LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida

pISSN:1390-3799; eISSN:1390-8596

https://doi.org/10.17163/lgr.n41.2025.07

Artículo científico / Scientific paper

BIOTECNOLOGÍA



0

IDENTIFICACIÓN DE UN PÉPTIDO ANTIMICROBIANO DE CHAMAEMELUM NOBILE

IDENTIFICATION OF AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM CHAMAEMELUM NOBILE

Diana Daniela Portela Dussán¹[®], Sandra Mónica Estupiñan Torres²[®] y Silvio Alejandro Lopez-Pazos¹*[®]

¹Faculty of Sciences, Universidad Antonio Nariño, Carrera 3 Este 47A-15, Bogotá D.C., Colombia.
²Faculty of Health Sciences, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Calle 28 No. 5B-02 Bogotá D.C., Colombia.

*Autor para correspondencia: alejandrolopezpazos@uan.edu.co

Manuscrito recibido el 14 de julio de 2023. Aceptado, tras revisión, el 02 de abril de 2024. Publicado el 1 de marzo de 2025.

Resumen

Chamaemelum nobile, o manzanilla romana, es una planta que contiene propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. Los péptidos antimicrobianos (AMP) son parte del sistema de defensa de las plantas, que incluye a los péptidos de transferencia de lípidos (LPT). Nuestro objetivo es identificar una proteína relacionada con LTP de *C. nobile* (cnLTP). Se realizó la PCR sobre el ADN de *C. nobile* para la identificación del gen cnLTP; se utilizó bioinformática para su caracterización, y una prueba de sensibilidad contra *Rhizoctonia solani*. cnLTP tiene 99 aminoácidos, 9,8 kDa, punto isoeléctrico de 9,39, 33 residuos alifáticos, índice alifático de 85, hidropaticidad de 0,127, cuatro hélices alfa y cuatro puentes disulfuro. Se encontró que el fluido apoplásico de *C. nobile* (1 μ g/mL) inhibe el desarrollo de *R. solani*. Este estudio contribuye al conocimiento de un LTP novedoso y no caracterizado, utilizando enfoques *in silico* y experimentales.

Palabras clave: Manzanilla romana, péptido antimicrobiano, proteína de transferencia de lípidos, Rhizoctonia solani.

Abstract

Chamaemelum nobile, or Roman chamomile, is a plant containing anti-inflammatory and antimicrobial properties. Antimicrobial peptides (AMPs) are part of the plant defense system including lipid transfer peptides (LPTs). Our objective is to identify a LTP-related protein from *C. nobile* (cnLTP). PCR was performed on *C. nobile* DNA for identifying cnLTP gene. Bioinformatics was used for their characterization, and a sensitivity test was carried out on *Rhizoctonia solani*. cnLTP has 99 amino acids, 9.8 kDa, isoelectric point of 9.39, 33 aliphatic residues, aliphatic index of 85, hydropathicity

of 0.127, four alpha-helices and four disulfide bridges. An inhibitory activity of apoplastic fluid of *C. nobile* was determined at 1 μ g/mL on *R. solani*. This study contributes in the knowledge of a novel and non-characterized LTP using *in silico* and experimental related approaches.

Keywords: Roman chamomile, Antimicrobial peptide, Lipid transfer protein, Rhizoctonia solani.

Forma sugerida de citar:	Portela Dussán, D., Estupiñan Torres, S. y Lopez-Pazos, S. (2025). Identificación de un
-	péptido antimicrobiano de Chamaemelum nobile. La Granja: Revista de Ciencias de la
	Vida. Vol. 41(1):118-126. https://doi.org/10.17163/lgr.n41.2025.07.

IDs Orcid:

Diana Daniela Portela Dussán: https://orcid.org/0000-0003-2949-7033 Sandra Mónica Estupiñan Torres: https://orcid.org/0000-0002-6937-4567 Silvio Alejandro Lopez-Pazos: https://orcid.org/0000-0002-3682-4162

1 Introducción

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) se pueden detectar a nivel basal en los tejidos sanos de las plantas, pero aumentan su presencia ante el ataque de patógenos. La activación de las PR puede comenzar solo después de una fase de interacción de la planta-patógeno, a partir del reconocimiento de patrones moleculares asociados con microorganismos (PAMPs) por receptores de reconocimiento de estos patrones (PRR) presentes en la membrana celular de las plantas, o mediante el reconocimiento de elicitores como proteínas con dominios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NB-LRR). La concentración de PRs aumenta con la transducción de señales químicas como el ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico durante la primera etapa de activación de los mecanismos de defensa (Zhou and Zhang, 2020; Boyd et al., 2013). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son una parte de las PRs, tienen un peso molecular menor a 10 kDa y una actividad antimicrobiana in vitro. Los AMPs se producen por microorganismos, animales y plantas como mecanismo de defensa contra los patógenos (Bin Hafeez et al., 2021).

Los AMPs tienen menos de 200 aminoácidos, se expresan constitutivamente y se inducen en tejidos susceptibles como primordios foliares, estomas y epidermis. Por ejemplo, en Nicotiana megalosiphon se evidenció que tras la inoculación con Peronospora hyoscyami sp. tabacina expresó en hojas un gen de defensina, y en Brassica oleracea inoculada con Xanthomonas campestris pv. campestris se expresaron genes de AMPs en tallo y hojas; también se observó que el pimiento inoculado con X. campestris pv. vesicatoria provocó una alta transcripción en el gen CaAMP1, y su expresión generó tolerancia a Phytophthora sojae (Sharma et al., 2022; Niu et al., 2020; Jiang et al., 2011; Portieles et al., 2010). Se ha evidenciado que los AMPs catiónicos como las tioninas alfa/beta, defensinas y los péptidos de transferencia de lípidos (LTPs) interactúan con grupos aniónicos de la bicapa fosfolipídica en los microorganismos. También se forman micelas que permiten el flujo de iones hacia el espacio extracelular con descompensación osmótica, lisis celular y muerte (Kovaleva et al., 2020).

Los AMPs aniónicos, como los ciclotidos, interactúan con la membrana citoplasmática de los patógenos a través de fuerzas electrostáticas entre los residuos polares de un AMP y las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, mediante el reconocimiento de la columna vertebral quiral del glicerol. La fuerza electrostática de esta unión compleja está determinada por una interacción iónica entre el grupo amonio de la fosfatidiletanolamina y el grupo carboxilo de un glutamato conservado del bucle 1 del AMP (Venkatesan and Roy, 2023; Troeira Henriques and Craik, 2017). La permeabilización sufrida por la membrana citoplasmática en la interacción microorganismo/AMP no es del todo clara. Se han descrito cuatro posibles mecanismos: (i) hélices peptídicas que forman un haz en la membrana con un lumen central, (ii) los AMPs se acumulan en la superficie de la bicapa lipídica interactuando con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, cubriendo la membrana como una alfombra y causando la desorganización de la bicapa lipídica, (iii) los AMPs se insertan en la membrana, formando un poro e induciendo una flexión continua de la monocapa lipídica, lo que provoca que la superficie hidrófoba de la membrana se oriente hacia el exterior y la superficie hidrofílica hacia el interior, formando un canal acuoso con pérdida de polaridad, (iv) el AMP provoca un desplazamiento competitivo de Ca2+ y Mg2+ (Boparai and Sharma, 2020; Li et al., 2012).

La manzanilla romana Chamaemelum nobile (L.) es una hierba perenne aromática, con un tallo ramificado y alargado que alcanza una altura de entre 20 y 30 cm, que sostiene una cabeza floral formada por hojas blancas con lígulas segmentadas y folíolos bien definidos. Crece en zonas templadas, es adaptable y se utiliza en varios tipos de suelos ácidos con suficiente agua. C. nobile. Contiene entre un 0,24% y 1,9% de aceites volátiles y alrededor de 120 metabolitos secundarios, incluidos flavonoides (quercetina, luteolina, apigenina, patuletina), alfa-bisabolol y óxidos de bisabolol A y B, azulenos (camazuleno), monoterpenos (alfa-pineno), sesquiterpenos (farneseno), cumarinas (herniarina y umbeliferona). Su composición le otorga posibles propiedades terapéuticas reconocidas (antiinflamatorias, espasmolíticas, sedantes, antioxidantes, anticoagulantes, antihiperlipidémicas, repelentes y antimicrobianas).

La producción mundial de *C. nobile* supera las 1000 toneladas/año. Se utilizan 800 kg de tallo floral/ha para producir entre 0.8% y 1.5% de aceites esenciales. De igual forma, se pueden obtener com-

puestos fenólicos y alcanos de las semillas, frutos o raíces. Los aceites de *C. nobile* son efectivos *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (0,1 mg/mL), *Escherichia coli* (0,1 mg/mL), *Bacillus subtilis* (0,05 mg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (12,5 y 25 mg/mL), *P. tolaasii* (300 mg/mL), *Candida albicans* (0,1 mg/mL), y hongos como *Aspergillus candidus*, *Penicillium* sp., *Fusarium culmorum* y *A. niger* (900 mg/mL) (Ghaedi et al., 2015; Kazemian et al., 2015; Srivastava et al., 2010; Saderi et al., 2005).

El objetivo de esta investigación fue encontrar un AMP catiónico de *C. nobile* (denominado cnLTP) enfocado en identificar la secuencia de ADN de un LTP. Los parámetros a utilizar fueron las pruebas bioinformáticas y moleculares, y la evaluación sobre *Rhizoctonia solani*, que es un patógeno de la papa.

2 Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de C. nobile

Se utilizaron semillas comerciales de manzanilla romana en un medio de propagación (Mezcla de Sales y Vitaminas de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 20 mg/L de sacarosa, 0,1 mg/L de bencilaminopurina (BAP), 0,5 mg/L de ácido naftalenoacético (ANA), 0,25 mg/L de ácido giberélico (GA3)). Las semillas se mantuvieron en condiciones de temperatura constante (20 °C) y humedad (70%).

2.2 PCR para la detección del gen cnLTP

Para extraer el ADN, se sumergieron las hojas de *C. nobile* de plántulas *in vitro* en un tubo que contenía tampón de lisis (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS), solución de precipitación (isopropanol) y tampón TE 1X como diluyente (Edwards et al., 1991). Se realizó PCR utilizando 1X tampón PCR, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μ M de cada cebador y 0,2 U de Taq ADN polimerasa. Las condiciones del ciclo térmico fueron: una fase de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos consistentes en desnaturalización (95 °C por 1 min), alineamiento (50 °C por 1 min), extensión (72 °C por 1 min) y una extensión final (72 °C por 5 min).

Los productos de PCR se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y se secuenciaron (Macrogen, EE. UU.). Los cebadores directo e inverso para LTP fueron 5'-GACTGCTCAACGGTTCAGTAAAGTTGA-3' y 5'-TCAACTTTACTGAACCGTTGAGCAGTC-3', respectivamente (Rojas, 2010). Los datos de la secuencia obtenida se depositaron en GenBank (ID: MT294300).

2.3 Caracterización in silico de cnLTP

Se empleó la secuencia de nucleótidos de cnLTP para obtener su secuencia de aminoácidos, utilizando la herramienta "Translate"del servidor Expasy (http://web.expasy.org/translate/) (Artimo et al., 2012). Para prever el posible rol del AMP, se realizó un análisis comparativo usando BLASTp (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTp/) (Shah et al., 2018) para encontrar secuencias similares en bases de datos de proteínas. La anotación bioquímica de cnLTP se realizó usando ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/) (Artimo et al., 2012). El modelado por homología de cnLTP se llevó a cabo utilizando el servidor I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER /) (Zhang, 2009). El mejor resultado obtenido en la anotación de cnLTP fue para un LTP de Nicotiana tabacum, que se utilizó como plantilla (PDB ID: 1T12A; 73% de identidad, 91% de cobertura de consulta; valor E de 7e-43). Las figuras se realizaron con DeepView (https://spdbv.vital-it.ch/) (Johansson et al., 2012).

2.4 Prueba de susceptibilidad de *R. solani* utilizando fluido apoplástico de *C. nobile*

El fluido de lavado apoplástico (AWF) de *C. nobile* se extrajo de hojas (Butt et al., 2019; Gentzel et al., 2019). Primero, se lavaron las hojas maduras (~ 1 g) con agua destilada estéril para eliminar los exudados citoplasmáticos de las células dañadas, y luego se determinó el peso fresco. Los segmentos de hojas se infiltraron en un frasco que contenía 250 mL de agua destilada estéril a 4 °C y presión de vacío de 20 kPa, lo que permite que el aire escape y facilite el flujo de agua en el espacio intercelular, lavando las moléculas de AWF. Una vez completado el método de presión, el frasco se agitó lentamente hasta liberar aire y vacío para reducir la lisis celular y evitar la contaminación citoplasmática.

La presión de vacío se repitió hasta que las hojas quedaron completamente infiltradas, volviéndose de color oscuro. El AWF se recuperó de los segmentos de hojas secados con papel de laboratorio suave y envueltos en parafilm; luego, se centrifugaron a 4 °C, 10,000 rpm durante 10 min. Se utilizó el ensayo de Bradford para medir la concentración de proteínas (Bradford, 1976). La evaluación de la calidad de los péptidos de AWF se realizó mediante tricina-SDS-PAGE. Se completó la evaluación preliminar de la actividad biológica del AWF sobre *R*. solani utilizando 10 cm del micelio que se cultivó en medio PDA, y se añadieron carriles de AWF a cada lado, extendiéndose más allá de los extremos de la estructura fúngica existente en una base decreciente gradual, utilizando concentraciones de 0,1 μ g/mL a $1 \,\mu g/mL$.

Se utilizó una suspensión de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* como control positivo (control negativo: agua en lugar de AWF como muestra, datos no mostrados). El *R. solani* se incubó durante cinco días a 30 °C. Se midió el efecto de las proteínas del AWF en *R. solani* mediante el desplazamiento del micelio en la placa de Petri.

3 Resultados

Las semillas de manzanilla romana se cultivaron en un medio MS suplementado con hormonas de crecimiento con el objetivo de inducir la germinación y el crecimiento de plántulas adecuadas para la extracción de ADN genómico. La PCR identificó un producto de aproximadamente 300 pb, que pudo ser determinado mediante secuenciación. Esta secuencia se comparó con las entradas de nucleótidos registradas en la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (Shah et al., 2018). La secuencia de ADN (297 pb) mostró una estrecha relación con los LTPs de tomate (identidad 96%, valor E 4e-57, cobertura 96%, NCBI). Este conocimiento, a su vez, permitió deducir la secuencia del cnLTP (99 residuos) que codifica el ADN y que contiene únicamente secuencias de ADN codificante para el péptido maduro, sin señal peptídica ni sitio de poliadenilación. La secuencia de aminoácidos en el cnLTP y, por lo tanto, la función de la proteína, está determinada por ocho residuos de C que están enlazados en cuatro puentes disulfuro (Figura 1A).



Figura 1. Estructura de cnLTP. A. Alineación de dos LTPs de tomate con cnLTP, asociada con propiedades fisicoquímicas según Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2014): en rojo, aminoácidos pequeños e hidrofóbicos (junto con aromáticos -Y); en azul, ácidos; en magenta, básicos – H; en verde, hidroxilo, sulfhidrilo, amina y G; en gris, aminoácidos e iminoácidos inusuales. B. Modelo 3D de cnLTP, la flecha negra indica el terminal N, la flecha blanca señala el terminal C. Las hélices están indicadas y coloreadas en negro.

El peso molecular teórico del cnLTP es de 9,8 kDa y su punto isoeléctrico es de 9,39. Además, el péptido está compuesto por 33 residuos alifáticos (A, V, I y L), el índice alifático del cnLTP es 85, el cual determina el volumen ocupado por cadenas

laterales alifáticas, y contiene 12 residuos cargados positivamente debido a la conformación catiónica del cnLTP a pH neutro, y tres residuos cargados negativamente. La hidropatía es 0,127, lo que indica la presencia de una cavidad hidrofóbica donde también ocurre la interacción con lípidos. El cnLTP está formado por cuatro alfa-hélices. La primera hélice (P2-Q24) presenta una estructura H1A (P2-S5) formada por dos pliegues en His3 y Gly4, y H1B (P18-L23) formada por cuatro pliegues en Q11, G15, C19 y Y22. La segunda hélice H2 (C32-L39) contiene tres pliegues en R34, G35 y L39. La tercera hélice H3 (P46-A62) comprende siete pliegues en D48, K50, A52, T54, L56, K57, A59 y N61. La cuarta hélice H4 (L68-C78) encierra pliegues en G69, I74 y S76. Las cuatro alfa-hélices están conectadas por tres bucles cortos, L1 (G25-G31), L2 (L40-T45) y L3 (I63-N67) (Figura 1B). El cnLTP está estabilizado por cuatro puentes disulfuro formados entre C9-C33, C19-C55, C32-C78 y C53-C92, los cuales se calcularon mediante DISULFIND (http://disulfind.dsi.unifi.it/) (Ceroni et al., 2006). El cnLTP contiene 50 residuos hidrofóbicos: A, V, L, I, P, F y C, estando la mayoría en el interior del péptido, formando una cavidad hidrofóbica, lo que es característico de esta familia de AMPs (Li et al., 2012).

La evaluación biológica del fluido apoplástico de *C. nobile* se llevó a cabo teniendo en cuenta la concentración de proteínas (2,37 mg/mL), así como la presencia intrínseca de péptidos de bajo peso molecular, de aproximadamente 10 kDa, lo que indicaría que son LTPs (Figura 2A). Las pruebas de antagonismo indicaron un efecto inhibitorio sobre *R. solani* a una concentración de 1 μ g/mL (Figuras 2B-2C).



Figura 2. Bioensayo del AWF de *C. nobile* en *R. solani*. A. Tricina SDS-PAGE mostró una banda de 10 kDa relacionada con LTPs en el AWF de *C. nobile* (líneas 1 y 2, M es el marcador de peso molecular). B. Control positivo que contiene carriles con suspensión de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (flechas negras). C. Micelio de *R. solani* con carriles de AWF de *C. nobile* a cada lado, que se fueron extendiendo gradualmente en el medio; los cuadros muestran las áreas de inhibición.

4 Discusión

Los péptidos permiten que las bacterias evadan la defensa del huésped y se proliferen al impedir la señalización celular, la migración celular e incluso pueden matar directamente las células de respuesta. Los péptidos tienen mecanismos de daño complejos sobre las membranas celulares (ruptura), la síntesis de proteínas (inhibición), los segundos mensajeros (activación) o la respuesta de defensa (activación) (Yang and Yousef, 2018). Hasta ahora, se ha sugerido que una caracterización bioquímica específica enfocada en la actividad biológica específica o un diseño asistido por computadora son vías para el descubrimiento de nuevas opciones biotecnológicas (Rondon-Villarreal and Pinzon-Reyes, 2018).

En los LTPs, una secuencia señal es la responsable de dirigir el péptido hacia la membrana citoplasmática, donde es llevada en el extremo N por una aminopeptidasa, y el péptido maduro se exporta al espacio intercelular, donde ejerce su actividad biológica (Pagnussat et al., 2012). El cnLTP maduro tiene una sustitución conservada (T-S), además de dos sustituciones semiconservadas (E-S, N-S). Se ha informado que la conservación del sitio de fosforilación de S (que podría ser intercambiado por T o E fosforilables) sería uno de los residuos clave para el plegamiento de la proteína (Pearlman et al., 2011). La presencia de la cavidad hidrofóbica es esencial en la familia de los LTPs, ya que permite la unión y transferencia de lípidos, por ejemplo, un LTP de trigo que tenía una cavidad hidrofóbica capaz de atraer prostaglandina B2 y movilizarla entre fracciones microsomales y mitocondrias. La cavidad hidrofóbica de los LTP puede unirse a ácidos grasos saturados (12–19 átomos de carbono), ácidos grasos insaturados de diferentes longitudes de cadena (16–18 átomos de carbono) y geometría de insaturación, lisolípidos (14–16 átomos de carbono) y ácido jasmónico (Melnikova et al., 2016; Tassin-Moindrot et al., 2000).

Los LTPs se dividen en dos grupos según su peso molecular y conformación estructural: (i) tipo 1 (9-10 kDa), que están formados por cuatro alfahélices y se caracterizan por tener actividad inhibitoria sobre fitopatógenos; (ii) tipo 2 (7,0 kDa), que también están formados por cuatro alfa-hélices, pero no muestran actividad inhibitoria sobre los patógenos de las plantas (Finkina et al., 2016). El cnLTP pertenece al tipo 1 de los LTPs, en particular por su peso molecular (9.8 kDa) y sus cuatro alfa-hélices. Los LTPs tienen actividad biológica contra bacterias y hongos como Clavibacter michiganensis, P. solanacearum, P. syringae, Alternaria brassicola, Ascochyta pisi, Colletotrichum lindemuthianum, F. solani, F. graminearum, F. culmorum, F. oxysporum, Botrytis cinerea, Sclerotinia sclerotiorum, Verticillium dahliae (Finkina et al., 2016). Las pruebas de antagonismo indicaron un efecto inhibitorio del AWF de C. nobile sobre R. solani, por ejemplo, se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los aceites de C. nobile sobre Penicillium sp. y Aspergillus sp. (Sharifzadeh et al., 2016). La localización de un LTP en la pared celular y su externalización hacia el espacio intercelular por una secuencia señal sugiere su presencia en el fluido apoplástico, como se ha evidenciado en Arabidopsis thaliana, B. oleracea, Ricinus communis y Vigna unguiculata (Missaoui et al., 2022). Se aislaron dos LTPs (IWFI e IWFI2) del fluido de lavado intercelular de Beta vulgaris con actividad antifúngica sobre Cercospora beticola, demostrando su presencia en el AWF (Nielsen et al., 1996). I-TASSER puede indicarnos cómo el cnLTP interactúa con componentes celulares; por ejemplo, el cnLTP puede unirse químicamente al ácido palmítico, ya que este constituye el 30% de todos los fosfolípidos (Carta et al., 2017).

5 Conclusiones

Este proyecto exploró el problema de la identificación y caracterización de nuevos AMPs de *C. nobile*. Se encontraron características relevantes del cnLTP (por ejemplo, la cavidad hidrofóbica o los puentes disulfuro); de igual forma, se analizó su actividad sobre *R. solani*. Finalmente, las plantas medicinales como *C. nobile* pueden ser una fuente interesante de AMPs para ser utilizados en Biotecnología, ya que poseen claves para la síntesis mejorada de nuevas moléculas o moléculas optimizadas, creando condiciones para su adaptación.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Antonio Nariño (proyecto 2022207) y la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca (Acuerdo 081 de 2020).

Contribución de los autores

DDPD; Conceptualización, investigación, tratamiento de datos, visualización, escritura del borrador original. SMET; Administración del proyecto. SALP; Conceptualización, investigación, administración del proyecto, tratamiento de datos, visualización, escritura del borrador original, escriturarevisión y edición.

Referencias

- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., and Stockinger, H. (2012). Expasy: Sib bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, 40(W1):W597–W603. Online:https://n9. cl/6qsqz.
- Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P., and Zhu, Y. (2021). Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. *International journal of molecular sciences*, 22(21):11691. Online:https://n9.cl/7j3e1.

- Boparai, J. and Sharma, P. (2020). Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Protein and peptide letters*, 27(1):4–16. Online:https://n9.cl/7ca86.
- Boyd, L., Ridout, C., O'Sullivan, D., Leach, J., and Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in genetics*, 29(4):233–240. Online:https://n9.cl/ mzus9.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2):248–254. Online:https://n9.cl/dtt60.
- Butt, U., Naz, R., Nosheen, A., Yasmin, H., Keyani, R., Hussain, I., and Hassan, M. (2019). Changes in pathogenesis-related gene expression in response to bioformulations in the apoplast of maize leaves against fusarium oxysporum. *Journal of Plant Interactions*, 14(1):61–72. Online:https://n9. cl/47u486.
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., and Manca, C. (2017). Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in physiology*, 8:902. Online:https://n9.cl/u84aoj.
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., and Frasconi, P. (2006). Disulfind: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic acids research*, 34(Web Server issue. Online:https: //n9.cl/n0oc5):W177–W181.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic dna for pcr analysis. *Nucleic acids research*, 19(6):1349. Online:https:// bit.ly/3UFvZb8.
- Finkina, E., Melnikova, D., and Bogdanov, I. (2016). Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: structure, functions, and applications. *Acta Naturae*, 8(2):47–61. Online:https://n9.cl/6pyyvl.
- Gentzel, I., Giese, L., Zhao, W., Alonso, A., and Mackey, D. (2019). A simple method for measuring apoplast hydration and collecting apoplast contents. *Plant Physiology*, 179(4):1265–1272. Online:https://n9.cl/cd1nud.

- Ghaedi, M., Naghiha, R., Jannesar, R., and Mirtamizdoust, B. (2015). Antibacterial and antifungal activity of flower extracts of urtica dioica, chamaemelum nobile and salvia officinalis: Effects of *Zn*[*OH*]₂ nanoparticles and hp-2-minh on their property. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 32:353–359. Online:https://n9.cl/5rvne.
- Jiang, H., Song, W., Li, A., Yang, X., and Sun, D. (2011). Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to xanthomonas campestris pv. campestris. *Molecular biology reports*, 38:621–629. Online:https:// n9.cl/djhw6.
- Johansson, M., Zoete, V., Michielin, O., and Guex, N. (2012). Defining and searching for structural motifs using deepview/swiss-pdbviewer. *BMC bioinformatics*, 13:1–11. Online:https://n9. cl/gog0w7.
- Kazemian, H., Ghafourian, S., Heidari, H., Amiri, P., Yamchi, J., Shavalipour, A., Houri, H., Maleki, A., and Sadeghifard, N. (2015). Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of chamaemelum nobile against pseudomonas aeruginosa. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48:432–436. Online:https://n9. cl/w42wgt.
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O., and Nesmelova, I. (2020). Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15):5307. Online:https://n9.cl/rs0vj.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., and Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2):207–215. Online:https://n9.cl/lmj10.
- Melnikova, D., Mineev, K., Finkina, E., Arseniev, A., and Ovchinnikova, T. (2016). A novel lipid transfer protein from the dill anethum graveolens l.: isolation, structure, heterologous expression, and functional characteristics. *Journal of Peptide Science*, 22(1):59–66. Online:https://n9.cl/p1gau.
- Missaoui, K., Gonzalez-Klein, Z., Pazos-Castro, D., Hernandez-Ramirez, G., Garrido-Arandia, M., Brini, F., Diaz-Perales, A., and Tome-Amat, J. (2022). Plant non-specific lipid transfer proteins: An overview. *Plant Physiology and Biochemistry*, 171:115–127. Online:https://n9.cl/gyqyk.

- Nielsen, K., Nielsen, J., Madrid, S., and Mikkelsen, J. (1996). New antifungal proteins from sugar beet (beta vulgaris l.) showing homology to non-specific lipid transfer proteins. *Plant Molecular Biology*, 31:539–552. Online:https://n9.cl/ pvxezo.
- Niu, L., Zhong, X., Zhang, Y., Yang, J., Xing, G., Li, H., Liu, D., Ma, R., Dong, Y., and Yang, X. (2020). Enhanced tolerance to phytophthora root and stem rot by over-expression of the plant antimicrobial peptide caamp1 gene in soybean. *BMC genetics*, 21:1–10. Online:https://n9.cl/f9rr6r.
- Pagnussat, L., Burbach, C., Baluška, F., and de la Canal, L. (2012). An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. *Journal of experimental botany*, 63(18):6555–6563. Online:https://n9.cl/i93pf.
- Pearlman, S., Serber, Z., and Ferrell, J. (2011). A mechanism for the evolution of phosphorylation sites. *Cell*, 147(4):934–946. Online:https://n9.cl/ lh5n4.
- Portieles, R., Ayra, C., Gonzalez, E., Gallo, A., Rodriguez, R., Chacon, O., Lopez, Y., Rodriguez, M., Castillo, J., and Pujol, M. (2010). Nmdef02, a novel antimicrobial gene isolated from nicotiana megalosiphon confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant biotechnology journal*, 8(6):678–690. Online:https://n9.cl/f12lm.
- Rojas, A. (2010). Identificación de genes tipo péptido antimicrobiano provenientes de solanum lycopersicum var. cerasiforme. Master's thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Rondon-Villarreal, P. and Pinzon-Reyes, E. (2018). Computer aided design of non-toxic antibacterial peptides. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(13):1044–1052. Online:https://n9.cl/je9o7g.
- Saderi, H., Owlia, P., Hosseini, A., and Semiyari, H. (2005). Antimicrobial effects of chamomile extract and essential oil on clinically isolated porphyromonas gingivalis from periodontitis. In *III WOC-MAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, volume 6, pages 145–146. Acta horticulturae.
- Shah, N., Altschul, S., and Pop, M. (2018). Outlier detection in blast hits. *Algorithms for Molecular Biology*, 13:1–9. Online:https://n9.cl/cwep59.

- Sharifzadeh, A., Javan, A., Shokri, H., Abbaszadeh, S., and Keykhosravy, K. (2016). Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against foodborne fungal pathogens. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(1):e11–e17. Online:https://n9.cl/d8ldk.
- Sharma, P., Kaur, J., Sharma, G., and Kashyap, P. (2022). Plant derived antimicrobial peptides: Mechanism of target, isolation techniques, sources and pharmaceutical applications. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10):e14348. Online:https://n9.cl/n7751.
- Sievers, F. and Higgins, D. (2014). Clustal omega. *Current protocols in bioinformatics*, 48(1):3–13. Online:https://n9.cl/1eihb.
- Srivastava, J., Shankar, E., and Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future. *Molecular medicine reports*, 3(6):895– 901. Online:https://n9.cl/fqf5r.
- Tassin-Moindrot, S., Caille, A., Douliez, J., Marion, D., and Vovelle, F. (2000). The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein: solution structure of a complex with prostaglandin b2. *European Journal of Biochemistry*, 267(4):1117–1124. Online:https://n9.cl/nky5q.
- Troeira Henriques, S. and Craik, D. (2017). Cyclotide structure and function: The role of membrane binding and permeation. *Biochemistry*, 56(5):669– 682. Online:https://n9.cl/sx0eik.
- Venkatesan, J. and Roy, D. (2023). Cyclic cystine knot and its strong implication on the structure and dynamics of cyclotides. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,* 91(2):256–267. Online:https://n9.cl/qcmf6g.
- Yang, X. and Yousef, A. (2018). Antimicrobial peptides produced by brevibacillus spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World journal of microbiology and biotechnology*, 34:1–10. Online:https://n9.cl/bqf5o.
- Zhang, Y. (2009). I-tasser: Fully automated protein structure prediction in casp8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics,* 77(S9):100–113. Online:https://n9.cl/x092s.
- Zhou, J. and Zhang, Y. (2020). Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell*, 181(5):978–989. Online:https://n9.cl/98e2d.