



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΜΥΚΗΤΩΝ: Η
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΖΥΜΩΝ ΤΟΥ ΜΗ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ, ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟΥ ΜΥΚΗΤΑ
Fusarium solani Strain K**

Όνομα: Ζαχαριάδης Ιωάννης-Παναγιώτης

Πατρώνυμο: Μιχαήλ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

**FUNGAL COMPARATIVE GENOMICS: THE CAZYMES AND
PROTEASES DIVERGENCE OF THE NON-PATHOGENIC,
ENDOPHYTIC *Fusarium Solani* Strain K**

Τριμελής επιτροπή:

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

Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας &
Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνιος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-
Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σε αυτό το πολύ οργανωμένο και συνάμα φιλικό περιβάλλον γνώρισα ανθρώπους που με στήριζαν και με συμβούλευαν καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών. Σας ευχαριστώ που με επιλέξατε στο εργαστήριο σας για την κατανόηση που μου δείξατε καθώς και για τις συμβουλές τις συμβουλές που μου δώσατε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Τσιουρή Όλγα και Φέκα Μαρία, υποψήφιους διδάκτορες στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών. Σας ευχαριστώ για την υπομονή, την αμέριστη βοήθεια και τις συμβουλές που μου δώσατε. Τέλος δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στηρίζει πάντα, αλλά και τους φίλους μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Μύκητες	7
1.2 Άμυνα Φυτών εναντίον παθογόνων	9
1.3 Σύμπλεγμα <i>Fusarium solani</i>	10
1.4 <i>Fusarium solani</i> στελεχος Κ.....	11
1.5 <i>Fusarium vanettenii</i> 77-13-4.....	12
1.6 <i>Rhizophagus irregularis</i>	13
1.7 <i>Serendipita indica</i>	14
1.8 Φυτικό κυτταρικό τοίχωμα.....	15
1.9 Υδρολυτικά ένζυμα.....	17
1.10 Πρωτεολυτικά ένζυμα.....	18
1.11 Secretome.....	19
2.ΣΚΟΠΟΣ	20
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
4.1 Υδρολυτικά ένζυμα του Secretome.....	23
4.1.1 Γλυκοσιδάσες (GH).....	23
4.1.2 Πολυσακχαρικές Λυάσες (PL).....	26
4.1.3 Υδατανθρακικές εστεράσες (CE).....	28
4.1.4 Βοηθητικά ένζυμα (AA).....	30
4.1.5 Μονάδες δέσμευσης σε υδατάνθρακες (CBM).....	32
4.1.6 Ένζυμα με μικτές κλάσεις.....	34
4.2 Πρωτεολυτικά ένζυμα του Secretome.....	35
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	42

Περίληψη

Οι μύκητες και τα φυτά εκκρίνουν μία μεγάλη ποικιλία μορίων στον εξωκυτταρικό τους χώρο τα οποία εμπλέκονται σε πολλές και σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η σηματοδότηση, η απόκτηση θρεπτικών για την επιβίωση, η απόκριση σε διάφορους τύπους στρες και άλλες. Οι μύκητες κατέχουν μία μεγάλη ποικιλία οικολογικών ρόλων, καθώς μπορεί είτε να λειτουργούν ως σαπροφυτικοί οργανισμοί που ζουν ελεύθεροι στο περιβάλλον είτε να αναπτύσσουν διάφορες σχέσεις με τα φυτά. Από τη φύση των σχέσεων αυτών οι μύκητες διακρίνονται σε υποχρεωτικά βιοτροφικοί έως και νεκροτροφικοί σκοτώνοντας το φυτό-ξενιστή και απορροφώντας τα απελευθερωμένα θρεπτικά. Οι βιοτροφικοί μύκητες, είτε αυτοί είναι συμβιωτές που έχουν θετικές επιπτώσεις στην λειτουργία του φυτού ξενιστή είτε είναι παθογόνοι προκαλώντας σημαντικές ζημιές και ασθένειες, είναι απαραίτητο να καταφέρουν με κάποιο τρόπο να αποφύγουν ή να καταστείλουν τις αμυντικές αποκρίσεις του φυτού κάτι που το πετυχαίνουν με τα μόρια αυτά που εκκρίνουν εξωκυτταρικά. Έτσι υπάρχει μία κοινή στρατηγική για την επίτευξη της συμβίωσης ή της παθογένειας, η οποία συνίσταται στην έκκριση μορίων που ως επί το πλείστον αποτελούν πρωτεΐνες με ενζυμική δραστηριότητα. Ο διαφορετικός συνδυασμός των πρωτεϊνών αυτών σε κάθε μύκητα, συντελεί στην υιοθέτηση των ποικίλων οικολογικών ρόλων των μυκήτων αποτελώντας κατά αυτόν τον τρόπο και την ιδιότυπη ταυτότητά τους. Στην συγκεκριμένη ανάλυση συγκριτικής γονιδιωματικής έγινε η προσπάθεια ανίχνευσης των υποθετικών υδρολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνουν τέσσερις πολύ καλά μελετημένοι μύκητες, το γονιδίωμα των οποίων έχει χαρτογραφηθεί. Οι μύκητες ανήκουν σε διαφορετικές διαιρέσεις και χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς τρόπους ζωής. Από την σύγκριση προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα που σε πολλές περιπτώσεις επιβεβαίωσαν τις ήδη διατυπωμένες θεωρίες συσχέτισης συγκεκριμένων οικογενειών ενζύμων με διάφορες διαιρέσεις των μυκήτων καθώς και με ποικίλους τρόπους ζωής. Η κατανόηση της σχέσης που έχουν οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται, με τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ φυτών και μυκήτων είτε αυτές είναι ωφέλιμες για το φυτό είτε είναι παθογόνες, θα βοηθήσει στην υιοθέτηση βελτιωμένων μεθόδων καλλιέργειας που θα οδηγήσουν σε μία πιο βιώσιμη γεωργία. Η ανάγκη για μία βιώσιμη γεωργία είναι σήμερα πιο επιτακτική από ποτέ, καθώς οι συνέπειες της κλιματικής αλλαγής αλλά και των συνεχώς αυξανόμενων αναγκών σε τρόφιμα είναι όλο και πιο εμφανείς.

Abstract

Fungi and plants secrete a wide variety of extracellular molecules which are involved in many important biological processes, such as signaling, the acquisition of nutrients for survival, responses in different types of stresses and others. Fungi possess a wide variety of ecological niches, since they can live either as saprophytes which are free living organisms or they can develop different types of interactions with the plants which vary from obligate biotrophic to necrotrophic relationships in which the death of the plant is required for the absorption of the released nutrients from the saprotrophic fungus. Biotrophic fungi, can be either symbionts which confer positive effects to the plants they colonize, or they can be pathogenic causing damage and different diseases. Both of them must find a way to suppress or avoid the defensive responses of the plants, and in order to do so they secrete different molecules extracellularly. Thus, there is an existing common strategy for the establishment of the symbiosis or pathogenesis which is based in the secretion of molecules the majority of which are proteins with enzymatic activity, however the different combination of the proteins on each fungus leads to the acquisition of diverse ecological niches by fungi, and thus someone can say that these combinations constitute the identity of the fungi. In our analysis of comparative genomics we tried to detect the putative Carbohydrate Active enzymes and the proteolytic enzymes which are secreted by four well studied fungi with available genomes. These four fungi belong to different phyla and they have different life styles. Several interesting results emerged from this comparison which in some cases confirmed the already recommended theories for the correlation of specific protein families with different groups of fungi and different lifestyles. The understanding of the relationship between the proteins which are secreted extracellularly and the interactions established between plants and fungi which may be beneficial or pathogenic, will help in adapting improved methods for cultivation that will lead to a more sustainable agriculture. The need for a sustainable agriculture is nowadays more necessary than ever because the consequences of climate change and the constantly increasing needs for food are more obvious.

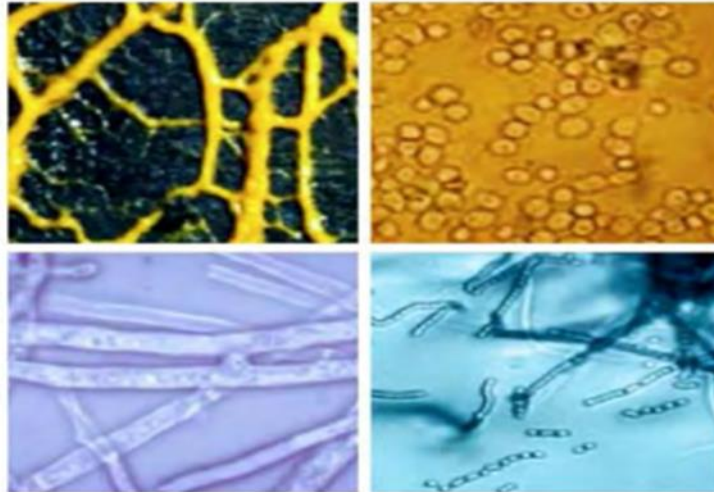
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μύκητες

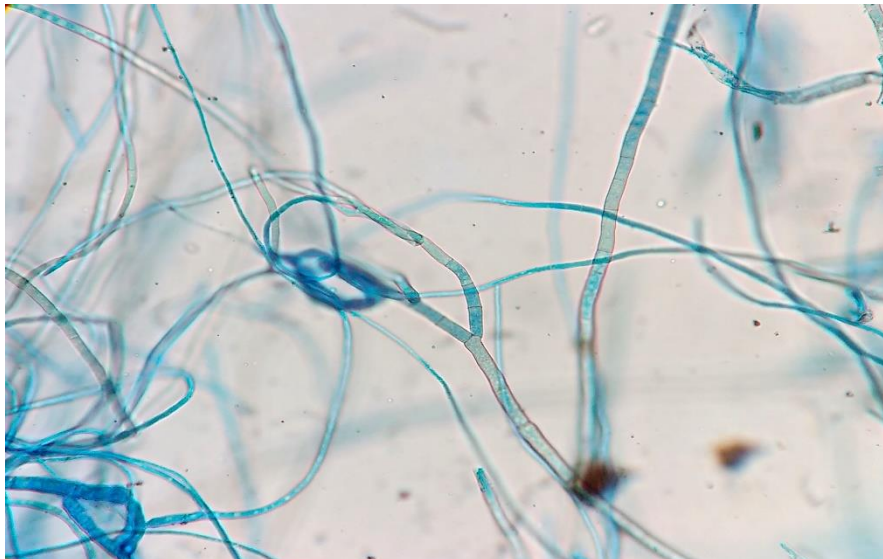
Οι μύκητες είναι μικροσκοπικοί ευκαρυωτικοί οργανισμοί οι οποίοι ανεξάρτητα από το αν είναι παθογόνοι ή όχι είναι γενικά ετερότροφοι καθώς δεν είναι ικανοί να φωτοσυνθέσουν αφού δεν διαθέτουν πλαστίδια και χλωροφύλη παρά μόνο χυμοτόπια, ωστόσο μπορούν να συνθέσουν γλυκογόνο. Έως σήμερα έχουν αναγνωριστεί πάνω από 120.000 είδη μυκήτων τα οποία χωρίζονται σε επτά φύλα (Ζίφα Α. et al 2011):

- Βασιδιομύκητες (Basidiomycota)
- Ασκομύκητες (Ascomycota)
- Χυτριομύκητες (Chytridiomycota)
- Μικροσπορίδια (Microsporidia)
- Γλομερομύκητες (Glomeromycota)
- Βλαστοκλαδιομύκητες (Blastocladiomycota)
- Νεοκαλλιμαστιγομύκητες (Neocallimastigomycota)

Το σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός ο οποίος διαφοροποιείται σε βλαστητικό ή αναπαραγωγικό ανάλογα με το αν θα γίνει βλαστητική ανάπτυξη ή παραγωγή σπορίων αντίστοιχα, και αποτελείται από τις υφές και το μυκήλιο που σχηματίζεται από το σύνολο των υφών πάνω στο οποίο σε ορισμένους μύκητες σχηματίζονται και οι αναπαραγωγικές δομές. Οι υφές αυτές αποτελούνται από μικρά σε διάμετρο νημάτια και διαχωρίζονται μεταξύ τους από ορισμένα τοιχώματα που ονομάζονται *septa*, ενώ επίσης περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα χιτίνης. Η επικοινωνία μεταξύ των κυτταροπλασμάτων γειτονικών κυττάρων και η μεταφορά θρεπτικών γίνεται μέσω των πόρων που υπάρχουν στα τοιχώματα *septa*. Οι πόροι αυτοί συμβάλλουν στην πολύ γρήγορη ανάπτυξη των μυκήτων και στην ικανότητα που έχουν να προσαρμόζονται στις διάφορες συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον τους για να εξασφαλίσουν την επιβίωση και έπειτα την αναπαραγωγή τους. Επίσης μεταξύ των γειτονικών κυττάρων μπορεί να γίνει και μετανάστευση πυρήνων καθώς κάθε κύτταρο μπορεί να φέρει έναν ή δύο οργανωμένους ευκαρυωτικούς πυρήνες που παράγουν σπόρια πολλών ειδών. Όπως προαναφέρθηκε το κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων αποτελείται από χιτίνη αλλά και από άλλους πολυσακχαρίτες και λιπίδια όπως β-γλυκάνες, λιπίδια μελανίνης και πολυμερή γαλακτοζαμίνης, ωστόσο όμως δεν παρατηρείται κυτταρίνη όπως γίνεται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Γραβάνης,2011).



Εικόνα 1. Το σώμα των μυκήτων (θαλλός)



Εικόνα 2. Οι υφές των μυκήτων

Οι μύκητες ανάλογα με το αν ζουν εις βάρος κάποιου ξενιστή ή ζουν ανεξάρτητοι και αποικοδομούν οργανική ύλη, διαχωρίζονται σε παρασιτικούς και σαπροτροφικούς αντίστοιχα. Οι πρώτοι μπορεί να είναι βιοτροφικοί όπου ζουν μαζί με τους ξενιστές τους χωρίς να τους προκαλούν νέκρωση (βιοτροφικοί), ή να απαιτείται πρώτα ο θάνατος των ξενιστών και η θρέψη των μυκήτων γίνεται από την νεκρή ύλη του ξενιστή (νεκροτροφικοί). Στην περίπτωση των σαπροφυτικών μυκήτων από την άλλη αποικοδομούν νεκρή οργανική ύλη όπως το ξύλο και το δέρμα και λαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά μέσω απορρόφησης από τα νημάτιά τους. Προκειμένου να γίνει η αποικοδόμηση της νεκρής οργανικής ύλης απαιτείται η έκκριση πεπτικών ενζύμων που διασπούν διάφορες ενώσεις σε μικρότερες για να απορροφηθούν ευκολότερα. Οι παρασιτικοί μύκητες απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά από τους ξενιστές τους είτε μέσω των νηματίων, είτε μέσω ειδικών δομών που ονομάζονται μυζητήρες.

Οι ικανότητες και οι εφαρμογές των μυκήτων σε μία πληθώρα διεργασιών τους έχει καταστήσει αρκετά σημαντικούς μικροοργανισμούς, με το ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτούς να είναι συνεχώς αυξανόμενο. Ειδικότερα ξεχωρίζουν για την ικανότητά παραγωγής από αυτούς, αντιβιοτικών αλλά και άλλων ουσιών όπως βιταμίνες και οργανικά οξέα για εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων και στη βιοχημεία αλλά και για την ικανότητα παραγωγής ενζύμων αποικοδόμησης της οργανικής ύλης που έχει εφαρμογές και για την προστασία του περιβάλλοντος, που αποτελεί φλέγον ζήτημα της εποχής μας. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση των διαφόρων καταπονήσεων, βιοτικών ή αβιοτικών, των καλλιεργούμενων φυτών, ενώ τέλος πολλοί εξώδιμοι βασιδιομύκητες μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο (Ελευθέριος Κ. Τζάμος, 2007).

Τέλος όσον αφορά την αναπαραγωγή των μυκήτων, αυτή μπορεί να είναι είτε αγενής είτε εγγενής, με τους περισσότερους να μπορούν να αναπαραχθούν και με τους δύο τρόπους. Η πιο κοινή μέθοδος αναπαραγωγής είναι η αγενής αναπαραγωγή, η οποία πραγματοποιείται μέσω εκβλαστημάτων είτε μέσω παραγωγής σπορίων και παράγει γενετικά πανομοιότυπους οργανισμούς. Τα σπόρια αποτελούν την κύρια αναπαραγωγική μονάδα των μυκήτων και στην αγενή παραγωγή ανάλογα με τον τρόπο της αναπαραγωγής χωρίζονται σε κονιδιοσπόρια, αρθροσπόρια χλαμυδιοσπόρια, βλαστοσπόρια και αγγειοσπόρια. Από την άλλη κατά την εγγενή αναπαραγωγή έχουμε σύζευξη δύο πυρήνων οι οποίοι καλούνται γαμέτες, οι οποίοι είναι αντίθετης σεξουαλικής ταυτότητας, και πραγματοποιείται όταν οι συνθήκες στο περιβάλλον (νερό, θρεπτικά) δεν είναι οι κατάλληλες (Ζίφα Α. et al 2011, Γραβάνης, 2011).

Άμυνα Φυτών εναντίον των Φυτοπαθόνων

Η υπόθεση γονίδιο εναντίον γονιδίου που αναπτύχθηκε από τον Flor υποστηρίζει πως για κάθε γονίδιο που διευκολύνει την μόλυνση από το παθογόνο, υπάρχει ένα αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας (R) στον ξενιστή, και η αλληλεπίδραση των προϊόντων των δύο αυτών γονιδίων επάγει την ενεργοποίηση των αμυντικών αποκρίσεων του φυτού-ξενιστή. Μία από αυτές τις αποκρίσεις είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας HR η οποία αποτρέπει την ανάπτυξη των βιοτροφικών μυκήτων

Ως απάντηση λοιπόν στις επιθέσεις από παθογόνα τα φυτά έχουν αναπτύξει τουλάχιστον δύο επίπεδα άμυνας. Το πρώτο επίπεδο παρέχει βασική άμυνα ενάντια σε όλα τα πιθανά παθογόνα και βασίζεται στην αναγνώριση μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs) από τους υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβου των φυτών (PRRs). Η αναγνώριση των παθογόνων εκκινεί την απόκριση άμυνας η οποία καλείται PTI “pattern triggered immunity” και αποτρέπει τον περαιτέρω αποικισμό του ξενιστή (De Wit, 2007, Jones and Dangl, 2006). Ένα από τα πιο γνωστά PAMPs αποτελεί η χιτίνη η οποία όπως προαναφέρθηκε αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Από την άλλη πλευρά οι μύκητες κωδικοποιούν και εκκρίνουν παράγοντες οι οποίοι ονομάζονται τελεστές και καταστέλλουν την αρχική άμυνα των φυτών (PTI), επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στο παθογόνο να μολύνει το φυτό και να επιβιώσει. Μόλις λοιπόν αυτό το πρώτο επίπεδο βασικής άμυνας ξεπεραστεί από το παθογόνο, ενεργοποιείται το δεύτερο επίπεδο άμυνας που βασίζεται στην αναγνώριση των τελεστών του παθογόνου από ορισμένες πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (R) του φυτού, το οποίο ονομάζεται ETI “effector triggered immunity” και είναι πιο ισχυρό, άμεσο και μεγαλύτερης διάρκειας από την PTI. Η άμυνα αυτή

περιλαμβάνει κάποιες άμεσες και ενισχυμένες αποκρίσεις του φυτού όπως είναι η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR). Αυτή η απόκριση του φυτού οδηγεί με την σειρά του στην διαδοχική απάντηση των παθογόνων τα οποία εκκρίνουν μεταλλαξιγόνους τελεστές ή νέους τελεστές που αποφεύγουν ή καταστέλλουν την ΕΤΙ άμυνα, ενώ τα φυτά αναπτύσσουν με την σειρά του καινούριες πρωτεΐνες ανθεκτικότητας R. Συνεπώς τόσο τα φυτοπαθογόνα όσο και το φυτό επιδίδονται σε ένα συνεχή αγώνα δρόμου για το ποιος τελικά από τους δύο θα επικρατήσει (Wit et al., 2009).

Έναν από τους πιο βασικούς μηχανισμούς άμυνας αποτελεί μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου γνωστή ως απόκριση υπερευαισθησίας (HR), κατά την οποία τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην περιοχή της μόλυνσης οδηγούνται σε θάνατο με γρήγορους ρυθμούς έτσι ώστε να μην επιτρέψουν στο παθογόνο να εξαπλωθεί στα γειτονικά κύτταρα. Προκειμένου να λειτουργήσει ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η απόκριση υπερευαισθησίας, απαιτείται η παραγωγή τοξικών χημικών ενώσεων, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROS).

Τα παραπάνω ισχύουν για τους βιοτροφικούς μύκητες, ενώ όσον αφορά τους νεκροτροφικούς θεωρείται πως δεν συμπίπτουν με το συγκεκριμένο μοντέλο. Ωστόσο αναγνωρίστηκαν πολλοί νεκροτροφικοί μύκητες οι οποίοι φαίνεται να παράγουν αρκετές ριβοσωμικές πρωτεΐνες που μπορεί να διαδραματίζουν τον ρόλο των τελεστών με σκοπό την νέκρωση του φυτού και την επακόλουθη θρέψη και επιβίωση του μύκητα (Friesen et al., 2008).

Μονοφυλετικός κλάδος *Fusarium Solani*

Οι δύο από τους τέσσερις μύκητες της ανάλυσής μας ανήκουν στο μονοφυλετικό κλάδο *Fusarium solani* ο οποίος αποτελεί μια ατελή μορφή του *Nectria haematococca* και επίσης αποτελεί μέλος ενός μονοφυλετικού κλάδου του συμπλέγματος *Fusarium solani* (FSSC) που εκτιμάται ότι αποτελείται από τουλάχιστον 60 διακριτά φυλογενετικά είδη (Coleman et al., 2009). Το σύμπλεγμα αποτελείται από παθογόνους και σαπροφυτικούς μύκητες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να διασπών και να μεταβολίζουν διαφορετικά υποστρώματα. Οι μύκητες του γένους αυτού παράγουν αρκετές μυκοτοξίνες και προκαλούν μεγάλη ποικιλία φυτικών ασθενειών, ενώ πλέον αναγνωρίζονται όλο και περισσότερα μέλη του συμπλέγματος αυτού ως ανθρώπινα παθογόνα (Summerell et al., 2010). Ειδικότερα στα είδη *F. solani* (FSSC) περιέχονται πολλοί μύκητες που μπορεί να είναι σαπρόφυτα, παθογόνα ή ενδοφυτικοί μύκητες με μεγάλο αγρονομικό και υγειονομικό ενδιαφέρον και μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (Zhang et al., 2006, Shweta et al. 2010).

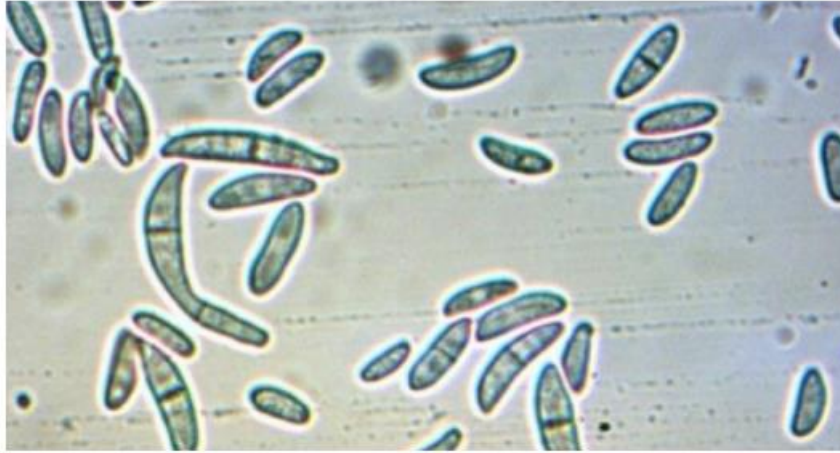
Βασίλειο	Fungi
Υποβασίλειο	Dikarya

Διαίρεση	Ascomycota
Υποδιαίρεση	Pezizomycotina
Κλάση	Sordariomycetes
Τάξη	Hypocreales
Οικογένεια	Nectriaceae
Γένος	Fusarium
Είδος	Solani

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του γένους *Fusarium Solani*

***Fusarium solani* στέλεχος K**

Το *Fusarium solani* στέλεχος K το οποίο θα αναφέρεται με την συντομογραφία *FsK* είναι ένας ενδοφυτικός, μη παθογόνος νηματοειδής μύκητας που εντοπίζεται στο έδαφος, ανήκει στην διαίρεση των ασκομυκήτων και απομονώθηκε από ένα επισχετικό κομπόστ από υπολείμματα στέμφυλων και παραπροϊόντων ελαιουργίας (Kavroulakis et al. 2007). Ο συγκεκριμένος μύκητας μπορεί να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος πηγών άνθρακα με προτιμώμενο pH=5 και βέλτιστη θερμοκρασία τους 24°C, αλλά και να αποικίσει πολλούς φυτικούς οργανισμούς (Σκιαδά Β., διδακτορική διατριβή, 2019). Αρχικά υπήρχε η θεώρηση πως ο *FsK* αναπτύσσεται μόνο στο υπόγειο τμήμα του φυτού και όχι στο υπέργειο, ωστόσο πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να αποικίσει και το υπέργειο τμήμα του φυτού (Skiada et al., 2019). Οι πρώτες ενδείξεις για τον προστατευτικό χαρακτήρα του *FsK* διαπιστώθηκαν όταν φυτά που μεγάλωναν στο υπόστρωμα από το οποίο απομονώθηκε ο *FsK*, είχαν αυξημένη προστασία απέναντι σε παθογόνα του εδάφους και του φυλλώματος, γεγονός για το οποίο ευθυνόταν ο *FsK* όπως διαπιστώθηκε αργότερα (Kavroulakis, et al., 2005, 2006). Η ικανότητα αυτή του *FsK* να προστατεύει το φυτό από φυτοπαθογόνους οργανισμούς οφείλεται στις ενώσεις που εκκρίνει εξωκυτταρικά ο μύκητας και αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες της ανάπτυξης των παθογόνων. Ειδικότερα, η δραστηριότητά του αυτή βρέθηκε ότι σχετίζεται με το αιθυλένιο καθώς σε φυτά με διαταραγμένο το σηματοδοτικό μονοπάτι αιθυλενίου δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα ανθεκτικότητας, σε αντίθεση με τα φυτά αγρίου τύπου. Τέλος άλλο ένα θετικό στοιχείο σχετικά με την δράση του *FsK* είναι πως δεν προκαλεί κάποια ζημιά στο φυτό ξενιστή (Kavroulakis et al, 2007). Επιπλέον έχει αποδειχτεί πως η συμβίωση με το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να αμβλύνει τις αρνητικές επιπτώσεις των αβιοτικών καταπονήσεων και συγκεκριμένα αυτές που προκαλούνται από την έλλειψη νερού (Kavroulakis et al, 2018).. Για να το πετύχει αυτό ο μύκητας μειώνει το κλείσιμο των στομάτων και ενισχύει την ικανότητα απορρόφησης νερού από τις ρίζες σε συνθήκες ξηρασίας. Έτσι ως αποτέλεσμα, πετυχαίνει την μείωση των απωλειών σε νερό και την διατήρηση του ρυθμού φωτοσύνθεσης.



Εικόνα 3. Κωνίδια του μύκητα FsK από οπτικό μικροσκόπιο

***Fusarium vanettenii* 77-13-4**

Ο μύκητας *Fusarium vanettenii* 77-13-4 αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους μύκητες του συμπλέγματος ειδών *Fusarium solani* και συνεπώς ανήκει και αυτός στην κατηγορία των ασκομυκήτων όπως και ο *FsK*. Οι ασκομύκητες αποτελούν μαζί με τους βασιδιομύκητες την συντριπτική πλειοψηφία όλων των μυκήτων παρά το γεγονός πως εξελικτικά είναι οι νεότεροι. Σε αντίθεση βέβαια με τον *FsK* ο *Fusarium vanettenii* 77-13-4 ο οποίος εν συντομία θα αναφέρεται στη συνέχεια ως “*Nectria*”, δεν έχει προστατευτική δράση αλλά εμφανίζεται ως φυτοπαθογόνος μύκητας. Επίσης αποτελεί τον πρώτο μύκητα ο οποίος βρέθηκε πως περιέχει τρία υπεράριθμα χρωμοσώματα με μοναδικά γονίδια που καθορίζουν το ενδιαίτημά του. Επιπλέον ο *Nectria* κατέχει ένα από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα μυκήτων με 15.707 γονίδια, γεγονός που ίσως σχετίζεται και με την πληθώρα των ενδαιτημάτων του μύκητα. Ο αυξημένος αυτός αριθμός γονιδίων που χαρακτηρίζουν τον *Nectria* οφείλεται σε δύο ομάδες γονιδίων. Η πρώτη αποτελείται από ειδικά γονίδια που δεν έχουν εντοπιστεί σε άλλο μύκητα και η δεύτερη από γονίδια που είναι παρόντα με ένα μόνο αντίγραφο στους άλλους μύκητες, αλλά στον *Nectria* εμφανίζονται διπλασιασμένα. Κάποια από αυτά τα γονίδια φέρουν στοιχεία που μαρτυρούν την πιθανή οριζόντια μεταφορά τους στον *Nectria* ή μπορεί να έχουν προκύψει από γονιδιακό διπλασιασμό (Coleman, 2016). Όσον αφορά τα γονίδια των υπεράριθμων χρωμοσωμάτων τα οποία αυξάνουν το εύρος των ενδαιτημάτων του μύκητα, φαίνεται πως δεν είναι υποχρεωτικά για την ανάπτυξη του μύκητα σε εργαστηριακές συνθήκες, αλλά συμβάλλουν στην ανάπτυξη παθογονικότητας, στην ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και στην εκμετάλλευση διαφόρων πηγών άνθρακα και αζώτου (Coleman et al., 2009).

Rhizophagus irregularis

Ο μύκητας *Rhizophagus irregularis* ανήκει στη διαίρεση των γκλομερομυκήτων. Οι γκλομερομύκητες αποτελούν μια σχετικά μικρή και μοναδική ομάδα υποχρεωτικά συμβιωτικών μυκήτων, τις οποίες τα είδη αναπαράγονται αφυλετικά και αλληλεπιδρούν με φυτά που ονομάζονται ενδομυκόρριζα, στα οποία ο μύκητας σχηματίζει δομές στο εσωτερικό των κυττάρων του φυτού και στην διεπιφάνεια μεταξύ μύκητα και φυτού οι μεμβράνες τους βρίσκονται σε στενή επαφή. Είναι αξιοσημείωτο πως πάνω από το 80% των χερσαίων φυτικών ειδών με κύρια τα λιβαδικά είδη και είδη

μεγάλων καλλιεργειών, σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με γκλομερομύκητες, στις οποίες παρατηρείται εισβολή των υφών του μυκηλίου στα κύτταρα του φυτού. Οι υφές αυτές βοηθούν τον μύκητα να προσλάβει μεταλλικά στοιχεία από το έδαφος τα οποία θα ανταλλάξει με τον δεσμευμένο άνθρακα που θα του προσφέρει το φυτό. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι γκλομερομύκητες παράγουν ολιγοσακχαρίτες λιποχιτίνης (παράγοντες Myc) οι οποίοι έχουν σηματοδοτική λειτουργία και επάγουν την διαδικασία σχηματισμού της μυκορριζικής συμβίωσης (Madigan et al., 2018). Επιπλέον ταυτοποιήθηκε πως εκτός από τους παράγοντες Myc, μία ομάδα τερπενοειδών και στριγγολακτόνων λειτουργούν ως ενώσεις σηματοδότησης για την συμβίωση αλλά και ως ενδογενείς φυτικές ορμόνες (Parniske, 2008).



Εικόνα 4. In vitro καλλιέργεια του μύκητα *Rhizophagus irregularis* σε ρίζες καρότου. Τα λευκά βέλη δείχνουν το πυκνό εξωτερικό μυκήλιο που σχηματίζεται στο υπόστρωμα και παράγει τα σπόρια.

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί αρκετοί γκλομερομύκητες ενώ ένας από τους πιο μελετημένους είναι και ο *Rhizophagus irregularis* ο οποίος αποτελεί έναν από τους πρώτους μύκητες του είδους αυτού που μπορεί να απομονωθεί και να αναπτυχθεί in vitro σε ειδικές συνθήκες στην παρουσία φυτού ξενιστή. Η ικανότητα αυτή να πολλαπλασιάζεται in vitro παρέχοντας μεγάλες ποσότητες βιολογικού υλικού, σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος του γονιδιώματός του, κατέστησαν την εργαστηριακή μελέτη του αρκετά διαδεδομένη καθώς και την αλληλούχιση του γονιδιώματος ευκολότερη.

Όσον αφορά το γονιδίωμα του *Rhizophagus irregularis* πρέπει να τονιστεί πως δεν έχει αναγνωρισθεί κάποιο γονίδιο που να κωδικοποιεί για μυκοτοξίνη ή για ένζυμα που διασπούν το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (Tisserant et al., 2013). Η υπόθεση γύρω από το παραπάνω γεγονός είναι πως η απουσία τέτοιων γονιδίων αποτρέπει την απελευθέρωση μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με την παθογένεση και την ζημιά στον ξενιστή, εξυπηρετώντας κατά αυτό τον τρόπο στην αποφυγή της επαγωγής των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή.

Συνεπώς έχει διατυπωθεί πως ο μηχανισμός με τον οποίο ο μύκητας εισβάλλει στα κύτταρα των φυτών καθορίζεται από δράση του ίδιου του φυτού-ξενιστή. Ειδικότερα η

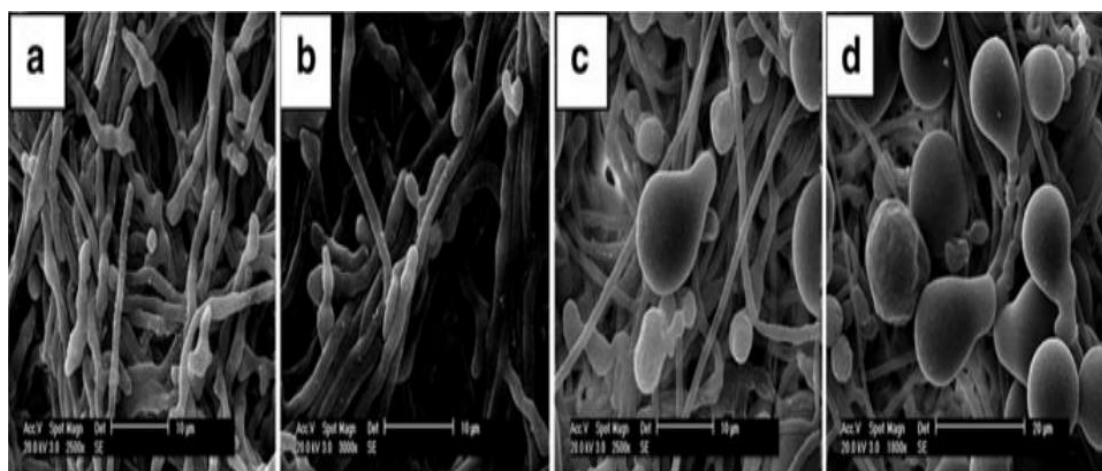
παρατήρηση πως ορισμένα φυτικά γονίδια ανασχηματισμού του κυτταρικού τοιχώματος εκφράζονται ισχυρά κατά τα πρώτα στάδια του αποικισμού, μαρτυρά ότι ορισμένες διεργασίες μπορεί να εμπλέκονται στην χαλάρωση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Εκτός από την στρατηγική της αθόρυβης αυτής εισβολής του μύκητα, ο *Rhizophagus irregularis* έχει αναπτύξει και στρατηγικές καταστολής της άμυνας του φυτού μέσω της έκκρισης πρωτεϊνών τελεστών που επεμβαίνουν στους μηχανισμούς άμυνας του φυτού. Για παράδειγμα ο *R. irregularis* εκκρίνει μία πρωτεΐνη SP7 (secreted protein 7) η οποία αλληλεπιδρά με τον παράγοντα απόκρισης αιθυλενίου 19 (ERF19), ενώ στο μεταγράφημα του *R. irregularis* έχουν ταυτοποιηθεί πολλές μικρές εκκρινόμενες (SSPs) πρωτεΐνες και άλλες μικρές πρωτεΐνες (SPs), οι οποίες ρυθμίζονται θετικά *in planta* ή εκφράζονται ειδικά κατά την συμβίωση (Malbreil et al., 2014).

Serendipita indica

Ο ενδοφυτικός μύκητας *Serendipita indica* ο οποίος μέχρι πρότινος ήταν γνωστός με την ονομασία *Piriformospora indica* αποτελεί τον πιο καλά μελετημένο μέλος της ομάδας *Sebacinales* που ανήκει στην διαίρεση των Βασιδιομυκήτων και απομονώθηκε πρώτη φορά από ένα έδαφος ερήμου, φτωχό σε θρεπτικά στην Ινδία (Verma et al., 1998). Ο μύκητας αυτός μπορεί να συνάψει σχέσεις αμοιβαιότητας με πολλά διαφορετικά φυτά, συμπεριλαμβανομένου και του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*. Ένας επιτυχημένος αποικισμός της ρίζας από τον μύκητα αυτό προσδίδει πολλές θετικές ιδιότητες στο φυτό, όπως η αυξημένη ανάπτυξη του φυτού και η ενισχυμένη αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις, για το γεγονός αυτό θεωρείται αρκετά χρήσιμος για την βιώσιμη γεωργία, ειδικά σε περιβάλλοντα με συνθήκες stress. Παρά το γεγονός πως η αλληλεπίδραση μεταξύ του *Serendipita indica* και του φυτού θεωρείται αμοιβαία, αφού ο μύκητας ξεπεράσει το πρώτα φυσικά εμπόδια του φυτού, όπως είναι το κυτταρικό τοίχωμα, θα πρέπει να αντιμετωπίσει τις βασικές αμυντικές αποκρίσεις του. Για να το πετύχει αυτό ο μύκητας, καταστέλλει την αρχική άμυνα και έπειτα αρχίζει να αναπτύσσεται ενδοκυτταρικά όπου και θα αναπτύξει δομές που μοιάζουν με αυτές των δενδροειδών μυκόρριζων και θα καθιερώσει την αμοιβαία ανταλλαγή θρεπτικών με το φυτό-ξενιστή. Στις δομές αυτές δημιουργείται ένας συμβιωτικός διάυλος στον χώρο του αποπλάστη μέσω του οποίου γίνεται ανταλλαγή φωσφόρου και υδατανθράκων οι οποίοι αποτελούν το αντίτιμο των φυτών για την μεταφορά φωσφόρου από τους μύκητες σε αυτά (Ortiz et al., 2021).

Ειδικότερα ο αποικισμός από τον *S. Indica* αυξάνει την απορρόφηση θρεπτικών, επάγει την άνθηση, επιτρέπει στα φυτά να επιβιώνουν κάτω από το νερό ή υπό συνθήκες stress λόγω θερμοκρασίας και αλατότητας, επιφέρει ανθεκτικότητα στις τοξίνες, τα βαρέα μέταλλα και τους παθογόνους οργανισμούς και τέλος ενισχύει την αύξηση και την καρποφορία κυρίως μέσω των δευτερογενών μεταβολιτών που εκκρίνει. Επιπλέον μπορεί να μετασχηματιστεί σταθερά μέσω τυχαίας εισόδου εξωγενούς DNA και κατέχει ένα σχετικά μικρό σε μέγεθος γονιδίωμα σε σχέση με άλλους βασιδιομύκητες. Οι κυλινδρικές υφές του *S. indica* είναι λεπτές και έχουν διάμετρο 0,7-3,5 μm. Ενώ επίσης στα τοιχώματα των υφών παρατηρούνται ανά τακτά διαστήματα πολυσακχαρίτες και υδροφοβικές πρωτεΐνες. Τέλος ένα ακόμη πλεονέκτημα του συγκεκριμένου μύκητα είναι πως παράγει έναν μεγάλο αριθμό φθορίζοντων σπορίων με παχιά τοιχώματα και σχήμα αχλαδιού που ονομάζονται χλαμυδιοσπόρια. Τα σπόρια αυτά παράγονται εύκολα και επιβιώνουν σε δυσμενείς

συνθήκες, έτσι και για τους λόγους αυτούς χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό των φυτών καλλιεργειών (Singhal et al., 2017).



Εικόνα 5. Στάδια μορφογένεσης του *S. indica*. (a,b) Οι κυλινδρικές υφές αρχίζουν να αυξάνονται σε μέγεθος σε κάποια σημεία. (c) μετά από 5 μέρες πολλές υφές έχουν μετατραπεί σε πρώιμα σπόρια. (d) Στο τέλος της εβδομης ημέρας σχηματίζονται με αφθονία τα τυπικά χλαμυδιοσπόρια με σχήμα αχλαδιού.

Φυτικό κυτταρικό τοίχωμα

Τα κύτταρα των ανώτερων φυτών περικλείονται από ένα τοίχωμα το οποίο αποτελείται από διάφορα πολυμερή συμπεριλαμβανομένου τους πολυσακχαρίτες κυτταρίνη, μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες όπως είναι η πεκτίνη, ημικυτταρίνες και δομικές γλυκοπρωτεΐνες, ενώ τα δευτερογενή τοιχώματα αποτελούνται από την λιγνίνη. Ο τύπος, η δομή και η αφθονία των πολυμερών ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού, τον τύπο του ιστού και το αναπτυξιακό στάδιο (Pauly et al., 2013). Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα είναι μία περίπλοκη δομή η οποία εμπλέκεται σε ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών κατά τον κύκλο ζωής του φυτού. Γενικά υπάρχουν δύο τύποι τοιχωμάτων που περικλείουν τα φυτικά κύτταρα και συχνά αναφέρονται ως πρωτογενές και δευτερογενές τοίχωμα. Το πρωτογενές τοίχωμα είναι δυναμικό και παχύ στρώμα (0.1–1 μm) που αποτελείται κυρίως από πολύπλοκους πολυσακχαρίτες, ένα μικρό αριθμό πρωτεϊνών και αναπτύσσεται στα νεαρά κύτταρα κατά την διάρκεια της διαίρεσης με στόχο την παροχή ελαστικότητας και βασικής δομικής στήριξης έτσι ώστε να προστατεύει το κύτταρο και να διαμεσολαβεί στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Από την άλλη το δευτερογενές τοίχωμα βρίσκεται ανάμεσα στο πρωτογενές τοίχωμα και την πλασματική μεμβράνη και σχηματίζεται σε μετέπειτα στάδιο όταν το κύτταρο σταματήσει να μεγαλώνει και να διαιρείται. Στον αγώνα συνεξέλιξης μεταξύ φυτών και μικροβίων που λαμβάνει χώρα εδώ και εκατομμύρια χρόνια, τα φυτά έχουν δημιουργήσει το κυτταρικό τους τοίχωμα το οποίο αποτελεί μία πολυεπίπεδη γραμμή άμυνας καθώς μπορεί και λειτουργεί τόσο ως παθητικό εμπόδιο λόγω της δομής του όσο και ως μία ενεργή γραμμή άμυνας την οποία πρέπει τα μικρόβια να ξεπεράσουν για να εγκαθιδρύσουν την επιθυμητή παθογονική σχέση με τα φυτά (Houston et al., 2016). Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν το 90% των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος και έχουν μελετηθεί εκτενώς.

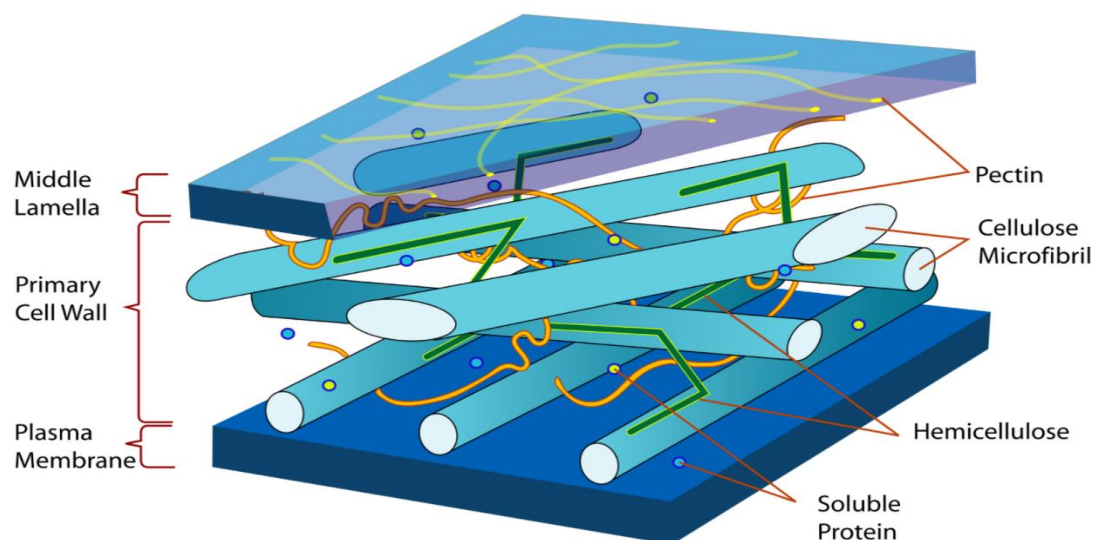
Κυτταρίνη: Αποτελεί το βασικό συστατικό όλου του φυτικού υλικού και αποτελεί το πιο άφθονο οργανικό μόριο στην γη. Πρόκειται για ένα γραμμικό βιοπολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ ο σχηματισμός δεσμών μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου ή Van der Waal's μεταξύ γειτονικών αλυσιδών κυτταρίνης οδηγεί στην παράλληλη στοίχιση δομών κρυσταλλίνης με την μορφή ινιδίων μεγάλου μήκους και πάχους 3-5 nm (Dashtban et al., 2010). Η κυτταρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό και εντοπίζεται τόσο στο πρωτογενές όσο και στο δευτερογενές τοίχωμα ενώ η δομή των μικροινιδίων κρυσταλλίνης διατηρεί την δομική ακεραιότητα καθώς είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην ενζυμική προσβολή (Cosgrove, 2005).

Ημικυτταρίνη: Σε αντίθεση με την κυτταρίνη όπου οι αλυσίδες γλυκάνης είναι στενά δεμένες μεταξύ τους με σκοπό τον σχηματισμό μικροινιδίων, οι ημικυτταρίνες οι οποίες αποτελούν και το 1/3 της μάζας των κυτταρικών τοιχωμάτων περιέχουν μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από πεντόζες με ετερογενείς υποκαταστάτες ή άλλους δεσμούς κατά μήκους του πολυμερούς που τους καθιστούν άμορφους και διαλυτούς σε υδατικά διαλύματα, ενώ υπάρχουν στοιχεία που μαρτυρούν πως αυτοί οι πολυσακχαρίτες είναι σθεναρά συνδεδεμένοι με την λιγνίνη και άλλοι με πηκτικούς πολυσακχαρίτες (Pauly et al., 2013). Η ξυλάνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης και αποτελεί τον δεύτερο πιο άφθονο πολυσακχαρίτη στη φύση μετά την κυτταρίνη. Περίπου το ένα τρίτο της ανανεώσιμης πηγής άνθρακα στον πλανήτη βρίσκεται στη μορφή της ξυλάνης.

Πεκτίνη: Οι πεκτίνες αποτελούν αδιαμφισβήτητα τους πιο περίπλοκους και ετερογενείς πολυσακχαρίτες του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Εντοπίζονται κυρίως στο πρωτογενές τοίχωμα διαδραματίζουν ρόλο στην επέκταση, στην προσκόλληση, την ενδοκυτταρική σηματοδότηση και την διαπεραστικότητα του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον το λεπτό στρώμα με το οποίο συνδέονται δύο φυτικά κύτταρα και ονομάζεται "Middle lamella" αποτελείται κυρίως από πεκτίνη. Η πεκτίνη όπως και άλλοι πολυσακχαρίτες αλλά όχι η κυτταρίνη, συντίθεται στο σύμπλεγμα Golgi και πακετάρεται σε μικρά κυστίδια τα οποία συνενώνονται με την πλασματική μεμβράνη και μεταφέρουν το φορτίο τους στο τοίχωμα όπου και ενσωματώνεται μέσω φυσικών αλληλεπιδράσεων ή μέσω ενζύμων με δράση λιγάσης (Cosgrove, 2005). Η πεκτίνη είναι άφθονη στα πρωτογενή τοιχώματα των δικότυλων φυτών, για αυτό και τα παθογόνα των δικότυλων έχουν περισσότερες πεκτινάσες από τα παθογόνα των μονοκότυλων (Zhao et al., 2013), επίσης είναι άφθονη σε φρούτα όπως το λεμόνι και το μήλο ενώ εντοπίζεται σε πολύ μικρότερη ποσότητα στα δευτερογενή τοιχώματα (Atmodjo et al., 2013).

Λιγνίνη: Η λιγνίνη αποτελεί ένα από τα 3 βασικά συστατικά της λιγνοκυτταρινικής βιομάζας η οποία είναι η οργανική ύλη που αποτελεί το βασικό δομικό συστατικό όλων των φυτών. Τα άλλα συστατικά είναι η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες κατά κύριο λόγο, ενώ σε μικρότερο ποσοστό ανιχνεύονται άλλα συστατικά όπως πρωτεΐνες και πεκτίνη. Η λιγνίνη είναι το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές στον πλανήτη και αποτελεί επίσης το μόνο πολυμερές με αρωματική βασική μονάδα που συντίθεται φυσικά. Η βασική δομική μονάδα είναι το φαινυλοπροπάνιο και η σύνδεση πολλών τέτοιων μονομερών δημιουργεί την λιγνίνη η οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στη διάσπαση. Η λιγνίνη, μέσω της σύνδεσης της τόσο στις ημικυτταρίνες, όσο και στην κυτταρίνη, λειτουργεί ως εμπόδιο σε οποιοδήποτε διάλυμα και ένζυμο, και αποτρέπει την διέσδυση λυτικών ενζύμων στην εσωτερική λιγνοκυτταρινική δομή. Παρά το γεγονός πως η λιγνίνη είναι η πιο ανθεκτική στη διάσπαση από όλα τα άλλα συστατικά του τοιχώματος, υπάρχουν

ορισμένοι βασιδιομύκητες οι οποίοι ονομάζονται μύκητες λευκής σήψης και μπορούν να την διασπούν αποτελεσματικά (Dashtban et al., 2010).



Εικόνα 6. Τα συστατικά που αποτελούν το πρωτογενές φυτικό κυτταρικό τοίχωμα το οποίο βρίσκεται ανάμεσα από την πλασματική μεμβράνη και το στρώμα επαφής των γειτονικών κυττάρων (Middle Lamella) το οποίο αποτελείται κυρίως από πεκτίνη.

Υδρολυτικά ένζυμα

Πολύπλοκοι υδατάνθρακες είναι ευρέως κατανομημένοι στη φύση όπου λειτουργούν ως αποθήκες άνθρακα, δομικά μόρια ή ως διαμεσολαβητές των ενδοκυτταρικής ή διακυτταρικής αναγνώρισης μεταξύ ενός ή παραπάνω οργανισμών. Η ποικιλότητα των πολύπλοκων αυτών υδατανθράκων ελέγχεται από μία ομάδα ενζύμων που συμμετέχουν στην συναρμολόγηση και την αποικοδόμησή τους και κατατάσσονται σε μία ενιαία κατηγορία υδρολυτικών ενζύμων (CAZymes). Μέσα στην μεγάλη αυτή κατηγορία υδρολυτικών ενζύμων, γίνεται διάκριση σε οικογένειες με βάση την ομοιότητα των αμινοξικών ακολουθιών. Στην συναρμολόγηση των πολύπλοκων υδατανθράκων συμμετέχουν οι γλυκοζυλοτρανσφεράσες (GT) ενώ στην αποικοδόμηση οι γλυκοσιδάσες (GH), οι πολυσακχαρικές λυάσες (PL) και οι υδατανθρακικές εστεράσες (CE) (Lombard et al., 2014). Οι τρεις αυτές κλάσεις υδρολυτικών ενζύμων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών περιέχουν πεκτινάσες, κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες, ένζυμα τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αποικοδόμηση των συστατικών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και συνεπώς στην διεϊσδυση των μυκήτων στο εσωτερικό του φυτού ξεπερνώντας το πρώτο επίπεδο μηχανικής άμυνας των φυτών, αλλά και στην απορρόφηση απλούστερων ουσιών που αποτελούν θρεπτικά για τους μύκητες. Οι χιτινάσες από την άλλη αν και δεν αποτελούν ένζυμα διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος, συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία αυτή καθώς συχνά παράγονται στα πρώιμα στάδια μόλυνσης του φυτού από παθογόνους μύκητες (Zhao et al., 2013).

Οι μύκητες δεν μπορούν να απορροφήσουν ακέραιους τους υδατάνθρακες για αυτό και χρειάζεται να τους αποικοδομήσουν εξωκυτταρικά σε μονομερή και ολιγομερή συστατικά μέσω των ενζύμων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η αποικοδόμηση των φυτικών πολυσακχαριτών από μύκητες είναι ένα θέμα που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα για δεκαετίες καθώς έχει πολλές βιομηχανικές εφαρμογές όπως στην παραγωγή χαρτιού, τροφίμων, αναψυκτικών και απορρυπαντικών όπου τα προϊόντα της κατάλυσης των ενζύμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομα μόρια. Τα νούμερα των γονιδίων των ενζύμων αποικοδόμησης (GH, PL και CE) ποικίλλουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών μυκήτων, ωστόσο είναι αποδεκτό πως η πλειοψηφία αποτελείται από γονίδια γλυκοσιδασών (GH) τα οποία αποτελούν το 58-66% σε όλα σχεδόν τα γονιδιώματα μυκήτων που έχουν μελετηθεί (Benoit et al., 2015).

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τους μύκητες, θεωρητικά εμπλέκονται στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και ειδικότερα στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών. Έτσι είναι κοινώς αποδεκτό πως ασχέτως του τύπου της αλληλεπίδρασης που σχηματίζουν οι μύκητες με τα φυτά-ξενιστές, τα υδρολυτικά ένζυμα διαδραματίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο τόσο για την καθιέρωση της συμβίωσης όσο και για την παθογένεση (Girard et al., 2013).

Πρωτεολυτικά ένζυμα

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, οι οποίες μετατρέπονται σε πεπτίδια και αμινοξέα και παρατηρούνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς καθώς είναι απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Η διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών οδηγεί στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στα συστατικά τους που είναι τα αμινοξέα, η διάσπαση αυτή μπορεί να είναι ειδική οδηγώντας σε κατευθυνόμενη διάσπαση για μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεϊνών. Οι πρωτεάσες χωρίζονται σε ενδοπεπτιδάσες και εξωπεπτιδάσες ανάλογα με την θέση του πεπτιδικού δεσμού που διασπάται. Επιπλέον χωρίζονται σε όξινες c (pH 2.0 to 6.0), ουδέτερες (pH 6.0 to 8.0) και αλκαλικές (pH 8.0 to 13.0) ανάλογα με το pH στο οποίο εμφανίζουν την βέλτιστη δραστηριότητα. Οι εξωπεπτιδάσες δρουν μόνο κοντά στα άκρα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και ανάλογα με το αν το άκρο είναι το αμινο-τελικό ή το καρβοξυ-τελικό χαρακτηρίζονται ως αμινοπεπτιδάσες ή καρβοξυπεπτιδάσες αντίστοιχα. Οι καρβοξυπεπτιδάσες διακρίνονται περαιτέρω σε 3 βασικές κατηγορίες τις σερινο-πρωτεάσες, τις μέταλλο-πρωτεάσες και τις κυστεϊνικές πρωτεάσες, ανάλογα με την φύση των αμινοξέων του ενεργού τους κέντρου. Από την άλλη οι ενδοπεπτιδάσες προτιμούν την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών που εντοπίζονται στο εσωτερικό των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και χωρίζονται και αυτές σε επιμέρους ομάδες ανάλογα με το καταλυτικό αμινοξύ και συγκεκριμένα τις ίδιες τρεις ομάδες που ανήκουν στις καρβοξυπεπτιδάσες με την προσθήκη των ασπαρτικών πρωτεάσεων. Οι δύο κυρίαρχες ομάδες πρωτεολυτικών ενζύμων, που εκκρίνονται από τους μύκητες και μπορούν να λειτουργήσουν ως δείκτες του τρόπου ζωής και των τροφικών προφίλ των μυκήτων, είναι οι σερινο-πρωτεάσες και οι μέταλλο-πρωτεάσες (de Souza et al., 2015).

Τα ένζυμα αυτά έχουν πιθανές εφαρμογές σε ένα μεγάλο εύρος βιομηχανικών διεργασιών όπως στην παραγωγή τροφίμων, απορρυπαντικών πλυντηρίων και φαρμακευτικών προϊόντων. Συγκεκριμένα οι πρωτεάσες από μικροοργανισμούς κυριαρχούν στις βιομηχανικές αυτές εφαρμογές καθώς αποτελούν κάποια από τα πιο σημαντικά υδρολυτικά ένζυμα τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς και αποτελούν μία

από τις μεγαλύτερες κατηγορίες βιομηχανικών ενζύμων τα οποία αντιστοιχούν στο 60% περίπου της αγοράς ενζύμων σε όλο τον κόσμο (Zambare et al., 2011). Ειδικότερα οι πρωτεάσες των μυκήτων έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν σε φθηνά υποστρώματα και να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ενζύμων. Ο τρόπος ζωής των μυκήτων και οι τροφικές σχέσεις που αναπτύσσουν με διάφορους οργανισμούς καθορίζουν και την σύνθεση των ενζύμων που εκφράζονται. Συγκεκριμένα οι πρωτεάσες που εκκρίνονται εξωκυτταρικά τους επιτρέπουν να προσαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα, για αυτό και κατά την διάρκεια της εξέλιξης οι μύκητες έχουν επεκτείνει τον αριθμό των πρωτεασών που εκκρίνουν. Για παράδειγμα παθογόνοι μύκητες εκκρίνουν διαφορετικές πεπτιδάσες με σκοπό την διείσδυση στον οργανισμό ξενιστή ανάλογα με την κάλυψη που εμφανίζει (Dubovenko et al., 2010).

Secretome

Οι μύκητες εκκρίνουν έναν μεγάλο αριθμό μορίων στον εξωκυτταρικό χώρο τα οποία εμπλέκονται στη σηματοδότηση, την ανάπτυξη και την απόκριση στο stress. Οι πρωτεΐνες αποτελούν την μεγάλη πλειοψηφία των μορίων αυτών και έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν το secretome των μυκήτων το οποίο αρχικά είχε οριστεί ως το σύνολο όλων των πρωτεϊνών που εκκρίνονται εξωκυτταρικά καθώς και τους εκκριτικούς μηχανισμούς. Έπειτα το 2010 ο Agrawal όρισε το secretome ως το σύνολο των πρωτεϊνών που εκκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο από ένα κύτταρο, ιστό, όργανο ή οργανισμό σε οποιοδήποτε χρόνο και υπό οποιοσδήποτε συνθήκες μέσω γνωστών ή άγνωστων εκκριτικών μηχανισμών (Agrawal et al., 2010). Είναι κοινώς αποδεκτό πως οι μύκητες έχουν ισχυρή ικανότητα έκκρισης καθώς μπορούν να παράγουν και να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες ομόλογων και ετερόλογων πρωτεϊνών. Ωστόσο η γνώση για το μονοπάτι έκκρισης των μυκήτων βρίσκεται σε πρώιμο επίπεδο. Μέχρι πρόσφατα ήταν αποδεκτό πως οι πρωτεΐνες του secretome συντίθενται και μεταφέρονται μέσω του συμβατικού εκκριτικού μονοπατιού του ενδοπλασματικού δικτύου το οποίο βασίζεται στην εξειδικευμένη αναγνώριση των πεπτιδίων σινιάλων που εντοπίζονται στον αμινο-τελικό άκρο των πρωτεϊνών. Ωστόσο πιο πρόσφατα στοιχεία έδειξαν την ύπαρξη ενός νέου τύπου εκκρινόμενων πρωτεϊνών οι οποίες στερούνται πεπτιδίου σινιάλου, γεγονός που μαρτυρά την ύπαρξη ενός νέου μονοπατιού έκκρισης που είναι ανεξάρτητο από το κλασικό μονοπάτι που περιελάμβανε το σύμπλεγμα Golgi και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτό το μη συμβατικό σύστημα περιλαμβάνει μικρά εξωκυτταρικά κυστίδια για την έξοδο των πρωτεϊνών στον εξωκυτταρικό χώρο (Vincent et al., 2020).

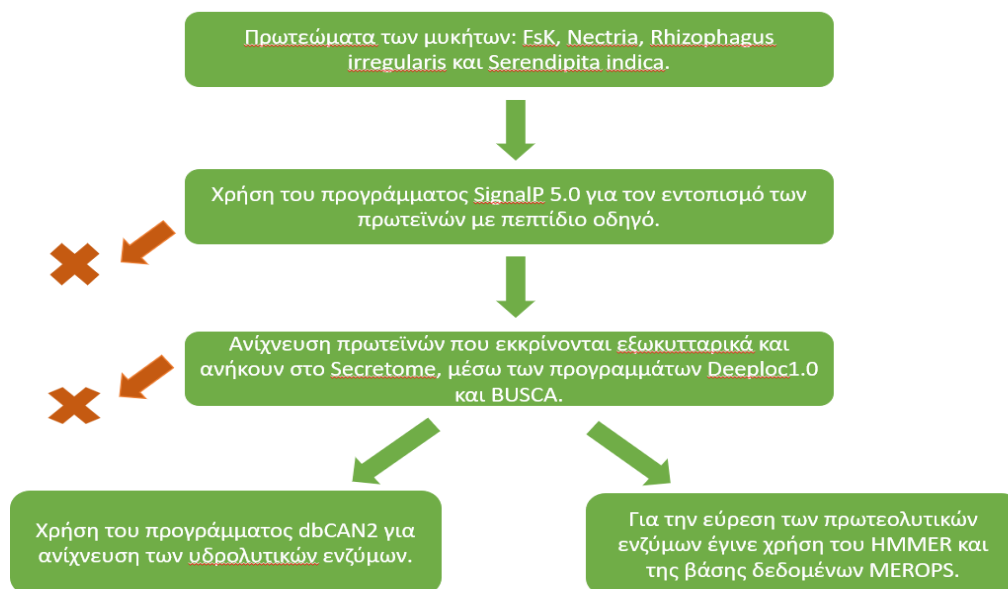
Πολλές από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες των μυκήτων με ενζυμικές δραστηριότητες όπως είναι τα υδρολυτικά ένζυμα, οι οξειδοοξειδοκτάσες, οι πρωτεάσες και οι λιπάσες έχουν προβλεπόμενες βιολογικές λειτουργίες, όπως η διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή, η αυτοπροστασία και η απόκτηση θρεπτικών. Επιπλέον αν και έχει αποδειχτεί ότι τις περισσότερες φορές οι πρωτεΐνες του secretome των μυκήτων έχουν συντηρημένη έκφραση κατά την αλληλεπίδραση με διάφορα φυτικά είδη, σε ορισμένες περιπτώσεις μυκήτων όπως είναι και ο *Rhizophagus irregularis* έχει βρεθεί ότι ορισμένες από τις πρωτεΐνες αυτές καθορίζονται από τον ξενιστή (Zeng et al., 2018). Οι μύκητες πέρα από τις πρωτεΐνες που εκκρίνουν, οι οποίες θεωρούνται ως οι πρωταγωνιστές για τις αλληλεπιδράσεις (παθογονικές ή συμβιωτικές) μεταξύ φυτών και μυκήτων, εκκρίνουν επίσης και εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες, μεταβολίτες όπως είναι τα μικρού μοριακού βάρους οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα,

φαινόλες και άλλες αρωματικές ενώσεις. Συνολικά μπορούμε να πούμε πως η φύση του secretome και των πρωτεϊνών αποτελεί μία υπογραφή του εκάστοτε οργανισμού (Girard et al., 2013). Τέλος είναι γνωστό πως τα περισσότερα εξωκυτταρικά ένζυμα των μυκήτων εκκρίνονται ιδιόσυστατα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις με σκοπό την έρευνα για κάποιο διαθέσιμο υπόστρωμα και έπειτα από την εύρεση κάποιου υποστρώματος παρατηρείται μαζική παραγωγή συγκεκριμένων ενζύμων που διασπούν το διαθέσιμο αυτό υπόστρωμα, μαρτυρώντας την ύπαρξη ενός συστήματος για την εξοικονόμηση ενέργειας από τον μύκητα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έχει ως σκοπό την σύγκριση και τον εντοπισμό των διαφορών στις επιμέρους οικογένειες των υδρολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται εξωκυτταρικά από τους τέσσερις μύκητες της ανάλυσης. Ειδικότερα ο εντοπισμός των διαφορών αυτών μπορεί να υποδείξει τις οικογένειες εκείνες που διαφοροποιούν τον ενδοφυτικό μύκητα *Fusarium solani* στέλεχος K από τους υπόλοιπους και να ρίξει φως στους μηχανισμούς που διαφοροποιούν τους παθογόνους από τους μη παθογόνους μύκητες που αποικίζουν φυτά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



Εικόνα 7. Ροή εργασίας για την εύρεση των πρωτεϊνών εκείνων που έχουν πεπτιδίο σινιάλο και εκκρίνονται εξωκυτταρικά από τους τέσσερις διαφορετικούς μύκητες. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν το secretome των μυκήτων. Έπειτα γίνεται χρήση των προγραμμάτων dbCAN2 και HMMER για την εύρεση και τον χαρακτηρισμό των υδρολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων που ανήκουν στο secretome.

Αρχικά για να γίνει η ανάλυση των πρωτεωμάτων των τεσσάρων μυκήτων, λήφθηκαν τα πρωτεώματά των 3 μυκήτων *Rhizophagus irregularis* DAOM 181602=DAOM 197198 (GCA_000439145), *Serendipita indica* DSM 11827 (GCA_000313545) και *Fusarium vanettenii* 77-13-4 (GCA_000151355.1) από την βάση δεδομένων ensemble fungi v4.06 (Howe et al., 2021) (Πίνακας 2), ενώ επίσης αντλήθηκαν από προηγούμενη ανάλυση που έγινε το σύνολο των πρωτεϊνών του *FsK* που έχουν πεπτιδίο σινιάλο για έκκριση σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα σε μορφή fasta, το οποίο προέκυψε με τη βοήθεια του προγράμματος SignalP (Almagro Armenteros et al., 2019). Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να γίνει η εύρεση των πρωτεϊνών εκείνων που αρχικά εκκρίνονται εξωκυτταρικά και όχι σε κάποιο άλλο διαμέρισμα του κυττάρου. Για την εύρεση των πρωτεϊνών αυτών έγινε χρήση δύο προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Πρώτα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Deeploc, το οποίο αποτελεί έναν αλγόριθμο πρόβλεψης του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών με τη χρήση επαναλαμβανόμενων και συγκλινόμενων νευρωνικών δικτύων και βασίζεται αποκλειστικά στην αλληλουχία της πρωτεΐνης (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc>). Έχοντας λοιπόν στη διάθεση μας το σύνολο των πρωτεϊνών του *FsK* που έχουν πεπτιδίο σινιάλο για έκκριση σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα σε μορφή fasta, το οποίο προέκυψε με τη βοήθεια του προγράμματος SignalP (Almagro Armenteros et al., 2019), έγινε εισαγωγή του σαν δεδομένο εισόδου στο Deeploc με σκοπό την εύρεση του υποκυτταρικού διαμερίσματος που εκκρίνεται η κάθε μία πρωτεΐνη από αυτές που έχουν το πεπτιδίο σινιάλο. Ωστόσο ο στόχος είναι η εύρεση των πρωτεϊνών εκείνων που εκκρίνονται μόνο εξωκυτταρικά. Για το λόγο αυτό, από τα αποτελέσματα του Deeploc απομονώθηκαν μόνο οι πρωτεΐνες εκείνες του *FsK* οι οποίες είχαν πεπτιδίο σινιάλο για εξωκυτταρική έκκριση. Έπειτα αντλήθηκαν μόνο τα ονόματα των πρωτεϊνών αυτών χωρίς τις άλλες τιμές που περιέχονται στο output του Deeploc.

Όνομα	Accession Number	Διαίρεση	Παθογόνος
<i>Fusarium vanettenii</i> 77-13-4	GCA_000151355.1	Ασκομύκητες	ΝΑΙ
<i>Rhizophagus irregularis</i>	GCA_000439145	Γκλομερομύκητες	ΟΧΙ
<i>Serendipita indica</i>	GCA_000313545	Βασιδιομύκητες	ΟΧΙ

Πίνακας 2: Αναπαράσταση των στοιχείων των τριών μυκήτων, των οποίων τα πρωτεώματα λήφθηκαν από το ensemble fungi v4.06

Ωστόσο, για την εύρεση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται εξωκυτταρικά δεν χρησιμοποιήθηκε μόνο το Deeploc αλλά και ένα ακόμα πρόγραμμα το BUSCA (<https://busca.biocomp.unibo.it/>). Πρόκειται για ένα καινούριο πρόγραμμα για την πρόβλεψη του υποκυτταρικού εντοπισμού πρωτεϊνών το οποίο συνδυάζει μεθόδους για την ταυτοποίηση πεπτιδίων σινιάλων, GPI-αγκυρών και διαμεμβρανικών περιοχών. Έπειτα, επειδή τόσο το BUSCA όπως και το Deeploc δεν δέχονται ως δεδομένα εισόδου, αρχεία που δεν περιέχουν τις αλληλουχίες σε μορφή FASTA έγινε αντιστοίχιση των πρωτεϊνών που προέκυψαν τελικά από το Deeploc με τις αντίστοιχες αμινοξικές τους αλληλουχίες με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής “fastaselecth.c” (<ftp://saf.bio.caltech.edu/pub/software/molbio/fastaselecth.c>). Στο πρόγραμμα αυτό σαν selector επιλέχθηκε το αρχείο με τα ονόματα των πρωτεϊνών που προέκυψαν από το deeploc και αναζητήθηκαν οι αλληλουχίες τους σε αρχείο που

περιείχε τις αλληλουχίες όλων των πρωτεϊνών του *FsK*. Ωστόσο επειδή προέκυψαν συνολικά πάνω από 1000 πρωτεΐνες και το BUSCA δέχεται κάθε φορά μέχρι 500 αλληλουχίες, το αρχείο χωρίστηκε σε 3 μέρη έτσι ώστε να εισαχθούν με τη σειρά στο BUSCA και έπειτα τα 3 αποτελέσματα του BUSCA ενώθηκαν με την εντολή *cat*. Από το αρχείο αυτό αφαιρέθηκε η πρώτη σειρά που περιείχε τους τίτλους από τις στήλες του *output* και επιλέχθηκαν οι σειρές με τις πρωτεΐνες που προβλέφθηκαν ως εξωκυττάρια με την χρήση της εντολής *grep*. Τέλος έγινε χρήση του προγράμματος *tabtk* (<https://github.com/lh3/tabtk>) για τον εντοπισμό των κοινών πρωτεϊνών από τα αποτελέσματα του *Deerloc* και του BUSCA, οι οποίες αποτελούν τις πρωτεΐνες που θα αποτελέσουν το τελικό *secretome*. Προκειμένου να αντιστοιχιστούν οι τελικές πρωτεΐνες του *secretome* με τις αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε αυτές, χρησιμοποιήθηκε και πάλι το πρόγραμμα βιοπληροφορικής *fastaselecth.c* (<ftp://saf.bio.caltech.edu/pub/software/molbio/fastaselecth.c>). Ενώ για την εύρεση των υδρολυτικών ενζύμων που υπάρχουν σε αυτό το σύνολο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το *tabtk* για την εύρεση κοινών πρωτεϊνών μεταξύ του αρχείου που περιείχε όλες τις πρωτεΐνες του *secretome* και του αρχείου που είχαμε στη διάθεσή μας και περιείχε όλα τα υδρολυτικά ένζυμα που εκφράζονται στον *FsK*.

Έπειτα για την ταυτοποίηση των υδρολυτικών ενζύμων που εκφράζονται στο *secretome* των τεσσάρων μυκήτων έγινε χρήση του προγράμματος *dbCAN* (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN>) (Yin et al., 2012) στο οποίο ως δεδομένο εισόδου επιλέχθηκε το αρχείο FASTA των πρωτεϊνών του *secretome* για κάθε μύκητα, ενώ ως εργαλείο το οποίο θα τρέξει το *dbCAN* επιλέχθηκε το HMMER (E-Value < 1e-15, coverage > 0.35). Έπειτα από το *output* αρχείο του *dbCAN* επιλέχθηκαν οι 2 πρώτες στήλες οι οποίες περιείχαν τα στοιχεία της πρωτεΐνης και την οικογένεια των υδρολυτικών ενζύμων στην οποία ανήκουν.

Για την ταυτοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων των τεσσάρων μυκήτων έγινε χρήση του προγράμματος HMMER. Μια από τις πρόσφατες προσθήκες του HMMER ήταν και αυτή των αλληλουχιών της βάσης δεδομένων MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>), της οποίας έγινε χρήση για την εύρεση των πρωτεολυτικών ενζύμων του *secretome* των 4 μυκήτων. Ειδικότερα έγινε χρήση του προγράμματος HMMER και μάλιστα του *rhmmer* σε περιβάλλον εντολών στο οποίο χρησιμοποιείται μια πρωτεϊνική αλληλουχία σε μορφή FASTA ως ακολουθία επερώτησης, στην συγκεκριμένη περίπτωση οι αλληλουχίες αυτές ήταν οι FASTA αλληλουχίες των *secretome* των μυκήτων, και αναζητά σε μία βάση δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Για την εύρεση των πρωτεολυτικών ενζύμων του *secretome* χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη πρωτεασών “*perunit.lib*” η οποία περιέχει τα *domains* όλων των πρωτεασών αλλά όχι ολόκληρες τις αλληλουχίες προκειμένου να μειωθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η βιβλιοθήκη αυτή αντλήθηκε από τη βάση δεδομένων MEROPS και περιέχει της πρωτεϊνικές αλληλουχίες όλων των πρωτεασών που συμπεριλαμβάνονται στο MEROPS, καθώς και των αναστολέων τους σε FASTA μορφή. Έπειτα από το αρχείο που προέκυψε από το *rhmmer* έγινε επιλογή του καλύτερου αποτελέσματος για κάθε πρωτεάση με τη χρήση της εντολής *sort*, καθώς σε πολλές πρωτεΐνες από την ακολουθία επερώτησης δηλαδή από το *secretome* αντιστοιχούν πολλά “hits” του MEROPS με διαφορετική σημαντικότητα.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1:Υδρολυτικά ένζυμα του Secretome

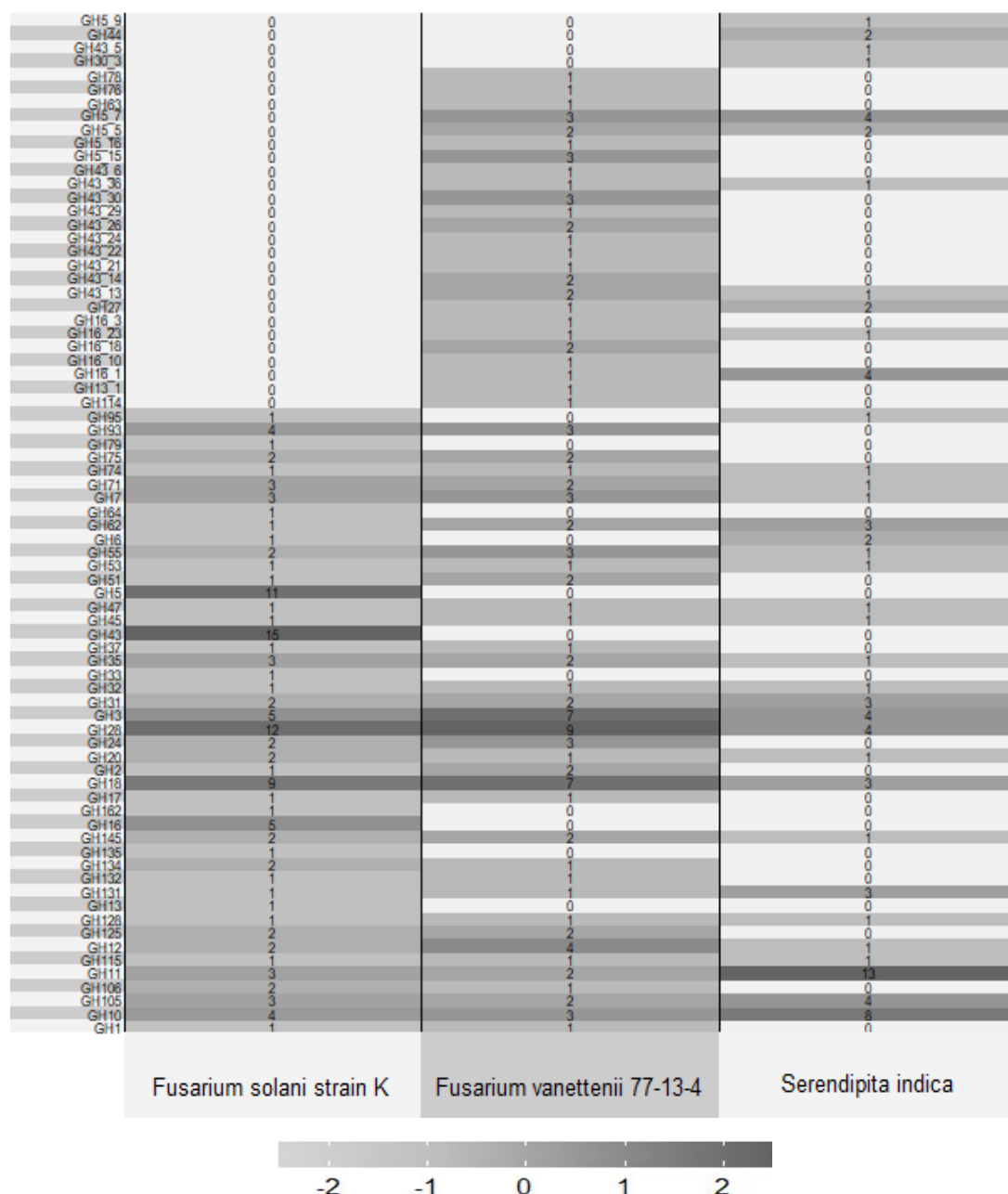
Με τη χρήση των προγραμμάτων βιοπληροφορικής έγινε ανίχνευση των ενζύμων που εκκρίνονται εξωκυτταρικά και συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα υδρολυτικά ένζυμα του secretome μέσω της χρήσης του προγράμματος dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN>) (Yin et al., 2012). Έως σήμερα έχουν χαρακτηριστεί 5 κύριες κλάσεις υδρολυτικών ενζύμων και 1 κλάση που αποτελείται από μονάδες πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM). Στα secretome των 4 μυκήτων εντοπίστηκαν ένζυμα που ανήκουν σε 5 από τις 6 υπάρχουσες κλάσεις, και συγκεκριμένα οι γλυκοσιδάσες (GH), οι πολυσακχαριτικές λυάσες (PL), οι υδατανθρακικές εστεράσες (CE), ορισμένα βοηθητικά ένζυμα (AA) καθώς και πρωτεΐνες με μονάδες δέσμευσης σε υδατάνθρακες (CBM), ενώ απουσιάζουν από τα secretomes των 4 μυκήτων ένζυμα της κλάσης των γλυκοσυλ-τρανσφερασών (GTs). Όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με τα έως τώρα στοιχεία από προηγούμενες μελέτες, η πολυπληθέστερη κλάση που έχει παρουσία στο secretome των μυκήτων είναι η κλάση των γλυκοσιδασών (GH) (Queiroz & Santana, 2020). Μεταξύ αυτών των υδρολυτικών ενζύμων, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στα ένζυμα των κλάσεων CE, GH και PL, τα οποία είναι γνωστά και ως ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος λόγω του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζουν στην αποικοδόμηση της φυτικής βιομάζας από μύκητες και βακτήρια.

4.1.1: Γλυκοσιδάσες (GH)

Οι γλυκοσιδάσες είναι η ομάδα με τις περισσότερες διαφορετικές οικογένειες ενζύμων καθώς μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 171 οικογένειες GH, και υδρολύουν γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των υδατανθράκων. Από το σύνολο των 171 οικογενειών γλυκοσιδασών που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα, οι 75 εντοπίζονται στα secretomes των μυκήτων που αναλύθηκαν. Από τους 4 μύκητες οι περισσότερες διαφορετικές οικογένειες ανιχνεύθηκαν στον φυτοπαθογόνο μύκητα *Nectria* όπου ανιχνεύθηκαν 60 οικογένειες και υποοικογένειες, γεγονός που ενισχύει την γενική θεώρηση που κυριαρχεί πως οι παθογόνοι μύκητες εκκρίνουν περισσότερες πρωτεΐνες από τους συμβιώτες και τους σαπροφυτικούς μύκητες (Vincent et al., 2020). Επιπλέον είναι αξιοσημείωτο πως δεν ανιχνεύθηκε καμία γλυκοσιδάση στο secretome του *Rhizophagus irregularis*. Όσον αφορά τον ενδοφυτικό μύκητα *FsK* και τον *Serendipita indica* εμφανίζουν 46 και 36 διαφορετικές οικογένειες γλυκοσιδασών (GH) αντίστοιχα. Κατά κανόνα οι μύκητες *FsK* και *Nectria* εμφανίζουν τα περισσότερα αντίγραφα ενζύμων για κάθε οικογένεια, με τον *FsK* να εμφανίζει ελαφρώς αυξημένα αντίγραφα στις περισσότερες οικογένειες (Εικόνα 8). Οι εκτομυκορριζικοί μύκητες όπως ο *Serendipita indica* έχουν κατά κανόνα μικρότερο αριθμό υδρολυτικών ενζύμων που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Hage & Rosso, 2021), ωστόσο υπάρχουν δύο οικογένειες στις οποίες τα περισσότερα αντίγραφα ανιχνεύθηκαν στον συγκεκριμένα μύκητα. Πρόκειται για τις οικογένειες GH10 και GH11 όπου τα αντίγραφα στον *Serendipita indica* είναι πολλαπλάσια σε σχέση με τους άλλους δύο μύκητες. Τα ένζυμα των οικογενειών GH10 και GH11 έχουν ανιχνευθεί στην πλειοψηφία των μυκήτων, έχουν δραστηριότητα ενδοξυλανάσης και διασπούν την λιγνοκυτταρινική φυτική μάζα μαζί με άλλες οικογένειες γλυκοσιδασών όπως είναι οι κυτταρινάσες των οικογενειών GH1, GH3, GH5 οι οποίες έχουν την μεγαλύτερη συνεισφορά στην αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρινικής φυτικής βιομάζας (Zhao et al., 2013). Επιπρόσθετα η μεγάλη απόκλιση στον αριθμό των ενζύμων μεταξύ των μυκήτων είναι εμφανής στις οικογένειες GH28 και GH43 όπου παρατηρείται μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο κοντινών εξελικτικά μυκήτων (*FsK* και *Nectria*) και του

Serendipita indica με τους πρώτους να εμφανίζουν πάνω από 10 αντίγραφα ενώ ο τελευταίος μόλις 4 και 3 αντίγραφα αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την γενική παρατήρηση για τον μικρότερο αριθμό γλυκοσιδασών που εκκρίνει εξωκυτταρικά. Τα ένζυμα της οικογένειας GH28 έχει βρεθεί ότι είναι παραπάνω από διπλάσια στα γονιδιώματα των φυτοπαθογόνων από ότι σε αυτά των σαπροφύτων με αποτέλεσμα η οικογένεια αυτή να θεωρείται ως πιθανός δείκτης παθογονικότητας (Soanes et al., 2008). Τα μέλη της οικογένειας GH28 είναι πολυγαλακτουρονάσες που υδρολύουν τους α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων γαλακτουρονικού στο πολυγαλακτουρονικό οξύ και διασπούν την πεκτίνη. Ωστόσο στην περίπτωση μας τα περισσότερα αντίγραφα της οικογένειας GH28 ανιχνεύθηκαν στον ενδοφυτικό μύκητα *FsK*. Από την άλλη τα ένζυμα της οικογένειας GH43 έχουν ενζυμική δραστικότητα α-L-αραβινοφουρανοσιδάσης και διασπούν την κυτταρίνη, ενώ επίσης είναι γνωστό πως σε αρκετούς οργανισμούς που διασπούν το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα παρατηρείται μεγάλη αύξηση του αριθμού των ενζύμων της οικογένειας αυτής (Matsuo et al., 2000). Τέλος τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία και με προϋπάρχοντα στοιχεία που μαρτυρούν πως ορισμένες οικογένειες GH όπως είναι η GH74 και η GH5 οι οποίες αμφότερες συμμετέχουν στην διάσπαση της ημικυτταρίνης εντοπίζονται σε όλους σχεδόν τους μύκητες που έχουν αναλυθεί σε προηγούμενες έρευνες (Zhao et al., 2013) , κάτι που ισχύει και στην ανάλυσή μας. Συγκεκριμένα η GH5 είναι μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γλυκοσιδασών με μεγάλη ποικιλία ενζυμικών δραστικότητων και εντοπίζεται ευρέως σε αρχαία, βακτήρια και ευκαρυώτες όχι όμως στον άνθρωπο. Από την άλλη τα μέλη της οικογένειας GH74 υδρολύουν β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τις ξυλογλυκάνες και τους ξυλογλυκαν-ολιγοσακχαράτες (Arnal et al., 2019).

Secretome Glycoside Hydrolases



Εικόνα 8. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων οικογενειών γλυκοσιδασών (GH) του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4 και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο BBmisc (Bischi et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας υδρολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος.

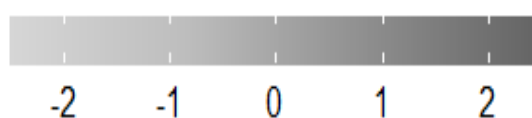
4.1.2: Πολυσακχαρικές λυάσες (PL)

Εκτός από την κλάση των γλυκοσιδασών, μία ακόμα κλάση που συγκαταλέγεται σε αυτές που έχουν κύριο ρόλο στην αποικοδόμηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος είναι η κλάση των πολυσακχαρικών λυασών (PL). Τα ένζυμα της κλάσης αυτής καταλύουν επίσης την διάσπαση των γλυκοσιδικών δεσμών αλλά σε αντίθεση με τα ένζυμα της οικογένειας GH το επιτυγχάνουν με μη-υδρολυτικό μηχανισμό, καθώς διασπούν πολυσακχαρίτες που περιέχουν ουρονικό οξύ μέσω β-διάσπασης που βασίζεται στην λυτική διάσπαση μέσω της προσφοράς πρωτονίων από ένα καταλυτικό οξύ, ενώ επίσης αποικοδομούν κυρίως πεκτίνη και γλυκοζαμινογλυκάνες. Έως σήμερα τα ένζυμα της τάξης αυτής χωρίζονται σε 42 οικογένειες εκ των οποίων μόλις 9 συναντούνται στους 3 από τους 4 μύκητες που αναλύθηκαν καθώς, όπως και στην περίπτωση των γλυκοσιδασών, έτσι και εδώ ο γλομερομύκητας *Rhizophagus irregularis* δεν εκκρίνει εξωκυτταρικά ένζυμα της κλάσης αυτής. Από την άλλη οι δύο μύκητες του γένους *Fusarium solani* *FsK* και *Nectria* εκκρίνουν πληθώρα ενζύμων αυτής της κλάσης (31 και 28 αντίστοιχα), ενώ εμφανώς λιγότερα είναι τα ένζυμα που εκκρίνει ο *Serendipita indica* καθώς είναι μόλις 8 (Εικόνα 9). Είναι γνωστό πως από όλες τις οικογένειες των πολυσακχαρικών λυασών την πιο διαδεδομένη αποτελεί η οικογένεια PL1 ενώ επιπλέον οι οικογένειες PL10 και PL11 χαρακτηρίζονται ως ειδικές για Ασκομύκητες και δεν εντοπίζονται στους Βασιδιομύκητες (Zhao et al., 2013). Τα μέλη της οικογένειας PL1 διασπούν τους α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς του πολυγαλακτουρονικού που εντοπίζεται στην πεκτίνη, ενώ παρόμοιο ρόλο στην διάσπαση της πεκτίνης έχουν και τα ένζυμα της οικογένειας PL11 (Hage & Rosso, 2021).

Και οι δύο παραπάνω θεωρήσεις επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματά μας, ωστόσο δεν επιβεβαιώνονται τα στοιχεία που υποστηρίζουν πως γενικά δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές στον αριθμό των PLs που εκκρίνονται μεταξύ ασκομυκήτων και βασιδιομυκήτων, αφού στην περίπτωση μας οι δύο ασκομύκητες (*FsK* και *Nectria*) φαίνεται να εκκρίνουν πολύ περισσότερα ένζυμα αυτής της κλάσης σε σχέση με τον *Serendipita indica*. Είναι επίσης ενδιαφέρον το γεγονός πως οι οικογένειες που έχουν την μεγαλύτερη αντιπροσώπευση και στους 3 μύκητες είναι η PL1, η PL3 η οποία εμφανίζει παρόμοια δραστηριότητα με την PL1 και η PL4 της οποίας η βασική λειτουργία σχετίζεται με την αποικοδόμηση του ραμνογαλακτουρονικού που αποτελεί συστατικό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και συγκεκριμένα των περιοχών της πεκτινής (Kofod et al., 1994). Παρατηρήθηκε ότι ανιχνεύθηκαν συνολικά 9 ένζυμα της υποοικογένειας PL3_2, η οποία αποτελείται από πεκτινάσες, στον παθογόνο ασκομύκητα *Nectria* γεγονός που επιβεβαιώνει τα στοιχεία που θέλουν τα ένζυμα που αποικοδομούν την πεκτίνη να διαδραματίζουν τον ρόλο του παράγοντα παθογένειας με αποτέλεσμα να είναι πιο κοινά στους παθογόνους μύκητες (D'Onofrio et al., 2004). Επιπλέον, όσον αφορά την οικογένεια PL1, η οποία είναι και η πιο πολυπληθής, εμφανίζει αρκετά μεγάλη διαφορά στον *Serendipita indica* καθώς ανιχνεύθηκε μόνο 1 αντίγραφο σε αντίθεση με τα πάνω από 10 αντίγραφα σε *FsK* και *Nectria*. Τέλος, όσον αφορά την οικογένεια PL7, η οποία ανιχνεύθηκε με ένα αντίγραφο στο secretome του *FsK* και δεν ανιχνεύθηκε στους άλλους μύκητες, γνωρίζουμε πως, μαζί με ένζυμα άλλων οικογενειών της κλάσης PL, καταλύει τον αποπολυμερισμό του αλγινικού με ένα μηχανισμό τριών βημάτων. Το αλγινικό είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονοσακχαρίτες που οργανώνονται σε ομογενή ή ετερογενή συμπλέγματα (Gacesa, 1987).

Polysaccharide Lyases

PL9_3	0	1	0
PL4_5	0	1	0
PL4_3	0	1	0
PL4_1	0	2	2
PL38	0	1	0
PL3_2	0	9	5
PL11_2	0	1	0
PL1_9	0	1	0
PL1_7	0	3	0
PL1_4	0	5	1
PL1_2	0	1	0
PL1_10	0	1	0
PL7	1	0	0
PL4	4	0	0
PL3	9	0	0
PL26	1	0	0
PL20	1	1	0
PL11	2	0	0
PL1	13	0	0
	Fusarium solani strain K	Fusarium vanettenii 77-13-4	Serendipita indica



Εικόνα 9. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων οικογενειών πολυσακχαριτικών λυασών του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4 και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο BBmisc (Bischi et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας υδρολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος.

4.1.3: Υδατανθρακικές εστεράσες (CE)

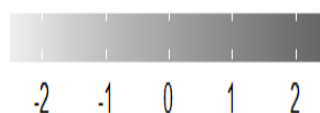
Η τρίτη και τελευταία κλάση υδρολυτικών ενζύμων που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος είναι η κλάση CE η οποία χαρακτηρίζεται από την δράση της στην υδρόλυση των υδατανθρακικών εστέρων και αφού ένας εστέρας αποτελείται από οξύ και αλκοόλη, ο υδατάνθρακας μπορεί να παίξει το ρόλο του οξέος όπως η πεκτίνη για τους μεθυλεστέρες ή το ρόλο της αλκοόλης όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ακετυλιωμένης ξυλάνης (<http://www.cazy.org/>) (Lombard et al., 2014). Συνολικά υπάρχουν 19 οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών (CE) εκ των οποίων 10 ανιχνεύθηκαν στο secretome των τεσσάρων μυκήτων. Στην περίπτωση των CE έχουμε αντιπροσώπευση και των 4 μυκήτων καθώς, και στον *Rhizophagus irregularis* ανιχνεύθηκαν 3 αντίγραφα ενζύμων CE και μάλιστα της οικογένειας CE4 η οποία είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και μέλη αυτής έχουν ανιχνευθεί στην πλειοψηφία των μυκήτων εκτός από ένα είδος, τον μύκητα *Arthrobotrys oligospora* (Zhao et al., 2013). Τα μέλη της οποίας καταλύουν την από-ακετυλίωση των πολυσακχαριτών και έχουν δραστηριότητες όπως αποακετυλάσες χίτινης, πεπτιδογλυκάνης και χιτοολιγοσακχαριτών (Fukushima et al., 2005, Hayhurst et al., 2008). Γενικά είναι γνωστό πως ασκομύκητες και βασιδιομύκητες δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές στον αριθμό των υδατανθρακικών εστερασών (CE) με τη μόνη εξαίρεση πως συνήθως οι Ασκομύκητες έχουν περισσότερα μέλη των οικογενειών CE3 και CE5 σε σχέση με τους Βασιδιομύκητες (Zhao et al., 2013). Τα ένζυμα της οικογένειας CE3 καταλύουν την αποικοδόμηση της ξυλάνης η οποία είναι συστατικό του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος και αποτελείται από μόρια ξυλόζης ενωμένα με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ τα ένζυμα της οικογένειας CE5 έχουν δράση χιπινάσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μας δεν αποτελούν εξαίρεση στον κανόνα αυτό καθώς και για τις δύο αυτές οικογένειες ανιχνεύθηκαν περισσότερα αντίγραφα στους δύο ασκομύκητες (Εικόνα 10).

Επίσης οικογένειες εστερασών για τις οποίες υπάρχουν στοιχεία πως εντοπίζονται στην πλειοψηφία των μυκήτων που έχουν αναλυθεί παλαιότερα και ανιχνεύθηκαν στους τρεις από τους τέσσερις μύκητες της ανάλυσης είναι οι οικογένειες CE1, τα ένζυμα της οποίας μπορούν να στοχεύουν πλήθος υποστρωμάτων και χρησιμοποιούν τον μηχανισμό υδρόλυσης της σερίνης που περιλαμβάνει μία καταλυτική τριάδα που αποτελείται από σερίνη, ιστιδίνη και ένα όξινο αμινοξύ, και η οικογένεια CE10 για την οποία δεν είναι πολλά γνωστά καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των μελών της είναι εστεράσες που δρουν σε μη υδατανθρακικά υποστρώματα. Στην περίπτωση της οικογένειας CE10 ανιχνεύθηκαν αντίγραφα μόνο στον *FsK*. Εκτός από την οικογένεια CE4 μέλη της οποίας ανιχνεύθηκαν και στους τέσσερις μύκητες, οι οικογένειες CE5 και CE8 εντοπίστηκαν επίσης με πολλαπλά αντίγραφα στο secretome του *FsK*, του *Nectria* και του *Serendipita indica*. Η οικογένεια CE5 είναι η οικογένεια με τα περισσότερα αντίγραφα στον παθογόνο μύκητα *Nectria* και διασπά τους εστερικούς δεσμούς της υμενίνης (Hage & Rosso, 2021). Η έντονη παρουσία της οικογένειας CE5 στον *Nectria* έρχεται να επιβεβαιώσει το γεγονός πως για τα φυτοπαθογόνα τα πιο απαραίτητα ένζυμα αποτελούν αυτά που επιτρέπουν στον μύκητα να διεισδύσει στο προστατευτικό στρώμα υμενίνης της επιδερμίδας του φυτού και να διαταράξει το δίκτυο πεκτίνης του κυτταρικού τοιχώματος στο οποίο είναι ενσωματωμένα τα ινίδια της κυτταρίνης (Soanes et al., 2008). Ενώ όσον αφορά την οικογένεια CE8 αποτελεί μία από τις 9 βασικές οικογένειες υδρολυτικών ενζύμων που μπορούν και διασπούν την πεκτίνη (Zhao et al., 2013). Τέλος μπορούμε να πούμε πως συνολικά όσον αφορά την κλάση CE ο μη παθογόνος ενδοφυτικός μύκητας *FsK* εμφανίζει τον μεγαλύτερο αριθμό ενζύμων (27) σε σχέση με τους άλλους 3 μύκητες ενώ επίσης έχουν ανιχνευθεί

στον μύκητα αυτό μέλη από τις περισσότερες διαφορετικές οικογένειες υδατανθρακικών εστερασών και συγκεκριμένα από 9 διαφορετικές οικογένειες CE.

Secretome Carbohydrate Esterases

CE15	0	0	0	1
CE8	4	2	0	3
CE5	5	6	0	3
CE4	3	4	3	6
CE3	5	3	0	1
CE2	1	1	0	0
CE16	4	1	0	3
CE12	3	2	0	0
CE10	1	0	0	0
CE1	1	1	0	7
	<i>Fusarium solani</i> strain K	<i>Fusarium vanettenii</i> 77-13-4	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Serendipita indica</i>



Εικόνα 10. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων οικογενειών υδατανθρακικών εστερασών (CE) του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4, *Rhizophagus irregularis* και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο Bbmisc (Bischi et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας υδρολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος.

4.1.4: Βοηθητικά ένζυμα (AA)

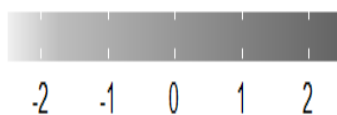
Η κλάση των βοηθητικών ενζύμων (AA) αποτελείται από οξειδοαναγωγικά ένζυμα τα οποία δρουν σε συνδυασμό με τα υδρολυτικά ένζυμα. Η κλάση αυτή αποτελεί την τελευταία προσθήκη στον κατάλογο των κλάσεων των υδρολυτικών ενζύμων και αυτό προέκυψε από την πρόσφατη ανακάλυψη πως μέλη των οικογενειών CBM33 και GH61 είναι στην πραγματικότητα λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες (LPMOs) και έτσι ήταν απαραίτητος ο επαναπροσδιορισμός τους και η κατατάξη τους σε μία κατάλληλη νέα κατηγορία. Έπειτα αποφασίστηκε να ενταχθούν στην κατηγορία των βοηθητικών ενζύμων (AA) και τα ένζυμα αποικοδόμησης της λιγνίνης μιας και η λιγνίνη βρίσκεται μαζί με τους πολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Έτσι πλέον η κλάση AA περιέχει 9 οικογένειες λιγνολυτικών ενζύμων και 7 οικογένειες λυτικών πολυσακχαρικών μονοοξυγενασών (LPMOs) (<http://www.cazy.org/>) (Levasseur et al., 2013). Από το σύνολο των 17 οικογενειών AA, ανιχνεύθηκαν στα secretomes των 4 μυκήτων 10 διαφορετικές οικογένειες με τον μεγαλύτερο αριθμό ενζύμων να παρατηρούνται στους μύκητες *FsK*, *Nectria* και *Serendipita indica*, μάλιστα σε αντίθεση με άλλες κλάσεις όπως η GH όπου ο αριθμός των ενζύμων της *Serendipita indica* ήταν αρκετά μικρότερος από αυτόν των ασκομυκήτων, στην περίπτωση της κλάσης AA οι αριθμοί των βοηθητικών ενζύμων που εκκρίνονται από κάθε μύκητα δεν εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις.

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως οι οικογένειες με την μεγαλύτερη αντιπροσώπηση είναι οι AA7 και AA9. Όσον αφορά τα μέλη της οικογένειας AA7 γνωρίζουμε ότι αποτελούν γλυκό-ολιγοσακχαρικές οξειδάσες και έχουν την δυνατότητα να οξειδώνουν μία μεγάλη γκάμα υδατανθράκων όπως η D-γλυκόζη και η μαλτόζη, ενώ γνωστά ένζυμα της οικογένειας αυτής πιθανώς εμπλέκονται στον βιομετασχηματισμό ή την αποτοξικοποίηση λιγνοκυτταρινικών συστατικών (Levasseur et al., 2013). Το αξιοσημείωτο με αυτή την οικογένεια πέρα από την έντονη αντιπροσώπηση που έχει στους μύκητες που αναλύθηκαν, είναι πως εμφανίζει μία πολύ μεγάλη διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων μεταξύ των δύο κοντινών μυκήτων του γένους *Fusarium solani* καθώς στον *FsK* ανιχνεύθηκαν 11 αντίγραφα ενώ στον *Nectria 27* αντίγραφα. Από την ανάλυση μας προέκυψε πως σε αντίθεση με τα ένζυμα της οικογένειας AA7 αυτά της AA9 είναι πολύ περισσότερα στον βασιδιομύκητα *Serendipita indica* ο οποίος εκκρίνει 21 αντίγραφα αυτής της οικογένειας σε αντίθεση με τον *FsK* και τον *Nectria* που εκκρίνουν 12 και 7 αντίστοιχα (Εικόνα 11). Τα μέλη της οικογένειας AA9 αποτελούν λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες που διασπούν την κυτταρίνη και σε συνεργασία με ένζυμα άλλων οικογενειών όπως αυτά της GH131, η οποία είναι μία οικογένεια που αποτελείται μόνο από ένζυμα με καταγωγή από μύκητες και που συχνά περιέχουν μονάδες δέσμευσης σε κυτταρίνη από την οικογένεια CBM1 (Lafond et al., 2012), αποικοδομούν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και ειδικότερα την κυτταρίνη. (Rytioja et al. 2014). Η παρουσία αυτών των ενζύμων στα secretomes των ενδοφυτικών μυκήτων ενισχύει τον ρόλο των πρωτεασών και των υπόλοιπων υδρολυτικών ενζύμων στην θρέψη και τον αποικισμό των μυκήτων στο φυτό (Queiroz & Santana, 2020). Επιπρόσθετα, από προηγούμενες μελέτες είναι γνωστό πως ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν για μονοοξυγενάσες των οικογενειών AA9, AA10, AA11 και AA13 είναι μεγαλύτερος στους μύκητες λευκής σήψης οι οποίοι αποτελούν σαπροφυτικούς βασιδιομύκητες στην πλειοψηφία τους σε αντίθεση με άλλους μύκητες σήψης (Sista Kameshwar & Qin, 2018). Οι μύκητες λευκής σήψης προκαλούν χαρακτηριστική λευκή σήψη όταν αναπτύξουν το μυκήλιο τους σε νεκρή οργανική ύλη όπως ξύλα και γενικά υποστρώματα πλούσια σε κυτταρίνη και ημικυτταρίνη (Pointing, 2001). Τέλος, σχετικά με την οικογένεια AA1 παρατηρήθηκε

πώς στον *FsK* ανιχνεύθηκαν 5 αντίγραφα ενώ στους υπόλοιπους τρεις μύκητες μόλις ένα. Τα ένζυμα της οικογένειας AA1 έχουν δραστικότητα λακκάσης και διασπούν την λιγνίνη (Hage & Rosso, 2021).

Secretome Auxiliary Activity

AA5_1	0	0	3	1
AA1_1	0	0	1	1
AA8	0	2	0	1
AA5	0	1	0	3
AA3_2	0	7	0	7
AA3_1	0	1	0	0
AA1_3	0	1	0	0
AA9	12	7	0	21
AA7	11	27	1	3
AA3	8	1	0	0
AA2	1	0	0	0
AA16	1	0	0	1
AA14	1	1	0	3
AA11	4	4	1	0
AA1	5	0	0	0
	<i>Fusarium solani</i> strain K	<i>Fusarium vanettenii</i> 77-13-4	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Serendipita indica</i>



Εικόνα 11. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων οικογενειών βοηθητικών ενζύμων (AA) του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4, *Rhizophagus irregularis* και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο BBmisc (Bischi et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας υδρολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος.

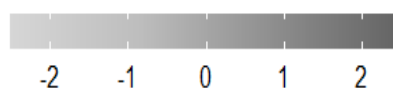
4.1.5: Μονάδες δέσμευσης σε υδατάνθρακες (CBM)

Ως μονάδες δέσμευσης σε υδατάνθρακες χαρακτηρίζονται οι αλληλουχίες αμινοξέων μέσα σε ένα υδρολυτικό ένζυμο με διακριτή αναδίπλωση που προσδίδει ικανότητα δέσμευσης σε υδατάνθρακες (<http://www.cazy.org/>) (Boraston et al., 2004). Είναι κοινώς αποδεκτό πως η ενζυμική αποικοδόμηση των αδιάλυτων πολυσακχαριτών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αντιδράσεις στην γη και καταλύεται από γλυκοσιδάσες (GH). Ωστόσο οι γλυκοσιδάσες δεν είναι πάντα αποτελεσματικές στην διάσπαση των γλυκοσιδικών δεσμών καθώς οι δεσμοί αυτοί δεν είναι προσβάσιμοι από το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών. Έτσι για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα πολλές γλυκοσιδάσες οι οποίες χρησιμοποιούν αδιάλυτα υποστρώματα, αποτελούνται πέρα από τις καταλυτικές μονάδες και από άλλες μονάδες οι οποίες είναι προσαρτημένες σε αυτά τα ένζυμα και είναι μη καταλυτικές. Οι μονάδες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με τους πολυσακχαρίτες-υποστρώματα. Επιπλέον παρά το γεγονός πως η πλειοψηφία των μονάδων αυτών στοχεύει συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, υπάρχουν ορισμένες οικογένειες CBM οι οποίες προσδένονται σε αδιάλυτους πολυσακχαρίτες υπό μορφή αποθήκευσης όπως το άμυλο και το γλυκογόνο (Boraston et al., 2004). Πολλές οικογένειες CBM έχουν πλέον ταυτοποιηθεί πειραματικά και αρκετές εκατοντάδες πιθανές CBM μπορούν να ελεγχθούν και να ταυτοποιηθούν περαιτέρω με βάση την ομοιότητα στην αμινοξική ακολουθία.

Παρομοίως με τις καταλυτικές μονάδες των γλυκοσιδασών έτσι και οι μονάδες πρόσδεσης σε υδατάνθρακες χωρίζονται σε οικογένειες με βάση την ομοιότητα των αμινοξικών αλληλουχιών. Συνολικά έχουν εντοπιστεί 88 διαφορετικές οικογένειες CBM εκ των οποίων μόλις 4 ανιχνεύθηκαν στους μύκητες της ανάλυσής μας ενώ επίσης δεν ανιχνεύθηκε κάποιο ένζυμο της κλάσης CBM στον γκλομερομύκητα *Rhizophagus irregularis* (Εικόνα 12). Όσον αφορά τον *FsK* ανιχνεύθηκαν ένζυμα 3 διαφορετικών οικογενειών CBM στο secretome του και μάλιστα των οικογενειών CBM38, CBM50 και CBM63 ενώ σε κάθε μία από αυτές τις οικογένειες εντοπίστηκε ένα μόλις αντίγραφο. Οι μονάδες CBM50 διακρίνονται για την πρόσδεσή τους σε βακτηριακές πεπτιδογλυκάνες και στη χιτίνη, ειδικότερα συμβάλλουν στην κυτταρική διαίρεση μέσω της πρόσδεσης στην βακτηριακή πεπτιδογλυκάνη ενώ εντοπίζονται επίσης και σε χιτινάσες της οικογένειας GH18 συμβάλλοντας στην αντιμυκητιακή δραστηριότητα των ενζύμων αυτών (Onaga & Taira, 2008). Από την άλλη, οι μονάδες που ανήκουν στην οικογένεια CBM63 εντοπίζονται κυρίως στις εξπανσίνες οι οποίες είναι πρωτεΐνες που είναι άφθονες στα φυτά και συμμετέχουν στην τροποποίηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, ενώ θεωρείται πως οι μύκητες μπορεί να απέκτησαν εξπανσίνες μέσω οριζόντιας μεταφοράς από φυτά στο παρελθόν (Nikolaidis et al., 2014). Οι μύκητες *Nectria* και *Serendipita indica* εκκρίνουν εξωκυτταρικά μονάδες μίας μόνο οικογένειας και μάλιστα στην περίπτωση του *Serendipita indica* ανιχνεύθηκαν 3 αντίγραφα της οικογένειας CBM13, η οποία συμμετέχει στην αποικοδόμηση της ξυλάνης, μέλη της οποίας ωστόσο δεν ανιχνεύθηκαν στους άλλους μύκητες. Το τελευταίο έρχεται να επαληθεύσει δεδομένα από προηγούμενες μελέτες όπου διαπιστώθηκε πως οι ασκομύκητες έχουν την τάση να έχουν λιγότερες μονάδες CBM13 από τους βασιδιομύκητες όπως είναι ο *Serendipita indica* (Zhao et al., 2013). Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως οι λιγότερες σε αριθμό μονάδες πρόσδεσης σε υδατάνθρακες παρατηρήθηκαν στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Nectria* ενώ στους μη παθογόνους *FsK* και *Serendipita indica* ανιχνεύθηκαν περισσότερα μέλη της κλάσης CBM.

Secretome Carbohydrate-Binding Modules

CBM13	0	0	3
CBM63	1	1	0
CBM50	1	0	0
CBM38	1	0	0
	Fusarium solani strain K	Fusarium vanettenii 77-13-4	Serendipita indica

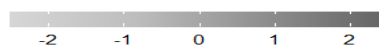
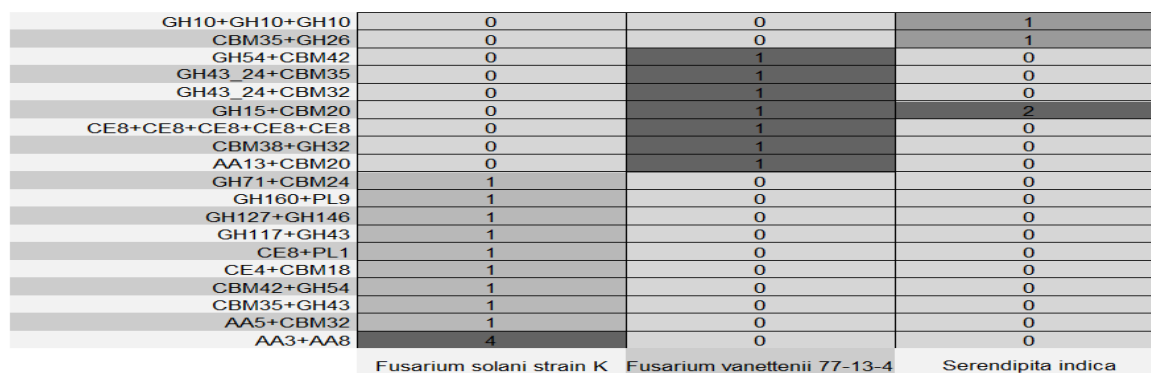


Εικόνα 12. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων οικογενειών μονάδων πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM) του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4 και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο BBmisc (Bischi et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας υδρολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος.

4.1.6: Ένζυμα με μικτές κλάσεις

Από την χρήση του προγράμματος dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN>) (Yin et al., 2012) για τον αυτόματο χαρακτηρισμό των υδρολυτικών ενζύμων των τεσσάρων μυκήτων, ανιχνεύθηκαν πέρα από τα ένζυμα μέλη των γνωστών κλάσεων των υδρολυτικών ενζύμων και ορισμένα ένζυμα που ανήκουν σε παραπάνω από μία κλάση. Μιας και το πρόγραμμα αυτό βασίζεται και ψάχνει σε ορισμένες signature domains που χαρακτηρίζουν κάθε οικογένεια των υδρολυτικών ενζύμων, προφανώς στα ένζυμα του της παραπάνω κατηγορίας ανιχνεύθηκαν παραπάνω από μία signature domain. Όπως και ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε πως την πλειοψηφία των μελών αυτής της κατηγορίας αποτελούν ένζυμα με μικτές κλάσεις GH και CBM αφού όπως αναλύθηκε και παραπάνω οι μονάδες πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM) είναι προσαρτημένες σε γλυκοσιδάσες (GH) και με αυτό τον τρόπο τις βοηθούν να ξεπεράσουν τον πρόβλημα της αναποτελεσματικότητας στην διάσπαση των γλυκοσιδικών δεσμών αδιάλυτων πολυσακχαριτών που εμφανίζουν, για αυτό και είναι πολύ λογικό οι 12 από τις 19 διαφορετικές κατηγορίες που ανιχνεύθηκαν να αποτελούνται από τέτοιους συνδυασμούς κλάσεων (Εικόνα 13). Επιπλέον, σε αυτή την κατηγορία υπάρχει μία κυριαρχία του μύκητα *FsK* ο οποίος εκκρίνει 13 ένζυμα με μικτή κλάση σε αντίθεση με τα 7 και 3 του *Nectria* και του *Serendipita indica*, ενώ επίσης ο συνδυασμός με τον μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων είναι ο AA3 και AA8 ο οποίος ανιχνεύθηκε με 4 αντίγραφα στον *FsK* και κανένα στους άλλους μύκητες. Τα ένζυμα της οικογένειας AA3 διαδραματίζουν ρόλο στην αποικοδόμηση της λιγνοκυτταρίνης σε συνεργασία με ένζυμα άλλων οικογενειών της κλάσης αυτής όπως η AA2 ή οι λυτικές πολυσακχαρικές μονοοξυγενάσες της οικογένειας AA9, ενώ είναι πιο άφθονα σε μύκητες που αποικοδομούν ξύλο (Sützl et al., 2018). Τέλος, όσον αφορά την οικογένεια AA8 γνωρίζουμε πως αποτελείται από μια μονάδα κυτοχρώματος και μπορεί να εντοπιστεί είτε ως αυτοτελής είτε σε σύνδεση με μία μονάδα πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM). Είναι αξιοσημείωτο πως δεν ανιχνεύθηκαν ένζυμα AA8 ως αυτοτελή στον *FsK* όπως φαίνεται και στον θερμικό χάρτη των AA οικογενειών (Εικόνα 13).

Secretome Mixed Families



Εικόνα 13. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων μικτών οικογενειών του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4 και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο BBmisc (Bischl et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας υδρολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος.

4.2. Πρωτεολυτικά ένζυμα του Secretome

Από την συγκριτική ανάλυση των τεσσάρων μυκήτων και μέσω της χρήσης του προγράμματος HMMER το οποίο αναζήτησε αλληλουχίες σε μία βιβλιοθήκη που περιέχει τα domains όλων των πρωτεολυτικών ενζύμων που συμπεριλαμβάνονται στη βάση δεδομένων MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>), εντοπίστηκαν τα πρωτεολυτικά ένζυμα που έχει προβλεφθεί πως εκκρίνονται από τα 4 διαφορετικά είδη μυκήτων που αναλύθηκαν. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων MEROPS υπάρχουν μέχρι σήμερα 8 διαφορετικές κλάσεις πρωτεολυτικών ενζύμων που διακρίνονται με βάση τις λειτουργικές ομάδες στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οι οποίες παίρνουν το όνομα τους από το γράμμα που υποδηλώνει το καταλυτικό αμινοξύ, για παράδειγμα η κλάση C από την κυστεΐνη ή η κλάση S από το αμινοξύ της σερίνης. Οι πρωτεάσες που ανιχνεύθηκαν σε ένα τουλάχιστον από τα 4 διαφορετικά είδη μυκήτων που αναλύθηκαν, ανήκουν σε οικογένειες ασπαρτο-πρωτεασών(A), κυστεΐνο-πρωτεασών(C), πρωτεασών γλουταμινικού(G), μεταλλο-πρωτεασών (M), σερινο-πρωτεασών (S) και πρωτεασών θρεονίνης (T), ενώ τέλος εντοπίστηκαν και 2 αντίγραφα αγνώστου καταλυτικού αμινοξέος (U), γεγονός που επιβεβαιώνει τα στοιχεία από πρότερες αναλύσεις που έδειξαν πως πρωτεολυτικά ένζυμα όλων σχεδόν των κλάσεων έχουν εντοπιστεί στα περισσότερα γονιδιώματα των μυκήτων (Zhou et al., 2014). Η πρώτη παρατήρηση προκύπτει από την σύγκριση των αριθμών των πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται γενικά από τους 4 μύκητες σε σχέση με αυτόν των υδρολυτικών ενζύμων που είναι μεγαλύτερος. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την θεώρηση πως τα πρωτεολυτικά ένζυμα διαδραματίζουν δευτερεύοντα ρόλο στο secretome των μυκήτων και αποτελούν την μειοψηφία των ενζύμων που εκκρίνονται, έχοντας κυρίως συνεργατικό ρόλο με τα πολλά σε αριθμό υδρολυτικά ένζυμα (Girard et al., 2013). Έπειτα παρατηρείται πως οι δύο κλάσεις με τον μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων και στους 4 μύκητες είναι οι κλάσεις των σερινο-πρωτεασών και των μεταλλο-πρωτεασών, γεγονός που δεν αποτελεί έκπληξη αφού είναι γνωστό πως και σε άλλες συγκριτικές αναλύσεις, στην συντριπτική πλειοψηφία των μυκήτων παρατηρήθηκε πως οι κυρίαρχες κλάσεις πρωτεολυτικών ενζύμων ήταν αυτές οι δύο (Semenov et al., 2017). Τόσο οι σερινο-πρωτεάσες όσο και οι μεταλλο-πρωτεάσες ανήκουν στην κατηγορία των καρβοξυπεπτιδασών επειδή δρουν στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και απελευθερώνουν ένα αμινοξύ ή ένα διπεπτίδιο. Επίσης και οι δύο αυτές κλάσεις ανήκουν στις ενδοπεπτιδάσες οι οποίες χαρακτηρίζονται από την προτίμησή τους στην διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών που βρίσκονται σε εσωτερικές περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (de Souza et al., 2015).

Επιπλέον παρατηρούμε πως όπως ίσχυε και για τα υδρολυτικά ένζυμα, οι δύο μύκητες που ανήκουν στο βασίλειο των ασκομυκήτων (*FsK* και *Nectria*) εμφανίζουν μεγαλύτερο συνολικά αριθμό πρωτεολυτικών ενζύμων σε όλες τις κλάσεις σε σχέση με τους άλλους δύο μύκητες, ενώ επίσης όσον αφορά τα πρωτεολυτικά ένζυμα, η ομοιότητα στους αριθμούς των αντιγράφων σε κάθε οικογένεια είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται στις συγκρίσεις των υδρολυτικών ενζύμων των δύο αυτών ειδών (Εικόνα 14). Έχοντας λοιπόν υπόψιν την σημαντική διαφορά τους ως προς τον τρόπο ζωής τους, αφού ο *FsK* είναι μη παθογόνος και ο *Nectria* παθογόνος, μπορεί κανείς να συμπεράνει πως τα πρωτεολυτικά ένζυμα δεν έχουν ιδιαίτερη συνεισφορά στην διαφοροποίηση των δύο μυκήτων ως προς την παθογονικότητα, αφού τα πρωτεολυτικά προφίλ τους είναι παρόμοια. Επιπλέον όσον αφορά την ομοιότητα στο μέγεθος των πρωτεολυτικών ενζύμων του secretome που παρατηρείται μεταξύ των δύο αυτών μυκήτων, δεν είναι κάτι που μας προκαλεί εντύπωση καθώς είναι γνωστό

πως κατά βάση το μέγεθος του secretome των παθογόνων μυκήτων δεν διαφέρει αρκετά από αυτό των μη παθογόνων (Soanes et al., 2008).

Από την άλλη, όπως συμβαίνει και με τα υδρολυτικά ένζυμα παρατηρείται πως ο μύκητας *Rhizophagus irregularis*, ο οποίος ανήκει στους Γκλομερομύκητες εκκρίνει τα λιγότερα σε αριθμό πρωτεολυτικά ένζυμα από τα τέσσερα διαφορετικά είδη, ενώ σαφώς περισσότερα εκκρίνει ο Βασιδιομύκητας *Serendipita indica* ο οποίος εκκρίνει ένζυμα που ανήκουν σε 4 διαφορετικές κλάσεις, με τις 2 βασικές να είναι, όπως και στα άλλα είδη, οι σερινό-πρωτεάσες και οι μεταλλο-πρωτεάσες (Εικόνα 14). Ωστόσο ενώ οι σερινο-πρωτεάσες αποτελούν στα περισσότερα είδη μυκήτων την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται εξωκυτταρικά με τις οικογένειες S8 και S1 να είναι οι κυρίαρχες (Dubovenko et al., 2010), στον μύκητα *Serendipita indica* ανιχνεύθηκαν περισσότερες μέταλλο-πρωτεάσες από ότι σερινο-πρωτεάσες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να επαληθεύσουν τα αποτελέσματα προηγούμενων αναλύσεων όπου είχε εντοπιστεί αυτή η αντιδιαμετρική διαφορά στα μοτίβα έκκρισης πρωτεολυτικών ενζύμων, με τις σερινο-πρωτεάσες να κυριαρχούν στους Ασκομύκητες όπως γίνεται στον *FsK* και τον *Nectria* και τις μεταλλοπρωτεάσες να κυριαρχούν στους Βασιδιομύκητες όπως είναι ο *Serendipita indica* (Semenova et al., 2017).

Είναι γνωστό πως τόσο το περιβάλλον όσο και ο τρόπος ζωής και οι τροφικές σχέσεις με διαφορετικά είδη οργανισμών που αναπτύσσει ο μύκητας καθορίζουν και την σύνθεση των ενζύμων που εκφράζει και εκκρίνει. Ειδικότερα όσον αφορά τους παθογόνους μύκητες, τα πρωτεολυτικά ένζυμα που εκκρίνουν τους επιτρέπουν να προσαρμόζονται σε διαφορετικές συνθήκες. Οι μύκητες έχουν επεκτείνει το “οπλοστάσιο” των πεπτιδασών που εκκρίνουν κατά την εξέλιξή τους. Ειδικότερα οι παθογόνοι μύκητες παράγουν πολλές διαφορετικές πεπτιδάσες έτσι ώστε να διεισδύσουν στον οργανισμό ξενιστή ανάλογα με τις άμυνες που εμφανίζει κάθε είδος ξενιστή (St. Leger et al. 1986, Freimoser et al. 2005). Όπως προαναφέρθηκε οι δύο βασικές κλάσεις πρωτεολυτικών ενζύμων με βάση τον καταλυτικό μηχανισμό είναι η σερινο-πρωτεάσες και οι μεταλλο-πρωτεάσες. Όσον αφορά τις πρώτες, χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας σερίνης στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, γενικά είναι ενεργές σε ουδέτερο και αλκαλικό pH 7-11 και έχουν χαμηλό μοριακό βάρος. Από την άλλη οι μεταλλοπρωτεάσες, αποτελούν τις πιο διακριτές ως προς τον καταλυτικό μηχανισμό πρωτεάσες, καθώς χαρακτηρίζονται από την απαίτηση ενός δισθενούς μεταλλικού ιόντος προκειμένου να είναι ενεργές και προτιμούν ουδέτερο pH (de Souza et al., 2015).

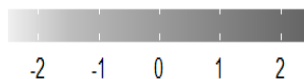
Από πειράματα που έχουν γίνει στα οποία έγινε καλλιέργεια πολλών διαφορετικών ειδών μυκήτων σε υγρά υποστρώματα επιβεβαιώθηκε η αρνητική συσχέτιση μεταξύ σερινο-πρωτεασών και μεταλλοπρωτεασών, με αποτέλεσμα στην συντριπτική πλειοψηφία των μυκήτων που καλλιεργήθηκαν, μόνο πρωτεάσες της μίας από τις δύο κλάσεις να κυριαρχούν, με εξαίρεση μόνο τον βασιδιομύκητα *Pleurotus ostreatus* ο οποίος παρήγαγε τόσο σερινο-πρωτεάσες όσο και μέταλλο-πρωτεάσες. Τα είδη των μυκήτων στα οποία κυριαρχούσαν οι σερινο-πρωτεάσες οι οποίες μάλιστα ήταν κυρίως ενεργές σε pH 7,5-8,6 ανήκαν κυρίως στους Ασκομύκητες, ενώ οι μύκητες στους οποίους παρατηρούνταν χαμηλή ενεργότητα σερινο-πρωτεασών και υψηλή ενεργότητα μεταλλο-πρωτεασών με προτιμώμενο pH 5,4-7,7 ήταν Βασιδιομύκητες (Semenova et al., 2017). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσής μας (Εικόνα 14) όπου διαπιστώνεται πως στα secretomes του *FsK* και του *Nectria* που ανήκουν στους Ασκομύκητες υπάρχει εμφανής επικράτηση των σερινο-πρωτεασών έναντι των μεταλλο-πρωτεασών με τις πρώτες να εμφανίζουν διπλάσια αντίγραφα. Ενώ το αντίθετο

παρατηρείται στον βασιδιομύκητα *Serendipita indica* όπου τα πολυπληθέστερα σε αντίγραφα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι αυτά της κλάσης των μεταλλο-πρωτεασών. Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως οι ασπαρτικές πρωτεάσες (A) αποτελούν την τρίτη σε σειρά κλάση πρωτεασών που ανιχνεύθηκαν και στους 4 μύκητες και σε ορισμένους από αυτούς με πολλά αντίγραφα. Η κλάση των ασπαρτικών πρωτεασών έχει απομονωθεί από μία πλειάδα διαφορετικών ειδών μυκήτων και θεωρείται σχεδόν εξίσου κοινή με την κλάση των σερινο-πρωτεασών (North, 1982). Ειδικότερα ανιχνεύθηκαν πάνω από 10 ασπαρτικές πρωτεάσες στους ασκομύκητες *FsK* και *Nectria* ενώ λιγότεροι εντοπίστηκαν στον βασιδιομύκητα *Serendipita indica* και μόλις ένα αντίγραφο στον γλομερομύκητα *Rhizophagus irregularis*.

Όσον αφορά τις σερινο-πρωτεάσες, οι μύκητες όπως και ολοι οι υπόλοιποι ευκαρυώτες εκφράζουν ένα μεγάλο αριθμό τόσο ενδοκυτταρικών σερινο-πρωτεασών οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στην απόπτωση, στην μεταγωγή σήματος και σε άλλες πολλές λειτουργίες, αλλά επίσης εκκρίνει και αρκετές σερινο-πρωτεάσες εξωκυτταρικά. Ο τρόπος ζωής και το τροφικό προφίλ των μυκήτων αντικατοπτρίζονται στη σύνθεση των ενζύμων που εκκρίνει τα οποία διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αποικοδόμηση θρεπτικών και την αφομοίωσή τους αλλά και στην προστασία από τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή τους. Ειδικότερα οι σερινο-πρωτεάσες εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις ξενιστή-μύκητα είτε αυτός είναι παθογόνος είτε είναι συμβιώτης (Reddy et al., 1996). Για παράδειγμα οι σερινο-πρωτεάσες των μυκήτων χρησιμοποιούνται για την διάσπαση των χιτινασών που εκκρίνονται από το φυτό ως απόκριση και στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα του μύκητα, ενώ επίσης είναι απαραίτητες και για την πρόσληψη θρεπτικών από αποθέματα πλούσια σε πρωτεΐνες που υπάρχουν τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Οι μύκητες επειδή είναι οσμोटροφικοί και διασπούν εξωκυτταρικά οργανική ύλη για την απόκτηση θρεπτικών, είναι αναμενόμενο πως θα έπρεπε να έχουν μία τεράστια ποικιλία από οικογένειες σερινο-πρωτεασών που εκκρίνουν, ωστόσο αποτελέσματα άλλων πειραμάτων έχουν δείξει πως το μεγαλύτερο μέρος των οικογενειών των σερινο-πρωτεασών ανιχνεύονται και σε άλλους ευκαρυώτες, μαρτυρώντας κατά αυτό τον τρόπο μία πιθανή καταγωγή τους που προέρχεται από τον τελευταίο κοινό πρόγονο των ευκαρυωτών (Muszewska et al., 2017).

Secretome Peptidases

family U	1	1	0	0
family T	2	1	0	0
family S	86	81	13	25
family M	42	40	2	38
family G	3	3	0	0
family C	4	4	0	3
family A	12	11	1	4
	Fusarium solani strain K	Fusarium vanettenii 77-13-4	Rhizophagus irregularis	Serendipita indica



Εικόνα 14. Θερμικός χάρτης που απεικονίζει την αφθονία διάφορων οικογενειών πρωτεολυτικών ενζύμων του secretome των μυκήτων *Fusarium solani* strain K, *Fusarium vanettenii* 77-13-4 και *Serendipita indica*. Έγινε κανονικοποίηση των τιμών με το πακέτο BBmisc (Bischi et al., 2017) στην R 3.6.1 και συγκεκριμένα με την μέθοδο “range” και κλίμακα από -2.5 έως 2.5. Οι θετικές και αρνητικές τιμές σημαίνουν πως η οικογένεια ανιχνεύθηκε αρκετά ή λιγότερο, αντίστοιχα στο συγκεκριμένο είδος. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των πρωτεϊνών κάθε οικογένειας πρωτεολυτικών ενζύμων σε κάθε είδος. Οι πρωτεάσες που ανιχνεύθηκαν ανήκουν σε οικογένειες ασπαρτο-πρωτεασών(A), κυστεϊνο-πρωτεασών(C),πρωτεασών γλουταμινικού (G),μεταλλο-πρωτεασών (M),σερινο-πρωτεασών (S) και πρωτεασών θρεονίνης (T) ενώ τέλος εντοπίστηκαν και 2 αντίγραφα άγνωστου καταλυτικού αμινοξέος (U).

Στους μύκητες υπάρχουν δύο βασικές οικογένειες σερινο-πρωτεασών και αυτές είναι η οικογένεια S8 της σουμπιλισίνης και η οικογένεια S1 της χυμοθρυψίνης. Η οικογένεια της σουμπιλισίνης S8 έχει παρόμοια αντιπροσώπευση μεταξύ μυκήτων και βακτηρίων. Από την άλλη η οικογένεια της χυμοθρυψίνης η οποία περιέχει θρυψίνες και χυμοθρυψίνες της υποοικογένειας S1A ανιχνεύεται σε μεγάλα ποσοστά στα ζώα αλλά εμφανίζει μικρότερη αφθονία στους μύκητες στους οποίους τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα είναι θρυψίνες (Dubovenko et al., 2010). Επιπλέον σύμφωνα με προηγούμενες παρατηρήσεις, η παραγωγή θρυψινών είναι χαρακτηριστικό των παθογόνων των φυτών ενώ η εξωκυτταρική πρωτεολυτική δραστηριότητα των σαπροτροφικών μυκήτων παρέχεται κυρίως από πρωτεάσες της οικογένειας S8. Από

αυτά τα στοιχεία έχει προταθεί η συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων της θρυψίνης και της παθογονικότητας των μυκήτων (St. Leger et al. 1997, Dubovenko et al., 2010). Έχοντας ως δεδομένο το παραπάνω θα περίμενε κανείς πως στα αποτελέσματα της ανάλυσης μας θα παρατηρούνταν περισσότερα αντίγραφα της οικογένειας S1 στον παθογόνο μύκητα *Nectria* και λιγότερα στους άλλους μη παθογόνους. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να ισχύει καθώς στον *Nectria* ανιχνεύθηκαν τα ίδια σε αριθμό ένζυμα της οικογένειας S1 των θρυψινών/χυμοθρυψινών με τον μη παθογόνο μύκητα *FsK* (Πίνακας 3).

Επιπλέον σύμφωνα με μεταγενέστερες μελέτες διαπιστώθηκε πως η υπόθεση, ότι η έντονη παρουσία της οικογένειας S1 στο secretome των μυκήτων σχετίζεται με παθογονικότητα και η παρουσία S8 με σαπροτροφικό προφίλ, δεν μπορεί να ελεγχθεί με στατιστικές μεθόδους καθώς υπήρχαν περιορισμοί στις ομάδες δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν και έτσι η θεώρηση των θρυψινών ως δείκτες παθογονικότητας μπορεί να οφείλεται σε μία δυσαναλογία των πρωτεομάτων των παθογόνων και σαπροτροφικών μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των δεδομένων. Έτσι κατασκεύασαν ένα πιο ενδεδειγμένο πακέτο δεδομένων και ελέγχθηκε και πάλι η παραπάνω υπόθεση. Το πιο αξιοσημείωτο που προέκυψε από αυτή την ανάλυση είναι ότι οι μύκητες που είναι συμβιώτες με φυτά έχουν αρκετά χαμηλά επίπεδα εκκρινόμενων πρωτεολυτικών ενζύμων, παρά το γεγονός πως γενικά οι μύκητες που σχετίζονται με φυτά εμφανίζουν περισσότερες πρωτεάσες σε σχέση με αυτούς που αλληλεπιδρούν με ζώα, με τις προλυλ-ολιγοπεπτιδάσες S9 να αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα καθώς είναι πολυπληθείς στους μύκητες που σχετίζονται με φυτά και λιγότερο άφθονες σε αυτούς που σχετίζονται με ζώα. Τα μικρότερα επίπεδα των πρωτεολυτικών ενζύμων των συμβιωτών οφείλονται στο γεγονός πως οι μύκητες αυτοί μειώνουν την πιθανότητα αποικοδόμησης συστατικών του ξενιστή με απώτερο σκοπό την μείωση της αμυντικής απόκρισης του φυτού (Kohler et al., 2015). Από την άλλη, οι παθογόνοι και οι σαπροτροφικοί μύκητες εμφανίζουν άλλη στρατηγική καθώς αποτελούν καλούς αποικοδομητές και κατέχουν ένα οπλοστάσιο αποικοδομητικών ενζύμων που προσαρμόζονται στον ξενιστή. Έτσι διαπιστώθηκε πως οι παθογόνοι μύκητες που ζουν στο έδαφος έχουν περισσότερες πρωτεάσες των οικογενειών S1 και S8 επιβεβαιώνοντας μερικώς τις αρχικές θεωρήσεις της οικογένειας S1 ως δείκτη παθογονικότητας (Muszewska et al., 2017).

	<i>Fusarium solani</i> strain K	<i>Fusarium vanettenii</i> 77-13-4	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Serendipita indica</i>
S8	15	8	10	10
S1	3	3	3	0

Πίνακας 3: Πρωτεολυτικά ένζυμα των δύο βασικών οικογενειών S1 και S8 που εκκρίνονται εξωκυτταρικά από τους 4 μύκητες.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπερασματικά, στην παρούσα ανάλυση συγκριτικής γονιδιωματικής, έγινε επιλογή τεσσάρων μυκήτων με διαφορετικούς τρόπους ζωής, τροφικά προφίλ και λειτουργίες, οι οποίοι ανήκουν σε διαφορετικά είδη τα οποία καλύπτουν ένα όσο το δυνατόν πιο ευρύ φάσμα και έχουν μελετηθεί αρκετά. Ειδικότερα οι 3 από τους 4 μύκητες ανήκουν στις διαιρέσεις των ασκομυκήτων και βασιδιομυκήτων, οι οποίες αν και είναι εξελικτικά οι νεότερες, αποτελούν την πλειοψηφία των μυκήτων σήμερα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση μεταξύ των μυκήτων *FsK* και *Nectria*, οι οποίοι αν και είναι κοντινά είδη και ανήκουν στο ίδιο σύμπλεγμα (*Fusarium solani*) εμφανίζουν πολύ διαφορετικούς τρόπους ζωής καθώς ο πρώτος έχει φυτοπροστατευτικό ρόλο και ενισχύει την άμυνα του φυτού αλλά και την αντοχή του στην ξηρασία, ενώ ο δεύτερος είναι παθογόνος. Καθώς πολλοί πιστεύουν πως η ταυτότητα ενός μύκητα συνίσταται στο σύνολο των μορίων και κυρίως των πρωτεϊνών που εκκρίνει, οι οποίες και καθορίζουν την συμπεριφορά του και τις σχέσεις που αναπτύσσει με τους ξενιστές, η ανάλυση αυτών των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την κατανόηση των μικρών εκείνων διαφορών που οδηγούν τελικά σε ένα τόσο διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με το φυτό. Από την άλλη, μύκητες που ανήκουν σε άλλα είδη και ως εκ τούτου εμφανίζουν πολλές διαφορές στο secretome με τον *FsK*, μπορεί να έχουν παρόμοιες φυτοπροστατευτικές ιδιότητες όπως γίνεται στην περίπτωση του βασιδιομύκητα *Serendipita indica*. Το γεγονός αυτό δεν μας προξενεί εντύπωση καθώς παθογόνοι και μη παθογόνοι οργανισμοί συχνά έχουν στενή εξελικτική σχέση ενώ από την άλλη, μύκητες με κοινή συμπεριφορά και τρόπο ζωής δεν είναι απαραίτητο πως είναι σχετιζόμενοι ο ένας με τον άλλο. Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις το εύρος και η σύνθεση του secretome των μυκήτων εξαρτώνται πέρα από τον οικολογικό τους ρόλο και την ταξινόμηση τους, και από το περιβάλλον και το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται.

Από την συγκεκριμένη ανάλυση προέκυψε πως η βασική κατηγορία ενζύμων που διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις φυτών και μυκήτων, είναι τα υδρολυτικά ένζυμα (Cazymes) και συγκεκριμένα οι κλάσεις εκείνες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (GH,PL,CE). Ενώ σημαντική παρουσία, αν και σαφώς μικρότερη από τα υδρολυτικά ένζυμα, είχαν και τα πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία δρουν σε συνεργασία με τα Cazymes για την ενίσχυση της μολυσματικότητας, την άμυνα του μύκητα και την καθιέρωση της συμβίωσης. Αξίζει να σημειωθεί η σχεδόν παντελής απουσία υδρολυτικών ενζύμων, που διασπούν το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, στο secretome του μύκητα *Rhizophagus irregularis*, γεγονός που μαρτυρά την στρατηγική που υιοθετεί έτσι ώστε να αποφύγει τις αμυντικές αποκρίσεις του φυτού οι οποίες ενεργοποιούνται από την αναγνώριση των ενζύμων αυτών (Tisserant et al., 2013). Επίσης όσον αφορά τις γλυκοσιδάσες, οι οποίες αποτελούν και την πλειοψηφία των υδρολυτικών ενζύμων που ανιχνεύθηκαν, επιβεβαιώθηκαν προηγουμένα δεδομένα σχετικά με τον σχεδόν καθολικό εντοπισμό των οικογενειών GH5, GH47, GH74 στους μύκητες, οι οποίες συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος είτε με την διάσπαση των β-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών των ξυλογλυκανών στην περίπτωση της GH74 είτε μέσω άλλων ποικίλων ενζυμικών δραστηριοτήτων όπως στην περίπτωση της GH5, ενώ προξενεί εντύπωση το γεγονός πως η οικογένεια GH28, που διασπά την πεκτίνη και θεωρείται πως σχετίζεται με παθογόνους μύκητες, εντοπίζεται με περισσότερα αντίγραφα στον ενδοφυτικό μύκητα *FsK*. Επιπλέον όσον αφορά το secretome μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ του *FsK* και του *Nectria* εντοπίστηκε στην οικογένεια των βοηθητικών ενζύμων AA7 η οποία ανιχνεύθηκε με 27 αντίγραφα στον

παθογόνο μύκητα και με 11 στον ενδοφυτικό. Πρόκειται για μία μεγάλη διαφορά που χρήζει περαιτέρω μελέτης καθώς ίσως αποκαλύψει κάτι νέο στη σχέση secretome και παθογένειας. Από την άλλη, όσον αφορά τα πρωτεολυτικά ένζυμα αξίζει να σημειωθεί η αναμενόμενη κυριαρχία των σερινοπρωτεασών και των μεταλλοπρωτεασών με τις σερινο-πρωτεάσες να κυριαρχούν στους Ασκομύκητες όπως γίνεται στον *FsK* και τον *Nectria* και τις μεταλλοπρωτεάσες να κυριαρχούν στους Βασιδιομύκητες όπως είναι ο *Serendipita indica*. Σχετικά με τις σερινοπρωτεάσες είναι γνωστό πως δύο οικογένειες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση φυτού μύκητα και αυτές είναι η οικογένεια της χυμοθρυψίνης S1 και αυτή της σουμπιλισίνης S8. Όσον αφορά τις χυμοθρυψίνες είναι κοινώς αποδεκτό πως αποτελούν έναν μοριακό δείκτη παθογονικότητας, ωστόσο η θεώρηση αυτή δεν έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, καθώς δεν παρατηρείται διαφορά στα αντίγραφα της οικογένειας S1 μεταξύ του παθογόνου ασκομύκητα *Nectria* και του ενδοφυτικού μύκητα *FsK*.

Συνεπώς ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται αλληλεπιδρούν για να ρυθμίζουν την επικοινωνία και τους μηχανισμούς σηματοδότησης μεταξύ φυτών και μυκήτων τόσο σε ωφέλιμες όσο και σε παθογόνες αλληλεπιδράσεις δεν έχει γίνει ακόμα πλήρως κατανοητός και αποτελεί μία πρόκληση για το μέλλον έτσι ώστε να βοηθήσει στην βελτίωση των καλλιεργειών και στην υιοθέτηση μίας βιώσιμης γεωργίας, ανάγκες που σήμερα λόγω της κλιματικής αλλαγής και των αυξημένων αναγκών σε τρόφιμα είναι πιο επιτακτικές από ποτέ. Έτσι ένας από τους πιο θεμελιώδεις στόχους στην παθολογία των φυτών είναι η μελέτη και ο ακριβής ορισμός των μηχανισμών εκείνων που διαφοροποιούν τους παθογόνους από τους μη παθογόνους μικροοργανισμούς, και αφού είναι γνωστό ότι φυτοπαθογόνα έχουν βρεθεί σε όλες τις ταξονομικές ομάδες και συχνά είναι συγγενείς με μη παθογόνα, οι μηχανισμοί αυτοί δεν μπορεί να έχουν φυλογενετική βάση. Συνεπώς η σύγκριση των secretomes των μυκήτων, που αποτελούν τα οπλοστάσια τους έτσι ώστε να εντοπιστούν πιθανοί δείκτες συσχέτισης μεταξύ ταξινόμησης-οικολογίας και πρωτεϊνών που εκκρίνουν οι μύκητες, είναι ιδιαίτερης σημασίας και μπορεί να δώσει απάντηση σε πολλά φλέγοντα ερωτήματα της εποχής μας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Agrawal, G. K., Jwa, N.-S., Lebrun, M.-H., Job, D., & Rakwal, R. (2010). Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10(4), 799–827. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900514>
2. Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: Prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(21), 3387–3395. Scopus. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>
3. Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
4. Arnal, G., Stogios, P. J., Asohan, J., Attia, M. A., Skarina, T., Viborg, A. H., Henrissat, B., Savchenko, A., & Brumer, H. (2019). Substrate specificity, regiospecificity, and processivity in glycoside hydrolase family 74. *Journal of Biological Chemistry*, 294(36), 13233–13247. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009861>
5. Atmodjo, M. A., Hao, Z., & Mohnen, D. (2013). Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 747–779. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534>
6. Benoit, I., Culleton, H., Zhou, M., DiFalco, M., Aguilar-Osorio, G., Battaglia, E., Bouzid, O., Brouwer, C. P. J. M., El-Bushari, H. B. O., Coutinho, P. M., Gruben, B. S., Hildén, K. S., Houbraeken, J., Barboza, L. A. J., Levasseur, A., Majoor, E., Mäkelä, M. R., Narang, H.-M., Trejo-Aguilar, B., ... de Vries, R. P. (2015). Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0285-0>
7. Bischl B., Lang M., Bossek J., Horn D., Richter J., and Surmann D., (2017). BBmisc: Miscellaneous Helper Functions for B. Bischl. R
8. Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 3), 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
9. Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. <https://doi.org/10.1111/mpp.12289>
10. Coleman, J. J., Rounsley, S. D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Taga, M., White, G. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Freitag, M., Ma, L., Danchin, E. G. J., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Nelson, D. R., Straney, D., Napoli, C. A., ... VanEtten, H. D. (2009). The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PLoS Genetics*, 5(8), e1000618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000618>
11. Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
12. D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., & Bellincampi, D. (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1696(2), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.012>
13. Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), 36–50.
14. de Souza, P. M., Bittencourt, M. L. de A., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P. C., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira, E. X., Pessoa, A., & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>
15. de Wit, P. J. G. M. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(21), 2726–2732. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7284-7>

16. Dubovenko, A. G., Dunaevsky, Y. E., Belozersky, M. A., Oppert, B., Lord, J. C., & Elpidina, E. N. (2010). Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal Biology*, 114(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.11.004>
17. Freimoser, F. M., Hu, G., & Leger, R. J. S. (2005). Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 2), 361–371. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27560-0>
18. Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S., & Oliver, R. P. (2008). Host-specific toxins: Effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology*, 10(7), 1421–1428. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01153.x>
19. Fukushima, T., Kitajima, T., & Sekiguchi, J. (2005). A polysaccharide deacetylase homologue, PdaA, in *Bacillus subtilis* acts as an N-acetylmuramic acid deacetylase in vitro. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1287–1292. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1287-1292.2005>
20. Gacesa, P. (1987). Alginate-modifying enzymes. *FEBS Letters*, 212(2), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81344-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81344-3)
21. Girard, V., Dieryckx, C., Job, C., & Job, D. (2013). Secretomes: The fungal strike force. *PROTEOMICS*, 13(3–4), 597–608. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200282>
22. Hage, H., & Rosso, M.-N. (2021). Evolution of Fungal Carbohydrate-Active Enzyme Portfolios and Adaptation to Plant Cell-Wall Polymers. *Journal of Fungi*, 7(3), 185. <https://doi.org/10.3390/jof7030185>
23. Hayhurst, E. J., Kailas, L., Hobbs, J. K., & Foster, S. J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14603–14608. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804138105>
24. Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 984. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
25. Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., & Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>
26. Howe, K. L., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Azov, A. G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., ... Flicek, P. (2021). Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
27. Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
28. Kavroulakis, N., Ehaliotis, C., Ntougias, S., Zervakis, G., & Papadopoulou, K. (2005). Local and systemic resistance against fungal pathogens of tomato plants elicited by a compost derived from agricultural residues. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.06.003>
29. Kavroulakis, N., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., & 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. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 3853–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm230>
30. KAVROULAKIS, N., PAPADOPOULOU, K. K., NTOUGIAS, S., ZERVAKIS, G. I., & EHALIOTIS, C. (2006). Cytological and Other Aspects of Pathogenesis-related Gene Expression in Tomato Plants Grown on a Suppressive Compost. *Annals of Botany*, 98(3), 555–564. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl149>
31. Kofod, L. V., Kauppinen, S., Christgau, S., Andersen, L. N., Heldt-Hansen, H. P., Dörreich, K., & Dalbøge, H. (1994). Cloning and characterization of two structurally and functionally divergent rhamnogalacturonases from *Aspergillus aculeatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 29182–29189.

32. Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., Canbäck, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M. D., Doré, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., ... Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics*, 47(4), 410–415. <https://doi.org/10.1038/ng.3223>
33. Lafond, M., Navarro, D., Haon, M., Couturier, M., & Berrin, J.-G. (2012). Characterization of a broad-specificity β -glucanase acting on β -(1,3)-, β -(1,4)-, and β -(1,6)-glucans that defines a new glycoside hydrolase family. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8540–8546. <https://doi.org/10.1128/AEM.02572-12>
34. Lévassieur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>
35. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
36. Malbreil, M., Tisserant, E., Martin, F., & Roux, C. (2014). Chapter Nine - Genomics of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Out of the Shadows. In F. M. Martin (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 70, pp. 259–290). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397940-7.00009-4>
37. Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., & Kusakabe, I. (2000). Purification, characterization and gene cloning of two α -L-arabinofuranosidases from streptomyces chartreusis GS901. *The Biochemical Journal*, 346 Pt 1, 9–15.
38. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, David A. Stahl (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (14th edn). (eds). International Microbiology
39. Muszewska, A., Stepniewska-Dziubinska, M. M., Steczkiewicz, K., Pawlowska, J., Dziejczak, A., & Ginalski, K. (2017). Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Scientific Reports*, 7(1), 9147. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09644-w>
40. Nikolaidis, N., Doran, N., & Cosgrove, D. J. (2014). Plant expansins in bacteria and fungi: Evolution by horizontal gene transfer and independent domain fusion. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 376–386. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst206>
41. North, M. J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiological Reviews*, 46(3), 308–340. Scopus. <https://doi.org/10.1128/membr.46.3.308-340.1982>
42. Onaga, S., & Taira, T. (2008). A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): Roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity. *Glycobiology*, 18(5), 414–423. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn018>
43. Opitz, M. W., Daneshkhah, R., Lorenz, C., Ludwig, R., Steinkellner, S., & Wiczorek, K. (2021). *Serendipita indica* changes host sugar and defense status in *Arabidopsis thaliana*: Cooperation or exploitation? *Planta*, 253(3), 74. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03587-3>
44. package version 1.11. <https://CRAN.R-project.org/package=BBmisc>
45. Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
46. Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4), 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
47. Pointing, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 20–33. <https://doi.org/10.1007/s002530100745>
48. Queiroz, C. B. de, & Santana, M. F. (2020). Prediction of the secretomes of endophytic and nonendophytic fungi reveals similarities in host plant infection and colonization strategies. *Mycologia*, 112(3), 491–503. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1716566>

49. Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D503–D509. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt953>
50. Reddy, P. V., Lam, C. K., & Belanger, F. C. (1996). Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiology*, 111(4), 1209–1218. <https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1209>
51. Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2014). Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 78(4), 614–649. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00035-14>
52. Semenova, T. A., Dunaevsky, Y. E., Beljakova, G. A., Borisov, B. A., Shamraichuk, I. L., & Belozersky, M. A. (2017). Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology. *Applied Soil Ecology*, 113, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.002>
53. Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B. T., Priti, V., Mohana Kumar, P., Ravikanth, G., Spittler, M., Vasudeva, R., & Uma Shaanker, R. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. Ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, 71(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.030>
54. Singhal, U., Prasad, R., & Varma, A. (2017). *Piriformospora indica* (Serendipita indica): The Novel Symbiont. In A. Varma, R. Prasad, & N. Tuteja (Eds.), *Mycorrhiza—Function, Diversity, State of the Art* (pp. 349–364). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53064-2_17
55. Sista Kameshwar, A. K., & Qin, W. (2018). Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology*, 9(2), 93–105. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1419296>
56. Skiada, V., Avramidou, M., Bonfante, P., Genre, A., & Papadopoulou, K. K. (2020). An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytologist*, 226(5), 1429–1444. <https://doi.org/10.1111/nph.16457>
57. Skiada, V., Faccio, A., Kavroulakis, N., Genre, A., Bonfante, P., & Papadopoulou, K. K. (2019). Colonization of legumes by an endophytic *Fusarium solani* strain FsK reveals common features to symbionts or pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 127, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.003>
58. Soanes, D. M., Alam, I., Cornell, M., Wong, H. M., Hedeler, C., Paton, N. W., Rattray, M., Hubbard, S. J., Oliver, S. G., & Talbot, N. J. (2008). Comparative Genome Analysis of Filamentous Fungi Reveals Gene Family Expansions Associated with Fungal Pathogenesis. *PLOS ONE*, 3(6), e2300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002300>
59. St. Leger, R. J., Charnley, A. K., & Cooper, R. M. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48(1), 85–95. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(86\)90146-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(86)90146-1)
60. Summerell, B., Laurence, M., Liew, E. C. Y., & Leslie, J. (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Divers*, 44, 3–13. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2>
61. Sützl, L., Laurent, C. V. F. P., Abrera, A. T., Schütz, G., Ludwig, R., & Haltrich, D. (2018). Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2477–2492. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8784-0>
62. Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frey, N. F. dit, Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L. B., Handa, Y., Herr, J. R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P. J., Masclaux, F. G., ... Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50), 20117–20122. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110>
63. Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütehorn, B., & Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. Et sp. Nov., a New Root-Colonizing Fungus. *Mycologia*, 90(5), 896–903. <https://doi.org/10.2307/3761331>

64. Vincent, D., Rafiqi, M., & Job, D. (2020). The Multiple Facets of Plant–Fungal Interactions Revealed Through Plant and Fungal Secretomics. *Frontiers in Plant Science*, 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01626>
65. Wit, P. J. G. M. D., Mehrabi, R., Burg, H. a. V. D., & Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: Past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 735–747. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00591.x>
66. Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., & Xu, Y. (2012). dbCAN: A web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W445–W451. <https://doi.org/10.1093/nar/gks479>
67. Zambare, V., Nilegaonkar, S., & Kanekar, P. (2011). A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, 28(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.002>
68. Zeng, T., Holmer, R., Hontelez, J., Te Lintel-Hekkert, B., Marufu, L., de Zeeuw, T., Wu, F., Schijlen, E., Bisseling, T., & Limpens, E. (2018). Host- and stage-dependent secretome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 94(3), 411–425. <https://doi.org/10.1111/tpj.13908>
69. Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D. A., Nalim, F. A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A., & Geiser, D. M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2186–2190. <https://doi.org/10.1128/JCM.00120-06>
70. Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., & Xu, J.-R. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 14(1), 274. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-274>
71. Zhou, P., Zhang, G., Chen, S., Jiang, Z., Tang, Y., Henrissat, B., Yan, Q., Yang, S., Chen, C.-F., Zhang, B., & Du, Z. (2014). Genome sequence and transcriptome analyses of the thermophilic zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *BMC Genomics*, 15(1), 294. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-294>
72. Γραβάνης Θ. Φώπιος. (2011). “Γενική Φυτοπαθολογία”. Εκδόσεις ΙΩΝ
73. Ελευθέριος Κ. Τζάμος. (2007). “Φυτοπαθολογία”. 2^η έκδοση. Εκδόσεις Σταμούλης
74. Ζίφα, Α.,Μαμούρης,Ζ. και Μούτου,Κ. (2011). ‘Βιολογία’. 2nd ed. Βόλος: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλία