

El contenido de enzimas CAZy y péptidos efectores en los genomas accesorios de *Laccaria trichodermophora* confiere a las cepas capacidades simbióticas diferenciales

Rodolfo Enrique Ángeles-Argáiz*† y Roberto Garibay-Orijel†

* Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México, C.P. 04510.

† Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

Palabras clave

Capacidad infectiva, enzimas CAZy, genoma accesorio, predicción de péptidos efectores, variabilidad genómica intraespecífica.

Autor de correspondencia

Roberto Garibay Orijel, Instituto de Biología, Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, A.P. 70-233, C.P. 04510, Ciudad de México, México, +52 56229250 ext. 47836, rgaribay@ib.unam.mx

Resumen

En los genomas de los hongos ectomicorrízicos están impresas las capacidades fisiológicas que les han permitido lograr la asociación simbiótica con sus hospederos. La variación genética intraespecífica tiene efecto en su fenotipo y en sus interacciones simbióticas. Con la intención de identificar el trasfondo genómico que da a distintas cepas sus capacidades infectivas diferenciales se realizó el análisis comparativo de cuatro genomas de *Laccaria trichodermophora*. Este es un hongo ectomicorrízico asociado a pinos y con un importante potencial en la biotecnología forestal. A pesar de las diferencias genómicas entre las cepas de *L. trichodermophora* todas formaron un grupo monofilético hermano a *L. bicolor*. Su genoma *core* estuvo integrado por 6,756 grupos de genes ortólogos y el porcentaje del genoma accesorio varió entre el 18% y el 29% (genes). La batería genética codificante para enzimas de actividad sobre carbohidratos (CAZy) de *L. trichodermophora* es muy similar a la reportada para *L. bicolor* con genes simbióticos involucrados en la evasión y confrontación del sistema inmune vegetal, la colonización y organogénesis de la ectomicorriza, la competencia contra otros microorganismos rizosféricos y la explotación de la materia orgánica nitrogenada de difícil acceso en el suelo. Sin embargo la ausencia de importantes genes, cómo poligalacturonasas GH28 parecen haber comprometido la eficiencia simbiótica de algunas de las cepas analizadas. La cepa CA15-F10 fue la única que codificó el homólogo de la endoglucanasa LbGH5-CBM1, crucial en la formación de la ectomicorriza, lo que en conjunto con su elevada batería de péptidos efectores (SSPs) explica su mayor capacidad simbiótica.

1 Introducción

La simbiosis ectomicorrízica se presenta entre las raíces de más de 30 linajes de plantas (Tedersoo y Brundett 2017) y las hifas de más de 80 linajes de hongos (Tedersoo y Smith 2017) y tiene implicaciones que van desde el establecimiento de las plántulas hasta los ciclos biogeoquímicos globales (Smith y Read, 2009). El estudio de la simbiosis ectomicorrízica se ha visto robustecido por el análisis de genomas completos (Kohler y Martin 2016; Martin *et al.* 2016; Miyauchi *et al.* 2020; Plett y Martin,

2015). Mediante la secuenciación de los primeros genomas de especies micorrízicas se hicieron evidentes las características que llevaron a linajes independientes de hongos saprobios a convertirse en simbioses micorrízicas biótrosos, así como la diversidad y heterogeneidad de los mecanismos moleculares que los hongos micorrízicos emplean en la comunicación con sus socios vegetales (Kuo *et al.* 2014; Martin *et al.* 2008, 2010; Tisserant *et al.* 2013).

Una de las metas del estudio genómico de la simbiosis ectomicorrízica es identificar los “genes simbióticos” con los que cualquier especie de hongo micorrízico entabla comunicación e intercambio con sus distintos hospederos (Kuo *et al.* 2014). Con el análisis y comparación de genomas de hongos biótrosos y saprótrofos fue posible señalar la pérdida de la capacidad enzimática degradadora de pared celular vegetal como una convergencia evolutiva en hongos ectomicorrízicos. Por otro lado, también se ha hecho evidente que partes importantes de la batería genética involucrada en la comunicación con el hospedero son linaje-específicas (Kohler *et al.* 2015; Kohler y Martin 2016; Martin *et al.* 2016; Plett y Martin, 2015).

En el genoma de *Laccaria bicolor*, se encontraron péptidos efectores (SSPs) inducidos en la micorriza (MiSSPs, Martin *et al.* 2008). Algunos de ellos, como MiSSP7 (Plett *et al.* 2014; Martin *et al.* 2016) o MiSSP7.6 (Kang *et al.* 2020) presentaron actividad efectora en el interior de las células de la raíz de su hospedero, mientras que otras, como MiSSP8 (Pellegrin *et al.* 2019a) mostraron participación en la penetración intercelular. Proteínas efectoras de este tipo son bien conocidas por su papel en la colonización de los tejidos vegetales por parte de hongos patógenos y endófitos (Plett y Martin, 2015; Stergiopoulos y Wit, 2009). Ahora, sabemos que la biología efectora juega un papel fundamental en la comunicación entre el hongo y la planta durante el establecimiento de la simbiosis, su maduración y desempeño (Pellegrin *et al.* 2019b; Plett y Martin 2011; Plett *et al.* 2011; Rocafort *et al.* 2020; Toro y Brachmann, 2016). Con el empleo de datos transcriptómicos, se identificó un “regulón estable”, compuesto por 1,249 genes involucrados en la regulación de la simbiosis entre *L. bicolor* y algunos de sus hospederos. Simultáneamente, fue identificado un conjunto de 1,210 genes expresados diferencialmente durante la simbiosis, pero esta vez, específicos para los

distintos hospederos estudiados *Populus trichocarpa* y *Pseudotsuga menziesii* (Plett *et al.* 2015). Así mismo, los perfiles de expresión diferencial de enzimas de actividad sobre carbohidratos (CAZy) fueron relacionados con las distintas etapas de la ontogénesis de la ectomicorriza (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Con la caracterización de algunas de estas enzimas, como LbGH5-CBM1 (Zhang *et al.* 2018a), la comprensión sobre su participación en la simbiosis comienza a esclarecerse.

La teoría sobre la fisiología de las interacciones micorrízicas se ha forjado sobre una colección de observaciones experimentales y genómicas realizadas en distintas especies o cepas modelo, en muchos casos representantes de linajes micorrízicos independientes. En el caso de la simbiosis ectomicorrízica, modelos como *Laccaria bicolor* (Martin *et al.* 2008) y *Tuber melanosporum* (Martin *et al.* 2010) han permitido comprender aspectos fisio-ecológicos y evolutivos de las interacciones. Al mismo tiempo, la microbiología clásica remarcó la importancia de la identidad de la cepa en el fenotipo de prácticamente cualquier especie microbiana. Ahora, mediante el análisis de genomas completos, se llega a conclusiones similares (Welch *et al.* 2002). De manera experimental se ha comprobado, para *L. bicolor*, que la identidad de la cepa es determinante en las diferencias tanto en crecimiento micelial *in vitro* como en el desempeño de la planta inoculada (Di Battista *et al.* 1996; Hazard *et al.* 2017; Flores-Almaraz, 2020). Dentro del género *Laccaria* se ha reportado la variabilidad interespecífica al comparar los genomas de *L. bicolor* y *L. amethystina* (Kholer *et al.* 2015). Pero también, se han detectado importantes diferencias genómicas al interior de la misma especie, como la presencia de doce genes codificantes para hidrofobinas de la clase 1 en *L. bicolor* S238N-H82 y solo nueve en el de *L. bicolor* 81306 (Plett *et al.* 2012).

Con análisis de genómica comparada enfocada a la diversidad intraespecífica en especies modelo (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*) se detectó que los hongos evolucionan mediante innovaciones a nivel de cepa, como la duplicación de genes, en lugar de la transferencia horizontal a gran escala, y que la mayoría de los genes accesorios se

agrupan dentro de las regiones cromosómicas sub-terminales y están involucrados en la patogenicidad y resistencia antimicrobiana (McCarthy y Fitzpatrick, 2019).

Mediante muestreos sub-genómicos se evidenció que el hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus irregularis* (= *Glomus irregularis*, *Rhizoglomus irregulare*) presenta diferencias considerables en el número de copias genéticas entre cepas, divergencia entre las copias, aneuploidía; e incluso en algunas cepas heterocarióticas, esta variabilidad se presenta entre núcleo y núcleo. La variación en sus regiones codificantes es equiparable a la de las regiones no codificantes, lo que se relaciona con características fenotípicas en cuanto al desempeño de la planta simbiote (Wyss *et al.* 2016). Resultados similares se encontraron mediante genómica comparada, las diferencias entre los ensamblajes de siete cepas van desde el tamaño del genoma, el porcentaje de regiones repetidas, número de genes y genes huérfanos. Esta variación afectó elementos transponibles, diversos dominios proteicos funcionales péptidos efectores y otros genes simbióticos. Además, mediante análisis pan-genómicos se encontró el intercambio genético entre cepas, lo que es muy relevante en estos hongos supuestamente clonales, para los que no se conoce reproducción sexual (Chen *et al.* 2018).

Al analizar cuatro cepas geográficamente cercanas del hongo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* en cultivo axénico, se detectaron sutiles diferencias en sus perfiles de expresión transcriptómica. Sin embargo, al modificar las concentraciones de la fuente de carbono (glucosa) en el medio, las distintas cepas reaccionaron de manera considerablemente diferente en cuanto a su acumulación de biomasa y perfil de azúcares en el micelio. En simbiosis con su hospedero, *Eucalyptus grandis*, se demostró que a pesar de que la respuesta simbiótica general se mantiene en todas las cepas, la mayoría de los genes regulados de manera específica para la simbiosis son cepa específicos. De éstos, cerca de la mitad son de función desconocida, pero también una buena proporción son SSPs, transportadores y enzimas CAZy (Plett *et al.* 2020).

Por lo tanto, cada vez es mas clara la importancia de estudiar la variación genómica intraespecífica para hacer interpretaciones generales, forjar teoría y comprender el

trasfondo genético de los fenotipos observados (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020; Chen *et al.* 2018; Hortal *et al.* 2017; Pellitier y Zak, 2018; Plett *et al.* 2020; Hazard *et al.* 2017). La selección de la cepa es crucial en un desarrollo biotecnológico, por lo que es necesario fenotipificarlas y analizar sus genomas. En este trabajo se presenta la anotación funcional de cuatro genomas completos de cepas de *Laccaria trichodermophora* que fueron probados en simbiosis con pino (Flores-Almaraz, 2020) y en crecimiento micelial en medio líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020), así como el análisis comparativo en busca de genes y funciones potencialmente implicadas en sus capacidades diferenciales de colonización. La cepa EF-36 de *L. trichodermophora* acumula altas concentraciones de biomasa en cultivo líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020), pero desarrolla una pobre e incompleta colonización de la raíz de su hospedero (Flores-Almaraz, 2020), mientras que la cepa CA15-F10 no acumula tanta biomasa en la mismas condiciones de cultivo (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020) pero alcanza buenos porcentajes de micorrización y en tiempos relativamente cortos (Flores-Almaraz, 2020).

Como hipótesis, se asume que dentro del pan-genoma de *L. trichodermophora* se encontraran diferencias en cuanto al tamaño de familias génicas y a la identidad de los genes. Algunas de estas diferencias, de presentarse en genes involucrados en la simbiosis como SSPs y enzimas CAZy, podrían estar relacionadas con la capacidad de establecer la simbiosis. Por lo tanto, se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuáles son las principales diferencias genómicas entre las especies del género *Laccaria* y sus parientes saprobios más cercanos? ¿Cuáles son los genes comunes a las tres especies de *Laccaria* con genoma secuenciado? ¿Cuáles son los genes exclusivos de cada especie o cepa? y ¿Cómo estas diferencias explican sus capacidades diferenciales para establecer la simbiosis? Para atender estas interrogantes se planteó analizar de manera comparativa los genomas disponibles de *L. amethystina*, *L. bicolor* y *L. trichodermophora*. De manera particular, identificar los genes compartidos y/o únicos en el pan-genoma *Laccaria trichodermophora*. Así mismo, de entre los genes involucrados en la simbiosis, identificar su variación inter- e intraespecífica en cuanto a identidad y tamaño de familias génicas. Para finalmente, detectar genes potencialmente relacionados con sus capacidades diferenciales para establecer la simbiosis.

2 Material y métodos

2.1 Genomas analizados y modelos de estudio

El modelo de estudio fue la especie *Laccaria trichodermophora* (Muell. 1984), un Basidiomycete ectomicorrízico que se distribuye en México y Estados Unidos de América (Mueller, 1992; Wilson *et al.* 2017). En los volcanes del centro de México, particularmente en el Eje Neovolcánico Transversal Mexicano, es uno de los hongos con mayor producción de esporomas (Montoya *et al.* 2014; Reverchon *et al.* 2012). *Laccaria trichodermophora* se asocia con *Pinus montezumae* en los bosques de alrededor de 3,000 msnm y con *P. harwegii* en los límites superiores del bosque, alrededor de 4,000 msnm. Al estar cercanamente emparentada a *L. bicolor* (Wilson *et al.* 2017) comparte características morfo-anatómicas, pero parte de su ecología es distinta. Mientras *L. bicolor* se asocia, como generalista, tanto a gimnospermas como a angiospermas; *L. trichodermophora*, dentro de su rango de distribución natural, muestra una fuerte preferencia por hospederos en el género *Pinus* y los reportes sobre su asociación con *Fagus* o *Quercus* refieren a saltos de hospedero fuera de su distribución natural (Mueller y Strack 1992; Ramos *et al.* 2017). Partiendo de análisis de estructura poblacional (Quintero-Corrales *et al.* 2020) y de cultivo en medio líquido (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020), se seleccionaron cuatro cepas de *L. trichodermophora* con la intención de capturar la mayor diversidad genética y fenotípica de la especie dentro del centro de México. Los protocolos de extracción de DNA, secuenciación y ensamble genómico fueron reportados por Ángeles Argáiz *et al.* (en preparación).

Junto con los genomas de *L. trichodermophora*, se analizaron genomas públicamente disponibles que fueron ensamblados y secuenciados con distintas estrategias. El genoma de *L. bicolor* S238N-H82 se ensambló a partir de librerías de fósmidos (Martin *et al.* 2008); Los genomas de *L. amethystina* LaAM-08-1 (Kohler *et al.* 2015), *L. trichodermophora* CA15-F10 y *L. trichodermophora* CA15-75 (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación) fueron generados mediante secuenciación Illumina; Mientras que los de *L. bicolor* D101_1 (sin publicar, disponible en MycoCosm de JGI; Grigoriev *et al.* 2014), *L.*

trichodermophora CA15-11 y *L. trichodermophora* EF-36 (Ángeles-Argáiz *et al.* en preparación) son ensamblajes híbridos (PacBio e Illumina). Todas las muestras de *Laccaria* pertenecen a especies ectomicorrízicas. No se cuenta con genomas secuenciados de otros representantes de la Familia Hydnangiaceae, por lo que, se incluyeron siete genomas de hongos descomponedores del mantillo, representantes de la Familia más cercana, Psathyrellaceae (Varga *et al.* 2019; Wilson *et al.* 2017) (Tabla 1). Los datos genómicos, así como el código utilizado y otra información relacionada, se encuentran disponibles en línea (<https://github.com/Rodolfo47/LtC.git>).

Especie	Cepa	Tamaño del genoma (Mpb)	Número de Contigs/Scaffolds	Tamaño del contig/ scaffold mayor (Mpb)	N50 (Mpb)	GC (%)	Números de acceso	Secuenciación	Cita
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 144469	93.565	517	2.228	0.482	52.77	NCBI: PRJNA463278	PacBio	Steindorff et al. 2020
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 175.51	59.300	273	3.712	0.754	52.56	NCBI: PRJNA496351	PacBio	Floudas et al. 2020
<i>Coprinellus micaceus</i>	FP101781_FA13	77.386	704	2.253	0.315	53.73	NCBI: PRJNA247835	Illumina y PacBio	Varga et al. 2019
<i>Coprinopsis cinerea</i>	okayama7-130	36.192	68	4.146	3.468	51.64	NCBI: PRJNA1447	Sanger	Stajich et al. 2010
<i>Coprinopsis marcescibilis</i>	CBS 121175	38.912	817	1.435	0.134	49.26	NCBI: PRJNA247837	Illumina	Varga et al. 2019
<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	76940	33.316	622	1.580	0.190	48.98	NCBI: PRJEB18786	Illumina	Banks et al. 2017
<i>Laccaria amethystina</i>	LaAM-08-1	52.197	1,299	0.841	0.120	42.84	NCBI: PRJNA196025	Illumina	Kohler et al. 2015
<i>Laccaria bicolor</i>	D101_1	69.814	2,820	1.014	0.107	45.52	JGI: 1019115	Illumina y PacBio	-
<i>Laccaria bicolor</i>	S238N-H82	64.877	665	3.566	0.784	42.48	NCBI: PRJNA29019	Sanger	Martin et al. 2008
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-11	111.822	873	1.052	0.241	46.5	NCBI: PRJNA642675	Illumina y PacBio	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-75	82.555	28,921	0.127	0.005	46.97	NCBI: PRJNA642675	Illumina	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-F10	75.974	34,046	0.091	0.004	47.16	NCBI: PRJNA642675	Illumina	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Laccaria trichodermophora</i>	EF-36	58.859	72	5.316	1.464	46.83	NCBI: PRJNA642675	Illumina y PacBio	Ángeles-Argáiz et al. sin publicar
<i>Psathyrella aberdarensis</i>	ASM4126641v1	60.609	2,303	0.354	0.057	50.25	NCBI: PRJNA516162	IonTorrent	-

Tabla 1. Estadísticos básicos, autoría y procedencia de los ensambles genómicos utilizados. El tamaño del el genoma reportado es posterior a la limpieza de contigs repetidos por Funannotate (ver tabla 2).

2.2 Anotación funcional general

Se utilizó el pipeline Funannotate (v1.7.4, Palmer, 2017) sobre los ensamblajes genómicos para homogeneizar la anotación funcional de todas las muestras. Como primer paso se descartaron *contigs/scaffolds* repetidos (de longitud <N50, de >95% similitud nucleotídica y >95% de cobertura con algún otro *contig/scaffold*) y se enmascararon regiones repetidas del genoma con Tantan (v13, Frith, 2011) (softmasking = repetidos en letras minúsculas). Se sumaron los resultados de tres predictores de modelos génicos: Augustus (v3.3.3, Stanke y Waack, 2003), GlimmerHMM (v3.0.4, Majoros *et al.* 2004) y SNAP (Korf, 2013). Se usó el proteoma predicho de *L. bicolor* S238N-H82 (GCF_000143565.1_V1.0_protein.faa, Martin *et al.* 2008) como evidencia para entrenar al predictor Augustus. Para la anotación funcional se ejecutó InterProScan (v5.41-78.0, Jones *et al.* 2014) con lo que se detectaron términos IPR y términos GO (Gene Ontology Consortium, 2006). Se usó el servidor *online* de fungiSMASH (v5.2.0, Blin *et al.* 2019) para identificar metabolitos secundarios y el de Phobius (Käll *et al.* 2007) para dominios transmembranales. Con búsquedas HMMer (v3.3.2, Wheeler y Eddy, 2013) se identificaron enzimas CAZy (dbCAN2 v8.0, Zhang *et al.* 2018b) y dominios Pfam (v33.1, Bateman *et al.* 2004), con búsquedas Diamond (v0.9.21, Buchfink *et al.* 2015) sobre la base de datos UniProt KB (v2020_02, UniProt Consortium 2019) se identificaron proteasas (MEROPS v12.0, Rawlings *et al.* 2010), también se predijeron proteínas secretadas (SignalP v4.1, Petersen *et al.* 2011). Se evaluó lo completo de los ensamblajes mediante Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO, colección: basidiomycota_odb9, Simão *et al.* 2005). Para detectar similitudes funcionales entre las muestras se realizaron análisis de escalamiento multidimensional con las matrices de anotación IPR y Pfam.

2.3 Análisis filogenómico

Para confirmar la monofilia de las muestras de *L. trichodermophora*, se hicieron un par de análisis filogenómicos, uno basado en una super-matriz y uno en un super-árbol. El primero fue un análisis de máxima verosimilitud mediante RAxML (v8.2.12, Stamatakis,

2014) con Funannotate. El análisis usó como modelo de sustitución de aminoácidos JTT+DCMut, 100 inferencias rápidas de bootstrap y una búsqueda exhaustiva de máxima verosimilitud, realizado a partir de un super-alineamiento concatenado con longitud de 79,012 aminoácidos e integrado por 148 marcadores BUSCO presentes como copia única en todas las muestras. El segundo fue un super-árbol resultante del consenso de 895 árboles de genes ortólogos. Cada árbol de genes fue inferido por máxima verosimilitud de FastTree (Price *et al.* 2010) con OrthoFinder (v2.5.2, Emms y Kelly, 2015; 2019), y los alineamientos realizados con MAFFT (Kato *et al.* 2013). Al menos 85.7% de las especies analizadas contribuyeron con un gene a los grupos de ortólogos usados. El árbol de especies se consensó con STAG (Emms y Kelly, 2018) y se enraizó con STRIDE basado en los eventos de duplicación genética (Emms y Kelly, 2017). Los árboles resultantes se editaron con FigTree (v1.4.3, Rambaut, 2012).

2.4 Cálculo del pan-genoma

El pan-genoma de *L. trichodermophora* estuvo integrado por la suma de todos los grupos de modelos génicos ortólogos de todos los genomas de la especie, el genoma *core* se integró solo por los ortólogos con (al menos) una copia en cada cepa. La homología entre los modelos génicos se detectó mediante OrthoFinder (v2.5.2, Emms y Kelly, 2015; 2019) sobre los proteomas predichos por Funannotate. OrthoFinder generó grupos de genes ortólogos mediante MCL (Dongen, 2000) a partir de grafos, con genes como nodos conectados por el *score* normalizado de los mejores *hits* recíprocos de BlastP/Diamond (v0.9.21, Buchfink *et al.* 2015). Posteriormente hizo árboles para cada grupo de genes, con los que construye un árbol de especies y con base en esa información filogenética corrige los propios grupos de orthologos (v2.5.2, Emms y Kelly, 2019). Para asegurar una mejor asignación de ortólogos se incluyeron en el análisis, a manera de grupos externos, las muestras de la familia Psathyrellaceae (Tabla 1).

2.5 Anotación de enzimas CAZy

Las enzimas CAZy relajan la pared celular de la raíz durante la simbiosis permitiendo la colonización intercelular. Para profundizar en el análisis de este grupo genético/ funcional se partió de la predicción de modelos génicos realizada con Funannotate para posteriormente detectar enzimas CAZy con dbCAN2 (v2.0.11, Zhang *et al.* 2018b). Se utilizaron los resultados del método de búsqueda HMMer (dbCAN-HMMdb-V8) ya que se ha considerado el más robusto de los tres (Stewart *et al.* 2019).

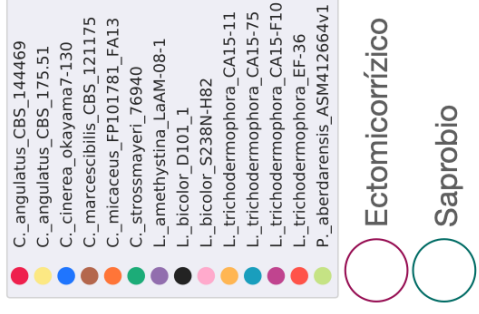
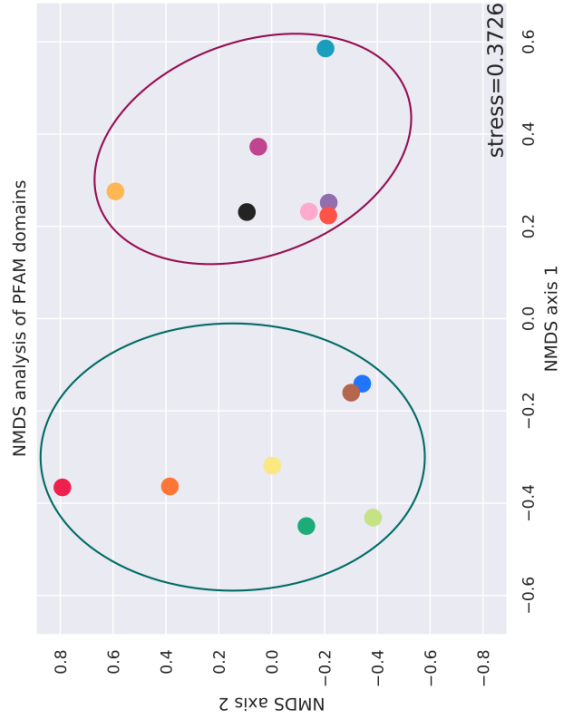
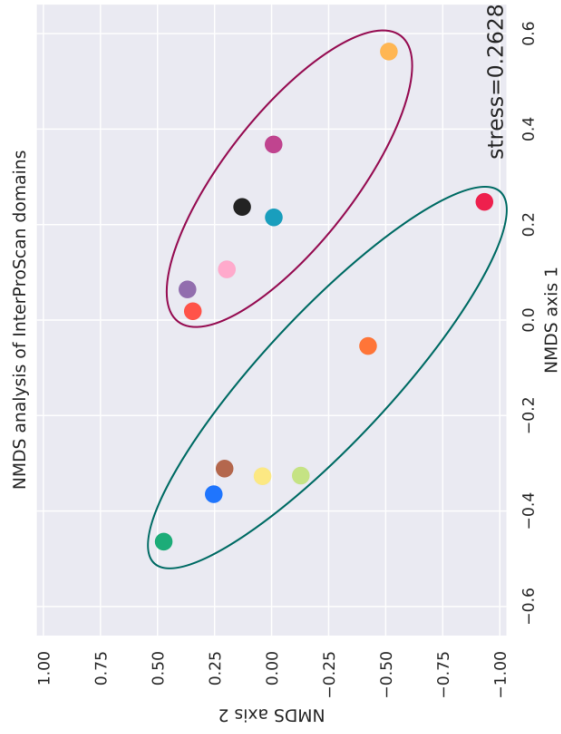
2.6 Predicción de péptidos efectores

Las proteínas efectoras secretadas por los hongos facilitan la infección de los tejidos vegetales. Para su predicción, el proteoma predicho con Funannotate se tamizó con los programas SignalP (v5.0b, Armenteros *et al.* 2019), EffectorP (v2.0, Sperschneider *et al.* 2018a) y ApoplastP (v1.0, Sperschneider *et al.* 2018b). SignalP-5 es un programa basado en redes neurales destinado a la predicción de proteínas secretadas, con el cual se detectó la señal de secreción, se cortó y se discriminó de los motivos transmembranales y las proteínas de localización mitocondrial o de retículo endoplasmático (Armenteros *et al.* 2019). A partir del secretoma se predijeron los péptidos potencialmente efectores con EffectorP, un programa basado en “Machine Learning”, entrenado con péptidos efectores de hongos patógenos y simbióticos, que toma en cuenta la carga neta de la proteína, longitud de su cadena, su contenido de cisteína y la evidencia de selección diversificante (Sperschneider *et al.* 2018a). A su vez, a partir de estos resultados se realizó un tercer filtrado con ApoplastP, que selecciona los péptidos con una potencial localización en el apoplasto. Para lo que también, mediante “Machine Learning”, busca secuencias enriquecidas con ácido glutámico y en aminoácidos ácidos pequeños y cargados (Sperschneider *et al.* 2018b). Los péptidos obtenidos después de los tres pasos de filtrado fueron agrupados por su ortología con OrthoFinder, como se describe en la sección 2.4.

3 Resultados y discusión

Especie	Cepa	Complejidad del ensamble (%)	Contigs repetidos	Repetidos enmascarados	Modelos génicos	Proteínas	Proteínas anotadas (%)	tRNAs	Plam	UniProt	InterProScan	GO	CAZymes	MEROPS	Sec. Met.	Secretados
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 144469	86.8 (D:46.0)	0; 0 bp (0.00%)	6,800,894 bp (7.27%)	25,190	24,648	70.02	542	18,318	741	43,694	10,139	1,062	603	21	1,894
<i>Coprinellus angulatus</i>	CBS 175.51	86.3 (D:2.6)	0; 0 bp (0.00%)	6,369,509 bp (10.74%)	14,429	14,043	69.73	386	10,912	465	25,847	5,905	606	345	13	892
<i>Coprinellus micaceus</i>	FP101781_FA13	80.9 (D:23.4)	0; 0 bp (0.00%)	8,573,706 bp (11.08%)	18,349	17,881	69.10	468	13,038	611	32,205	7,419	787	459	20	956
<i>Coprinopsis cinerea</i>	okayama7-130	91.1 (D:0.5)	0; 0 bp (0.00%)	3,315,551 bp (9.16%)	11,687	11,419	74.69	268	9,990	451	22,746	5,326	650	312	16	912
<i>Coprinopsis marcescibilis</i>	CBS 121175	91.4 (D:0.7)	0; 0 bp (0.00%)	993,305 bp (2.55%)	11,696	11,459	77.06	237	10,349	399	23,477	5,504	627	333	17	842
<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	76940	79.4 (D:0.4)	0; 0 bp (0.00%)	2,417,872 bp (7.26%)	9,585	9,350	77.19	235	8,395	415	20,164	4,790	455	280	15	530
<i>Laccaria amethystina</i>	LaAM-08-1	93.3 (D:1.5)	0; 0 bp (0.00%)	6,190,404 bp (11.86%)	12,635	12,414	69.99	221	10,120	411	23,696	5,428	403	301	19	373
<i>Laccaria bicolor</i>	D101_1	93.8 (D:7.3)	100; 214,808 bp (0.31%)	3,540,422 bp (5.07%)	18,390	17,997	64.47	397	13,102	501	29,865	6,953	530	371	20	203
<i>Laccaria bicolor</i>	S238N-H82	88.8 (D:2.4)	0; 0 bp (0.00%)	8,480,540 bp (13.07%)	14,655	14,319	66.11	339	10,794	412	25,405	5,731	427	344	21	165
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-11	86.1 (D:34.6)	3; 79,604 bp (0.07%)	7,141,517 bp (6.39%)	25,500	24,885	63.11	609	17,121	670	40,199	9,102	635	541	39	141
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-75	49.7 (D:12.1)	125; 85,163 bp (0.10%)	3,871,341 bp (4.69%)	22,024	21,508	56.30	532	10,218	773	27,447	6,934	382	376	15	75
<i>Laccaria trichodermophora</i>	CA15-F10	53.3 (D:6.0)	101; 68,978 bp (0.09%)	3,323,251 bp (4.37%)	24,980	24,505	55.49	484	10,824	808	30,365	7,899	359	431	22	43
<i>Laccaria trichodermophora</i>	EF-36	81.9 (D:2.0)	5; 203,654 bp (0.34%)	3,574,890 bp (6.07%)	14,410	14,083	64.51	330	9,932	427	23,748	5,446	379	308	17	137
<i>Psathyrella aberdarensis</i>	ASM4126641v1	78 (D:1.9)	0; 0 bp (0.00%)	5,160,575 bp (8.51%)	14,350	14,108	69.73	250	10,056	477	24,763	5,724	604	351	21	99

Tabla 2. Principales resultados de la anotación funcional de los ensamblajes genómicos. El porcentaje de completitud del ensamble se detectó mediante BUSCO: D = porcentaje de BUSCOs duplicados.



3.1 Comparación funcional general

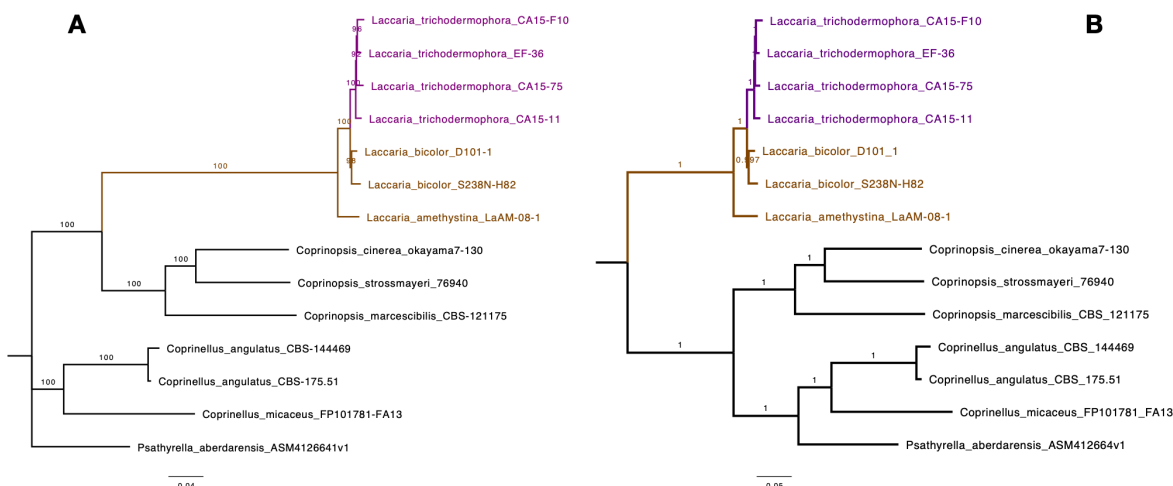
Se asignaron anotaciones funcionales o dominios proteicos conocidos a más de la mitad de las proteínas predichas de las muestras de *L. trichodermophora* ($\mu = 59.85 \pm 4.62$ %) aunque para las otras muestras del género *Laccaria* ($\mu = 66.86 \pm 2.84$ %) y para las de la Familia Psathyrellace ($\mu = 72.50 \pm 3.67$ %) el porcentaje de proteínas anotadas fue mayor (Tabla 2). Al comparar la diversidad de funciones representadas por dominios Pfam o IPRs se observó que las cepas ectomicorrízicas, todas del género *Laccaria*, se agrupan entre sí, mientras que las cepas saprobias, aunque de distintos géneros, formaron un grupo independiente, sin embargo los altos valores de tensión de ambos análisis indican que la ordenación fue arbitraria (Figura 1).

3.2 Posición filogenética

Con los análisis filogenómicos se confirmó que, a pesar de las diferencias genómicas en tamaño y contenido que se detectaron en los genomas de las cuatro cepas de *L. trichodermophora*, todas estas formaron un grupo monofilético bien soportado (soporte bootstrap del análisis de super-matriz = 100, soporte de las ramas del análisis de super-árbol = 1) en ambos análisis. El género *Laccaria* (100/1) y la especie *L. bicolor* (98/0.997) también se recuperaron como monofiléticos. Lo mismo ocurrió con todos los géneros o especies para los que se incluyó más de una muestra en el análisis (Figura 2). La especie hermana de *L. trichodermophora* fue *L. bicolor* (100/1), mientras que *L. amethystina* fue la especie más externa dentro de *Laccaria*, lo que concuerda con previos análisis morfoanatómicos (Osmundson *et al.* 2005) y filogenéticos multi-loci (Wilson *et al.* 2017).

Figura 1. Análisis de escalamiento multidimensional de **(A)** dominios IPR y **(B)** dominios Pfam. Los círculos rojos señalan las muestras del género *Laccaria*, los círculos verdes señalan las muestras de la Familia Psathyrellaceae. —————>

Figura 2. Análisis filogenómicos. **(A)** Análisis de máxima verosimilitud (RAxML) con 148 genes BUSCO en alineamiento concatenado, con modelo de sustitución de aminoácidos JTT+DCMut, 100 inferencias rápidas de bootstrap y una búsqueda exhaustiva de ML. **(B)** Árbol consenso de 895 árboles de genes ortólogos de máxima verosimilitud (FastTree), consensado con STAG y enraizado con STRIDE. Los valores de soporte indican el porcentaje de árboles de genes que soportan la rama.



3.3 El pan-genoma abierto de *Laccaria trichodermophora*

Las distintas cepas de *L. trichodermophora* acumularon entre 14,083 (EF-36) y 24,885 (CA15-11) modelos génicos (Tabla 3). Los 84,981 modelos génicos totales del pan-genoma de *L. trichodermophora* se integraron en 12,513 grupos de ortólogos. El genoma *core* de la especie se integró por 6,756 (54%) grupos de genes ortólogos representados por una o varias copias. En los genomas de cada cepa del 54% al 76% fueron grupos de ortólogos *core* lo que en genes representa del 71% al 82% del genoma (Tabla 3, Figura 3B). El genoma de la cepa CA15-F10 presentó el mayor número de grupos de ortólogos exclusivos (717) mientras que la cepa EF-36 presentó el menor (93) (Figura 3A), estas mismas cepas presentaron el mayor y menor número de genes no agrupados en ortólogos respectivamente (1,279 y 193, Tabla 3). En bioensayos de inoculación de las cuatro cepas en las raíces de su hospedero, CA15-F10 fue la que presentó mayor infectividad (Flores-Almaraz, 2020). La relación entre la

presencia y eventual expresión de los genes exclusivos de CA15-F10 y su capacidad diferencial de colonización deberá ser comprobada.

Cepas	Genes	Genes en grupos de ortólogos	Genes no agrupados # (%)	Grupos de ortólogos # (%) del pan-genoma	Grupos de ortólogos del core-genoma # (%)	Genes del core-genoma # (%)
<i>L. trichodermophora</i> CA15-11	24,885	24,208 (97.28)	677 (2.72)	9,859 (78.79)	6,756 (68.53)	19,303 (77.57)
<i>L. trichodermophora</i> CA15-75	21,508	20,591 (95.72)	917 (4.26)	9,796 (78.29)	6,756 (68.97)	16,250 (75.55)
<i>L. trichodermophora</i> CA15-F10	24,505	23,226 (94.78)	1,279 (5.22)	10,560 (84.39)	6,756 (63.98)	17,439 (71.17)
<i>L. trichodermophora</i> EF-36	14,083	13,890 (98.63)	193 (1.37)	8,882 (70.98)	6,756 (76.06)	11,480 (81.52)
Pan-genoma	84,981	81,915 (96.39)	3,066 (3.61)	12,513 (100)	6,756 (53.99)	-
Core-genoma	64,472	64,472 (75.87)	-	6,756 (53.99)	6,756 (100)	64,472 (75.87)

Tabla 3. Número de grupos de ortólogos y genes en distintos estratos pan-genómicos de *Laccaria trichodermophora*.

El conjunto de siete genomas del género *Laccaria* sumaron 132,594 modelos génicos agrupados en 13,733 ortólogos. Se detectaron solo 5,548 ortólogos compartidos por todas las muestras del género (Figura 3C). Estos resultados hacen evidente, no solo la alta variabilidad genómica a nivel de tamaño y contenido génico de la especie *L. trichodermophora*, si no también para *L. bicolor*, que a pesar de solo haber incluido dos muestras en este análisis su diversidad genómica es equiparable a la detectada para *L. trichodermophora*. Este resultado no es sorprendente, pues ya se contaba con evidencia de la disparidad genómica en genes particulares entre cepas de *L. bicolor* (Plett *et al.* 2012) y la inminente publicación del proyecto The *Laccaria* Pan-Genome por parte de JGI/MycoCosm dará más claridad a este fenómeno.

99



genes por cepa compartidos por todas las muestras (*Core*) exclusivos de una solo cepa (Exclusivos) o compartidas por varias, pero no todas las cepas (Accesorios).

En microorganismos bacterianos la relación entre los genes del genoma *core* con respecto al pan-genoma de la especie puede ser tan baja como del 5% y sus fenotipos asociados suelen presentar características contrastantes, particularmente relacionadas a la interacción con sus hospederos, ya sea de manera simbiótica mutualista o detrimental (González *et al.* 2019; McInerney *et al.* 2017; Rouli *et al.* 2015).

Evidentemente, el esfuerzo de muestreo genómico, en especies de pan-genoma abierto, impacta considerablemente el tamaño de los pan-genomas y por ende en su relación con el genoma *core*. En microorganismos eucariontes las cifras no son tan extremas, hongos modelo han presentado genomas *core* de entre el 80 y 90% (McCarthy y Fitzpatrick, 2019). Las relaciones entre *core* y pan-genomas de microorganismos eucarióticos pueden estar influenciadas por el uso de ensamblajes genómicos incompletos, lo que puede afectar ambos estratos genómicos. Sin embargo, es preciso considerar que gran parte de las regiones descubiertas por los ensamblajes genómicos son precisamente regiones teloméricas. En hongos asociados a plantas estas regiones típicamente están pobladas por elementos repetidos, que a su vez promueven el enriquecimiento de genes relacionados con la interacción simbiótica (Möller y Stukenbrock, 2017). En muchos casos este tipo de genes son más bien pertenecientes al estrato accesorio de los pan-genomas de las especies, por lo que es posible considerar que los efectos de la calidad de los ensamblajes sobre la acumulación de genes en los pan-genomas eucariontes pudiera afectar al genoma accesorio en mayor medida que al *core*. Este fenómeno fue reportado para cepas de *Leptosphaeria maculans* codificantes para genes accesorios de interacción con su hospedero vegetal, pero localizados en *gaps* teloméricos del ensamblaje de referencia (Plissonneau *et al.* 2016). Con el uso de seis ensamblajes “telómero a telómero” del fitopatógeno *Zymoseptoria tritici* se detectaron cromosomas accesorios completos, se destacó la relevancia del genoma accesorio en la interacción con el hospedero y un genoma *core* de cerca del 60% (Plissonneau *et al.* 2018). Esta relación se mantuvo al incrementar el muestreo a 19 genomas de alta calidad procedentes de seis continentes (Badet *et al.* 2020) o incluir una colección global mayor a cien genomas (Plissonneau *et al.* 2018).

Se encontraron 549 grupos de ortólogos del género *Laccaria* ausentes en *L. trichodermophora*, 20 de ellos fueron anotados a genes conocidos, pero cerca de la mitad tuvieron anotación a dominios funcionales de las bases de datos PFam (310, 56%), InterProScan (390, 71%), términos GO (289, 53%) o las tres (246, 45%). Solo 10 grupos de ortólogos tuvieron anotación a enzimas CAZy, 17 a proteasas MEROPS y 9 con señal de secreción, aunque de estas ninguna proteasa y solo una enzima CAZy (glucanasa GH152) presentó señal de secreción. Además, 100 grupos de ortólogos presentaron dominios transmembranales, de estos solo dos se predijeron como secretados, pero cerca de la mitad tuvieron anotaciones PFam (52), InterProScan (65), términos GO (43) o los tres (39).

3.4 El poder degradador de pared celular vegetal de *Laccaria*

Se detectaron 259 enzimas CAZy en el genoma de *L. amethystina*, 324 y 295 en los de *L. bicolor* (D101_1 y S238N-H82 respectivamente), mientras que las cepas de *L. trichodermophora* promediaron 310 ± 81 enzimas CAZy (CA15-11: 428, CA15-75: 274, CA15-F10: 289 y EF-36: 248). El género *Laccaria* promedió 302 ± 61 enzimas CAZy mientras que las especies saprobias de la Familia Psathyrellaceae acumularon 521 ± 159 . Como se esperaba, fueron varias las enzimas CAZy presentes en Psathyrellaceae y ausentes en *Laccaria*. De las 203 funciones CAZy anotadas en total (considerando a los genes que presentaron dos motivos funcionales como distintos a los de un solo motivo) *Laccaria* solo presentó 116 (57%) y Psathyrellaceae 191 (94%). Este patrón se relaciona con el estilo de nutrición de estos dos linajes cercanamente emparentados y es una evidencia más que sostiene la hipótesis de la pérdida de enzimas de actividad sobre pared celular vegetal como una de las principales características genéticas/fisiológicas que definen a la simbiosis ectomicorrízica en Basidiomycota (Kohler *et al.* 2015; Wolfe *et al.* 2012). Sin embargo, también se encontraron algunas enzimas CAZy exclusivas en *Laccaria* (Figura 4), estas se discuten a continuación.



3.4.1 Funciones de *Laccaria* no detectadas en Psathyrellaceae

Los genes CAZy exclusivos de *Laccaria*, no detectados en Psathyrellaceae fueron AA3_4, CE8, GH12, GH13_31, GH30, GH76 y GH95, así como los dímeros AA1_1+AA1_1, GT20+GT20, GH13_1+GH13_1, GH13_8+GH13_8 y GH5_15+GH5_15. Todos los dímeros fueron detectados como monómeros en casi todas las muestras de Psathyrellaceae (excepto GH5_15). La función AA3_4 solo estuvo presente en *L. amethystina*, por el contrario GH30 no se encontró en esta especie pero sí en varias cepas de las otras especies de *Laccaria*. Genes de CE8 se detectaron en todas las especies aunque no en todas las cepas. Genes de GH12 y GH95 fueron detectados en todas las especies pero no en todas las cepas de *L. trichodermophora*. GH13_31 fue exclusiva de la cepa CA15-11 de *L. trichodermophora*, aunque varios miembros de la familia GH13, asignados a otras sub-familias fueron detectados en *Laccaria* y Psathyrellaceae. Finalmente GH76 fue la única función detectada para todas las cepas de *Laccaria* y ninguna de Psathyrellaceae (Figura 4).

Figura 4. Heatmap de la comparación del contenido de enzimas CAZy (filas) en los genomas de representantes del género *Laccaria* y representantes de la familia Psathyrellaceae (columnas). El color blanco representa la ausencia de la sub-familia, los colores fríos representan un número bajo de genes de cada sub-familia mientras los colores cálidos representan altos números de genes. El dendograma agrupa los genes por su ocupación en los genomas y similitud en número de copias. Las barras superiores señalan el estilo trófico de los hongos analizados: morados = ectomicorrízicos (todos del Género *Laccaria*); anaranjados = saprobios (todos de la Familia Psathyrellaceae). —————>

Las GH76 son endo- α -mananasas con capacidad de utilizar manano lineal, pero tienen poca actividad en manano ramificado. Este tipo de enzimas están involucradas en la reticulación de lipo-proteínas de la pared celular fúngica actuando como transglicosilasas y manosiltransferasas (CAZypedia Consortium, 2018). Son comunes en los genomas de patógenos necrotróficos, pero más bien raras en los biotróficos (Zhao *et al.* 2014). Cepas de levaduras patógenas de plantas deficientes en estas funciones son altamente susceptibles a la respuesta inmune vegetal mediada por osmotinas PR-5 (Ibeas *et al.* 2000). Dada la ausencia de esta función en todos los saprobios analizados, y su presencia en todos los ectomicorrízicos, se puede especular que este es uno de los “genes simbióticos” de *Laccaria*, ya que la enzima está relacionada con el “camuflaje molecular” al enmascarar ramas externas de la quitina ligadas a mananos y d β -glucanos propios de la pared celular fúngica, evadiendo así su detección y atenuando la respuesta inmune de la planta (Gow *et al.* 2017) lo que a su vez permite el desarrollo de la simbiosis ectomicorrízica (Plett y Martin 2018).

En *L. amethystina* fue detectada la función AA3_4 y no en sus congéneres ni en las especies de Psathyrellaceae. Las enzimas de la subfamilia AA3_4 son piranosa oxidasas (POX) que participan en facilitar la degradación de compuestos lignocelulósicos. Típicamente se expresan en conjunto con peroxidasas (AA2) y monooxigenasas líticas de polisacáridos (AA9), en las puntas de las raíces de ectomicorrizadas probablemente modificando la pared celular de la planta durante la colonización del espacio apoplásico (Kohler *et al.* 2015; Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Estas enzimas son parte del regulón estable independiente a la identidad del hospedero (Plett *et al.* 2015). A diferencia de otras AA3, las POX (AA3_4) están asociadas a vesículas o membranas hifales periplasmáticas y usan metales y quinonas, que son catalíticamente más eficientes que el oxígeno, como aceptores de iones (Ludwig *et al.* 2018); esto le da a los hongos una actividad fuerte y generalista sobre sustratos lignificados justo sobre la superficie de la hifa.

Por el contrario *L. amethystina* no presentó la enzimas GH30 (a nivel de familia enzimática), un grupo xilanasas fúngicas poco específicas, activas tanto en glucuronoxilanos como en arabinoxilanos, que liberan xilosa o xilobiosa de las

decoraciones de los xilooligosacaridos de la hemicelulosa y pueden tener actividad transglucosilasa (Espinoza y Eyzaguirre, 2018; Katsimpouras *et al.* 2019). Estas enzimas no se detectaron en las muestras de Psathyrellaceae, pero sí en las otras especies de *Laccaria*. Enzimas similares, clasificadas en la subfamilia GH30_3 fueron detectadas en todas las especies de *Laccaria* incluyendo *L. amethystina* mientras que GH30_7 solo se detectó en las muestras de Psathyrellaceae. Es difícil interpretar estos resultados, aunque este tipo de enzimas, por actuar sobre la hemicelulosa de la pared primaria, podrían tener funciones simbióticas en la colonización o la organogénesis de la ectomicorriza. Por otra parte, podrían tener alguna participación en la modulación de las comunidades microbianas en la rizósfera mediante la liberación de carbohidratos solubles probióticos.

Las CE8, GH12 y GH95 ausentes en los saprobios en Psathyrellaceae, fueron detectadas en todas las especies de *Laccaria*, aunque no en todas las muestras. Las enzimas CAZy clasificadas en la familia CE8 son metilesterasas de pectina, la cual es el principal componente de la lámina media y también se encuentra en la pared celular primaria en plantas. Recientemente se detectó la expresión de CE8 en micelio de *L. bicolor* S238N-H82 bajo condiciones de agotamiento de nitrógeno, por lo que se asume que esta enzima participa activamente en la obtención de nitrógeno de la materia orgánica del suelo (Nicolás *et al.* 2019). Por otra parte, en los transcriptomas de hongos formadores de micorriza ericoide todas o casi todas sus CE8 fueron sobre expresadas durante la simbiosis (Martino *et al.* 2018). Las enzimas de actividad sobre pectina sobre expresadas en la simbiosis de *L. bicolor* S238N-H82 y *Populus trichocarpa* fueron clasificadas en la familia GH28, no en CE8 (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Sin embargo, la actividad de CE8 anclada a la pared fúngica, en conjunto con expansinas, se ha asociado a la penetración de la hifa en el espacio apoplástico, a pesar de que su expresión es disminuida en la ectomicorriza (Vincent *et al.* 2012). En este trabajo se detectó la presencia de metilesterasas de la familia CE8 en el genoma de la cepa S238N-H82 de *L. bicolor*, pero no en el de la cepa D101-1 de la misma especie, de manera similar, solo dos cepas de *L. trichoderma* (CA15-75 y EF-36) codificaron esta enzima en sus genomas, mientras que la cepa *L. amethystina* LaAM-08-1

presentó dos genes. El número y diversidad de estas enzimas podría estar relacionado con la capacidad diferencial de colonización de la raíz del hospedero.

Las GH95 son α -L-fucosidasas y α -L-galactosidasas de acción sobre oligosacáridos y arabinoxilano, componentes de la hemicelulosa. Al igual que CE8, GH95 fueron sobre expresadas en las micorrizas ericoides de *Oidiodendron maius* (Martino *et al.* 2018) y al igual que CE8, están ausentes en los genomas de hongos endófitos como *Xylona heveae* (Gazis *et al.* 2016) aunque esta enzima no se destaca en los transcriptomas o secretomas de *L. bicolor* en investigaciones previas.

Las GH12 son endo- β -1,4-glucanasas capaces de degradar celulosa, es una de las pocas familias de enzimas degradadoras de celulosa remanentes en *Laccaria*. Estas enzimas también presentan actividad hidrolasa sobre xiloglucano. Su sobre expresión ha sido detectada en fases tempranas de la colonización de la raíz (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Se ha observado el relajamiento de la pared celular vegetal por este tipo de enzimas, propias de hongos Ascomycota, en ensayos experimentales (Yuan, 2001). Se ha detectado que sustituciones particulares en la secuencia de aminoácidos del sitio catalítico de las endoglucanasas fúngicas de la familia GH12 propician modificaciones estructurales, que a su vez transforman xiloglucanasas específicas en glucanasas más generalistas (Damásio *et al.* 2014), por lo que es posible que el análisis evolutivo sobre secuencias y dominios estructurales permita hipotetizar el componente de la pared celular vegetal que es sustrato de las GH12 de *Laccaria* y así aproximarse al entendimiento de su participación en la simbiosis o en la explotación de la materia orgánica en el suelo.

3.4.2 Las funciones CAZy más numerosas en *Laccaria*

En los genomas de *Laccaria* las 10 funciones CAZy más numerosas fueron CE10, AA3_2, GH18, GH47, GH16, GH5_9, GH79, GT2_Chitin_synth_2, GT90 y AA1_1. Este patrón fue constante al interior de las especies y cepas. En el genoma de *L. amethystina* se detectó un alto número de enzimas CAZy de las actividades CE10 (14 genes), GH16 (10), GH5_9 (10) y AA7 (10); en los de *L. bicolor* las enzimas CAZy más numerosas fueron CE10 (19 y 17 genes en las cepas D101_1 y S238N-H82

respectivamente), GH16 (13 y 12), GH18 (12 y 11), GH5_9 (10 y 10); Mientras que en los genomas de *L. trichodermophora* las enzimas CAZy más numerosas fueron CE10 (24, 11, 15 y 15 genes en las cepas CA15-11, CA15-75, CA15-F10 y EF-36 respectivamente), AA3_2 (18, 17, 14, 10), GH47 (15, 14, 13, 12) y GH18 (16, 13, 12,10).

La enzima CAZy más numerosa en todas las especies y cepas de *Laccaria* fue CE10, aunque Psathyrellaceae presentó contenidos aún mayores (16 ± 4 vs 23 ± 6). CE10 pertenece a la superfamilia de las esterasas de carbohidratos, pero particularmente CE10 es una acetilesterasa. Esta familia fue retirada de la base de datos CAZy dado que la gran mayoría de sus integrantes presentan actividad sobre sustratos distintos a carbohidratos, como ésteres y glicérol decorativos (CAZypedia Consortium, 2018). Por ejemplo, una CE10 de *Aspergillus* presenta actividad sobre ésteres de vinilo de cadena corta (derivados de alcohol) y tricilglicérols (Bourne *et al.* 2004), mientras que otra presenta actividad sobre propilenglicol derivado de ácidos grasos (Oleas *et al.* 2017). Son particulares los hongos fitopatógenos que codifican altos contenidos de acetilesterasa de la familia CE10, como *Macrophomina phaseolina* (32 genes, Islam *et al.* 2012), *Corynespora cassiicola* (92 genes, Looi *et al.* 2017) o *Colletotrichum truncatum* (87 genes, Rao y Nandineni, 2017) por lo que se les considera con estilos infectivos poco habituales. Las especies hemibiotróficas de Oomycetes codifican mayor cantidad de acetilesterasa CE10 que las biotróficas o necrotróficas, y no presentan un patrón general en cuanto a su transcripción en micelio de vida libre o micelio infeccioso, por lo que se infiere que las distintas especies usan sus acetilesterasas durante su actividad saprobia o patógena de manera diferencial. Así mismo, la transcripción de estos genes por parte de Oomycetes asociados a plantas es más variable (de una especie a otra) que las patógenas de animales, aunque estadísticamente similares (Vries y Vries, 2020). Ya que las acetilesterasas de la familia CE10 no fueron expresadas por hongos filamentosos cultivados en presencia de glucosa (a pesar de codificarlos en sus genomas), es posible que estas enzimas desempeñen un papel en la conversión de biomasa relacionado con la modificación de la lignina (Arntzen *et al.* 2020). En *Laccaria* algunos de estos genes podrían estar participando en la modificación de la pared vegetal en la colonización y organogénesis en conjunto con

LPMOs (AA9), mientras que algunos otros en la explotación de la materia orgánica del suelo. CE10 es una familia CAZy poco estudiada y con características enzimáticas que la hacen interesante para su estudio desde la perspectiva de las simbiosis fúngicas, sin embargo ha pasado desapercibida.

La segunda subfamilia CAZy mejor representada en los genomas de *Laccaria* es la actividad auxiliar AA3_2, aunque en comparación con sus parientes saprobios está reducida a un tercio (*Laccaria* = 12 ± 4 , Psathyrellaceae 34 ± 11 genes) cabe destacar que homodimeros de este dominio fueron detectados en *L. trichodermorphora* y no en sus congéneres. De manera general, las enzimas CAZy con actividades auxiliares son familias de proteínas catalíticas que están implicadas en la degradación de las paredes celulares vegetales gracias a su capacidad de ayudar a otras enzimas (GH, PL y CE) a acceder a los carbohidratos que la componen. Particularmente, en AA3_2 se encuentran oxidorreductasas de alcohol arílico (AAO), glucosa oxidasas (GOX) o glucosa deshidrogenasas (GDH) y piranosa deshidrogenasas (PDH). Las AAO son secretadas por hongos Basidiomycetes, particularmente saprobios de pudrición blanca y descomponedores del mantillo, ya que están involucradas en la degradación de la lignina. Los principales sustratos de las AAO son alcoholes bencílicos secretados del metabolismo secundario, o alcoholes relacionados que se acumulan durante la degradación de la lignina. Durante la reacción de oxidación se forma peróxido de hidrógeno, esencial para la actividad de las peroxidasas degradadoras de lignina. Por su parte GOX y GDH catalizan la oxidación de β -D-glucosa hacia D-glucano-1,5-lactona selectivamente. Ambas enzimas son estructuralmente similares y difíciles de discriminar por su secuencia. Las GOX reducen el oxígeno a peróxido, mientras que las GDH prefieren quinonas o fenoxi-radicales sobre el oxígeno, como aceptores de iones (CAZypedia Consortium, 2018). A estas enzimas fúngicas se les ha atribuido la neutralización de la actividad de la laccasa de la planta durante la colonización de los tejidos vegetales por parte de hongos patógenos (Sygmund *et al.* 2011). Simultáneamente, PDHs catalizan oxidaciones y di-oxidaciones, y se caracterizan por su alta promiscuidad en cuanto a sustratos mono-, oligo- y polisacáridos. Se detectó su sobre expresión en el micelio de *Laccaria* cultivado en condiciones pobres de nitrógeno, por lo que estas funciones podrían ser parte de la oxidación de compuestos

recalcitrantes del suelo, en la búsqueda de nitrógeno que se les ha atribuido a los HEM (Nicolás *et al.* 2019).

La familia GH18 agrupa glicosil hidrolasas con actividades catalíticas tanto quitinasas como endo- β -N-acetilglucosaminidasas. Pueden ser endo-quitinasas no procesivas o endo/ecto procesivas, que producen quitobiosa, o productos más largos, pero no actúan sobre trímeros o tetrámeros (Davies *et al.* 2013). Así que estas enzimas CAZy participan en la síntesis, degradación y remodelación de la propia pared hifal e incluso podrían participar en el antagonismo y depredación que *Laccaria* ejerce en contra de otros hongos micotróficos como especies de *Trichoderma* (Werner *et al.* 2002).

Otra glicosil hidrolasa, esta vez en la familia GH47, se detectó entre las enzimas CAZy más numerosas del género. Son exo- α -1,2-mannosidasas de clase 1, localizadas en retículo endoplásmico y dictiosoma participantes en la maduración de las glicoproteínas, por lo que se consideran de metabolismo central (Williams y Williams 2015).

Las GHs miembros de la familia 16 tienen actividad en los enlaces glicosídicos β -1,4 o β -1,3 en varios glucanos y galactanos, algunos con actividad transglicosilasa como xiloglicosil transferasas o enzimas de reticulación de quitina/beta-glucano (CAZypedia Consortium, 2018). La abundancia de estos genes en los genomas de *Laccaria* los hacen candidatos a una profunda exploración. El gran tamaño y diversidad funcional de la familia GH16 hace retador su estudio, aunque recientemente fue propuesta una clasificación robusta y más detallada (Viborg *et al.* 2019). En *L. bicolor* las numerosas GH16 se consideran implicadas en la remodelación, tanto de la pared vegetal como de la pared fúngica (particularmente sobre β -glucanos), y se detectó su sobre expresión en el micelio de vida libre (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Así mismo, estas enzimas podrían ser responsables de características nutraceuticas y/o inmunopotenciadoras de los esporomas de este género de hongos comestibles silvestres.

Las especies de *Laccaria* codificaron 10 ± 3 genes de GH5_9, mientras que solo 2 o 3 genes para las otras funciones de la familia GH5 (GH5_12, GH5_15, GH5_30 o GH5_50). A diferencia de muchas CAZy, el contenido de GH5_9 en *Laccaria* no es muy

distinto al de Psathyrellaceae (12 ± 3), aunque la diversidad funcional de GH5 en Psathyrellaceae asciende a 16 sub-familias. GH5 es una de las familias de glicosil hidrolasas más grandes, son también conocidas como la familia celulasa A y contiene enzimas de actividad sobre pared vegetal y fúngica. GH5_9 son enzimas modificadoras de la pared celular fúngica. Esta subfamilia sólo contiene enzimas fúngicas secretadas o ancladas a la membrana (CAZypedia Consortium, 2018). En ascomycetes han sido identificadas como exo- β -1,3-glucanasas modificadoras de pared celular fúngica (Koseki *et al.* 2018) y productoras de material de la pared (Aspeborg *et al.* 2012). Sin embargo, a estas enzimas se les ha atribuido participación en la colonización de tejidos vegetales por parte de hongos endófitos (Bhatnagar *et al.* 2018; Ehsan *et al.* 2020).

Dentro de la familia GH5, el único representante de la sub-familia GH5_5 se asume como la única enzima de actividad directa sobre celulosa en el genoma de *L. bicolor* S238N-H82, esta se encuentra asociada a un, también único, módulo de unión a carbohidrato de la familia CBM1 (Martin *et al.* 2008). Dicho complejo presentó expresión en la ectomicorriza, se predijo como secretado y su relación filogenética con las GH5_5 fúngicas fue analizada (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Posteriormente se demostró que la expresión, de la llamada LbGH5-CBM1, está inducida en la ectomicorriza, que tiene su mayor actividad sobre celulosa y galactomananos, pero no sobre pared fúngica y que su localización es la periferia de las hifas que forman la red de Hartig y el manto (Zhang *et al.* 2018a). En este trabajo detectamos al homólogo de LbGH5-CBM1 asignado a la subfamilia GH5_5 y asociado a CMB1 en los genomas de las dos cepas de *L. bicolor* pero solo en la cepa CA15-F10 de *L. trichodermophora*, pero no en *L. amethystina* ni en las otras cepas de *L. trichodermophora*. Recientemente se comprobó la infectividad de las cuatro cepas de *L. trichodermophora* y se detectó que solo la cepa CA15-F10 fue capaz de desarrollar ectomicorrizas maduras, mientras que las otras tres cepas colonizaron las raíces de *Pinus montezumae* desarrollando estructuras incompletas y poco numerosas (Flores-Almaraz, 2020). Cabe destacar que solo con DIAMOND o HotPep se detectó esta proteína con todos sus dominios (ver: /C3/out/dbCAN/*overview.txt en el repositorio de GitHub) mientras que con HMMer solo se detectaron los dominios GH5_5 (Figura 4).

GH79 es una familia de β -glucuronidasas con actividad sobre arabinogalactanos protéicos, un componente de la pared celular vegetal que en la raíz se han relacionado con la regulación de la colonización por patógenos y mutualistas (Nguema-Ona *et al.* 2013). Las funciones GH79 son típicamente más abundantes en Ascomycetes (Zhao *et al.* 2014) y les da mayores capacidades saprobias y preferencias particulares por sustrato a hongos formadores de micorriza ericoide (Martino *et al.* 2018). Los genomas de *Laccaria* promediaron solo un poco más genes de esta familia que los de Psathyrellaceae (9 ± 3 vs 7 ± 3). La presencia de GH79 en el genoma de *L. bicolor* S238N-H82 fue interpretada como una capacidad para degradar oligosacáridos animales o bacterianos (Martin *et al.* 2008) particularmente los miembros de esta familia subexpresados en la ectomicorriza se les atribuye actividad en la defensa contra bacterias patógenas, al igual que en el genoma de *Russula griseocarnosa* (Yu *et al.* 2020). La expresión de estas enzimas se relacionó con el enriquecimiento de biomasa bacteriana en la materia orgánica del suelo en experimentos metagenómicos (López-Mondéjar *et al.* 2020). Al mismo tiempo, varios genes GH79 presentan péptidos señal o anclajes glicosilfosfatidilinositol, lo que es característico de enzimas de actividad en la pared fúngica (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Algunos miembros de esta familia fueron sobre expresados en la ectomicorriza de *L. bicolor* S238N-H82, por lo que se sugiere que estos genes GH79, mediante la hidrolización del arabinogalactano protéico, pueden estar implicados en la comunicación entre las células fúngicas y las células de la raíz (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). En las ectomicorrizas de *Hebeloma cylindrosporum* y *Pinus pinaster* también se detectaron GH79 sobreexpresadas (Doré *et al.* 2015), mientras que en las de *Pisolithus microcarpus* y *Eucalyptus grandis* sus β -glucuronidasas GH79 estuvieron subexpresadas (Plett *et al.* 2020). Así que esta es una de las familias CAZy para las que sí se cuenta con información transcriptómica y proteómica de la simbiosis, lo que permite suponer que algunas enzimas de esta familia participan en la colonización y la organogénesis mientras que otras en la protección contra patógenos bacterianos o el forrajeo en busca de fuentes carbonadas y nitrogenadas en forma de microartrópodos, nemátodos, necromasa y otros hongos del suelo (Perez-Moreno y Read, 2001).

En los genomas de *Laccaria* se detectó un número considerablemente alto de los genes GT2_Chitin_synth_2. Estos genes están presentes en prácticamente todos los hongos (Zhao *et al.* 2013), dado que la quitina es el principal componente de la pared celular fúngica. Expansiones de estos genes fueron detectadas en *L. bicolor* S238N-H82 (Veneault-Fourrey *et al.* 2014), aunque al comparar los contenidos de estos genes en el género *Laccaria* con sus relativos saprobios se presentaron valores similares (8 ± 2 vs 7 ± 3). Este tipo de genes son abundantes en hongos patógenos dimórficos (Prakash *et al.* 2020) y en hongos micorrízico arbusculares como *Gigaspora margarita* (38 genes, Venice *et al.* 2020). De entre las enzimas CAZy sobre expresadas durante la infección de *Colletotrichum lupini*, GT2 fue la única que no estuvo relacionada con la degradación de la pared vegetal, principalmente en estados avanzados de la infección, por lo que no se interpretó como relacionada con la formación del apresorio (Dubrulle *et al.* 2020). Las actividades potencialmente simbióticas de las sintetasas de quitina son proteger la pared celular fúngica de la acción de la quitinasa de la planta y evadir la detección y consecuente activación de su respuesta inmune, en ambos casos a través de la desacetilación de su quitina a quitosano, sin embargo esta reacción química recae principalmente en enzimas de la familia CE4 por su actividad desacetilasa (Merzendorfer, 2011; Veneault-Fourrey *et al.* 2014) por lo que GT2 más bien podría estar involucrada en la plasticidad de las paredes de la red de Hartig.

Otra glicosil transferasa, esta vez de la familia GT90 fue numerosa en los genomas de *Laccaria*, un poco más que en los de Psathyrellaceae (8 ± 3 vs 6 ± 2). Estas enzimas son xilosiltransferasas y glucosiltransferasas participantes en la síntesis de UDP-xilosa y UDP-glucosa (CAZypedia Consortium, 2018). GT90 se detectó como activa de manera intracelular en el genoma del micorrízico ericoide *Cairneyella variabilis* (Midgley *et al.* 2016) y su expresión aumentó durante la simbiosis entre *Cenococcum geophilum* con *Pinus sylvestris* pero no con *Populus tremula* × *Populus alba* (de Freitas Pereira *et al.* 2018). Es muy numerosa en el genoma de la levadura endófito *Rhodotorula mucilaginosa* (Sen *et al.* 2019), aunque su actividad en las levaduras patógenicas *Cryptococcus neoformans* se ha asociado a la formación de la cápsula, la cual es su principal factor de virulencia. La cápsula está formada de glucuronoxilomananos y galactoxilomananos, y tiene la función del “camuflaje molecular” (Griffith *et al.* 2004;

Muszevska *et al.* 2018). Tanto GT90 como GT2 son las principales funciones GT en los genomas de Basidiomycetes saprobios basales (Aliyu *et al.* 2020). Por lo tanto, de haber relación de estas funciones con la biología de la simbiosis ectomicorrízica en *Laccaria*, deberá estar asociada a genes particulares, potencialmente involucrada en la evasión de la respuesta inmune vegetal.

En la familia AA1_1 se encuentran laccasas, oxidoreductasas y oxigenasas multicobre con participación en la degradación de lignina. Aunque en *Laccaria* esta función CAZy es una de las 10 más representadas (7 ± 2) es considerablemente menos numerosa que en Psathyrellaceae (16 ± 6), sin embargo, *L. trichodermophora* presentó genes con doble dominio activo. El hongo micorrízico arbuscular *G. margarita* presenta expandida la familia AA1, la expresa y secreta de manera abundante en simbiosis, particularmente cuando el hongo contiene bacterias endosimbióticas, lo que se ha interpretado como un mecanismo de colonización de la raíz (Venice *et al.* 2020). El hongo ectomicorrízico *Paxillus involutus* expresa AA1_1 en el suelo, en condiciones experimentales de baja disponibilidad de carbono, pero no a baja disponibilidad de nitrógeno. Al mismo tiempo, tanto *P. involutus* como *L. bicolor* expresan otras laccasas (AA1 no clasificadas a subfamilia) en condiciones de poco nitrógeno y en coordinación con peptidasas y transportadores de nitrógeno (Nicolás *et al.* 2019). En este trabajo solo se detectaron AA1_1 y AA1_2 en los genomas de *Laccaria*, pero la función AA1_2 solo presentó de 1 a 3 genes en cada genoma. Los hongos formadores de micorriza ericoide presentan un número considerablemente más grande de estos genes en comparación con los hongos ectomicorrízicos e incluso más grandes que la de los saprobios. La mayoría de las laccasas y oxigenasas multicobre de *Laccaria* son homologas a las de *C. cinerea*, algunas se expresan en la ectomicorriza, otras en el micelio y otras en el basidioma (Courty *et al.* 2009), por lo que las potenciales funciones simbióticas no están distribuidas a lo ancho de esta familia CAZy.

3.4.3 Las funciones CAZy de *Laccaria trichodermophora*

Al contrario de lo esperado, la especie *L. trichodermophora* no presentó un número considerablemente menor de enzimas CAZy en sus genomas en comparación con las especies generalistas de *Laccaria*, aunque de manera individual la mayoría de las

cepas de *L. trichodermophora* sí presentaron menos enzimas CAZy que cualquiera de las cepas de *L. bicolor*, aunque más que la cepa de *L. amethystina* (Figura 5). Es así que se asume que el número total de genes codificantes para enzimas CAZy, considerando todas las sub-familias enzimáticas, no se relaciona con la preferencia por hospedero en este género ectomicorrízico, por lo que, de existir esta relación, deberá estar en la presencia, tamaño o identidad de sub-familias particulares.

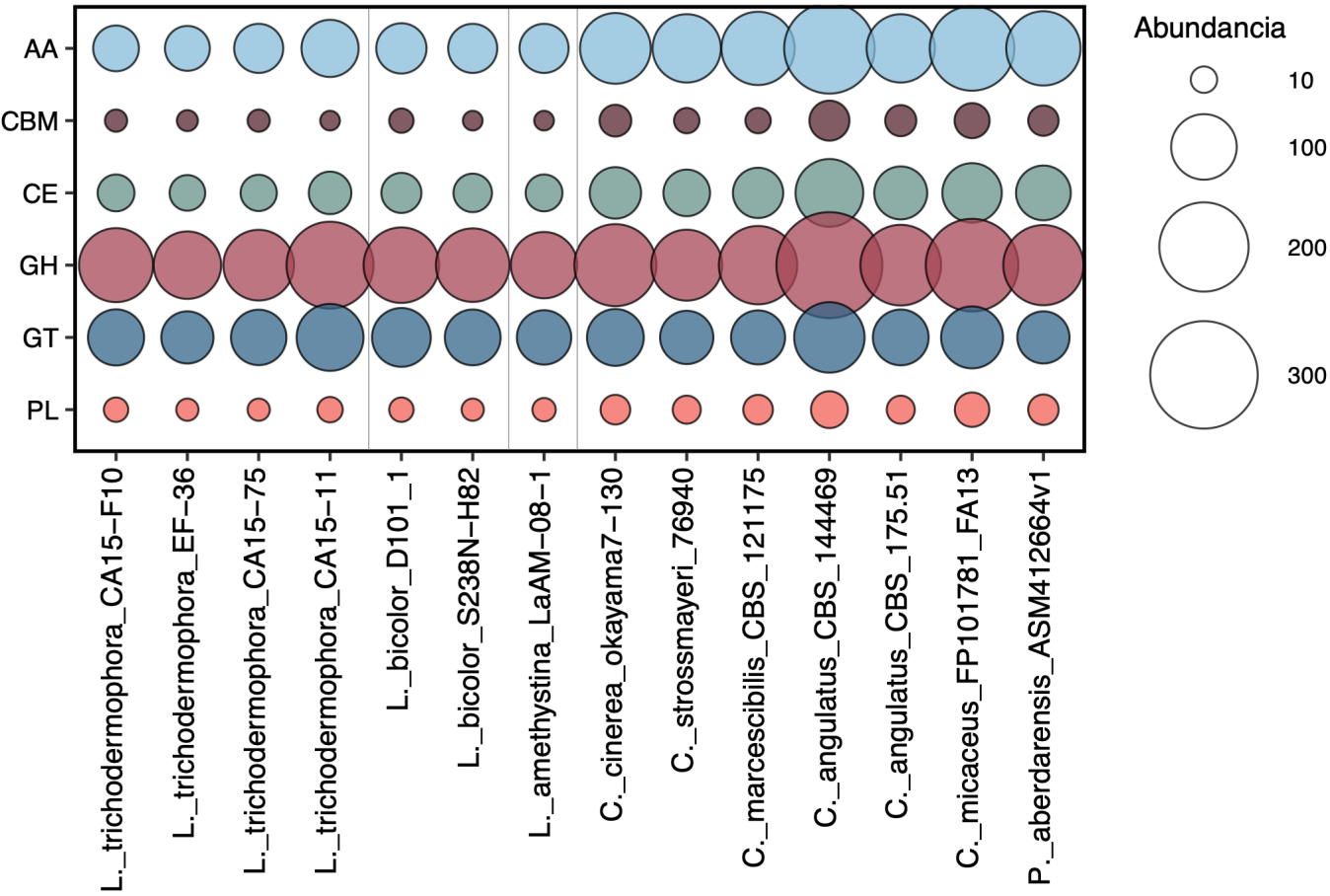


Figura 5. Comparación de la abundancia de genes codificantes para las seis súper-familias de enzimas CAZy en los genomas de *Laccaria* y sus parientes saprobios en Psathyrellaceae. El tamaño de la burbuja representa el número de genes.

Fueron pocos los genes CAZy exclusivos de *L. trichodermophora*: AA1_1+AA1_1 (lacasas), AA3_2+AA3_2 (celobiosa deshidrogenasa), GH13_1+GH13_1 (amilasas), GH13_31, GH13_8+GH13_8 (amilasas), todos compuestos por homodímeros de funciones compartidas con otras especie de *Laccaria* analizadas e incluso con Psathyrellaceae. Genes con múltiples dominios catalíticos de la misma función incrementan la potencia enzimática, por lo que la multiplicación de estos dominios podría traducirse en mayor afinidad por sustrato y velocidad de reacción.

Al comparar entre cepas de *L. trichodermophora* se encontraron pocas funciones CAZy restringidas a una sola cepa. La cepa CA15-11 presentó un número de enzimas CAZy alrededor de un tercio mayor al del resto de las muestras de *L. trichodermophora*. Esta cepa fue secuenciada y ensamblada con datos de segunda y tercera generación de secuenciación, y su genoma y exoma también presentaron un tamaño mayor al resto de las muestras. Sin embargo, aunque el genoma de EF-36 fue generado mediante los mismos protocolos y tipo de datos, su genoma, exoma y CAZoma no son mayores a los del resto de las muestras (Tabla 2). A pesar del alto número de enzimas CAZy de la cepa CA15-11, no se detectaron diferencias relevantes en su diversidad funcional (Figura 4). Las únicas seis enzimas CAZy restringidas a la cepa CA15-11 fueron AA1_1+AA1_1, AA3, AA3_2+AA3_2, GH13, GH13_1+GH13_1 y GH13_31. De estas, todas las funciones de doble dominio fueron también detectadas con dominio simple en las demás muestras. Las enzimas AA3 son celobiosa deshidrogenasas, no se detectaron en las otras muestras de *L. trichodermophora* ni en *L. bicolor* pero sí en *L. amethystina* (tres genes). Las enzimas GH13 son amilasas, solo se presentó una copia en *L. trichodermophora* CA15-11, una en *L. bicolor* D101-1 y una en *P. aberdarensis*. Mientras que las amilasas asignadas a la subfamilia GH13_31 no se encontraron en ninguna de las muestras analizadas a excepción de CA15-11.

Las funciones exclusivas de CA15-75 fueron: β -galactosidasa de GH2 compartidas con todas las muestras excepto con las otras cepas de *L. trichodermophora*; endo- β -N-

acetylglucosaminidasas de GH85 también compartidas con todas las muestras excepto con las otras cepas de *L. trichodermophora* ni con *L. bicolor* S238N-H82; y β -galactosyltransferasas de GT28 detectadas solo en *L. bicolor* y *Coprinopsis*.

Las únicas dos funciones CAZy restringidas a CA15-F10 fueron GH5_5, una celulasa simbiótica sobre la que ya se discutió su potencial relación con capacidades infectivas de esta cepa; y GH25 una lisozima compartida con *L. bicolor* D101-1. La familia de GH25 son lisozimas conocidas como del tipo de *Chalaropsis*, por haber sido descubiertas en dicho hongo (Hash *et al.* 1967), aunque se han encontrado con mayor frecuencia en bacterias y bacteriófagos (Taylor y Davies, 2011). Estas enzimas típicamente escinden en el enlace glicosídico β -1,4, entre ácido N-acetilmurámico y al N-acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Esta enzima se ha reportado acompañada de un motivo de secreción, por lo que se le atribuye una posición extracelular (Taylor y Davies, 2011). Por consiguiente, funciones relacionadas con actividad antibacteriana o con el acceso a nutrientes propios de las paredes bacterianas o sus contenidos celulares. Enzimas CAZy de la familia GH25 han sido detectadas en más de 40 genomas de hongos (Zhao *et al.* 2014). Las GH25 caracterizadas muestran baja identidad (18-51%), pero son muy conservadas en su dominio funcional, en contraste, los residuos de asociación al sustrato no son conservados (Korczynska *et al.* 2010). GH25 como función exclusiva de *L. trichodermophora* CA15-F10 no es un resultado robusto, pues esta lisozima ha sido detectada en el transcriptoma y secretoma de *L. bicolor* S238N-H82 en estudios previos (Vincent *et al.* 2012) y se sobre expresa en la ectomicorriza. En *H. cylindrosporum* es sobre expresada un poco en la micorriza *in vitro* pero mucho más en la ectomicorriza en vivero (Doré *et al.* 2015) donde se espera una mayor y más compleja diversidad microbiana. Estas lisozimas podrían ser exploradas biotecnológicamente como antimicrobianos alternativos.

Un hallazgo interesante, fue la ausencia de genes codificantes para glucosidasas de la familia GH152 en todos los genomas de *L. trichodermophora*, mientras que estuvieron presentes en todos los genomas de la especie hermana *L. bicolor* y en la mayoría de los saprobios cercanos. En plantas estas enzimas son comunes, conocidas como

“thaumatin-like”, presentan actividad de unión a la calosa (Li *et al.* 2020; Trudel *et al.* 1998), un componente efímero de la pared celular vegetal, típicamente encontrado en células crecientes, dañadas o bajo estrés biótico. En *Populus trichocarpa* su expresión fue abundante en el floema y en las zonas de expansión radial del cámbium (Kumar *et al.* 2019), lo que confirma su participación en el metabolismo de la calosa en tejidos en desarrollo. Cepas de *Pleurotus* mutantes en factores transcripcionales relacionados a la pudrición blanca mostraron una baja en la expresión de varias de sus GH152 (Wu *et al.* 2020), lo que hace evidente la participación de estas enzimas en la actividad saprobia en hongos de esa naturaleza. Enzimas GH152 de *Lentinula edodes*, un patógeno de encinos, demostraron actividad endo-1,3- β -D-glucosidasa y degradación de lentinanos (β -glucanos) de la propia pared fúngica (Sakamoto *et al.* 2006) lo que respalda la participación de enzimas vegetales de esta familia como parte de la respuesta inmune antifúngica, aunque también se les pueden atribuir el papel de disimular la pared celular fúngica durante la infección. En contraste, y a pesar de que los β -glucanos son integrales de pared en prácticamente todos los hongos, no todos los hongos codifican GH152 (Blatzer *et al.* 2020), y en contra de lo esperado, no se encontraron estas enzimas en el repertorio de glucosidasa usadas por bacterias que se alimentan de biomasa fúngica (Starke *et al.* 2020). La familia GH152 fue recientemente incorporada a la base de datos CAZy (Garron *et al.* 2019), lo que podría explicar que no se mencione en los estudios enfocados a enzimas CAZy en la simbiosis de *L. bicolor* (ej. Veneault-Fourrey *et al.* 2014) sin embargo, la afinidad molecular y su participación fisiológica en la organogénesis y la interacción planta-hongo, en otros modelos, hacen a GH152 un candidato para descartar su participación como uno de los genes simbióticos.

Del mismo modo, ortólogos de genes codificantes para enzimas CAZy de las familias GH28 y GH16 fueron detectados como ausentes en los genomas de *L. trichodermorphora* pero presentes en otras muestras de *Laccaria*. Ya se mencionó que algunas de las poligalacturonasas GH28 de *L. bicolor* S238N-H82 se detectaron sobre expresadas en su ectomicorriza madura o temprana con *P. trichocarpa*, a lo que los autores llamaron “remodelación suave (de la pared celular vegetal) a través de la hidrólisis de la pectina (homogalacturonano)” (Veneault-Fourrey *et al.* 2014).

Poligalacturonasas GH28 son parte del llamado “regulón estable”, un grupo de genes que se expresan a niveles homogéneamente altos a través del desarrollo de la ectomicorriza tanto en *P. trichocarpa* como en *Pseudotsuga menziesii* (Plett *et al.* 2015). Poligalacturonasas GH28 están incluidas entre las funciones CAZy remanentes de ancestros saprobios pero neofuncionalizadas a la remodelación de la raíz para la penetración de la lamina media y la colonización de los espacios intercelulares por la red de Hartig, no solo por *L. bicolor* (Kohler *et al.* 2015; Martin *et al.* 2008) si no también por otros Basidiomycetes (Doré *et al.* 2015) y Pezizomycetes (Martin *et al.* 2010; Murat *et al.* 2018). Es decir, la ausencia de este gene, de ser ortólogo a GH28 de *L. bicolor* S238N-H82 definitivamente impacta en la actividad simbiótica de *L. trichodermophora*.

Es imprescindible mencionar que, como en el caso de la glucosiltransferasa de xilano (GH16) laccasas (AA1_1) o NADPH: p-benzoquinona oxidorreductasa (AA6), no todos los genes anotados con una función CAZy particular estuvieron agrupados en un solo grupo de ortólogos, es así que en este análisis las cepas de *L. bicolor* presentaron dos o tres genes de GH28, los saprobios hasta nueve, y las cepas CA15-11 y CA15-F10 de *L. trichodermophora* presentaron un gene. Cabe reiterar que de entre las cuatro cepas estudiadas, CA15-F10 fue la única que generó ectomicorrizas maduras en las raíces de su hospedero (Flores-Almaraz, 2020).

En la batería genética codificante para enzimas CAZy del género *Laccaria* se detectó evidencia de su estilo de vida ectomicorrízico, al compararla con sus parientes saprobios asimbióticos. Las endo- α -mananasas (GH76), sintetisas de quitina (GT2) y glicosil transferasas (GT90), mediante la remodelación de pared fúngica, despliegan un “camuflaje molecular” que le permite a *Laccaria* soportar y evadir la respuesta inmune del hospedero e incluso inhibirla mediante oxidorreductasas (AA3_2). Metilesterasas (CE8) y endo- β -1,4-glucanasas (GH12) propician de la penetración de la hifa en el espacio apoplástico y permiten el relajamiento de la pared celular vegetal. Quitinasas (GH18) participan en el antagonismo y depredación que *Laccaria* ejerce en contra de otros hongos micotróficos de la rizósfera. Incluso, fueron detectadas enzimas involucradas en características nutraceuticas del género (GH16). Mientras que β -glucuronidasas (GH79) y otras enzimas CAZy parecen pelear dos frentes al participar

en la colonización y organogénesis de la ectomicorriza con algunos de sus miembros y en la explotación de nutrientes del suelo con otros, principalmente en la búsqueda y transporte de compuestos nitrogenados. No se detectaron funciones exclusivas en *L. trichodermorphora*, aunque al comparar el estrato accesorio de los genomas de las especies de *Laccaria*, la ausencia de ortólogos de poligalacturonasas (GH28) en varias cepas compromete su capacidad simbiótica, particularmente la cepa CA15-F10 fue la única para la que se pudo detectar el ortólogo de la endoglucanasa con modulo de unión LbGH5-CBM1, asignado a la subfamilia GH5_5, lo que podría explicar la pobre capacidad colonizadora detectada para el resto de las cepas (Flores-Almaraz, 2020).

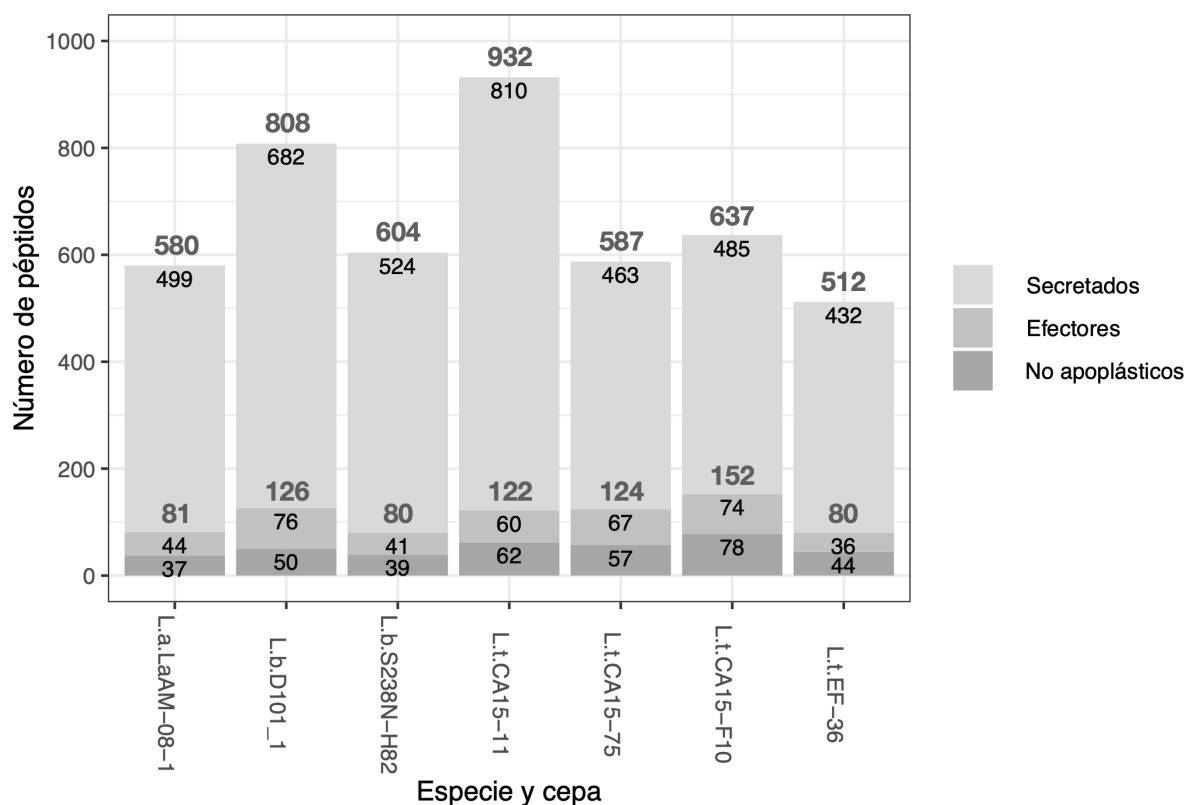
3.5 Los péptidos efectores de *Laccaria trichodermorphora*

El Género *Laccaria* codificó para 367 SSPs intracelulares en total (Figura 6), OrthoFinder asignó 252 genes (68.7%) a 62 grupos de ortólogos, lo que hace evidente el gran número de genes huérfanos (>30% de SSPs intracelulares del género) y/o la rápida tasa evolutiva que actúa sobre este tipo de genes. Solo 5 de estos grupos de ortólogos contó con genes representantes de todas las especies (Figura 6B) y 1 de estos estuvo enteramente compuesto por genes de copia única. *Laccaria trichodermorphora* codificó entre 932 (CA15-11) y 512 (EF-36) péptidos secretados, de los cuales entre 156 (CA15-F10) y 80 (EF-36) fueron predichos como péptidos efectores (SSPs). De entre estos, 78 (CA15-F10) y 44 (EF-36) son secretados al interior de la célula vegetal, estas cantidades fueron equiparables a las contenidas en los genomas de las otras especies de *Laccaria* (Figura 6).

Los SSPs intracelulares de *L. trichodermorphora* se agruparon en 58 grupos de ortólogos (solo 4 grupos de ortólogos menos que en el género), 9 de estos grupos se consideran parte del genoma *core* de la especie (5 de ellos son también parte del core de *Laccaria*) integrados por máximo 3 parálogos. La cepa CA15-F10 presentó 8 grupos de ortólogos de SSPs intracelulares únicos, mientras que el resto de las cepas presentaron 2 (Figura 7A). Además, entre 31 (CA15-F10) y 11 (EF-36) SSPs no fueron agrupadas y representan genes huérfanos. El alto contenido de SSPs intracelulares en

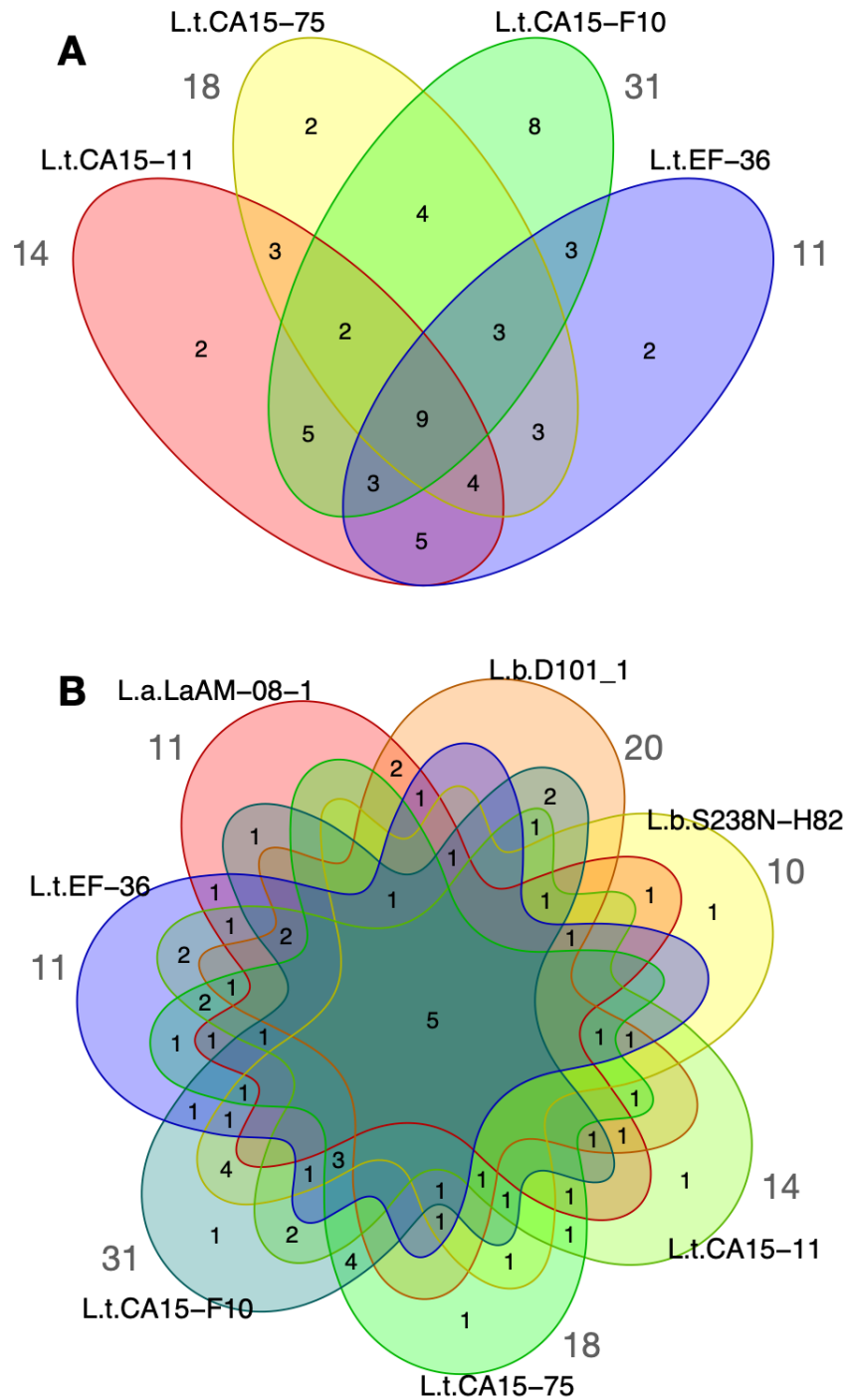
CA15-F10 podría estar relacionado con sus capacidades simbióticas superiores a las de las otras cepas de *L. trichodermophora*.

Figura 6. Comparación del contenido de péptidos secretados, efectores y péptidos efectores de localización no apoplástica en los genomas de *Laccaria*. Los números en gris sobre las barras indican el número total de péptidos secretados o de efectores, los números negro dentro de las barras indican el número de péptidos secretados o efectores excluyendo los efectores o no apoplásticos según el caso. En el eje X se



presentan las cepas de *Laccaria* con el género y especie abreviados.

Figura 7. Intersecciones entre los grupos de ortólogos de péptidos efectores no apoplásticos de **(A)** varias cepas de *L. trichodermophora* y **(B)** siete cepas de *Laccaria*. Los números grises fuera de los círculos representan la cantidad de genes no asignados a grupos de ortólogos. La ortología entre los péptidos fue detectada con OrthoFinder.



Dada la naturaleza no enzimática de este tipo de proteínas, no se cuenta con información que permita inferir su función. Es imprescindible destacar la dificultad de su predicción, no solo por los programas específicamente destinados a detectar el secretoma o los efectores, si no desde la predicción de los modelos génicos. En este trabajo, mediante tblastn, detectamos una o dos copias homólogas a MiSSP7 de *L. bicolor* en los ensamblajes genómicos de todas las muestras (Tabla 3), por el contrario este importante péptido no fue detectado (con blastp) en el grupo de péptidos efectores, ni en el secretoma, ni siquiera en el proteoma de ninguna de las muestras, lo que indica que nuestros protocolos de predicción de genes no fueron capaces de detectarlos.

4 Conclusiones

Se confirmó que a pesar de las diferencias genómicas entre las cepas de *L. trichodermophora*, todas estas formaron un grupo monofilético bien soportado, hermano a la especie *L. bicolor*. Al analizar los genomas de *L. trichodermophora* de manera pan-genómica se hizo evidente una estructura de pan-genoma abierto, con una gran cantidad de genes cepa específicos y un genoma core de alrededor de 6,756 grupos de genes ortólogos. El genoma accesorio comprendió entre el 18 y el 29% de los genes predichos. Se detectaron 549 grupos de ortólogos de *Laccaria* ausentes en *L. trichodermophora*, entre los cuales menos de la mitad tuvieron algún tipo de anotación funcional. La batería genética codificante para enzimas CAZy del *L. trichodermophora* es muy similar a la reportada para *L. bicolor* con genes simbióticos involucrados en la evasión y confrontación del sistema inmune vegetal, la colonización y organogénesis de la ectomicorriza, la competencia contra otros microorganismos rizosféricos y la explotación de la materia orgánica nitrogenada de difícil acceso en el suelo. Sin embargo varias cepas de *L. trichodermophora* no presentaron genes centrales en el desarrollo de la simbiosis, como es el caso de la poligalacturonasas GH28 y la endoglucanasa con modulo de unión a carbohidrato GH5_5-CBM1, ambas funciones presentes en la cepa CA15-10, lo que en conjunto con su elevada batería de SSPs intracelulares se relaciona con su mayor capacidad de colonización. Dada la

naturaleza de los análisis de genómica comparada, todos los hallazgos planteados demandan un respaldo experimental.

5 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN-210217. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada al primer autor, por la asesoría bioinformática a Diana Hernández Oaxaca, Alicia Mastretta Yañes y Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán, y al grupo UATI por la administración de los servidores del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, donde se realizaron todos los análisis.

6 Referencias

- Aliyu, H., Gorte, O., Zhou, X., Neumann, A., & Ochsenreither, K. (2020). In silico proteomic analysis provides insights into phylogenomics and plant biomass deconstruction potentials of the Tremelalles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 226.
- Ángeles-Argáiz, R. E., Carmona-Reyes, I. A., Quintero-Corrales, C. A., Medina-Macías, F. J., Blancas-Cabrera, A., Valdez-Cruz, N. A., ... & Garibay-Orijel, R. (2020). From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. *Fungal biology*, 124(3-4), 205-218.
- Ángeles-Argáiz, R., Aguirre-Beltrán, L. F. L., Quintero-Corrales, C. A., Trujillo-Roldán, M. A., Castillo-Ramírez, S., Garibay-Orijel, R. (en preparación). Long-read sequencing decompresses the genome assemblies of *Laccaria trichodermophora* strains (CA15-11, CA15-75, CA15-F10 and EF-36) and highlights intraspecific genome diversity. *Genomes, Genes and Genetics*.

- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37(4), 420-423.
- Arntzen, M. Ø., Bengtsson, O., Várnai, A., Delogu, F., Mathiesen, G., & Eijsink, V. G. (2020). Quantitative comparison of the biomass-degrading enzyme repertoires of five filamentous fungi. *Scientific reports*, 10(1), 1-17.
- Aspeborg, H., Coutinho, P. M., Wang, Y., Brumer, H., & Henrissat, B. (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC evolutionary biology*, 12(1), 186.
- Badet, T., Oggenfuss, U., Abraham, L., McDonald, B. A., & Croll, D. (2020). A 19-isolate reference-quality global pangenome for the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC biology*, 18(1), 1-18.
- Banks, A. M., Barker, G. L., Bailey, A. M., & Foster, G. D. (2017). Draft genome sequence of the coprinoid mushroom *Coprinopsis strossmayeri*. *Genome Announcements*, 5(14).
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R., & Rodrigues, M. L. (2004). Structure and biological functions of fungal cerebroside. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76(1), 67-84.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., ... & Studholme, D. J. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D138-D141.
- Bhatnagar, J. M., Sabat, G., & Cullen, D. (2018). The foliar endophyte *Phialocephala scopiformis* DAOMC 229536 secretes enzymes supporting growth on wood as sole carbon source. *BioRxiv*, 354365.
- Blatzer, M., Beauvais, A., Henrissat, B., & Latgé, J. P. (2020). Revisiting Old Questions and New Approaches to Investigate the Fungal Cell Wall Construction. *The Fungal Cell Wall: An Armour and a Weapon for Human Fungal Pathogens*, 331-369.

- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., ... & Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research*, 47(W1), W81-W87.
- Bourne, Y., Hasper, A. A., Chahinian, H., Juin, M., de Graaff, L. H., & Marchot, P. (2004). *Aspergillus niger* protein EstA defines a new class of fungal esterases within the α/β hydrolase fold superfamily of proteins. *Structure*, 12(4), 677-687.
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.
- CAZypedia Consortium. (2018). Ten years of CAZypedia: a living encyclopedia of carbohydrate-active enzymes. *Glycobiology*, 28(1), 3-8. from http://www.cazypedia.org/index.php?title=Main_Page&oldid=13510.
- Chen, E. C., Mathieu, S., Hoffrichter, A., Sedzielewska-Toro, K., Peart, M., Pelin, A., ... & Corradi, N. (2018). Single nucleus sequencing reveals evidence of inter-nucleus recombination in arbuscular mycorrhizal fungi. *Elife*, 7, e39813.
- Courty, P. E., Hoegger, P. J., Kilaru, S., Kohler, A., Buee, M., Garbaye, J., ... & Kües, U. (2009). Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 182(3), 736-750.
- Damásio, A. R., Rubio, M. V., Oliveira, L. C., Segato, F., Dias, B. A., Citadini, A. P., ... & Squina, F. M. (2014). Understanding the function of conserved variations in the catalytic loops of fungal glycoside hydrolase family 12. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8), 1494-1505.
- Davies G., Juge N, Eijsink V (2013). Glycoside Hydrolase Family 18. in CAZypedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- De Freitas Pereira, M., Veneault-Fourrey, C., Vion, P., Guinet, F., Morin, E., Barry, K. W., ... & Peter, M. (2018). Secretome analysis from the ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 141.

- Di Battista, C., Selosse, M. A., Bouchard, D., Stenström, E., & Le Tacon, F. (1996). Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycological Research*, 100(11), 1315-1324.
- Doré, J., Perraud, M., Dieryckx, C., Kohler, A., Morin, E., Henrissat, B., ... & Gay, G. (2015). Comparative genomics, proteomics and transcriptomics give new insight into the exoproteome of the basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* and its involvement in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 208(4), 1169-1187.
- Dubrulle, G., Picot, A., Madec, S., Corre, E., Pawtowski, A., Baroncelli, R., ... & Pensec, F. (2020). Deciphering the Infectious Process of *Colletotrichum lupini* in *Lupin* through Transcriptomic and Proteomic Analysis. *Microorganisms*, 8(10), 1621.
- Ehsan, T., Reza, R. N., Das, A., Ahmed, O., Baten, A. A., Ferdous, A. S., ... & Khan, H. (2020). Genome and secretome analysis of jute endophyte *Grammothele lineata* strain SDL-CO-2015-1: Insights into its lignocellulolytic structure and secondary metabolite profile. *Genomics*.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome biology*, 16(1), 1-14.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2017). STRIDE: species tree root inference from gene duplication events. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3267-3278.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2018). STAG: species tree inference from all genes. *BioRxiv*, 267914.
- Emms, D. M., & Kelly, S. (2019). OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome biology*, 20(1), 1-14.
- Espinoza, K., & Eyzaguirre, J. (2018). Identification, heterologous expression and characterization of a novel glycoside hydrolase family 30 xylanase from the fungus *Penicillium purpurogenum*. *Carbohydrate research*, 468, 45-50.

- Flores-Almaraz, V. (2020). Viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de *Laccaria trichodermophora*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 103 pp.
- Frith, M. C. (2011). A new repeat-masking method enables specific detection of homologous sequences. *Nucleic acids research*, 39(4), e23-e23.
- Garron, M. L., & Henrissat, B. (2019). The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current opinion in chemical biology*, 53, 82-87.
- Gazis, R., Kuo, A., Riley, R., LaButti, K., Lipzen, A., Lin, J., ... & Hibbett, D. S. (2016). The genome of *Xylona heveae* provides a window into fungal endophytism. *Fungal biology*, 120(1), 26-42.
- Gene Ontology Consortium. (2006). The gene ontology (GO) project in 2006. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D322-D326.
- González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Vinuesa, P., Juárez, S., ... & Romero, D. (2019). Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. *Frontiers in microbiology*, 10, 910.
- Gow, N. A., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *The fungal kingdom*, 267-292.
- Griffith, C. L., Klutts, J. S., Zhang, L., Levery, S. B., & Doering, T. L. (2004). UDP-glucose dehydrogenase plays multiple roles in the biology of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51669-51676.
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., ... & Smirnova, T. (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic acids research*, 42(D1), D699-D704.
- Hash, J. H., & Rothlauf, M. V. (1967). The N, O-Diacetylmuramidase of *Chalaropsis* Species I. purification and crystallization. *Journal of Biological Chemistry*, 242(23), 5586-5590.

- Hazard, C., Kruitbos, L., Davidson, H., Mbow, F. T., Taylor, A. F., & Johnson, D. (2017). Strain identity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* is more important than richness in regulating plant and fungal performance under nutrient rich conditions. *Frontiers in microbiology*, 8, 1874.
- Hortal, S., Plett, K. L., Plett, J. M., Cresswell, T., Johansen, M., Pendall, E., & Anderson, I. C. (2017). Role of plant–fungal nutrient trading and host control in determining the competitive success of ectomycorrhizal fungi. *The ISME journal*, 11(12), 2666-2676.
- Ibeas, J. I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D. T., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., ... & Narasimhan, M. L. (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *The Plant Journal*, 23(3), 375-383.
- Islam, M. S., Haque, M. S., Islam, M. M., Emdad, E. M., Halim, A., Hossen, Q. M. M., ... & Alam, M. (2012). Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. *BMC genomics*, 13(1), 1-16.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., ... & Pesseat, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W429-W432.
- Kang, H., Chen, X., Kemppainen, M., Pardo, A. G., Veneault-Fourrey, C., Kohler, A., & Martin, F. M. (2020). The small secreted effector protein MiSSP7. 6 of *Laccaria bicolor* is required for the establishment of ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology*, 22(4), 1435-1446.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.

- Katsimpouras, C., Dedes, G., Thomaidis, N. S., & Topakas, E. (2019). A novel fungal GH30 xylanase with xylobiohydrolase auxiliary activity. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 120.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., ... & Martin, F. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature genetics*, 47(4), 410-415.
- Kohler, A., & Martin, F. (2016). The evolution of the mycorrhizal lifestyles—a genomic perspective. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, 87-106.
- Korczynska, J. E., Danielsen, S., Schagerlöff, U., Turkenburg, J. P., Davies, G. J., Wilson, K. S., & Taylor, E. J. (2010). The structure of a family GH25 lysozyme from *Aspergillus fumigatus*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(9), 973-977.
- Korf, I. (2013). SNAP: Semi-HMM-based Nucleic Acid Parser. Ian Korf homepage: [http://homepage. mac. com/iankorf](http://homepage.mac.com/iankorf).
- Koseki, T., Ishikawa, M., Kawasaki, M., & Shiono, Y. (2018). β -Diglycosidases from microorganisms as industrial biocatalysts: biochemical characteristics and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(20), 8717-8723.
- Kumar, V., Hainaut, M., Delhomme, N., Mannapperuma, C., Immerzeel, P., Street, N. R., ... & Mellerowicz, E. J. (2019). Poplar carbohydrate-active enzymes: whole-genome annotation and functional analyses based on RNA expression data. *The Plant Journal*, 99(4), 589-609.
- Kuo, A., Kohler, A., Martin, F. M., & Grigoriev, I. V. (2014). Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in microbiology*, 5, 582.
- Li, Y. Q., Lei, L., Nong, X., Tang, H., & Luo, C. B. (2020). Plant carbohydrate-active enzymes in bamboo *Neosinocalamus affinis*: identification, classification and function in lignocellulose biosynthesis in herbivore defence. *Nordic Journal of Botany*, 38(3).

- López-Mondéjar, R., Tláskal, V., Větrovský, T., Štursová, M., Toscan, R., da Rocha, U. N., & Baldrian, P. (2020). Metagenomics and stable isotope probing reveal the complementary contribution of fungal and bacterial communities in the recycling of dead biomass in forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 148, 107875.
- Looi, H. K., Toh, Y. F., Yew, S. M., Na, S. L., Tan, Y. C., Chong, P. S., ... & Kuan, C. S. (2017). Genomic insight into pathogenicity of dematiaceous fungus *Corynespora cassiicola*. *PeerJ*, 5, e2841.
- Ludwig R. y Kracher D. (2018). Auxiliary Activity Family 3. in CAZypedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- McInerney, J. O., McNally, A., & O'connell, M. J. (2017). Why prokaryotes have pangenomes. *Nature microbiology*, 2(4), 1-5.
- Majoros, W. H., Pertea, M., & Salzberg, S. L. (2004). TigrScan and GlimmerHMM: two open source ab initio eukaryotic gene-finders. *Bioinformatics*, 20(16), 2878-2879.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., ... & Grigoriev, I. V. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452(7183), 88-92.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P. M., Jaillon, O., ... & Wincker, P. (2010). Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*, 464(7291), 1033-1038.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Veneault-Fourrey, C., & Hibbett, D. S. (2016). Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12), 760-773.
- Martino, E., Morin, E., Grelet, G. A., Kuo, A., Kohler, A., Daghino, S., ... & Perotto, S. (2018). Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*, 217(3), 1213-1229.
- McCarthy, C. G., & Fitzpatrick, D. A. (2019). Pan-genome analyses of model fungal species. *Microbial genomics*, 5(2).

- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *European journal of cell biology*, 90(9), 759-769.
- Midgley, D. J., Rosewarne, C. P., Greenfield, P., Li, D., Vockler, C. J., Hitchcock, C. J., ... & Tran-Dinh, N. (2016). Genomic insights into the carbohydrate catabolism of *Cairneyella variabilis* gen. nov. sp. nov., the first reports from a genome of an ericoid mycorrhizal fungus from the southern hemisphere. *Mycorrhiza*, 26(4), 345-352.
- Miyauchi, S., Kiss, E., Kuo, A., Drula, E., Kohler, A., Sánchez-García, M., ... & Martin, F. M. (2020). Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature communications*, 11(1), 1-17.
- Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 756.
- Montoya, A., Kong, A., Garibay-Orijel, R., Méndez-Espinoza, C., Tulloss, R. E., & Estrada-Torres, A. (2014). Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology*, 2014.
- Mueller, G. M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Mueller, G. M., & Strack, B. A. (1992). Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forests. Evidencia de un cambio de hospedero micorrízico durante la migración de *Laccaria trichodermophora* y otros agaricales dentro de bosques de robles neotropicales. *Mycotaxon.*, 45, 249-256.
- Murat, C., Payen, T., Noel, B., Kuo, A., Morin, E., Chen, J., ... & Martin, F. M. (2018). Pezizomycetes genomes reveal the molecular basis of ectomycorrhizal truffle lifestyle. *Nature ecology & evolution*, 2(12), 1956-1965.
- Muszevska, A., Piłsyk, S., Perlińska-Lenart, U., & Kruszevska, J. S. (2018). Diversity of cell wall related proteins in human pathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 4(1), 6.

- Nguema-Ona, E., Vitré-Gibouin, M., Cannesan, M. A., & Driouich, A. (2013). Arabinogalactan proteins in root–microbe interactions. *Trends in plant science*, 18(8), 440-449.
- Nicolás, C., Martin-Bertelsen, T., Floudas, D., Bentzer, J., Smits, M., Johansson, T., ... & Tunlid, A. (2019). The soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi are tuned for liberating soil organic nitrogen. *The ISME journal*, 13(4), 977-988.
- Oleas, G., Callegari, E., Sepúlveda, R., & Eyzaguirre, J. (2017). Heterologous expression, purification and characterization of three novel esterases secreted by the lignocellulolytic fungus *Penicillium purpurogenum* when grown on sugar beet pulp. *Carbohydrate research*, 443, 42-48.
- Osmundson, T. W., Cripps, C. L., & Mueller, G. M. (2005). Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. *Mycologia*, 97(5), 949-972.
- Palmer, J., Funannotate. <https://funannotate.readthedocs.io/en/latest/index.html>. Copyright 2017 Revision 05b18107.
- Pellegrin, C., Daguerre, Y., Ruytinx, J., Guinet, F., Kemppainen, M., Frey, N. F. D., ... & Veneault-Fourrey, C. (2019a). *Laccaria bicolor* MiSSP8 is a small-secreted protein decisive for the establishment of the ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology*, 21(10), 3765-3779.
- Pellegrin, C., Martin, F., & Veneault-Fourrey, C. (2019b). Molecular signalling during the ectomycorrhizal symbiosis. In *Biology of the Fungal Cell* (pp. 95-109). Springer, Cham.
- Pellitier, P. T., & Zak, D. R. (2018). Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: why evolutionary history matters. *New Phytologist*, 217(1), 68-73.

- Perez-Moreno, J., & Read, D. J. (2001). Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant, Cell & Environment*, 24(11), 1219-1226.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), 785.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., ... & Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8299-8304.
- Plett, J. M., Gibon, J., Kohler, A., Duffy, K., Hoegger, P. J., Velagapudi, R., ... & Martin, F. (2012). Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(3), 199-209.
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., ... & Martin, F. (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology*, 21(14), 1197-1203.
- Plett, K. L., Kohler, A., Lebel, T., Singan, V. R., Bauer, D., He, G., ... & Anderson, I. C. (2020). Intra-species genetic variability drives carbon metabolism and symbiotic host interactions in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Environmental Microbiology*.
- Plett, J. M., & Martin, F. M. (2018). Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *The Plant Journal*, 93(4), 729-746.
- Plett, J. M., & Martin, F. (2015). Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 45-50.

- Plett, J. M., & Martin, F. (2011). Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics*, 27(1), 14-22.
- Plett, J. M., Tisserant, E., Brun, A., Morin, E., Grigoriev, I. V., Kuo, A., ... & Kohler, A. (2015). The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 261-273.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., ... & Balesdent, M. H. (2016). A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209(4), 1613-1624.
- Plissonneau, C., Hartmann, F. E., & Croll, D. (2018). Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC biology*, 16(1), 1-16.
- Prakash, H., Karuppiyah, P., AAl-Dhabi, N., Prasad, G. S., Badapanda, C., Chakrabarti, A., & Rudramurthy, S. M. (2020). Comparative genomics of *Sporothrix* species and identification of putative pathogenic-gene determinants. *Future Microbiology*, 15(15), 1465-1481.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490.
- Quintero-Corrales, C., Ángeles-Argáiz, R., Jaramillo-Correa, J. P., Piñero, D., Garibay-Orijel, R., & Mastretta-Yanes, A. (2020). Allopatric instead of parapatric divergence in an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria trichodermophora*) in tropical sky-islands. *Fungal Ecology*, 47, 100966.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v1. 4.
- Ramos, A., Bandala, V. M., & Montoya, L. (2017). A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycoKeys*, (27), 77.

- Rao, S., & Nandineni, M. R. (2017). Genome sequencing and comparative genomics reveal a repertoire of putative pathogenicity genes in chilli anthracnose fungus *Colletotrichum truncatum*. PLoS One, 12(8), e0183567.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. Nucleic acids research, 38(suppl_1), D227-D233.
- Reverchon, F., del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Pérez-Moreno, J. (2012). Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. Mycoscience, 53(3), 203-210.
- Rocafort, M., Fudal, I., & Mesarich, C. H. (2020). Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. Current opinion in plant biology, 56, 9-19.
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. New microbes and new infections, 7, 72-85.
- Sakamoto, Y., Watanabe, H., Nagai, M., Nakade, K., Takahashi, M., & Sato, T. (2006). *Lentinula edodes* tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence. Plant physiology, 141(2), 793-801.
- Sen, D., Paul, K., Saha, C., Mukherjee, G., Nag, M., Ghosh, S., ... & Tripathy, S. (2019). A unique life-strategy of an endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a comparative genomics viewpoint. DNA Research, 26(2), 131-146.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics, 31(19), 3210-3212.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). Mycorrhizal symbiosis. Academic press.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018a). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. Molecular plant pathology, 19(9), 2094-2110.

- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018b). ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*, 217(4), 1764-1778.
- Stajich, J. E., Wilke, S. K., Ahrén, D., Au, C. H., Birren, B. W., Borodovsky, M., ... & Deng, J. (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11889-11894.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stanke, M., & Waack, S. (2003). Gene prediction with a hidden Markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics*, 19(suppl_2), ii215-ii225.
- Starke, R., Morais, D., Větrovský, T., Lopez Mondejar, R., Baldrian, P., & Brabcová, V. (2020). Feeding on fungi: genomic and proteomic analysis of the enzymatic machinery of bacteria decomposing fungal biomass. *Environmental Microbiology*, 22(11), 4604-4619.
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, 47, 233-263.
- Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Walker, A. W., Roehe, R., & Watson, M. (2019). Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. *Nature biotechnology*, 37(8), 953-961.
- Sygmund, C., Klausberger, M., Felice, A. K., & Ludwig, R. (2011). Reduction of quinones and phenoxy radicals by extracellular glucose dehydrogenase from *Glomerella cingulata* suggests a role in plant pathogenicity. *Microbiology*, 157(11), 3203-3212.
- Taylor, E and Davies, G. (2011). Glycoside Hydrolase Family 25. in CAZypedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.

- Tedersoo, L., & Brundrett, M. C. (2017). Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 407-467). Springer, Cham.
- Tedersoo, L., & Smith, M. E. (2017). Ectomycorrhizal fungal lineages: detection of four new groups and notes on consistent recognition of ectomycorrhizal taxa in high-throughput sequencing studies. In *Biogeography of mycorrhizal symbiosis* (pp. 125-142). Springer, Cham.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., ... & 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.
- Toro, K. S., & Brachmann, A. (2016). The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Bmc Genomics*, 17(1), 1-13.
- Trudel, J., Grenier, J., Potvin, C., & Asselin, A. (1998). Several thaumatin-like proteins bind to β -1, 3-glucans. *Plant physiology*, 118(4), 1431-1438.
- UniProt Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research*, 47(D1), D506-D515.
- Van Dongen S. Graph clustering by flow simulation (2000). PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands.
- Varga, T., Krizsán, K., Földi, C., Dima, B., Sánchez-García, M., Sánchez-Ramírez, S., ... & Andreopoulos, W. (2019). Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution. *Nature ecology & evolution*, 3(4), 668-678.
- Veneault-Fourrey, C., Commun, C., Kohler, A., Morin, E., Balestrini, R., Plett, J., ... & Martin, F. (2014). Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 168-181.
- Venice, F., Ghignone, S., Salvioli di Fossalunga, A., Amselem, J., Novero, M., Xianan, X., ... & Bonfante, P. (2020). At the nexus of three kingdoms: the genome of the

- mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* provides insights into plant, endobacterial and fungal interactions. *Environmental microbiology*, 22(1), 122-141.
- Viborg, A. H., Terrapon, N., Lombard, V., Michel, G., Czjzek, M., Henrissat, B., & Brumer, H. (2019). A subfamily roadmap of the evolutionarily diverse glycoside hydrolase family 16 (GH16). *Journal of Biological Chemistry*, 294(44), 15973-15986.
- Vincent, D., Kohler, A., Claverol, S., Solier, E., Joets, J., Gibon, J., ... & Martin, F. (2012). Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Journal of proteome research*, 11(1), 157-171.
- de Vries, S., & de Vries, J. (2020). A Global Survey of Carbohydrate Esterase Families 1 and 10 in Oomycetes. *Frontiers in genetics*, 11, 756.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G. I. I., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., ... & Blattner, F. R. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 17020-17024.
- Werner, A., Zadworny, M., & Idzikowska, K. (2002). Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* grown in vitro. *Mycorrhiza*, 12(3), 139-145.
- Wheeler, T. J., & Eddy, S. R. (2013). nhmmer: DNA homology search with profile HMMs. *Bioinformatics*, 29(19), 2487-2489.
- Williams R y Williams S (2015). Glycoside Hydrolase Family 47. en CAZypedia, available at URL <http://www.cazy.org/GH25.html>.
- Wilson, A. W., Hosaka, K., & Mueller, G. M. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213(4), 1862-1873.
- Wolfe, B. E., Tulloss, R. E., & Pringle, A. (2012). The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *PloS one*, 7(7), e39597.

- Wu, H., Nakazawa, T., Takenaka, A., Kodera, R., Morimoto, R., Sakamoto, M., & Honda, Y. (2020). Transcriptional shifts in delignification-defective mutants of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *FEBS letters*, 594(19), 3182-3199.
- Wyss, T., Masclaux, F. G., Rosikiewicz, P., Pagni, M., & Sanders, I. R. (2016). Population genomics reveals that within-fungus polymorphism is common and maintained in populations of the mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *The ISME journal*, 10(10), 2514-2526.
- Yu, F., Song, J., Liang, J., Wang, S., & Lu, J. (2020). Whole genome sequencing and genome annotation of the wild edible mushroom, *Russula griseocarnosa*. *Genomics*, 112(1), 603-614.
- Yuan, S., Wu, Y., & Cosgrove, D. J. (2001). A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant Physiology*, 127(1), 324-333.
- Zhang, F., Anasontzis, G. E., Labourel, A., Champion, C., Haon, M., Kemppainen, M., ... & Martin, F. (2018a). The ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* releases a secreted β -1, 4 endoglucanase that plays a key role in symbiosis development. *New Phytologist*, 220(4), 1309-1321.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... & Yin, Y. (2018b). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W95-W101.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., & Xu, J. R. (2014). Erratum to: comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC genomics*, 15(1), 6.