



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΣΙΟΥΡΗ ΟΛΓΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΜΟΡΙΑΚΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΜΥΚΗΤΩΝ:
Η περίπτωση του στελέχους *Fusarium solani* K**

**FUNGAL COMPARATIVE GENOMICS:
The case of *Fusarium solani* strain K**

Τριμελής επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Γιακουντής Αντώνιος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βασιλειάδης Σωτήριος: Μεταδιδακτορικός ερευνητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πίνακας περιεχομένων

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΗΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΜΥΚΗΤΩΝ : Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *Fusarium solani*

Κ.....	2
Abstract.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1:ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1: ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ	6
1.2: ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ <i>Fusarium solani</i> Κ ΚΑΙ <i>Fusarium solani</i> mpVI 77-14-3.....	7
1.3: ΤΟ ΦΥΤΟ - ΜΟΝΤΕΛΟ <i>Lotus japonicus</i>	8
1.4: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΗΔΙΩΜΑΤΙΚΗ.....	9
1.5: ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ	9
2:ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	10
2.1: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΟΝΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ FUSARIUM.....	10
2.2: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ: <i>FsK</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> & <i>Serendipita indica</i>	11
2.2.1: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ.....	11
2.2.2: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΟΠΛΑΣΤΟΜΕ.....	12
3:ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΗΖΗΤΗΣΗ.....	14
3.1: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ: <i>FsK</i> , <i>Nectria haematococca</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> & <i>Serendipita indica</i>	14
3.1.1: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ.....	14
3.1.2:ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	19
3.1.3:CAZYMES ΣΤΟ ΑΡΟΠΛΑΣΤΟΜΕ	20
3.2.: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΟΝΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ FUSARIUM	22
3.2.1: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΕΡΠΕΝΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΩΝ ΤΥΠΟΥ 1 ΤΟΥ FSK-NECTRIA.....	24
4:ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	25
5:ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	26

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το στέλεχος K του μύκητα *Fusarium solani* (FsK) αποτελεί έναν ευεργετικό, ενδοφυτικό μύκητα που παρουσιάζει προστατευτικό ρόλο στα φυτά έναντι των βιοτικών και των αβιοτικών καταπονήσεων. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις φυτού/μύκητα και οδηγούν σε βελτιωμένο φαινότυπο δεν έχουν προσδιοριστεί με σαφήνεια. Στη παρούσα διπλωματική εργασία θα γίνει προσδιορισμός του χωροχρόνου των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του FsK και του *Lotus* μέσω. **1.** Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση του FsK με το *Fusarium solani* mpVI 77-14-3 και 2 μη παθογόνους μύκητες-οργανισμούς μοντέλα: *Rhizophagus irregularis*, *Serendipita indica* και **2.** Σύγκριση των πρωτεϊνών των μυκήτων, οποίοι δρουν στον αποπλάστη (apoplastome). Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων, εκτός από την διαλεύκανση των πιθανών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που καθορίζουν τον φαινότυπο παθογόνου / συμβιώτη, μπορούν να συμβάλλουν στην σε μια πιο βιώσιμη γεωργία μέσω της χρήσης τέτοιων μυκήτων ως βιολογικό λίπασμα για τη βελτίωση των καλλιεργειών.

Λέξεις κλειδιά: αποπλάστης, τερπένια, συγκριτική γονιδιωματική, συμβίωσης, μύκητας, φυτό

ABSTRACT

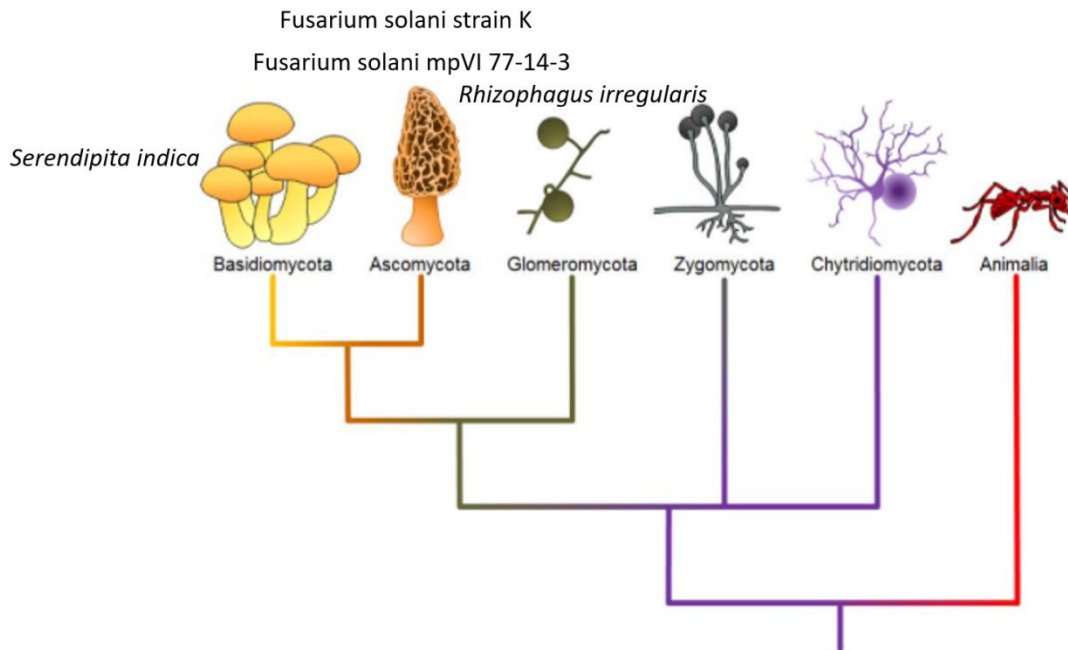
Fusarium solani strain K (FsK) is a beneficial, endophytic fungus that has a protective role in plants against biotic and abiotic stresses. However, the molecular mechanisms governing plant / fungus interactions leading to an improved phenotype have not been clearly identified. In the present dissertation the spatio-temporality of the interactions between FsK and *Lotus* will be determined through: **1.** Determining the transcriptional profile of FsK in the early phase of interaction with *Lotus japonicus*. **2.** Comparative genomic analysis of FsK with *Fusarium solani* mpVI 77-14-3 and 2 non-pathogenic fungi-model organisms: *Rhizophagus irregularis*, *Serendipita indica* and **3.** Comparison of fungal proteins acting on apoplast. The results of these studies, in addition to elucidating the potential signal transduction pathways that determine the pathogen / symbiotic phenotype, can contribute to a more sustainable agriculture through the use of such fungi as organic fertilizers for crop improvement.

Keywords: , apoplastome, τερπένια, comparative genomics, symbiosis, fungus, plant

1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1: ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΗΤΩΝ

Αν και η λέξη *fungus* στα λατινικά έχει τον ορισμό του μανιταριού, το βασίλειο των μυκήτων διαθέτει πάνω από 100000 είδη. Αυτά τα είδη είναι κατηγοριοποιημένα σε διάφορα φύλα με κριτήριο τον τρόπο αναπαραγωγής και τις φυλογενετικές μελέτες. Στην παρακάτω εικόνα συνοψίζονται τα διάφορα φύλα μυκήτων καθώς και τα είδη που ανήκουν σε αυτά και θα συζητηθούν στην παρούσα διπλωματική.



Εικόνα 1: Τα κύρια φύλα που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων και ορισμένα από τα είδη που ανήκουν σε αυτά ("Principles of Biology - OpenStax CNX").

1.2: ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Fusarium solani* K ΚΑΙ *Fusarium solani* mpVI 77-14-3

Το γένος *Fusarium*, το οποίο ανήκει στο γένος των ασκομυκήτων και αποτελεί μια μεγάλη ομάδα μυκήτων που σχηματίζουν νηματοειδείς μορφές τις υφές, αποτελείται από ένα «σύμπλοκο ειδών» το *Fusarium solani* species complex (FSSC). Το FSSC αποτελείται από ένα είδος μύκητα το *Nectria haematococca* (όνομα στη σεξουαλική φάση: *Fusarium solani*), το οποίο διακρίνεται σε 7 πληθυσμούς (mating populations: MP) τα μέλη των οποίων μπορούν να αναπαραχθούν εγγενώς (με σύντηξη των πυρήνων και εμφανίζουν περιβαλλοντική εξειδίκευση (Γραβάνης, 2011)) (Coleman, 2016). Ένα από τα πιο μελετημένα είδη του complex είναι το *Fusarium solani* mpVI 77-14-3, είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση ασθενειών σε 100 είδη φυτών και διαθέτει γονιδίωμα με 17 χρωμοσώματα σύμφωνα με την 2^η αλληλούχηση του γονιδιώματος του (https://fungi.ensembl.org/Fusarium_solani/Info/Index). Εάν και το FSSC αποτελείται κυρίως από παθογόνους οργανισμούς, ένα μη παθογόνο στέλεχος έχει απομονωθεί από τις ρίζες φυτού ντομάτας (Kavroulakis et al., 2007), το οποίο είχε αναπτυχθεί σε κομπόστ: το στέλεχος *Fusarium solani* K (FsK) το οποίο εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι παθογόνων της ρίζας και του φυλλώματος (Kavroulakis et al., 2007). Ο μηχανισμός με τον οποίο φαίνεται να δρά ο μύκητας στο φυτό είναι μέσω ενός μονοπατιού συματοδότησης αιθυλενίου (Kavroulakis et al., 2007). Επιπρόσθετα ο μύκητας εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι του ακάρεος *Tetranychus urticae* (Pappas et al., 2018) και του φυτοφάγου αρπακτικού εντόμου *Nesidiocoris tenuis* στην ντομάτα (Garantonakis et al., 2018) καθώς και την ικανότητα να προστατεύει τα φυτά από αβιοτικές καταπονήσεις (Kavroulakis et al., 2018). Εκτός από την ντομάτα ο FsK έχει την ικανότητα να αποικίζει και το ψυχανθές φυτό *Lotus japonicus* (Skiada et al., 2019), χωρίς να επηρεάζει το φαινότυπο του. Τέλος έχει πραγματοποιηθεί μία πρώτη αλληλούχηση του γονιδιώματος του FsK με τη χρήση της τεχνολογίας illumina καθώς και ανάλυση RNAseq από RNA που έχει απομονωθεί από τους το φυτό *L. japonicus* και τον μύκητα κατά την αλληλεπίδρασή τους σε in vitro συνθήκες στα πολύ αρχικά στάδια της αλληλεπίδρασης (ο μύκητας έρχεται σε επαφή με τις ρίζες του φυτού όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Skiada, διδακτορική διατριβή, 2019). Με την χρήση βιοπληροφορικών προγραμμάτων έχει αποτυπωθεί στο γονιδίωμα η αλληλουχία και θέση γονιδίων σε αυτό με τη δημιουργία αρχείων που θα χρησιμοποιηθούν στην παρακάτω ανάλυση (Skiada, διδακτορική διατριβή, 2019).



Εικόνα 2: Σχεδιασμός του πειράματος RNA-seq για την εύρεση μοριακών δεικτών υπεύθυνων για την εγκαθίδρυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ Fsk και *Lotus japonicus*.

1.3: ΤΟ ΦΥΤΟ - ΜΟΝΤΕΛΟ *Lotus japonicus*

Πρόκειται για ένα ψυχανθές δηλαδή φυτό του διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύει το άζωτο, συνάπτοντας ωφέλιμες συμβιωτικές σχέσεις με βακτηριοειδή λαμβάνοντας έτσι το ατμοσφαιρικό άζωτο ως αμμωνία, συμβάλλοντας σημαντικά στον κύκλο του αζώτου. Ανήκει στην οικογένεια Leguminosae (Fabaceae), η οποία αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες στα αγγειόσπερμα. Ο μικρός κύκλος ζωής (3 μήνες) το μικρό του γονιδίωμα (472MB MG20, 442.8 MB Gifu, Ito M. et al., 2000 Sato et al., 2008) καθώς και το μικρό του μέγεθος, τα μεγάλη άνθη, ο εύκολος μετασχηματισμός και η υψηλή παραγωγή σπόρων, το καθιστούν ιδανικό οργανισμό μοντέλο (Stougaard, 2005). Το *Lotus japonicus* αναπτύσσεται στις εξής εργαστηριακές συνθήκες: 16h/8h (μεγαλύτερη ημέρα), υγρασία 70% και θερμοκρασίες 18-22 °C, ενώ το υπερβολικό πότισμα αντιπροτείνεται (Stougaard, 2005). Το είδος αυτό διαθέτει πολλούς οικότυπους με ποιο καλά μελετημένους και χρησιμοποιημένους τους MG20 (Miyakojima) και Gifu. Ο πρώτος οικότυπος εμφανίζεται στην Ιαπωνία, χρησιμοποιείται για την αλληλούχιση του *Lotus* καθώς περιέχει περισσότερους πολυμορφισμούς από κάθε άλλο οικότυπο καθώς και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως μειωμένα επίπεδα ανθοκυανινών στα πέταλα, μεγάλα μαύρα σπέρματα και λίγα τριχίδια. Ο δεύτερος οικότυπος ανακαλύφθηκε το 1950 σε ένα ποτάμι στην πόλη Gifu της Ιαπωνίας, το οποίο οδήγησε στην καθιέρωση του ως ερευνητικό εργαλείο μεταλλάξεων στο *Lotus*.



Εικόνα 3: Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*.

1.4: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

Η συγκριτική γονιδιωματική αποτελεί τη σύγκριση των γονιδιωματικών στοιχείων μεταξύ δύο ή περισσότερων οργανισμών (Touchman, 2010). Τα στοιχεία αυτά μπορούν να αποτελούν: DNA αλληλουχίες, γονίδια, ρυθμιστικές αλληλουχίες και πρωτεΐνες (Χία, 2013). Η συγκριτική γονιδιωματική παρουσιάζει εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως και στη γεωργία καθώς με την σύγκριση γονιδιωμάτων μπορούν να εντοπιστούν τα γονίδια μυκήτων/βακτηρίων υπεύθυνα για τον παθογενή φαινότυπο καθώς και γονίδια με ωφέλιμη δράση, το οποίο σε συνδυασμό με τεχνικές βιοτεχνολογίας μπορεί να συντελέσει στη δημιουργία καλύτερων βιοσυνθετικών προϊόντων (Plissonneau et al., 2017).

1.5: ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Ο στόχοι της διπλωματικής εργασίας είναι οι παρακάτω:

1. Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση του FsK με το *Fusarium solani* mpVI 77-14-3 και δύο μη παθογόνους μύκητες-οργανισμούς μοντέλα: *Rhizophagus irregularis* και *Serendipita indica*.
2. Σύγκριση του συνόλου των εξωκυτταρικά εκκρινόμενων πρωτεϊνών (*secretome*), των εκκρινόμενων πρωτεϊνών τελεστών που αλληλεπιδρούν με φυτικές πρωτεΐνες (*effectome*) και των τελεστών οι οποίοι δρουν στον αποπλάστη (*apoplastome*).

2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΟΝΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ FUSARIUM

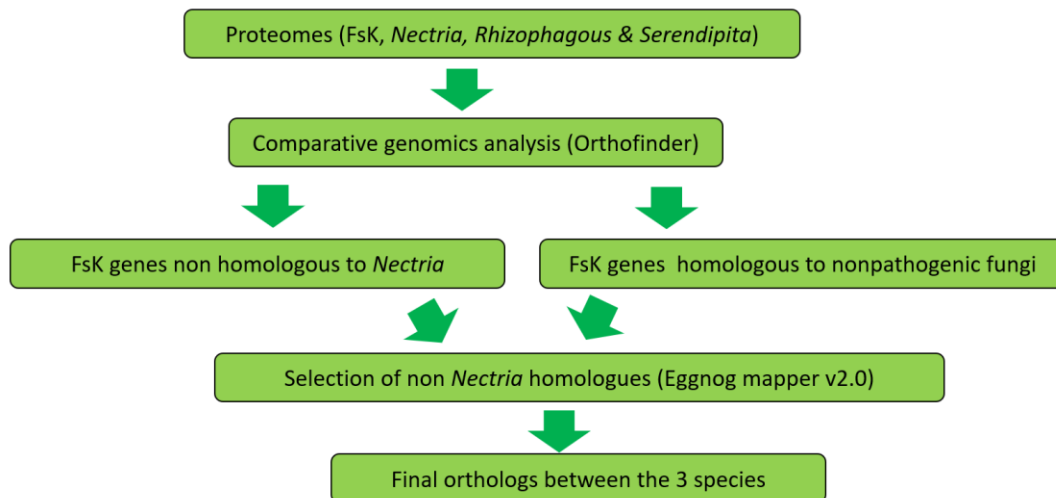
Από το αρχείο genbank *Fusarium solani* strain K, το οποίο έχει προκύψει από το genome annotation. όλα τα γονίδια και τα CDS ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας το script `genbank_to_fasta.py` γραμμένο στη γλώσσα προγραμματισμού python(https://rocaplab.ocean.washington.edu/tools/genbank_to_fasta/). Τα αρχεία GFF3 που περιέχουν ιντρόνια δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας το `extract_intron_gff3_from_gff3.py` (<https://github.com/irusri/Extract-intron-from-gff3>). και όλα τα αρχεία gff3 μετατράπηκαν σε αρχεία μορφής BED χρησιμοποιώντας πρόγραμμα `gff2bed` από το πακέτο BEDOPS v2.4.37 (Neph et al., 2012). Οι αλληλουχίες εξωνίων και ιντρονίων ανακτήθηκαν από το BED αρχείο κάθε μύκητα χρησιμοποιώντας τα `bedtools getfasta` από `bedtools v2.29.2` (Quinlan et al., 2010). Τα στατιστικά στοιχεία γονιδιώματος, κωδικών περιοχών(CDS), ιντρονίων (Intron) και εξωνίων (exon) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας in house προγράμματα γραμμής εντολών σε γλώσσα προγραμματισμού `rython` χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες `rython Biorython v1.77` (Cock et al., 2009) και `pandas v1.1.1` (McKinney, 2010). Για να διασφαλιστεί ότι οι προβλεπόμενες οι ομάδες ομόλογων γονιδίων δεν θα έχουν χαμηλότερη ανάλυση λόγω της παρουσίας απομακρυσμένων ειδών (βλ. σύγκριση πρωτεωμάτων) (https://davidemms.github.io/orthofinder_tutorials/orthofinder-best-practices.html),συγκρίθηκαν τα γονιδιώματα των στελεχών *Fusarium solani* στελέχους K και *Fusarium solani* mpVI 77-13-4 με το Orthofinder (Emms, DM και Kelly, S, 2019) με το `blastp v2.9.0` (Camacho C., et al., 2008) MSA με το `muscle v3.81551` (Edgar RC, et al., 2004) και `trimAl v1.2` (Capella-Gutiérrez S., et al., 2009), τροποποιώντας κατάλληλα το αρχείο `confing.json`. Η ανακατασκευή των δέντρων έγινε χρησιμοποιώντας `raxml-ng v.0.9`. Τα γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή ενζύμων υπεύθυνων για τη δημιουργία δευτερογενών μεταβολιτών ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας το `antismash v5.1.1` (Kai Blin et al., 2019).

Το Orthofinder εμφανίζει 3 τύπους ομάδων ως αποτελέσματα: τις ορθόλογες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που μοιράζονται τον ίδιο πρόγονο) τις παράλογες (πρωτεΐνες που εξελίσσονται μέσω της διαφοροποίησης) και μη ομόλογες (πρωτεΐνες που δεν μοιράζονται την καταγωγή με οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη από τους 2 οργανισμούς). Από αυτές επιλέγονται μόνο οι πρωτεΐνες του FsK που ανήκουν: α) στις μη ομόλογες πρωτεΐνες β) στις παράλογες πρωτεΐνες που ανήκουν μόνο σε ομάδες FsK-πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες φιλτραρίστηκαν περαιτέρω με τα αποτελέσματα του `eggno-mapper v2` (Huerta-Cepas et al., 2019), απομακρύνοντας αυτές που βρέθηκαν ορθόλογες με το *Nectria*. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης συνδυάστηκαν με τα αποτελέσματα της παρακάτω ανάλυσης όπως φαίνεται στην εικόνα 4.

2.2: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ *FsK*, *Nectria haematococca*, *Rhizopagus irregularis* & *Serendipita indica*

2.2.1: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

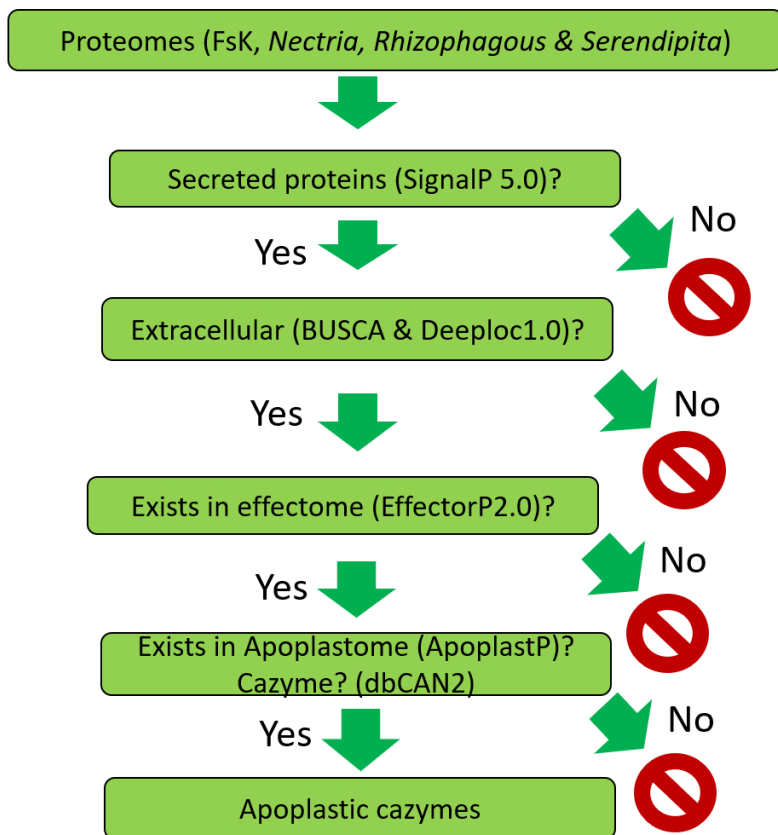
Τα Πρωτεόματα των άλλων 3^{ων} μυκήτων ανακτήθηκαν από το ensembl fungi που απελευθερώνουν θέσεις 47 ftp (*Rhizopagus irregularis* DAOM 181602 = DAOM 197198 (GCA_000439145), *Serendipita indica* DSM 11827 (GCA_000313545) και *Fusarium solani* v2.0 mpVI 77-13-4 (Cunningham et al., 2019). Η σύγκριση όλων των πρωτεϊνών έγινε με το Orthofinder (Emms, DM και Kelly, S, 2019) με τις παραμέτρους -seg «yes» στο blastp v2.9.0 (Camacho C., et al., 2008) και -M MSA, αλλάζοντας τις παραμέτρους στο αρχείο config.json. Από τα αποτελέσματα επιλέχθηκαν, γονίδια ορθόλογα σε FsK από κάθε μύκητα και αντιστρόφως. Επιπλέον, συλλέχθηκαν πρωτεΐνες FsK ορθόλογες μόνο με μη παθογόνους μύκητες (όχι ομόλογα με *Nectria*).



Εικόνα 4: Pipeline επιλογής ορθόλογων γονιδίων μεταξύ μη παθογόνων μυκήτων.

2.2.2: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΟΠΛΑΣΤΟΜΕ

Για την ανάλυση του secretome, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SignalP 5.0 (Armenteros et al., 2019) για τον προσδιορισμό πιθανών εκκριμένων πρωτεϊνών. Η πρόβλεψη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πιθανών εκκριμένων πρωτεϊνών έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα γραμμής εντολών DeepLoc (Armenteros et al., 2017). Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν από το deeploc, υποβλήθηκαν στον διακομιστή BUSCA (Savojardo et al., 2018) χρησιμοποιώντας την επιλογή «fungi», υποβάλλοντας λιγότερο από 500 ακολουθίες, με το διαχωρισμό του output fasta αρχείου του deeploc σε μικρότερα, με το ρyfasta v0.5.2 (<https://anaconda.org/bioconda/ryfasta>). Μόνο οι πρωτεΐνες που προβλέπονται εξωκυτταρικές από τα 2 προγράμματα επιλέγονται για περαιτέρω ανάλυση και μεταφορτώθηκαν στον TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) server για αναγνώριση διαμεμβρανικής περιοχής. Οι διαμεμβρανικές περιοχές εντός των πρώτων 70 aa από την N-τερματική περιοχή δεν λήφθηκαν υπόψη, καθώς το εργαλείο μπορεί μερικές φορές να προβλέψει πεπτιδία σήματος ως ψευδώς θετικά TM. Ο λειτουργικός ρόλος των προβλεπόμενων εκκρινόμενων πρωτεϊνών έγινε χρησιμοποιώντας το eggnoG mapper v2.0 (Huerta-Cepas et al., 2019). Τα carbohydrate active enzymes (cazymes) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο HMMER με το πρόγραμμα dbCAN2 (Zhang H., et al., 2018). Από τα τελικά αποτελέσματα που ικανοποιούν τις παραμέτρους για την υπαγωγή τους στο secretome, επιλέχθηκαν πρωτεΐνες με μήκος μικρότερο από 300aa χρησιμοποιώντας το bioawk (<https://github.com/lh3/bioawk>) και η πρόβλεψη πρωτεϊνών-τελεστών έγινε χρησιμοποιώντας την ηλεκτρονική έκδοση του EffectorP2.0 (Sperschneider et al., 2018). Για τον προσδιορισμό του aroplastome χρησιμοποιήθηκε το AroplastP (Sperschneider et al., 2018). Οι παραπάνω αναλύσεις συνοψίζονται στην εικόνα 5.



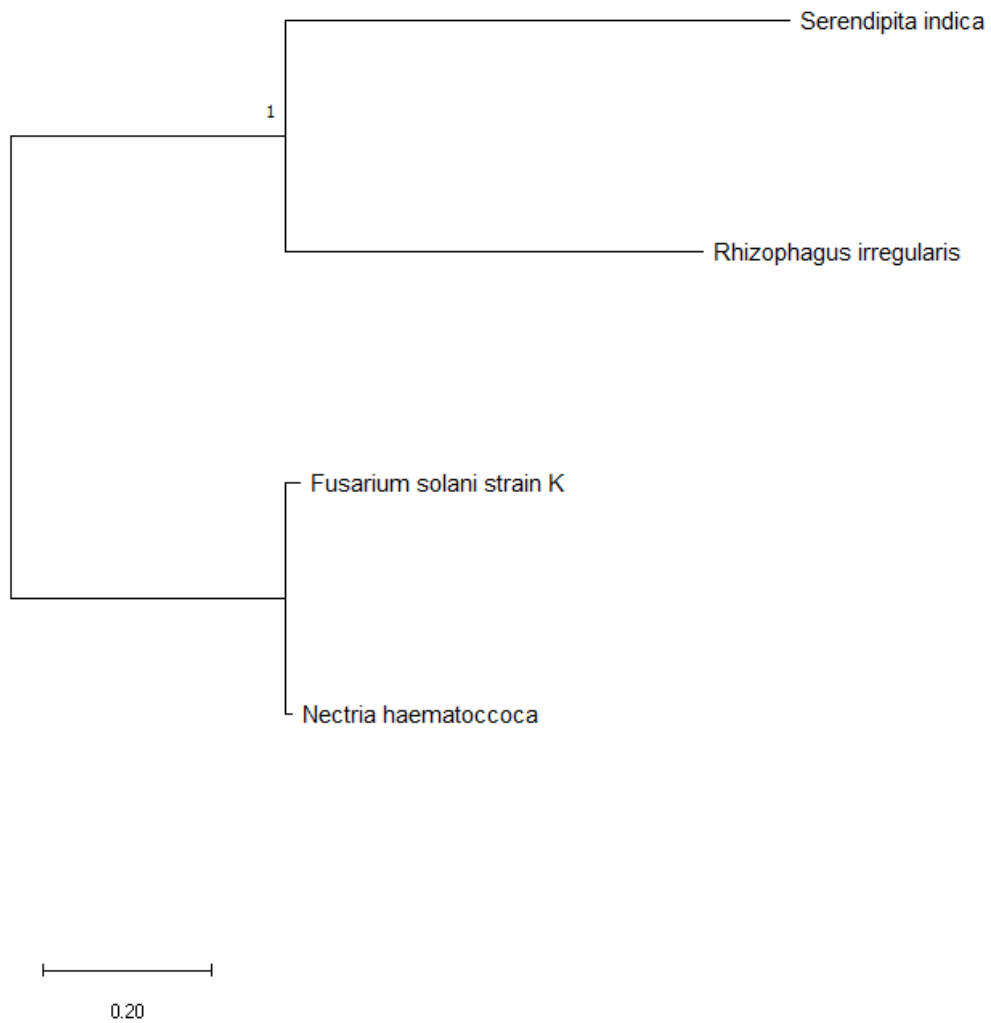
Εικόνα 5: Pipeline επιλογής ορθολόγων γονιδίων μεταξύ μη παθογόνων μυκήτων.

3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΗΖΗΤΗΣΗ

3.1: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΩΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ: *FsK*, *Nectria haematococca*, *Rhizophaqus irregularis* & *Serendipita indica*

3.1.1: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΩΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ

Από την σύγκριση των 4 μυκήτων με το orthofinder και τον υπολογισμό των ορθόλογων πρωτεϊνών στο secretome και στο effectome, φαίνεται ότι, όπως ήταν αναμενόμενο λόγω της φυλογενετικής τους σχέσης, το πρωτόμα του *Nectria* περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό ορθόλογων πρωτεϊνών με τον *FsK* και το μεγαλύτερο ποσοστό ορθόλογων εκρινόμενων πρωτεϊνών και πρωτεϊνών τελεστών με αυτόν (Εικόνα 7). Πρέπει να σημειωθεί ότι αν και σχεδόν το 93% των πρωτεϊνών *Nectria* είναι ορθόλογες με αυτές του *FsK*, μόνο το 70,4% των πρωτεϊνών του *FsK* είναι ορθόλογο με το *Nectria* και το ίδιο μοτίβο μπορεί να παρατηρηθεί στο secretome (Εικόνα 7). Επίσης, ενώ το *Serendipita indica* είναι πιο απομακρυσμένο από το *FsK* σε σύγκριση με από το *Rhizophaqus irregularis*(εικόνα 6) , περιέχει περισσότερες ορθόλογες πρωτεΐνες που υποδηλώνουν ότι διπλασιασμοί του γονιδιώματος ενδέχεται να εμπλέκονται στην εξελικτική απόσταση *FsK* και *Serendipita*.

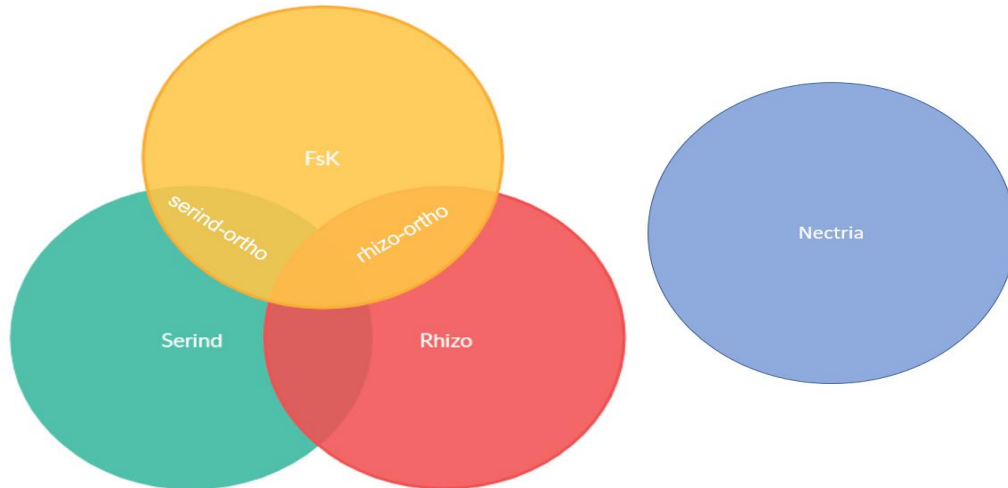


Εικόνα 6: Φυλογενετικό δέντρο που προκύπτει από το συνδυασμό φυλογενετικών δέντρων των πρωτεϊνικών ορθοομάδων που εντοπίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Orthofinder (Emms, DM και Kelly, S, 2019)



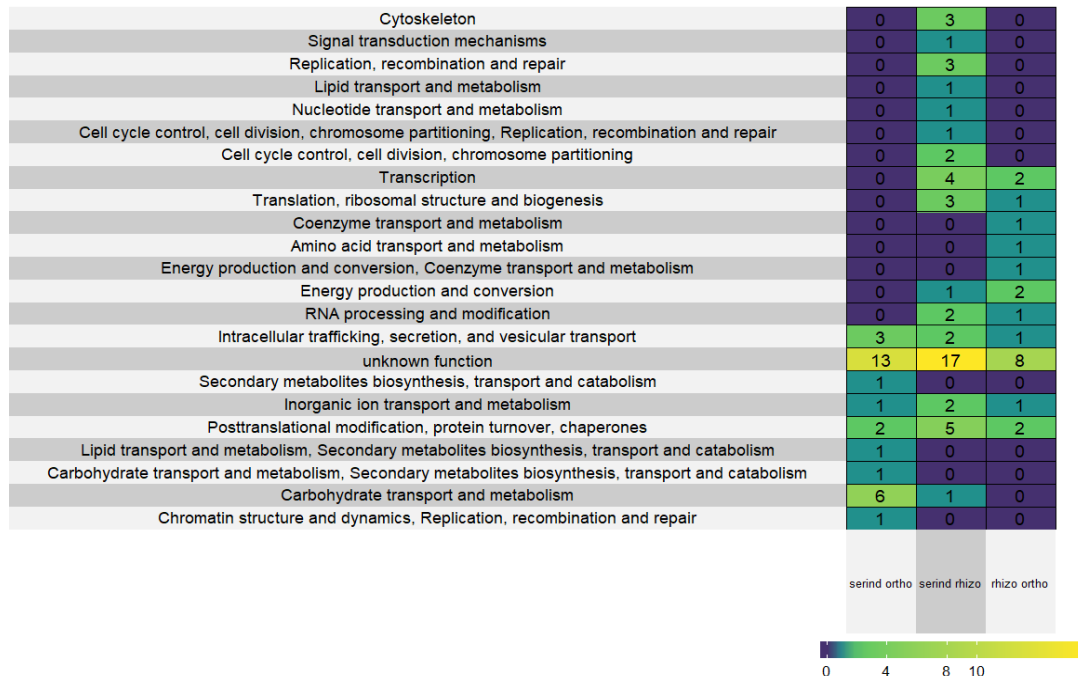
Εικόνα 7: Heatmap, που περιγράφει το ποσοστό πρωτεϊνών Fsk που είναι ορθόλογα με τους άλλους 3 μύκητες και το ποσοστό των άλλων πρωτεομάτων που είναι ορθόλογα με Fsk. Επίσης, απεικονίζεται το ποσοστό των ορθόλογων πρωτεϊνών του του secretome και effectome σε σχέση με το σύνολο των πρωτεϊνών σε κάθε οργανισμό. ετικέτες: necha- *Nectria haematococca* mpVI 77-13-4, rhizo- *Rhizophagus irregularis*, serind-*Serendipita indica*.

Με την προσέγγιση φιλτραρίσματος για τον εντοπισμό πρωτεϊνών Fsk ορθόλογων είτε μεμονωμένα με *Rhizophagus irregularis* ή *Serendipita indica* ή και τα δύο (εικόνα 8) μπορεί να βρεθεί ότι υπάρχουν 21 πρωτεΐνες Fsk ορθόλογες μόνο με το *Rhizophagus irregularis*, 49 Fsk πρωτεΐνες ορθόλογες μόνο με το *Serendipita indica* και 68 Fsk πρωτεΐνες ορθόλογες και με στους δύο συμβιωτικούς μύκητες (Εικόνα 9). Όσον αφορά τα ορθόλογα με το *Serendipita*, το FUN_012643, μια πρωτεΐνη οικογένειας υδατανθράκων εστεράσης 1 (CE1) που αφαιρεί τις ομάδες εστέρα από υδατάνθρακες (Nakamura, Nascimento & Polikarpon, 2017), είναι ορθόλογο με άλλες 4 πρωτεΐνες *Serendipita* (CCA72185, CCA77292, CCA72198, CCA72326) που μοιράζονται την ίδια λειτουργία. Επιπλέον, το FUN_020202 μια εκκρινόμενη πεπτιδάση σερίνης, ορθόλογη μόνο με το *Rhizophagus*, βρέθηκε να είναι ειδική για το στέλεχος Fsk και περιέχει 11 ορθόλογα που έχουν την ίδια λειτουργία σύμφωνα με το uniprot ([https:// www .uniprot.org /](https://www.uniprot.org/)).



Εικόνα 8: Διάγραμμα Venn που περιγράφει την προσέγγιση φιλτραρίσματος για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών FsK ορθολογικών είτε σε *Rhizophagus irregularis* (rhizo-ortho), *Serendipita indica* (serind-ortho) ή και στα δύο. Τα αποτελέσματα φιλτράρονται για να αποκλειστούν ορθοομάδες (πρωτεΐνες με κοινό πρόγονο) που περιέχουν πρωτεΐνες *Nectria*. Επίσης, εξαιρούνται πρωτεΐνες FsK με ορθόλογα στο *Nectria* (eggnog)
Ετικέτες: rhizo-*Rhizophagus irregularis*, serind-*Serendipita indica*, *Nectria*: *Fusarium solani* strain mpVI 77 -14-3.

Σε ό,τι αφορά τη λειτουργική κατηγοριοποίηση αυτών των ορθολογικών γονιδίων, οι περισσότερες πρωτεΐνες του FsK, οι οποίες είναι κοινές ορθόλογες με αυτές του *Serendipita indica*, ανήκουν στη λειτουργική κατηγορία «Μεταφορά υδατανθράκων και μεταβολισμός». Συγκεκριμένα, στην ομάδα αυτή έχουν εντοπισθεί μια major facilitator superfamily πρωτεΐνη που ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών μεταφοράς με ρόλο στη μεταφορά πρωτεϊνών ή άλλων θρεπτικών ουσιών, παίζοντας έτσι ρόλο στον αποικισμό (Nugent, Ali, Mullins, & Doohan, 2019) καθώς και μια πρωτεΐνη γλυκοσιδικής υδρολάσης 18 (FUN_009226), η οποία στους μύκητες δρα ως χιτινάση (eggnog seed ortholog: CADAORAP00011399 στο *Aspergillus oryzae*). Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες αυτής της λειτουργικής κατηγορίας ανήκουν στην οικογένεια των υδρολασών γλυκόζης (κατηγορία 28) (Πίνακας 1) που δρουν ως πολυγαλακτορουνάσες που παίζουν ρόλο στην εισβολή μυκήτων στο φυτό. Οι πολυγαλακτορουνάσες, όμως, μπορούν να ανασταλούν από τις πρωτεΐνες αναστολής της πολυγαλακτορουνάσης (PG) (PGIP) (LRR στην πραγματικότητα) και έτσι ουσιαστικά να δρουν ως παράγοντες επαγωγής αντίστασης ενάντια στο παθογόνο (Chang et al., 2016). Στην ορθοομάδα αυτή ανήκουν τα γονίδια του FsK, FUN_008289 και FUN_008291. Το orthogroup αυτό περιέχει μόνο ένα *Serendipita* ortholog CCA76753 το οποίο έχει την ίδια λειτουργία (<https://www.uniprot.org/uniprot/G4TZL0>).



Εικόνα 9: Heatmap που περιγράφει τις διαφορές μεταξύ των λειτουργικών ομάδων πρωτεϊνών FsK ορθόλογων είτε μόνο *Rhizophagus irregularis*, *Serendipita indica* ή και τα δύο (rhizo ortho, serind ortho και serind rhizo αντίστοιχα) που βρέθηκαν να μην είναι ομόλογα με το *Nectria*. Κάτω ετικέτες: rhizo- *Rhizophagus irregularis*, serind-*Serendipita indica*. Κάθε πρωτεΐνη εκχωρείται σε μια ορθολογική ομάδα (COG) από eggnog-mapper (Huerta-Cepas et al., 2019) και η λειτουργική κατηγορία που μοιράζονται όλα τα μέλη μίας ορθολογικής ομάδας μεταφέρονται στην πρωτεΐνη FsK. Οι λειτουργικές κατηγορίες «unknown function» και «poorly characterized» έχουν συγχωνευθεί.

Από τις υπόλοιπες λειτουργικές κατηγορίες, 4 πρωτεΐνες βρέθηκαν να υπάρχουν σε λειτουργικές κατηγορίες που περιέχουν ορθόλογα μόνο με το *Serendipita indica* (Πίνακας 2). Συγκεκριμένα, μια πρωτεΐνη του FsK με επικράτεια πρόσδεσης θειορεδοξίνης τύπου DSBA, που είναι υπεύθυνη για την κατάλυση του σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, εμφανίζεται υπερεκφραζόμενη στο *Alternaria brassicicola* μετά από έκθεση στους μεταβολίτες αμυλομαγαδαΐνης, καμαλεξίνης και αλλυλ-ισοθειουρανικού (Sellam, Dongo, Guillemette, Hudhomme, & Simoneau, 2007) είναι ορθόλογη με 2 πρωτεΐνες (CCA70500, CCA70503) που εμφανίζουν την ίδια λειτουργία. Επιπλέον, το FUN_009954 φαίνεται να κωδικοποιεί για έναν μεταφορέα μονοκαρβοξυλικού όπως το γαλακτικό, το πυροσταφυλικό και το οξικό. Έχει αναφερθεί ότι ο μεταφορέας αυτός είναι απαραίτητος για την ομοιοστάση και μολυσματικότητα στα *Botrytis cinerea* και *Rhizophagus irregularis* (Tisserant et al., 2012), όπου εκφράζεται 10 φορές περισσότερο έπειτα από μόλυνση στο *Medicago truncatula*. Η πρωτεΐνη αυτή που εμφανίζεται ειδικά στον FsK (και όχι στο παθογόνο συγγενικό του είδος), εμφανίζει ορθολογία με 1 πρωτεΐνη του *Serendipita indica* (CCA73652) (<https://www.uniprot.org/uniprot/G4TQQ9>).

geneid	functional description
FUN_005837	Major Facilitator Superfamily
FUN_008289	Belongs to the glycosyl hydrolase 28 family
FUN_008291	Belongs to the glycosyl hydrolase 28 family
FUN_009226	Belongs to the glycosyl hydrolase 18 family
FUN_016787	Belongs to the glycosyl hydrolase 28 family
FUN_016790	Belongs to the glycosyl hydrolase 28 family

Πίνακας 1: Πρωτεΐνες FsK που ανήκουν στη λειτουργική κατηγορία «Μεταφορά υδατανθράκων και καταβολισμός» (Εικόνα 13), ορθόλογες μόνο στο *Serendipita indica*.

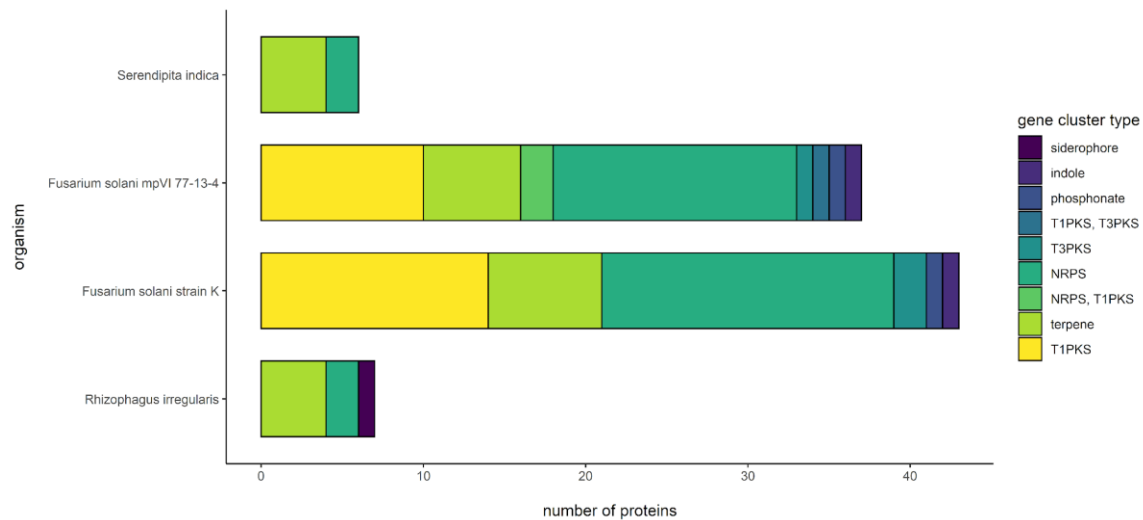
geneid	COG	functional description
FUN_000231	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	DSBA-like thioredoxin domain
FUN_009954	Lipid transport and metabolism, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	monocarboxylate transporter
FUN_011595	Chromatin structure and dynamics, Replication, recombination and repair	Telomerase ribonucleoprotein complex - RNA binding domain
FUN_010154	Carbohydrate transport and metabolism, Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	NADP d-xylose dehydrogenase

Πίνακας 2: Λειτουργική σημείωση των πρωτεϊνών FsK ορθόλογα μόνο με το *Serendipita indica*, οι κάθε πρωτεΐνη εκχωρείται σε μια ορθολογική ομάδα (COG) με το eggnog-mapper (Huerta-Cepas et al., 2019) και η λειτουργική κατηγορία που μοιράζονται όλα τα συστατικά της ορθολογικής ομάδας μεταφέρονται σε αυτήν.

3.1.2: Σύγκριση βιοσυνθετικών γονιδίων δευτερογενών μεταβολιτών

Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα ο FsK έχει τις περισσότερες πρωτεΐνες βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα τις λιγότερες ομάδες διαθέτουν οι άλλοι 2 μη παθογόνοι μύκητες, οι οποίοι διαθέτουν μόνο γονίδια βιοσύνθεσης τερπενοειδών και μη ριβοσωμικών πεπτιδίων. Το *Rhizophagus irregularis* διαθέτει μια συστοιχία γονιδίων υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση σιδηροφόρων. Επιπλέον ο FsK διαθέτει μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση πολυκετιδίων τύπου 1, τερπενοειδών και μη ριβοσωμικών πεπτιδίων. Τέλος ο *Nectria (Fusarium solani)*

mpVI 77-13-4) διαθέτει πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν να δράσουν στο σχηματισμό μεικτού τύπου(γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα βιοσύνθεσης τύπου 1 και τύπου 3 ριβοσωμικών πεπτιδίων) δευτερογενών μεταβολιτών.

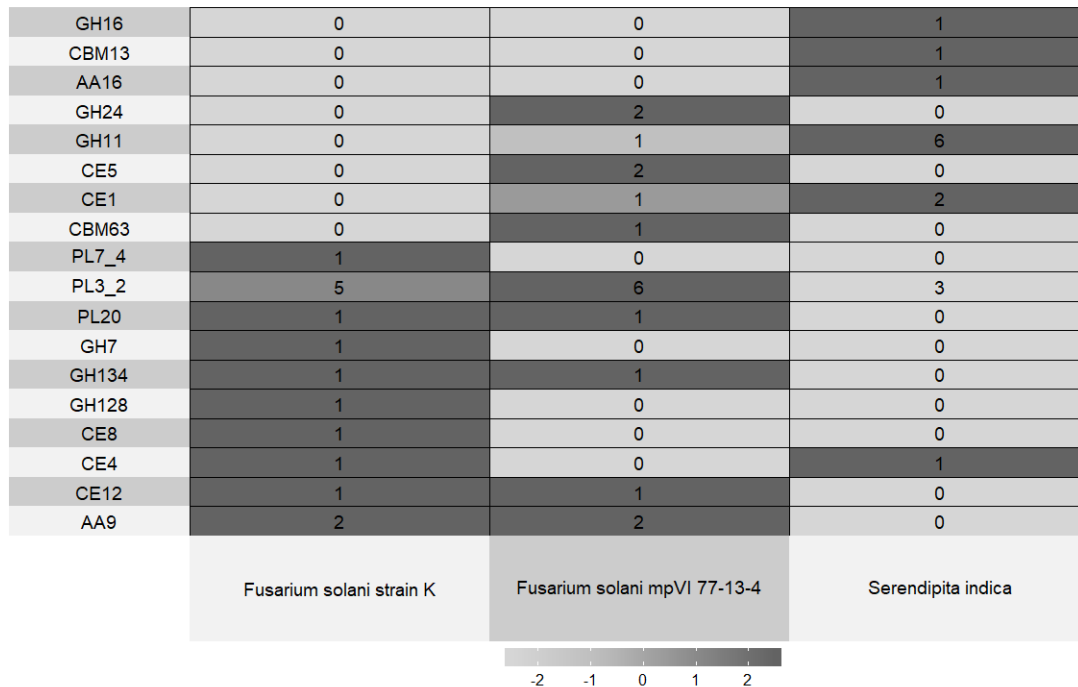


Εικόνα 10: Σύγκριση των ομάδων δευτερογενών μεταβολιτών που υπάρχουν σε κάθε μύκητα. T1 / 3PKS: τύπος 1/3 συνθετάσης πολυκετιδίων, NRPS: συνθετάση μη ριβοσωμικού πεπτιδίου

3.1.3: Cazymes στο apoplastome

Από την ανάλυση του secretome, του effectome και του apoplastome προέκυψε ο εντοπισμός cazymes στο apoplastome κάθε ενός από τους 4 μύκητες και η σύγκριση του αριθμού κάθε ομάδας στις κατηγορίες cazyme. Συγκεκριμένα, υπάρχουν 2 cazymes στον αποπλάστη που εμφανίζονται μόνο στο παθογόνο στέλεχος του *Fusarium solani*: 1) 2 CH24 πρωτεΐνες από την οικογένεια των υδρολασών που λειτουργούν ως λυσοζύμες έναντι βακτηριακών πεπτιδογλυκανών (Zhao, Liu, Wang, & Xu, 2013) και 2) 2 Οι πρωτεΐνες CE5 που ανήκουν στις εστεράσες υδατανθράκων, συσσωρεύονται και λειτουργούν ως κουτινάσες δηλαδή, πρωτεΐνες που διασπούν την επιδερμίδα των φυτών (Zhao, Liu, Wang, & Xu, 2013). Ένα μέλος των λυασών PL7_4 που υπάρχει μόνο στο FsK apoplastome λειτουργεί ως αλγινική λύαση: υπεύθυνη για την αποικοδόμηση του αλγινικού, , που αποτελείται από μια γραμμική δομή ετεροπολυσακχαρίτη που λαμβάνεται από τα κυτταρικά τοιχώματα των καφέ αλγών (Advanced Functional Polymers for Biomedical) Εφαρμογές, 2019). Από την οικογένεια των εστερασών υδατανθράκων CE8, μια πεκτινεστεράση (Zhao, Liu, Wang, & Xu, 2013) εμφανίζεται μόνο στο apoplastome του FsK. Επιπλέον, 2 πρωτεΐνες από την οικογένεια υδρολασών υπάρχουν μόνο στο FsK apoplastome: 1) GH7 που τροποποιεί τα υπολείμματα κυτταρίνης (<http://www.cazy.org/GH7.html>), 2) GH128 που αποικοδομεί β-1,3 γλυκάνες

από το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων (Sakamoto, Nakade, & Konno, 2011). Τέλος, 2 οικογένειες *cazymes* εμφανίζουν μεγάλες διαφορές στον αριθμό των πρωτεϊνών: οι 1) GH11, ημικυτταρινάσες (Zhao, Liu, Wang, & Xu, 2013) οι οποίες παρουσιάζονται υπερεκφρασμένες στο *Serendipita indica*, 2) PL3_2 μια πηκτική λυάση (http://www.cazy.org/PL3_2.html) που διασπά την πηκτίνη ένα συστατικό του τοιχώματος των φυτικών κυττάρων (Zhao, Liu, Wang, & Xu, 2013) με το γένος *Fusarium* να έχει κυρίως 2 γονίδια, με το παθογόνο στέλεχος να έχει 1 επιπλέον πρωτεΐνη σε αυτή την κατηγορία.



Εικόνα 11: Heatmap που απεικονίζει την αφθονία διαφόρων οικογενειών *cazyme* στο απορλαστόμα του *Fusarium solani* στέλεχος K, *Fusarium solani* mpVI 77-13-4 και *Serendipita indica*. Τα δεδομένα μετατράπηκαν σε τιμές \log_2 χρησιμοποιώντας μια προηγούμενη μέτρηση 2. Η κανονικοποίηση έγινε με το πακέτο *BBmisc* (Bischl et al., 2017) στο R 3.6.1 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «εύρος» και κλίμακα από -2,5 έως 2,5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν ότι η οικογένεια υπερεκπροσωπείται ή υποεκπροσωπείται αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Οι αριθμοί υποδεικνύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών σε κάθε είδος ανα κατηγορία *cazyme*.

3.2: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΟΝΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ FUSARIUM

Από τα συγκριτικά στατιστικά στοιχεία των γονιδιωμάτων *Fusarium solani* στελέχους K και *Fusarium solani* ηρVI 77-13-4 μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι το FsK έχει μεγαλύτερο γονιδίωμα, περισσότερα γονίδια κωδικοποίησης πρωτεΐνης και λιγότερα ιντρόνια και εξόνια. Επιπλέον, το στέλεχος ηρVI έχει μεγαλύτερο ποσοστό ιντρονίων και εξωνίων ως προς με το μέγεθος του γονιδιώματος σε σύγκριση με τον FsK. Αυτά τα ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με τις γενικές στατιστικές των γονιδιωμάτων παθογόνων και μη, καθώς συνήθως τα γονιδιώματα των παθογόνων των φυτών είναι ελαφρώς μεγαλύτερα από αυτά άλλων μυκητιακών ειδών και περιέχουν λιγότερες κωδικές αλληλουχίες σε σχέση με το μέγεθος του γονιδιώματος τους (Aylward J et al. , 2017). Το γονιδίωμα του FsK έχει μεγαλύτερο μέσο μέγεθος ιντρονίου και εξωνίου, αλλά το μέσο μήκος πρωτεΐνης είναι 100aa μικρότερο. Οι πρωτεΐνες και τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες έχουν τον ίδιο αριθμό και στους δύο οργανισμούς (Πίνακας 8).

stats	Fusarium solani strain K	Fusarium solani mpVI 77-13-4
genome size(Mb)	54.859	51.292
gene number	22258.000	15705.000
L50(Mb)	0.321	3.622
%CG content	49.060	50.790
number of introns	19636.000	32675.000
number of exons	41895.000	48380.000
%genome(exons)	42.660	46.000
%genome(introns)	3.880	5.240
total length exons	23402713.000	23607931.000
total length introns	2126644.000	2688366.000
max %GC (CDS)	69.610	69.730
mean %GC (CDS)	54.850	54.540
min %GC (CDS)	38.160	16.360
max %GC (exons)	100.000	100.000
mean %GC (exons)	54.170	53.230
min %GC (exons)	0.000	0.000
max %GC (introns)	74.000	83.330
mean %GC (introns)	46.800	46.470
min %GC (introns)	12.400	6.000
max %AT (CDS)	61.840	83.640
mean %AT (CDS)	45.150	45.460
min %AT (CDS)	30.390	30.270
max %AT (exons)	100.000	100.000
mean %AT (exons)	45.830	46.780
min %AT (exons)	0.000	0.000
max %AT (introns)	87.600	94.000
mean %AT (introns)	53.200	53.530
min %AT (introns)	26.000	16.670
max length(CDS)	23973.000	22950.000
mean length(CDS)	1051.000	1441.000
min length(CDS)	153.000	150.000
max length(exons)	14961.000	22950.000
mean length(exons)	559.000	488.000
min length(exons)	3.000	1.000
max length(introns)	9989.000	8864.000
mean length(introns)	108.000	82.000
min length(introns)	23.000	11.000
max length(aa)	7990.000	7649.000
mean length(aa)	349.000	479.000
min length(aa)	50.000	49.000

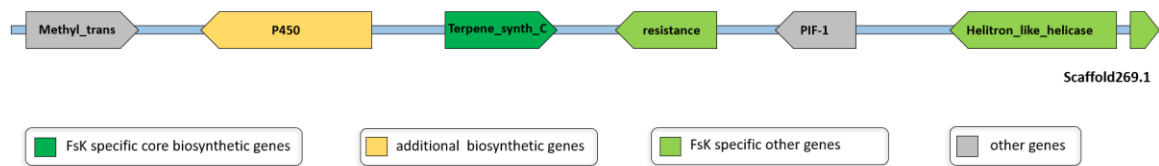
Πίνακας 3: Στατιστικά στοιχεία γονιδιώματος των *Fusarium solani* στελεχών K και *Fusarium solani* mpVI 77-13-4 για γονιδίωμα, CDS, ιντρόνια, εξόνια και πρωτεΐνες (υπολογίστηκαν μόνο τα ιντρόνια και τα εξόνια από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες).

Τέλος αν και φαίνεται ότι από το %GC του γονιδιώματος, το FsK είναι πιο πλούσιο σε AT-rich περιοχές, από τις μέσες τιμές των ποσοστών %GC και % AT στις κωδικές περιοχές, στα ιντρόνια και τα εξόνια του φαίνεται ότι ο FsK είναι πιο πλούσιος σε GC και στις 3 αυτές περιοχές (Πίνακας 8).

3.2.1: Σύγκριση τερπενίων και πολυκετιδίων τύπου 1 του FsK-*Nectria*

Ο αριθμός των βιοσυνθετικών «συστοιχιών» υπεύθυνων για τη βιοσύνθεση τερπενίων στα *Nectria* και FsK είναι 6 και 7 αντίστοιχα. Ανάλογα με τη λειτουργία των κυρίων (core: γονίδια υπεύθυνα για την κύρια δομή του μεταβολίτη) και των επιπρόσθετων (additional: υπεύθυνα για δευτερεύουσες τροποποιήσεις) γονιδίων τους και μπορεί να ταξινομηθεί, ως ομάδων *Nectria*-FsK (οι αριθμοί δηλώνουν τα scaffolds στα οποία ανήκουν τα γονίδια υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση μεταβολιτών σε *Nectria*-FsK αντίστοιχα): 1.1 και 100.1 (core: τερπενική κυκλάση) 5.1 & 50.1 (core: συνθετάση πολυπρενυλίου) 11.2 110.1 (core: συνθετάσης φυτοενίου), αλλά το FsK δεν διαθέτει ένα μεταφορέα φαινηλαανίνης, 12.4 και 141.1 (core: συνθετάση τριχοδιενίου), αλλά το FsK scaffold δεν διαθέτει P450s. Η επιπλέον συστάδα γονιδίων στο FsK (269.1) δεν υπάρχει στο *Nectria* (Εικόνα 16) με FUN_021640 μια ελικάση DNA ειδικά για το στέλεχος, Επιπλέον, το FsK περιέχει περισσότερες βιοσυνθετικές συστάδες συνθετάσης τύπου 1-rokyketide από *Nectria* (14 και 10 αντίστοιχα) και ειδικές πρωτεΐνες FsK βρίσκονται σε διάφορους συστάδες, ιδίως μια πρωτεΐνη ανθεκτικότητας σε γλυκοσαλάση / βλεομυκίνη από το σύμπλεγμα 110.2 (FUN_018217).

Fusarium solani strain K



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση της μη ομόλογης με το *Nectria* βιοσυνθετική συστάδας γονιδίων 269.1. Τοποθεσία στο γονιδίωμα: scaffold 269.1 4.019 - 25.239 nt, γονίδια από αριστερά προς τα δεξιά: FUN_021635-FUN_021641.

4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από την σύγκριση των 4^{ων} μυκήτων προκύπτει ότι ο Fsk διαθέτει μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών ορθολόγων μόνο με το *Serendipita indica* σε σχέση με αυτά που είναι ορθόλογα μόνο με το *Rhizophagus irregularis*. Από την ανάλυση φαίνεται ότι όσον αφορά τα γονίδια ορθόλογα με το *Serendipita* περισσότερη έμφαση καλείται να δοθεί στις πολυγαλακτοουρονάσες έτσι ώστε να εντοπιστεί εάν υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και φυτικών αναστολών πολυγαλακτοουρονασών (PGIPs), τα οποία διαθέτουν επικράτειες λευκίνης, δεσμεύοντας με αυτό τον τρόπο πολυγαλακτοουρονάσες αποτρέποντας την αποικοδομική τους δράση, συντελώντας στην αύξηση της ανθεκτικότητας του φυτού έναντι του μύκητα (Chang et al., 2016). Από την ανάλυση του aro1astome προκύπτει ότι ο Fsk διαθέτει εξελικτικά απομακρυνσμένα ή μικρότερο αριθμό ένζυμων διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος, χωρίς ωστόσο να μπορεί να εξηγηθεί η μη παθογένεια. Ακόμη, από την ανάλυση των βιοσυνθετικών συστάδων δευτερογενών μεταβολιτών, προέκυψε ότι ο Fsk διαθέτει τον μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτείνες υπεύθυνες για τη βιοσύνθεση τερπενίων, μη, ριβοσωμικών πεπτιδίων με 1 cluster βιοσύνθεσης τερπενίων μη ομόλογο με το *Nectria*, με το παθογόνο να είναι το μόνο που διαθέτει μικτού τύπου βιοσυνθετικές συστάδες. Αυτό μπορεί να δηλώνει ότι οι 2 μύκητες αν και σχετικά κοντινοί εξελικτικά αλλά το μεταβολικό τους προφίλ διαφέρει καθώς οι μικτοί αυτοί δευτερογενείς μεταβολίτες μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την παθογόνο δράση του *Nectria* ή/και ο Fsk να παράγει μεταβολίτες με προστατευτική δράση έναντι μυκήτων και άλλων οργανισμών (Pusztahelyi, Holb, & Pócsi, 2015). Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι το γονιδίωμα του Fsk αν και μη παθογόνο αποτελεί εξαίρεση σε σχέση με άλλα γονιδιώματα μη παθογόνων, καθότι εμφανίζει μεγαλύτερο μέγεθος με το παθογόνο. Συνεπώς απαιτείται η ανάγκη αύξησης την ποιότητας αυτών των «περισσευόμενων» περιοχών, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί μέσω της εκ νέου αλληλούχησης με τη χρήση τελευταίας γενιάς τεχνολογιών (nanopore). Με αυτόν τον τρόπο θα αυξηθεί δραματικά η κάλυψη του γονιδιώματος βελτιώνοντας την ποιότητα των παραπάνω αναλύσεων όπου σε συνδιασμό με προσεγγίσεις μεταβολομικής μπορεί να δώσουν μία πιο λεπτομερή σκοπιά στο χωροχρόνο των αλληλεπιδράσεων.

5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aylward, J., Steenkamp, E. T., Dreyer, L. L., Roets, F., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2017). A plant pathology perspective of fungal genome sequencing. *IMA Fungus*, 8(1), 1–15. doi: 10.5598/ima fungus.2017.08.01.01
2. Jon Love et al., 2019, <https://funannotate.readthedocs.io/en/latest/>
3. Jose Juan Almagro Armenteros, Casper Kaae Sønderby, Søren Kaae Sønderby, Henrik Nielsen, Ole Winther; DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning, *Bioinformatics*, btx431.
4. Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; Madden, T. L. (2009). "BLAST+: Architecture and applications". *BMC Bioinformatics*. 10: 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421. PMC 2803857. PMID 20003500.
5. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 2009 Aug 1;25(15):1972-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btp348.
6. Chang, H., Yendrek, C.R., Caetano-Anolles, G. et al. Genomic characterization of plant cell wall degrading enzymes and in silico analysis of xylanses and polygalacturonases of *Fusarium virguliforme*. *BMC Microbiol* 16, 147 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0761-0>
7. Chen TW et al., (2017). FunctionAnnotator, a versatile and efficient web tool for non-model organism annotation. *Scientific Reports*
8. Coleman, J.J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant Pathol.* 17: 146–158.
9. Coleman, J.J. et al. (2009). The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PLoS Genet.* 5: e1000618.
10. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W, et al. Ensembl (2019). *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1): D745–D751. doi:10.1093/nar/gky1113.
11. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1), 113. doi: 10.1186/1471-2105-5-113
12. Emms, D.M. and Kelly, S. (2019) OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biology* 20:238

13. Garantonakis, N., Pappas, M.L., Varikou, K., Skiada, V., Broufas, G.D., Kavroulakis, N., and Papadopoulou, K.K. (2018). Tomato Inoculation With the Endophytic Strain *Fusarium solani* K Results in Reduced Feeding Damage by the Zoophytophagous Predator *Nesidiocoris tenuis*. *Front. Ecol. Evol.* 6: 126
14. Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic acids research*, 47(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>.
15. Kai Blin, Simon Shaw, Katharina Steinke, Rasmus Villebro, Nadine Ziemert, Sang Yup Lee, Marnix H Medema, Tilmann Weber, antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue W1, 02 July 2019, Pages W81–W87, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>.
16. Kavroulakis, N., Doupis, G., Papadakis, I.E., Ehaliotis, C., and Papadopoulou, K.K. (2018). Tolerance of tomato plants to water stress is improved by the root endophyte *Fusarium solani* FsK. *Rhizosphere* 6: 77–85
17. Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G.I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., and Papadopoulou, K.K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J. Exp. Bot.* 58: 3853–3864.
18. Kavroulakis, N., Papadopoulou, K.K., Ntougias, S., Zervakis, G.I., and Ehaliotis, C. (2006). Cytological and other aspects of pathogenesis-related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. *Ann. Bot.* 98: 555–564
19. Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology*, 13(5), e1005457. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005457
20. Maryam, M., Fu, M. S., Alanio, A., Camacho, E., Goncalves, D. S., Faneuff, E. E., ... Coelho, C. (2019). The enigmatic role of fungal annexins: The case of *Cryptococcus neoformans*. *BioRxiv*, 536193. doi: 10.1101/536193
21. McKinney, W. (2010). *Data Structures for Statistical Computing in Python*. 56–61. Austin, Texas. doi: 10.25080/Majora-92bf1922-00a
22. Mendoza-Mendoza, A., Steyaert, J., Nieto-Jacobo, M. F., Holyoake, A., Braithwaite, M., & Stewart, A. (2015). Identification of growth stage molecular markers in *Trichoderma* sp. “atroviride type B” and their potential application in monitoring fungal growth and development in soil. *Microbiology (Reading, England)*, 161(11), 2110–2126. doi: 10.1099/mic.0.000167

23. Nakamura, A. M., Nascimento, A. S., & Polikarpov, I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 35–51. doi: 10.1016/j.biori.2017.02.001
24. Neph S, Kuehn MS, Reynolds AP, et al. BEDOPS: high-performance genomic feature operations. *Bioinformatics*. 2012;28(14):1919–1920. doi:10.1093/bioinformatics/bts277.
25. Nugent, B., Ali, S. S., Mullins, E., & Doohan, F. M. (2019). A Major Facilitator Superfamily Peptide Transporter From *Fusarium oxysporum* Influences Bioethanol Production From Lignocellulosic Material. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00295
26. Oliw, E. H. (2002). Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68–69, 313–323. doi: 10.1016/s0090-6980(02)00037-0
27. Pappas, M.L., Liapoura, M., Papantoniou, D., Avramidou, M., Kavroulakis, N., Weinhold, A., Broufas, G.D., and Papadopoulou, K.K. (2018). The Beneficial Endophytic Fungus *Fusarium solani* Strain K Alters Tomato Responses Against Spider Mites to the Benefit of the Plant. *Front. Plant Sci.* 9: 1603.
28. Plissonneau, C., Benevenuto, J., Mohd-Assaad, N., Fouché, S., Hartmann, F. E., & Croll, D. (2017). Using Population and Comparative Genomics to Understand the Genetic Basis of Effector-Driven Fungal Pathogen Evolution. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00119
29. Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00573
30. R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
31. Sakamoto, Y., Nakade, K., & Konno, N. (2011). Endo- β -1,3-Glucanase GLU1, from the Fruiting Body of *Lentinula edodes*, Belongs to a New Glycoside Hydrolase Family ν . *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23), 8350–8354. doi: 10.1128/AEM.05581-11
32. Savojardo, C, Martelli, PL, Fariselli, P, Profiti, G, Casadio, R (2018) BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W459-W466.
33. Sellam, A., Dongo, A., Guillemette, T., Hudhomme, P., & Simoneau, P. (2007). Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria*

- brassicicola. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 195–208. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00387.x
34. Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular plant pathology*, 19(9), 2094–2110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12682>
 35. Sperschneider Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., ... Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182–207. doi: 10.1093/femsre/fuv05
 36. Stougaard, J. (2005). *Lotus japonicus handbook*. Marquez AJ, chapter 1, pp 3-24.
 37. Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., ... Martin, F. (2012). The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist*, 193(3), 755–769. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03948.x
 38. Touchman, J. (2010). "Comparative Genomics". *Nature Education Knowledge*. 3 (10): 13.
 39. Unkles, S., Symington, V., Kotur, Z., Wang, Y., Siddiqi, M., Kinghorn, J., & Glass, A. (2011). Physiological and Biochemical Characterization of AnNitA, the *Aspergillus nidulans* High-Affinity Nitrite Transporter. *Eukaryotic Cell*, 10, 1724–1732. doi: 10.1128/EC.05199-11
 40. Xia, X. (2013). *Comparative Genomics*. SpringerBriefs in Genetics. Heidelberg: Springer. doi:10.1007/978-3-642-37146-2. ISBN 978-3-642-37145-5. S2CID 5491782.
 41. Zhang H, Yohe T, Huang L, Entwistle S, Wu P, Yang Z, Busk PK, Xu Y, Yin Y. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1): W95-W101. doi: 10.1093/nar/gky418.
 42. Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., & Xu, J.-R. (2014). Correction: Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 15(1), 6. doi: 10.1186/1471-2164-15-6
 43. Principles of Biology—OpenStax CNX. <https://cnx.org/contents/24nl-KJ8@24.18:uVdR6VSq/Kingdom-Fungi>