MIAO, L., CHEN, C., YAO, L., TRAN, J. & ZHANG, H. Genome-wide identification, characterization, interaction network and expression profile of GAPDH gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *PeerJ* **2019**, 1–20 (2019).
10. SANTOS, A. S., DE ANDRADE, E. M., DE OLIVEIRA SOUSA, A. R., DO CARMO COSTA, M. M., TOGAWA, R., GRYNBERG, P., PIROVANI C., OLIVEIRA S. S, FILHO W. S. S, FILHO M. A. C., GESTEIRA A. S. & FERREIRA C. F. Transcriptome profile of drought responsive candidate genes in varieties of citrus rootstocks with different tolerance strategies. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **277**, (2021).
11. WANG, J., JIANG, L. & WU, R. Plant grafting: how genetic exchange promotes vascular reconnection. *New Phytol.* **214**, 56–65 (2017).
12. GOLDSCHMIDT, E. E. Plant grafting: New mechanisms, evolutionary implications. *Front. Plant Sci.* **5**, (2014).
13. RIBEIRO, G. D., COSTA, J. N. M., VIEIRA, A. H. & SANTOS, M. R. A. Enxertia em fruteiras. *Embrapa* **364**, 8 (2005).
14. LIU, Y. Historical and Modern Genetics of Plant Graft Hybridization. *Adv. Genet.* **56**, 101–129 (2006).
15. JAIN, M. S.; ISHII, K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits. in *Micropropagation of Woody Trees and Fruits* 815 (2012).
16. CASTLE, W. S. A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* **45**, 11–15 (2010).
17. SCHÄFER, G., BASTIANEL, M. & DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos cítricos baseada em marcadores moleculares RAPD. *Ciência Rural* **34**, 1437–1442 (2004).
18. ZHU, S. P., HUANG, T. J., Xin, Y. U., HONG, Q. B., XIANG, J. S., ZENG, A. Z.,

- GONG, G., ZHAO, X. C.. The effects of rootstocks on performances of three late-ripening navel orange varieties. *J. Integr. Agric.* **19**, 1802–1812 (2020).
19. BENJAMIN, G., TIETEL, Z. & PORAT, R. Effects of rootstock/scion combinations on the flavor of citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 11286–11294 (2013).
 20. HEMMATI N, GHASEMNEZHAD A, MOGHADDAM J F, E. P. Variation in the content of bioflavonoids of orange as affected by scion, rootstock, and fruit part. *Acta Physiol. Plant.* **40**, 1–8 (2018).
 21. ALBRECHT, U., FIEHN, O. & BOWMAN, K. D. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiol. Biochem.* **107**, 33–44 (2016).
 22. SOARES FILHO, W. D. S., DIAMANTINO, M. S. A. S., MOITINHO, E. D. B., CUNHA SOBRINHO, A. P. DA & PASSOS, O. S. 'Tropical': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. *Rev. Bras. Frutic.* **24**, 127–132 (2002).
 23. POMPEU, J. & BLUMER, S. Citrumelos como porta - enxertos para a laranjeira 'Valência' Citrumelos as rootstocks for 'Valência' sweet orange trees. *Notas Científicas* 105–107 (2011).
 24. GONÇALVES, L. P., BOSCARIOL CAMARGO, R. L., TAKITA, M. A., MACHADO, M. A., DOS SOARES FILHO, W. S., & COSTA, M. G.. Rootstock-induced molecular responses associated with drought tolerance in sweet orange as revealed by RNA-Seq. *BMC Genomics* **20**, 1–14 (2019).
 25. DE CARVALHO, S. A., GIRARDI, E. A., FILHO, F. DE A. A. M., FERRAREZI, R. S. & FILHO, H. D. C. Advances in citrus propagation in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* vol. 41 (2019).
 26. GILMAR SCHÄFER, MARINÊS BASTIANEL, A. L. C. D. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **31**, 723–733 (2001).
 27. FUNDECITRUS. Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja 2021/22 do cinturão citrícola de são paulo e triângulo/sudoeste mineiro. vol. 4 1–23 (2021).
 28. PETRY, H. B., KOLLER, O. C., BENDER, R. J. & SCHWARZ, S. F. Qualidade de laranjas 'Valência' produzidas sob sistemas de cultivo orgânico e convencional. *Rev. Bras. Frutic.* **34**, 167–174 (2012).
 29. SHARMA, S., PRAKASH, A. & TELE, A. *In vitro* propagation of citrus rootstocks. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **37**, 84–88 (2009).
 30. MARTÍNEZ-CUENCA, M.-R., PRIMO-CAPELLA, A. & FORNER-GINER, M. A. Influence of Rootstock on Citrus Tree Growth: Effects on Photosynthesis and Carbohydrate Distribution, Plant Size, Yield, Fruit Quality, and Dwarfing Genotypes. *Plant Growth* (2016) doi:10.5772/64825.
 31. WIDYANINGSIH, S., UTAMI, S. N. H., JOKO, T. & SUBANDIYAH, S. Development of Disease and Growth on Six Scion/Rootstock Combinations of Citrus Seedlings under Huanglongbing Pressure. *J. Agric. Sci.* **9**, 229 (2017).
 32. MACÍAS, F. A., GALINDO, J. L. G. & GALINDO, J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2917–2936 (2007).
 33. REYNOLDS, T. The evolution of chemosystematics. **68**, 2887–2895 (2007).
 34. MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2786–2798 (2007).
 35. SEDIO, B. E. Recent breakthroughs in metabolomics promise to reveal the cryptic chemical traits that mediate plant community composition, character evolution and lineage diversification. *New Phytol.* **214**, 952–958 (2017).
 36. PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* **68**, 2960–2972 (2007).

37. SCHMID, R., PETRAS, D., NOTHIAS, L. F., WANG, M., ARON, A. T., JAGELS, A., et al., Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment. *Nat. Commun.* **12**, (2021).
38. CAESAR, L. K., MONTASER, R., KELLER, N. P. & KELLEHER, N. L. Metabolomics and genomics in natural products research: Complementary tools for targeting new chemical entities. *Nat. Prod. Rep.* **38**, 2041–2065 (2021).
39. UCKELE, K. A., JAHNER, J. P., TEPE, E. J., RICHARDS, L. A., DYER, L. A., OCHSENIDER, K. M., PHILBIN C. S., KATO, M. J., YAMAGUCHI L. F., FORISTER, M. L., SMILANICH A. M., DODSON C. D., JEFFREY C. S. & PARCHMAN T. L.. Phytochemistry reflects different evolutionary history in traditional classes versus specialized structural motifs. *Sci. Rep.* **11**, 1–14 (2021).
40. DA SILVA, M. F. G. F., Gottlieb, O. R. & EHRENDORFER, F. Chemosystematics of the Rutaceae : suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. **161**, 97–134 (1988).
41. RIBEIRO, A. B. ARCIA, C. L. F. E. G., ELINI, A. D. B., DA SILVA, M. F. G. F. & CARVALHO, A. D. E. C. Chemical Characterization of Citrus sinensis Grafted on C. limonia and the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of *Xylella fastidiosa*. 7815–7822 (2008).
42. SOARES, M. S., DA SILVA, D. F., FORIM, M. R., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., SILVA, D. B., SILVA D. B., LOPES N. P., DE CARVALHO S. A., DE SOUZA, A. A. & MACHADO, M. A. Quantification and localization of hesperidin and rutin in Citrus sinensis grafted on C. limonia after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. *Phytochemistry* **115**, 161–70 (2015).
43. TRIPOLI, E., GUARDIA, M. LA, GIAMMANCO, S., MAJO, D. DI & GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **104**, 466–479 (2007).
44. LI, S., LO, C. Y. & HO, C. T. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4176–4185 (2006).
45. KAWAII, S., TOMONO, Y., KATASE, E., OGAWA, K., YANO, M., KOIZUMI, M., ITO, C. & FURUKAWA, H. Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3865–3871 (2000).
46. PURI, M., VERMA, M. L. & MAHALE, K. Processing of citrus peel for the extraction of flavonoids for biotechnological applications. *Handb. Flavonoids Diet. Sources, Prop. Heal. Benefits* 443–459 (2012).
47. LEDESMA-ESCOBAR, C. A., PRIEGO-CAPOTE, F. & LUQUE DE CASTRO, M. D. Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *J. Mass Spectrom.* **50**, 1196–1205 (2015).
48. DUGRAND-JUDEK, A., OLRYS, A., HEHN, A., COSTANTINO, G., OLLITRAULT, P., FROELICHER, Y., & BOURGAUD, F. The distribution of coumarins and furanocoumarins in Citrus species closely matches Citrus phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. *PLoS One* **10**, 1–25 (2015).
49. STANLEY, W. L. & JURD, L. Citrus Coumarins. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 1106–1110 (1971).
50. AKTAR, K. & FOYZUN, T. Phytochemistry and Pharmacological Studies of Citrus macroptera: A Medicinal Plant Review. *Evidence-based Complement.*

- Altern. Med.* **2017**, (2017).
51. BRAHMI, F., MOKHTARI, O., LEGSSYER, B., HAMDANI, I., ASEHRAOU, A., HASNAOUI, I., ROKNI, H., DIASS, K., OUALDI, I. & TAHANI, A. Chemical and biological characterization of essential oils extracted from citrus fruits peels. *Mater. Today Proc.* **45**, 7794–7799 (2021).
 52. CHANG, C.-H. Flavonoids, Coumarins and Acridone Alkaloids from the root bark of *Citrus limonia*. **29**, 351–353 (1990).
 53. SOARES, M. S., DA SILVA, D. F., AMARAL, J. C., DA SILVA, M. M., FORIM, M. R., RODRIGUES-FILHO, E. DA SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., MACHADO, M. A., SOUZA, A. A. & MARTINS, C. H. G. Rapid differentiation of graft *Citrus sinensis* with and without *Xylella fastidiosa* infection by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **34**, (2020).
 54. TOFFANO, L., FISCHER, I. H., BLUMER, S. & PASCHOLATI, S. F. Potencial do flavedo (epicarpo) de *Citrus aurantifolia* cv. Tahiti no controle do bolor verde e da antracnose em citros. *Summa Phytopathol.* **38**, 61–66 (2012).
 55. NAIR S, A., SR, R. K., NAIR, A. S. & BABY, S. Citrus peels prevent cancer. *Phytomedicine* **50**, 231–237 (2018).
 56. BERK, Z. Introduction: history, production, trade, and utilization. *Citrus Fruit Process.* 1–8 (2016) doi:10.1016/b978-0-12-803133-9.00001-1.
 57. NEVES, M. F., TROMBIN, V. G., MILAN, P., LOPES, F. F., CRESSONI, F., & KALAKI, R. *O retrato da citricultura brasileira.* (2010).
 58. POMPEU JUNIOR, J., RODRIGUEZ, O., VIEGAS, F., POMPEU JUNIOR, J., & AMARO, A. A. *Citricultura Brasileira, 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991.* (1991).
 59. FUNDECITRUS. Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. *Fundecitrus* 105 (2020).
 60. Sun, L., Ke, F., Nie, Z., Wang, P., & Xu, J. Citrus genetic engineering for disease resistance: past, present and future. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 61. AMARAL, J. C. Estudos da biossíntese das piranocumarinas xantiletina e seselina em laranja pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) E LIMÃO CRAVO (*Citrus limonia* Osbeck). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2017. Dissertação de Mestrado, 125 p.
 62. SHOKROLLAH, H., LEE ABDULLAH, T., SIJAM, K. & AKMAR ABDULLAH, S. N. Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. *Crop Prot.* **30**, 521–525 (2011).
 63. AMMAR, E. D., SHATTERS, R. G. & HALL, D. G. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Associated with Citrus Huanglongbing Disease, in its Psyllid Vector using Fluorescence *in situ* Hybridization. *J. Phytopathol.* **159**, 726–734 (2011).
 64. ALQUÉZAR, B., CARMONA, L., BENNICI, S. & PEÑA, L. Engineering of citrus to obtain huanglongbing resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **70**, 196–203 (2021).
 65. BOVÉ, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* **88**, 7–37 (2006).
 66. Bassanezi, R. B. *et al.* Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* **45**, 251–264 (2020).
 67. FUNDECITRUS. *Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e Cancro cítrico.* FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura (2017).
 68. *Liberibacter*, C. Garça/SP. (2008).
 69. JOHNSON, E. G., WU, J., BRIGHT, D. B. & GRAHAM, J. H. Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem plugging with

- root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol.* **63**, 290–298 (2014).
70. BRASWELL, W. E., PARK, J. W., STANSLY, P. A., KOSTYK, B. C., LOUZADA, E. S., DA GRAÇA, J. V., & KUNTA, M. Root samples provide early and improved detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Citrus. *Sci. Rep.* **10**, 1–11 (2020).
 71. ETXE BERRIA, E., GONZALEZ, P., ACHOR, D. & ALBRIGO, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**, 76–83 (2009).
 72. ZHENG, Y., KUMAR, N., GONZALEZ, P. & ETXE BERRIA, E. Strigolactones restore vegetative and reproductive developments in Huanglongbing (HLB) affected, greenhouse-grown citrus trees by modulating carbohydrate distribution. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **237**, 89–95 (2018).
 73. XIE, Z., ZHAO, K., LONG, J., ZHEN, L., ZOU, X., & CHEN, S. Comparative analysis of Wanjincheng orange leaf and root responses to ‘*Candidatus liberibacter asiaticus*’ infection using leaf-disc grafting. *Hortic. Plant J.* **7**, 401–410 (2021).
 74. BELASQUE JUNIOR, J., BERGAMIN FILHO, A., BASSANEZI, R. B., BARBOSA, J. C., FERNANDES, N. G., YAMAMOTO, P. T., LOPES, S. A., MACHADO, M. A.; JUNIOR, R. P. L.; AYRESI, A. J. & MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de huanglongbing (HLB, greening) visando o controle efetivo da doença. *Trop. Plant Pathol.* **34**, 137–145 (2009).
 75. BOVÉ, J. M. Huanglongbing and the future of citrus in são paulo state, Brazil. **94**, 465–467 (2011).
 76. CAIRA, S., & FERRANTI, P. Innovation for Sustainable Agriculture and Food Production. *Reference Module in Food Science* (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21018-4.
 77. CHOUDHARY, P., AGGARWAL, P. R., RANA, S., NAGARATHNAM, R. & MUTHAMILARASAN, M. Molecular and metabolomic interventions for identifying potential bioactive molecules to mitigate diseases and their impacts on crop plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **114**, 101624 (2021).
 78. SAITO, K. & MATSUDA, F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 463–489 (2010).
 79. SUMNER, L. W., LEI, Z., NIKOLAU, B. J. & SAITO, K. Modern plant metabolomics: Advanced natural product gene discoveries, improved technologies and future prospects. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 212–229 (2015).
 80. RAZZAQ, A., SADIA, B., RAZA, A., HAMEED, M. K. & SALEEM, F. Metabolomics: A way forward for crop improvement. *Metabolites* **9**, (2019).
 81. BECKLES, D. M. & ROESSNER, U. Plant metabolomics: Applications and opportunities for agricultural biotechnology. *Plant Biotechnol. Agric.* 67–81 (2012).
 82. GOBETTI, M. F. DA S. Estudo da resposta de tecidos de *Citrus sinensis* em fases ontogenéticas distintas à infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2021. Tese de Doutorado, 147 p.
 83. BELLETE, S. B. Estudo da variação do perfil químico de citros com HLB e sadios, buscando informações sobre mecanismo de defesa. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de Doutorado, 188 p.
 84. PONTES, J. G. M., VENDRAMIN, P. H., FERNANDES, L. S., DE SOUZA, F. H., PILAU, E. J., EBERLIN, M. N., MAGNANI, R. F., WULFF, N. A. & FILL, T. P.

- Mass spectrometry imaging as a potential technique for diagnostic of Huanglongbing disease using fast and simple sample preparation. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
85. HIJAZ, F. M., MANTHEY, J. A., FOLIMONOVA, S. Y., DAVIS, C. L., JONES, S. E., & REYES-DE-CORCUERA, J. I. An HPLC-MS characterization of the changes in sweet orange leaf metabolite profile following infection by the bacterial pathogen *Candidatus liberibacter asiaticus*. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
 86. 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*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **30**, 666–678 (2017).
 87. SLISZ, A. M., BREKSA, A. P., MISHCHUK, D. O., MCCOLLUM, G. & SLUPSKY, C. M. Metabolomic analysis of citrus infection by '*Candidatus Liberibacter*' reveals insight into pathogenicity. *J. Proteome Res.* **11**, 4223–4230 (2012).
 88. FRANCO, J. Y., THAPA, S. P., PANG, Z., GURUNG, F. B., LIEBRAND, T. W., STEVENS, D. M., ANCONA, V., WANG, N. & COAKER, G. Citrus Vascular Proteomics Highlights the Role of Peroxidases and Serine Proteases during Huanglongbing Disease Progression. *Mol. Cell. Proteomics* **19**, 1936–1951 (2020).
 89. QIU, W., SOARES, J., PANG, Z., HUANG, Y. & SUN, Z. Potential Mechanisms of AtNPR1 mediated resistance against Huanglongbing (HLB) in *Citrus*. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1–17 (2020).
 90. Wu, Q., Moniruzzaman, M., Yan, H., Lv, Y., Jiang, B., Jiang, N., & Zhong, Y. The CsNPR1 gene expression modulation in citrus and understanding the defense mechanism against Huanglongbing by screening CsNPR1-interacting proteins. *Sci. Hortic.* **288**, 110375 (2021).
 91. PAN, R., CHEN, Y., DENG, X. & XU, M. Digital Gene Expression Analysis of Huanglongbing Affected Mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) In Response to Thermotherapy. *Hortic. Plant J.* **7**, 1–12 (2021).
 92. XUE, A., LIU, Y., LI, H., CUI, M., HUANG, X., WANG, W., WU, D., GUO, X., HAO, Y. & LUO, L. Early detection of Huanglongbing with EESI-MS indicates a role of phenylpropanoid pathway in *citrus*. *Anal. Biochem.* **639**, 3–10 (2022).
 93. IRIGOYEN, S., RAMASAMY, M., PANT, S., NIRAULA, P., BEDRE, R., GURUNG, M., ROSSI, D., LAUGHLIN, C., GORMAN, Z., ACHOR, D., LEVY, A., KOLOMIETS, M. V., SÉTAMOU, M., BADILLO-VARGAS, I. E., AVILA, C. A., IREY, M. S. & MANDADI, K. K. Plant hairy roots enable high throughput identification of antimicrobials against *Candidatus Liberibacter* spp. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
 94. IRANSHAHI M., ASKARI M., SAHEBKAR A., H.-L. D. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **17**, 99–103 (2009).
 95. ROBE, K., IZQUIERDO, E., VIGNOLS, F., ROUACHED, H. & DUBOS, C. The Coumarins: Secondary Metabolites Playing a Primary Role in Plant Nutrition and Health. *Trends Plant Sci.* **26**, 248–259 (2021).
 96. STRINGLIS, I. A., DE JONGE, R. & PIETERSE, C. M. J. The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell Physiol.* **60**, 1405–1419 (2019).
 97. RIBEIRO, C. V. C. & KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. *Quim. Nova* **25**, 533–538 (2002).

98. VIALART, G., HEHN, A., OLRV, A., ITO, K., KRIEGER, C., LARBAT, R., PARIS, C., SHIMIZU, U., SUGIMOTO, Y., MIZUTANI, M. & BOURGAUD, F. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. Exhibits p-coumaroyl CoA 2-hydroxylase activity (C2H): A missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant J.* **70**, 460–470 (2012).
99. BOURGAUD, F., HEHN, A., LARBAT, R., DOERPER, S., GONTIER, E., KELLNER, S., & MATERN, U. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem. Rev.* **5**, 293–308 (2006).
100. MATERN, U. & DARIA, H. Biosynthesis Psoralen 5-monooxygenase of psoralens *Ammi majus* cells activity from elicitor-treated suspension cultures of *Ammi majus* produce from. *FEBS Lett.* **239**, 263–265 (1988).
101. DENG, Y. & LU, S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **36**, 257–290 (2017).
102. Dewick, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. *John Wiley & Sons, 2002.*
103. LOGEMANN, E., PARNISKE, M. & HAHLBROCK, K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5905–5909 (1995).
104. Sui, Z., Luo, J., Yao, R., Huang, C., Zhao, Y., & Kong, L. Functional characterization and correlation analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in coumarin biosynthesis from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Phytochemistry* **158**, 35–45 (2019).
105. GRAVOT, A., LARBAT, R., HEHN, A., LIEVRE, K., GONTIER, E., GOERGEN, J. L., & BOURGAUD, F. Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: Cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant - *Ruta graveolens* - Exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* **422**, 71–80 (2004).
106. YAO, R., ZHAO, Y., LIU, T., HUANG, C., XU, S., SUI, Z., LUO, J., & KONG, L. Identification and functional characterization of a p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase involved in the biosynthesis of coumarin skeleton from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Plant Mol. Biol.* **95**, 199–213 (2017).
107. WANG, C. H., YU, J., CAI, Y. X., ZHU, P. P., LIU, C. Y., ZHAO, A. C., LU, R., LI, M., XU, F. & YU, M. D.. Characterization and functional analysis of 4-coumarate:CoA ligase genes in mul-berry. *PLoS One* **11**, 1–20 (2016).
108. LIU, T., YAO, R., ZHAO, Y., XU, S., HUANG, C., LUO, J., & KONG, L. Cloning, functional characterization and site-directed mutagenesis of 4-Coumarate: Coenzyme a ligase (4CL) involved in coumarin biosynthesis in *peucedanum praeruptorum* Dunn. *Front. Plant Sci.* **8**, 1–14 (2017).
109. BERENBAUM, M. R., NITAO, J. K., & ZANGERL, A. R. Adaptive significance of furanocoumarin diversity in *Pastinaca sativa* (Apiaceae). *Journal of chemical ecology*, **17**, 207-215 (1991).
110. ROSELLI, S., OLRV, A., VAUTRIN, S., CORITON, O., RITCHIE, D., GALATI, G., NAVROT, N., KRIEGER, C., VIALART, G., BÈRGES, H., BOURGAUD, F. & HEHN, A. A bacterial artificial chromosome (BAC) genomic approach reveals partial clustering of the furanocoumarin pathway genes in parsnip. *Plant J.* **89**, 1119–1132 (2017).
111. ORTUÑO, A, J. M. BOTÍA, M. D. FUSTER, I. PORRAS, A. GARCIA-LIDÓN, & J. A. D. R. Effect of Scoparone (6 , 7-Dimethoxycoumarin) Biosynthesis on the Resistance of Tangelo Nova , *Citrus paradisi* , and *Citrus aurantium* Fruits against *Phytophthora parasitica*. *Journal of agricultural and food chemistry*,

- 8561, 2740–2743 (1997).
112. STASSEN, M. J. J., HSU, S., PIETERSE, C. M. J. & STRINGLIS, I. A. Coumarin Communication Along the Microbiome – Root – Shoot Axis. *Plant Science* **169**–183 (2020).
 113. YANG, L., DING, W., XU, Y., WU, D., LI, S., CHEN, J., & GUO, B. New insights into the antibacterial activity of hydroxycoumarins against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules* **21**, 1–13 (2016).
 114. AFEK, U. Umbelliferone: a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. *Phytochemistry*, **50**(7), 1129-1132 (1999).
 115. MARÍA TORTOSA, MARÍA E CARTEA, V. M. R. AND P. V. Unraveling the metabolic response of *Brassica oleracea* exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (2546).
 116. SUN, H., WANG, L., ZHANG, B., MA, J., HETTENHAUSEN, C., CAO, G., SUN, G., WU, J. & WU, J. Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling. *J. Exp. Bot.* **65**, 4305–4315 (2014).
 117. REEN, F. J., GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A., PARAGES, M. L. & O'GARA, F. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2063–2073 (2018).
 118. VOGES, M. J. E. E. E., BAI, Y., SCHULZE-LEFERT, P. & SATTELY, E. S. Plant-derived coumarins shape the composition of an Arabidopsis synthetic root microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 12558–12565 (2019).
 119. PERKOWSKA, I., SIWINSKA, J., OLRZY, A., GROSJEAN, J., HEHN, A., BOURGAUD, F., LOJKOWSKA, E. & IHNATOWICZ, A. Identification and quantification of coumarins by UHPLC-MS in *Arabidopsis thaliana* natural populations. *Molecules* **26**, (2021).
 120. TSAI, H. H. & SCHMIDT, W. Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins. *Trends Plant Sci.* **22**, 538–548 (2017).
 121. ROSENKRANZ, T., OBURGER, E., BAUNE, M., WEBER, G. & PUSCHENREITER, M. Root exudation of coumarins from soil-grown *Arabidopsis thaliana* in response to iron deficiency. *Rhizosphere* **17**, 100296 (2021).
 122. XU, L., ZHAO, X.-Y., WU, Y.-L. & ZHANG, W. The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins. *Proc. 2015 Asia-Pacific Energy Equip. Eng. Res. Conf.* **9**, 135–138 (2015).
 123. GARG, S. S., GUPTA, J., SHARMA, S. & SAHU, D. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. *Eur. J. Pharm. Sci.* **152**, 105424 (2020).
 124. OJALA, T., REMES, S., HAANSUU, P., VUORELA, H., HILTUNEN, R., HAAHTELA, K., & VUORELA, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 299–305 (2000).
 125. SAHOO, C. R., SAHOO, J., MAHAPATRA, M., LENKA, D., SAHU, P. K., DEHURY, B., PADHY, R. N. & PAIDSETTY, S. K. Coumarin derivatives as promising antibacterial agents. *Arab. J. Chem.* **14**, (2021).
 126. MISHRA, S., PANDEY, A. & MANVATI, S. Coumarin: An emerging antiviral agent. *Heliyon* **6**, (2020).
 127. LI, Z., KONG, D., LIU, Y. & LI, M. Pharmacological perspectives and molecular mechanisms of coumarin derivatives against virus disease. *Genes Dis.* **9**, 80–94 (2022).

128. PRUSTY, J. S. & KUMAR, A. Coumarins: antifungal effectiveness and future therapeutic scope. *Mol. Divers.* **24**, 1367–1383 (2020).
129. GONCALVES, G. A., SPILLERE, A. R., DAS NEVES, G. M., KAGAMI, L. P., VON POSER, G. L., CANTO, R. F. S., & EIFLER-LIMA, V. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **203**, (2020).
130. LIU, Y. P., YAN, G., XIE, Y. T., LIN, T. C., ZHANG, W., LI, J., WU, Y., ZHOU, J. & FU, Y. H Bioactive prenylated coumarins as potential anti-inflammatory and anti-HIV agents from *Clausena lenis*. *Bioorg. Chem.* **97**, 103699 (2020).
131. TRINH, D. H., TRAN, P. T., TRINH, B. T., NGUYEN, H. T., NGUYEN, H. D., HA, L. D., & NGUYEN, L. H. D. Coumarins and acridone alkaloids with α -glucosidase inhibitory and antioxidant activity from the roots of *Paramignya trimera*. *Phytochem. Lett.* **35**, 94–98 (2020).
132. REVANKAR, H. M., BUKHARI, S. N. A., KUMAR, G. B. & QIN, H. L. Coumarins scaffolds as COX inhibitors. *Bioorg. Chem.* **71**, 146–159 (2017).
133. DE SOUZA, L. G., RENNÃ, M. N. & FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. *Chem. Biol. Interact.* **254**, 11–23 (2016).
134. PINEO, G. & HULL, R. D. Coumarin therapy in thrombosis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **17**, 201–216 (2003).
135. GARRO, H. A., RETA, G. F., DONADEL, O. J. & PUNGITORE, C. R. Cytotoxic and antitumor activity of some coumarin derivatives. *Nat. Prod. Commun.* **11**, 1289–1292 (2016).
136. AKKOL, E. K., GENÇ, Y., KARPUZ, B., SOBARZO-SÁNCHEZ, E. & CAPASSO, R. Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–25 (2020).
137. KHAN, H. J., KUNESCH, G., CHUILON, S. & RAVISE, A. Structure and biological activity of Xanthyletin a new phytoalexin of *Citrus* . **40**, 3–7 (1985).
138. CAZAL, C., DOMINGUES, V. C., BATALHÃO, J. R., BUENO, O. C., RODRIGUES FILHO, E., DA SILVA, M. F. G. F., VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants 'symbiotic fungus , by high-speed counter-current chromatography. **1216**, 4307–4312 (2009).
139. LIMA, V., SILVA, C. B., MAFEZOLI, J., BEZERRA, M. M., MORAES, M. O., MOURÃO, G. S. & OLIVEIRA, M. C. F Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice. **77**, 574–578 (2006).
140. FENG, T. F., ANG, R. W., AI, X. C., HENG, Y. Z. & UO, X. L. Anti-human Immunodeficiency Virus-1 Constituents of the Bark of *Poncirus trifoliata*. **58**, 971–975 (2010).
141. MOHD. ZAHEEN HASSAN , HASNAH OSMAN, M. A. A. & AHSAN, M. J. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **123**, 236–255 (2016).
142. AMARAL, J. C., DA SILVA, M. M., DA SILVA, M. F. G., ALVES, T. C., FERREIRA, A. G., FORIM, M. R., FERNANDES, J. B., PINA, E. S., LOPES, A. A., PEREIRA, A. M. S. & NOVELLI, V. M. Advances in the Biosynthesis of Pyranocoumarins: Isolation and ¹³C-Incorporation Analysis by High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-Solid-Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance Data. *J. Nat. Prod.* **83**, 1409–1415 (2020).
143. TUGIZIMANA, F., PIATER, L. & DUBERY, I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *S. Afr. J. Sci.* **109**, 18–20 (2013).
144. PANDA, A., PARIDA, A. K. & RANGANI, J. *Advancement of Metabolomics Techniques and Their Applications in Plant Science: Current Scenario and Future Prospective. Plant Metabolites and Regulation under Environmental*

- Stress* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-812689-9.00001-7.
145. Dyer, L. A., Philbin, C. S., Ochsenrider, K. M., Richards, L. A., Massad, T. J., Smilanich, A. M. & Jeffrey, C. S Modern approaches to study plant–insect interactions in chemical ecology. *Nat. Rev. Chem.* **2**, 50–64 (2018).
 146. SALEM, M. A., PEREZ DE SOUZA, L., SERAG, A., FERNIE, A. R., FARAG, M. A., EZZAT, S. M., & ALSEEKH, S. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. *Metabolites* **10**, 1–30 (2020).
 147. Uthe, H., van Dam, N. M., Hervé, M. R., Sorokina, M., Peters, K., & Weinhold, A A practical guide to implementing metabolomics in plant ecology and biodiversity research. *Adv. Bot. Res.* **98**, 163–203 (2021).
 148. BEDIA, C., CARDOSO, P., DALMAU, N., GARRETA-LARA, E., GÓMEZ-CANELA, C., GORROCHATEGUI, E. & TAULER, R. *Applications of Metabolomics Analysis in Environmental Research. Comprehensive Analytical Chemistry* vol. 82 (Elsevier B.V., 2018).
 149. KATAJAMAA, M. & OREŠIČ, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A* **1158**, 318–328 (2007).
 150. GRANATO, D., SANTOS, J. S., ESCHER, G. B., FERREIRA, B. L. & MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends Food Sci. Technol.* **72**, 83–90 (2018).
 151. Pezzatti, J., Boccard, J., Codesido, S., Gagnebin, Y., Joshi, A., Picard, D., RUIZ-GONZÁLEZ, V. & Rudaz, S. Implementation of liquid chromatography–high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **1105**, 28–44 (2020).
 152. KANU, A. B. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *J. Chromatogr. A* **1654**, (2021).
 153. HASHEMI, B., ZOHRABI, P. & SHAMSIPUR, M. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta* **187**, 337–347 (2018).
 154. RAZZAZI-FAZELI, E. & REITER, E. V. Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: Principles, applications and recent developments. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed* (2011). doi:10.1533/9780857090973.1.37.
 155. WINSTEL, D., BAHAMMOU, D., ALBERTIN, W., WAFFO-TÉGUO, P. & MARCHAL, A. Untargeted LC–HRMS profiling followed by targeted fractionation to discover new taste-active compounds in spirits. *Food Chem.* **359**, (2021).
 156. YI, L., DONG, N., YUN, Y., DENG, B., REN, D., LIU, S., & LIANG, Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Anal. Chim. Acta* **914**, 17–34 (2016).
 157. SMITH, C. A., WANT, E. J., O'MAILLE, G., ABAGYAN, R., & SIUZDAK, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **78**, 779–787 (2006).
 158. KATAJAMAA, M., MIETTINEN, J. & OREŠIČ, M. MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* **22**, 634–636 (2006).
 159. TSUGAWA, H., CAJKA, T., KIND, T., MA, Y., HIGGINS, B., IKEDA, K.,

- KANAZAWA, M., VANDERGHEYNST, J., FIEHN, O. & ARITA, M. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat. Methods* **12**, 523–526 (2015).
160. RÖST, H. L., SACHSENBERG, T., AICHE, S., BIELOW, C., WEISSER, H., AICHELER, F., et al. OpenMS: A flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nat. Methods* **13**, 741–748 (2016).
161. WANG, M., CARVER, J. J., PHELAN, V. V., SANCHEZ, L. M., GARG, N., PENG, Y., et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **34**, 828–837 (2016).
162. Nothias, L. F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat. Methods* **17**, 905–908 (2020).
163. LAI, Z., TSUGAWA, H., WOHLGEMUTH, G., MEHTA, S., MUELLER, M., ZHENG, Y., OGIWARA, A., MEISSEN, J., SHOWALTER, M., TAKEUCHI, K., KIND, T., BEAL, P., ARITA, M. & FIEHN, O. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat. Methods* **15**, 53–56 (2018).
164. Romanelli, J. P., Gonçalves, M. C. P., de Abreu Pestana, L. F., Soares, J. A. H., Boschi, R. S., & Andrade, D. F. Four challenges when conducting bibliometric reviews and how to deal with them. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **28**, 60448–60458 (2021).
165. NAKAGAWA, S., SAMARASINGHE, G., HADDAWAY, N. R., WESTGATE, M. J., O’DEA, R. E., NOBLE, D. W., & LAGISZ, M. Research Weaving: Visualizing the Future of Research Synthesis. *Trends Ecol. Evol.* **34**, 224–238 (2019).
166. CHEN, C. CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature. *J. Am. Soc. Inf. Sci. Technol.* **57**, 359–377 (2006).
167. VAN ECK, N. J. & WALTMAN, N. L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics* **84**, 523–538 (2010).
168. WALTMAN, N. J. & VAN ECK, N. J. CitNetExplorer: A new software tool for analyzing and visualizing citation networks. *J. Informetr.* **8**, 802–823 (2014).
169. DONTU, N., KUMAR, S., MUKHERJEE, D., PANDEY, N. & LIM, W. M. How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. *J. Bus. Res.* **133**, 285–296 (2021).
170. ARIA, M. & CUCCURULLO, C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *J. Informetr.* **11**, 959–975 (2017).
171. 67.pdf.
172. LI, W., HARTUNG, J. S. & LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *J. Microbiol. Methods* **66**, 104–115 (2006).
173. ZHONG, X., LIU, X. LU, LOU, B. HAI, ZHOU, C. YONG & WANG, X. FENG. Development of a sensitive and reliable droplet digital PCR assay for the detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *J. Integr. Agric.* **17**, 483–487 (2018).
174. CHUN, S. C., GOPAL, J., IYYAKANNU, S. & MUTHU, M. An analytical retrospection of mass spectrometric tools established for plant tissue culture: Current endeavours and future perspectives. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **126**, (2020).
175. HUSSAIN, M. S., FAREED, S., ANSARI, S., RAHMAN, M. A., AHMAD, I. Z., & SAEED, M. Current approaches toward production of secondary plant

- metabolites. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **4**, 10–20 (2012).
176. ISLAM, W. CRISPR-Cas9; an efficient tool for precise plant genome editing. *Mol. Cell. Probes* **39**, 47–52 (2018).
 177. LI, T., HU, J., SUN, Y., LI, B., ZHANG, D., LI, W., LIU, J., LI, D., GAO, C., ZHANG, Y. & WANG, Y. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture. *Mol. Plant* **14**, 1787–1798 (2021).
 178. LOPES, S. A., & CIFUENTES-ARENAS, J. C. A protocol for successful transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from citrus to citrus using *Diaphorina citri*. *Phytopathology* **111**, 2367–2374 (2021).
 179. MENDIS, H. C., OZCAN, A., SANTRA, S., LA, L. DE & ID, F. A novel Zn chelate (TSOL) that moves systemically in citrus plants inhibits growth and biofilm formation of bacterial pathogens. *Plos one*, 14(6), (2019).
 180. CERQUEIRA, C. N. Busca de biomarcadores como indicadores do mecanismo de defesa da laranja pera à infecção de CVC através de análise metabonômica. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2016. Tese de Doutorado, 499 p.
 181. REN, Z., NIE, B., LIU, T., YUAN, F., FENG, F., ZHANG, Y., ZHOU, W., XU, X., YAO, M. & ZHANG, F. Simultaneous determination of coumarin and its derivatives in tobacco products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules* **21**, (2016).
 182. DEMARQUE, D. P., CROTTI, A. E. M., VESSECCHI, R., LOPES, J. L. C. & LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 432–455 (2016).
 183. NISHAD, R., AHMED, T., RAHMAN, V. J. & KAREEM, A. Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Front. Microbiol.* **11**, 1–13 (2020).
 184. KAUR, S., SAMOTA, M. K., CHOUDHARY, M., CHOUDHARY, M., PANDEY, A. K., SHARMA, A., & THAKUR, J. How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **28**, 485–504 (2022).
 185. DING, L. N., LI, Y. T., WU, Y. Z., LI, T., GENG, R., CAO, J., ZHANG, W. & TAN, X. L. Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
 186. YANG, C., POWELL, C. A., DUAN, Y., SHATTERS, R. G., LIN, Y., & ZHANG, M. Mitigating citrus huanglongbing via effective application of antimicrobial compounds and thermotherapy. *Crop Prot.* **84**, 150–158 (2016).
 187. YANG, C., ZHONG, Y., POWELL, C. A., DOUD, M. S., DUAN, Y., HUANG, Y., & ZHANG, M. Antimicrobial Compounds Effective against *Candidatus Liberibacter asiaticus* Discovered via Graft-based Assay in Citrus. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
 188. YANG, C. & ANCONA, V. Validation of Propidium Monoazide-qPCR for Assessing Treatment Effectiveness against ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Citrus. *Agronomy* **12**, (2022).
 189. ZHANG, M., GUO, Y., POWELL, C. A., DOUD, M. S., YANG, C., & DUAN, Y. Effective antibiotics against ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PLoS One* **9**, 17–21 (2014).
 190. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, 1–10 (2021).
191. BAO, M., ZHENG, Z. Z., SUN, X., CHEN, J. & DENG, X. Enhancing PCR capacity to detect '*Candidatus liberibacter asiaticus*' utilizing whole genome sequence information. *Plant Dis.* **104**, 527–532 (2020).
 192. KUMAR, J., RAMLAL, A., MALLICK, D. & MISHRA, V. An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. 1–15 (2021).
 193. ZHANG, W. Global pesticide use: Profile, trend, cost, benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1), 1.
 194. DONG, O. X. & RONALD, P. C. Genetic Engineering for Disease Resistance in Plants: Recent Progress and Future Perspectives 1 [OPEN]. **180**, 26–38 (2019).
 195. RUKAVTSOVA, E. B., ALEKSEEVA, V. V., TARLACHKOV, S. V., ZAKHARCHENKO, N. S., ERMOSHIN, A. A., ZIMNITSKAYA, S. A., SURIN, A., GORBUNOVA, E. Y., AZEV V. N., SHESHNITSAN, S., SHESTIBRATOV, K. A. & BURYANOV, Y. I. Expression of a Stilbene Synthase Gene from the *Vitis labrusca* x *Vitis vinifera* L. Hybrid Increases the Resistance of Transgenic *Nicotiana tabacum* L. Plants to *Erwinia carotovora*. *Plants*, 11(6), 770.. (2022).
 196. HE, X. Z., & DIXON, R. A. Genetic Manipulation of Isoflavone 7- O - Methyltransferase Enhances Biosynthesis of 4 -O-Methylated Isoflavonoid Phytoalexins and Disease Resistance in Alfalfa. **12**, *The Plant Cell*, 1689–1702 (2000).
 197. ANDERSEN, E. J., ALI, S., BYAMUKAMA, E. & YEN, Y. Disease Resistance Mechanisms in Plants. (2018) doi:10.3390/genes9070339.
 198. ZHU, H., LI, C. & GAO, C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi:10.1038/s41580-020-00288-9.
 199. Liu, Q., Yang, F., Zhang, J., Liu, H., Rahman, S., Islam, S., MA, W. & She, M. Application of CRISPR / Cas9 in Crop Quality Improvement. *Int. J. Mol. Sci.* 1–16 (2021).
 200. WADA, N., UETA, R., OSAKABE, Y. & OSAKABE, K. Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR / Cas9-based genome engineering. 1–12 (2020).
 201. WANG, T., ZHANG, H. & ZHU, H. CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Hortic. Res.* (2019) doi:10.1038/s41438-019-0159-x.
 202. OLIVA, R., JI, C., ATIENZA-GRANDE, G., HUGUET-TAPIA, J. C., PEREZ-QUINTERO, A., LI, T., et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat. Biotechnol.* **37**, (2019).
 203. PENG, A., CHEN, S., LEI, T., XU, L., HE, Y., WU, L., YAO, L. & ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR / Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. 1509–1519 (2017) doi:10.1111/pbi.12733.
 204. FISTER, A. S., LANDHERR, L., MAXIMOVA, S. N. & GUILTINAN, M. J. Transient Expression of CRISPR/Cas9 Machinery Targeting TcNPR3 Enhances Defense Response in *Theobroma cacao*. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1–15 (2018).
 205. FRANK, A. & GROLL, M. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chemical Reviews*, 117(8), 5675-5703 (2017).

206. LANGE, B. M., RUJAN, T., MARTIN, W. & CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13172-13177 (2000).
207. ZHAO, L., CHANG, W., XIAO, Y., LIU, H. & LIU, P. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Annu Rev. Biochem.* 497–530 (2013)
208. PERELLO, C., LLAMAS, E., BURLAT, V. & ORTIZ-ALCAIDE, M. Differential Subplastidial Localization and Turnover of Enzymes Involved in Isoprenoid Biosynthesis in Chloroplasts. *PLoS one*, 11(2) (2016).
209. ALLAMAND A., PIECHOWIAK T., LIÈVREMONT D., R. M. G.-B. C. The Multifaceted MEP Pathway: Towards New Therapeutic Perspectives. *Molecules* **28**, 1403 (2023).
210. XIE, S., ZHU, L., QIU, X., ZHU, C. & ZHU, L. Advances in the Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Manufacture of Monoterpenes. (2019).
211. PULIDO, P., TOLEDO-ORTIZ, G., PHILLIPS, M. A. & WRIGHT, L. P. Arabidopsis J-Protein J20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway to Protein Quality Control. **25**, 4183–4194 (2013).
212. DU, F., YU, H., XU, J. & LI, C. Enhanced limonene production by optimizing the expression of limonene biosynthesis and MEP pathway genes in *E. coli*. 1–10 (2014).
213. ZHANG T., SUN M., GUO Y., SHI X., YANG Y., CHEN J., ZHENG T., HAN Y., B. F. AND A. S. Overexpression of LiDXS and LiDXR From Lily (*Lilium ‘ Siberia ‘*) Enhances the Terpenoid Content in Tobacco. *Front. Plant Sci.* **9**, 1–12 (2018).
214. CHANG, H. Y., CHENG, T. H. & WANG, A. H. J. Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life* **73**, 40–63 (2021).
215. YU, X. & LI, S. M. *Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily*. *Methods in Enzymology* vol. 516 (Elsevier Inc., 2012).
216. YANG, Y., KE, N., LIU, S. & LI, W. Methods for Structural and Functional Analyses of Intramembrane Prenyltransferases in the UbiA Superfamily. *Methods Enzymol.* **584**, 309–347 (2017).
217. LI, W. Bringing Bioactive Compounds into Membranes: The UbiA Superfamily of Intramembrane Aromatic Prenyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 356–370 (2016).
218. JOST, M., ZOCHER, G., TARCZ, S., MATUSCHEK, M. & XIE, X. Structure - Function Analysis of an Enzymatic Prenyl Transfer Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* 17849–17858 (2010).
219. KARAMAT, F., OLRYS, A., MUNAKATA, R., KOEDUKA, T., SUGIYAMA, A., PARIS, C., HEHN, A., BOURGAUD, F. & YAZAKI, K. A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *Plant J.* **77**, 627–38 (2014).
220. LARBAT, R., KELLNER, S., SPECKER, S., HEHN, A., GONTIER, E., HANS, J., BOURGAUD, F. & MATERN, U. Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 542–54 (2007).
221. LARBAT, R., HEHN, A., HANS, J., SCHNEIDER, S., JUGDE, H., SCHNEIDER, B., MATERN, U. & BOURGAUD, F. Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 4776–85 (2009).
222. MUNAKATA, R., OLRYS, A., KARAMAT, F., COURDAVAULT, V., SUGIYAMA, A., DATE, Y., KRIEGER, C., SILIE, P., FOUREAU, E., PAPON, N.,

- GROSJEAN, J., YAKAZI, K., BOURGAUD, F. & HEHN, A. Molecular evolution of parsnip (*Pastinaca sativa*) membrane-bound prenyltransferases for linear and/or angular furanocoumarin biosynthesis. *New Phytol.* **211**, 332–344 (2016).
223. MUNAKATA, R., OLRV, A., TAKEMURA, T., & YAKAZI, K.. Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic O-prenyltransferases in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
224. LIMONES-MENDEZ, M., DUGRAND-JUDEK, A., VILLARD, C., COQUERET, V., FROELICHER, Y., BOURGAUD, F., OLRV, A. & HEHN, A.. Convergent evolution leading to the appearance of furanocoumarins in citrus plants. *Plant Sci.* **292**, 110392 (2020).
225. Dhillon, D. S., & Brown, S. A. Localization and characterization of Dimethylallylpyrophosphate: Umbelliferone Dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 177(1), 74-83 (1976).
226. VILLARD, C., MUNAKATA, R., KITAJIMA, S., VAN VELZEN, R., SCHRANZ, M. E., LARBAT, R., & HEHN, A. A new P450 involved in the furanocoumarin pathway underlies a recent case of convergent evolution. *New Phytologist* vol. 231 (2021).
227. MUNAKATA, R., KITAJIMA, S., NUTTENS, A., TATSUMI, K., TAKEMURA, T., ICHINO, T., GALATI, G., VAUTRIN, S., BERGÈS, H., GROSJEAN, J., BOURGAUD, F., SUGIYAMA, A., HEHN, A. & YAZAKI, K. Convergent evolution of the UbiA prenyltransferase family underlies the independent acquisition of furanocoumarins in plants. *New Phytol.* **225**, 2166–2182 (2020).
228. WU, G. A., PROCHNIK, S., JENKINS, J., SALSE, J., HELLSTEN, U., MURAT, F., et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat. Biotechnol.* **32**, 656–662 (2014).
229. 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* **7**, (2012).
230. LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
231. REMINGTON, S. J. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Sci.* **20**, 1509–1519 (2011).

Anexo I - Alinhamento das sequências para DXS, DXR e PT encontradas no genoma de *C. sinensis* com aquelas utilizadas nas análises *in silico*

DXR

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------|----------|------|-----|------------|------------|------------|-----|------------|------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | | |
| At_NM25674.3_Arabidopsis_thali | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | TRSNHRLP | KLSC | G | FALKRRDNAT | ATFGRVCCS | ACQ | --- | FAWPGRAVPE | TFRRTWDGPF | KPISVIGSTG |
| At_NM_001203671.1_Arabidopsis | MLNLSIPA | ESKISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Gb_AY494186.1_Ginkgo_biloba | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Rd_JX518618.1_Rosa_x_damascena | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Rr_JX518616.1_Rosa_rugosa | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Rc_JX518617.1_Rosa_x_centifolia | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Gm_HQ340242.1_Glycine_max | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Gm_HQ340241.1_Glycine_max | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Sm_FJ476255.1_Salvia_miltiorrhiza | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Gb_EF051345.1_Gossypium_barbad | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |
| Nt_NM_001326035.1_Nicotiana_t | MALNLSIPA | EIKRISFLIT | SRFNPIP | KLSC | --- | FALKRRNQGR | G-FGKGVCCS | VKVVQQQQPP | --- | FAWPGRAVPE | AP-RQSWDGP | KPISVIGSTG |

DXR

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|------|-----|-------|------------|-------------|------------|------------|
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| At_NM25674.3_Arabidopsis_thali | SIGTGLDIV | AEHDKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| At_NM_001203671.1_Arabidopsis | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Gb_AY494186.1_Ginkgo_biloba | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Rd_JX518618.1_Rosa_x_damascena | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Rr_JX518616.1_Rosa_rugosa | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Rc_JX518617.1_Rosa_x_centifolia | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Gm_HQ340242.1_Glycine_max | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Gm_HQ340241.1_Glycine_max | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Sm_FJ476255.1_Salvia_miltiorrhiza | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Gb_EF051345.1_Gossypium_barbad | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |
| Nt_NM_001326035.1_Nicotiana_t | SIGTGLDIV | AENPKFRVW | ALAAGSNVLL | LADQ | --- | VKRFK | EKLVAVRNES | LILDELKEALA | NVDELKEALA | GEQGVIEVAR |

DXR

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| At_NM25674.3_Arabidopsis_thali | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| At_NM_001203671.1_Arabidopsis | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Gb_AY494186.1_Ginkgo_biloba | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Rd_JX518618.1_Rosa_x_damascena | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Rr_JX518616.1_Rosa_rugosa | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Rc_JX518617.1_Rosa_x_centifolia | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Gm_HQ340242.1_Glycine_max | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Gm_HQ340241.1_Glycine_max | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Sm_FJ476255.1_Salvia_miltiorrhiza | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Gb_EF051345.1_Gossypium_barbad | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |
| Nt_NM_001326035.1_Nicotiana_t | HPDAVTVVTG | IVGCAGLKEP | VAAIEAGKDI | ALANKETLIA | GGPFVLPALH | KHNWKILPAD | SEHSAIFCOI | QGLPEGALRR | IILTAGSGAF | RDWPFVKLKE |

DXR

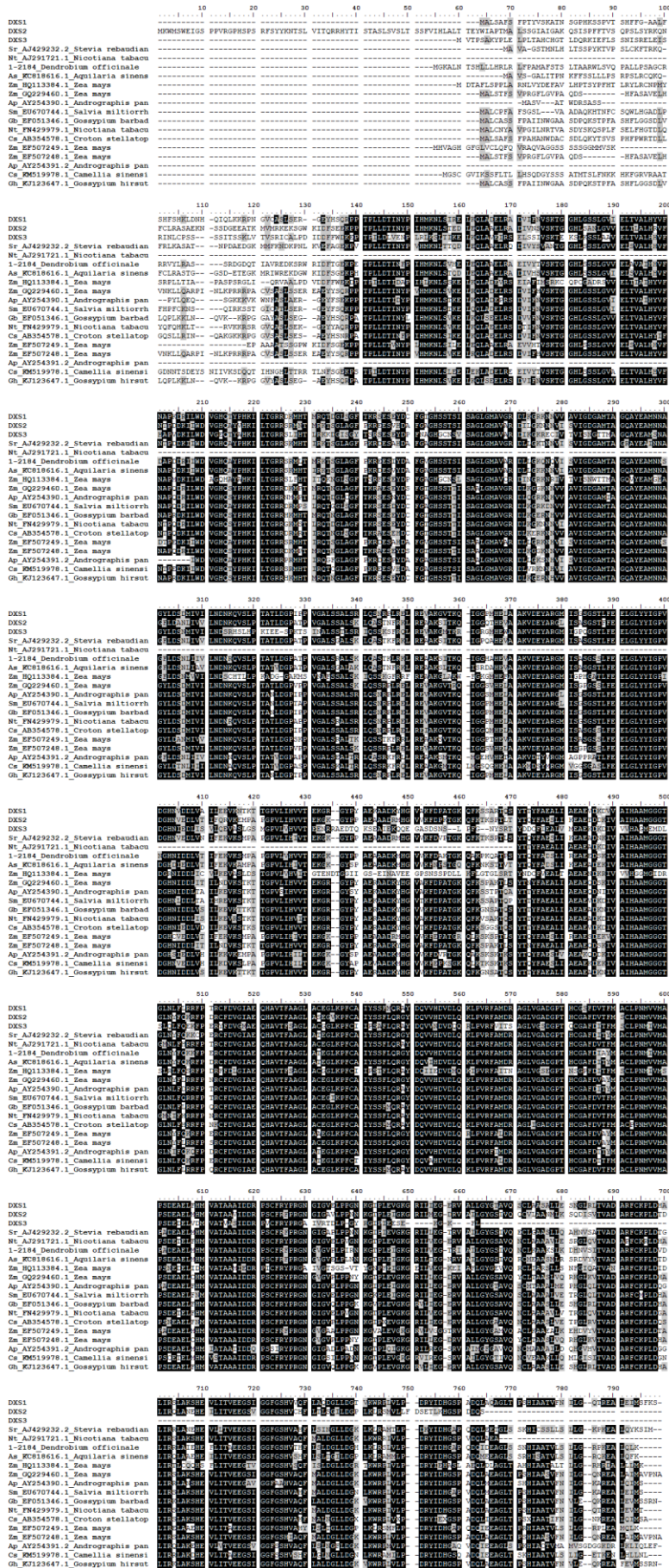
| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|-------------|------------|------------|------------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| At_NM25674.3_Arabidopsis_thali | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| At_NM_001203671.1_Arabidopsis | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Gb_AY494186.1_Ginkgo_biloba | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Rd_JX518618.1_Rosa_x_damascena | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Rr_JX518616.1_Rosa_rugosa | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Rc_JX518617.1_Rosa_x_centifolia | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Gm_HQ340242.1_Glycine_max | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Gm_HQ340241.1_Glycine_max | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Sm_FJ476255.1_Salvia_miltiorrhiza | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Gb_EF051345.1_Gossypium_barbad | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |
| Nt_NM_001326035.1_Nicotiana_t | VKVDALRKH | NWNNMGRKITV | DSATLFNKGL | EVIEAHYLEG | AEYDDIEIVI | HPQSIHSMV | ETQDSSVLAQ | LGWPFDMRLPI | LYTMSWEPRI | YCSEVTWPRLL |

DXR

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|
| | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
| At_NM25674.3_Arabidopsis_thali | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| At_NM_001203671.1_Arabidopsis | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Gb_AY494186.1_Ginkgo_biloba | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Rd_JX518618.1_Rosa_x_damascena | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Rr_JX518616.1_Rosa_rugosa | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Rc_JX518617.1_Rosa_x_centifolia | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Gm_HQ340242.1_Glycine_max | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Gm_HQ340241.1_Glycine_max | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Sm_FJ476255.1_Salvia_miltiorrhiza | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Gb_EF051345.1_Gossypium_barbad | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |
| Nt_NM_001326035.1_Nicotiana_t | DLCKLGSLTR | KAPDNVRYPS | MDLAVAAGRA | GGTMTGVLSA | ANEKAVEMFI | DEKISVLDIF | KVVELTCQKH | RRELVTSPSL | EEIHVDLWA | RYAANVLOS |

DXR

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| At_NM25674.3_Arabidopsis_thali | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| At_NM_001203671.1_Arabidopsis | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Gb_AY494186.1_Ginkgo_biloba | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Rd_JX518618.1_Rosa_x_damascena | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Rr_JX518616.1_Rosa_rugosa | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Rc_JX518617.1_Rosa_x_centifolia | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Gm_HQ340242.1_Glycine_max | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Gm_HQ340241.1_Glycine_max | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Sm_FJ476255.1_Salvia_miltiorrhiza | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Gb_EF051345.1_Gossypium_barbad | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nt_NM_001326035.1_Nicotiana_t | SGRSPVFA | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |



| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| PT1 | MQMHSSSS | FSLK--YHP | LQAGCGIKL | ESPVTHHGV | LNRSCQRKYA | IKCSQSNFY | N----LTNKI | SSRNCKRFN | SHRAPVLIQD | GYRSKSS-- |
| PT2 | MMQMHSSSS | FSPKY--YYP | LQHAGCDKLL | QLPLKRVHGG | LNRSESRNYA | IKCTQSDSY | STNKIKNNEN | SSRNCKRFN | KYRWAVLIQD | GGASNN--- |
| PT4 | MMQMHSSSS | FSLK--YHP | LQAGCGIKL | ESPVTHHGV | LNRSCQRKYA | IKCSQSNFY | N----LTNKI | SSRNCKRFN | SHRAPVLIQD | GYRSKSS-- |
| PcPT_AB825956.1_Petroselinum c | MQMHSSSR | FSSS--FLH | HOPEK--GHL | T-LQTCRRHA | KTLKGEPRFP | SRVWSCHKNV | D----SSRN | FSSSCKR--S | KTQEKILLOT | IGATSDGEAI |
| PsPT1_KM017083.1_Pastinaca sat | MQMHSSSR | FSSS--FLH | LQRDK--GFR | T-LQTCRRHA | KVWNGDQSEA | FRVWSCKNL | D----STKN | FSSSCKR--I | RTHNKILLOT | ISATSDREAL |
| PsPT2_KM017084.1_Pastinaca sat | MQMHSSSR | FSSS--FLH | LQRERSGHL | TSPTPRRHA | TILNKIRELT | VRVWSCKIL | D----STNN | SSRSCKRPTN | RNTSTILLOT | IGATSDGEVI |
| AL3G52980.t1 | MESLSSSS | LVSAAAGFCW | RKQNLKHL | SEIRVLKCD | SKVWAKPRR | NNLVRDQGE | S----- | ----- | ----- | ----- |
| AT2G18950.1 | MESLSSSS | LVSAAAGFCW | RKQNLKHL | SEIRVLKCD | SKVWAKPRR | NNLVRDQGE | S----- | ----- | ----- | ----- |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| PT1 | -EDD-DHSNS | FLNWFLEKTH | ALVRFRRFA | CAGTIATTS | NSLLFVQTLA | DLTPRYFTGL | MEALVPEVIM | ETVWVAINCL | SDVEIDKVNK | FYPLASGEI |
| PT2 | -EDD-INSTS | FWDVLRKRLH | ALVRFRRFA | MIGTIINGTS | IAILLPQSEA | DLTPRYFMET | MEALVPEVIM | NIYWGIMNOV | SDVEIDKVNK | FYPLASGDL |
| PT4 | -EENILPAS | FVQVLRKRLH | ALVRLRRPMT | WASITINGTS | VSNLAVQSEP | DLTATYFIEV | IRSMVPEIMM | NIYVNAINCL | SDVEIDKVNK | FELPLASGEI |
| PcPT_AB825956.1_Petroselinum c | WQPRNDFFVT | WQNTLRKRLD | AFSIFSRPYS | AIITTIIGTS | VSNLPLSVA | DRSAPYFVGL | LQALPELCA | NIYVSGINCL | VDVEIDKVNK | FYPLASGEF |
| PsPT1_KM017083.1_Pastinaca sat | WQPRNDFFVT | WQNTLRKRLD | AFCTFERPYS | AIITTIIGTS | VSNLPLSVA | DRSAPYFVGL | LQALPELCA | NIYVSGINCL | VDVEIDKVNK | FYPLASGEF |
| PsPT2_KM017084.1_Pastinaca sat | WQPRNDFFVT | WQNTLRKRLD | AFCTFERPYS | AIITTIIGTS | VSNLPLSVA | DRSAPYFVGL | LQALPELCA | NIYVSGINCL | VDVEIDKVNK | FYPLASGEF |
| AL3G52980.t1 | QCHAFDANS | RQKSFROSLD | AFVRSRRPHT | VIGTVLSITS | VSNLPLSVA | DRSAPYFVGL | LQALPELCA | NIYVSGINCL | SDVEIDKVNK | FYPLASGEY |
| AT2G18950.1 | QCHAFDANS | RQKSFROSLD | AFVRSRRPHT | VIGTVLSITS | VSNLPLSVA | DRSAPYFVGL | LQALPELCA | NIYVSGINCL | SDVEIDKVNK | FYPLASGEY |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| PT1 | SMGTGIAIIL | ASAIMSLAYA | MMRSEPLFIW | AVIAMIIVGT | AYSVLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| PT2 | SMGTGIAIIL | TLSLTSIAIA | LSLQSEPLFI | AVIAMIIVGT | AYSVLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| PT4 | SMGTGIAIIL | ASAIMSLAYA | MMRSEPLFIW | AVIAMIIVGT | AYSVLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| PcPT_AB825956.1_Petroselinum c | SMGEGGAIIVS | ALATFICPMA | MMRSEPLFIW | AVIAMIIVGT | AYSVLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| PsPT1_KM017083.1_Pastinaca sat | SMGEGGAIIVS | ALATFICPMA | MMRSEPLFIW | AVIAMIIVGT | AYSVLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| PsPT2_KM017084.1_Pastinaca sat | SMGEGGAIIVS | ALATFICPMA | MMRSEPLFIW | AVIAMIIVGT | AYSVLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| AL3G52980.t1 | SMGTGIAIIVS | SFSIMSFWIG | WIVGSPLEFW | ALVRSFVMLGT | AYSINLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |
| AT2G18950.1 | SMGTGIAIIVS | SFSIMSFWIG | WIVGSPLEFW | ALVRSFVMLGT | AYSINLEPLL | WRKNSFLAAF | CMVSLAGLTI | QEVVYHHQK | VVLGRFVVE | TRPLIFATAF |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| PT1 | ISFCVVIATF | IKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| PT2 | ISFISAVNSL | IKDIPDVEGD | RDFGRFOSIS | KLGRFVLRLL | CVWLFHAYG | FAVVVGASSP | FQVVEVSHII | GHSILASLLW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| PT4 | MPHRTAATAF | SKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| PcPT_AB825956.1_Petroselinum c | ISFIPACLGA | IKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| PsPT1_KM017083.1_Pastinaca sat | ISFIPACLGA | IKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| PsPT2_KM017084.1_Pastinaca sat | ISFIPACLGA | IKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| AL3G52980.t1 | ISFISAVNSL | IKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |
| AT2G18950.1 | ISFISAVNSL | IKDIPDVEGD | RDFGRRTFSV | MLGRRVFRRL | SVSLSIAYG | FAVVVGASSP | FLANKLITII | GHSILASIEW | LRVRAVDLSD | NRSTISFYMF |

| | | | |
|--------------------------------|-------------|------------|----|
| | 410 | 420 | |
| PT1 | IWK-----L | GYAEYLLIHF | VR |
| PT2 | IWK-----L | GYAEYLLIHF | IR |
| PT4 | IFKASGSTITL | GYAEYLLIHF | VR |
| PcPT_AB825956.1_Petroselinum c | IFK-----L | GYAEYLLIHF | NR |
| PsPT1_KM017083.1_Pastinaca sat | IFK-----L | GYAEYLLIHF | NR |
| PsPT2_KM017084.1_Pastinaca sat | IFK-----L | GYAEYLLIHF | IR |
| AL3G52980.t1 | IWK-----L | GYAEYLLIHF | IK |
| AT2G18950.1 | IWK-----L | GYAEYLLIHF | LK |

Anexo II – Sequências das PT KM017083, KM017084, AB825956, XM_006483446, XM_006483444, CSR PT1-18, CLR PT1-11, CSR PT2-15 e CLR PT2-3

KM017083

>KM017083.1 Pastinaca sativa umbelliferone dimethylallyl transferase (PT1)
mRNA, complete cds
MAQTIMHSRLSSGFLHLQRDKGFRTLPTQRRHAKVVNGDQEFARVVSCKDKNLDSTKNFSGSCEKPIRTHTNKLL
QTISATSDREAI IQPKDDYEAPWQNTLRKWDADFCTFGRPYSAICTIIGISSVSLPLTSVKDFSAFYVGLLQA
LIPFLCANIYTSGINQLVDVDDIDKINKPYLPLVSGEFSLGEGRAIVSALAFMCLAVGILSHSTPLFVGVLVYFLI
GTAYSVELPLLRWTKPMAAAF SMAGLMGLTIQPAVFYHIQNALGKPMVFSKTVAFATIFFSVFAAVLGAIKDVP
DVEGD TAFGNRTFSVRYGQEKVFSVCLNILL LAYGFAVVVGASSFLLCKIVSVMGH T T L A S L L L L R A K S T N P K D
PESTQSFYMF L F K L L Y A E Y V L I H F M R

>KM017083.1 Pastinaca sativa umbelliferone dimethylallyl transferase (PT1)
mRNA, complete cds
ATGGCTCAAACAATTATGCATTACGATTATCGTCCGGTTTCTTACATCTTCAACGAGACAAAAGGCTTTCGTACA
CTTCCAACGCAAAGAAGACATGCTAAAGTAGTGAACGGAGACCAAGAATTTGCTTTCAGGGTGGTTCATGCGAT
AAAAATTTAGATTCAACAAAGAATTTAGCGGCAGTTGTGAAAAGCCAATTAGAACACACACAAAACAACTTTTA
CAAACAATTAGTGCCACATCAGACAGAGAGGCTATTATACAGCCAAAGATGATTACGAAGCACCATGGCAGAA
ACTTTACGGAGAAAATGGGATGCATTTTGCACGTTTGGTTCGTCCTACTCTGCCATCTGCACAATTATTGGAATA
AGTTCGGTTTCTCTGCTGCCCTTAACTTCCGTTAAAGATTTCTCGGCTCCATATTTTGTGGGATTACTACAGGCA
TTGATCCCATTTCTTTGTGCCAACATCTATACCTCGGGGATAAATCAACTTGTTGATGTGGACATAGACAAAATA
AACAAGCCTTACCTGCCACTGGTTTCGGGAGAATTTTCTTGGGCGAAGGGAGAGCAATTGTCTCAGCACTGGCT
TTTATGTGCCTGGCCGTGGGAATCCTATCTCATTCTACACCATTGTTTGTTCGGGTTCTTGTCTATTTTTTAAAT
GGAACCGCATATTCTGTTGAGCTACCTCTACTTAGATGGAAAACAAAACCGGCCATGGCTGCATTTTCTATGGCC
GGCCTAATGGGACTCACGATCCAGCCTGCTGTCTTCTATCACATCCAGAATGCACTCGGTAAACCAATGGTATTT
TCAAAGACAGTGGCCTTTGCTACCATTTTCTTCAAGTGTCTTTGCAGCTGTTCTTGGAGCGATCAAGGACGTACCT
GATGTTGAAGGAGACACAGCGTTTCGGCAACCGAACATTCAGTGTGAGATATGGCCAAGAGAAAGTCTTTTCTGTC
TGTCTAAATATCCTGCTGCTTGCTACGGGTTTGTGTTGGTGGTAGGAGCTTCATCCTCGTTCCTATTATGCAAG
ATTGTATCTGTGATGGGTACACTACACTTGCCTCCCTACTTTTGTCTCGAGCAAATCTACTAATCCGAAAGAT
CCTGAATCAACGCAGTCTTTTACATGTTTTTATTTAAGCTATTGTACGCGGAGTATGTGCTAATTCATTTTCATG
CGCTGA

KM017084

>KM017084.1 Pastinaca sativa umbelliferone dimethylallyl transferase (PT2)
mRNA, complete cds
MTQTLMHSRFS S GFLHLQRERRSGFLTSFPTRRRHATILNKDKELTVRVVSCDKILDSTNNSSRSCEKPINRNT
STLLQTLGASSEGEV I I Q P K A E Y E E T W D S I F W R K W D A F V T F G R P Y S V L G S I I G I S S V S L L P L T S V G D F S L A V F V G
FVQALIPFVCANIYASGINQVVDVEIDKINKPYLPLVSGDFSMGEGKAVVSATGFLCLAMTIMFGSLPLFLGLV
YFLYATAYSVELPFLRWTKPFMAAAF SMAGLMGLTIQPSVYYHIQNVLGRPMVLT K P V V F A T S F I S V F S A V L A M I
KDLPDVEGD R A L G N L T F S V R Y G Q E K V F N I C V G I M L A A Y A S A V V T G S F S S L L I C K L V S V I G H T A L A F L L M L R A K S I
DVNDPESTQSFYMF A F Q L L Y A E Y V L I H F I R

>KM017084.1 Pastinaca sativa umbelliferone dimethylallyl transferase (PT2)
mRNA, complete cds
ATGACTCAGACACTTATGCATTACGCTTCTCCTCCGGTTTCTTACATCTTCAACGACGAGAAAAGATCAGGCTTT
CTTACATCATTTC AACCCG G A G A A G A C A T G C T A C A A T A T T G A A T A A A G A C A A A G A A T T G A C T G T C A G G G T G G T T
TCTTGCATAAAAATTTTGGATTCAACAAACAATTCTAGCAGAAAGTTGTGAAAAGCCAATTAATAGAACAAAACACA
AGCACGCTTTTACAAACACTTGGTGCCTCATCAGAGGGTGAGGTTATTATACAACCCAAAAGCTGAATACGAAGAA
ACATGGGATAGTATTTTCTGGAGAAAATGGGATGCCTTTGTGACGTTTGGTGCACCATATTCTGTCTTGGCTCA
ATTATTGGAATAAGTTCAGTTTCTCTACTGCCCTTAACTCAGTCGGAGATTTCTCACTTGCAGTTTTTGTGGGA
TTCGTACAGGCATTGATCCCGTTTGTGTGCGAACATTTATGCCTCAGGAATAAATCAAGTGGTTGATGTGGAA
ATAGACAAAATTAACAAGCCCTATCTTCCACTGGTTTCTGGAGATTTTTCTATGGGGGAAGGGAAAGCAGTTGTC
TCAGCTACGGGCTTTTTGTGCTTGGCCATGACAATCATGTTTGGGTCTCTACCATTGTTTCTGGGAGTCTTGGAA

TATTTTCTTTATGCAACTGCATATTCTGTGGAGCTACCTTTTCCTTAGATGGAAAACAAAACCGTTTATGGCTGCA
 TTCAGTATGGCTGGTCTAATGGGACTCACCATTACAGCCTTCTGTCTACTATCACATCCAAAACGTGCTTGGTAGA
 CCAATGGTTTTTGACAAAGCCAGTGGTCTTTCGCTACCAGTTTCATCAGTGTCTTTTCAGCTGTTCTTGAATGATC
 AAGGACTTACCTGATGTTGAAGGAGACAGAGCGTTGGGCAACCTAACATTTCAGTGTAGATATGGCCAAGAGAAA
 GTCTTTAATATCTGTGTAGGTATCATGCTGGCTGCCTATGCATCTGCTGTGGTGACAGGATCTTTCCTCGCTT
 CTAATATGCAAGCTTGTCTGTGATTGGTCACACTGCACTTGCCTTCCTCCTTATGCTTCGAGCAAAATCTATT
 GATGTAAATGATCCTGAATCAACGCAGTCCTTTTACATGTTTGTCTTTTCAGCTATTATATGCAGAGTATGTGCTT
 ATTCATTTTCATACGCTGA

AB825956

>AB825956.1 *Petroselinum crispum* PcPT mRNA for umbelliferone 6-
 dimethylallyltransferase, complete cds

MSQTLMHSRFSSGFLHHQPEKGFLLTQTQRRHAKTLKGEKEFSPRVVVSCHKNVDSKSNFSSSCEKSKTQEKILAQ
 TLGATSDGEAIVQPNNDFEVTWQNTLRRKWDAFSIFSRPYSIAICTIIGISSVSLPLTSVADFSPAYFVGLLQAL
 IPFLCANIYTSAINQLVDVDIDKINKPYLPLVSGEFMSGEGRAIVSALTFTCFAMAIMSHSVPLFVGVLVYFLIG
 TAYSVEHPLLRLWKTTPAMAASFMAGLMGLTIQPTVFYHIQNVLGKPMVFSRSVAFATMFFSIFAACLGAIKDIPD
 VEGDREFGNLTFVRYGQEKVFSFCLNVLLLAYGSAVVVGASSSSLLCKTVSVIGHTVLAALLVLRKSTNPKDP
 ESTQSFYMFLLFKLLLYAEYVLIHFMR

>AB825956.1:70-1272 *Petroselinum crispum* PcPT mRNA for umbelliferone 6-
 dimethylallyltransferase, complete cds

ATGTCTCAAACACTTATGCATTACGATTCTCCTCCGGTTTCTTACATCATCAACCAGAAAAAGGCTTTCTTACT
 CTTCAAACGCAAAGAAGACATGCTAAAACATTGAAGGGAGAAAAAGAATTTCTTCCAGGGTGGTTTCTTGCCAC
 AAAAATGTAGATTTCATCCAAGAATTTTCAGCAGCAGTTGTGAAAAGTCAAAAACACAAGAAAAGATACTTGCACAA
 AACTTGGTGCTACATCAGACGGCGAGGCTATTGTACAGCCAAATAATGATTTTGAAGTACATGGCAGAATACT
 TTACGGAGAAAATGGGATGCATTTTCCATTTTTAGTCGTCATACTCTGCCATCTGCACTATTATTGGAATAAGT
 TCAGTTTCTCTACTGCCCTTGACTTCCGTTGCTGATTTCTCACCTGCATATTTTGTGGGATTACTACAGGCATTG
 ATCCCATTTCTTTGTGCAAACATCTATACATCCGCAATAAATCAACTGGTTGATGTGGACATAGACAAAATAAAC
 AAGCCTTATCTTCCACTGGTTTTCTGGAGAATTTTCCATGGGTGAAGGGAGAGCAATTGTCTCTGCATTGACATTT
 ACGTGCTTCGCCATGGCTATCATGTCTCATTCTGTACCATTGTTTGTGGGGTCTTGTGTTATTTTTTATTGATTGGA
 ACCGCATATTCTGTTGAGCATCCTTTACTTAGATGGAAAACAAAACCGGCAATGGCTGCATTTTCTATGGCCGGA
 CTAATGGGACTCACGATTACGCCTACTGTCTTCTACCACATACAGAATGTTCTCGGTAAACCAATGGTTTTCTCA
 AGGTCAGTGGCCTTTGCTACCATGTTCTTTCAGCATCTTTGCAGCTTGTCTTGGAGCGATCAAGGACATACCTGAT
 GTTGAAGGAGACAGAGAGTTCCGGCAACCTAACGTTTCAGTGTGAGATATGGCCAAGAGAAAGTCTTTTCTTCTGT
 CTAATGTCTCTGCTGTTGGCCTATGGGTCTGCAGTGGTGGTAGGAGCTTCATCCTCGTCTCTATTATGCAAGACT
 GTATCTGTGATAGGTACACTGTACTTGCCTCCCTCCTTGTGCTTCGAGCAAAATCTACTAATCCCAAGGATCCT
 GAATCAACCAGTCCTTTTACATGTTTTTATTCAAGCTACTGTATGCAGAGTATGTGCTAATTCATTTTCATGCGC
 TGA

PT1 XM 006483446

>XP_006483446 coumarin 8-geranyltransferase 1b, chloroplastic [*Citrus
 sinensis*]

MLQMHLSSFSFLKYHPLQKAGCIKTLSPVTHIHGVLNRSQEKKYAIKCSQSNFYNLTNKIASSRNCKPFSNSHR
 APVTLQDGYASKSEDDHSNSFLNVFLKKFHALYRFMRAYACAGVI IATTSNSLLPVQTLADLTPAYFTGLMEAL
 VPAVLMHIYVVAINQLSDVEVDKVNKPYLPLASGEISMGTGIAITLASALMSLAYAVMIRSPFFIWAIVIAWIFVG
 TAYSVQLPLLRLWKGNSFLAAFCMVSLNGLLTQFPVYVHIQKYVLGRPLEIFTRPLMFATAFISCFVVIKDL
 HDVDGDKKFGIKTSLVMLGKERVFRLSVSMLSIAYGAAVVVGASSPFLANKLITIIHGILASIFWLRVRAVDLS
 DNASILSFYMFIIWKLYYAEYLLIPFVR

>XM_006483446 PREDICTED: *Citrus sinensis* coumarin 8-geranyltransferase 1b,
 chloroplastic (LOC102619418), mRNA

ATGCTTCAAATGCACCTTGAGTTCGAGCTTCTCTCTAAAATACCATCCTTTACAAAAGGCTGGTTGCATTAAAACA
 CTCGAATCGCCAGTGACACATATACATGGCGTCTGAACAGAAAGTCAAGAAAAGAGTACGCCATCAAGTGTCTCC
 CAAAGTAATTCATTTTATAATTTGACCAATAAAAATTGCAAGCAGCAGAACTGTAAACCATTC AACAGTCACCGG
 GCTCCTGTCACGTTACAAGATGGTTATGCATCAAAATCTGAGGATGATGATCACTCCAACAGCTTTCTGAATGTT
 TTTCTCAAGAAATTTTCATGCACTATAACGTTTTATGCGTGTCTTATGCTTGTGCCGGCGTTATTATAGCAACAACA
 TCGAATTTCTTCTACCTGTACAAACACTCGCCGACTTGACTCCCGCATATTTCACTGGATTAATGGAGGCTTTG
 GTGCCTGCAGTATTGATGCACATTTATGTGCTGGCCATAAACCAGTTGTCTGATGTTGAAGTAGACAAGGTTAAC

AAGCCTTATCTGCCACTTGCTTCCGGTGAAATTTCAATGGGTACTGGAATTGCAATTACTTTAGCATCTGCATTG
 ATGAGCCTGGCTTACGCAGTTATGATTTCGATCTCCACCGTTTATTTGGGCCGTCATTGCATGGATTTTTGTTGGA
 ACCGCCTACTCCGTCCAACCTTCCCCTTCTCAGATGGAAGGGAAATTCATTTCTAGCTGCTTTCTGCATGGTGTCA
 CTAACGGACTTCTAACACAATTTCTGTCTACGTACACATCCAGAAATACGTGCTTGGTAGACCTCTAGAAAATA
 TTTACAAGACCACTGATGTTTGCAACTGCTTTCAATTTCTGCTTCTGCGTTGTGATTGCATTTATCAAGGATTTA
 CACGATGTGGATGGCGATAAAAAATTTGGCATTAAAACCTCAGTGTTCATGCTTGGGAAAGAACGAGTATTTCCGG
 CTTAGTGTCTATGCTTTCAATTGCTTATGGCGCTGCGGTAGTAGTTGGAGCTTCTTCACCTTTCCTGGCAAAC
 AAGCTTATCACGATAATAGGCCACGGCATACTTGCTTCCATTTTTTGGCTTCGAGTCCGAGCTGTTGATCTCTCT
 GATAATGCATCAATACTTTCTTTCTACATGTTTCATTTGGAAGTTATACTATGCTGAATACCTCCTTATCCCATTT
 GTACGCTGA

PT2 XM 006483444

>XM_006483444 :102-1328 PREDICTED: Citrus sinensis coumarin 8-
 geranyltransferase 1b, chloroplastic (LOC102618825), mRNA
 MMLQMHSSSSFSFKYYPYPLQHAGCDKTLQLPLTKVHGLNRSESKNYAIKCTQSDSFYSTNKIKNNENTSSRNCK
 PFNKYRVAVTLQQQGCASNNEDDINSTSFWDVLLKHLHALYVFTTRPFAMIGTIVGITSIAILPLQSFADLTPKYF
 MEFLKALLSAVLMNNYVGTQVADVEIDKVNKPDPLASGDLMSGTGLAITLTLSTLALIALSLQSPPLIFGL
 IVWFLGLTAYSVDLPFLRWKTKPFLAGMCMVTVFGLVYQFSFFIHFQKYVLGRPVVITRPLIFAAAIIISTISAVM
 SLLKDIPEDEGDKQFGFQSISSKLGKENVLRLCVYALFFAYGVSVIVGASSSFQLVKLVSIIGHSTLAFLLWLRA
 QTVDLSSNNASTYSFYMFYIWKLFYAEYLLIHFLR

>XM_006483381.4:102-1328 PREDICTED: Citrus sinensis coumarin 8-
 geranyltransferase 1b, chloroplastic (LOC102618825), mRNA
 ATGATGCTTCAAATGCATTTCGAGTTCAAGCTTCTCTCCAAAGTACTACTATCCTTTGCAACATGCTGGTTGCGAC
 AAAACACTTCAATTACCGTTGACAAAAGTGCATGGCGGCTTGAACAGAAGTGAAGCAAGAATTACGCTATCAAA
 TGCACACAAAGTGATTCGTTTTATTTCGACCAATAAAATCAAAAACAATGAAAACACAAGCAGCAGAAATGTAAA
 CCGTTCAACAAATACCGCGTTGCTGTACATTACAACAACAAGGTTGTGCATCAAACAATGAGGATGATATTAAC
 TCGACGAGCTTTTGGGATGTTCTCCTGAAGAAATTACATGCATTATATGTTTTACTCGTCCCTTCGCTATGATT
 GGCCTATTGTTGGGATAACATCAATTGCCATTCTGCCACTGCAAAGCTTTGCTGATTGACTCCAAAATATTTTC
 ATGGAATTCCTAAAGGCCCTGTTGTCCGCGACTGATGAACAATTATGTAGGGACTGTAAATCAGGTGGCCGAT
 GTTGAATTTGACAAGGTTAACAAGCCCGACCTCCCACTAGCTTCCGGTGACTTATCAATGGGAACTGGACTCGCA
 ATCACTTTAACATTGTCTTTGACGAGCCTGGCTATCGCACTTAGCCTTCAATCTCCACCCTTATCTTTGGCCTC
 ATTGTATGGTTTCTACTTGGAACTGCTTATTCCGTCGACCTTCCCTTTCTTAGATGGAAGACAAAACCATTTCTA
 GCCGGAATGTGCATGGTTACTGTGTTCCGACTTGTATAACCAATTTTCTTTCTTACACTTCCAGAAATATGTG
 CTTGGTAGACCGGTCGTAATTACGAGACCATTGATATTTGCGGCCGCTATCATCAGTACCATTTCTGCTGTAATG
 TCACTCCTCAAGGATATACCCGACGAGGATGGCGATAAACAATTTGGCTTTCAGTCAATATCTTCCAAGTTAGGG
 AAAGAAAATGTACTTCCGCTTTGTGTTTATGCGCTGTTTTTGCATATGGAGTTTCTGTCATAGTTGGAGCTTCT
 TCGTCTTTCCAGTTAGTCAAGCTTGTGAGTATAATTGGCCACTCCACACTTGCTTTCTTATTGTGGCTTCGAGCT
 CAGACTGTGGATCTCTCAATAATGCATCTACATATTCTTTTTACATGTTTCATTTGGAAGTTGTTCTATGCTGAA
 TATCTCCTTATTCACTTCTTACGATGA

CSR PT1 18

>CSR PT1_18
 MLQMHLSSSFSFLKYHPLQKAGCIKTLESVTHIHGVLNRSQEKKYAIKCSQSNSFYNLTKIASSRNCKPFNSHR
 APVTLQDGYASKSEDDNSNSFLNVFLKKFHALYRFMRAYACAGVI IATTSNSLLPVQTLADLTPAYFTGLMEAL
 VPAVLMHIYVVAINQLSDVEVDKVNKPYLPLASGEISMGTGIAITLASALMSLAYAVMIRSPFFIWAIVIAWIFVG
 TAYSVQLPLLRWKGNSFLAAFCMVSLNGLLTQFPVYVHIRKYVLGRPLEIFTRPLMFATAFISCFVVIKDL
 HDVDAKKNWHKNPHVSLGRKKYFG*VVLGFIGRGCCKSLELFPFPENNL*DKRHGYVVPFVWQKRSFDSAAGKNE
 F*SSYGNKKGKTLSPMKRRRVCNRAR

>CSR PT1_18
 ATGCTTCAAATGCACTTGAGTTGAGCTTCTCTCTAAAATACCATCCTTTACAAAAGGCTGGTTGCATTTAAAACA
 CTCGAATCGCCAGTGACACATATACATGGCGTCTGAAACAGAAGTCAAGAAAAGAAGTACGCCATCAAGTGTCC
 CAAAGTAATTCATTTTTATAATTTGACCAATAAAATTTGCAAGCAGCAGAAACTGTAAACCATTCAACAGTCACCGG
 GCTCCTGTACGTTACAAGATGGTTATGCATCAAAATCTGAGGATGATGATAACTCCAACAGCTTTCTGAATGTT
 TTTCTCAAGAAATTTTCATGCACTATACCGTTTTATGCGTGCTTATGCTTGTGCCGGCTTATTATAGCAACAACA

TCGAATTCTCTTCTACCTGTACAAACACTCGCCGACTTGACTCCCGCATATTTTACTGGAATTAATGGAGGCTTTG
 GTGCCTGCAGTATTGATGCACATTTATGTCTGGCCATAAACCAGTTGTCTGATGTTGAAGTAGACAAGGTTAAC
 AAGCCTTATCTGCCACTTGCTTCCGGTGAAATTTCAATGGGTACTGGAATTGCAATTACTTTAGCATCTGCATTG
 ATGAGCCTGGCTTACGCAGTTATGATTTCGATCTCCACCGTTTATTTGGGCCGTCATTGCATGGATTTTTGTTGGA
 ACCGCCTACTCCGTCCAACCTCCCCTTCTCAGATGGAAGGGAAATTCATTTCTAGCTGCTTTCTGCATGGTGTCA
 CTAACGGACTTCTAACACAATTTCTGTCTACGTACACATCCGGAAATACGTGCTTGGTAGACCTCTAGAAATA
 TTTACAAGACCACTGATGTTTGAACACTGCTTTTCAATTTCTGCTTCTGCGTTGTGATTGCATTTATCAAGGATTTA
 CACGATGTGGATGCGAAAAAAATTTGGCATAAAAAACCCCTCATGTGAGCCTGGGAAGAAAGATTTTCGGCTAA
 GTGGTTCTAGGCTTCAATGGTAGGGGCTGCGGAAAAGTTTGGAGCTTTTTCTTTCCCGGAAAAACAACCTATA
 GATAAAAGGCACGGGTACGTGGTTCTTTTTGGGTTCAAAGCGAAGCTTTGATTCCGCGAAAGGCAAAAACCTTT
 TTTTAAAGTTTCAATGGAAATAAGAAAGGGAAAACCTTTCCCCTATGAAGAGAAGGAGGGTATGCAACCGAGCC
 AGA

CLR PT1 11

>CLR PT1_11

MILF*LIVTCSLQOX**AMLFYNANFVQKSRLRIRPSAYKWDKEVFSIV*LPNEHVERKY*CIIREINSSDSKPK
 NGSKYAVAYYRDKLVXPGKVKKLQLLPQRHKQX~XKHRNTKPKYSFFPKHDTEGFNAXIFYRHPHRVNP**MQSQ
 RKSXRNNESSCKHQWSCKYF*RSXXKHVFLDMYVDGKLC*KSV**HHAESS*KXNFP*SI*EGEVGQNXGSKNPC
 DDGPNKRWRSNHXLKPGSSMQMLK*LQFQYP*NFTGSKGQIS**TC*LNINTG*GPTKMCIKTTASKPA*NPVN
 SGTKIV*GVILNERHVGPYTYSTILLEVQS*VLYRNLLITIIKR*EVKLDLTVSNFRKQHDDER*KK*ALHVM**Q
 G*DHIHKQENSEITNLTIP**QI*TELPQSSDVPKCCLTMPMYK*KK*NCPR

>CLR PT1_11

ATGATTTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCCGTTGCAACAAATTTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACT
 TTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTCAGCGTACAAATGGGATAAGGAGGTATTCAGCATAGTATAAC
 TTCCAAATGAACATGTAGAAAGAAAGTATTGATGCATTATCAGAGAGATCAACAGCTCGGACTCGAAGCCAAAA
 ATGGAAGCAAGTATGCAGTGGCCTATTATCGTGATAAGCTTGTGTTGCCAGGAAAGGTGAAGAAGCTCCAACACT
 ACCGCAGCGCCATAAGCAATT~GAAAGCATAGAAACACTAAGCCGAAATACTCGTTCTTTCCCAAGCATGACAC
 TGAGGGTTTTAATGCCAAATTTTTATCGCCATCCACATCGTGTAATCCTTGATAAATGCAATCACAACGCAAA
 AGCAGGAAATGAAAGCAGTTGCAACATCAGTGGTCTTGTAATATTTCTAGAGGTCTTCCAAGCACGATTTCT
 GGATATGTACGTAGACGGAAATTTGTGTTAGAACTCCGTTAGTGACACCATGCAGAAAGCAGCTAGAAATGAAT
 TTCCCTTCCATCTGAGAAGGGGAAGTTGGACAGAATAAACGGTTCCAACAAAAATCCATGCGATGACGGCCAAA
 TAAACGGTGGAGATCGAATCATCACTGCGTAAACCAGGCTCATCAATGCAGATGCTAAAGTAATTGCAATTCAG
 TACCCATGAAATTTACCAGGAAGCAAGGGGCGAGATAAGCTAGTAAACATGTTAACTTAACATCAACACGGGTTAG
 GGACCGACAAAAATGTGCATAAAAAACGACTGCATCAAAAACAGCATAAAAAACCTGTGAATAGCGGAACCAAGATT
 GTCTAAGGTGTAATTTCTAAATGAACGCCACGTTGGACCTACATACTCGACAATACTACTAGAGGTACAATCGTGA
 GTATTATACAGGAACCTCCTTATAACAATTATTAACGATGAGAAGTAAAGCTAGATCTAACTGTATCAAATTTTC
 CGAAAGCAGCACGATGACGAAAGGTAAAAGAAATAAGCACTCCACGTCATGTAATGACAAGGATGAGATCATATA
 CACAAACAGGAAAATAGTGAGATCACTAACCTAACTATAACCCTAATAACAGATATAAACGGAACTACCTCAGTCG
 AGTGACGTTCCAAAATGTTGTTAACTCCGATGAATTATAAATAGAAAAAATAAAATTTGCCCTAGG

CSR PT2 15

>CSRPT2_15

MMLQMHSSSSFSFKYYPQLQHAGCVKTLQLPLTKVHGLNRSESKNYAIKCTQSDSFYSTNKIRNNENSSSRNCK
 PFNKYRVAVTLQOEGCASNNEDDINSTSFRDVLKLLHALYVFRPFAMIGTVVGITSIALPLQSFADLTPKYF
 MEFLKALLSAVLMNNYVRTVNVQVTDVEIEKVNKPVLPPLAYTDLSDMRDVLIIYLIL*LTRLARMTEAITTTTYLCP
 HVMGYLVAAYYFRSSPSSMKREKTPNWLQ*PSSF*MDIYFSFLTQTSRNMCLAYL*YPKTNGC*LPLSCP*IFKG
 GNCFPRIYRVGRRRTKNLPLENPPTPGGGKEKFF*WWGKSSVRIYVRCGGGGRRRDRSRGVP*ELLE*KRQRL
 QNRATCCGGGTEQKSERTEIIPPTKKRMFSTRENATAVR

>CSRPT2_15

ATGATGCTTCAAATGCATTTCGAGTTCAAGCTTCTCTCCAAAGTACTACTATCCTTTGCAACATGCTGGTTGCGTC
 AAAACACTTCAATTGCCGTTGACAAAAGTGCATGGCGGCTTGAACAGAAAGTGAAGCAAGAAATACGCTATCAAA
 TGCACACAAAGTGATTCGTTTTATTCGACCAATAAAATCAGAAAACAAATGAAAACCTCAAGCAGCAGAAAATGTAAA
 CCGTTCAACAAATACCGCGTTGCTGTACATTACAACAAGAGGTTGTGCATCAACAAATGAGGATGATATTAAC
 TCGACGAGCTTTCCGGGACGTTCTCCTGAAGAAATTACATGCATTATATGTTTTACTCGTCCCTTCGCTATGATT
 GGCAGTGTGTTGGGATAACATCAATTGCCATTCTGCCACTGCAAGCTTTGCTGATTTGACTCCAAAAATATTTTC
 ATGGAATTCCTTAAAGGCCCTGTTGTCCGCGAGTACTGATGAACAATTATGTACGGACTGTAAATCAGGTGACCGAT

GTTGAAATTGAAAAGGTTAACAAGCCTGTACTCCCAGCTTAGCTTACACTGACTTATCAATGAGAGATGTACTCTTG
 ATCTATTTAATATTGTGATTGACGAGGCTAGCTAGAATGACTGAAGCGATCACCACCACCCTTATCTGTGTCTT
 CATATGGTTGGATACTTGGTAGCCGCTTATTACTTTAGATCATCCCCTTCTTCGATGAAAAGGGAGAAGACCCCT
 AATTGGCTGCAGTAACCATCATCATTCTGAATGGACATCTACTTCAGTTTCCTTACTTTGCAGACTTCCAGAAAT
 ATGTGCTTGGCATACTGTAGTATCCCAAGACAAATGGTTGTTAGCTGCCGCTATCCTGCCCAATTTTCAAAGGT
 GGCAATTGCATTTTCCCAAGGATTTACCGGGTTGGACGACGCCGAACAAAAAATTTGCCCTCGAAAACCCCT
 ACTCCCGGGGGGGGAAAAGAAAAGAAGTTTTAATGGTGGGGAAAAAGCTCGGTTAGGATTTATGTGAGGTGCGGA
 GGAGGGGTTCGGGGAGGAGAGATTTCGCGGGCGTCCCCTGAGAATTATTGGAGGTATAGAAAAGGCAACGCTTG
 CAAAATCGGGCCACCTGTTGTGGGGGGGAACAGAACAAAAGAGTGAAAGAACCAGATACCACCACAAAAAG
 AGAATGTTTAGTACGAGAGAGAACGCCACAGCAGTGAGG

CLR PT2 3

>CLRPT2_3

MMLQMHSSSSFSFKYYYPLQHAGCDKTLQLPLTKVHGLNRSESKNYAIKCTQSDSFYSTNLIKNNENTSSRNCK
 PFNKYRVAVTLQQQGCASNNEDDINSTSFDVLLKKLHALYVTRPFAMIGTIVGITSIAILPLQSFADLTPKYF
 MEFLKALLSAVLMNNYVGTVNQVADVEIDKVNKPDLPASGDLMSGTGLAITLTLSTSLAIXT*PSISTTYLWP
 HCMVSTWNCLFRRPSLS*MEEKTISSRNHGYCVRTCIPIFFLHTLPEICAW*TGRNYETIDICGRYHQYHFCCN
 VTPQGYTRRGWR*TIWLSVISS*ERKCTSALVMRCFCCKGVSANWSSSSSINQLGSKLPLTLFLFMGFNPNGDLPN
 APHSFKVIGIVQVKPLFF*RKGIHPF*KV*X

>CLRPT2_3

ATGATGCTTCAAATGCATTTCGAGTTCAAGCTTCTCTCCAAAGTACTACTATCCTTTGCAACATGCTGGTTGCGAC
 AAAACACTTCAATTACCGTTGACAAAAGTGCATGGCGGCTTGAACAGAAAGTAAAAGCAAGAATTACGCTATCAAA
 TGCACACAAAGTGATTCGTTTTATTTCGACCAATAAAATCAAAAACAATGAAAACACAAGCAGCAGAAATTGTAAA
 CCGTTCAACAAATACCGCGTTGCTGTACATTACAACAACAAGGTTGTGCATCAAACAATGAGGATGATATTAAC
 TCGACGAGCTTTTGGGATGTTCTCCTGAAGAAATTACATGCATTATATGTTTTTACTCGTCCCTTCGCTATGATT
 GGCATATTGTTGGGATAACATCAATTGCCATTCTGCCACTGCAAAGCTTTGCTGATTTGACTCCAAAATATTTT
 ATGGAATTCCTAAAGGCCCTGTTGTCCGCGACTGATGAACAATTATGTAGGGACTGTAAATCAGGTGGCCGAT
 GTTGAATTTGACAAGGTTAACAAGCCCGACCTCCCAGCTTAGCTTCCGGTGACTTATCAATGGGAACCTGGACTCGCA
 ATCACTTTAACATTGTCTTTGACGAGCCTGGCTATCGCACTTAGCCTTCAATCTCCACCCTTATCTTTGGCCTC
 ATTGTATGGTTTTCTACTTGGAACTGCTTATTCCGTCGACCTTCCCTTTCTTAGATGGAAGAAAAACCATTCTA
 GCCGGAATGTGCATGGTTACTGTGTTCCGACTTGTATACCAATTTTCTTTCTTATACACTTCCAGAAATATGTG
 CTTGGTAGACCGGTCGTAATTACGAGACCATTGATATTTGCGGCCGCTATCATCAGTACCATTCTGCTGTAATG
 TCACTCCTCAAGGATATACCCGACGAGGATGGCGATAAACAATTTGGCTTTCAGTCATATCTCCAGTTAGGAAA
 GAAAATGTACTTCGGCTTTGGTTATGCGCTGTTTTTCAAAGGAGTTTCGGCAAATTGGAGCTCCTCGTCTTCCA
 TTAATCAACTTGGCAGTAAATTGCCACTCACCTTGCTTTTTATGGGCTTCAACCCAAATGGGGATCTCCAAATG
 CCCACATTCTTTTAAAGGTCATTGGAATTGTCCAGGTAAAACCCCTATTCTTTTAAAGAAAGGGAATTCACCCCT
 TTTGAAAAGTGTGA

Anexo III - Primers desenhados para os genes PT1 e PT2 para a caracterização molecular

| Primers Fw | Sequence | pb | Tm (°C) |
|-------------------|---------------------------------------|-----------|----------------|
| PT1 Fw | ATGCTTCAAATGCACTTGAGTTGAGCTTCTC | 32 | 61.8 |
| PT2 Fw | ATGATGCTTCAAATGCATTGAGTTCAAGCTTCTCTCC | 38 | 64.5 |

| Primers Rv | Sequence | pb | Tm (°C) |
|-------------------|------------------------------------------|-----------|----------------|
| PT1 Rv | TCAGCGTACAAATGGGATAAGGAGGTATTCAGC | 33 | 63.2 |
| PT2 Rv | TCATCGTAAGAAGTGAATAAGGAGATATTCAGCATAGAAC | 40 | 62.4 |

Anexo IV – Alinhamento para as sequências para PT1, isoladas das raízes de *C. limonia*, clonadas e extraídas de diferentes colônias de *E. coli*

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
20B7KAA192 TAG-TGACCTGTTCTGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGAATTCGCCCTTCA-CGTACAA
20B7KAA193 .....G.....
20B7KAA194 .....G.....

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
20B7KAA192 ATGGGATAAGGAGGTATTCAGCATAGTATAACTTCCAATGAACATGTAGAAAAGAAAGTATTGATGCATTATCAGAGAGATCAACAGCTCGGACTCGAAG
20B7KAA193 .....
20B7KAA194 .....

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
20B7KAA192 CCAAAAAATGGAAGCAAGTATGCAGTGGCTATTATCGTGATAAGCTTTGTTGCCAGGAAAGGTGAAGAAGCTCCAACACTACCAGCGGCCATAAGCA
20B7KAA193 .....
20B7KAA194 .....

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
20B7KAA192 ATTGAAAGCATAGAAACACTAAGCCGAAATACTCGTCTTTCCCAAGCATGACACTGAGGGTTTAAATGCCAAATTTTTTATCGCCATCCACATCGTGTA
20B7KAA193 .....
20B7KAA194 .....

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
20B7KAA192 AATCCTTGATAAATGCAATCACAAACGCAAAAGCAGGAAATGAAAGCAGTTGCCAAACATCAGTGGTCTTGTAAATATTTCTAGAGGTCCTCCAGCACGTA
20B7KAA193 .....
20B7KAA194 .....

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
20B7KAA192 TTTCTGGATATGTACGTAGACGGGAAATGTGTTAGAAGTCCGTTTGTAGTACACCATGCGAAGAGCAGCTAGAAATGAAATTTCCCTCCATCTGAGAAGG
20B7KAA193 .....
20B7KAA194 .....

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
20B7KAA192 GGAAGTTGGACGGAGTAAAGCGTTCCCAACAAAATCCATCGCATGACGGCCCAATAAACCGGTGGAGATCGAATCATCACTCGGTAAAGCCAGGCTCATCA
20B7KAA193 .....A.A.A.....
20B7KAA194 .....

      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
20B7KAA192 ATGCAGATGCTAAAGTAAATGCAATCCAGTACCCATTCGAAATTTACCAGGAAAGCAGATTAAGGCTTGTAACTTGTCTA-CTTCAACATCAG
20B7KAA193 .....-C.AG..A.A..TA..-C.T.....
20B7KAA194 .....T.....A...C.A..T.....

      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
20B7KAA192 ACAACTGGTTTATGGCCACGACATAAATGTG-CATCAATCTCGAGGCACC-AAAGCCTCCAATAATCCAGTGAATAATCGGGGAGTCAAGTCGGCGAGT
20B7KAA193 .....-C.G...G.A..A.....A.A..GA.T..T.A...C.AG.AT.A..C..T...T-A...A.CCA.GA.T.T.T.AG
20B7KAA194 .....G.....A...G.....A...T...C.....T...G.....C.....G.....

      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
20B7KAA192 GTTTGTACAGGTAGAAGA-GAATTCGATGTTGTTGCTATAATAACG-CCGGCACAAGCCATAAGCACGCATAAAACGGTATA-GTGCATGAAATTTCTTG
20B7KAA193 .....ATTCA..A.T...CG.C.C...GAC...C...TACT..A..AT.CTAC..GAGGTA..ATCGTGA...T-A.A..G...CC.C...A
20B7KAA194 .....G...A...C.A.G...T...A.G...G...C...-C...AC...A..G.T..G...A.G...G...G...A..

      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
20B7KAA192 AGAAA-AACTT~CAAAGCTGGTGGAG--TAAATCATCCT-C-AGATTTGG-GGCCAAACCATCTGGAAACGGGACGGG-CCGGGGACGGTGGATGGT
20B7KAA193 TA.C.ATTA..AAA.G.TGAGAA..AA..CTAG..C.A.CTG.ATC.A...CC--G...G..G.A.C..TGAC..AA.G--TAAAA..AATAA.CACTC
20B7KAA194 .....C..A.C~...AGC.T.T..ACT..CCT.....-C.A.....A..G...TGA...GAT..A..A..TC...A..A..AA.G

      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
20B7KAA192 TAA--GTTTCGGCGGCTGGAATTTTAT-GGTCAAATAAA--AAAGAATACTTTGGGACCATGAAGGG~AAC~TTTTCGGGCTTGGACGGAGCA
20B7KAA193 C.CGTCA.GTAAAT.A.AA.G..GAG..CATAT.C.C...-C.G...A.TAG..A..T..CT..CCTAACT.TACCC.AA.AA.A.AA...A.T
20B7KAA194 A..AA.G.AAA.G..T.A...G.AAC.A..A..GC..GG..G..A.A...GAA.AA.GA..GAG..T~GC.GA.CA.G..A.GT..G.G.

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270
20B7KAA192 AGGAAAGTGTAGCGGGATCCAAGGAGAAGAAGAGGCATTGAAAGGAGAATTTATGAGAATCCGACACGGGGTGA
20B7KAA193 ..CCTC...CG..T.AC.T...AAT.TGTTTA..CT..CGATG..TT.T..A.AGAA..A..A.ATT.CCC...
20B7KAA194 ..A...GA.AA.ATT.AAG.~TGGTCGG...TAAC...AC.C..A..TG.T...GG.GGC.T.A..A.

```

Anexo V - Mecanismo para a biossíntese de piranocumarinas via intermediário geranilado

