BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

Estudios *in silico* de promotores de crecimiento vegetal esteroidales vs proteínas asociadas a la proliferación de fitopatógenos

Tesis para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Emiliano Marín Merino

Director de tesis:

Dr. Alan Carrasco Carballo

Codirector de tesis:

Dr. Jesús Sandoval Ramírez

Mayo 2024

BIOTECNOLOGÍA

LESQO
Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica

DEDICATORIA

A mi madre, por ser mi pilar más grande en la vida y la razón por la que continúo tratando de mejorar todos los días.

A mi hermana, por ser una fuente inagotable de inspiración y por hacer mi vida un poco más feliz y resplandeciente con su compañía.

A mis tías Laura y Cecilia, con mucho cariño y amor como el que he recibido de ustedes incluso antes de llegar a este mundo. Crecer a su lado es una de las cosas más bellas que me han sucedido.

A mí mismo.

Agradecimientos

Me gustaría extender un sentido y sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante esta trayectoria de mis estudios universitarios. Profesores, compañeros y amigos que hicieron mis días felices unos poco más dulces y mis penas un poco más llevaderas. Espero que sigan inspirando y motivando a más personas como lo hicieron conmigo.

Quiero agradecer especialmente al doctor Alan Carrasco Carballo por su infinita paciencia y por no darse por vencido conmigo y mi caótica vida. A la licenciada Mónica Delfín por su gran apoyo durante las primeras etapas de este proyecto y a su incesante labor preparándome para defender el presente trabajo. A la profesora Brenda Gaytán por siempre animarme y tener la disposición de escucharme cuando no muchos querían hacerlo.

Índice

Índice 4

Índice de figuras 5

Índice de tablas 6

RESUMEN 7

INTRODUCCIÓN 8

OBJETIVOS 12

Objetivo general 12

Objetivos particulares 12

Metodología 13

Preparación de la proteína y el ligando 13

Protocolo de docking 13

DISCUSIÓN DE RESULTADOS 14

Quitinasa B. 16

1,3-β-glucanasa 20

ECP6 y AVR4 23

CONCLUSIONES 28

BIBLIOGRAFÍA 29

Índice de figuras

Figura 1. Derivados esteroidales que proporcionan efectos promotores de crecimiento vegetal. 9
Figura 2 SPGP's evaluados *in silico* para las diferentes dianas antifúngicas. 15
Figura 3. Docking score (kcal/mol) de estructuras SPGP en enzimas quitinasa B y 1,3-β-glucanasa y efectores AVR4 y ECP6. 16
Figura 4 Modo de unión con la enzima quitinasa B. (a) Fragmento de quitina, (b) FO0, (c) SPGP8, (d) SPGP15, (e) SPGP1, (f) SPGP14. 17
Figura 5. Interacción 1,3-β-glucanasa: (a) 1,3-β-glucano, (b) apegin, (c) SPGP15, (d) SPGP7. 21
Figura 6. Figura 6. Modo de enlace para (a) fragmento de quitina frente a ECP6, (b) SPGP6 frente a ECP6, (c) SPGP1 frente a ECP6, (d) fragmento de quitina frente a AVR4, (e) SPGP1 frente a AVR4, (f) SPGP6 frente a AVR4. 25

Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas asociadas con la proliferación de hongos fitopatógenos..... 10
Tabla 2. Interacción de residuos aminoacídicos con estructuras de SPGP's en el sitio catalítico de la quitinasa B..... 18
Tabla 3. Residuos de aminoácidos que interactúan con SPGP en el sitio catalítico de 1,3-β-glucanasa..... 21
Tabla 4. Residuos aminoacídicos que interactúan con SPGP en el sitio catalítico de AVR4. 25

RESUMEN

Los promotores del crecimiento vegetal esteroidales (SPGP, por sus siglas en inglés) han sido continuamente estudiados debido a su alta actividad en el aumento de biomasa y la resistencia a diversos factores de estrés. En nuestras manos, una nueva familia de SPGP de compuestos 22-oxocolestánicos se destaca a un nivel comparativo con los brassinoesteroides (BSs). La actividad potencial de los nuevos SPGP contra fitopatógenos se estudió mediante acoplamiento molecular *in silico*; estos ensayos se realizaron con enzimas relevantes de fitopatógenos, como la Quitinasa B y la 1,3-β-Glucanasa. Se propusieron nueve inhibidores de Quitinasa B y dos inhibidores de 1,3-β-Glucanasa. El estudio realizado analizó el nivel interaccional y espacial, determinando la presencia de interacciones con aminoácidos clave en los receptores en comparación con los inhibidores de referencia. Además, también se examinaron los efectores AVR4 y ECP6. No se encontró ningún compuesto que bloquee ECP6, probablemente debido a la influencia de su entorno altamente hidrofílico. En el caso de AVR4, dos SPGP mostraron una mejor puntuación de acoplamiento (DS) que un fragmento de quitina (ligando endógeno); este hecho demuestra el potencial latente de los derivados 22-oxocolestánicos contra fitopatógenos, con una regulación específica mediante la inhibición de la proliferación. Además, este SPGP no afecta a los hongos simbióticos que son beneficiosos para el sistema natural de la planta.

INTRODUCCIÓN

Los promotores de crecimiento vegetal son compuestos comúnmente llamados 'fitohormonas', los cuales desempeñan roles importantes como la regulación de incremento de biomasa, floración, resistencia a condiciones de estrés, entre otros. Un grupo de gran actividad como promotores de crecimiento vegetal son los brasinoesteroides; por ejemplo, la brasinólida (1) ha demostrado poseer un enorme efecto promotor, mayor al de otros grupos de fitohormonas. Esto ha despertado gran interés en la síntesis de diferentes sustancias análogas a los brasinoesteroides; sin embargo, en la mayoría de los casos se reportan bajos rendimientos (1–8). Compuestos de la novedosa familia de los derivados 22-oxocolestánicos (SPGP1, SPGP3, SPGP5), se han posicionado como una alternativa como promotores de crecimiento vegetal (SPGP) debido a que presentan una actividad equiparable e incluso mayor que la de los brasinoesteroides; además de que pueden ser generados por medio de reacciones con rendimientos más altos. Algunos derivados 22-oxocolestánicos han sido probados exitosamente en arroz, frijoles rojos y maíz (9–11). Aunque estos compuestos han demostrado un efecto excepcional como promotores de crecimiento en análisis in vitro y de invernadero, para estudios de campo y futuras aplicaciones es necesario predecir efectos sinérgicos en fitopatógenos beneficiosos/no beneficiosos y estudiar su efecto en el sistema de defensa intrínseco de organismos modelo.

Los organismos vegetales han desarrollado numerosos mecanismos para reconocer infecciones microbianas y responder eficazmente mediante la activación de respuestas de defensa (12). Por lo tanto, el conocimiento de la relación entre las plantas y los patógenos infecciosos es crucial para su control (13). Se ha descubierto que la relación que tiene lugar entre plantas y patógenos es llevada a cabo por medio de proteínas especiales las cuales tienen en ambas células y en el fenotipo de los patógenos (14) (Tabla 1). Afortunadamente, todas las células vegetales poseen un sofisticado sistema de vigilancia que puede registrar y distinguir muchas señales de diferentes orígenes, lo que ayuda a inducir una respuesta de defensa más eficiente y efectiva en el sitio de la infección (15).

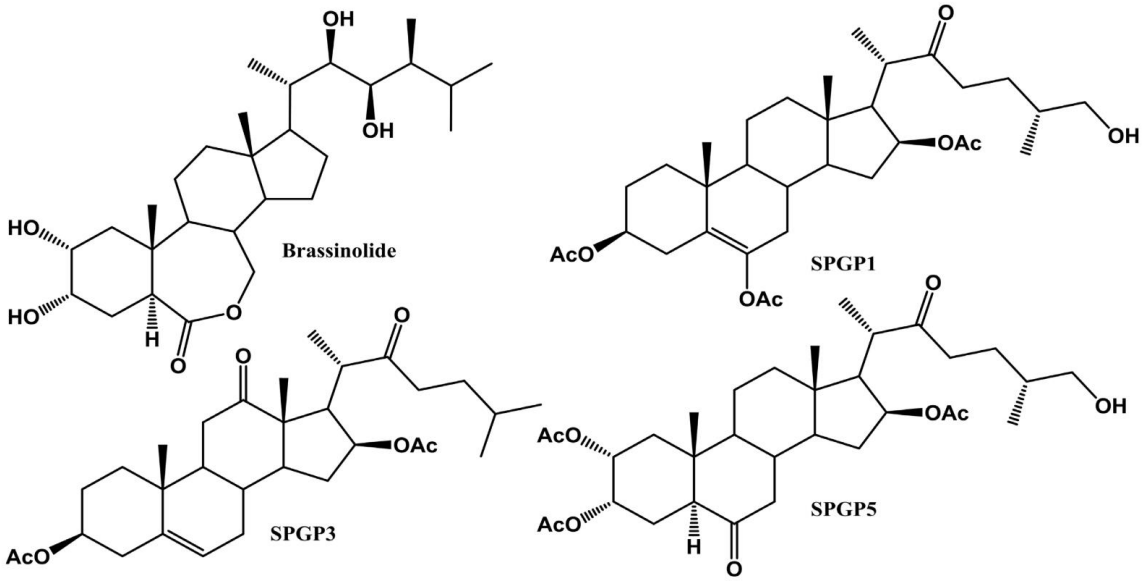

Figura 1. Derivados esteroidales que proporcionan efectos promotores de crecimiento vegetal.

Existe una clase especial de proteína de baja masa molecular, composición química diversa y diferente carácter hidrofílico que está directamente relacionado con la actividad de los hongos patógenos; estas son conocidas como proteínas relacionadas a patogenicidad (PR – por las siglas en inglés correspondientes a *Pathogenesis - Related*), tales como quitinasas y 1,3-β-glucanasas (16). Otro tipo especial de proteínas que actúan como mecanismo de defensa se denominan efectores, tales como AVR4 y EPC6 (17). Cuando estas moléculas son reconocidas por la planta ocurre una interacción desfavorable entre la planta y los patógenos, por lo tanto, la función de los efectores no se ha dilucidado por completo aún (18).

En el presente trabajo, 15 moléculas de derivados 22-oxocolestánicos identificadas como promotores esteroidales de crecimiento vegetal (SPGP, por sus siglas en inglés) (9,10) (Figura 2), fueron estudiadas *in silico* en su efecto sobre las dos enzimas principales en la proliferación de hongos fitopatógenos de distintos géneros. Además, se estudió la influencia sobre dos efectores de infección en sistemas vegetales (AVR4 y ECP6), para probar el potencial de los SPGP frente a plagas fúngicas.

Tabla 1. proteínas asociadas con la proliferación de hongos fitopatógenos

Enzima / Proteína	Función	Compuesto de referencia	Huésped	Ref.
Quitinasa B	Hidrolizar la quitina polimérica de estructurada por N-acetilglucosamina. Junto con la 1, 3 - β - glucanasas juegan indirectamente un rol defensivo: los oligosacáridos de 1,3-β-/1,6-glucano son destruidos en las paredes celulares de los patógenos. Se produce la inhibición del crecimiento de los hongos y se induce una amplia gama de respuestas defensivas en las plantas.	Quitina (S) F0O (I)	*Alternaria brassicicola* *Sclerotinia sclerotiorum* *Rhizoctonia solani*	(19–21)
1, 3 - β - glucanasa	Para realizar su función protectora llevan a cabo una hidrólisis del enlace 1,3-β-/1,6-glucano presente en las paredes celulares de los patógenos.	1,3-β-/1,6-glucano (S) Apegina (S)	*Fusarium moniliforme* *F. verticillioides* *Aspergillus Flavus* *Alternaria solani* *Colletotrichum fragariae* *C. acutatum*	(22–25)
ECP6	Desempeña un reconocimiento de secuencias específicas. Codifica tres dominios de lisina que interrumpen la inmunidad desencadenada por quitina.	Quitina (L)	*Cladosporium fulvum*	(18)
AVR4	Es una lectina de unión a quitina que protege la pared fúngica de las quitinasas de las plantas proveyendo un rol defensivo durante la infección. Inhibe la Cys- proteasa Rcr3 secretada por	Quitina (L)	*Cladosporium fulvum*	(26)

	plantas de tomate y se une a la quitinasas a las paredes celulares del hongo.			

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el potencial *in silico* de promotores de crecimiento vegetal esteroidales contra proteínas asociadas al desarrollo de fitopatógenos.

Objetivos particulares

- Analizar energéticamente los derivados 22-oxocolestanos contra la Quitinasa B, 1, 3 - β – glucanasa, ECP6 y AVR4
- Analizar interaccionalmente los sitios de unión de los derivados 22-oxocolestanos contra la Quitinasa B, 1, 3 - β – glucanasa, ECP6 y AVR4
- Diseñar el efecto biológico de los derivados 22-oxocolestanicos como antagonistas del desarrollo de fitopatógenos.

Metodología

Preparación de la proteína y el ligando.

Las estructuras de las enzimas usadas fueron obtenidas de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) con los códigos 7CB1 (quitinasa B), 3N9K (1,3-β-glucanasa), 6BN0 (AVR4) y 4B8V (ECP6) (27–30). Estas fueron procesadas con ayuda de la herramienta *Protein Preparation Assistant* (31,32) usando el programa Schrödinger Suite. La integridad estructural de las proteínas fue revisada y ajustada; *las recurrencias faltantes* y segmentos de tipo bucle cerca del sitio activo fueron añadidos por Prime. Se añadieron los átomos de hidrogeno de cada proteína para devolverlas a su estado inicial. La protonación y los estados de tautomería del aspartato, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina fueron ajustados a un pH de 7.4. Las moléculas de agua dentro de un radio de 5 Å al sitio activo fueron removidas. La orientación de los puentes de hidrógeno fue ajustada alrededor del sitio activo usando PROPKA a un pH de 7.4. Finalmente, el complejo ligando-proteína fue minimizado empleando el campo de fuerza OPLS4 (33), con una convergencia para átomos pesados con una distancia media cuadrática mínima (RMSD, por sus siglas en inglés) de 0.3 Å.

Los ligandos de referencia (sustratos, inhibidores, ligandos endógenos) se obtuvieron a partir de imágenes cristalográficas. Los derivados 22-oxocolestánicos esteroidales fueron diseñados de acuerdo con el programa *2D Sketcher* del programa *Master* en *Schrödinger Suite* y luego fueron convertidos a su isómero conformacional en 3D más estable. Para llevar a cabo el *docking* molecular, se prepararon los ligandos usando la herramienta *LigPrep* (34) también encontrada en *Schrödinger Suite*. Después de que las estructuras en 3D fueron generadas, el método *OPLS4 force field* y las cargas de la proteína fueron preparados para todos los estados de la misma. Todos los posibles centros de protonación y estados de ionización se calcularon para la estructura utilizando un ionizador a un valor de pH de 7,4. Los estereoisómeros se conservaron de acuerdo con sus estructuras originales limitadas a 32 isómeros para cada ligando. Se designaron estados tautoméricos para cada grupo y se seleccionaron los confórmeros con la mejor energía para cada ligando.

Protocolo de docking

El acoplamiento molecular entre sitios catalíticos y sustratos se realizó utilizando el módulo *Glide* (35,36) del software *Maestro* en su versión 12.2 y la *Grid* de receptores para cada

objetivo se preparó utilizando OPLS4. Cada red se construyó basándose en inhibidores o ligandos de referencia co-cristalizados. Para la preparación de las partes no polares de las estructuras de los receptores se realizó el ajuste de los radios de van der Waals por un factor de 0,8. Los átomos se consideraron como no polares únicamente si se determinaba que su carga atómica parcial absoluta era <0,25. Respecto a la flexibilidad, se permitieron rotaciones adicionales de ligando para los grupos hidroxilo en residuos de Ser, Thr y Tyr, y el grupo tiol en los residuos de Cys. Además, se mantuvo la posición de unión más baja para cada ligando. La combinación de las puntuaciones de acoplamiento se obtuvo a través de tres modos de detección virtual de alto rendimiento (HTVS), precisión estándar (SP) y precisión adicional (XP). Antes de analizar las moléculas SPGP, se realizó el acoplamiento con moléculas de referencia para cada una de las respectivas proteínas diana, esto con el objetivo de validar el protocolo de acoplamiento. Se limitó el error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés) a un punto de corte < 2,0 Å en todas las proteínas en el proceso de validación.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los bioactivos tipo SPGP, SPGP 1 – 15 (compuestos 22 - oxocolestánicos) sintetizados a través de una apertura de acetólisis del marco espirocetal de los esteroides espirostanicos han sido reportados previamente por nuestro grupo de investigación (9,11). Se realizaron varias modificaciones en los anillos A, B y C y en carbono de la posición 26 (Figura 2): en C-3 se puede encontrar un grupo acetiloxi, o lo que es lo mismo, un grupo cetona a, β - insaturada. En el anillo B, está presente un doble enlace en C-5 o un grupo cetona en C-6. En el anillo C se estudió la presencia de un grupo carbonilo en C-12. El anillo D se derivatizó mediante la introducción de un grupo acetiloxi o cetona en C-16. La cadena lateral de 22-oxocolestano se modificó introduciendo grupos oxigenados en C-26 o introduciendo un transdiol en C-22 y C-23; una función similar presente en los brasinoesteroides naturales (37).

Se estudiaron dos enzimas asociadas a la proliferación fúngica: la quitinasa B, que es la responsable de la regulación de los niveles de quitina en el hongo, y la 1,3-β-glucanasa (38). Ambas enzimas están asociadas con la hidrólisis de 1,3- y 1,6-β-glucano. Para el caso de la quitinasa B, el fragmento de quitina tiene mejor energía de acoplamiento que la mayoría de los promotores de crecimiento vegetal: SPGP13, SPGP7 y SPGP1 tienen mejor energía que el inhibidor de referencia evaluado (FO0), mientras que SPGP12 presenta el mismo nivel.

Por otro lado, para el caso de la glucanasa el compuesto SPGP15 tiene una mayor afinidad por la enzima que una molécula de 1,3-glucano y el inhibidor de referencia apegin mientras que SPGP7 tiene la misma energía que el sustrato.

Los efectores AVR4 y ECP6 son los encargados de la regulación y protección intramolecular de la quitina, por lo que la inhibición del sitio activo es fundamental para detener la proliferación fúngica. Para AVR4, los compuestos SPGP1 y SPGP6 tienen una mejor energía de acoplamiento que el fragmento de quitina, mientras que en el caso de ECP6, ningún derivado esteroideo tiene el potencial de unirse al sitio activo de esta proteína. Este estudio es a nivel de energía, que en los casos de la enzima se ha establecido previamente una relación directa entre la energía de acoplamiento y la constante de inhibición de la enzima(39), pero también deben estudiarse de acuerdo con la interacción de los residuos aminoacídicos.

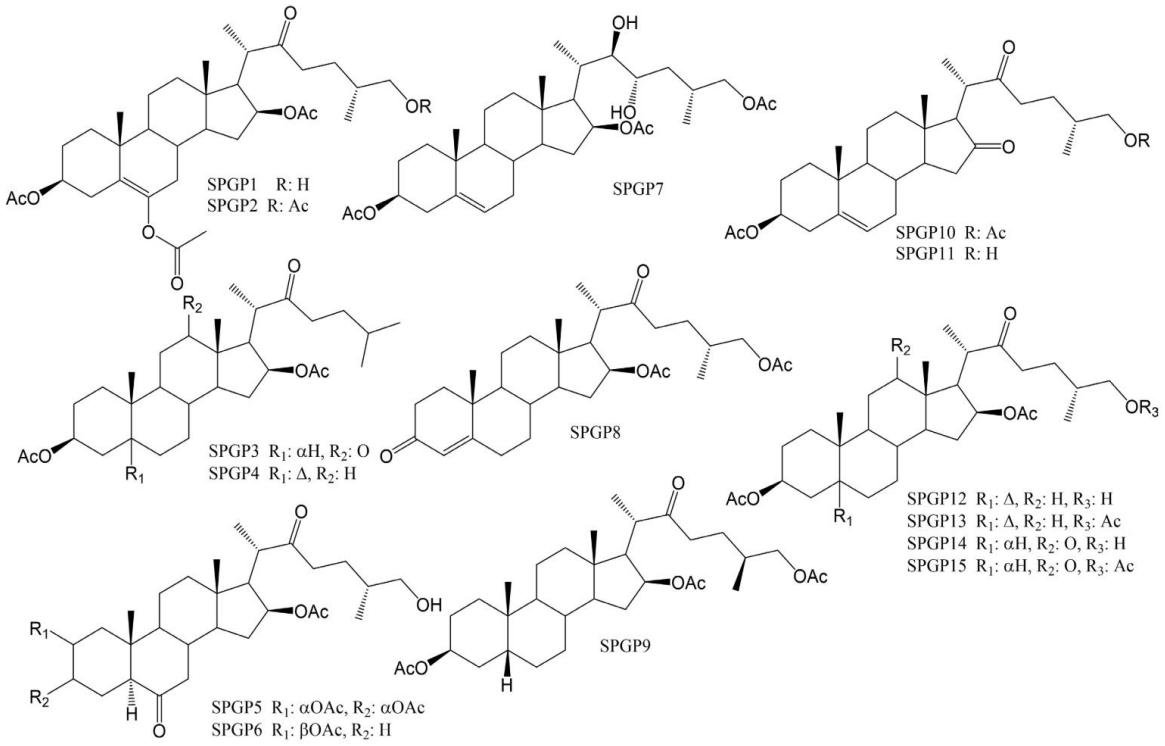

Figura 2 SPGP's evaluados *in silico* para las diferentes dianas antifúngicas.

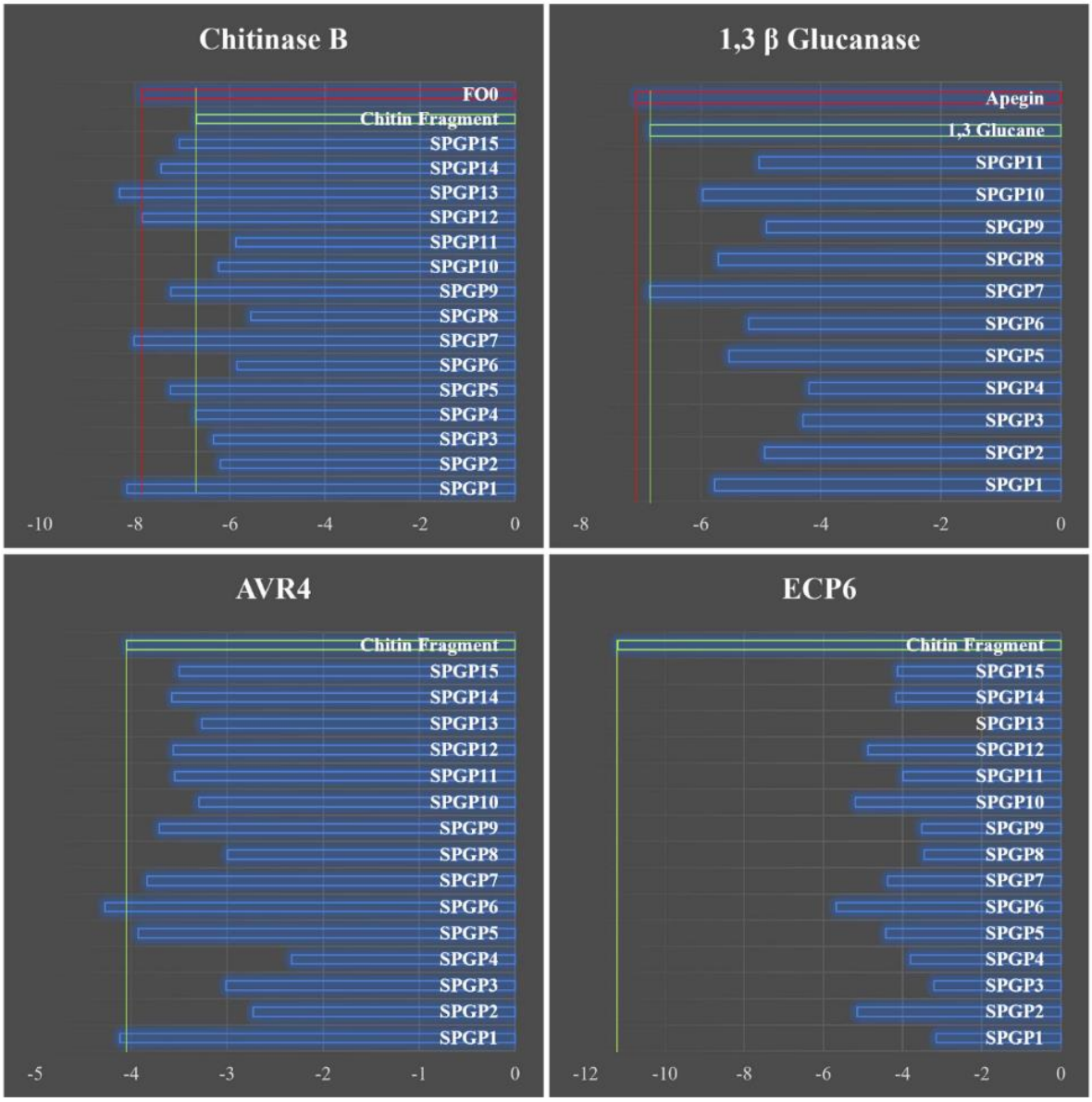

Figura 3. Docking score (kcal/mol) de estructuras SPGP en enzimas quitinasa B y 1,3-β-glucanasa y efectores AVR4 y ECP6.

Quitinasa B.

La quitinasa B es una enzima quitinolítica responsable de la regulación de los niveles de quitina en el hongo invasor. La quitina es un componente esencial para la proliferación de hongos. En el presente trabajo, el primer objetivo es evaluar el puntaje de acoplamiento (abreviado como 'DS' del inglés *dockin score*) entre moléculas SPGP y quitina, en comparación con el inhibidor de referencia, para delimitar su potencial. Se encontró que tanto quitina como moléculas SPGP pueden colocarse en el sitio catalítico de la enzima; este hecho

valida el acoplamiento y el potencial inhibidor de los derivados esteroideos. Los núcleos esteroidales son hidrófobos en comparación con el fragmento de quitina uno, como se confirma en la Figura 4. El potencial efecto inhibitorio se puede observar con la interacción de aminoácidos, mostrando la formación de puentes de hidrógeno característicos con los residuos aminoacídicos **W** 97, **W** 145 y **D** 215. Estas interacciones pueden observarse tanto en el fragmento de quitina como en el inhibidor de referencia. La mayoría de los derivados esteroidales presentan puentes de hidrógeno con el residuo **W** 97, incluso se observa que los compuestos con mejor puntaje de acoplamiento también presentan un puente de hidrógeno con **W** 145, y en algunos casos con otros como **E** 144.

Las interacciones de Van der Waals y π-alquilo se deben a los grupos acetilo del sustrato; este hecho revela la importancia de resaltar el carácter lipofílico de los derivados de SPGP. El carácter hidrofóbico de los anillos permitió observar interacciones con los residuos F 191, Y 145, W 97 y F 190 en el caso de SPGP13, SPGP7 y SPGP1 (Tabla 2). SPGP7 tiene un puente de hidrógeno con el residuo W 220, así como SPGP12, que tiene mejor DS que la quitina, pero no que el inhibidor de referencia, lo que demuestra la importancia de este residuo.

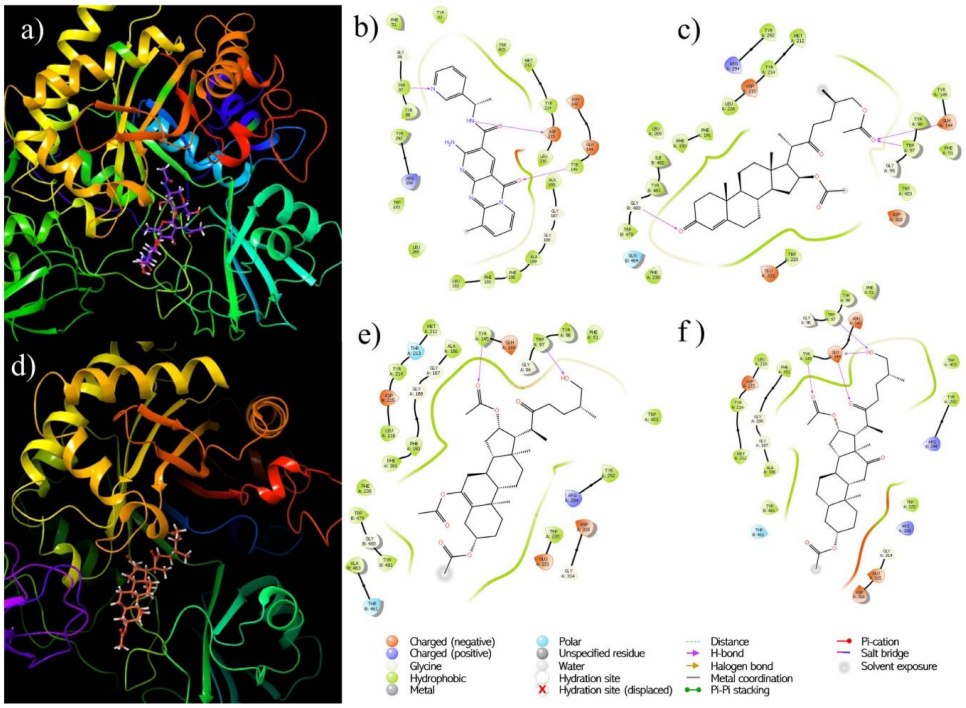

Figura 4 Modo de unión con la enzima quitinasa B. (a) Fragmento de quitina, (b) FO0, (c) SPGP8, (d) SPGP15, (e) SPGP1, (f) SPGP14.

Tabla 2. Interacción de residuos aminoacídicos con estructuras de SPGP's en el sitio catalítico de la quitinasa B.

Compuesto	Van der Waals y pi - alquilo	Puente de hidrógeno convencional	Otros
Fragmento de quitina	**A** A:145, **F** A:191, **Y** A:145, **W** A:97, **L** A:265, **F** A:190, **L** A:216, **E** A:144, **Y** A:214, **M** A:212	**G** A:187, **G** A:188, **D** A:215, **W** A:220	**Y** B: 481
SPGP1	**A** A:186, **R** A:294, **D** A:215, **D** A:316, **E** A:315, **G** A:188, **G** A:314, **I** A:339, **L** A:216, **M** A:212, **F** A:190, **F** A:191, **P** A:317, **W** A:97, **Y** A:318, **Y** B:481	**W** A:220, **G** A:187, **R** A:338	**W** A:220, **D** A:336
SPGP2	**R** A:294, **W** A:97, **D** A:215, **W** A:220, **E** A:144, **G** A:95, **G** A:96, **M** A:212, **F** A:12, **F** A:191, **F** A:51, **P** A:14, **Y** A:145, **Y** A:214, **Y** A:98, **Y** A:99, **Y** B:481	**W** A:97	**W** A:403
SPGP3	**D** A:215, **F** A:12, **E** A:144, **F** A:51, **G** A:96, **W** A:97, **M** A:212, **F** A:191, **Y** A:214, **Y** A:98, **Y** A:99		**W** A:97, **W** A:403, **W** A:220
SPGP4	**R** A:194, **I** B:482, **D** A:316, **W** A:220, **E** A:221, **W** A:97, **G** A:314, **W** B:479, **G** B:480, **Y** B:481, **F** A:190, **F** A:239, **T** B:483	**W** A:97	**F** A:191, **W** B:479
SPGP5	**A** A:186, **R** A:338, **D** A:215, **D** A:316, **D** A:336, **G** A:187, **I** A:339, **L** A:216, **M** A:212, **F** A:190, **F** A:191, **P** A:219, **P** A:313, **W** A:220, **W** A:97,	**R** A:294	**G** A:188, **G** A:314

	Y A:145		
SPGP6	**A** A:186, **W** A:220, **A** A:217, **R** A:294, **E** A:315, **G** A:188, **G** A:314, **L** A:216, **L** A:265, **M** A:212, **F** A:190, **F** A:191, **W** A:97, **Y** A:145, **Y** A:214, **Y** B:481	**D** A:215, **D** A:316, **G** A:187	**W** A:220, **E** A:221
SPGP7	**D** A:215, **E** A:144, **G** A:95, **G** A:96, **M** A:212, **F** A:12, **F** A:191, **F** A:51, **W** A:403, **Y** A:214, **Y** A:97, **Y** A:98, **Y** A:99	**W** A:220	
SPGP8	**R** A:294, **W** A:220, **R** A:338, **D** A:215, **D** A:316, **G** A:314, **G** B:480, **I** B:482, **F** A:190, **T** B:483, **Y** A:145, **Y** B:481	**R** A:194, **W** B:479	**F** A:191, **W** A:220
SPGP9	**A** A:186, **W** A:220, **R** A:294, **R** A:338, **D** A:215, **D** A:316, **D** A:336, **E** A:315, **G** A:188, **G** A:314, **I** A:339, **L** A:216, **L** A:265, **M** A:212, **F** A:190, **F** A:191, **W** A:97, **Y** A:145, **Y** B:481	**G** A:187, **W** A:220	**W** A:220
SPGP10	**D** A:215, **F** A:191, **E** A:221, **G** A:96, **G** B:480, **M** A:212, **F** A:51, **W** A:220, **W** B:479, **Y** A:214, **Y** A:99, **Y** B:481	**W** A:98	**F** A:190, **W** A:87, **W** A:403, **E** A:144
SPGP11	**A** B:491, **Y** B:481, **D** A:316, **D** B:489, **G** B:480, **I** B:482, **S** B:484, **T** B:483, **W** A:220, **W** B:479	**R** A:194, **W** A:97	**F** A:191, **F** A:190
SPGP12	**R** A:294, **D** A:215, **D** A:316, **D** A:336, **G** B:480, **I** A:339,	**R** A:338, **E** A:221, **W** A:220	**F** A:190, **W** A:220

	F A:190, **F** A:191, **W** A:97, **W** B:479, **W** B:481, **Y** A:481, **F** A:190, **W** A:220		
SPGP13	**R** A:294, **D** A:215, **D** A:316, **D** A:336, **G** B:480, **I** A:339, **I** B:482, **F** A:190, **F** A:191, **T** B:483, **W** A:97, **Y** B:481, **W** A:220	**R** A:194, **R** A:338, **W** B:479	
SPGP14	**D** A:215, **W** A:97, **E** A:144, **G** A:96, **M** A:212, **F** A:12, **F** A:191, **F** A:51, **Y** A:214, **Y** A:98, **Y** A:99	**G** A:95	**W** A:220, **W** A:403, **W** A:97
SPGP15	**D** A:215, **W** A:97, **E** A:144, **G** A:95, **G** A:96, **M** A:212, **F** A:12, **F** A:191, **F** A:51, **W** A:403, **Y** A:214, **Y** A:98, **Y** A:99		**W** A:97, **W** A:220

1,3-β-glucanasa

La principal función de la 1,3-β-glucanasa radica en la hidrólisis de estos glucanos, necesarios para el proceso de adaptación-proliferación del hongo fitopatógeno. Es una enzima tan específica que solo existen unos pocos inhibidores selectivos, como a*pegin*. La formación de un puente de hidrógeno entre el residuo **Y** 29 y **E** 192 es crucial en el proceso catalítico de descomposición del b-glucano en unidades de monosacáridos.

La naturaleza hidrofóbica de los núcleos de esteroides dificulta la interacción con el sitio catalítico de la enzima (Figura 5). SPGP7 y SPGP15 interactúan de forma polar con los aminoácidos **Q** 27 y **D** 145 debido a sus funciones polioxigenadas. Es importante destacar esto último en el proceso de hidrólisis de la glucanasa, teniendo un mecanismo como *apegin*, con la ventaja de que estas SPGP interactúan con **F** 258 y **N** 191. SPGP15 también interactúa con el residuo **F** 144. Para el caso de los fitopatógenos dependientes de glucanasa, SPGP7 y SPG15 demostraron la necesidad de una alta polaridad para unirse a esta enzima. Quitinasa

B, que se une a la quitina, al tener grupos acetilo, los residuos en la proteína tienen un carácter hidrofóbico.

El resto de SPGP (1 - 6, 8 - 14) tienen puntuaciones de acoplamiento entre −6,0 kcal/mol y −4,0 kcal/mol (Tabla 3). Estos valores no son comparables con los glucanos o inhibidores comerciales. Esto no es necesariamente negativo, ya que la 1,3-β-glucanasa está presente no solo en fitopatógenos, sino también en hongos benéficos para el desarrollo vegetal, lo que permite el uso de estas SPGP's con efecto promotor del crecimiento vegetal sin alterar la simbiosis con el reino de los hongos.

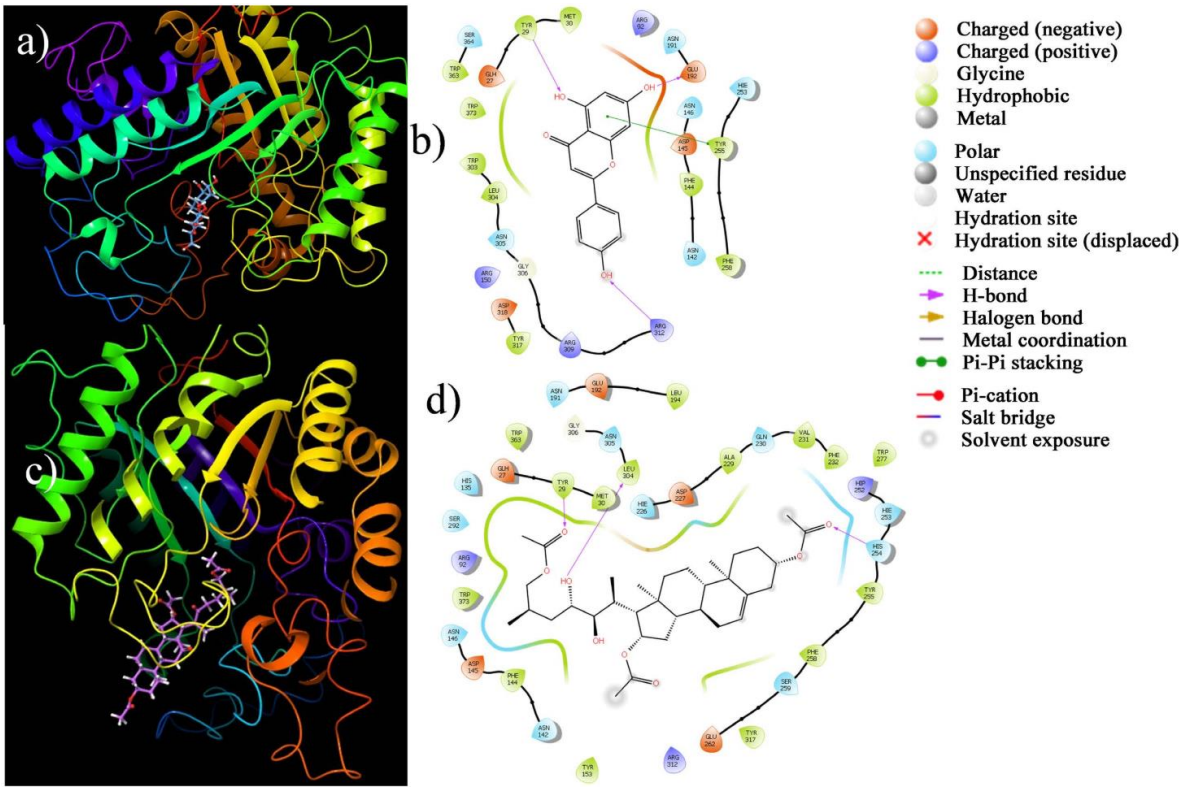

Figura 5. Interacción 1,3-β-glucanasa: (a) 1,3-β-glucano, (b) apegin, (c) SPGP15, (d) SPGP7.

Tabla 3. Residuos de aminoácidos que interactúan con SPGP en el sitio catalítico de 1,3-β-glucanasa.

Compuesto	Van der Waals y pi - alquilo	Puente de hidrógeno convencional	Otros
1,3-β-Glucano	**H** 253, **N** 191, **F** 258, **N** 305, **L** 304, **F** 144, **D** 145	**Y** 255, **E** 192, **Y** 29, **G** 27, **N** 149, **R** 312	**D** 145
Apegin	**N** 191, **N** 146, **F** 144, **N** 142,	**Y** 29, **E** 192, **R** 211	**R** 92, **D** 145,

	G 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **W** 373		**R** 309, **G** 27, **Y** 255
SPGP1	**G** 261, **S** 259, **F** 258, **V** 257, **Q** 256, **Y** 255, **H** 253, **F** 232, **V** 231, **Q** 230, **A** 229, **A** 228, **H** 226, **W** 373, **H** 135, **S** 147, **F** 144, **G** 143, **N** 142, **Y** 153	**R** 312, **H** 254, **D** 145, **N** 146	**R** 265, **E** 262, **H** 252, **D** 227
SPGP2	**Y** 153, **G** 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **M** 30, **N** 191, **L** 194, **P** 196, **H** 253, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**R** 312, **Y** 29, **G** 27, **H** 254	**R** 309, **E** 191, **H** 252, **E** 262, **R** 265
SPGP3	**Y** 317, **G** 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **W** 373, **H** 135, **N** 191, **L** 194, **P** 196, **H** 253, **H** 254, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**R** 162, **W** 277	**D** 318, **R** 309, **E** 192, **E** 262, **R** 265, **D** 318
SPGP4	**Y** 153, **N** 146, **F** 144, **G** 143, **N** 142, **H** 226, **A** 229, **Q** 230, **V** 231, **F** 232, **H** 253, **H** 254, **Y** 255, **F** 258, **S** 259	**W** 277	**G** 262, **R** 312, **R** 309, **E** 192
SPGP5	**Y** 153, **S** 147, **F** 144, **G** 143, **N** 142, **H** 253, **H** 254, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259,	**N** 146, **D** 145	**D** 151, **R** 150, **H** 252, **E** 262, **R** 265
SPGP6	**Y** 153, **S** 147, **N** 142, **H** 253, **H** 254, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**N** 146, **D** 145, **W** 277	**R** 265, **E** 262, **H** 252, **R** 150, **D** 318
SPGP7	**S** 259, **F** 258, **V** 257, **Q** 256, **Y** 255, **H** 253, **F** 232, **V** 231, **Q** 230, **A** 229, **A** 228, **H** 226, **P** 94, **M** 30, **W** 303, **N** 305, **G** 306	**H** 254, **L** 304, **Y** 29	**E** 262, **H** 252, **D** 227, **R** 92, **G** 27, **R** 309, **R** 312
SPGP8	**N** 146, **F** 144, **G** 143, **N** 142, **H** 253, **H** 254, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259, **Y** 153,	**R** 312, **G** 27	**R** 312, **R** 309, **R** 150, **R** 265,

	M 30, **Y** 29, **H** 135, **D** 133		**E** 262, **H** 252, **D** 145, **D** 133
SPGP9	**Y** 153, **G** 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **P** 28, **M** 30, **H** 135, **H** 253, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**R** 312, **Y** 29, **H** 254	**R** 309, **E** 27, **R** 92, **H** 252, **E** 262, **R** 265
SPGP10	**Y** 153, **S** 147, **F** 144, **G** 143, **N** 142, **S** 364, **W** 363, **H** 253, **V** 257, **F** 258, **N** 191, **L** 194, **V** 197	**N** 146, **Y** 255	**D** 151, **R** 150, **D** 145, **E** 192, **R** 92
SPGP11	**Y** 317, **V** 307, **G** 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **H** 253, **H** 254, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**D** 145, **R** 265	**R** 312, **R** 309, **E** 262
SPGP12	**G** 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **P** 28, **Y** 29, **M** 30, **W** 373, **H** 226, **H** 253, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**R** 312, **H** 254, **D** 145	**R** 309, **E** 27, **H** 252, **E** 262, **R** 265
SPGP13	**Y** 137, **G** 306, **N** 305, **L** 304, **W** 303, **W** 373, **H** 253, **H** 254, **F** 258, **S** 259	**Y** 255, **Y** 29, **R** 312	**R** 309, **E** 27, **R** 92, **D** 227, **G** 262
SPGP14	**Y** 153, **G** 143, **F** 144, **S** 157, **W** 373, **W** 363, **H** 253, **H** 254, **Y** 255, **Q** 256, **V** 257, **F** 258, **S** 259, **V** 273, **Y** 317	**D** 145, **N** 146, **R** 265	**D** 318, **E** 262, **R** 312
SPGP15	**W** 153, **S** 147, **N** 146, **F** 144, **G** 143, **N** 142, **H** 253, **Y** 255, **V** 257, **F** 258, **S** 259	**N** 146, **E** 27	**D** 151, **R** 150, **D** 256, **E** 262

ECP6 y AVR4.

Dado que la regulación observada es vía quitinasa B, fue interesante estudiar los efectores por parte del hongo necesarios para la proliferación fúngica, siendo ECP6 y AVR4 críticos para el transporte y proceso proliferativo vía Quitina, una opción de regulación indirecta es

mediante el bloqueo alostérico del sitio de transporte que se ubica entre las dos cadenas de la estructura tanto en el efector ECP6 como en el AVR4 (Figura 6 (a) y Figura 6 (d)). A nivel de energía podemos observar que solo 2 compuestos tienen una energía superior al fragmento de quitina en el caso de AVR4, pero en ECP6 ningún compuesto tiene una energía competitiva. A nivel espacial podemos ver que el fragmento Quitina en ambos casos se encuentra en medio de las dos cadenas, las SPGP en todos los casos se unen en ese sitio (Figura 6 (b) y Figura 6 (e)) pero particularmente en el caso de ECP6, las intercadenas de esta región son altamente hidrofílicas, por lo que el núcleo esteroidal que es lipofílico no permite una fuerte interacción con el sitio, aunque los acetatos e hidroxilos forman enlaces de hidrógeno no es suficiente para comparar con la quitina. En el caso de AVR4, aunque la quitina es hidrófila, el sitio no es completamente hidrófilo, presentando interacción con el núcleo y con un carbonilo o un enol en C-6 para SPGP1 y SPGP6 (Figura 6 (c) y Figura 6 (f)).

Específicamente para AVR4, los compuestos interactúan en el sitio particular, lo que concuerda con un aumento en las interacciones de van der Walls y π-alquilo, como se puede ver en la Tabla 4, los aminoácidos para la fracción de quitina se repiten en interacción para los derivados SPGP, pero en la formación de puentes de hidrógeno es donde reside la clave para SPGP1 y SPGP6 ya que interactúan con **Y** D: 67, además de agregar residuos como **Y** C: 67, **D** C: 102 y **K** C: 98, que aumenta la energía de acoplamiento permitiéndole competir en el caso de SPGP1 al mismo nivel de energía y para SPGP6 con mejor puntaje de acoplamiento que el ligando endógeno, permitiendo así bloquear el efector AVR4.

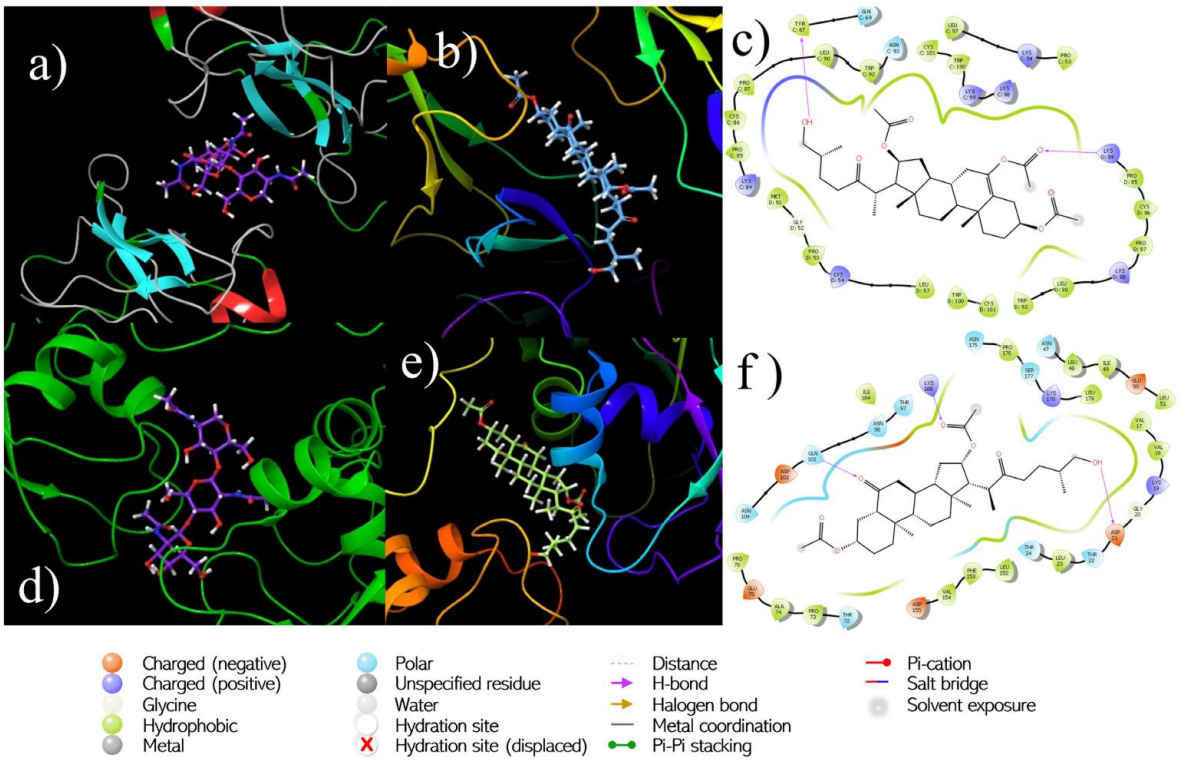

Figura 6. Figura 6. Modo de enlace para (a) fragmento de quitina frente a ECP6, (b) SPGP6 frente a ECP6, (c) SPGP1 frente a ECP6, (d) fragmento de quitina frente a AVR4, (e) SPGP1 frente a AVR4, (f) SPGP6 frente a AVR4.

Tabla 4. Residuos aminoacídicos que interactúan con SPGP en el sitio catalítico de AVR4.

Compuesto	Van der Waals y π - alquilo	Puente de hidrógeno convencional	Otros
SPGP1	**C** C:101, **W** C:100, **L** C:57, **P** C:53, **P** D:85, **C** D:86, **P** D:87, **L** D:90, **W** D:92, **Q** D:69, **Y** D:67, **C** D:101, **W** D:100, **L** D:57, **P** D:53, **G** D:52, **M** D:51, **P** C:85, **C** C:86, **P** C:87, **L** C:98, **W** C:92, **N** C:93, **Y** C:67, **Q** C:69	**K** D:84, **Y** C:67	**K** D:84, **K** C:54, **K** C:98, **K** C:99, **K** D:88, **K** D:54, **K** C:84
SPGP2	**C** C:50, **M** C:51, **G** C:52, **P** C:53, **L** C:57, **Y** D:67, **Q** D:69, **G** C:97, **W** C:100,	**K** C.84, **Y** C:67, **K** C:54	**K** C:54, **D** C:55, **K** D:84,

	C C:101, **P** A:61, **S** A:63, **C** A:64, **W** C:92, **L** C:90, **G** C:89, **P** D:53, **P** C:87, **G** D:52, **C** C:86, **M** D:51, **C** D:50, **P** C:85, **V** C:83, **V** C:82, **Y** C:67, **Q** C:69		**K** C:98, **K** C:99, **D** A:62, **C** A:208, **D** D:55, **K** D:54, **K** C:88, **K** C:84
SPGP3	**P** D:87, **W** D:100, **C** D:101, **L** D:90, **L** C:106, **Y** C:103, **N** C:93, **C** C:101, **W** C:92, **W** C:100, **L** C: 90, **M** D:51, **P** C:87, **G** D:52, **C** C:86, **P** D.53, **P** C:85, **Y** C:67, **Q** C:69, **L** C:57, **P** C:53, **G** C:52, **Y** D:67, **Q** D:69		**K** D:84, **D** C:102, **K** C:99, **K** C:98, **K** C:84, **D** C.55, **K** C:54
SPGP4	**P** D:87, **L** D:90, **T** A:113, **L** C:106, **N** C:105, **Y** C:103, **Y** D:103, **C** C:101, **W** D:100, **W** C:100, **M** D:51, **G** D:52, **P** D:53, **P** C:85, **C** C:86, **P** C:87, **Y** C:67, **L** C:90, **W** C:92, **N** C:93		**K** A:112, **D** C:102, **K** C:98
SPGP5	**Y** C:58, **L** C:57, **T** C:65, **T** C:66, **Y** C:67, **I** C:68, **Q** C:69, **P** C:53, **G** C:52, **W** C:100, **C** C:101, **C** D:86, **Q** D:69, **Y** D:67, **P** D:87, **Y** C:103, **P** C:104, **L** C:106, **Y** D:103, **C** D:101, **W** D:100, **G** D:97, **N** C:93, **T** A:113, **W** C:92, **Q** C:91, **L** C:90, **G** C:89, **L** D:57, **V** A:111, **P** D:53, **P** C:87, **G** D.52,	**K** C:84, **M** D:51	**D** C:55, **K** C:54, **K** C:98, **K** C.99, **K** C:84, **D** C:102, **D** D:102, **K** C:88, **K** C:54, **K** D.49, **K** C:84

	C C:86, **P** C:85, **M** D:51, **C** D:50, **V** C:83, **V** C:82, **T** D:48		
SPGP6	**Y** D:67, **Q** D:69, **L** C:57, **P** C:53, **G** C:52, **C** D:85, **P** D:87, **L** D:90, **W** D:100, **C** D:101, **L** C:106, **Y** C:103, **C** C:101, **W** C:100, **N** C:93, **W** C:92, **P** D.53, **G** D:52, **M** D:51, **Y** C:67, **L** C:90, **Q** C:69, **P** C:87, **C** C:86, **P** C:85	**K** C:98, **D** C:102, **Y** C:67	**L** C:54, **K** D:84, **D** C:102, **K** C:99, **K** C:98, **K** C:84
SPGP7	**V** C:82, **V** C:83, **P** C:85, **Y** C:67, **Q** C:69, **C** C:86, **C** D:50, **P** C:87, **M** D:51, **G** D:52, **P** D:53, **L** C:90, **L** C:57, **W** C:92, **Q** D:69, **Y** D.67, **P** C:53, **L** D:57, **W** D:92, **L** D:90, **P** D:87, **C** D:86, **P** D:85, **C** D:101. **W** D:100, **W** C:100, **C** C:101	**K** C:84, **P** C:85, **M** D:51	**K** C:84, **K** C:88, **K** D:54, **D** D:55, **K** C:54, **K** D:84
SPGP8	**Q** D:69, **Y** D:67, **P** C:53, **P** D:87, **W** D:100, **C** D:101, **L** C:57, **L** D:90, **W** D:92, **W** C:100, **N** C:93, **W** C:92, **C** C:101, **Y** C:67, **L** C:90, **Y** C:103, **L** C.106, **P** C:87, **C** C:86, **C** D:50, **M** D:51, **G** D:52, **P** D:53, **L** D:57	**Y** D:67, **K** C:98	**K** D:84, **K** C:54, **K** D:99, **K** C:98, **K** C:99, **D** C:102, **K** D:54, **D** D:55
SPGP9	**P** D:85, **C** D:86, **L** D:106, **P** D:87, **Y** D:103, **Y** D:67, **L** D.90, **C** D:101, **W** D:100, **W** D:92, **N** D:93, **T** A:113,	**C** D:101, **K** D:98	**D** D:102, **K** D:99, **K** D:98, **D** C:102, **K** D:99,

	Y C:103, **C** C:101, **W** C:100, **P** C:85, **C** C:86, **P** C:87, **L** C:90, **Y** C:67, **M** D:51, **G** D:52, **P** D:53, **W** C:92, **N** C:93		**K** D:54
SPGP10	**Q** D:69, **Y** D:67, **P** D:85, **C** D:86, **L** D:106, **P** D:87, **Y** D:103, **L** D:90, **W** D:92, **N** D:93, **C** D:101, **W** D:100, **Y** C:103, **P** D:53, **L** C:57, **W** C:100, **L** D:57, **P** C:53	**K** D:84, **C** D:101, **K** D:98	**K** D:84, **D** D:102, **K** D:99. **K** D:98, **K** D:54, **K** C:99, **K** C:98, **K** C:54

CONCLUSIONES

Los compuestos SPGP tienen un enorme efecto promotor del crecimiento de las plantas en varios sistemas biológicos y un efecto contra los fitopatógenos (específicamente para la quitinasa B y la 1,3-β-glucanasa). Algunos compuestos SPGP fueron estudiados *in silico* encontrando 5 inhibidores competitivos con un puntaje de acoplamiento mejor que la quitina y 4 comparables a FO0 (inhibidor de referencia). Mientras que para la 1,3-β-glucanasa, se encontraron 2 inhibidores potenciales (SPGP7, a nivel del 1,3-β-glucano y SPGP15) con mejor actividad que *apegin* (inhibidor de referencia). Para el bloqueo de los efectores de quitina (AVR4 y ECP6), solo se logró un bloqueo alostérico contra AVR4, por lo que los compuestos 22-oxocolestano estudiados tienen un potencial latente como inhibidores de la proliferación fúngica a nivel enzimático. En conclusión, los compuestos tipo SPGP tienen potencial como moléculas de doble acción, primeramente, como promotores del crecimiento vegetal y por otro lado como antifúngicos frente a hongos fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang, S. Q., Zhao, H. H., Zhao L. M., Gu C. M., Na, Y, G., Xie, B., et al. Application of brassinolide alleviates cold stress at the booting stage of rice. Journal of Integrative Agric. 2020;19(4):975–87.
2. Hussain, M. A., Fahad, S., Sharif, R., Jan, M. F., Mujtaba, M., Ali, O., et al. Multifunctional role of brassinosteroid and its analogues in plants. Plant Growth Regul. 2020;92:141–56.
3. Hafeez, M. B., Zahra, N., Zahra, K., Raza, A., Khan, A., Shaukat, K., et al. Brassinosteroids: Molecular and physiological responses in plant growth and abiotic stresses. Plant Stress [Internet]. 2021;2(August):1–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100029
4. Jia, J., Zhang, Y., Feng, H. Effects of brassinolide on microspore embryogenesis and plantlet regeneration in pakchoi (Brassica rapa var. multiceps). Sci Hortic. 2019; 252:354–62.
5. Peng, J., Tang, X., Feng, H. Effects of brassinolide on the physiological properties of litchi pericarp (Litchi chinensis cv. nuomoci). Sci Hortic. 2004;101(4):407–16.
6. Doležalová, J., Koudela, M., Sus, J., Ptáček, V. Effects of synthetic brassinolide on the yield of onion grown at two irrigation levels. Sci Hortic. 2016; 202:125–32.
7. Núñez Vázquez M, Reyes Guerrero Y, Martínez González L, Torres de la Noval W. Brassinosteroids and Plant Responses to Heavy Metal Stress. An Overview. Open J Met. 2013;03(02):34–41.
8. Yadava, P., Kaushal, J., Gautam, A., Parmar, H., Singh, I. Physiological and Biochemical Effects of 24-Epibrassinolide on Heat-Stress Adaptation in Maize (Zea mays L.). Nat Sci (Irvine). 2016;08(04):171–9.
9. Zeferino-Diaz, R., Hilario-Martinez, J. C., Rodriguez-Acosta, M., Carrasco-Carballo, A., Hernandez-Linares, M. G., Sandoval-Ramirez, J., et al. Mimicking natural phytohormones. 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as plant growth promoters. Steroids [Internet]. 2017;125(June):20–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.06.004

10. Zeferino-Diaz, R., Hilario-Martinez, J. C., Rodriguez-Acosta, M., Sandoval-Ramirez, J., Fernandez-Herrera, M. A. 22-Oxocholestanes as plant growth promoters. Steroids [Internet]. 2015;98:126–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2015.03.005

11. Hilario-Martínez JC, Zeferino-Díaz R, Muñoz-Hernández MA, Hernández-Linares MG, Cabellos JL, Merino G, et al. Regioselective Spirostan E-Ring Opening for the Synthesis of Dihydropyran Steroidal Frameworks. Org Lett. 2016;18(8):1772–5.

12. Balasubramanian V, Vashisht D, Cletus J, Sakthivel N. Plant β-1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. Biotechnol Lett. 2012;34(11):1983–90.

13. Ojito K, Portal O. Introducción al sistema inmune en plantas. Biotecnol Veg. 2010;10(1):3–19.

14. Hawkesford MJ, Buchner P. Molecular Analysis of Plant Adaptation. 2001. 1–271 p.

15. Heath MC. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Curr Opin Plant Biol. 2000;3(4):315–9.

16. Shewry PR, Lucas JA. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. Adv Bot Res. 1997;26(C).

17. lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, et al. Fungal effectors and plant susceptibility. Annu Rev Plant Biol. 2015;66:513–45.

18. Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, et al. The novel Cladosporium fulvum lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Mol Microbiol. 2008;69(1):119–36.

19. Gupta P, Ravi I, Sharma V. Induction of β-1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of Eruca sativa plants against the fungal pathogen Alternaria brassicicola. J Plant Interact. 2013;8(2):155–61.

20. Zhao J, Wang J, An L, Doerge RW, Chen ZJ, Grau CR, et al. Analysis of gene expression profiles in response to Sclerotinia sclerotiorum in Brassica napus. Planta. 2007;227(1):13–24.

21. Shrestha CL, Oña I, Muthukrishnan S, Mew TW. Chitinase levels in rice cultivars correlate with resistance to the sheath blight pathogen Rhizoctonia solani. Eur J Plant Pathol. 2008;120(1):69–77.

22. Salim AP, Saminaidu K, Marimuthu M, Perumal Y, Rethinasamy V, Palanisami JR, et al. Defense responses in tomato landrace and wild genotypes to early blight pathogen Alternaria solani infection and accumulation of pathogenesisrelated proteins. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2011;44(12):1147–64.

23. Wu G wei, Gao J ming, Shi X wei, Zhang Q, Wei S peng, Ding K. Microbial Transformations of Diosgenin by the White-Rot Basidiomycete Coriolus versicolor. J Nat Prod. 2011;74:2095–101.

24. Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. Fumonisin B1, a toxin produced by Fusarium verticillioides, modulates maize β-1,3-glucanase activities involved in defense response. Planta. 2012;235(5):965–78.

25. Kuo HW, Zeng JK, Wang PH, Chen WC. A Novel Exo-Glucanase Explored from a Meyerozyma sp. Fungal Strain. Adv Enzyme Res. 2015;03(03):53–65.

26. Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. Cell. 2006;124(4):803–14.

27. Patrick WM, Nakatani Y, Cutfield SM, Sharpe ML, Ramsay RJ, Cutfield JF. Carbohydrate binding sites in Candida albicans exo-β-1,3-glucanase and the role of the Phe-Phe "clamp" at the active site entrance. FEBS Journal. 2010;277(21):4549–61.

28. Jiang PT, Yuan X. Structure of Serratia marcescens Chitinase B Complexed with Compound 6q [Internet]. 2021. Available from: https://www.rcsb.org/structure/7CB1

29. Hurlburt NK, Chen LH, Stergiopoulos I, Fisher AJ. Structure of the Cladosporium fulvum Avr4 effector in complex with (GlcNAc)6reveals the ligand-binding mechanism and uncouples its intrinsic function from recognition by the Cf-4 resistance protein. PLoS Pathog. 2018;14(8):1–22.

30. Sánchez-Vallet A, Saleem-Batcha R, Kombrink A, Hansen G, Valkenburg DJ, Thomma BPHJ, et al. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. Elife. 2013;2013(2):1–16.

31. Madhavi Sastry G, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. J Comput Aided Mol Des. 2013;27(3):221–34.

32. Epik Schrödinger LLC. Schrödinger Release 2021-3: Protein Preparation Wizard. New York, NY; 2021.

33. Lu C, Wu C, Ghoreishi D, Chen W, Wang L, Damm W, et al. OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. J Chem Theory Comput. 2021;17(7):4291–300.

34. Schrödinger LLC. Schrödinger Release 2021-3: LigPrep. New York, NY;

35. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. J Med Chem. 2006;49(21):6177–96.

36. Schrödinger LLC. Schrödinger Release 2021-3: Glide. New York, NY;

37. Moreno-Castillo E, Ramírez-Echemendía DP, Hernández-Campoalegre G, Mesa-Tejeda D, Coll-Manchado F, Coll-García Y. In silico identification of new potentially active brassinosteroid analogues. Steroids [Internet]. 2018;138:35–42. Available from: https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.06.009

38. Wang Y, Liu M, Wang X, Zhong L, Shi G, Xu Y, et al. A novel β-1,3-glucanase Gns6 from rice possesses antifungal activity against Magnaporthe oryzae. J Plant Physiol. 2021;265(June).

39. Xu X, Song Z, Yin Y, Zhong F, Song J, Huang J, et al. Virtual Screening of Inhibitors for Chitosanases EAG1. Adv Enzyme Res. 2020;08(04):49–57.