

CAZYMES, PEPTIDASES E LIPASES SECRETADAS DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Pseudopezalotiaopsis gilvanii* (CPAA222): UMA ABORDAGEM GENÔMICA

CHAGAS¹ Steffany Souza; YAMAGISHI², Michel E. Belez; NETO², Adhemar Zerlotini; DA SILVA³, Gilvan Ferreira; CANIATO¹, Fernanda Fatima

¹Universidade Federal do Amazonas (UFAM); ²Embrapa Informática Agropecuária; ³Embrapa Amazônia Ocidental

E-mail: steffanychagas1209@gmail.com

Introdução: A cultura do guaraná é de importância econômica e social para o estado do Amazonas, sua produtividade na safra de 2019 foi de 218 Kg/ha, bem abaixo ainda da média nacional de 274 Kg/ha (1). Entre os fatores que limitam a produtividade do guaranazeiro no estado do Amazonas, destacamos as doenças fúngicas, que aqui encontraram condições favoráveis para o seu desenvolvimento como altas temperaturas e alta umidade (2). A mais nova ameaça ao cultivo do guaranazeiro tem como agente causal uma nova espécie de fungo fitopatogênico, *Pseudopezalotiaopsis gilvanii* que apresenta sintomas que podem ser confundidos com os da antracnose causada pelo *Colletotrichum guaranicola*, como lesões necróticas nas folhas de coloração marrom, que são bem visíveis dentro de um curto período após a inoculação e progride para completa necrose da folha resultando na sua queda (3). Diante da disponibilidade do sequenciamento completo do isolado CPAA22 do *Ps. gilvanii* estamos conduzindo análises genômicas visando identificar fatores com potencial envolvimento na sua patogênese, com especial atenção para as CAZymes, peptidases e lipases, devido ao conhecido envolvimento destas enzimas na patogênese de fitopatógenos (4,5,6). Neste aspecto, este trabalho teve como objetivo identificar candidatos a fatores de virulência/patogenicidade no secretoma de *Ps. gilvanii* com especial ênfase para as CAZymes, peptidases e lipases. **Material e métodos:** A predição do secretoma foi iniciada com a detecção de proteínas com peptídeo sinal na região N-terminal pelo SignalP5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) e Phobius (phobius.sbc.su.se/data.html), ausência de domínio transmembrana pelo Phobius e TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Uma vez preditas quanto a presença de peptídeo sinal e ausência de domínio transmembrana, as proteínas foram então escaneadas quanto a presença de motivo de retenção ao retículo endoplasmático usando o ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/>) e classificadas quanto probabilidade de serem ancoradas por GPI usando o PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>), sendo estas removidas do conjunto de proteínas preditas como secretadas. A anotação do secretoma predito para as proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos (CAZymes) foi conduzida no servidor da web dbCAN2 (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/>), selecionando as ferramentas HMMER, DIAMOND e Hotpep. Já a anotação das peptidases secretadas foi realizada no servidor da web MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>), adotando e-value mínimo de 1×10^{-5} . Finalmente, a anotação das lipases secretadas para as três superfamílias de lipases GX, GGGX e Y foi conduzida usando a “lipase engineering database” (<http://www.led.uni-stuttgart.de/>), adotando e-value mínimo de 1×10^{-5} . **SISGEN** N° AB6B14F. **Resultados e discussão:** O secretoma predito do *Ps. gilvanii* resultou em um total de 1217 proteínas, das quais 314 foram anotadas pela CAZy database. A classe predominante de CAZymes foi a glicosil hidrolases (GH=176), seguida por enzimas ativas auxiliares (AA=76), carboidratos esterases (CE=32), polissacarídeos liases (PL=28), módulo de ligação a carboidratos (CBM=24) e glicosil transferase (GT=2). As GH além de mais frequentes foram também as mais diversas com 52 famílias. A abundância de enzimas de degradação de parede celular, como as GHs sugerem que as CAZymes podem ter um importante papel na interação do *Ps. gilvanii* com o guaranazeiro. *Ps. gilvanii* possui em seu genoma 122 peptidases secretadas, incluindo serino (S=78), metalo (M=22), aspartico (A=13), glutâmico (G=6) e treonino (T=3) peptidases. Entre as serino peptidases oito foram anotadas como membros da família das subtilases (S08A). Subtilases codificadas pelos genes (Bcser1 e Bcser2) foram descritas com envolvimento na formação esclerótica, conidiação e virulência em *Botrytis cinerea* (7). Enquanto que as sete cópias da serino peptidase da família S53, apresentaram identidade com as sequências do gene FGSG_10343 que não apresentou relacionamento com a virulência em *Fusarium graminearum* (8). *Ps. gilvanii* possui também 106 lipases secretadas distribuídas entre as três superfamílias GX = 57, GGGX = 44 e Y = 5. Entre as GX destacamos a lipase tipo 3 (PF01764), cujas sequências apresentaram identidade com sequência da lipase codificada pelo gene FGL1, requerido para a virulência em *F. graminearum* (9) e com o efector AGLIP1 de *Rhizoctonia solani* (10) e 13 cutinases (PF01083) que apresentaram identidade com sequências do gene MfCUT1, que contribui para a virulência em *Monilinia fructicola* (11), com o gene Pbc1 que afeta a patogenicidade de *Pyrenopeziza brassicae* (12) e com o gene cutA que não afetou a patogenicidade de *Fusarium solani* (13).

Apoio: FAPEAM, CNPq, CAPES, EMBRAPA e UFAM

Referências: 1. IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola em municípios brasileiros. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em 15 de março de 2021. 2. Fisch, G. Climatic aspects of the amazonian tropical forest. Acta Amazonica, v. 20, p. 39–48, 1990. 3. Gualberto, G. F. et al. Pseudopezalotiaopsis gilvanii sp. nov. and Neopestalotiopsis formicarum leaves spot pathogens from guarana plant: a new threat to global tropical hosts. Phytotaxa, v. 489, n. 2, p. 1–39, 2021. 4. Blümke, A. et al. Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. Plant Physiology, v. 165, n. 1, p. 346–358, 2014. 5. Ma, H. et al. Cell-Wall-Degrading Enzymes Required for Virulence in the Host Selective ToxinProducing Necrotroph Alternaria alternata of Citrus. Frontiers in Microbiology, v. 10, n. November, p. 1–15, 2019. 6. Villamiel, J. C. M. et al. A fungal substrate mimicking molecule suppresses plant immunity via an inter-kingdom conserved motif. Nature Communications, v. 10, n. 1, 2019. 7. Liu, X. et al. The subtilisin-like protease Bcser2 affects the sclerotial formation, conidiation and virulence of Botrytis cinerea. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 2, 2020. 8. Xu, L. et al. System-wide characterization of subtilases reveals that subtilisin-like protease FgPrb1 of Fusarium graminearum regulates fungal development and virulence. Fungal Genetics and Biology, v. 144, n. August, p. 103449, 2020. 9. Voigt, C. A. et al. A secreted lipase of Fusarium graminearum is a virulence factor required for infection of cereals. Plant Journal, v. 42, n. 3, p. 364–375, 2005. 10. Li, S. et al. The effector AGLIP1 in Rhizoctonia solani AG1 IA triggers cell death in plants and promotes disease development through inhibiting PAMP-triggered immunity in Arabidopsis thaliana. Frontiers in Microbiology, v. 10, p. 1–12, 2019. 11. Lee, M. H. et al. Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, MfCUT1, increases virulence of the brown rot pathogen Monilinia fructicola on Prunus spp. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 23, n. 2, p. 176–186, 2010. 12. Li, D. et al. Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of Pyrenopeziza brassicae on oilseed rape. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 16, n. 6, p. 545–552, 2003. 13. Crowhurst, R. N. et al. Effect of disruption of a cutinase gene (cutA) on virulence and tissue specificity of Fusarium solani sp. cucurbitae race 2 toward Cucurbita maxima and C. moschata. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 10, n. 3, p. 355–368, 1997

