



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π.4.5.4: Γονιδιωματική αλληλούχηση επιλεγμένων στελεχών για τη μελέτη της γενετικής βάσης της βιοσύνθεσης βιοδραστικών ουσιών

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π.4.5.4**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ4**

Επικεφαλής δικαιούχος: **[ΓΠΑ/ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ/ΜΦΙ/ΑΠΘ/ΔΠΘ/ΙΤΕ/ΕΛΜΕΠΑ]**

Συγγραφείς: **[Παναγιώτης Σαρρής]**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **[Δημοσίευση]**

Ημερομηνία παράδοσης: **[15/12/2025]**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (ΕΝ): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕDR-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

Contents

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	4
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	5
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	5
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	7
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	13
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	14

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ4

Στην ΕΕ4 θα αναπτυχθούν δράσεις που θα ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα της βιολογικής καταπολέμησης. Θα γίνει βελτίωση της αρμοστικότητας των ωφέλιμων αρπακτικών και ενίσχυση της δράσης τους, καθώς επίσης και αξιοποίηση της λειτουργικής βιοποικιλότητας για την ανάπτυξη καλύτερα προσαρμοσμένης βιολογικής καταπολέμησης. Θα αναπτυχθούν βελτιωμένα προϊόντα για τη βιολογική καταπολέμηση, θα διερευνηθεί η αξιοποίηση άγριων αυτοφυών φυτών για την ενίσχυση των οικοσυστημικών υπηρεσιών για την αντιμετώπιση επιβλαβών οργανισμών μέσω της βιολογικής καταπολέμησης και θα ενισχυθεί η δράση παρασιτοειδών με χρήση ουσιών φυσικής προέλευσης ή/και «ωφέλιμων ιών». Θα αναπτυχθούν βελτιωμένες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των εχθρών μέσω της χρήσης βακτηρίων και μικροοργανισμών. Θα αναπτυχθούν τέλος καινοτόμες μέθοδοι για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, μέσω προσεγγίσεων αξιοποίησης της βιοποικιλότητας και καλλιεργητικών πρακτικών.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου 4.5.4

Σκοπός του παραδοτέου Π4.5.4 είναι να αλληλουχηθεί το πλήρες γονιδίωμα επιλεγμένων στελεχών και να αναλυθούν στη συνέχεια για τη μελέτη της γενετικής βάσης της βιοσύνθεσης βιοδραστικών ουσιών.

Περιγράφεται η πρόοδος των εργασιών στα πλαίσια της Εμβληματικής δράσης «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος», οι οποίες έλαβαν χώρα στο παρακάτω ερευνητικό Ινστιτούτο:

- Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Έρευνας και Τεχνολογίας (ΙΤΕ), και στο εργαστήριο «Μικροβιολογίας και Αλληλεπιδράσεων Μικροβίου – Ξενιστή» του Καθ. Π. Σαρρή.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των ωφέλιμων μικροοργανισμών στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μικροβίων ολοένα και αυξάνεται. Η δράση τους έγκειται είτε επειδή άμεσα μπορούν να μειώνουν την ανάπτυξη των μικροβίων είτε επειδή έμμεσα επάγουν την καλύτερη υγεία του φυτού ξενιστή, μέσω ενίσχυσης του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Pascale et al., 2020; Pieterse et al., 2014).

Τα τελευταία χρόνια οι νέες μέθοδοι αλληλούχησης (Pacbio, Oxford Nanopore, Cyclone) έχουν επιτρέψει την αποτελεσματικότερη αλληλούχηση μικροβίων, με απώτερο σκοπό την αποκάλυψη της γενετικής πληροφορίας που υπάρχει και του εύρους των βιοδραστικών ουσιών που μπορούν να παράγουν. Με τη βοήθεια της υβριδικής αλληλούχησης, είναι δυνατόν να επιτευχθεί η πλήρης κάλυψη γονιδιωμάτων σε μεγάλο βάθος. Επιπλέον, ολοένα και αναδύονται νέα εργαλεία υπολογιστικής μελέτης που επιτρέπουν την καλύτερη συναρμολόγηση γονιδιωμάτων (perfect assembly (Wick et al., 2023) και πρόσφατα το autocycler (Wick et al., 2025)) και την ανάλυσή τους *in silico* προτού αποδειχθεί πειραματικά ότι οι ουσίες αυτές είναι βιοδραστικές.

Σκοπός του παρόντος εγγράφου

Στην παρούσα υποενότητα εργασίας 4.5.4 αλληλουχήθηκε το πλήρες γονιδίωμα επιλεγμένων στελεχών και στη συνέχεια αναλύθηκαν *in silico* με σκοπό την εύρεση γονιδίων/μονοπατιών παραγωγής βιοδραστικών ουσιών.

Δομή του παρόντος εγγράφου

Το παρόν έγγραφο **ακολουθεί την παρακάτω δομή:**

- 1. Εισαγωγή και Στόχοι:** Παρουσιάζεται το πλαίσιο της έρευνας και οι στόχοι του εγγράφου.
- 2. Περιγραφή των Εργασιών:** 2.1. Υλικά και Μέθοδοι (με υποπαραγράφους ανά πείραμα), 2.2. Αποτελέσματα και Συζήτηση (με υποπαραγράφους ανά πείραμα).
- 3. Σύνοψη και Συμπεράσματα:** Βασικά ευρήματα της έρευνας και σχετικά συμπεράσματα.
- 4. Παράρτημα:** Βιβλιογραφικές αναφορές.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Αλληλουχηθέντα βακτήρια και τεχνολογίες αλληλούχισης

Προκειμένου να μελετηθεί η γενετική βάση των βιοδραστικών ουσιών, στάλθηκαν για αλληλούχιση πλήρους γονιδιώματος με τη χρήση δύο τεχνολογιών, μικρών τμημάτων διαβασμάτων (short reads) και μεγάλων τμημάτων διαβασμάτων (long reads). Τα βακτήρια που αλληλουχήθηκαν ήταν 9 είδη *Kushneria* spp. και ένα είδος *Streptomyces* sp. (**Πίνακας 4.5.4-1**) και η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στην εταιρία BGI Genomics με τη χρήση των DNBSEQ PE150 (short reads) και Cyclone (long reads).

Πίνακας 4.5.4-1. Μικροβιακές απομονώσεις που αλληλουχήθηκε το πλήρες γονιδιωμα τους, το γένος τους με βάση την πληροφορία από την αλληλούχιση του 16S rDNA και το φυτό-ξενιστής από το οποίο προέκυψε το κάθε ενδοφυτικό βακτήριο.

Απομόνωση	Γένος	Ξενιστής-Φυτό
SRL307	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Tetraena alba</i> (roots)
SRL376	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Atriplex halimus</i> (leaves)
SRL377	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Atriplex halimus</i> (leaves)
SRL383	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Arthrocremnum macrostachyum</i> (leaves)
SRL386	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Tetraena alba</i> (leaves)
SRL403	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Tetraena alba</i> (leaves)
SRL411	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Euphorbia paralias</i> (leaves)
SRL412	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Euphorbia paralias</i> (leaves)
SRL423	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Euphorbia paralias</i> (leaves)
SRL426	<i>Kushneria</i> sp.	<i>Tetraena alba</i> (leaves)

2.1.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από τις βακτηριακές απομονώσεις

Αρχικά, οι βακτηριακές απομονώσεις καλλιεργήθηκαν σε υγρή καλλιέργεια που περιείχε θρεπτικό υλικό Nutrient Agar (NA), μέσω ενοφθαλμισμού μίας μοναδιαίας αποικίας από στέρη καλλιέργεια και μεγάλωσε στους 28° C και 200 rpm για 1-2 ημέρες. Στην περίπτωση των *Kushneria* spp. το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με 3% β/ό χλωριούχο νάτριο. Μόλις οι καλλιέργειες ήταν κορεσμένες (1-2 ημέρες ανάπτυξης), φωτομετρήθηκαν και ξεκίνησε η απομόνωση του γενωμικού DNA τους.

Οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν σε 5000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο από κάθε καλλιέργεια απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 400 μL TEN (**Πίνακας 4.5.4-2**), στο οποίο προστέθηκε 20 μL λυσοζύμη (20 mg/mL διαλυμένη σε υπερκάθαρο H₂O) και επώαστηκε στους 37° C για 20 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκε σε κάθε δείγμα 2 μL RNase A (20 mg/mL διαλυμένη σε υπερκάθαρο H₂O) και επώαστηκε στους 65°C για 3 λεπτά. Μετά την προσθήκη διαφόρων ενζύμων, ακολούθησε η λύση με την προσθήκη 40 μL SDS (10% w/v), 10 μL proteinase K (10 mg/mL) και 550 μL TEN* (**Πίνακας 4.5.4-2**) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 60°C για δύο ώρες. Μετά το πέρας της βακτηριακής λύσης, ακολούθησε περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων στην περίπτωση που τα βακτήρια είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε βλέννη και ουσίες που μπορούν να διαταράξουν τον καθαρισμό με φαινόλη-χλωροφόρμιο. Για το σκοπό αυτό,

προστέθηκε 0,1 φορές τον όγκο κάθε δείγματος 3 M οξικό νάτριο και μία φορά τον όγκο κάθε δείγματος παγωμένη ισοπροπανόλη (-20° C) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 4° C για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 5000 rpm και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 400 µL TEN και 550 µL TEN*. Στη συνέχεια, το DNA καθαρίστηκε μέσω προσθήκης φαινόλης ίσου όγκου (δύο φορές) και στη συνέχεια ίσου όγκου διαλύματος χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία 24:1, αντίστοιχα) (δύο φορές). Τέλος, το υπερκείμενο που περιέχει το DNA προστέθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 mL 100% αιθανόλη, με αποτέλεσμα να συμπυκνωθεί και να δημιουργήσει ίνες, τις οποίες απομονώσαμε με γυάλινη Pasteur πιπέττα (η οποία είχε πλυθεί και αποστειρωθεί). Το DNA επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 µL 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Το DNA μετρήθηκε σε Nanodrop™ Spectrophotometer και σε Qubit με τη χρήση του Qubit™ dsDNA HS Assay Kit.

Πίνακας 4.5.4-2. Σύσταση των TEN και TEN* διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση του γενωμικού DNA διαφόρων βακτηριακών απομονώσεων.

	TEN	TEN*
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM	1 mM
NaCl	150 mM	50 mM

2.1.3 Συναρμολόγηση, ποιοτικός έλεγχος και χαρακτηρισμός των αλληλουχηθέντων γονιδιωμάτων

Τα μικρά τμήματα που αλληλουχήθηκαν μέσω DNBSEQ ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητά τους με το εργαλείο fastp v0.23.4 (Chen, 2023), με προεπιλεγμένες επιλογές. Η υβριδική συναρμολόγηση πραγματοποιήθηκε με το Unicycler v0.5.0 (Wick et al., 2023) με προεπιλεγμένες επιλογές. Τα δομικά στατιστικά στοιχεία και η λειτουργική πληρότητα των συναρμολογήσεων αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το QUAST v5.0.2 (Mikheenko et al., 2018) με προεπιλεγμένες επιλογές και το BUSCO 5.8.3 (Seppey et al., 2019) με τη βάση δεδομένων Actinomycetota (για το SRL307, actinomycetota_odb12) και Pseudomonadota (για τα SRL376 έως SRL426, pseudomonadota_odb12).

Ο χαρακτηρισμός και οι χάρτες των γονιδιωμάτων δημιουργήθηκαν με το Bakta v1.11.2 με την πλήρη βάση δεδομένων v6.0 (Schwengers et al., 2021). Η ανίχνευση πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε με το RFPlasmid v0.0.18 χρησιμοποιώντας διαφορετικές παραμέτρους (--species Generic, --species Pseudomonas και --species Streptomyces) (van der Graaf-Van Bloois et al., 2021). Τα contigs θεωρήθηκαν πλασμίδια εάν είχαν προβλεφθεί με υψηλή αξιοπιστία από το RFPlasmid και επιβεβαιωθεί ότι είναι κυκλικά.

2.1.4 Παν-γενωμική ανάλυση των διαθέσιμων γονιδιωμάτων *Kushneria* spp.

Προκειμένου τα αλληλουχημένα γονιδιώματα των 9 *Kushneria* spp. να χαρακτηριστούν καλύτερα, πραγματοποιήθηκε μία παν-γενωμική ανάλυση όπου συμπεριλήφθηκαν και τα 9 μαζί με όλα τα διαθέσιμα γονιδιώματα του ίδιου γένους που υπήρχαν στη NCBI.

Συνολικά, η NCBI έχει κατατεθειμένα 15 γονιδιώματα και τα 5 από αυτά είναι πλήρη σε επίπεδο χρωμοσώματος. Η ανάλυση του πανγονιδιώματος έγινε χρησιμοποιώντας το ανι'ο v8 (Delmont & Eren, 2018; Eren et al., 2021). Ο γονιδιωματικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός διεξήχθη σε βάσεις δεδομένων αποθήκευσης γονιδιωμάτων που δημιουργήθηκαν με το ανι-gen-genomes-storage χρησιμοποιώντας τα ανι-run-hmms (με τις σημαίες: -I Bacteria_71 και --also-scan-trnas) (Eddy, 2011), ανι-run-ncbi-cogs [55], ανι-run-kegg-kofams (Galperin et al., 2021), ανι-run-pfams (Mistry et al., 2021) και ανι-run-scg-taxonomy (Buchfink et al., 2015; Parks et al., 2018). Η εντολή ανι-ran-genome χρησιμοποιήθηκε με --minbit 0.5, --mcl-inflation 10 και --use-ncbi-blast (Delmont & Eren, 2018; Eren et al., 2021).

2.1.5 Έλεγχος των ομάδων βιοσύνθεσης γονιδίων

Για τον έλεγχο εάν τα βακτηριακά γονιδιώματα περιέχουν βιοσυνθετικές συστάδες γονιδίων, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση μέσω του antiSMASH v8.0 μέσω της web-based εφαρμογής με χαλαρή αυστηρότητα ανίχνευσης (προεπιλεγμένη μέθοδος) (Blin et al., 2025). Παράλληλα, ελέγξαμε και τα ήδη αλληλουχημένα γονιδιώματα που υπήρχαν κατατεθειμένα στη NCBI (5 ολοκληρωμένα γονιδιώματα) και πραγματοποιήσαμε συγκριτική ανάλυση.

2.2 Αποτελέσματα

2.2.1 Στατιστικά αποτελέσματα των αλληλουχήσεων των βακτηριακών γονιδιωμάτων

Τα βακτηριακά γονιδιώματα αλληλουχήθηκαν με τη μέθοδο DNBSEQ (PE150) και Cyclone και τα στατιστικά αποτελέσματα των αλληλουχήσεων παρατίθενται στις **Εικόνες 4.5.4-1** και **4.5.4-2**.

Sample Name	Clean Reads	Clean Base	Read Length	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
SRL307-DNBSEQ	4,035,540	1,210,662,000	PE150	96.75	90.32	70.23
SRL376-DNBSEQ	4,000,736	1,200,220,800	PE150	97.64	92.30	59.28
SRL377-DNBSEQ	4,001,851	1,200,555,300	PE150	97.38	91.48	59.37
SRL383-DNBSEQ	4,005,675	1,201,702,500	PE150	97.73	92.64	60.31
SRL386-DNBSEQ	4,143,327	1,242,998,100	PE150	97.64	92.30	59.12
SRL403-DNBSEQ	4,130,167	1,239,050,100	PE150	97.72	92.56	59.09
SRL411-DNBSEQ	4,026,353	1,207,905,900	PE150	98.06	93.73	59.16
SRL412-DNBSEQ	4,001,791	1,200,537,300	PE150	97.74	92.59	58.45
SRL426-DNBSEQ	4,138,834	1,241,650,200	PE150	97.78	92.75	58.98

Sample Name	Clean Reads	Clean Base	Read Length	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
SRL423	4,148,239	1,244,471,700	PE150	98.00	93.40	58.42

Εικόνα 4.5.4-1. Αποτελέσματα των αλληλουχήσεων των βακτηριακών γονιδιωμάτων με την τεχνολογία

DNBSEQ (μικρών τμημάτων, PE150).

Sample Name (#)	Reads Number (#)	Reads Total Bases (bp)	Reads Mean Length (bp)	Reads N50 (bp)	Reads N90 (bp)	Reads Max Length (bp)	Reads Min Length (bp)
SRL307-Cyclone	518,405	3,000,012,796	5,787	11,606	2,090	91,081	1,000
SRL376-Cyclone	19,221	107,986,566	5,618	9,706	2,249	98,810	1,000
SRL377-Cyclone	110,557	454,472,372	4,110	6,627	1,643	81,138	1,000
SRL383-Cyclone	39,452	220,882,802	5,598	9,909	2,188	94,897	1,000
SRL386-Cyclone	16,665	135,486,798	8,130	16,670	3,184	96,053	1,000
SRL403-Cyclone	313,324	2,668,661,013	8,517	20,330	3,144	181,271	1,000
SRL411-Cyclone	251,063	2,926,398,500	11,656	23,003	5,195	147,164	1,000
SRL412-Cyclone	260,517	1,898,605,271	7,287	13,163	2,979	104,440	1,000
SRL423-Cyclone	256,988	2,431,071,376	9,459	17,543	4,092	112,614	1,000
SRL426-Cyclone	293,402	1,926,114,653	6,564	15,297	2,178	125,763	1,000

Εικόνα 4.5.4-2. Αποτελέσματα των αλληλουχίσεων των βακτηριακών γονιδιωμάτων με την τεχνολογία Cyclone (μεγάλων τμημάτων).

Από τη συναρμολόγηση των βακτηριακών γονιδιωμάτων προέκυψε ότι όλα τα είδη *Kushneria* spp. αλληλουχίστηκαν πλήρως και τα τρία από τα εννέα (SRL386, SRL403 και SRL411) σε 1 contig. Τα υπόλοιπα 5 είδη *Kushneria* spp. (SRL377, SRL383, SRL412, SRL423 και SRL426) συναρμολογήθηκαν σε 2 contigs και το SRL376 σε τρία contigs. Η ανάλυση έδειξε ότι τα contigs ήταν πλήρη. Αντίστοιχα, και το *Streptomyces* sp. SRL307 συναρμολογήθηκε σε 2 contigs, όμως δεν πήραμε το πλήρες γονιδίωμα. *In silico* ανάλυση των contigs με το εργαλείο RFPlasmid (βλ. 2.1.3) έδειξε ότι πρόκειται για πιθανά πλασμίδια, με εξαίρεση το contig 2 του SRL376 (**Πίνακας 4.5.4-3**). Παρόλα αυτά, ελέγχθηκε η αλληλουχία του contig αυτού μέσω Blastn και φαίνεται ότι ίσως πρόκειται και αυτό για πλασμίδιο, καθώς τα αποτελέσματα (hits) δείχνουν μία μεγάλη ποικιλότητα από διαφορετικά γένη (συχνό φαινόμενο καθώς τα πλασμίδια φέρουν μεταθετά στοιχεία) και επιπλέον εμφανίζει και ομοιότητες με ήδη αλληλουχημένες *Kushneria* sp. Επιπλέον, θα μπορούσε να είναι και phage-plasmid στοιχείο (PP), καθώς ο χαρακτηρισμός του μέσω του εργαλείου Bakta δείχνει ότι περιλαμβάνει πολλές φαγικά γονίδια.

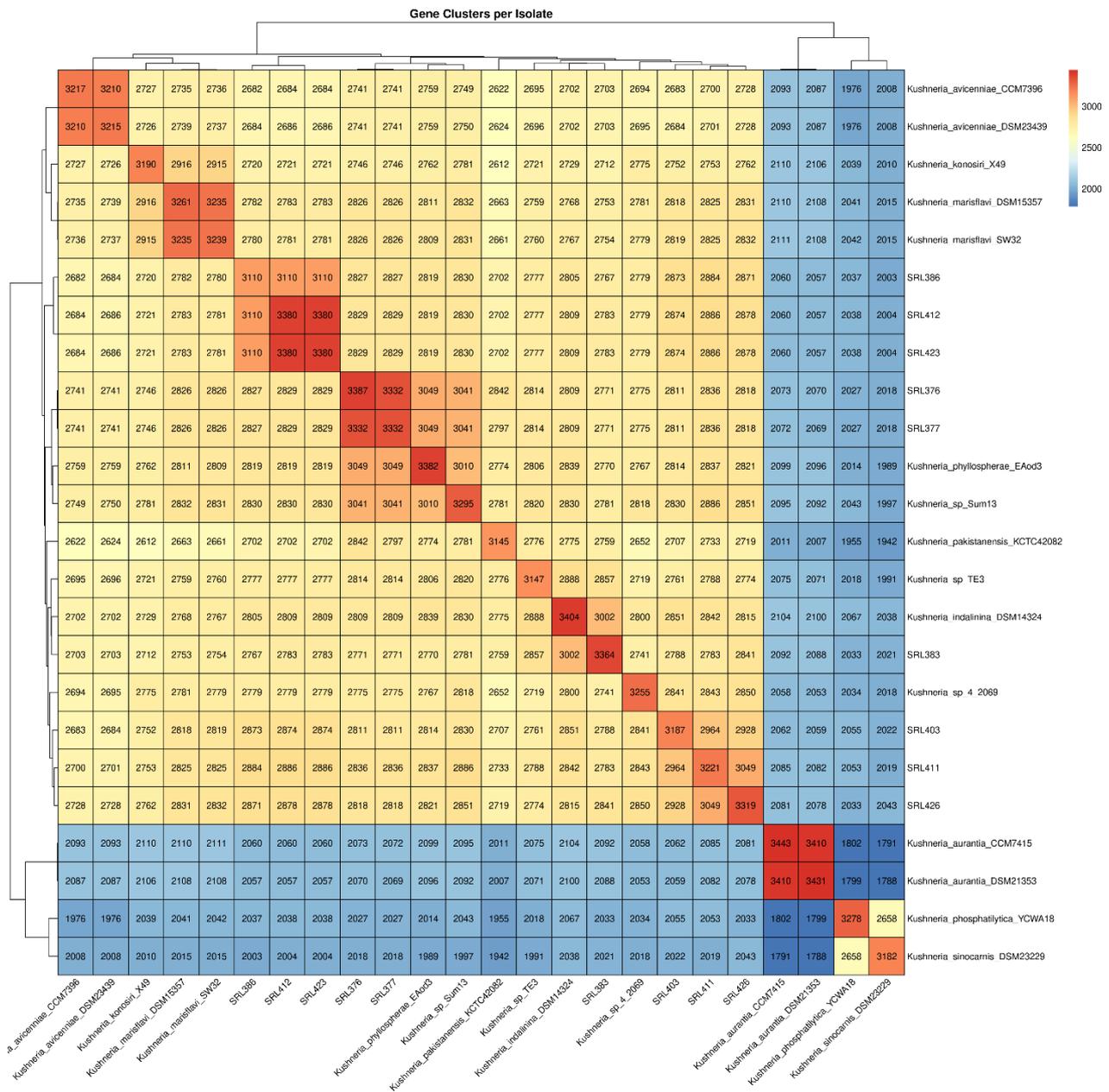
Επιπλέον, η ανάλυση για την ολοκλήρωση των γονιδιωμάτων μέσω BUSCO, έδειξε ότι πρόκειται για πλήρη γονιδιώματα (>98,5%) (**Πίνακας 4.5.4-3**).

Isolate ID	Contigs	Total genome length (bp)	Length of contig 1 (bp)	Length of contig 2 (bp)	Length of contig 3 (bp)
SRL307	2	9.398.512	8.661.515	736.997	
SRL376	3	3.767.250	3.721.604	37.465	8.181
SRL377	2	3.729.812	3.721.631	8.181	
SRL383	2	3.783.672	3.575.498	208.174	
SRL386	1	3.450.532	3.450.532		
SRL403	1	3.588.531	3.588.531		
SRL411	1	3.632.172	3.632.172		
SRL412	2	3.704.699	3.450.622	254.077	
SRL423	2	3.704.733	3.450.656	254.077	

SRL426 2 3.740.927 3.583.819 157.108

Isolate ID	Contigs	Total genome length (bp)	Length of contig 1 (bp)	Length of contig 2 (bp)	Length of contig 3 (bp)	GC (%)	ANI identity	BUSCO completeness (%)	Genome coverage
SRL307	2	9.398.512	8.661.515	736.997		70,78	93,23	99,2	319,2008263
SRL376	3	3.767.250	3.721.604	37.465	8.181	59,66	95,44	99,0	28,66456062
SRL377	2	3.729.812	3.721.631	8.181		59,66	95,44	99,0	121,8486004
SRL383	2	3.783.672	3.575.498	208.174		60,43	97,88	99,5	58,37789375
SRL386	1	3.450.532	3.450.532			59,27	89,82	99,5	39,2654808
SRL403	1	3.588.531	3.588.531			59,35	89,78	99,0	743,6639151
SRL411	1	3.632.172	3.632.172			59,49	89,67	99,5	805,6883044
SRL412	2	3.704.699	3.450.622	254.077		58,66	89,8	99,0	512,4857029
SRL423	2	3.704.733	3.450.656	254.077		58,66	89,8	99,5	656,2069051
SRL426	2	3.740.927	3.583.819	157.108		59,24	89,65	98,5	537,4475254

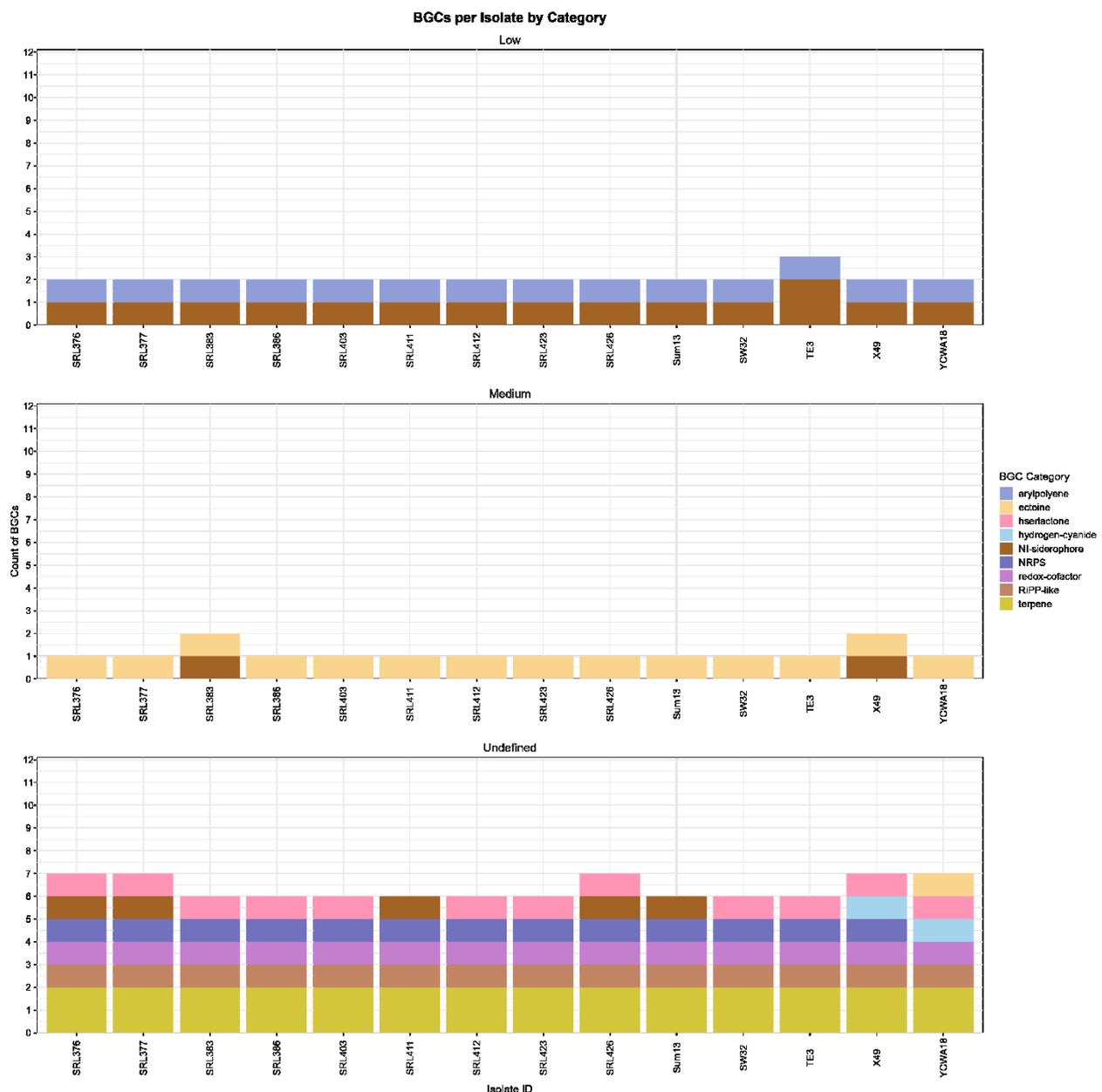
Στη συνέχεια, έγινε αναζήτηση για το εάν τα αλληλουχημένα είδη *Kushneria* spp. είναι νέα είδη και με ποια γνωστά είδη έχουν κοντινή ομολογία. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μία παν-γενωμική ανάλυση (ranggenome) μεταξύ των 9 απομονώσεων *Kushneria* spp. και των 15 ήδη αλληλουχημένων ειδών που υπάρχουν στη NCBI. Συνολικά, το ranggenome περιείχε 9081 συστάδες γονιδίων μεταξύ 24 γονιδιωμάτων. Από μία απεικόνιση τύπου heatmap (**Εικόνα 4.5.4-3**) φαίνεται πως τα SRL386, SRL423 και SRL412 σχηματίζουν ένα cluster μεταξύ τους και μάλιστα τα SRL423 και SRL412 ομαδοποιούνται μαζί. Παρόμοια, τα SRL376 και SRL377 έχουν υψηλή ομολογία τόσο μεταξύ τους όσο και με τα είδη *Kushneria phyllosphaerae* και *Kushneria* sp. Sum13. Η απομόνωση SRL383 ομαδοποιείται πιο κοντά με την *Kushneria indalinina*. Επίσης οι SRL411 και SRL426 βγαίνουν μαζί σε ένα cluster και κοντά τους η SRL403.



Εικόνα 4.5.4-3. Απεικόνιση heatmap με το rangenome των 9 *Kushneria* spp. που αλληλουχήθηκαν από εμάς (SRL) και των 5 *Kushneria* spp. που ήταν ήδη κατατεθειμένα στη NCBI (πλήρη γονιδιώματα). Μέσα σε κάθε κελί φαίνεται ο αριθμός των γονιδιακών συστάδων (gene clusters) για το κάθε είδος. Με βάση το θερμικό χάρτη παρατηρούνται οι ομαδοποιήσεις των ειδών.

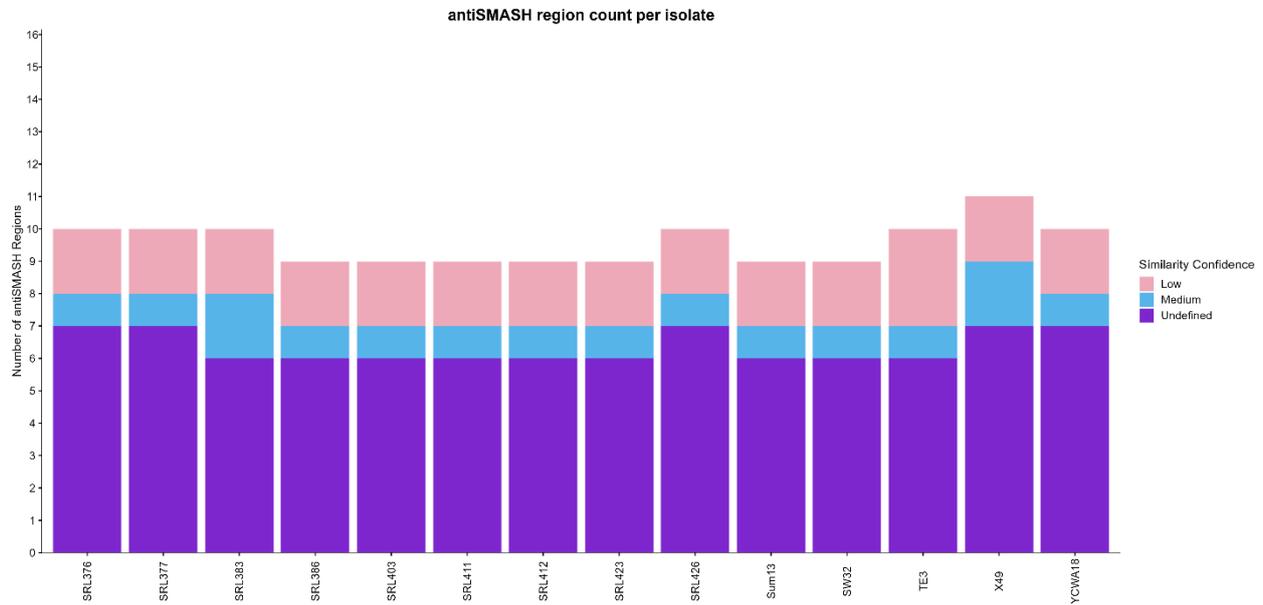
Επιπρόσθετα, για τον έλεγχο της ύπαρξης βιοσυνθετικών γονιδιακών συστάδων, πραγματοποιήθηκε *in silico* ανάλυση με τη χρήση του antiSMASH, συμπεριλαμβάνοντας και τις ήδη αλληλουχημένες 5 *Kushneria* spp. που υπάρχουν στη NCBI (υπάρχουν 15, αλλά μόνο 5 είναι αλληλουχημένες σε επίπεδο χρωμοσώματος). Από αυτήν προέκυψε ότι περιέχουν 9-10 κατηγορίες BGCs (ανάλογα την απομόνωση), ολόδια ή παρόμοια μεταξύ τους, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ομοιότητα που παρουσιάζουν με ήδη γνωστά BGCs από βάσεις δεδομένων (**Εικόνες 4.5.4-4** και **4.5.4-5**). Οι κατηγορίες με μέτρια ομοιότητα με ήδη γνωστά BGCs περιλαμβάνουν ένα αρυλοπυλινίο, μια κατηγορία βακτηριακών χρωστικών, ουσιαστικά πολυακρόεστων καρβοξυλικών οξέων, που παράγονται από συγκεκριμένες βιοσυνθετικές συστάδες

γονιδίων σε βακτήρια, ιδιαίτερα σε Gram-αρνητικά και 1 ή 2 NI-σιδηροφόρα. Στις κατηγορίες με μικρή ομοιότητα όλα τα είδη *Kushneria* spp. περιλαμβάνουν την εκτοΐνη, η οποία είναι ένα φυσικό μόριο που παράγεται από μικροοργανισμούς για να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες (αλατότητα, ξηρασία, θερμότητα) και λειτουργεί ως "κυτταρικό προστατευτικό" και ορισμένα από αυτά κι ένα ακόμη NI-σιδηροφόρο, διαφορετικό από το δεύτερο με μέτρια ή άγνωστη ομοιότητα (κάποια διαθέτουν μόνο ένα σιδηροφόρο). Τα BGCs που δεν βρέθηκε να έχουν ομοιότητα με άλλα ήδη γνωστά BGCs περιλαμβάνουν κατηγορίες όπως υσερλακτόνη ή ομοσερινική λακτόνη (απουσιάζει μόνο από τα SRL411 και Sum13), υδροκυάνιο (που δε βρέθηκε στα δικά μας γονιδιώματα αλλά μόνο στα X49 και YCWA18), NI-σιδηροφόρο, μη ριβοσωμική πεπτιδική συνθάση (NRPS), οξειδοαναγωγικός συμπάραγοντας, ριβοσωμικά συντιθέμενο και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένο πεπτίδιο (RiPP-like) και τερπένια.



Εικόνα 4.5.4-4. Απεικόνιση των βιοσυνθετικών γονιδιακών συστάδων (BGC) από τα 9 αλληλουχημένα γονιδιώματα *Kushneria* spp., μαζί με 5 πλήρη γονιδιώματα που υπήρχαν ήδη κατατεθειμένα στη NCBI. Με

διαφορετικό χρώμα φαίνεται κάθε κατηγορία BGC, ενώ ομαδοποιούνται σε τρία διαφορετικά πλαίσια ανάλογα με την ομοιότητα που παρουσιάζει η συστάδα με ήδη γνωστές από βάσεις δεδομένων (Medium, Low, Undefined).



Εικόνα 4.5.4-5. Απεικόνιση των διαφορετικών κατηγοριών BGCs ανά απομόνωση, ομαδοποιημένα ανάλογα με την ομοιότητα που παρουσιάζουν με άλλα ήδη γνωστά BGCs.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την παρούσα μελέτη αλληλουχήθηκαν καινούρια γονιδιώματα ειδών *Kushneria* spp. και ένα είδος *Streptomyces* sp. με υβριδικό τρόπο (μικρά και μεγάλα τμήματα), με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η μέγιστη κάλυψη του γονιδιώματος σε μεγάλο βάθος. Με την υβριδική αυτή τεχνολογία, ανακαλύφθηκαν πιθανώς 6 καινούρια είδη του γένους *Kushneria* sp.: τα SRL386, SRL403, SRL411, SRL412, SRL426 και SRL426, καθώς η ομολογία τους με ήδη γνωστά είδη ήταν κάτω από 90%, σύμφωνα με την FastANI. Επιπλέον, από την παν-γενωμική ανάλυση απεικονίζονται οι διακριτές ομαδοποιήσεις τους σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη *Kushneria* spp, που τα κατατάσσει σε νέους κλάδους. Η βακτηριακή απομόνωση *Streptomyces* sp.

Επιπλέον, μελετήθηκαν *in silico* οι βιοσυνθετικές γονιδιακές συστάδες μέσω του εργαλείου antiSMASH και αποκαλύφθηκαν κατηγορίες γονιδιακών συστάδων χωρίς ομολογία με ήδη γνωστές, προσδίδοντας μεγάλη πληροφορία για τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που τα νέα είδη ενδέχεται να συνθέτουν. Οι κατηγορίες αυτές περιλαμβάνουν αντιμικροβιακές ουσίες όπως η ομοσερινική λακτόνη, τερπένια και ΝΙ-σιδηροφόρα.

Τα γονιδιώματα (οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μαζί με το χαρακτηρισμό τους) έχουν δημοσιευθεί στην Ευρωπαϊκή Βάση Δεδομένων ENA (European Nucleotide Archive) με αριθμό PROJECT: PRJEB105379. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των γονιδιωματικών αναλύσεων, μαζί με αποτελέσματα άλλων παραδοτέων (Π4.5.3, 4.5.2 και 4.5.1) βρίσκονται σε προετοιμασία προς δημοσίευση σε έγκριτο επιστημονικό περιοδικό.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Blin, K., Shaw, S., Vader, L., Szenei, J., Reitz, Z. L., Augustijn, H. E., Cediél-Becerra, J. D. D., De Crécy-Lagard, V., Koetsier, R. A., Williams, S. E., Cruz-Morales, P., Wongwas, S., Segurado Luchsinger, A. E., Biermann, F., Korenskaia, A., Zduc, M. M., Meijer, D., Terlouw, B. R., Van Der Hooft, J. J. J., ... Weber, T. (2025). AntiSMASH 8.0: Extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic Acids Research*, 53(W1), W32–W38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf334>
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1), 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Chen, S. (2023). Ultrafast one - pass FASTQ data preprocessing , quality control , and deduplication using fastp. *Imeta*, 2(2), 1–5. <https://doi.org/10.1002/imt2.107>
- Delmont, T. O., & Eren, A. M. (2018). Linking pangenomes and metagenomes: the Prochlorococcus metapangenome. *PeerJ*, 6, e4320. <https://doi.org/10.7717/peerj.4320>
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS Computational Biology*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>
- Eren, A. M., Kiefl, E., Shaiber, A., Veseli, I., Miller, S. E., Schechter, M. S., Fink, I., Pan, J. N., Yousef, M., Fogarty, E. C., Trigodet, F., Watson, A. R., Esen, Ö. C., Moore, R. M., Clayssen, Q., Lee, M. D., Kivenson, V., Graham, E. D., Merrill, B. D., ... Willis, A. D. (2021). Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvio. *Nat Microbiol*, 6(1), 3–6. <https://doi.org/doi:10.1038/s41564-020-00834-3>
- Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Makarova, K. S., Vera Alvarez, R., Landsman, D., & Koonin, E. V. (2021). COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D274–D281. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1018>
- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., & Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142–i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.-A., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36(10), 996–1004. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Pascale, A., Proietti, S., Pantelides, I. S., & Stringlis, I. A. (2020). Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: The Basis for Targeted Disease Suppression and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01741>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). The plant microbiome: A complex and dynamic system. *Frontiers in Plant Science*, 12, 622211. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.622211>

- A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11).
<https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685>
- Sepey, M., Manni, M., & Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In M. Kollmar (Ed.), *Gene Prediction. Methods in Molecular Biology* (pp. 227–245). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
- van der Graaf-Van Bloois, L., Wagenaar, J. A., & Zomer, A. L. (2021). RFPlasmid: predicting plasmid sequences from short-read assembly data using machine learning. *Microbial Genomics*, 7(11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000683>
- Wick, R. R., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2025). Autocycler: long-read consensus assembly for bacterial genomes. *Bioinformatics*, 41(9).
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaf474>
- Wick, R. R., Judd, L. M., & Holt, K. E. (2023). Assembling the perfect bacterial genome using Oxford Nanopore and Illumina sequencing. *PLoS Computational Biology*, 19(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010905>