

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E Ambientali

Corso di Laurea magistrale in Scienze Agrarie e del Territorio

GENOMICA COMPARATIVA DEI PATOGENI FUNGINI MONILINIA FRUCTICOLA, MONILINIA LAXA E MONILINIA FRUCTIGENA, ASSOCIATI AL MARCIUME BRUNO DI POMACEE E DRUPACEE

COMPARATIVE GENOMICS OF MONILINIA FRUCTICOLA, MONILINIA LAXA AND MONILINIA FRUCTIGENA, CAUSAL AGENTS OF POME AND STONE FRUIT BROWN ROT

Studente: FABIO DI ROSA

Relatore: PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore: DOTT. LUCIA LANDI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

INDICE

RIASSUNTO
ABSTRACT
1 INTRODUZIONE
1.1 LA MONILIOSI
1.1.1 Le specie fungine agenti di moniliosi: inquadramento
SISTEMATICO DI MONILINIA SPP
1.1.2 Ospiti e distribuzione geografica 10
1.1.3 Monilinia fructicola: un patogeno da quarantena 11
1.1.4 Sintomatologia della moniliosi
1.1.5 Biologia ed epidemiologia14
1.2 GENOMICA COMPARATIVA 17
1.2.1 LA SINTENIA 19
1.2.2 Analisi delle sostituzioni sinonime e non sinonime
1.2.3 GLI ELEMENTI TRASPONIBILI
1.2.3.1 La classificazione dei TE 23
1.2.3.1.1 Classe I
1.2.3.1.1.1 Long terminal repeat
1.2.3.1.1.2 Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence (DIRS)
1.2.3.1.1.3 Penelope-Like Element (PLE)
1.2.3.1.1.4 Long Interspersed Nuclear Element e Short
Interspersed Nuclear Element (Non-LTR)
1.2.3.1.2 Classe II
1.2.3.1.2.1 Subclasse I: TIR e Crypton
1.2.3.1.2.2 Subclasse II: Helitron e Maverick
1.2.3.2 Meccanismi di trasposizione
1.2.3.2.1 I trasposoni con trasposasi-DDE
1.2.3.2.2 I trasposoni-Y2 di tipo rolling-circle
1.2.3.2.3 Trasposasi-Y e –S 33
1.2.3.2.4 Trasposoni con dominio RT e con trasposasi di tipo EN

1.2.3.3 Effetti dei trasposoni sul genoma
1.2.3.3.1 La trasposizione: fonte di adattamento alle condizioni di
<i>stress</i> 34
1.2.3.3.2 Gli elementi trasponibili: strumenti di regolazione
<i>dell'espressione genetica</i> 34
1.2.3.3.3 Il trasferimento orizzontale (HT) degli elementi
trasponibili, fonte di innovazione35
1.2.3.4 Meccanismi di silenziamento degli elementi trasponibili 36
1.2.3.4.1 Introduzione: gli small (s)RNA
1.2.3.4.2 Soppressione cotrascrizionale del RNA
1.2.3.4.3 Somatic quelling 39
1.2.3.4.4 Meiotic Silencing by Unpaired DNA (MSUD)
1.2.3.4.5 Sex induced silencing 40
1.2.3.4.6 Il silenziamento indotto dai danni al DNA
1.2.3.4.7 Metilazione indotta dai disiRNA
1.2.3.4.8 Meccanismi di silenziamento indipendenti dagli sRNA:
Repeat Induced Point (RIP) Mutation
Repeat Induced Point (RIP) Mutation
Repeat Induced Point (RIP) Mutation
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE. 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI 49
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI 49 3.6 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI 49
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI 49 3.6 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI 49
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI 49 3.6 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI 49 4 RISULTATI 49 4 RISULTATI 54
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI 49 3.6 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI 49 4 RISULTATI 54 4.1 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE 54
Repeat Induced Point (RIP) Mutation 41 1.2.3.4.9 Methylation-Induced Premeiotically 42 2 OBIETTIVI DELLA TESI 43 3 MATERIALI E METODI 45 3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO 45 3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE. 47 3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 47 3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE 48 3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI 49 3.6 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI 49 4.1 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE. 54 4.1 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE. 54 4.2 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI 54

4.4 Caso studio: identificazione e studio della stru	TTURA DEGLI
ELEMENTI LTR/GYPSY: BOTY-I E GYPSY-2_BFB-I	
5. DISCUSSIONE	77
6. CONCLUSIONI	
7. BIBLIOGRAFIA	83

RIASSUNTO

Le specie fungine del genere Monilinia sono i più importanti agenti di marciume bruno, e colpiscono drupacee e pomacee. Recentemente, sono state rese disponibili le bozze dei genomi sequenziati e completi di Monilinia fructicola, Monilinia laxa e Monilinia fructigena, appartenenti alla famiglia delle Sclerotiniaceae. In questo lavoro di tesi è stata fatto uno studio di genomica comparativa con lo scopo di ottenere informazioni sui cambiamenti dinamici evolutivi delle tre specie di Monilinia includendo i genomi completi delle specie Sclerotinia sclerotiorum e Botrytis cinerea, le specie più vicine all'interno delle Sclerotiniaceae. Dall'analisi della sintenia e dallo studio delle mutazioni sinonime Ks è emerso che M. laxa è la specie, evolutivamente parlando, più vicina a M. fructigena, mentre M. fructicola è la più distante. Inoltre, M. laxa è la specie più vicina a S. sclerotiorum e B. cinerea. In merito agli elementi trasponibili (TE), lo studio ha evidenziato un contenuto totale simile tra i genomi analizzati, che varia dal 7,2% di M. laxa al 5,1% nel genoma in B. cinerea. Tuttavia, in M. fructicola e *M. laxa* troviamo principalmente elementi non autonomi e degenerati, mentre in *M.* fructigena, e in misura minore in S. sclerotiorum e B. cinerea, si riscontrano i TE più attivi e più conservati. Questo collima con l'analisi della storia evolutiva dei TE, che evidenzia una più recente espansione e trasposizione di questi elementi nel genoma di queste ultime specie rispetto ad una più vecchia riscontrata nei genomi di M. fructicola e M. laxa. I risultati suggeriscono che le tre specie di Monilinia hanno subito pressioni evolutive diverse, alquanto divergenti, probabilmente dovute alla loro biologia e all'adattamento a differenti ambienti e piante ospiti.

ABSTRACT

The species of the genus Monilinia represent the most important brown rot agents affecting stone fruit and pome fruit. Recently, high quality draft genomes of Monilinia fructicola, Monilinia laxa and Monilinia fructigena, belonging to the Sclerotiniaceae family, have been generated. In this work a comparative genomics study was carried out with the aim to obtain information on the evolutionary dynamic of the three species of Monilinia, including the complete genomes of the Sclerotinia sclerotiorum and Botrytis cinerea, the closest species within Sclerotiniaceae. The synteny and the synonymous Ks mutations investigation suggest that M. laxa is closer to M. fructigena than M. fructicola, and is closest to the other investigated Sclerotiniaceae species. Regarding the transposable elements (TE), a similar quantity was recorded in all genomes, ranging from 7.2% on M. laxa to 5.1% in the B. cinerea genome. However, in M. fructicola and M. laxa, nonautonomous and degenerated TEs were detected, while in *M. fructigena*, and with a lesser extent in S. sclerotiorum and B. cinerea, active and conserved TEs were found. This was linked with the analysis of the TEs evolutionary landscape investigation which highlights a more recent expansion and transposition of these elements in the genome M. fructigena, S. sclerotiorum and B. cinerea compared to M. fructicola and M. laxa. Our results suggest that the three Monilinia species have been subjected to different, somewhat divergent, evolutionary pressures, probably due to their biology and adaptation to different environments and host plants.

1 INTRODUZIONE

1.1 LA MONILIOSI

La moniliosi, nota anche come marciume bruno, è una delle più importanti e comuni malattie delle drupacee e delle pomacee, che colpisce sia le piante da frutto in campo, sia la frutta in postraccolta causando pesanti perdite di produzione e riducendo la conservabilità dei frutti. Gli agenti sono funghi appartenenti al genere *Monilinia* (Petróczy et al., 2012; Martini e Mari, 2014).

1.1.1 Le specie fungine agenti di moniliosi: inquadramento sistematico di Monilinia spp.

Il genere *Monilinia* (Honey) (Honey 1928) è rappresentato da 35 specie (Lino et al., 2016) appartenenti alla famiglia delle *Sclerotiniaceae*, phylum *Ascomycota*. Il genere è diviso in due sezioni *Disjunctoriae* e *Junctoriae* in base alla specificità all'ospite, alle caratteristiche morfologiche dei conidi (mitospore) e alla biologia (Holst-Jensen et al., 1997). I funghi della sezione *Disjunctoriae* hanno le seguenti caratteristiche:

- produzione di catene di mitospore unite tramite conidi modificati chiamati disjunctors (Lantos et al., 2017) (Figura 1);
- elevata specificità all'ospite: sono parassiti in una sola specie o in poche specie;
- riproduzione sessuale (teleomorfo) e asessuale (anamorfo).

Le caratteristiche della sezione Junctoriae sono:

- produzione di catene di mitospore non separate dal disjunctors;
- spore prodotte per lunghi periodi e longeve;
- bassa specificità per l'ospite e comportamenti saprofiti su specie non bersaglio;
- riproduzione principalmente asessuale.



Figura 1. Catena di conidi separati dal disjunctors (indicati con una freccia) (Lantos et al., 2017).

I funghi della sezione *Disjunctoriae* (ad es. *Monilinia vaccinii-corymbosi*) inducono sulla foglia infetta sostanze aromatiche e zuccheri attrattivi nei confronti di pronubi e ditteri, i quali visitando la foglia si caricano di mitospore e divengono così dei vettori della malattia (Holst-Jensen et al., 1997; McArt et al., 2016). La specificità ad una o poche specie è il prodotto del sistema di diffusione che usa gli insetti come vettori (Batra 1991). Alcune specie appartenenti a questa sezione sono *Monilinia linhartiana, Monilinia padi, Monilinia amelanchieris, Monilinia cassiopes, Monilinia oxycocci e Monilinia gaylusaciae*.

La sezione *Junctoriae* ospita funghi con una scarsa specificità per l'ospite. Le spore prodotte dai funghi inclusi in questa sezione sono diffuse da pioggia, vento ed insetti (vespe, mosche e coleotteri); questi ultimi sono attratti dalle sostanze prodotte dai microrganismi che s'insediano nei frutti danneggiati dalla malattia (Holst-Jensen et al., 1997). Le specie più dannose in ambito agricolo appartengono alla sezione *Junctoriae*. Tra queste le più importanti sono: *Monilinia fructicola* (G. Winter) (Winter 1883) Honey (anamorfo *Monilia fructicola* (Batra)), *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland) (Aderhold e Ruhland 1905) Honey (anamorfo *Monilia laxa* (Ehrenberg) Saccardo & Voglino) e *Monilinia fructigena* (Person) Honey (Aderhold e Ruhland 1905) (anamorfo *Monilia fructigena* (Person) Persoon).

Altre specie di minore importanza e con areale geografico limitato sono la Monilia polystroma (G. Leeuwen) L. M. Kohn (van Leeuwen et al., 2002), Monilia mumecola (Y. Harada, Y. Sasaki & T. Sano) (Harada et al., 2004) e Monilia yunnanensis (M. J. Hu & C. X. Luo ex Sand. - Dan. & Crouse) (Hu et al., 2011). Si stima che le perdite causate dagli agenti di moniliosi si possano aggirare intorno al 8-10%. Infatti, se il valore lordo annuale della produzione di drupacee (pesche, nettarine, ciliegie, prugne, prugnolo e albicocche) è pari a circa 17 miliardi di dollari (a prezzi correnti rilevati nell'anno 2018) (FAOSTAT) (http://www.fao.org/faostat/en/#data/QV) [consultato il 21/09/2021] le perdite stimate riportate da Martini e Mari (2014) causate da specie del genere Monilinia ammonterebbero a 1.7 miliardi di euro annui.

1.1.2 OSPITI E DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Il genere *Monilinia* colpisce specie appartenenti alle *Rosaceae* (Jussieu) e alle *Ericaceae* (Jussieu) (Byrde e Willetts 1997). In particolare, nella sezione *Junctoriae M. fructicola* colpisce principalmente pesche e nettarine, *M. laxa* principalmente le albicocche e *M. fructigena* le pomacee (Zhu et al., 2016). *M. polystroma*, specie scoperta solo in tempi recenti, attacca il genere *Malus* (Miller), *Pyrus* (Linneo) e *Prunus* (Linneo). *M. mumecola* scoperta su *Prunus mume* (Siebold) (Siebold e Zuccarini 1836) è stata isolata anche da nettarine (Hu et al., 2011), pesco e albicocche (Yin et al., 2014), papaya e susino (Yin et al., 2015). Infine, *M. yunnanensis* attacca pesco (Hu et al., 2011), susino (Yin et al., 2015), pero e melo (Zhu et al., 2016). In particolare, in Cina su pero e melo è la specie prevalente con una incidenza del 77% dei campioni positivi alla *M. yunnanensis*, mentre *M. polystroma* e *M. fructicola* sono stati trovati solo sul 20% e 3% dei campioni (Zhu et al., 2016).

M. fructicola è originaria degli Stati Uniti d'America (Byrde e Willetts 1997) dove fu descritta per la prima volta nel 1881 da Peck, che la identificò erroneamente come *M. fructigena* (Holb 2003). *M. laxa* e *M. fructigena* sono state identificate per la prima volta in Europa rispettivamente da Persoon nel 1796 e da Ehrenberg nel 1818. Entrambi attribuirono a questi due miceti il nome di *Oidium laxum* e *Torula fructigena* (Holb 2003). Secondo Byrde e Willetts (1977) l'origine di queste specie è comune a quella degli ospiti su cui vivono, Euro-Asiatica. L'odierna distribuzione geografica delle tre specie principali è indicata nella **Figura 2A, B, C**. In particolare, *M. fructicola*, l'unica fra le tre a non essere indigena in Europa, è stata segnalata per la prima volta nel territorio dell'Unione Europea nel 2001 in Francia e in Piemonte solo nel 2009 (EFSA, 2011). *M. polystroma* è stata rilevata inizialmente in Giappone (van Leeuwen et al., 2002), e successivamente è stata segnalata in Repubblica Ceca, Ungheria (Petróczy e Palkovics 2009), Cina (Zhu e Guo 2010), Svizzera (Hilber-Bodmer et al., 2012), Serbia (Vasić et al., 2013), Polonia (Poniatowska et al., 2013) e Italia (Di Francesco et al., 2015). *M. mumecola e M. yunnanensis* sono diffuse in Cina (Hu et al., 2011) e solo la prima è presente anche in Giappone (Harada et al., 2004).



Distribuzione geografica di: (A) M. fructicola Figura 2. (EPPO) (https://gd.eppo.int/taxon/MONIFC/distribution) [consultato il 13/08/2021], (**B**) M. (Runjindamai laxa et al., 2014) e **(C)** М. fructigena (CABI) (https://www.cabi.org/isc/datasheet/34747#toDistributionMaps) [consultato il 13/08/2021].

1.1.3 M. FRUCTICOLA: UN PATOGENO DA QUARANTENA

Alla *M. fructicola* deve essere dedicato un paragrafo a parte, infatti, essa è considerata dall'*European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) un patogeno da quarantena, per il materiale di propagazione, ed è quindi

iscritta nella lista A2 (EPPO) (https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant quarantine/A2 list) [consultato il 13/08/2021]. Con la sua introduzione in Spagna, la M. fructicola ha soppiantato completamente la M. fructigena e ha raggiunto i livelli della M. laxa (Larena e Melgarejo, 1996) mentre in Italia meridionale negli ultimi 5 anni è stata isolata nel 74,8% dei frutti infetti e nell'80% delle aziende campionate (Abate et al., 2018b). Nella regione Marche è stata isolata per la prima volta su pesco nel 2016 (Landi et al., 2016). In particolare, quando *M. fructicola* coesiste con *M. laxa* la prima si trova soprattutto nei frutti, mentre la seconda è su fiori e rametti (Michailides et al., 2007; Papavasileiou et al., 2015; Montuschi et al., 2016). La presenza di M. fructicola sui frutti è dovuta in particolare a fattori di natura climatica (Papavasileiou et al., 2015). Infatti, *M. laxa*, ha un optimum per lo sviluppo del micelio e la produzione di conidi ad un intervallo di 10-19,8°C e pertanto negli areali mediterranei si adatta alle temperature primaverili sviluppandosi su fiore, mentre M. fructicola avendo un optimum di crescita e di sporulazione tra i 24,5-30°C (Papavasileiou et al., 2015; Angeli et al., 2017; Hrustić et al., 2018) si adattata ad un clima più caldo e quindi alla crescita sui frutti. Alla base della rapida espansione di M. fructicola vi possono essere altre spiegazioni come la maggiore virulenza (Papavasileiou et al., 2015; Tran et al., 2020), la possibilità di riprodursi per via gamica e la propensione a sviluppare resistenze. M. fructicola ricorre più frequentemente rispetto alle altre specie alla riproduzione sessuale che è stata osservata in campo negli Stati Uniti d'America, Uruguay, Cina, Giappone e Nuova Zelanda (Holtz et al., 1998; Hong e Michailides, 1998; Tate e Wood 2000) ma non in Europa (Villarino et al., 2010; Jänsch et al., 2012; Abate et al., 2018a). Tuttavia, la produzione degli apoteci in campo non è da escludere in virtù dei risultati ottenuti da Jänsch et al. (2012) che affermano, attraverso l'analisi della variabilità genetica, che i fenomeni di ricombinazione sessuale potrebbero essere comuni sia nelle popolazioni americane che in quelle europee. Oltretutto, anche se fosse vero che sono presenti barriere alla riproduzione sessuale queste non sono certamente di natura genetica poiché la popolazione europea di M. fructicola - fungo eterotallico - è dotata dei due alleli idiomorfi: MAT1-1 e MAT1-2 necessari per la riproduzione sessuale (Abate et al., 2018a); ed è possibile anche la riproduzione parasessuale (De Cal et al., 2014), anche se quest'ultima non porta alla produzione degli apoteci.

La ricombinazione sessuale crea un'opportunità per lo sviluppo delle resistenze ai fungicidi e ciò è un vantaggio per la *M. fructicola*. A questo proposito in Spagna sono stati rinvenuti ceppi resistenti a tiofanato-metile e ad iprodione la cui resistenza è da attribuire all'introduzione dalla popolazione di partenza di individui dotati di alleli resistenti (Egüen et al., 2015). La presenza di questi ceppi resistenti, dotati di un'elevata fitness parassitica e di un'elevata competitività, ha modificato i rapporti tra le tre specie nella valle dell'Ebro in Spagna. Ceppi di M. fructicola resistenti a benomyl, sono stati isolati come causa della diffusione della specie in arboreti californiani ciò a scapito della M. laxa, quest'ultima con neanche un ceppo resistente (Michailides et al., 1987). Allo stesso modo prove in campo condotte in Serbia, hanno evidenziato una maggiore resistenza di M. fructicola a composti a base di iprodione, tebunconazolo, clorotalonil, azossistrobina, fluopyram e boscalid rispetto alla M. laxa (Hrustić et al., 2018). L'insieme dei dati qui raccolti dimostrano che la M. fructicola può creare molti problemi nel controllo della malattia, soprattutto nelle zone di coltivazione a clima caldo. La sua adattabilità alle alte temperature fa sì che i danni ai frutteti siano numerosi e ciò è rilevante per l'economia delle aziende.

1.1.4 SINTOMATOLOGIA DELLA MONILIOSI

Monilinia spp. colpisce il fiore durante la ripresa vegetativa creando imbrunimenti sui petali seguiti dalla completa necrosi dell'organo che in alcuni casi cade o rimane attaccato alla pianta, si parla in questo caso di marciume del fiore o *blossom blight*. Nelle drupacee il fiore ormai imbrunito può essere avvolto dalla gomma prodotta dalla pianta. Dal fiore la malattia si diffonde sui germogli, rametti e piccole branche che disseccano e sull'asse rimangono le foglie necrotizzate. Sulla superfice dei rametti compaiono delle aree di forma ellittica o fusiforme con tessuto inizialmente depresso e poi mancante seguono i cancri rameali. La malattia può infettare i frutticini appena formati e qui può rimanere latente, solo successivamente con lo sviluppo e la maturazione del frutto la malattia si palesa producendo il sintomo di marciume bruno o *brown rot*. I frutti con marciume incominciano ad imbrunire e, se le condizioni sono favorevoli, vengono prodotti dei cuscinetti di conidi che saranno poi dispersi nell'ambiente. Nel caso di *M. laxa* e *M. fructicola* questi cuscinetti sono di colore grigio cenere mentre se vi è *M. fructigena* i

cuscinetti sono più grandi e di colore camoscio (**Figura 3**). Il frutto marcescente diventa una mummia, si disidrata e sviluppa lo stroma che gli conferisce un aspetto legnoso. Le mummie rimangono attaccate alla pianta o cadono sul terreno.

L'analisi del micelio può essere uno strumento per distinguere i vari tipi di marciume dalle specie di *Monilinia*, ma è più difficile distinguere *M. fructicola* da *M. laxa*, è pertanto necessario un test diagnostico di tipo molecolare per effettuare la corretta identificazione.



Figura 3. Sviluppo del micelio di *M. fructicola* (sinistra), *M. laxa* (centro) e *M. fructigena* (destra) sul frutto (Lino et al., 2016).

1.1.5 BIOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA

Il micelio di *Monilinia* spp. sverna nei cancri rameali e sui frutti mummificati, questi ultimi sono la principale fonte d'inoculo per l'avvio delle infezioni primarie (Villarino et al., 2010). L'infezione primaria ha avvio con la dispersione dei conidi, o al verificarsi di particolari condizioni ambientali e di conduzione dell'impianto, in particolare in *M. fructicola*, con la dispersione delle ascospore (Biggs e Northover, 1985, Holtz et al., 1998) (**Figura 4**). Mentre i conidi vengono prodotti durante tutto l'anno, le ascospore sono importanti solo nell'infezione primaria, in particolare, fino a quando non termina la fioritura (Holtz et al., 1998). La produzione delle ascospore segue queste fasi: sviluppo dello stroma, maturazione dello stroma, iniziazione degli apoteci e differenziazione degli apoteci, (Willetts e Harada, 1984). Ogni fase ha particolari esigenze che se non soddisfatte possono impedire lo sviluppo delle ascospore, per tale ragione le ascospore sono un metodo di diffusione poco frequente in campo. Le esigenze ambientali e le tempistiche di ogni fase vengono elencate in **Tabella 1**. Per giungere alla produzione di apoteci è

importante, che i frutti infettati a giugno e luglio rimangano attaccati alla pianta fino a ottobre / dicembre, poiché se cadono a terra prima dello sviluppo di uno stroma maturo vengono degradati dai microrganismi (Holtz et al., 1998). A partire dalla fase d'iniziazione degli apoteci è maggiore la probabilità di trovare la forma teleomorfo se il frutto cade a terra come testimoniano Holtz et al. (1998) che non hanno trovato apoteci nei frutti rimasti sulla pianta. Numerosi microrganismi del suolo entrano in competizione con la *Monilinia* presente nei frutti. Tuttavia, con inverni secchi e con lunghi periodi sottozero, l'attività dei microrganismi antagonisti è ridotta e la produzione degli apoteci è favorita (Willetts e Harada 1984).

Tabella 1. Esigenze per lo sviluppo delle ascospore per ciascuna fase, come indicato da Willetts e Harada (1984).

Fase	Temperatura (°C)	Umidità relativa (%)	Luminosità	Durata della fase (settimane)
Sviluppo dello stroma	15-20	90-100	Buio	4-8
Maturazione dello stroma	20-30	90-100	Buio	4-8
Iniziazione degli apoteci	0-15	100	Buio	12-16
Differenziazione degli apoteci	10-15	100	Luce diffusa o fluorescente con fotoperiodo 12 h a 1500 lux	2-4

I conidi sono responsabili della diffusione delle *Monilinia* per tutta la stagione. Essi trovano le migliori condizioni di sviluppo quando l'organo è appeso alla pianta (Villarino et al., 2010), per tale ragione è buona pratica per la lotta alla malattia eliminare durante la potatura al bruno le mummie, principale fonte d'inoculo primario, rimaste sugli alberi. Sulla mummia caduta sul terreno, in condizioni favorevoli, si sviluppano gli apoteci, pertanto, è utile lavorare il terreno per impedire la produzione di queste spore (Holtz et al., 1998). Dopo l'avvio dell'infezione le principali fonti d'inoculo sono i frutti diradati e i frutti abortiti e non abscissi mentre i fiori sono un importante fonte d'inoculo soltanto nelle cultivar precoci o mediamente precoci quando non è presente un'alta carica d'inoculo dovuta alla sporulazione di organi come frutti diradati e abortiti e non abscissi, 15 poiché, se ciò non si verifica, la semplice relazione tra marciume dei fiori e marciume bruno alla raccolta è oscurata (Emery et al., 2000).

Con il marciume bruno l'ifa si sviluppa in modo intercellulare e intracellulare e va a colonizzare l'intero mesocarpo mentre nell'infezione latente lo sviluppo è solo intercellulare ed è continuo ma lento e interessa l'epidermide e solo i primi due strati sub-dermali (Garcia-Benitez et al., 2016). Tra infezioni latenti e marciume bruno alla raccolta (Emery et al., 2000) o in postraccolta (Gel et al., 2009; Pavanello et al., 2018) vi è una relazione positiva e dal momento che le infezioni latenti si manifestano soprattutto in prossimità della raccolta (Byrde e Willetts, 1977) diventano un importante componente nell'epidemiologia della malattia. L'incidenza del marciume bruno è correlata all'incidenza delle infezioni latenti, alla fase di crescita del frutto, alla concentrazione d'inoculo, al numero di ore di umidità relativa, alle ore di bagnatura accumulate (Luo e Michailides, 2003) e alla temperatura (Gell et al., 2009). Studi condotti utilizzando la M. laxa, su pesco e albicocco, hanno dimostrato che il frutto è suscettibile all'infezione nella prima fase, quando il frutto aumenta in dimensione a causa della divisione cellulare, mentre in prossimità dell'indurimento del nocciolo la suscettibilità diminuisce ma dalla terza fase, dall'invaiatura alla raccolta, 4-5 settimane prima la piena maturazione, la suscettibilità aumenta nuovamente (Mari et al., 2003). La concentrazione dell'inoculo è legata all'aumento delle infezioni latenti (Luo e Michailides 2001; Luo e Michailides, 2003; Gell et al., 2009) e quindi all'incidenza del marciume bruno; i primi conidi compaiono alla comparsa dei primi frutti e la loro concentrazione aumenta progressivamente fino al termine del ciclo vegetativo ed è massima dopo la raccolta a causa dei frutti che vengono lasciati in campo (Villarino et al., 2012; Abonyi et al., 2015). In California Luo e Michailides (2003) hanno trovato, conducendo esperimenti con M. fructicola su susino, che l'incidenza del marciume bruno aumentava con l'aumentare delle ore di bagnatura accumulate e con l'accumulo delle ore di umidità relativa >90% e questo a partire da metà luglio fino a metà agosto. L'importanza delle ore di bagnatura per lo sviluppo del marciume bruno è stata osservata anche da Kable et al. (1972) che evidenzia che 10 h di bagnatura in campo sono sufficienti ad avviare il marciume bruno in pesche da conserva mentre bastano solo 2 h di bagnatura a 5-25°C per la germinazione dei conidi e l'avvio dell'infezione sui frutticini e sui frutti maturi di pesche e nettarine

(Kreidl et al., 2015). Gell et al. (2009) oltre a prendere in considerazione le ore di bagnatura tengono conto anche delle temperature e affermano che l'incidenza delle infezioni latenti aumenta se aumentano le temperature e si riducono le ore di bagnatura e viceversa mentre il marciume bruno non si sviluppava a temperature non favorevoli.



Figura 4. Ciclo biologico di Monilinia spp. (EFSA 2011).

1.2 GENOMICA COMPARATIVA

La genomica comparativa è un campo della biologia che ha come obiettivo il confronto tra genomi di specie diverse allo scopo di evidenziare differenze e similitudini che consentono di fare inferenza sulle relazioni funzionali ed evolutive delle specie (Touchman, 2010).

Confrontando le sequenze dei genomi di diversi organismi, si può comprendere cosa, a livello molecolare, distingue le diverse forme di vita l'una dall'altra. La genomica comparativa fornisce anche un potente strumento per studiare i cambiamenti evolutivi tra gli organismi, aiutando a identificare i geni che sono conservati o comuni tra le specie, nonché i geni che conferiscono a ciascun organismo le sue caratteristiche uniche. Sebbene gli esseri viventi sembrino e si comportino in una miriade di modi, tutti i loro genomi sono costituiti da DNA, la catena chimica che ospita i geni che codificano per migliaia di diversi tipi di proteine. All'interno del DNA ci sono le istruzioni sufficienti per creare un organismo e i mezzi con cui gli organismi trasmettono informazioni alla loro progenie. Questa informazione è codificata solo da quattro nucleotidi: adenosina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). La comprensione dell'ordine di questi nucleotidi nelle molecole di DNA lineare è stata una ricerca attiva sin dalla scoperta della struttura a doppia elica del DNA (Watson e Crick, 1953). Il sequenziamento del DNA è emerso come un approccio fondamentale alla ricerca in biologia molecolare. Il potere del sequenziamento del DNA a basso costo ha stimolato il notevole progresso della tecnologia consentendo di sequenziare un numero sempre maggiore di genomi e rendendo la genomica comparativa un punto focale accessibile per lo studio di qualsiasi forma di vita. Pertanto, a partire dal genoma umano (Lander et al., 2001), lo sviluppo della tecnologia di sequenziamento ha consentito l'analisi di una pletora di genomi correlati. Tuttavia, se si pensa alle piante solo una piccola frazione (~0,16%) delle ~350.000 piante terrestri esistenti ha avuto il sequenziamento del genoma. Per alcune piante (ad esempio mais, Arabidopsis e riso), sono disponibili assemblaggi genomici multipli di alta qualità e migliaia di accessioni (Marks et al., 2021). Per quanto riguarda le specie fungine nel 2016 erano già disponibili i dati dei genomici di 1.090 specie (Aylward et al., 2017).

Il primo passo nella genomica comparativa è confrontare caratteristiche generali come: dimensione del genoma, numero di geni e numero di cromosomi. Ad esempio, *Arabidopsis* ha un genoma più piccolo rispetto a *Drosophila melanogaster*, il moscerino della frutta che ha il doppio dei geni. È interessante notare che la dimensione del genoma di *Arabidopsis* è simile a quella umana, suggerendo che la dimensione del genoma non è un indicatore di complessità o stato evolutivo. L'antica origine dei funghi e la loro notevole diversità, in combinazione con i loro genomi semplificati, rendono il regno dei funghi un eccellente sistema modello per studiare l'evoluzione degli eucarioti e la relazione con gli ospiti utilizzando la genomica comparativa. Il sequenziamento ad alto rendimento ha

consentito importanti progressi nella comprensione del modo in cui i patogeni causano malattie sulle colture. L'analisi dei genomi fungini ha evidenziato il ruolo chiave dei geni effettori nella insorgenza della malattia nell'ospite (Plissonneau et al., 2017). In *Fusarium oxysporum* sono stati identificati geni associati alla resistenza in melone (Schmidt et al., 2016). L'analisi comparativa ha permesso di evidenziare geni responsabili della specializzazione con l'ospite in *Ustilago hordei* isolato da avena e *U. tritici* isolato da frumento (Benvenuto et al., 2018), e nel genere *Botrytis* (Valero-Jiménez et al., 2019), o geni che chiariscono lo stile di vita dei patogeni fungini (Knapp et al., 2018; Stauber et al., 2020). Solo per fare alcuni esempi, molto interessanti sono studi di genomica comparativa che hanno chiarito le relazioni evolutive tra specie fungine e il ruolo degli elementi ripetitivi nell'adattamento dei genomi come riportato nel genere *Mycosphaerella* (Zeng et al., 2017) e in *Aspergillus* spp. (Kjærbølling et al., 2020).

Rientrano in questo tipo di studi comparativi le analisi sullo stato sintenico o più correttamente definito collinearità, analisi sulle sostituzioni sinonime e nonsinonime e analisi quantitative e qualitative degli elementi trasponibili (TE).

1.2.1 LA SINTENIA

L'essenza della genomica comparativa risiede nel modo in cui confrontiamo i genomi per rivelare le relazioni evolutive delle specie. Sfortunatamente, nella maggior parte dei casi, allineare correttamente anche solo due genomi alla risoluzione della coppia di basi può essere difficile. Un genoma di solito contiene milioni o miliardi di nucleotidi ed è diverso dal genoma di una specie strettamente correlata a causa di processi evolutivi come mutazioni di sequenza, riarrangiamenti cromosomici ed espansione o perdita di famiglie di geni. Ci sono costi computazionali elevati quando si cerca di allineare e assegnare più copie di DNA identiche tra loro, come duplicazioni segmentali ed elementi trasponibili (Chen e Tompa, 2010; Uricaru, 2010). Inoltre, è stato dimostrato che i metodi di allineamento più diffusi non sono d'accordo tra loro (Chen e Tompa, 2010). Un approccio alternativo e probabilmente più pratico si basa sull'identificazione di geni sintenici e/o blocchi di sintenia (Ehrlich et al., 1997; Ghiurcuta e Moret, 2014), descritti per la prima volta come loci genetici omologhi che si verificano sullo stesso cromosoma (Nadeau, 1989). Il termine sintenia, introdotto nel 1971 da John H. Rewick, fa riferimento a due o più geni che si trovano nello stesso cromosoma ma per i quali non è necessario mostrare il linkage o associazione (Stein, 2013). Nella genomica comparativa il termine sintenia descrive, invece, quella situazione in cui in due o più specie almeno due geni seppur non in 'linkage' si trovano sullo "stesso" cromosoma. Oggi, però, la locuzione sintenia viene usata in modo errato e ambiguo dagli studiosi della genomica comparativa che gli attribuiscono il significato di collinearità (Passarge et al., 1999; Hane et al., 2011). La collinearità si ha quando dal confronto di due genomi di specie diverse emerge un gruppo di geni ortologhi (i geni ortologhi sono i geni che, in organismi differenti, codificano per le stesse proteine), che seppur presenti in cromosomi diversi mantengono lo stesso ordine e orientamento (Lyons et al., 2008; Hane et al., 2011); geni ortologhi che mantengono lo stesso ordine e orientamento formano dei blocchi sintenici. I blocchi di sintenia sono definiti più formalmente come regioni di cromosomi tra genomi che condividono un ordine comune di geni omologhi derivati da un antenato comune (Tang et al., 2011). Nomi alternativi come sintenia conservata o collinearità sono stati usati in modo intercambiabile (Molinari et al., 2008). I confronti della sintenia del genoma tra e all'interno delle specie hanno fornito l'opportunità di studiare i processi evolutivi che portano alla diversità del numero e della struttura dei cromosomi in molti lignaggi attraverso l'albero della vita; le prime scoperte che utilizzano tali approcci includono regioni cromosomiche conservate in nematodi e lieviti (Stein et al., 2003; Wong e Wolfe, 2005).

L'entità della somiglianza e della dissomiglianza può variare tra i cromosomi e/o scaffolds o contigs. L'analisi dello stato di collinearità consente di valutare come gli eventi di duplicazione, delezione, trasposizione ma anche altri riarrangiamenti che coinvolgono il genoma hanno agito consentendo la divergenza evolutiva tra le specie confrontate.

I blocchi sintenici possono avere dimensione diversa e a seconda della dimensione si parla di:

- macrosintenia, il blocco sintenico è molto grande ed è costituito da numerosi geni ortologhi;
- microsintenia, il blocco sintenico è costituito da due fino a un massimo di dieci geni in co-linearità;

• mesosintenia, è una sintenia in cui i geni, nelle specie confrontate, sono conservati sullo "stesso" cromosoma ma non mantengono né l'ordine né l'orientamento (Hane et al., 2011).

La mesosintenia è caratteristica dei funghi delle divisione Ascomycota poiché: sono organismi molto antichi, in breve tempo compiono molte generazioni e ricorrono meno frequentemente alla meiosi che è conosciuta come uno strumento di stabilizzazione del genoma, pertanto, questi fattori messi insieme fanno sì che i genomi dei funghi presentino dei blocchi sintenici molto frammentati e con numerosi geni ortologhi che, esterni al blocco sintenico, sono dispersi all'interno dello "stesso" cromosoma nelle specie confrontate (Hane et al., 2011). La collinearità consente di valutare la vicinanza evolutiva tra le specie poiché specie vicine, evolutivamente parlando, sono dotate di blocchi sintenici meno frammentati mentre specie distanti sono caratterizzate dalla microsintenia, poiché, hanno sperimentato fenomeni di: aberrazione di geni singoli, inversioni, traslocazioni, trasposizioni e delezioni (Lyons et al., 2008). Inoltre, la conservazione dello stato di collinearità consente anche di stabilire un'importante relazione funzionale tra i geni (Zhao, 2018) oltre che permettere di valutare l'accadimento di eventi di duplicazione di geni omologhi, la perdita di geni o la presenza di regioni che più di altre sono prone a far verificare riarrangiamenti (Lyons et al., 2008).

1.2.2 Analisi delle sostituzioni sinonime e non sinonime

Nel corso dell'evoluzione il genoma accumula delle mutazioni dovute alla sostituzione delle basi azotate: transversioni o transizioni. Le transversioni consistono nello scambio di una purina con una pirimidina o viceversa mentre nelle transizioni lo scambio è di una purina con una purina o di una pirimidina con pirimidina. Questi eventi di transversione o transizione producono delle sostituzioni sinonime o non-sinonime: nel primo caso non vi è un cambiamento nella sequenza dell'amminoacido codificato dalla tripletta mentre nel secondo si ha un cambiamento nella sequenza amminoacidica. Tali valutazioni sono fatte confrontando i geni omologhi (due geni sono omologhi se derivano da un antenato comune), di due specie ed è attraverso questi confronti che viene determinato il rateo di sostituzioni sinonime (Ks) e di sostituzioni non-sinonime (Ka). Nei geni il valore di Ks è più elevato rispetto al valore di Ka poiché le sostituzioni sinonime rappresentano mutazioni neutre e quindi si accumulano normalmente nel genoma mentre le sostituzioni non-sinonime sono meno frequenti poiché sono sottoposte alla pressione selettiva e sono di frequente eliminate.

La teoria neutra prevede che le sostituzioni sinonimiche saranno tollerate, ma le sostituzioni non sinonime saranno rimosse dalla selezione purificante. Di conseguenza, le sostituzioni non sinonime saranno inferiori alle sostituzioni sinonime. Coerentemente con questa previsione, è noto che le sostituzioni sinonime in genere superano le sostituzioni non sinonime nei geni codificanti proteine e le regioni dei geni funzionalmente vincolate evolvono a un ritmo più lento rispetto alle regioni che non sono vincolate dal punto di vista funzionale. Tuttavia, se una sostituzione non sinonima conferisce un vantaggio selettivo, sarà rapidamente fissata nella popolazione mediante selezione positiva. La stima dei tassi di sostituzione sinonimi e non è importante per comprendere la dinamica dell'evoluzione della sequenza molecolare (Kimura, 1983; Gillespie, 1991; Razeto-Barry et al., 2012). Nei confronti tra genomi il valore di Ks può essere usato per valutare la distanza evolutiva tra le specie, tanto più il valore tende ad essere negativo tanto più le specie sono imparentante mentre più è alto, quindi positivo, più le specie sono distanti. Inoltre, può essere usato il rapporto Ka/Ks per determinare se un gene ortologo è sottoposto a pressione selettiva neutra (Ka/Ks = 1), positiva (Ka/Ks > 1) o negativa (Ka/Ks < 1) (de Magalhães e Church, 2007).

Il valore Ks e Ka può essere usato anche per stimare, se sono presi in considerazione dei trasposoni, il momento della trasposizione (Weber e Schmidt, 2009). Per stimare l'età evolutiva si usa la formula:

T = (K/k)/2

dove T è il tempo a partire dal quale è avvenuta la divergenza delle due sequenze, k è il tasso evolutivo per anno che deve essere calcolato e può variare in organismi diversi e K è il numero di sostituzioni per sito.

$\mathbf{K} = -((1)/(2) \ln \frac{f_0}{f_0} \{ (1 - 2\mathbf{P} - \mathbf{Q}) \sqrt{(1 - 2\mathbf{Q})} \}$

Questa formula che calcola il K vale quando si considerano sia le sostituzioni sinonime sia quelle non sinonime. P è il numero di transizioni presenti nella sequenza e Q sono le transversioni (Kimura, 1980). Una variante della formula è quella che calcola il K'] S che considera le sole transizioni e trasversioni

verificatesi sulla terza base azotata e quindi considera le sole sostituzioni sinonime (Kimura 1980):

$$[K'] _S = -(1/2) \ln [f_0] [(1 - 2P - Q)]$$

1.2.3 GLI ELEMENTI TRASPONIBILI

Gli elementi trasponibili (TE) sono dei segmenti di DNA definito mobile in grado di spostarsi autonomamente da una posizione all'altra del genoma. Il DNA mobile rappresenta una porzione importante del genoma sia dei procarioti che degli eucarioti con un ruolo importante nell'evoluzione delle specie.

Gli elementi trasponibili sono stati scoperti da Barbara McClintock che nel 1940, identificò, dei riarrangiamenti cromosomici prodotti da elementi che erano in grado di muoversi nel DNA. Ad oggi con l'avanzamento delle tecniche di sequenziamento genetico sono state scoperte molte famiglie di TE sia in eucarioti che in procarioti. I TE sono in grado di muoversi nel genoma dell'ospite da un sito all'altro attraverso meccanismi di trasposizione usando un intermedio a DNA (trasposoni a DNA) o RNA (retrotrasposoni). I TE sono stati definiti per decenni come elementi "inutili" e "parassiti" poiché possono creare delle mutazioni deleterie per l'ospite, ad esempio, in Drosophila ananassae l'inserzione del trasposone tom a fianco del gene Om(1D) produce dei fenotipi aberranti con un numero ridotto di ommatidi (Tanda et al., 1994). Allo stesso tempo, le specie con il maggiore numero di TE inattivi sono meno capaci di adattarsi ai cambiamenti ambientali, quindi, sono candidate all'estinzione (Ricci et al., 2018). Da ciò deriva che i TE sono fonte di mutazioni aberranti ed è per questo che ogni specie ha evoluto dei meccanismi volti al loro controllo ma se opportunamente regolati sono veicolo di innovazioni genetiche in grado di fornire plasticità al genoma.

1.2.3.1 LA CLASSIFICAZIONE DEI TE

I sistemi di classificazione si basano o sulla classificazione degli intermedi della trasposizione (Jurka, 2003; Wicker et al., 2007) o sulla classificazione delle trasposasi (Curcio e Derbyshire, 2003). I sistemi di classificazione sono organizzati in ordini gerarchici e secondo la classificazione di Wicker et al. (2007) abbiamo: classi, ordini, superfamiglie, famiglie e subfamiglie. In base all'intermedio di

trasposizione utilizzato distinguiamo, i retrotrasposoni (classe I) e i trasposoni a DNA (classe II) (Wicker et al., 2007).

1.2.3.1.1 CLASSE I

Nella classe I la RNA Polimerasi II (Pol II) dell'ospite sintetizza un intermedio a mRNA, successivamente si ha la retrotrascrizione in cDNA ad opera della retrotrascrittasi (RT) e l'integrazione per mezzo della integrasi (IN), entrambi gli enzimi sono trascritti dal TE. La comune IN è una trasposasi con dominio DDE, però, in alcuni elementi essa è sostituita da un enzima che svolge la stessa funzione ma sfruttando meccanismi diversi, per questo riconosciamo: ricombinasi di tipo Y (YR), endonucleasi (EN) ed endonucleasi di tipo apurinico e apirimidinico (APE) (Curcio e Derbyshire 2003). Nella classe I troviamo gli ordini: long terminal repeat (LTR), *Dictyostelium* intermediate repeat sequence-like (DIRS-like), Penelope-like element (PLE), long interspersed nuclear element (LINE) e short interspersed nuclear element (SINE) (Wicker et al., 2007).

1.2.3.1.1.1 LONG TERMINAL REPEAT

Negli elementi LTR, simili ai retrovirus, sono riconosciute le superfamiglie: Gypsy, Copia e Bel-Pao (Wicker et al., 2007). In questi elementi vi sono almeno due open reading frame (ORF) che corrispondono ai geni: group specific antigen (gag) e polymerase (pol), il terzo ORF, laddove presente, corrisponde al gene envelope (env); gag codifica delle proteine strutturali che nei retrotrasposoni sono utilizzate per la formazione delle virus-like particle (VLP), pol codifica per una poliproteina impiegata per la trasposizione, infine env, che nei retrovirus trascrive per un'unità transmembrana e di superfice che consente al virus il trasferimento orizzontale, nei retrotrasposoni è inattivo e ciò gli impedisce il trasferimento laterale (Daboussi, 1997; Andrianov et al., 2005). Gli ORF sono circoscritti da due sequenze ripetute, gli LTR, le quali sono fiancheggiate dai target site duplication (TSD). Nella poliproteina si trovano i domini: proteasi (PR), IN, ribonucleasi H (RH) e RT. Il dominio funzionale PR serve per la maturazione del precursore della poliproteina (Hansen et al., 1988), la RH serve invece alla formazione dell'ibrido DNA-RNA durante la retrotrascrizione e per il clivaggio del RNA e la formazione di corti primer di RNA da cui inizia la sintesi dell'elica di DNA (Moelling et al.,

2017). In alcuni elementi Gypsy, a volte, in prossimità del dominio IN vi è anche il cromodominio (CH) che ha la funzione di guidare l'integrazione del TE all'interno dell'eterocromatina (Gao et al., 2008). La distinzione tra Gypsy e Copia viene fatta in base all'ordine dei domini all'interno del gene pol, in particolare, gli elementi Gypsy hanno una disposizione del tipo PR-RT-RH-IN-(CH) mentre gli elementi Copia PR-IN-RT-RH (Daboussi, 1997). Gli elementi Bel-Pao, i progenitori degli elementi Gypsy, condividono con essi la medesima disposizione dei domini funzionali (Eickbush e Malik, 2002).

1.2.3.1.1.2 DICTYOSTELIUM INTERMEDIATE REPEAT SEQUENCE (DIRS)

L'ordine DIRS, da analisi filogenetiche della RT, si è mostrato simile ai Bel-Pao ma rispetto ad essi hanno sostituito l'IN con una YR (Eickbush e Malik, 2002). I DIRS mancano di veri e propri LTR le cui sequenze assomigliano a delle split direct repeat (SDR) o a delle inverted repeat (IR) (Wicker et al., 2007). Inoltre, con la trasposizione dei DIRS non si generano i TSD (Wicker et al., 2007).

1.2.3.1.1.3 PENELOPE-LIKE ELEMENT (PLE)

I PLE sono un ordine con caratteristiche simili ai retrotrasposoni LTR e Non-LTR (SINE e LINE), con i primi condividono gli "pseudo-LTR", sequenze che somigliano agli LTR, mentre con i secondi condividono un troncamento in 5' e un TSD di lunghezza variabile (Arkhipova et al., 2003). Nonostante le similitudini con gli LTR e Non-LTR, gli elementi PLE formano un nuovo ordine (Wicker et al., 2007). In particolare, questi elementi hanno delle RT che somigliano di più alle telomerase reverse transcriptase (TERT) piuttosto che alle RT degli LTR e Non-LTR; le TERT sono delle telomerasi che mantengono la struttura lineare dei cromosomi, conservando la struttura dei telomeri (Arkhipova et al., 2003). Wicker et al. (2007) riconoscono nei PLE la sola superfamiglia Penelope mentre secondo Craig et al. (2021) vi sono ulteriori superfamiglie riconosciute in base alla presenza (EN+) o assenza (EN-) di una endonucleasi. Negli elementi EN- sono presenti le superfamiglie denominate Penelope/Poseidon, Neptune e Nematis mentre in EN+ vi è Athena e Coprina (Craig et al., 2021). La presenza di cladi EN- insieme alla vicinanza filogenetica ai TERT può indicare che gli elementi PLE siano strettamente imparentati ad un ipotetico retroelemento che ha poi dato origine alle telomerasi (Kojima, 2019).

1.2.3.1.1.4 Long Interspersed Nuclear Element e Short Interspersed Nuclear Element (Non-LTR)

Altri ordini sono i SINE e LINE che erano inclusi nei Non-LTR; con le scoperte dei DIRS e PLE, la definizione Non-LTR è stata eliminata dalla classificazione Wicker et al., (2007), tuttavia è ancora utilizzato da librerie come Repbase incluse nel software CENSOR (Bao et al., 2015). Quindi, nell'introduzione il termine Non-LTR sarà usato in modo informale per riferirsi ai LINE e SINE.

L'ordine LINE è composto da cinque superfamiglie: R2, L1, RTE, I e Jockey e gli elementi autonomi di quest'ordine codificano almeno la RT e una nucleasi (Wicker et al., 2007) di tipo EN o APE.

I SINE sono gli unici TE ad essere nati come elementi non-autonomi, quindi, non lo sono diventati per la perdita di un dominio funzionale e la replicazione e integrazione dei SINE è demandata agli elementi LINE (Kramerov e Vassetzky, 2011). I SINE, infatti, codificano unicamente una polimerasi III (Pol III) che trascrive il DNA in RNA (Kramerov e Vassetzky, 2011) e sono costituiti da un "head", "body" e "tail"; Wicker et al. (2007) utilizzano l'origine del RNA presente nella "head" per distinguerli in tre superfamiglie: tRNA, 5S RNA e 7SL RNA.

1.2.3.1.2 CLASSE II

La classe II è la classe degli elementi a DNA ed è divisa in:

- subclasse I: contiene elementi che per la trasposizione tagliano il TE e lo incollano altrove sono cioè dotati di un meccanismo *taglia e incolla* (Wicker et al., 2007);
- subclasse II: contiene elementi che seguono un processo di replicazione che comporta il taglio di un solo filamento di DNA che viene poi replicato altrove, segue, la riparazione del DNA, trattasi di un meccanismo di tipo *copia e incolla* (Wicker et al., 2007).

Alla subclasse I appartengono gli ordini: Terminal Inverted Repeat (TIR) e Crypton, alla subclasse II: Helitron e Maverick (Wicker et al., 2007).

1.2.3.1.2.1 SUBCLASSE I: TIR E CRYPTON

Nei TIR sono inclusi gli elementi a DNA dotati di sequenze terminali omologhe e invertite che prendono il nome di terminal inverted repeat (TIR) e di trasposasi (Tase) (Wicker et al., 2007) mentre i Crypton possiedono unicamente la YR. La Tase è la IN dei retroelementi, quindi, entrambe sono trasposasi di tipo DDE (Curcio e Derbyshire, 2003). I TIR sono fiancheggiati dai TSD e in base alla lunghezza del TSD e alla sequenza dei TIR sono riconosciute nove superfamiglie (Wicker et al., 2007). Le superfamiglie Tc1-Mariner, hAT, Mutator, Merlin, Transib, P e PiggyBac sono costituite da TIR e TSD di varia lunghezza ma tutti sono caratterizzati dalla presenza di un'unica trasposasi mentre nelle superfamiglie PIF-Harbinger e CACTA vi è, oltre alla trasposasi, un ORF aggiuntivo che nel primo caso traduce per una proteina con dominio DNA binding mentre nel secondo la funzione di tale ORF è sconosciuta (Wicker et al., 2007). Gli elementi, nell'ordine Crypton, appartengono ad un'unica e omonima superfamiglia e possiedono oltre alla YR, i TSD ma mancano i TIR (Wicker et al., 2007).

1.2.3.1.2.2 Subclasse II: Helitron e Maverick

Helitron si replica con un meccanismo di tipo rolling-circle in quanto dotato di una tirosina-Y2-ricombinasi, ciò non genera i TSD (Curcio e Derbyshire, 2003).

I Maverick o Politon sono caratterizzati da lunghi TIR, inoltre, traducono fino ad undici proteine che codificano per una DNA polimerasi B e un INT; l'INT somiglia a quella degli elementi della classe I.

1.2.3.2 MECCANISMI DI TRASPOSIZIONE

Al fine di analizzare i meccanismi di trasposizione è utile introdurre il sistema di classificazione di Curcio e Derbyshire (2003) che classifica i trasposoni in base alle trasposasi e li divide in cinque famiglie proteiche:

- trasposasi con dominio DDE;
- rolling-circle (RC) o Y2-trasposasi;
- tirosina (Y)-trasposasi;
- serina (S)-trasposasi;
- trasposoni con dominio RT e con trasposasi di tipo EN.

1.2.3.2.1 I TRASPOSONI CON TRASPOSASI-DDE

La trasposasi con dominio DDE è presente nei trasposoni a DNA dell'ordine TIR. Questa trasposasi, attraverso il dominio DDE, taglia il trasposone da un sito donatore e lo incolla in un sito bersaglio, pertanto, questi sono elementi "*taglia e incolla*" (Curcio e Derbyshire, 2003). Nei retrotrasposoni abbiamo invece l'IN che è tipico degli elementi dell'ordine LTR, in questo caso il meccanismo è di tipo "*copia e incolla*". Una caratteristica comune nelle trasposasi di tipo DDE è che generano il TSD, poiché, la trasposasi nel sito target taglia il DNA ma lo fa in modo sfalsato (**Figura 5 E**).

I modelli di trasposizione riconosciuti per le trasposasi tipo DDE:

- modello di trasposizione dei trasposoni a DNA, dell'ordine TIR Figura 5
 A,B,C,D,E,F;
- 2) modello di trasposizione dei retrotrasposoni, dell'ordine LTR.

Secondo il 1) modello di trasposizione dei trasposoni a DNA, la trasposasi opera il taglio sulle estremità 5' del trasposone liberando così un 3'-OH nucleofilo nel DNA donatore e con un legame di trans-esterificazione che coinvolge l'opposto filamento di DNA si forma una forcina che libera il trasposone che sarà attaccato altrove (**Figura 5 A,B,C**). Il DNA donatore su cui si è generata la forcina viene riparato ma questo processo lascia dei segni rappresentati dalla presenza nel sito del donatore di una sequenza palindroma (Curcio e Derbyshire, 2003).



Figura 5. Ciclo di trasposizione: in arancione il TE, le frecce in (**A**) che nascono dalla trasposasi indicano dove avviene il taglio dell'elemento; l'elemento tagliato (**B**), viene spostato in una nuova posizione (**D**), e nel punto in cui è avvenuta la traslocazione si forma un ponte tra le sequenze opposte che chiamiamo: forcina (**C**). In (**E**) il filamento rosso mostra la formazione del TSD; in (**F**) si mostrata in particolare che il TSD si forma a causa del taglio sfalsato (punti di taglio indicati da due pallini) prodotto dalla trasposasi sul DNA accettore.

Nel secondo caso, la struttura dei retrotrasposoni LTR è mostrata in **Figura 6**. Negli LTR si trovano tre sequenze: le *unique* 3' (U3) e 5' (U5) e una sequenza denominata *redundant* (R), nella sequenza U3 vi è un *enhancer* e *promoter* mentre in R si trova il segnale 5' *cap* utile alla maturazione del mRNA e il segnale di poliadenilazione (Curcio e Derbyshire 2003).



Figura 6. Struttura di un retrotrasposone di tipo LTR, dove: PBS sta per primer binding site mentre PPT per polypurine tract.

In **Figura 7** sono mostrate le tappe che portano alla replicazione dei retrotrasposoni. Il retrotrasposone prima della trasposizione deve essere trascritto, tale operazione è svolta dalla Pol II che opera all'interno del nucleo cellulare e produce un mRNA. Nel mRNA sono presenti le sequenze R-U5 del LTR 5' e U3-R del LTR 3' (**Figura 8 A**). Dal nucleo l'mRNA passa al citoplasma dove all'interno dei ribosomi avviene la trascrizione della proteina gag - legata alla formazione delle VLP - e della proteina pol - con i domini RT, IN, RH e AP.



Figura 7. Schema di una cellula, viene mostrato in ogni suo passaggio il processo di trasposizione dei retrotrasposoni LTR che si conclude con l'integrazione ad opera dell'IN della copia del cDNA (in rosso) retrotrascritta dal RT a partire dal mRNA del retrotrasposone.

La retrotrascrizione - il processo che è alla base della formazione del cDNA a partire dal mRNA - ha avvio dopo che la RT, legato il tRNA alla sequenza PBS complementare, sintetizza un primer complementare alla sequenza R-U5 (**Figura 8** A). Il primer R-U5 del LTR 5' viene clivato dalla RH (**Figura 8 B**) e si appaia alla regione R del LTR 3', successivamente si ha la retrotrascrizione fino al PBS situato sul LTR 5'. Dopo la sintesi del primo filamento di cDNA interviene la RH che degrada tratti di RNA (**Figura 8 B**,C) e avviene la sintesi del cDNA a partire dal frammento di RNA lasciato come primer. Il filamento di cDNA viene trasferito sul LTR 3' e si appaia alla sequenza complementare, da qui la RT completa la sintesi del cDNA (**Figura 8 D**,E). L'IN (trasposasi-DDE) lega il cDNA e si forma un complesso di pre-integrazione in cui sono create delle rotture a livello delle estremità 3' terminali del cDNA, ciò espone un dinucleotide conservato in retrovirus e retrotrasposoni LTR: 3'-CA. Le estremità 3'-OH del trasposone – liberate dall'azione dell'IN - si legano al sito bersaglio e il meccanismo di riparazione del DNA dell'ospite elimina i dinucleotidi non appaiati presenti nell'estremità 5' terminali del cDNA e lo lega formando un unico filamento.



Figura 8. Rappresentazione del processo di retrotrascrizione che viene svolto all'interno del VLP e coinvolge l'attività del gene pol e di una parte dei suoi domini, in particolare, in questa fase RT e RH. In rosso vi è il filamento di mRNA che sarà retrotrascritto in cDNA (filamento nero). Il tRNA è il filamento verde.

1.2.3.2.2 I TRASPOSONI-Y2 DI TIPO ROLLING-CIRCLE

La tirosina-trasposasi o Y2-trasposasi si trova principalmente nei TE dei batteri ma un enzima simile si trova negli elementi Helitron, questi elementi sono dotati di due estremità non simmetriche una possiede la funzione di origine della trasposizione (*ori*) l'altra di terminazione (*ter*) (Curcio e Derbyshire, 2003).

La trasposasi ha un dominio funzionale costituito da una coppia di tirosine separate da tre residui amminoacidici; il dominio funzionale taglia il filamento di DNA in corrispondenza del TE si forma un complesso 5' fosfotirosina, il filamento del trasposone liberato è integrato nel sito target ed è usato per la riparazione del DNA (Curcio e Derbyshire, 2003). Durante la trasposizione e integrazione la trasposasi utilizza un dominio funzionale tipo elicasi per lo srotolamento del DNA (Curcio e Derbyshire, 2003). Le trasposasi degli elementi Helitron hanno come sito bersaglio la sequenza 5' – CTRR dove R è una purina. Una caratteristica di queste trasposasi è che in alcuni casi la sequenza *ter* non è riconosciuta ma è riconosciuta una *pseudo-ter*, ciò consente la cattura nel trasposone di geni dell'ospite.

1.2.3.2.3 TRASPOSASI-Y E-S

Le trasposasi-Y e -S si trovano soprattutto nei trasposoni batterici ma le trasposasi-Y sono presenti anche negli elementi eucariotici dell'ordine DIRS. La trasposasi-Y, nei DIRS, interviene dopo che avvenuta l'azione della RT sul mRNA, pertanto, il cDNA di tipo *rolling circle* viene integrato nel sito target (Curcio e Derbyshire, 2003). Le modalità non sono però ancora conosciute, ciò che sappiamo, è che la sua azione non porta alla formazione dei TSD (Curcio e Derbyshire, 2003).

1.2.3.2.4 TRASPOSONI CON DOMINIO RT E CON TRASPOSASI DI TIPO EN

Infine, vi sono i trasposoni che presentano il dominio RT a cui è associata una trasposasi di tipo EN, questi elementi sono caratteristici della classe I e si trovano negli ordini LINE e PLE (Curcio e Derbyshire, 2003); gli elementi dotati di questa RT-EN, definiti retrotrasposoni target-primed (retrotrasposoni-TP), sono più semplici e antichi dei retrotrasposoni LTR (Curcio e Derbyshire, 2003). In generale l'mRNA viene retrotrascritto dal momento in cui la endonucleasi effettua il taglio del sito target, ciò libera l'estremità 3'-OH che viene usata come primer per la retrotrascrizione. Per spiegare la retrotrascrizione sono state proposte due teorie: una prevede che un filamento del DNA accettore si leghi al cDNA attraverso una micromologia e a partire dall'OH-3' libero inizi la sintesi del secondo filamento di DNA, l'altra teoria, invece, prevede che la RT si leghi al DNA target e utilizzando l'mRNA come stampo viene sintetizzato il cDNA. Dal momento che anche la endonucleasi taglia entrambi i filamenti di DNA in modo sfalsato, anche, questo meccanismo di trasposizione genera dei TSD.

1.2.3.3 EFFETTI DEI TRASPOSONI SUL GENOMA

I TE sono degli innovatori del genoma poiché possono conferire caratteri vantaggiosi per l'ospite e in un arco temporale evoluzionistico consentono anche la speciazione, difatti, nei mammiferi i taxa che hanno sperimentato di recente questi fenomeni sono anche quelli con il maggior numero di TE attivi (Ricci et al., 2018). Comunque, non mancano anche gli effetti deleteri che non saranno però discussi dal momento che sono degli incidenti di percorso che si verificano nel corso dell'evoluzione ed è per questo che gli ospiti hanno evoluto dei meccanismi di silenziamento volti al controllo della trasposizione.

1.2.3.3.1 LA TRASPOSIZIONE: FONTE DI ADATTAMENTO ALLE CONDIZIONI DI STRESS

Le condizioni di stress abiotico (Jardim et al., 2015; Roquis et al., 2021) e biotico (Mhiri et al., 1999) possono indurre la trasposizione, ciò produce delle mutazioni come: delezioni, duplicazioni o riarrangiamenti cromosomici, e se favorevoli garantiscono l'adattamento allo stress. Eventi vetusti di trasposizione sono stati rilevati nel genere Vitis dove il trasferimento orizzontale (HT) di alcune famiglie di TE è stata la risposta alle condizioni di freddo estremo verificatesi tra il medio Eocene e il precoce Oligocene e laddove gli elementi hanno dato un vantaggio evolutivo o tuttalpiù neutro sono stati mantenuti dalla selezione naturale (Park et al., 2021). In *M. fructicola*, lo stress indotto dalla somministrazione di un inibitore della demetilazione (DMI) e di un inibitore della sintesi dei chinoni (QoI) ha condotto al movimento di un trasposone denominato Mftc1 (Chen et al., 2015). Nel fungo patogeno Zymoseptoria tritici i riarrangiamenti prodotti dalla perdita di un cluster di TE a cui era associato il gene Zt-8-609, un elicitore, hanno prodotto dei ceppi virulenti (Hartman et al., 2017). In Magnaporthe grisea la trasposizione del trasposone Pot3 nel promotore del gene Avr-Pita (elicitore) ha consentito al patogeno di attaccare anche le varietà di riso resistenti (Singh et al., 2014).

1.2.3.3.2 GLI ELEMENTI TRASPONIBILI: STRUMENTI DI REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENETICA

I TE a volte si comportano come sequenze regolatrici dell'espressione genica. Questo accade ad esempio con le sequenze MITE, trasposoni a DNA non autonomi, che sono il bersaglio della metilazione ciò limita l'accesso alla polimerasi e reprime l'espressione genica, di geni, prossimi al sito della metilazione (Wei et al., 2014; Xin et al., 2021). In alcuni organismi la metilazione è guidata dagli small RNA (sRNA) e, poiché, le vie degli sRNA sono spesso attivate dal riconoscimento dell'omologia vien da sé che sequenze altamente ripetute e omologhe come i trasposoni siano il bersaglio della metilazione. Un esempio di un gene regolato dalla metilazione a carico di TE è il gene FWA di A. thaliana, in prossimità del gene si trovano due sequenze omologhe di tipo SINE, queste sequenze, bersaglio della metilazione, esprimono il fenotipo: fioritura precoce, laddove manca la ripetizione in tandem il fenotipo è fioritura tardiva (Chan et al., 2006). Anche i geni di resistenza agli stress abiotici e biotici nelle piante sono regolati allo stesso modo e quindi quando vi sono condizioni normali il gene è sottoespresso (downregulated) ma quando si verificano stress biotici o abiotici intervengono le demetilasi che consentono la sovraespressione (*upregulation*) del gene e la risposta allo stress (Le et al., 2014). Nei geni di resistenza questo processo è importante poiché le proteine da questi trascritte in condizioni normali non producono alcun vantaggio ma bensì richiedono un dispendio di energia e in alcuni casi, i trascritti, possono essere deleteri per la normale attività cellulare, in questo contesto è quindi facile che la selezione naturale abbia favorito quei genotipi che presentavano in prossimità di questi geni un qualche meccanismo di regolazione.

1.2.3.3.3 IL TRASFERIMENTO ORIZZONTALE (HT) DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI, FONTE DI INNOVAZIONE

In alcuni casi i TE possono anche essere oggetto di HT, ovvero, sono trasferiti da un ospite ad un altro che appartiene ad un diverso taxon e, quindi, in cui è impossibile la riproduzione sessuale. Schaack et al., (2010) affermano che l'HT dei TE (HTT) è molto più frequente di quello che riguarda i singoli geni (HTG). L'opinione di Panaud (2016) è che HTT sia lo strumento con il quale i TE sfuggono dal controllo dei meccanismi di silenziamento genetico.

La diffusione si crede avvenga attraverso vettori virali e consente a questi elementi, molti dei quali ancora attivi, (Panaud 2016; Loiseau et al., 2021) di apportare sostanziali cambiamenti nel nuovo genoma ospite. Pace et al. (2008), ad esempio, trovano che l'elemento SPACE INVADERS (SPIN) si è diffuso attraverso HT in diverse specie della superclasse *Tetrapoda*. Nei topi è stata trovata la forma chimerica della trasposasi di SPIN, in questo caso un TE diffusosi con meccanismi di HT ha fornito un nuovo gene all'ospite. Altro elemento andato incontro ad HTT è il gene di virulenza ToxhAT che è fiancheggiato da due sequenze TIR ed è stato

trovato in tre funghi, ovvero: Parastagonospora nodorum, Pyrenophora triticirepentis e Bipolaris sorokiniana (McDonald et al., 2019).

1.2.3.4 MECCANISMI DI SILENZIAMENTO DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI

Per evitare gli effetti deleteri dei TE è opportuno che l'organismo sia munito di meccanismi di silenziamento che controllino la trasposizione; nei funghi molti meccanismi di silenziamento adottano gli sRNA come guida (soppressione del RNA durante la trascrizione, somatic quelling, sex-induced silencing (SIS), meiotic silencing by unpaired DNA (MSUD), silenziamento indotto dai danni al DNA e metilazione indotta dai disiRNA) altri come la repeat-induced point mutation (RIP) e mehylation induced premeiotically (MIP) sono indipendenti dagli sRNA e utilizzano altre strategie per scegliere il bersaglio della loro azione (Dang et al., 2011; Gladyshev 2017).

1.2.3.4.1 INTRODUZIONE: GLI SMALL (S)RNA

Gli sRNA sono piccoli frammenti di RNA e sono sintetizzati attraverso la trasformazione operata da opportuni meccanismi proteici che agiscono su:

- double stranded RNA (dsRNA) blunt end;
- RNA corti o lunghi con struttura a forcina;
- RNA senso o antisenso;
- RNA "aberrante" (aRNA), comunque, convertito in dsRNA da una RNAdipendente RNA polimerasi (RdRP) (Svoboda, 2020).

I sistemi che usano il dsRNA per la sintesi degli sRNA sono afferenti alla via degli RNA interference (RNAi) in questa via sono inclusi solo gli *small interfering* RNA (siRNA) (Svoboda, 2020) gli altri sistemi che alcuni autori come Shabalina e Koonin (2008) individuano nella via degli RNAi sono invece a sé stanti e sono la via dei *micro*-RNA (miRNA) e via dei *piwi interacting* RNA (piRNA). Nei funghi oltre alla via degli siRNA, negli ultimi anni sono emerse delle altre vie come quella dei qiRNA, afferente alla via degli RNAi, o come la via dei microRNA-like (milRNA) (Lee et al., 2010; Wang et al., 2018) omologo della via dei microRNA (disiRNA) (Lee et al., 2010; Dang et al., 2013). Poiché la funzione svolta dalla via
dei milRNA, trovata in Neurospora crassa (Lee et al., 2010) e Trichophyton rubrum (Wang et al., 2018), non è ancora conosciuta (Dang et al., 2011) e siccome non è possibile sapere se è correlata direttamente o indirettamente al silenziamento dei TE, non verrà discussa. Gli RNA sintetizzati nel sistema siRNA hanno una lunghezza di 20-30 pb e sono prodotti dal clivaggio da parte di una ribonucleasi III (RNasi III) o Dicer di una molecola di dsRNA. In alcuni sistemi il dsRNA viene sintetizzato da una RNA-dipendente RNA polimerasi (RdRP). Gli siRNA si legano ad una proteina argonaute e il sistema è guidato in un sito omologo alla sequenza espressa dal siRNA (Svoboda 2020) e con delle variazioni al sistema si sviluppa l'attività di silenziamento. Gli sRNA possono essere utilizzati per il silenziamento post-trascrizionale, prodotto, dal clivaggio di molecole di mRNA oppure dalla soppressione della traduzione (Höck e Meister 2008) o può essere prodotto dalla metilazione del DNA, nel Arabidopsis thaliana il complesso responsabile della metilazione è infatti guidato dagli siRNA e da una ARGONAUTE 4/6 (Matzke e Mosher 2014; Matzke et al., 2015). La maggior parte delle proteine argonaute svolgono la loro azione nel citoplasma (Höck e Meister 2008) o in alcuni casi anche nel nucleo (Guang et al., 2008; Matzke e Mosher 2014; Matzke et al., 2015). Nel citoplasma si trovano dei granuli privi di membrana di natura ribonucleoproteica (RNP) che prendono il nome di processing body (PB) che a detta di alcuni sono il centro delle attività di silenziamento degli RNA ad opera della via degli siRNA (Jagannath e Wood, 2009; Xiao et al., 2021). Questo potrebbe però essere un bias cognitivo, difatti, questa valutazione viene spesso fornita da chi mostra con tecniche di fluorescenza che le proteine argonaute si localizzano principalmente all'interno di questi granuli. Secondo i dati raccolti da Leung e Sharp (2013) se da una parte è vero che le proteine argonaute marcate con dei fluorofori mostrano una fluorescenza nei PB 10 volte maggiore rispetto a quella del citoplasma, dall'altra parte è anche vero che solo l'1% di queste proteine argonaute sono localizzate all'interno dei PB. Quindi, è probabile che siano le proteine argonaute diffuse nel citoplasma ad essere la componente più importante in questi fenomeni di silenziamento (Pitchiaya et al., 2019). All'interno di questo modello base nei funghi sono presenti delle varianti, in base, al meccanismo che porta all'attivazione del silenziamento, agli attori proteici che intervengono e al momento in cui questa risposta viene attivata distinguiamo vari meccanismi di silenziamento.

1.2.3.4.2 SOPPRESSIONE COTRASCRIZIONALE DEL RNA

Questo tipo di silenziamento si verifica dopo che è avvenuta la trascrizione di un gene codificante una proteina in pre-mRNA e deve avvenire la maturazione e produzione del mRNA. La maturazione richiede l'intervento di un complesso proteico denominato splicesoma il quale elimina gli introni dal filamento di premRNA. Nello splicesoma si trova anche un complesso RNA-dipendente RNA polimerasi, denominato Spliceosome-Coupled And Nuclear RNAi (SCANR), responsabile della sintesi dei dsRNA (Dumesic et al., 2013). In questo meccanismo di silenziamento il riconoscimento di un mRNA come bersaglio è dovuto al fatto che nello splicesoma i pre-mRNA dei TE permangono per molto tempo visto che sono dotati di introni sub-ottimali (Dumesic e Madhani, 2013) ne deriva che poiché splicesoma e SCANR sono in competizione cinetica tra loro la condizione di stallo promuove la sintesi dei dsRNA (Dumesic et al., 2013). La **Figura 9** mostra le fasi che portano alla produzione degli siRNA.

I dsRNA attraversano il nucleo per finire nel citoplasma, sono trasformati da una proteina Dicer in siRNA e da qui una proteina argonaute li lega e li usa per il silenziamento post-trascrizionale, ovvero per il clivaggio degli mRNA di sequenze bersaglio.



Figura 9. Sono mostrate le due vie seguite dal complesso splicesoma/SCANR. Nel caso d'introni normali si ottiene l'mRNA, nel caso d'introni sub-ottimali si ottengono prima i dsRNA e poi gli siRNA che saranno utilizzati da una proteina argonaute per il silenziamento post-trascrizionale. Tratta da Dumesic et al. (2013).

1.2.3.4.3 SOMATIC QUELLING

Questo meccanismo è stato individuato nel fungo *Neurospora crassa* (Romano e Mancino, 1992) e sfrutta la via degli RNAi. Le sequenze riconosciute come target sono le sequenze di DNA ripetuto (Dang et al., 2011). Il meccanismo sfrutta le proteine QDE-1, QDE-2, DCL-1 e DCL-2, queste svolgono rispettivamente funzioni di RdRP, argonaute e Dicer-like. Per la QDE-1 è stata dimostrata anche un'attività DNA-dipendete RNA polimerasi (DdRP), quindi, questa polimerasi potrebbe essere responsabile della produzione degli aRNA e dsRNA (Lee et al., 2009). I dsRNA diventano il bersaglio della proteina Dicer-like grazie alla quale si ottengono gli siRNA. La proteina argonaute attraverso un'azione di slincing e l'attività della endonucleasi (QIP) degrada uno dei due filamenti del siRNA e attiva il complesso che inizia il clivaggio degli mRNA con sequenza omologa al siRNA (Dang et al., 2011).

1.2.3.4.4 MEIOTIC SILENCING BY UNPAIRED DNA (MSUD)

Descritto nella *Neurospora crassa* (Shiu et al., 2001), insieme al sistema Repeat Induced Point Mutation (RIP), interviene durante la riproduzione sessuale, in particolare, la RIP opera prima della cariogamia (Shiu et al., 2001) mentre MSUD opera in profase I della meiosi (Xiao et al., 2021). La MSUD viene attivata dopo un processo di *meiotic trans-sensing* che si verifica solo nella fase di zigote quando i cromosomi dei due nuclei aploidi si appaiano e attraverso un confronto per omologia svolto dalla proteina SAD-6 (Samarajeewa et al., 2014) emergono dei segmenti discreti di DNA a singolo filamento che sono il bersaglio della MSUD.

I responsabili proteici della MSUD sono la SAD-1 (gene: *Suppressor of ascus dominance-1*, Sad-1) una RdRP, la SMS-2 (gene: *Suppressor of meiotic silencing-2*, Sms-2) un argonaute, la SMS-3 (gene: *Suppressor of meiotic silencing-3*, Sms-3) una proteina Dicer simile, la SAD-2 una proteina con attività di scaffold, la SAD-3 una elicasi e la QIP. La SAD-2 è responsabile dell'aggancio alla regione perinucleare (dove il complesso proteico della MSUD svolge attività di silenziamento post-trascrizionale) e dell'assemblaggio delle singole unità nel complesso proteico della MSUD (Decker et al., 2015). La SAD-1, aiutata dalla elicasi (SAD-3), produce il dsRNA a partire da un aRNA che deriva dalla regione non omologa, successivamente grazie all'opera della Dicer (SMS-3) si ha il clivaggio del dsRNA e la produzione di siRNA. Gli siRNA vengono convertiti dalla QIP in siRNA a singolo filamento e legati alla SMS-2, ha avvio, l'azione di clivaggio degli mRNA con sequenza omologa (Decker et al., 2015).

1.2.3.4.5 SEX INDUCED SILENCING

Studiato nel *Cryptococcus neoformans* la SIS è attiva nella fase premeiotica ed ha come bersaglio le sequenze ripetute in tandem, ciò la differenzia dalla MSUD; maggiore è il numero delle copie maggiore è la risposta (Wang et al., 2010). Inoltre, l'attività di silenziamento si è osservata sia in individui con lo stesso *mating type* che in individui con diverso *mating type* (Wang et al., 2013). Le proteine coinvolte in questa via sono la Rdp1 - proteina RdRP - che ha localizzazione nucleare e Ago1-proteina argonaute, Dcr1 e Dcr2 – due proteine Dicer - che si trovano invece nel citoplasma (Wang et al., 2010).

1.2.3.4.6 IL SILENZIAMENTO INDOTTO DAI DANNI AL DNA

Questa via scoperta in *N. crassa* somiglia alla via del somatic quelling, poiché, coinvolge gli stessi attori molecolari (QDE-1, QDE-2, DCL-1 e DCL-2) ma le differenze stanno nel fatto che ad essere prodotti sono qiRNA e la via è attivata solo in presenza di rotture del DNA (Lee et al., 2009). I qiRNA sono degli RNAi più corti degli siRNA, inoltre, si originano da aRNA prodotti da geni che codificano per i ribosomal DNA (rDNA) e quindi la loro azione è mirata al silenziamento degli rRNA ed essendo questi componenti dei ribosomi si ha un'inibizione della sintesi proteica (Lee et al., 2009).

1.2.3.4.7 METILAZIONE INDOTTA DAI DISIRNA

I disiRNA sono stati studiati in *N. crassa* (Lee et al., 2010) e non usano la Dicer, da ciò, nasce il nome. In Dang et al., (2013) sono stati giudicati responsabili di un processo di metilazione definito disiRNA loci DNA methylation (DLDM) che produce la metilazione sui promotori che codificano i disiRNA. La metilazione, dei promotori dei geni codificanti i disiRNA, inibisce l'espressione dei geni limitrofi è per questo che i geni codificanti i disiRNA si trovano in regioni cromosomiche ricche di geni codificanti (Dang et al., 2013). Il meccanismo ad oggi è ancora poco conosciuto ma sappiamo che la metilazione è attivata dalla trascrizione convergente e per il mantenimento della metilazione è necessario che il DLDM sia mantenuto attivo (Dang et al., 2013).

1.2.3.4.8 MECCANISMI DI SILENZIAMENTO INDIPENDENTI DAGLI SRNA: Repeat Induced Point (RIP) Mutation

I meccanismi della Repeat Induced Point Mutation (RIP) e Methylation-Induced Premeiotically (MIP), che agiscono nei funghi, sono indipendenti dagli sRNA e il riconoscimento delle sequenze è mediato dall'omologia. Entrambi i processi si verificano prima della meiosi: la RIP produce delle mutazioni irreversibili mentre la MIP conduce alla metilazione un processo reversibile durante la crescita vegetativa. La RIP in *N. crassa* conduce alla mutazione citosina – a – timina nei dinucleotidi citosina-adenina, in particolare l'innesco di questo meccanismo si ha nelle sequenze ripetute in tandem con sequenze di 400 pb con un'omologia almeno del 80% mentre quando le duplicazioni non sono vicine sono necessarie sequenze omologhe >1 kb. Questo meccanismo è stato descritto per diverse specie di funghi appartenenti ai *Basidiomycota* e *Ascomycota* (Horns et al., 2012). Nel fungo *Leptosphaeria maculans* solo lo 0,01% di sequenze ripetute non in tandem e di lunghezza >5.7 kb ha subito l'azione della RIP, ciò indica che in ogni specie l'efficienza della RIP, la lunghezza delle sequenze e l'identità richiesta per innescare il meccanismo sono diverse (Van de Wouw et al., 2019). La proteina responsabile della RIP è stata definita "*RIP defective*" (RID) ed è omologa alla proteina codificata dal gene masc1 importante nella MIP (Gladyshev, 2017).

1.2.3.4.9 METHYLATION-INDUCED PREMEIOTICALLY

Nella MIP il riconoscimento dell'omologia consente la metilazione delle citosine, questo processo è stato scoperto in *Ascobolus immersus* (Barry et al., 1993) e coinvolge l'attività di almeno due metiltrasferasi codificate dal gene masc1 e masc2 (Malagnac et al., 1999). La MIP in *A. immersus* viene attivata con sequenze omologhe lunghe almeno 300 pb (Goyon et al., 1996).

2 OBIETTIVI DELLA TESI

Monilinia fructicola, M. fructigena e Monilinia laxa sono funghi appartenenti agli Ascomiceti, inclusi nella famiglia delle Sclerotiniaceae. Sono gli agenti responsabili principali del marciume bruno, una delle malattie più importanti e comuni che colpisce le drupacee e pomacee sia in campo che nel postraccolta, causando pesanti perdite in termini di resa e riducendo la conservabilità dei frutti. Le specie di Monilinia sono diffuse in tutti i continenti. Segnalate per la prima volta nella prima metà del XX secolo negli Stati Uniti, sono di fatto diffuse in tutte le zone temperate e calde dove sono coltivate le pomacee e le drupacee. In Europa, M. laxa è stata la prima ad essere identificata come agente eziologico del marciume bruno sulle drupacee negli anni '70. In Italia, tutte e tre le specie sono attualmente presenti con un incremento crescente della specie M. fructicola che, con M. laxa, è quella prevalente nelle drupacee mentre M. fructigena colpisce principalmente le pomacee. L'impatto del marciume bruno è notevole, anche solo considerando gli USA, si stima una perdita sul mercato dei frutti di circa 4,4 miliardi di dollari. In generale le perdite annuali universali dovute a focolai di malattie sono state stimate in 1,7 miliardi di euro. In condizioni ambientali favorevoli alla malattia, il marciume bruno è stato associato fino all'80% dell'incidenza della perdita di frutti durante il postraccolta. Attualmente, un efficace controllo del marciume bruno nel frutteto dipende da strategie integrate che si basano in gran parte su irrorazione di fungicidi e pratiche colturali.

Restano da chiarire i meccanismi genetici alla base della diversità nelle popolazioni di *Monilinia* e le interazioni con le piante ospiti. L'analisi delle variazioni sia su piccola che su larga scala tra i genomi fungini fornisce informazioni sulla diversità genotipica e fenotipica sia stabile che transitoria, nonché sulla speciazione, e dà anche indizi sui loro meccanismi evolutivi. Recentemente sono state sequenziate e rese pubbliche per la comunità scientifica bozze complete di genomi di alta qualità di *M. fructicola* ceppo Mfrc123, *M. laxa* ceppo Mlax316 e *M. fructigena*, ceppo Mfrg269. Questi genomi assemblati *de-novo* hanno migliorato quelli già disponibili per queste tre specie fornendo al contempo risorse genetiche aggiuntive. Inoltre, rappresentano utili fonti per le indagini sulla storia evolutiva del genere *Monilinia* all'interno della famiglia delle *Sclerotiniaceae*, nonché sui meccanismi di patogenicità e sulle interazioni ospite-

patogeno. In particolare, confronti dei genomi mediante analisi della sintenia, cioè del modo in cui i geni omologhi sono ereditati nelle specie e in che ordine sono conservati, è fondamentale per indagare le distanze filogenetiche tra specie ed esplorare sia il verificarsi di eventi di riarrangiamento quindi della conservazione del genoma. Un importante fonte di variabilità con un ruolo riconosciuto nell'evoluzione adattativa e nella diversificazione dei genomi, sono gli elementi trasponibili (TE), segmenti di DNA capaci di spostarsi e inserirsi in diverse posizioni del genoma. I TE tendono a ospitare geni coinvolti nella patogenicità e nell'adattamento dell'ospite e possono evolvere a velocità più elevate rispetto al resto delle sequenze genomiche, per dare origine ai cosiddetti genomi "a due velocità". In questo lavoro di tesi è stata eseguita una prima analisi comparativa tra i genomi delle specie di Monilinia recentemente sequenziate prendendo come specie di riferimento i genomi ben definiti di B. cinerea e S. sclerotiorum strettamente imparentate e appartenenti alla famiglia delle Sclerotiniaceae. In questo studio sono state analizzate per la prima volta: (i) le relazioni sinteniche tra i genomi e le variazioni strutturali; (ii) l'abbondanza e le dinamiche evolutive dei loro TE.

3 MATERIALI E METODI

In questo lavoro di tesi, è stato condotto uno studio genomico di tipo comparativo relativo alle tre principali specie di *Monilinia* per le quali recentemente è stato ottenuto il completo genoma sequenziato ed annotato: *M. fructicola* (De Miccolis Angelini et al., 2019), *M. laxa* (Landi et al., 2020) e *M. fructigena* (Landi et al., 2018). In particolare, sono state analizzate: 1) le relazioni sinteniche tra i genomi di *Monilinia* per confrontare la loro variazione strutturale, includendo nell'analisi i genomi ben definiti di *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum*, selezionati come specie strettamente correlate appartenenti alla famiglia delle *Sclerotiniaceae*; 2) l'abbondanza e la dinamica evolutiva dei TE nei genomi di *Monilinia* rispetto a *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. 3) In un caso studio sono stati ricostruiti gli elementi TE, BOTY_I e Gypsy-2_BFB-I (Boty II) ed utilizzati per l'analisi delle relazioni evolutive/filogenetiche con specie di organismi selezionati nella banca genomica NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.1 GENOMI UTILIZZATI NELLO STUDIO COMPARATIVO

I genomi oggetto di questo lavoro di tesi sono stati ottenuti dalla banca genomica NCBI <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u> e relativi ai BioProjects PRJNA523200 *M. fructicola* (De Miccolis Angelini et al., 2019), PRJNA523196 *Monilinia laxa* (Landi et al., 2020), PRJNA470675 *M. fructigena* (Landi et al., 2018), PRJNA15632 *Botrytis cinerea* B05.10 (Van Kan et al., 2017) e PRJNA348385 *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 UF-70 (Derbyshire et al., 2017). In **Tabella 2** sono riportate le caratteristiche dei genomi analizzati nell'indagine comparativa.

	Isolato	Mfrc123	
M. fructicola	Origine	Bisceglie – Bari – Puglia	
	Ospite	Prunus avium	
	Lunghezza totale (Mb)	44 047 900	
	N° di scaffolds	20	
	Nº di geni	12 118	
	CDS	12,110	
	CDS Saaffalda N50 (ph)	2 502 822	
	Scattolds N50 (pb)	2,392,623	
		/ 40.70	
		40,73	
		Cisis del Celle Deri Duelle	
	Origine	Giola del Colle – Bari – Puglia	
	Ospite	Prunus avium	
	Lunghezza totale (pb)	42,814,844	
M. laxa	N° di scattolds	49	
	N° di geni	11,163	
	CDS	12,427	
	Scaffolds N50 (pb)	2,449,422	
	Scaffolds L50	8	
	CG%	41.26	
	Isolato	Mfrg269	
	Origine	Tursi - Matera - Basilicata	
	Ospite	Prunus domestica	
	Lunghezza totale (pb)	43,125,165	
M. fruitigang	N° di scaffolds	131	
M. frucilgenu	N° di geni	10,502	
	CDS	10,811	
	Scaffolds N50 (pb)	767,732	
	Scaffolds L50	20	
	CG%	42.10	
	Isolato	B05.10	
	Origine	N.D.	
	Ospite	N.D.	
	Lunghezza totale (pb)	42,630,066	
D	N° di scaffolds	18	
B. cinerea	N° di geni	N.D.	
	CDS	13,703	
	Scaffolds N50 (pb)	N.D.	
	Scaffolds L50	N.D.	
	CG%	42.00	
	Isolato	1980	
S. sclerotiorum	Origine	Olanda	
	Ospite	ND	
	Lunghezza totale (nh)	38 906 497	
	Nº di scaffolds	16	
	Nº di gani		
		и	
	CDS Seeffelde N50 (-1-)	11,130	
	Scattolus Nou (pb)	2,434,062	
	Scalloids LSU	/	
	CG%	41.33	

Tabella 2. Caratteristiche strutturali dei genomi utilizzati in questo studio. La sigla N.D. affianco ai parametri indicati nella tabella sta per "Non Disponibile".

3.2 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE

L'analisi sintenica è stata condotta utilizzando la piattaforma CoGe (https://genome volution.org/coge) (Lyons e Freeling, 2008) che include diversi strumenti utili per lo studio comparativo dei genomi. Lo studio macrosintenico è stato effettuato utilizzando il programma SynMap (Haug-Baltzell et al., 2017; Lyons et al., 2019) che individua le regioni sinteniche collineari tra due genomi a confronto. I geni ortologhi sono stati individuati utilizzando l'algoritmo Blast Z. Successivamente le sequenze ripetute in tandem sono state filtrate utilizzando blast2raw. Le regioni collineari sinteniche sono state individuate col il programma DAGChainer (Haas et al., 2004) impostando i seguenti parametri: 'relative gene order' e 'Maximum distance between two matches N°5'. Le indicazioni relative alla distanza evolutiva tra genomi sono state indagate analizzando le sostituzioni sinonime (Ks) calcolate impiegando l'algoritmo di Needleman-Wunsch (Needleman et al., 1970) in CodeML (Haug-Baltzell et al., 2015) del pacchetto PAML (Yang et al., 1997), integrato in SynMap. Inoltre, i valori di Ks sono stati analizzati in relazione alle seguenti classi: 1) divergenza di Ks ≤0,2; 2) da 0,21 a (0,4; 3) da (0,41 a 1,0; 4) da $(1,1 a 79; 5) \ge 80$ Ks. La rappresentazione grafica della effettuata macrosintenia è stata utilizzando il programma CIRCOS (http://circos.ca/citations/general/) installato sul sistema operativo Ubuntu v. 21.10 (https://ubuntu.com/download/desktop). Per la stima della profondità sintenica, si è utilizzato SynFind (Tang et al., 2015) che valuta la poliploidia ovvero il numero di volte che una regione di un genoma è sintenica con un'altra regione di un altro genoma. SynFind è stato adoperato utilizzando la variante BLAST con una "gene window size" 40 e un "minimum number of gene" di 4. Il programma SynFind è stato utilizzato per lo studio microsintenico di specifici geni. In dettaglio abbiamo analizzato le relazioni sinteniche tra i geni utilizzando come query i geni di un genoma rispetto ad altri genomi analizzati. L'analisi di regioni specifiche in microsintenia è stata effettuata utilizzando lo strumento GEvo (Fajkus et al., 2008) in CoGe.

3.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI

Per lo studio dei TE è stato utilizzato un approccio basato sulla identificazionedenovousandoilprogrammaRepeatModeler

(http://www.repeatmasker.org/RepeatModeler, version 1.0.10) (Smit e Hubley, 2015) combinato con la ricerca per omologia effettuata con RepeatMasker (v. 4.0.7) e CENSOR https://www.girinst.org/censor/ (Jurka et al., 1996; Kohany et al., 2006). In dettaglio l'annotazione de novo dei TE è stata effettuata con il software RepeatModeler che utilizza quattro programmi con le seguenti funzioni: RMBlast (http://www.repeatmasker.org/RMBlast.html) implementa il programma NCBI blastn per la ricerca delle omologie, RepeatScout v. 1.0.5 (Price et al., 2005) utile per identificare le sequenze ripetute, RECON v. 1.08 (Bao ed Eddy 2002) capace di identificare gli elementi non conservati e Tandem Repeats Finder (TRF) v. 4.07b (Benson 1999) necessario per la costruzione della libreria utile per l'identificazione delle famiglie transposoniche. Le famiglie consenso <genome.families.fa>, generate da RepeatModeler sono state corrette manualmente e le sottofamiglie di consenso de novo sono state scoperte e classificate utilizzando il software CENSOR utilizzando il database degli elementi trasponibili "funghi" [Fungi Species/Taxa Search: Fungi (NCBI Taxonomy ID: 4751) 9 families in ancestor taxa; 2475 lineage-specific families] presenti nella libreria RepBase, disponibile sul sito web del Genetic Information Research Institute (GIRI) (<u>http://www.girinst.org/repbase</u>) [consultato il 1 giugno 2020] (Kapitonov e Jurka 2008; Kapitonov et al., 2009). Infine, per l'indagine con RepeatMasker, le librerie de novo sono state combinate con quelle già presenti nel programma (RepeatMaskerLib.h5, Dfam con RBRM, v 3.2; Data: 2020-07-02 Famiglie: 318.520) e con la libreria Repbase (20181026) Data: 2020-07-02) (Kapitonov e Jurka, 2008). I TE sono stati smascherati nel genoma di Monilinia spp, ignorando le ripetizioni a bassa complessità (-nolow) ed è stata eseguita una (-s) ricerca sensibile. Il file prodotto conteneva le annotazioni e le posizioni sul genoma di tutti gli TE identificati.

3.4 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEI TE

Per stimare l'età evolutiva dei TE abbiamo eseguito un'analisi copia-divergenza degli elementi basata sulle distanze in base al calcolo proposto da Kimura (1980) a due parametri (valori K). Le distanze di Kimura tra le copie del genoma e il consenso TE dalla libreria sono state determinate utilizzando CALCDIVERGENCEFROMALIGN.PL e CREATEREPEATLANDSCAPE.PL (nella directory RepeatMasker) sui file di allineamento (.align files) dopo il mascheramento del genoma. I tassi di transizione e trasversione sono stati calcolati per questi allineamenti, e poi trasformati in distanze di Kimura con la seguente equazione:

$K = -1/2 \ln(1 - 2p - q) - 1/4 \ln(1 - 2q)$

dove q è la proporzione di siti con trasversioni, e p è la proporzione di siti con transizioni. La percentuale e la frequenza dei TE sono stati calcolati in base all'ordine delle loro classi.

3.5 SOVRAPPOSIZIONE DI TE E GENI CODIFICANTI E RILEVAMENTO DI DOMINI PROTEICI CORRELATI AI TE

Con l'obiettivo di predire i principali elementi TE potenzialmente attivi (autonomi) o degenerati (non autonomi) (Wicker et al., 2007; Santana et al., 2012), la relazione tra le regioni codificanti (CDS) e gli elementi TE sono state analizzate secondo la seguente strategia. La sovrapposizione tra TE e geni annotati è stata rilevata utilizzando CLC Genomics Workbench e inviata a InterProScan utilizzando la piattaforma OmixBox 2.0.8 per la ricerca dei domini. Inoltre, gli open reading utilizzando frame (ORF) sono stati previsti ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) e analizzati da **SmartBLAST** (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ smartblast/smartBlast.cgi) contro il database UniProtKB/Swiss-prot fornito da NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) e BLASTX per rilevare i domini conservati utilizzando lo strumento di ricerca su CD. Gli elementi selezionati sono stati analizzati utilizzando gli strumenti GEvo e FeatView su piattaforma CoGe per analizzare le caratteristiche relazionali con i geni annotati.

3.6 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI ELEMENTI LTR/GYPSY: BOTY_I E GYPSY-2_BFB-I

Un'analisi dettagliata ha riguardato gli elementi annotati come BOTY_I e Gypsy-2_BFB-I, quest'ultimo indicato in Zhao et al. (2009) come Boty-II, sono elementi Gypsy, appartenenti alla classe dei retrotrasposoni LTR. Questi elementi sono stati identificati e descritti su Botrite, pertanto, visto che tali trasposoni sono anche ben rappresentati nel genoma delle specie studiate, sono state prese in considerazione le loro sequenze per valutare il loro stato di conservazione e fare

inferenza sul come, questi TE, sono tramandati in specie che appartengono a generi diversi. Allo scopo di ricostruire la sequenza specifica di tali elementi si è ricercato un programma d'identificazione *ex novo* LTR_FINDER (Xu e Wang 2007) che fornisce buoni risultati in termini di *"sensitivity"* e *"specificity"*. In dettaglio la *sensitivity* rileva l'incidenza dei falsi negativi sui veri positivi mentre la *specificity* rileva il numero di falsi positivi sui veri positivi. LTR_FINDER è eseguibile attraverso sito web <u>http://tlife.fudan.edu.cn/tlife/ltr_finder/</u>, i parametri di ricerca impostati sono stati:

- *Auto mask highly repeated regions'* trova più rapidamente i TE posti in centrioli e telomeri;
- 'Use ps scan to predict IN (core), IN (c-term) and RH' trova i domini proteici tipici dei TE utilizzando lo strumento ps_scan (de Castro et al., 2006) (<u>http://www.expasy.org/prosite/</u>) che maschera il database PROSITE (Sigrist et al., 2013) per identificare i domini proteici conservati;
- 'Predicted PBS by using which tRNA database' necessario per identificare il PBS; la sequenza viene mascherata con tRNA di un organismo scelto come riferimento nel Genomic tRNA Database (<u>http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/</u>) Data: 2007-07-17) (Chan e Lowe 2009). L'organismo scelto è stato *S. cerevisiae* utilizzato anche da Zhao et al. (2009) per *B. cinerea*.

Al programma sono stati sottoposti nella loro interezza i genomi di: *B. cinerea*, *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa* e *S. sclerotiorum*.

Ottenute le sequenze dei retrotrasposoni LTR si è proceduto alla ricerca manuale dei BOTY_I (Diolez et al., 1995) e Gypsy-2_BFB-I (Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2011) sulla base delle posizioni identificate da CENSOR e degli elementi caratteristici, ovvero, i PBS e i PPT (**Tabella 3**).

Tabella 3. Sequenza degli elementi caratteristici PBS e PPT in BOTY_I (Diolez et al., 1995) e Gypsy-2_BFB-I (Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2011)

	BOTY_I	GYPSY-2_BFB-I
PBS	5'-TTTGAGCAC-3'	5'-TTGTACCAT-3'
PPT	5'-AGGCTAAGAAGGGGATAG-3'	5'-GCCTTGAGCGGGGGGGTAC-3'

Gli elementi BOTY_I e Gypsy-2_BFB-I sono poi stati analizzati con il programma CD-NCBI (Marchler-Bauer e Bryant, 2004) per valutare, presenza e ordine, dei domini caratteristici: PR, RT, RH, IN e CH, anche questi descrittori fondamentali per identificare la classe di appartenenza dei TE.

CD-NCBI (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</u>), è stato usato per il mascheramento dei TE ed è stato utilizzato il database *CDD v3.18 – 55570 PSSMs* secondo parametri predefiniti [consultato il 15 ottobre 2020].

Per chiarire le relazioni filogenetiche esistenti tra gli elementi - più conservati - dei BOTY_I e Gypsy-2_BFB-I sono stati raccolti - dal database del NCBI [consultato il 18 ottobre 2020] - retrotrasposoni provenienti da diversi organismi e da alcuni virus (**Tabella 4**). Le sequenze nucleotidiche di ciascun elemento sono state tradotte in sequenze amminoacidiche utilizzando lo strumento EMBOSS sixpack (Madeira et al., 2019) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_sixpack/), fornito dallo European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Con i riferimenti bibliografici è stata individuata la sequenza *pol*. Le sequenze sono state allineate utilizzando il programma MEGA X (version 10.2.4) (Kumar et al., 2018) (https://www.megasoftware.net/) secondo parametri predefiniti. Con ricerca manuale sono stati estratti i domini RT (Xiong ed Eickbush 1988), RH (Majorek et al., 2014) e IN (Khan et al., 1991) comunemente usati per le analisi filogenetiche (Malik ed Eickbush 1999; Neumann et al., 2019). L'analisi evolutiva è stata condotta con MEGA X sui domini precedentemente allineati utilizzando il metodo Maximum Likelihood con 1.000 prove bootstrap.

Elemento - Virus	lemento - Virus Specie ospite Accessione in NCBI		Bibliografia	
Athilla 1-1	Arabidopsis thaliana	AB005248.1	(Marco e Marin 2008; Marín e Lloréms 2000)	
Baboon endogenous virus	Papio spp.	NC 022517.1	(Kato et al., 1987)	
Beetle 1	Beta vulgaris	AJ539424.1	(Weber e Schmidt 2009)	
blastopia	Drosophila melanogaster	Z27119.1	(Rizzon et al., 2002)	
Cer1	Caenorhabditis elegans	U15406.1	(Bowen e McDonald 1999)	
CfT-1	Passalora fulva	AF051915.1	(McHale et al., 1992)	
Copia	D. melanogaster	X04456.2	(Mount e Rubin 1985)	
del	Lilium henryi	X13886.1	(Smyth et al., 1989)	
grh	Magnaporthe grisea	M77661.1	(Dobinson et al., 1993)	
Gypsy	D. melanogaster	M12927.1	(Marlor et al., 1986)	
Human immunodeficiency virus 1	Human immunodeficiency Homo sapiens NC 00 virus 1		(Watts et al., 2009)	
IFG7	Pinus radiata	AJ004945.1	(Kossack e Kinlaw 1999)	
mag	Bombyx mori	X17219.1	(Zhou e Haymer 1997; Michaille et al., 1990)	
MAGGY	M. grisea	L35053.1	(Farman et al., 1996)	
MarY1	Tricholoma matsutake	AB028236.1	(Murata e Yamada 2000)	
mdg3	D. melanogaster	X95908.1	(Rizzon et al., 2002)	
MGRL-3	M. grisea	AF314096.1	(Kang 2001)	
micropia	D. melanogaster	X14037.1	(Rizzon et al., 2002)	
osvaldo	D. buzzatii	AJ133521.1	(Patazidis et al., 1999)	
REAL	Alternaria alternata	AB025309.1	(Kaneko et al., 2000)	
RIRE7	Oryza sativa	AB033235.1	(Kumekawa et al., 2001)	
Rous sarcoma virus	Gallus domesticus	NC 001407.1	(Withers e Beemon 2011)	
Skipper	Dictyostelium discoideum	AF049230.1	(Leng et al., 1998)	
Skippy	Fusarium oxysporum	L34658.1	(Anava e Roncero 1995)	
SURL	Tripneustes gratilla	M75723.1	(Springer et al., 1991)	
TED	Trichoplusia ni	NC 038512.1	(Friesen e Nissen 1990)	
Tekay	Zea mays	AF448416.1	(Fu e Dooner 2002)	
Tf2	Schizosaccharomyces pombe	L10324.1	(Weaver et al., 1993)	
Tom	D. ananassae	Z24451.1	(Tanda et al., 1994)	
Tvl	D. virilis	AF056940.1	(Andrianov et al., 1999)	
Ty3-1Saccharomyces cerevision		M34549.1	(Hansen e Sandmeyer 1990)	
Ulysses	D. virilis	X56645.1	(Zhou e Haymer 1997)	
Woot	Tribolium castaneum	U09586.1	(Beeman et al., 1996)	
yeti	Podospora anserina	EU697464.1	(Hamann et al., 2000; Espagne et al., 2008)	
yoyo	Ceratitis capitata	U60529.1	(Zhou e Haymer 1997)	
ZAM	D. melanogaster	AJ000387.1 (Leblanc et al., 1997		
17.6	D. melanogaster	X01472.1	(Saigo et al., 1984)	
297	D. melanogaster	X03431.1	(Inouye et al., 1986)	
412	D. melanogaster	X04132.1	(Yuki et al., 1986; Bertocchi et al., 2020)	

Tabella 4. Elenco degli elementi Gypsy trovati in altre specie e utilizzati per il confronto.

In seguito, l'indagine si è conclusa impiegando il programma ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) che considera codone di inizio la sequenza ATG e identificando tramite ricerca manuale i motivi del nucleocapside C-X₂-C-X₄-H-X₄-C (Bowen e McDonald, 1999), della PR con D,T/S,G (Bowen e McDonald 1999) e del cromodominio (Koonin et al., 1995) elemento caratteristico dei Cromovirus, tali informazioni hanno consentito di annotare la struttura di questi elementi.

4 RISULTATI

4.1 STUDIO DELLE RELAZIONI SINTENICHE

I geni codificanti presenti in *M. fructicola*, *M. laxa* e *M.* fructigena sono rispettivamente 13.784, 12.427 e 10.811. Il genoma di *M. fructicola* ha evidenziato 9.015 e 7.765 geni sintenici quando confrontato con quelli di *M. laxa* e *M. fructigena*, mentre 7.813 geni sono quelli risultati sintenici tra i genomi di *M. laxa* e *M. fructigena*. Il confronto complessivo ha evidenziato 7.398 geni condivisi tra le specie di *Monilinia*. Il confronto intergenere delle *Sclerotiniaceae* ha mostrato livelli sintenici elevati: 7.827, 7.930 e 6.824 dei 13.703 geni codificanti di *B. cinerea* sono, rispettivamente, risultati sintenici con *M. fructicola*, *M. laxa* e *M. fructigena* mentre 7.572, 7.640, e 6.623 degli 11.130 geni di *S. sclerotiorum* sono sintenici con *M. fructicola*, *M. laxa*, e *M. fructigena*. Complessivamente, 5.715 geni codificanti sono condivisi nelle cinque specie fungine testate (**Figura 10; Tabella 5**).



Figura 10. Diagrammi di Venn di geni codificanti sintenici omologhi univoci e condivisi identificati utilizzando SynMap tra *M. fructicola*, *M. laxa* e *M. fructigena* (**A**), o estendendo il confronto a *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* (**B**).

L'indagine sui geni ortologhi collineari ha rivelato un ordine genico altamente conservato tra i genomi di *Monilinia*. In particolare, i blocchi collineari sintenici identificati tra *M. fructicola* e *M. laxa* sono ampiamente conservati, con una media di 180 geni per 50 blocchi sintenici. Quindi, 143 e 136 blocchi sintenici con una media di circa 50 geni per blocco sono stati rilevati rispettivamente nei confronti *M. fructicola* / *M. fructigena* e *M. laxa* / *M. fructigena*. Come previsto, è stata rilevata una maggiore frammentazione dei blocchi sintenici confrontando le specie

Monilinia con *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Nei confronti con *B. cinerea* è stato contato un range di 411-419 blocchi sintenici mentre erano nel range 364-388 nei confronti con *S. sclerotiorum* (**Tabella 5**).

Tabella 5. Blocchi sintenici collineari ottenuti dall'analisi SynMap che mostrano la sintenia complessiva negli allineamenti a coppie tra i genomi di *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. fructigena*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*.

Confronto a coppie	Coppie di geni coinvolti	Blocchi Sintenici	Numero medio di geni per blocco
M. fructicola / M. laxa	9.015	50	180,3
M. laxa / M. fructigena	7.813	136	57,4
M. fructicola / M. fructigena	7.765	143	54,3
B. cinerea / M. fructicola	7.827	411	19,1
B. cinerea / M. laxa	7.930	414	19,2
B. cinerea / M. fructigena	6.824	419	16,3
S. sclerotiorum / M. fructicola	7.572	364	20,9
S. sclerotiorum / M. laxa	7.640	368	20,8
S. sclerotiorum / M. fructigena	6.623	388	17,1
S. sclerotiorum / B. cinerea	8.442	311	27,2

Tra le specie di *Monilinia* vi è un alto numero di geni in sintenia (Figura 11 A,B,C).



Figura 11. I CIRCOS mostrano i geni in sintenia dei confronti: *M. fructicola* (bianco) / *M. laxa* (nero) (**A**), *M. fructigena* (bianco) / *M. laxa* (nero) (**B**) e *M. fructicola* (nero) / *M. fructigena* (bianco) (**C**). La figura è composta da segmenti disposti a semicerchio, ciascuno dei quali è uno scaffold, neri o bianchi a seconda della specie. La dimensione di ogni scaffold è determinata dal numero di tacche presenti sopra ad ogni segmento, la sezione del segmento che è compresa tra due tacche grandi è 1 Mb.

L'indagine del dot plot tra i genomi di *M. fructicola* e *M. laxa* ha mostrato discontinuità nello stato di collinearità. L'indagine microsintenica ha mostrato che queste regioni genomiche corrispondono ad aree non codificanti ricche di AT (GC% < 20%) con lunghezza da ~ 70.000 a 110.000 pb. In queste regioni vi è un'alta densità di TE non autonomi/degenerati. Regioni omologhe simili sono assenti in *M. fructigena*. I geni che si trovano nei genomi di *M. fructicola* e *M. laxa*

sono sintenici con i geni situati nelle posizioni terminali di due scaffold di *M. fructigena*, questi ultimi sono però adiacenti a geni non sintenici annotati come TE attivi. I geni non in sintenia, trovati in *M. fructigena*, sono annotati come DNA polimerasi RNA-diretta (RdDP) la cui sequenza è relativa all'elemento Non-LTR/Tad1-2_Acap; il gene RdDP mostra il più alto contenuto di GC (>62%) del "codon wobble positions" suggerendo un probabile trasferimento orizzontale. Altre ipotetiche proteine trovate in questa regione con geni annotati ma non in sintenia si sovrappongono a trasposoni DNA del tipo Mariner o retrotrasposoni Non-LTR. Una delle 10 regioni omologhe non codificanti è mostrata nella **Figura 12**.



Figura 12. (A) Analisi di regioni che includono sequenze conservate non codificanti. Punto di interruzione del diagramma rilevato con lo strumento SynMap tra M. laxa, scaffold VIGI01000009, e M. fructicola, scaffold VICG01000010 sottolineato con una linea circolare blu e rossa. I dot-plot sintenici degli stessi scaffold di M. laxa o M. fructicola con M. fructigena, coinvolgono le regioni terminali degli scaffold QKRW01000012 e QKRW01000001 (B,C). Nel confronto dot-plot la linea verde indica l'ordine collineare sintenico in avanti, mentre il colore blu l'ordine inverso. I geni sintenici della coppia terminale sono stati riportati anche nella figura **D**. Le frecce blu e rosse indicano le stesse regioni genomiche indagate utilizzando lo strumento GEvo per lo studio microsintenico (**D**). Nella figura (**D**) sono riportati i geni sintenici (giallo) e non sintenici (rosa) tra le specie Monilinia. Nel pannello superiore sono mostrate le regioni ortologhe di M. fructicola, in M. fructigena QKRW01000001 (blocchi arancioni), M. fructigena QKRW01000012 (blocchi marrone chiaro) e M. laxa (blocchi marrone scuro). L'interruzione del dotplot rilevata nella figura (A), è indicata dal cerchio rosso tratteggiato nella figura (**D**). Queste regioni contengono alte ripetizioni di sequenze non codificanti relative a TE (Gypsy-2 PaPe-I; Mariner1 AO; FLIPPER; hAT-2 AmNi), con basso GC (<20%). In *M. fructigena* tali regioni sono vicine ai seguenti TE autonomi che condividono la posizione con i geni annotati come codificanti per: DNA polimerasi RNA dipendenti (RdDP) (TE = Tad1-2_Acap), proteina ipotetica (hp) (Mariner-12SS); I nomi delle proteine seguono la nomenclatura ufficiale UniProt https://www.uniprot.org/help/protein names

Il tasso di sostituzioni sinonime (Ks) è stato utilizzato per stimare il grado di evoluzione delle sequenze codificanti nelle regioni sinteniche (Figura 13). Nel complesso è stato rilevato un unico picco nei grafici dell'istogramma Ks, ciò testimonia, che i genomi delle specie studiate non presentano eventi di duplicazione. Il picco di Ks dei confronti intra-genere di Monilinia era caratterizzato dalla prevalenza del colore blu-viola, il che suggerisce che non ci sono cambiamenti considerevoli nei tassi di mutazione tra queste specie a livello dell'intero genoma. Il valore medio di Ks tra M. fructigena / M. laxa (Ksmedia = 0,273) era inferiore sia a quello di *M. laxa / M. fructicola* (Ks_{media} = 0,346) che a *M.* fructigena / M. fructicola (Ksmedia = 0,442). Sebbene le sequenze geniche codificanti tra le tre specie Monilinia siano ben conservate, questi dati supportano l'ipotesi che M. fructigena sia più vicino a M. laxa che a M. fructicola. Il confronto intergenere ha mostrato una prevalenza del colore verde-ciano, che enfatizza un numero maggiore di cambiamenti sinonimi rispetto ai cambiamenti evolutivi precedenti. In particolare, i valori di Ks più elevati nei confronti a coppie delle specie Monilinia con B. cinerea e S. sclerotiorum sono stati rilevati per M. fructigena (Ksmedia = 1,470, 1,023, rispettivamente) e *M. fructicola* (Ks_{media} = 1,356, 1,011, rispettivamente), mentre i più bassi erano per M. laxa (Ks_{media} = 1,058, 0,931, rispettivamente) (Figura 13). Questi risultati suggeriscono che il genoma di M. laxa è geneticamente più vicino a quelli di B. cinerea e S. sclerotiorum, rispetto ai genomi di M. fructigena e M. fructicola.



Figura 13. Analisi delle sostituzioni sinonime Ks (b, d, e, g, h, i, m, n, o, p) rilevate nel confronto tra i genomi di *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Gli isolati analizzati in questo studio allevati per sette giorni su PDA (Potato Dextrose Agar) sono mostrati lungo la diagonale (a, c, f, i, q). Nei grafici Ks, le sostituzioni più recenti (numeri inferiori di cambiamenti sinonimi) sono viola-blu (a sinistra), mentre le sostituzioni più antiche (numeri più alti di cambiamenti sinonimi) sono ciano-giallo-verde (a destra)

Un'analisi della distribuzione dei geni in classi di valori di Ks ha mostrato che le coppie di geni omologhi con Ks $\leq 0,2$ erano superiori al 60% nel confronto *M. laxa / M. fructigena* e raggiungevano il 28,3% e il 21,0% nei confronti tra *M. fructicola* e *M. laxa* o *M. fructigena*, rispettivamente. Questa distribuzione dei valori di Ks ha suggerito una più antica separazione di *M. fructicola* dalle altre due specie di *Monilinia*. La frequenza delle coppie di geni omologhi con Ks $\leq 0,2$ era inferiore all'1% nei confronti tra ciascuna specie di *Monilinia* e *B. cinerea* o *S. sclerotiorum* (**Figura 14**).



Synonymous substitution rate (Ks)

Figura 14. Frequenza delle sostituzioni Ks sinonimiche secondo le relazioni genomiche di *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. fructigena*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Viola (Ks $\leq 0,2$) è indicativo di mutazioni più recenti, ciano (0,21 \leq Ks $\leq 0,4$) di divergenza molto più lontana, verde (0,41 \leq Ks ≤ 1) di mutazioni più vecchie, rosso (1,1 \leq Ks \leq 79) di antichi eventi di duplicazione, mentre l'arancione (Ks \geq 80) viene interpretato come rumore di fondo.

Le proporzioni più elevate di geni con una profondità sintenica di 1 (indicativo di una singola regione genomica ortologa tra due specie) variano dall'80% al 95% in tutti i confronti a coppie tra le specie di *Monilinia* testate e dal 57% al 73% nel confronto rispettivamente con *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Una profondità sintenica >1 è stata rilevata più frequentemente (fino al 17%-18%) nei confronti a coppie con *M. fructigena* utilizzato come genoma di riferimento (**Tabella 6**).

Tabella 6. Profondità sintetica ottenuta dai confronti a coppie tra un genoma referente e uno preso come obiettivo di *M. fructicola*, *M. fructigena*, *M. laxa*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* secondo l'analisi SynFind.

Confronti a coppie	Profondità Sintenica				
(referente / obiettivo)	0	1	2	3	4
M. fructicola / M. fructigena	0,15	80,99	17,74	1,12	0,01
M. fructicola / M. laxa	0,15	93,97	5,77	0,12	0,00
M. laxa / M. fructicola	0,15	95,69	4,16	0,00	0,00
M. fructigena / M. fructicola	1,27	90,12	8,43	0,18	0,00
M. laxa / M. fructigena	0,15	80,29	18,38	1,17	0,00
M. fructigena / M. laxa	1,26	91,09	7,59	0,06	0,00
M. fructicola / B. cinerea	0,21	66,77	30,32	2,48	0,17
B. cinerea / M. fructicola	0,63	67,03	28,15	3,98	0,21
M. fructigena / B. cinerea	1,31	63,21	29,91	4,99	0,57
B. cinerea / M. fructigena	1,17	63,39	31,77	3,52	0,15
M. laxa / B. cinerea	0,15	64,83	30,81	3,88	0,27
B. cinerea / M. laxa	0,77	67,69	27,32	3,92	0,31
M. fructicola / S. sclerotiorum	0,16	73,45	24,02	2,06	0,30
S. sclerotiorum / M. fructicola	0,33	63,94	31,33	4,30	0,10
M. fructigena / S. sclerotiorum	1,39	67,39	27,28	3,84	0,10
S. sclerotiorum / M. fructigena	0,71	57,08	36,26	5,78	0,17
M. laxa / S. sclerotiorum	0,15	69,64	27,53	2,48	0,20
S. sclerotiorum / M. laxa	0,35	62,85	32,43	4,26	0,11
B. cinerea / S. sclerotiorum	0,59	75,44	21,21	2,61	0,14
S. sclerotiorum / B. cinerea	0,33	68,07	27,08	4,21	0,32

4.2 IDENTIFICAZIONE DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI

Il metodo analitico adottato ha evidenziato che nel genoma di *M. fructicola* 2,7 Mb (6,12%) sono rappresentate da TE, in quello di *M. laxa* 3,1 Mb (7,23%) e nel genoma di *M. fructigena* 2,85 Mb (6,62% del genoma). Contestualmente la quantità di TE osservata nelle specie utilizzate come confronto è di 2,19 Mb in *B. cinerea* (5,14%) e 2,34 Mb in *S. sclerotiorum* (6%). La classe maggiormente rappresentata è relativa ai retrotrasposoni (**Figura 15**) che è abbondante nei genomi di *M. laxa* e *M. fructigena* mentre la Classe II che rappresenta i TE a DNA è presente in tutte le specie in quantità inferiori. Tuttavia, quest'ultima è più abbondante nei genomi di *S. sclerotiorum* e *M. fructicola* rispetto agli altri genomi analizzati. Per quanto riguarda i retrotrasposoni le specie *M. fructicola*, *M. laxa*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* mostrano in particolare elementi LTR mentre in *M. fructigena* sono state individuate proporzioni quasi simili di elementi LTR e Non-LTR che costituiscono, rispettivamente il 2,89% e 2,38% del genoma della specie.

Considerando le famiglie dei TE gli LTR/Gypsy e LTR/Copia sono quelle più rappresentate in tutte le specie. NonLTR/Tad1 è abbondante in particolare in *M*.

fructigena dove rappresenta il 2,34% del genoma e in misura minore in *S. sclerotiorum* dove rappresenta lo 0,93% del genoma. Tra gli elementi a DNA vanno ricordati i DNA/Mariner che sono ubiquitari in tutte le specie e rappresentano 1,12% del genoma di *M. fructicola*, 0,77% in *M. laxa*, 0,25% del genoma di *M. fructigena*, 0,71% in *B. cinerea* e 1,48%, in quello di *S. sclerotiorum*. DNA/hAT è caratteristico in quanto presente soprattutto in *M. fructicola* e *M. laxa* (0,56 e 0,55% rispettivamente mentre non supera lo 0,07-0,11% nelle altre specie) come pure la famiglia DNA che rappresenta lo 0,55% e 0,72% in *M. fructigena* e *S. sclerotiorum* (Figura 15).



Figura 15. Principali gruppi di elementi trasponibili identificati nei genomi di *M. fructicola, M. laxa, M. fructigena, B. cinerea* e *S. sclerotiorum.* È stata utilizzata la nomenclatura usata da Repbase (Bao et al. 2015).

La HeatMap (**Figura 16**) raccoglie gli elementi più significativi per le diverse specie ed esprime l'abbondanza di questi elementi in scala logaritmica. Nell'analisi dei singoli elementi sono stati presi in considerazione quelli con dimensioni \geq a 500 pb allo scopo di evitare gli elementi degenerati e inattivi. L'elemento BOTY_I è un elemento presente in tutte le specie ad esclusione della *M. fructicola*. In particolare, è abbondante in *M. laxa* e occupa nel genoma 524.979 pb seguono le specie: *B. cinerea* 328.456 pb, *M. fructigena* 154.794 pb e *S. sclerotiorum* 58.665 pb. Altro elemento importante poiché presente in più specie è Gypsy-2_PaPe-I che occupa in *M. fructicola* 416.098 pb e in *M. laxa* 390.464 pb. Mentre è stato annotato meno frequentemente in *B. cinerea* (97.303 pb), *S. sclerotiorum* (22.430 pb) e *M. fructigena* (35.99 pb). Un elemento che è molto importante poiché rappresentato in 64 modo preponderante solo in *M. fructigena* è Gypsy-2_BFB-I che occupa 153.929 pb del genoma, mentre in *B. cinerea* occupa 52.426 pb, in *M. laxa* 5.627 pb nelle altre specie l'elemento è assente. Altri elementi importanti degli LTR/Gypsy e degli LTR/Copia sono: Gypsy-1_BFB-I che ha la peculiarità di essere presente solo nel genoma di *B. cinerea* con 195.129 pb. Infine, Copia-1_BFB-I è presente in tutte le specie con valore più elevato in sequenza solo in *B. cinerea* 107.385 pb, mentre in *M. fructicola* è presente solo con pochi elementi (2.005 pb). Copia-2_MaAq-I è presente soprattutto in *M. laxa* 102.813 pb e a seguire in *B. cinerea* (20.822 pb) e *M. fructigena* (11.924 pb).

Tra gli elementi Non-LTR, Tad1-2 ACap è in assoluto il TE più abbondante in *M. fructigena* difatti da solo occupa 712.238 pb del genoma, mentre, tra le altre specie è presente esclusivamente in *S. sclerotiorum* (8.612 pb) e in minima parte in *M. fructicola* (1.981 pb).

Per quanto riguarda gli elementi a DNA, Mariner1_AO è particolarmente abbondante in *M. fructicola* 254.168 pb seguono: *M. laxa* (151.146 pb), *S. sclerotiorum* (28.233 pb), *B. cinerea* (16.169 pb) e *M. fructigena* (1.124 pb). Due elementi a DNA importanti poiché ritrovati solo in *M. fructigena* e nei genomi controllo sono Mariner-12_SS e Mariner-8_SS che in *M. fructigena* sono presenti rispettivamente con 122.158 pb e 100.329 pb mentre in *B. cinerea* (9.802 pb e 1,827 pb) e *S. sclerotiorum* (69.325 pb e 14.189 pb) sono presenti in misura minore. Ultimo elemento che vale la pena annoverare è Mariner-4_SS che raggiunge le 124.502 pb in *B. cinerea* ed è poi presente in *S. sclerotiorum* (38.441 pb), *M. fructigena* (25.739 pb) e *M. laxa* (1.858 pb).



Figura 16. HeatMap dei TE > 500 pb in scala logaritmica (log10) identificati nelle specie di *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. fructigena*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Gli elementi sono numerati da 0 a 85 e sono nell'ordine: (0) BOTY_I, (1) BOTY_LTR, (2) Gypsy-1_BFB-I, (3) Gypsy-1_CaPs-I, (4) Gypsy_CoTr-I, (5) Gypsy-1_GDe-I, (6) Gypsy-1_GGr-I, (7) Gypsy-1_MaAq-I, (8) Gypsy-1_PeEx-I, (9) Gypsy-1_TSt-I, (10) Gypsy-1B_CaPs-I, (11) Gypsy-1-I_AN, (12) Gypsy1-I_AO, (13) Gypsy-2_AsCa-I, (14) Gypsy-2_BFB-I, (15) Gypsy-2_Cop-I, (16) Gypsy-2_PaPe-I, (17) Gypsy-2_PeEx-I, (18) Gypsy-3_BySp-I, (19) Gypsy-3_CoGl-I, (20) Gypsy-3_GDe-I, (21) Gypsy-3_MaAq-I, (22) Gypsy-3_TSt-I, (23) Gypsy-31_BG-I, (24)

Gypsy-4 BG-I, (25) Gypsy-4 BySp-I, (26) Gypsy-4 VeDa-I, (27) Gypsy-41 BG-I, (28) Gypsy-56 BG-I, (29) Gypsy-9 BG-I, (30) YETI-I PA, (31) Copia-1 BFB-I, (32) Copia-1 PaNo-I, (33) Copia-1 PeEx-I, (34) Copia-1 VeDa-I, (35) Copia-10 BG-I, (36) Copia-2 CoGl-I, (37) Copia-2 MaAq-I, (38) Copia-30_BG-I, (39) Copia-58 BG-I, (40) Copia-6 BG-I, (41) Copia-67 BG-I, (42) Copia-7 BG-I, (43) Copia-74 BG-I, (44) Copia-77 BG-I, (45) Tad1-1 AF, (46) Tad1-14 BG, (47) Tad1-2 Acap, (48) Tad1-26 BG, (49) Tad1-26B BG, (50) Tad1-26C BG, (51) Tad1-3 TSt, (52) Tad1-31B BG, (53) Tad1-37 BG, (54) Tad1-44 BG, (55) Tad1-6 Acap, (56) Tad1-6 TSt, (57) Tad1-63 BG, (58) Tad1-63B BG, (59) Tad1-72 EP, (60) Tad1-74 BG, (61) Tad1-76 BG, (62) Tad1-8 TSt, (63) LMR1 LM, (64) FLIPPER, (65) Harbinger-1 DiVe, (66) hAT-2 AmNi, (67) Mariner1 AO, (68) Mariner-1 BFu, (69) Mariner-1 SS, (70) Mariner-10 SS, (71) Mariner-11 SS, (72) Mariner-12 SS, (73) Mariner-13 SS, (74) Mariner-14 SS, (75) Mariner-2 SS, (76) Mariner-3 SS, (77) Mariner4 AO, (78) Mariner-4 SS, (79) Mariner-5 SS, (80) Mariner-6 SS, (81) Mariner-7 SS, (82) Mariner-8 SS, (83) Mariner-9 SS, (84) MarinerL-1 AO e (85) Sagan-11 DiVe

4.3 CALCOLO DELLA DIVERGENZA EVOLUTIVA DEGLI ELEMENTI TE

Per analizzare le dinamiche relative all'espansione dei TE nel corso dell'evoluzione i TE sono stati raggruppati in base ai valori K (Kimura *substitution level*; Kimura, 1980) (**Figura 17**). I dati complessivi mostrano quando sono avvenuti gli eventi di trasposizioni dei TE ciò è evidente se si osserva un rapido aumento del numero di copie degli elementi ripetuti. Analizzando queste espansioni possiamo dedurre eventuali modifiche evolutive al genoma e fare ipotesi sulla presunta attività dei TE in funzione della presenza di picchi d'espansione. Pertanto, l'interpretazione dei dati ci suggerisce che in *M. fructigena* i TE hanno avuto un impatto diverso nell'evoluzione del genoma rispetto ai genomi delle altre *Monilinia*. Nel genoma di questa specie i TE mostrano eventi di trasposizione recenti con gli elementi LTR e Non-LTR che hanno dato il contributo maggiore. Ciò implica che il massimo accumulo di elementi trasponibili si è verificato nel recente passato o è ancora in corso (più del 90% di TE con valore K < 4) o che non vengano attivamente rimossi dal genoma.

I genomi di *M. laxa* e *M. fructicola* hanno mostrato un'espansione importante in tempi più remoti (valore K 15-20). Però, il genoma di *M. fructicola* mostra degli eventi di inserzione avvenuti in tempi più recenti rispetto a *M. laxa* soprattutto riguardo agli elementi a DNA è più costante mentre in *M. laxa* la trasposizione di questi elementi sembra essersi concentrata tutta in tempi remoti (valore K 16-30). Mentre, i retroelementi Non-LTR mostrano nelle due specie segni di mobilitazione costanti nel tempo. Più simile al genoma di *M. fructigena*, i genomi di *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* hanno mostrato un'espansione più recente che è stata tuttavia meno evidente di quella osservata in *M. fructigena*. I genomi delle due specie hanno mostrato sia un'espansione più antica (valore K 34-42) che ha coinvolto principalmente elementi LTR e DNA in *B. cinerea*, sia elementi Non-LTR in *S. sclerotiorum*. Inoltre, in *S. sclerotiorum* è stata osservata una proliferazione più giovane dei TE che coinvolgeva principalmente elementi LTR (valore K 18-20).



Figura 17. Espansione dei TE durante l'evoluzione dei genomi di *M. fructicola, M. laxa, M. fructigena, B. cinerea* e *S. sclerotiorum.* Grafici a barre: l'ordinata illustra la proporzione del genoma occupata da ciascun TE e l'ascissa illustra la divergenza genetica dal consenso (livello di sostituzione di Kimura) osservata tra le copie di ciascun TE. Le copie raggruppate a sinistra del grafico non si discostano molto dalla sequenza consenso dell'elemento e potenzialmente corrispondono a copie recenti, mentre le sequenze a destra potrebbero corrispondere a copie antiche e degenerate. Grafici a torta: proporzioni dei genomi occupati da ciascun gruppo TE.

L'analisi condotta per prevedere gli elementi attivi o degenerati ha rivelato che i TE non autonomi o resti di TE con dimensioni <200 pb, si sovrappongono in modo massiccio alle regioni genomiche annotate come geni codificanti (Figura 18). I TE <500 pb, tuttavia, non hanno domini correlati all'attività riconducibile ai TE mentre sono state osservate differenze nei TE ≥500 pb con o senza domini funzionali conservati tra le specie analizzate. I TE attivi con ORF che codificano per le proteine necessarie per la trasposizione sono stati rilevati raramente in M. fructicola e M. laxa, mentre sono stati rilevati più frequentemente nelle altre specie, con la percentuale più alta in M. fructigena, seguita da S. sclerotiorum e B. cinerea. Nessuno dei 938 e 1.141 TE ≥500 pb (fino a 10.000 pb di dimensione) identificati rispettivamente in M. fructicola e M. laxa, si sovrappone a sequenze geniche annotate. Solo 9 TE in M. fructicola e 39 in M. laxa contengono domini correlati a TE che appartengono principalmente a LTR/Gypsy. Seicentoquarantuno dei 1.031 TE ≥500 pb identificati in *M. fructigena* si sovrappongono a 739 geni, con l'86% di questi che mostra una sovrapposizione superiore al 50%. Dei 633 TE con almeno un dominio correlato a TE, identificati in M. fructigena, 562 sono TE che si sovrappongono a geni annotati e 96 non occupano porzioni geniche. In modo simile, 290 di 719 TE ≥500 pb in *S. sclerotiorum* si sovrappongono a 325 geni, con il 73% di essi che mostra una sovrapposizione superiore al 50%; tra i 483 TE portatori di almeno un dominio correlato a TE, 284 sono TE associati a geni e 199 non erano TE associati a geni. Ventuno dei 604 TE ≥500 pb in B. cinerea si sovrappone a 22 geni, con l'80% di essi che mostra una sovrapposizione superiore al 50%; tra 110 portatori di almeno un dominio correlato a TE, 9 sono TE in-gene e 106 non sono TE in-gene. Nei genomi di M. fructigena, S. sclerotiorum e B. cinerea, gli elementi LTR/Gypsy si sono sovrapposti a geni cruciali per la retrotrasposizione; cioè, poliproteina strutturale (Gag), strutturale-catalitica (Gag-Pol), trascrittasi inversa derivata, integrasi e nucleocapside retrotrasposonico. LTR/Copia si sovrappone frequentemente a geni che codificano per ribonucleasi H, retrotrasposone hobase, Gag, Gag-Pol, trascrittasi inversa e integrasi. Il Non-LTR/Tad1 nel genoma di M. fructigena si sovrappone ampiamente ai geni che codificano per la DNA polimerasi RNA-diretta dall'elemento X del trasposone, mentre in S. sclerotiorum e B. cinerea si sovrappone principalmente a proteine ipotetiche.



Figura 18. TE complessivi in-gene in base alla lunghezza TE (**A**). Analisi di TE autonomi e non in relazione a domini TE rilevati su TE >500 pb, e numero di geni che si sovrappongono con geni annotati legati a TE (**B**). TE in-gene = TE con sequenze che si sovrappongono a geni annotati; TE in-gene D = TE in-gene con identificati dei domini funzionali; TE no-gene D = TE che non si sovrappongono a geni funzionali ma che hanno comunque conservato dei domini funzionali.

4.4 CASO STUDIO: IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELLA STRUTTURA DEGLI ELEMENTI LTR/GYPSY: BOTY-I E GYPSY-2_BFB-I

Lo studio realizzato con LTR_FINDER ha individuato 3, 2, 82, 56 e 122 sequenze TE di tipo LTR rispettivamente in *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. fructigena*, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Confrontando la posizione degli elementi annotati con RepeatMasker, RepeatModler e CENSOR con quella degli elementi annotati da LTR_FINDER e ricercando manualmente i domini PBS e i PPT indicati in bibliografia (Diolez et al., 1995; Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2011) sono stati riconosciuti 8 BOTY_I in *M. fructigena*, 2 in *S. sclerotiorum* e 29 in *B. cinerea*, mentre 4 Gypsy-2_BFB-I in *M. fructigena* e in *B. cinerea*. Mentre nessun elemento ascrivibile a BOTY_I e Gypsy-2_BFB-I è stato rilevato in *M. fructicola* e *M. laxa*.

Il dominio PBS (**Figura 19 A**) è conservato in tutti gli elementi BOTY-I di *M. fructigena, S. sclerotiorum* e solo in 27 dei 29 elementi di *B. cinerea*; i restanti due hanno una mutazione puntiforme in punti diversi della sequenza. Il dominio PPT (**Figura 19 A**) è conservato in 7 degli 8 elementi di *M. fructigena*, in nessun elemento di *S. sclerotiorum* e in 21 dei 29 elementi di *B. cinerea*. Particolare è la situazione che si ritrova in *S. sclerotiorum* dove oltre a degli LTR più corti, circa 330 pb, rispetto alle 450-610 pb osservati in *M. fructigena* e *B. cinerea*, si osserva un PPT non omologo alla sequenza indicata in bibliografia per BOTY_I (PPT: 5'-AG→AG→ACTAA→GG→AAA→GGGGGGATAG-3'). In *B. cinerea* si rileva la presenza di un PPT mutato in 8 elementi, 7 dei quali, presentano la medesima mutazione ovvero: 5'-AGG→TCTAGGAAGGGGATAG-3' e l'LTR di cui sono composti ha una lunghezza di 558 pb. In Gypsy-2_BFB-I sia il PPT che il PBS sono conservati in entrambe le specie in cui l'elemento è presente.

L'elemento BOTY_I codifica un unico ORF (Diolez et al., 1995), le analisi condotte hanno mostrato che tutti gli elementi identificati del tipo BOTY_I in *M. fructigena* e *S. sclerotiorum* presentano due o più ORF ciò è dovuto a possibili mutazioni che hanno interrotto la continuità dell'ORF. In *B. cinerea* 23 elementi codificano un unico ORF, i restanti ne codificano più di uno ciò è sempre associato a possibili mutazioni della sequenza. I domini funzionali associati al gene gag, il dominio zinc finger (Zn), la PR, la RT, RH, IN e CH sono stati trovati completi in 2 elementi di *M. fructigena*, 2 di *S. sclerotiorum* e 16 in *B. cinerea*. Solo 1 elemento di *M. fructigena* e 3 di *B. cinerea* sono conformi a quelli indicati in bibliografia per quanto riguarda ORF e domini funzionali attesi in un elemento Gypsy-2_BFB-I. La ricostruzione di BOTY I e Gypsy-2 BFB-I è mostrata in **Figura 19 A,B,C,D**.


Figura 19. (A) mostra la struttura semplificata di un retrotrasposone LTR di tipo Copia, in base all'ordine dei domini funzionali (IN-RT-RH). Nella figura (Xu e Wang 2007) il trasposone è dotato dei TSD (target site duplication), negli LTR sono evidenziate le coppie delle basi azotate TG e CA che delimitano l'inizio e la fine di un LTR, i domini funzionali espressi nel gene gag e soprattutto nel gene pol: integrasi (IN), retrotrascrittasi (RT) e ribonucleasi H (RH). Nella figura sono evidenziate le sequenze nucleotidiche che rappresentano il PBS (primer binding site) e il PPT (polypurine tract), degli elementi BOTY I e Boty II quest'ultimo identificato dalla classificazione RepBase come Gypsy-2 BFB-I. In (B) è riportato l'elemento BOTY I trovato in B. cinerea cromosoma CP009806.1 posizione 1.521.010-1.527.627 pb che presenta un unico ORF (open reading frame) nella cornice di lettura 1 e sul quale sono stati riscontrati i domini funzionali della Zn (zinc binding domain), PR (proteasi), RT, RH, IN e CH (cromodominio). In (C) è riportato l'elemento BOTY I di M. fructigena trovato nello scaffold QKRW01000055.1 posizione 209.847-216.175 pb che possiede i medesimi domini funzionali trovati nell'elemento identificato in B. cinerea ma che possiede due ORF codificati in due cornici di lettura 1 e 3, il punto in cui è avvenuto il frame shift è indicato da un cerchio rosso. In (D) l'elemento Gypsy-2 BFB-I trovato in B. cinerea cromosoma CP009805.1 posizione 3.845.798-3.852.236 pb che presenta un gene gag codificato al frame 3 e un gene pol codificato al frame 2. In (E) l'elemento Gypsy-2 BFB-I trovato nello scaffold QKRW01000035.1 posizione 311.833-318.186 con il dominio gag letto nel frame 2 e il dominio pol letto al frame 1.

La sequenza amminoacidica degli elementi BOTY_I e Gypsy-2_BFB-I è mostrata in **Figura 20**, si osserva il dominio RT, RH e IN, le sequenze amminoacidiche sono molto conservate e si identificano i motivi che in bibliografia sono descritti come caratteristici.



Figura 20. Mostra le sequenze amminoacidiche più conservate del gene pol e in particolare i domini: RT, RH e IN; le frecce indicano gli amminoacidi conservati nella classe LTR. La sequenza aminoacidica indicata dalla (**a**) appartiene all'elemento BOTY_I di *B. cinerea* che si trova nel cromosoma CP009806.1 posizione 1.521.010-1.527.627 pb. In (**b**) sequenza amminoacidica di *M. fructigena* nello scaffold QKRW01000055.1 posizione 209.847-216.175 pb. In (**c**) la sequenza amminoacidica di Gypsy-2_BFB-I di *B. cinerea* cromosoma CP009805.1 posizione 3.845.798-3.852.236 pb. In (**d**) Gypsy-2_BFB-I di *M. fructigena* scaffold QKRW01000035.1 posizione 311.833-318.186.

L'analisi filogenetica mostra chiaramente che gli elementi BOTY_I trovati in *M. fructigena*, in *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* (**Figura 21**) sono raggruppati insieme, quindi, seppure sia riconoscibile una certa variabilità dovuta a mutazioni della sequenza, comunque, si parla dello stesso elemento. Lo stesso si può dire degli elementi Gyspsy-2_BFB-I. Infine, vi è una netta distinzione tra gli elementi trovati negli organismi appartenenti a regni diversi, infatti, i TE associati a funghi, piante ed insetti, si raggruppano formando uno stesso cluster ciò ad indicare che almeno tra gli elementi scelti non sono evidenti fenomeni di trasferimento orizzontale di trasposoni in specie, appartenenti, a regni diversi.



Figura 21. La storia evolutiva è stata predetta utilizzando il metodo Maximum Likelihood e il modello JTT matrix-based (Jones et al., 1992). In figura è mostrato l'albero con il più alto log di probabilità (-48208,90). I numeri ai nodi indicano la l'analisi bootstrap calcolata con 1.000 iterazioni. L'albero iniziale per la ricerca euristica è stato ottenuto automaticamente applicando gli algoritmi Neighbor-Join e BioNJ. Questa analisi ha coinvolto 59 sequenze amminoacidiche. Nel dataset finale c'erano un totale di 856 posizioni. L'analisi evolutiva è stata condotta in MEGA X (Kumar et al., 2018). Nella figura le frecce con le linee viola mostrano gli elementi associati alla *M. fructigena*, in rosso quelli di *B. cinerea* e in verde l'elemento di *S. sclerotiorum*.

5 DISCUSSIONE

In questo studio, grazie alla disponibilità di risorse genomiche complete relative alle specie M. fructigena (Landi et al., 2018), M. fructicola (De Miccolis Angelini et al., 2019) e M. laxa (Landi et al., 2020), sono state svolte ricerche approfondite che hanno messo in luce la storia evolutiva tra le specie di Monilinia più importanti che inducono marciumi bruni su pomacee e drupacee. Come primo approccio, i genomi di nuova sequenza delle tre specie di Monilinia sono stati analizzati da un punto di vista sintenico. Questo tipo di studio effettuato su larga scala è di enorme importanza ed è utile, nel confronto tra genomi, ad individuare i singoli geni omologhi conservati e come l'ordine dei geni viene mantenuto su un segmento genomico (Lichtin et al., 2020; Jiao e Schneeberger, 2020). Volendo descrivere in modo semplice questo approccio potremmo dire che due organismi che hanno un antenato in comune relativamente recente hanno genomi che presentano differenze specie-specifiche, basate su uno schema comune del genoma ancestrale. Quindi, quanto più due organismi sono vicini nella scala evolutiva, tanto più correlati sono i loro genomi. Per quanto riguarda l'analisi sintenica effettuata in questo studio elevate relazioni sinteniche sono state riscontrate tra le tre specie di Monilinia. In particolare, l'analisi dei blocchi sintenici nei confronti tra le specie Monilinia ha rivelato un numero più alto di geni sintenici collineari per blocco, e quindi un numero più basso di blocchi totali, tra i genomi di M. fructicola e M. laxa. Tuttavia, la grande frammentazione dell'assemblaggio del genoma di M. fructigena (131 scaffold) rispetto a M. fructicola e M. laxa (20 e 49 scaffold, rispettivamente) potrebbe aver influenzato i risultati nei diversi confronti. Comunque, la minore frammentazione dei blocchi sintenici osservata nei confronti, M. fructigena / M. laxa, rispetto al confronto M. fructigena / M. fructicola, suggerisce la maggiore diversità di M. fructicola dalle altre specie di Monilinia. La mappatura comparativa della sintenia tra le specie Monilinia, B. cinerea e S. sclerotiorum ha mostrato un numero crescente di piccoli blocchi sintenici in relazione alla distanza evolutiva, probabilmente a causa di riarrangiamenti del genoma. Uno studio relativo alla profondità sintenica ovvero l'analisi del numero di volte in cui una regione di un genoma è sintenica in un altro genoma ci ha fornito una misura delle porzioni di regioni ortologhe, cioè di geni che si trovano in organismi differenti ma codificano per le stesse proteine e che derivano da uno stessa linea evolutiva, e regioni

paraloghe o co-ortologhe, quindi di geni che derivano da duplicazione successiva alla speciazione e che hanno un evoluzione indipendente (Patel, 2011). I confronti a coppie hanno rivelato elevate proporzioni di geni con una profondità sintenica di 1, anche nei confronti tra generi, indicando un basso numero di regioni duplicate e una grande prevalenza di geni ortologhi nelle specie *Monilinia* (Tang et al., 2015). Quindi, la duplicazione genica non è stata per queste specie un processo che ha guidato la diversità e l'adattamento ambientale, come è invece stato rilevato ad esempio per la specie di *Saccharomyces cerevisiae* (Wang e Gao, 2019). La mappatura comparativa della sintenia nelle specie *Monilinia* rispetto a *B. cinerea* e *S. sclerotiorum* mostra dei piccoli blocchi sintenici il cui numero aumenta con il crescere della distanza evolutiva, ciò è causato dai riarrangiamenti del genoma.

La differenza della sequenza codificante (misurata dai valori Ks) è spesso utilizzata come orologio molecolare relativo per stimare i tempi di divergenza da un antenato comune (Haug-Baltzell et al., 2015; Shi et al., 2019). L'analisi di Ks tra le tre specie di *Monilinia* ha prodotto risultati in accordo con quelli relativi agli studi sintenici, che hanno confermato che *M. laxa* e *M. fructigena* sono filogeneticamente strettamente correlate tra loro, mentre *M. fructicola* è alquanto divergente. Da questo studio è emerso che le tre specie *Monilinia* sono geneticamente più vicine a *S. sclerotiorum* rispetto a *B. cinerea* e tra tutte *M. laxa* è risultata la più vicina agli altri funghi della famiglia delle *Sclerotiniaceae* testati. Questo suggerisce che *M. laxa* è stata la prima a differenziarsi attraverso il processo di speciazione.

Una indagine microsintenica ha rilevato in *M. fructigena* una frequenza di breakpoint sintenici causati dall'inserimento di geni non sintetici legati alla trasposizione di TE. Ciò suggerisce il verificarsi di eventi ricombinanti dovuti all'attività dei TE in *M. fructigena*, poiché lo spostamento del DNA dentro e fuori una regione genomica può causare trasposizione genica e duplicazione locale, avendo così un ruolo nella diminuzione dei segnali sintenici (Slot e Rokas, 2010; Wisecaver et al., 2014; Faino et al., 2016; Klein e O'Neill, 2018).

In questo contesto una parte importante di questo lavoro di tesi si è incentrato nello studio dei TE. È noto che il trasferimento di geni tra diverse specie, anche tra piante e animali, è stato molto più diffuso di quanto ritenuto finora, e ha avuto un ruolo fondamentale nell'evoluzione, cambiando radicalmente i genomi come osservato per i mammiferi attuali (Pace e Feschotte, 2007; Payer e Burns,

2019). Gli elementi TE sono in grado di riprodurre copie che vengono successivamente inserite in altri punti del genoma di cui fanno parte o in genomi di altre specie mediante un meccanismo di trasferimento orizzontale. Queste caratteristiche li rendono la principale forza trainante per l'evoluzione adattiva del genoma dei patogeni fungini nelle piante ospiti, come mostrato ad esempio in *Verticillium dahliae* (Faino et al., 2016).

In questo lavoro, il contenuto di TE nei genomi di *Monilinia* variava dal 6,0% al 7,1% del totale del genoma in quantità paragonabile a quelle osservate nei genomi di *B. cinerea* (5,1%) e *S. sclerotiorum* (6,6%). Precedenti indagini hanno riportato dal 7% al 12% di TE nel genoma di *S. sclerotiorum*, ma come dichiarato dagli stessi autori, la loro indagine potrebbe aver incluso alcune annotazioni dubbie (Amselem et al., 2011; Amselem et al., 2015; Derbyshire et al., 2017) e circa il 4% di TE nel genoma di *B. cinerea* (Porquier et al., 2016). Queste discrepanze potrebbero essere dovute ai diversi strumenti di annotazione e pipeline utilizzati, nonché al continuo aggiornamento delle librerie TE. Tuttavia, il presente studio ha confermato il maggior numero di TE nel genoma di *S. sclerotiorum* rispetto a *B. cinerea*, nonché una prevalenza di elementi a DNA nel genoma di *S. sclerotiorum* (Santana et al., 2014) e di elementi LTR nel genoma di *B. cinerea* (Amselem et al., 2015).

Nei genomi di *Monilinia*, i retrotrasposoni di Classe I (soprattutto delle superfamiglie LTR/Gypsy e LTR/Copia) sono risultati i più abbondanti, come nella maggior parte dei funghi (Muszewska et al., 2011; Santana et al., 2014; Donnart et al., 2017). Tuttavia, mentre la superfamiglia LTR/Copia è stata osservata in proporzioni simili nei tre genomi delle *Monilinia*, LTR/Gypsy è più abbondante in *M. laxa* contribuendo in modo significativo all'alto contenuto di tutti gli LTR nel suo genoma. I trasposoni a DNA (rappresentati principalmente dalle superfamiglie hAT e Mariner) sono risultati particolarmente abbondanti in *M. fructicola* e *S. sclerotiorum* (Santana et al., 2014; questo studio). Le ampie differenze nei tipi TE nelle specie di *Monilinia* suggeriscono che questi elementi genici hanno avuto ruolo significativo nell'evoluzione del genoma. Diversi TE (p. es., LTR/BOTY_I, LTR/Gypsy-2_PaPe-I o DNA/Mariner1_AO) sono comuni anche ai genomi di *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*, il che suggerisce la stessa origine delle specie *Monilinia*, sebbene i TE si siano probabilmente espansi in modo diverso nelle diverse specie

dopo il processo di speciazione, come suggerito dalla loro diversa frequenza e lunghezza cumulativa nei genomi qui analizzati. In particolare, gli studi fatti in questa tesi su LTR/BOTY-I e LTR/Gypsy-2 BFB-I mostrano che B. cinerea, S. sclerotiorum e M. fructigena sono dotati di elementi le cui sequenze sono conservate mentre M. laxa pur avendo molti elementi annotati per omologia le sequenze non presentavano domini conservati ed erano probabilmente inattivi. In *M. fructicola* l'elemento BOTY I e Gypsy-2 BFB-I è invece scarsamente presente. Questo approfondimento ci conferma quanto visto su larga scala. Infatti, i nostri risultati suggeriscono un diverso ruolo evolutivo per gli eventi di proliferazione dei TE che si sono verificati nel corso del tempo in queste specie. Lo studio della proliferazione nel tempo dei TE in M. laxa e M. fructicola, infatti, ha mostrato una proliferazione sia degli elementi LTR che di quelli a DNA, con l'attuale presenza di TE inattivi e degenerati in entrambi i genomi. Al contrario, la storia evolutiva dei TE in M. fructigena suggerisce un'esplosione più recente dei TE che è probabilmente ancora in atto e che ha portato a un genoma altamente dinamico e ha probabilmente causato una marcata riorganizzazione del genoma (Kang et al., 2001; Zhou et al., 2007; Haas et al., 2009; Yoshida et al., 2016). Allo stesso modo, sebbene in misura minore, lo studio evolutivo dei TE nei genomi di S. sclerotiorum e B. cinerea suggerisce anche per loro una più recente espansione. Questo è in linea con gli studi effettuati in merito agli elementi BOTY I e Gypsy-2 BFB-I.

La più antica espansione dei TE in *M. laxa* e *M. fructicola* rispetto a *M. fructigena* suggerisce che potrebbe esserci stata una pressione evolutiva contro questi elementi che ne ha limitato l'attività nei genomi. Di solito, la pressione evolutiva contro i TE inattivi è inferiore e i loro frammenti possono rimanere nelle regioni genomiche dove i TE attivi non sono ammessi (Muszewska et al., 2019). Nei genomi di *M. laxa* e *M. fructicola*, abbiamo identificato diverse regioni ortologhe non codificanti conservate che ospitavano molti TE non autonomi che mantenevano un'omologia parziale con i geni associati alla trasposizione in *M. fructigena*. I TE con caratteristiche strutturali dei domini funzionali necessari per la trasposizione autonoma (Havecker et al., 2004; Casacuberta e González, 2013; Castanera et al., 2016) sono stati rilevati solo in *M. fructigena*. Un risultato simile è stato osservato in *S. sclerotiorum* e, in misura molto minore, in *B. cinerea*, il che

suggerisce la presenza di TE attivi anche in queste specie, in accordo con precedenti segnalazioni (Santana et al., 2014; Muszewska et al., 2019).

A supporto che gli elementi TE possono creare nei genomi delle frammentazioni della collinearità sintenica, l'analisi microsintenica del genoma di *M. fructigena* ha rivelato che le rotture di sintenia erano associate alla presenza di TE attivi, come elementi BOTY I e Gypsy-2 BFB-I o i Non-LTR/Tad1-2 Acap. Questi ultimi associati a numerosi RdDP (circa 300 geni annotati), che sono coinvolti nella dispersione di elementi mobili, inclusi i retroelementi fungini (Mathias et al., 1991). Questi risultati sono coerenti con la recente espansione di TE, principalmente elementi Non-LTR, osservati in M. fructigena. Inoltre, l'alto contenuto di GC in posizione oscillante all'interno di RdDP suggerisce un possibile trasferimento orizzontale di questi geni nel genoma, come è stato riportato nei batteri (Tuller, 2011; Callens et al., 2021). Le stesse regioni di M. fructigena corrispondono nei genomi di M. laxa e M. fructicola a regioni omologhe conservate ricche di TE non attivi sottoposti all'azione mitigante dei RIP-mutation (mutazione puntiforme ripetuta). Queste osservazioni sono in accordo con quanto evidenziato con la diversa evoluzione nel tempo dei TE nei genomi di Monilinia analizzati in questo studio. Infatti, a differenza di quanto visto in M. fructigena un'espansione più antica dei TE nei genomi di M. laxa e M. fructicola può aver dato il tempo al genoma con meccanismi tipo RIP-mutation di riparare e contrastare l'espansione dei TE nel genoma (Hane et al., 2015). Il significato evolutivo e biologico di queste scoperte va ricercato nella differente relazione con gli ospiti e l'ambiente. Molte ipotesi possono essere formulate che necessitano di essere confutate, una tra queste è che l'origine dell'isolato di M. fructigena trovato nelle drupacee, ospite meno convenzionale rispetto alle pomacee, sia il prodotto dell'attività dei trasposoni che hanno reso più adatto il ceppo studiato a vivere su queste specie piuttosto che sull'ospite convenzionale.

6 CONCLUSIONI

Le innovazioni tecnologiche associate all'analisi dei genomi hanno consentito di indagare alcuni aspetti evolutivi e funzionali in patogeni fungini importanti come quelli associati al marciume bruno in pomacee e drupacee come *M. fructigena*, *M. fructicola* e *M. laxa*. Lo studio di genomica comparata affrontato in questo lavoro di tesi consentirà di fare valutazioni sulle interazioni ospite-patogeno. In particolare, l'indagine potrà contribuire alla conoscenza dei geni coinvolti nella patogenesi e come questi interagiscono ed elicitano le difese della pianta ospite. Conoscendo meglio le basi genetiche dei meccanismi di resistenza e suscettibilità, si potranno migliorare le piante coltivate per renderle meno suscettibili ai patogeni, riducendo così la necessità di ricorrere alla difesa chimica per proteggere l'ospite. Inoltre, sarà possibile comprendere quale è il ruolo svolto dai TE nell'evoluzione e nell'adattamento del patogeno all'ambiente.

7 BIBLIOGRAFIA

Abate, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S. e Faretra, F., 2018a. Mating system in the brown rot pathogens *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, and *M. fructigena*. Phytopathology, 108(11), pp. 1315-1325.

Abate, D., Pastore, C., Gerin, D., De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Pollastro, S. e Faretra, F., 2018b. Characterization of *Monilinia* spp. populations on stone fruit in south Italy. Plant Disease, 102(9), pp. 1708-1717.

Abonyi, F., Vámos, A., Rózsa, A., Lakatos, P. e Holb, I. J., 2015. Spore dispersal, diurnal pattern and viability of *Monilinia* spp. conidia and the relationship with weather components in an organic apple orchard. International Journal of Horticultural Science, 21(3-4), pp. 17-19.

Aderhold, R. e Ruhand, W., 1905. Zur Kenntnis der obstbaum-Slerotinien. Arbeiten Aus Der Biologischen Abteilung Für Land- Und Forstwirtschaft am Kaiserlichen Gesundeitsamte, 4, pp. 427-442.

Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuvéglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rascle, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M. H., Dickman, M., 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. PLoS Genetics, 7(8), e1002230.

Amselem, J., Lebrun, M.-H. e Quesneville, H., 2015. Whole genome comparative analysis of transposable elements provides new insight into mechanisms of their inactivation in fungal genomes. BMC Genomics, 16(1), 141.

Anava, N. e Roncero, M. I., 1995. Skippy, a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. Molecular Genetics and Genomics, 249(6), pp. 637-647.

Andrianov, B. V., Reznik, N. L., Gorelova, T. V. e Zolotova, L. I., 2005. The retrotransposon Tv1 forms infectious virus-like particles in some lines of *Drosophila virilis*. Doklady Biochemistry and Biophysics, 400(1-6), pp. 76-79.

Andrianov, B. V., Zakharyev, V. M., Renzik, N. L., Gorelova, T. V. ed Evgen'ev, M. B., 1999. Gypsy group retrotransposon Tv1 from *Drosophila virilis*. Gene, 239(1), pp. 193-199.

Angeli, S. S., De Mio, L. L. M. e Amorim, L., 2017. Comparative analysis of *Monilinia fructicola* and *M. laxa* isolates from Brazil: monocyclic components of peach brown rot. Ciência Rural, 47(6), e20160300.

Arkhipova, I. R., Pyatkov, K. I., Meselson, M. ed Evgen'ev, M. B., 2003. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. Nature Genetics, 33(2), pp. 123-124.

Aylward, J., Steenkamp, E. T., Dreyer, L. L., Roets, F., Wingfield, B. D. e Wingfield, M. J., 2017. A plant pathology perspective of fungal genome sequencing. IMA Fungus, 8(1), pp. 1-15.

Bao, Z. ed Eddy, S. R., 2002. Automated de novo identification of repeat sequence families in sequenced genomes. Genome Research, 12(8), pp. 1269-1276.

Barry, C., Faugeron, G. e Rossignol, J.-L, 1993. Methylation induced premeiotically in *Ascobolus*: coextension with DNA repeat lengths and effect on transcript elongation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(10), pp. 4557-4561.

Batra, L. R., 1991. World species of *Monilinia* (Fungi): their ecology, biosystematics and control. Mycologia Memoir no. 16, J. Cramer, Berlin/Struttgart.

Beeman, R. W., Thomson, M. S., Clark, J. M., DeCamillis, M. A., Brown, S. J. e Denell, R. E., 1996. Woot, an active gypsy-class retrotransposon in the flour beetle, *Tribolium castaneum*, is associated with a recent mutation. Genetics, 143(1), pp. 417-426.

Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, 27(2), pp. 573-580.

Benvenuto, J., Teixeira-Silva, N. S., Kuramae, E. E., Croll, D. e Monteiro-Vitorello, C. B., 2018. Comparative genomics of smut pathogens: insights from orphans and positively selected genes into host specialization. Frontiers in Microbiology, 9, 660.

Bertocchi, N. A., Torres, F. P., Deprá, M. e da Silva Valente, V. L., 2020. Evolutionary study of the 412/mdg1 lineage of the Ty3/gypsy group of LTR retrotransposons in Diptera. bioRxiv.

Biggs, A. R. e Northover, J., 1985. Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in Ontario peach orchards. Canadian Journal of Plant Pathology, 7(3), pp. 302-307.

Bowen, N. J. e McDonald, J. F., 1999. Genomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals ancient families of retroviral-like elements. Genome Research, 9(10), pp. 924-935.

Byrde, R. J. W. e Willetts, H. J., 1977. The brown rot fungi of fruit. Their biology and control. Pergamon Press, Oxford.

Callens, M., Scornavacca, C. e Bedhomme, S., 2021. Evolutionary responses to codon usage of horizontally transferred genes in *Pseudomonas aeruginosa*: gene retention amelioration and compensatory evolution. Microbial Genomics, 7(6), 000587.

Casacuberta, E. e González, J., 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. Molecular Ecology, 22(6), pp. 1503-1517.

Castanarera, R., López-Varas, L., Borgognone, A., LaButti, K., Lapidus, A., Schmutz, J., Grimwood, J., Pérez, G., Pisabarro, A. G., Grigoriev, I. V., Stajich, J. E. e Ramírez, L., 2016. Transposable elements versus the fungal genome: impact on whole-genome architecture and transcriptional profiles. PLoS Genetics, 12(6), e1006108.

Chan, P. P. e Lowe, T. M., 2009. GtRNAdb: A database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. Nucleic Acids Research, 37(SUPPL.1), pp. D93-D97.

Chan, S. W.-L., Zhang, X., Bernatavichute, Y. V. e Jacobsen, S. E., 2006. Two-step recruitment of RNA-directed DNA methylation to tandem repeats. PLoS Biology, 4(11), pp. 1923-1933.

Chen, F., Everhart, S., Bryson, P. K., Luo, C., Song, X., Liu, X. e Schnabel, G., 2015. Fungicide-induced transposon movement in *Monilinia fructicola*. Fungal Genetics and Biology, 85, pp. 38-44.

Chen, X. e Tompa, M., 2010. Comparative assessment of methods for aligning multiple genome sequences. Nature Biotechnology, 28(6), pp. 567-572.

Craig, R. J., Yushenova, I. A., Rodriguez, F. e Arkhipova, I. R., 2021. An ancient clade of Penelope-like retroelements with permuted domains is present in the green lineage and protists, and dominates many invertebrate genomes. Molecular Biology and Evolution, 38(11), pp. 5005-5020.

Curcio, M. J. e Derbyshire, K. M., 2003. The outs and ins of transposition: from MU to kangaroo. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4(11), pp. 865-877.

Daboussi, M. J., 1997. Fungal transposable elements and genome evolution. Genetica, 100(1-3), pp. 253-260.

Dang, Y., Li, L., Guo, W., Xue, Z. e Liu, Y., 2013. Convergent transcription induces dynamic DNA methylation at disiRNA loci. PLoS Genetics, 9(9), e1003761.

Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z. e Liu, Y., 2011. RNA interference in Fungi: pathways, functions, and applications. Eukaryotic Cell, 10(9), pp. 1148-1155.

De Cal, A., Egüen, B. e Melgarejo, P., 2014. Vegetative compatibility groups and sexual reproduction among Spanish *Monilinia fructicola* isolates obtained from peach and nectarine orchards, but not *Monilinia laxa*. Fungal Biology, 118(5-6), pp. 484-494.

de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A. e Hulo, N., 2006. ScanProsite: Detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. Nucleic Acids Research, 34(WEB. SERV. ISS.), pp. W362-W365.

de Magalhães, J. P. e Church, G. M., 2007. Analyses of human-chimpanzee orthologous gene pairs to explore evolutionary hypotheses of aging. Mechanisms of Ageing and Development, 128(5-6), pp. 355-364.

De Miccolis Angelini, R. M., Romanazzi, G., Pollastro, S., Rotolo, C., Faretra, F. e Landi, L., 2019. New high-quality draft genome of the brown rot fungal pathogen *Monilinia fructicola*. Genome Biology and Evolution, 11(10), pp. 2850-2855.

Decker, L. M., Boone, E. C., Xiao, H., Shanker, B. S., Boone, S. F., Kingston, S. L., Lee, S. A., Hammond, T. M. e Shiu, P. K. T., 2015. Complex formation of RNA silencing proteins in the perinuclear region of *Neurospora crassa*. Genetics, 199(4), pp. 1017-1021.

Derbyshire, M., Denton-Giles, M., Hegedus, D., Seifbarghy, S., Rollins, J., van Kan, J., Seidl, M. F., Faino, L., Mbengue, M., Navaud, O., Raffaele, S., Hammond-Kosack, K., Heard S. e Oliver, R., 2017. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. Genome Biology and Evolution, 9(3), pp. 593-618.

Di Francesco, A., Fruk, M., Martini, C., Jemric, T. e Mari, M., 2015. First report of asiatic brown rot (*Monilinia polystroma*) on apple in Croatia. Plant Disease, 99(8), 1181.

Diolez, A., Marches, F., Fortini, D. e Brygoo, Y., 1995. Boty, a Long-Terminal-Repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology, 61(1), pp. 103-108.

Dobinson, K. F., Harris, R. E. e Hamer, J. E., 1993. Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 6(1), pp. 114-126.

Donnart, T., Piednoël, M., Higuet, D. e Bonnivard, É., 2017. Filamentous ascomycete genomes provide insights into Copia retrotransposon diversity in fungi. BMC Genomics, 18, 410.

Dumesic, P. A. e Madhani, H. D., 2013. The spliceosome as a transposon sensor. RNA Biology, 10(11), pp. 1653-1660.

Dumesic, P. A., Natarajan, P., Chen, C., Drinnenberg, I. A., Schiller, B. J., Thompson, J., Moresco, J. J., Yates III, J. R., Bartel, D. P. e Madhani, H. D., 2013. Stalled spliceosomes are a signal for RNAi-mediated genome defense. Cell, 152(5), pp. 957-968.

Egüen, B., Melgarejo, P. e De Cal, A., 2015. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: fitness analysis and competitiveness. European Journal of Plant Pathology, 141(4), pp. 789-801.

Ehrlich, J., Sankoff, D. e Nadeau, J. H., 1997. Synteny conservation and chromosome rearrangements during mammalian evolution. Genetics, 147(1), pp.289-296.

Eickbush, T. H. e Malik, H. S., 2002. Origins and evolution of retrotransposons. Mobile DNA II. ASM Press, Wahington.

Ellinghaus, D., Kurtz, S. e Willhoeft, U., 2008. LTRharvest, an efficient and flexible software for de novo detection of LTR retrotransposons. BMC Bioinformatics, 9,18.

Emery, K. M., Michailides, T. J. e Scherm, H., 2000. Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot Georgia. Plant Disease, 84(8), pp. 853-857.

Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B. M., Couloux, A., Aury, J.-M., Ségurens, B., Poulain, J., Anthouard, V., Grossetete, S., Khalili, H., Coppin, E., Déquard-Chablat, M., Picard, M., Contamine, V., Arnaise, S., Bourdais, A., Berteaux-Lecellier, V., Gautheret, D., de Vries, R. P., Battaglia, E., Coutinho, P. M., Danchin, E. G., Henrissat, B., Khoury, R. E., Sainsard-Chanet, A., Boivin, A., Pinan-Lucarré, B., Sellem, C. H., Debuchy, R., Wincker, P., Weissenbach, J. e Silar, P., 2008. The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. Genome Biology 9(5), R77.

European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. EFSA Journal, 9(4), pp. 1-155.

Faino, L., Seidl, M. F., Shi-Kunne, X., Pauper, M., van den Berg, G. C. M., Wittenberg, A. H. J. e Thomma, B. P. H. J., 2016. Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen. Genome Research, 26(8), pp. 1091-1100.

Fan, J.-Y., Guo, L.-Y., Xu, J.-P., Luo, Y. e Michailides, T. J., 2010. Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 57(2), pp. 206-212.

Farman, M. L., Tosa, Y., Nitta, N. e Leong, S. A., 1996. MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Molecular and General Genetics, 251(6), pp. 665-674.

Friesen, P. D. e Nissen, M. S., 1990. Gene organization and transcription of TED, a lepidopteran retrotransposon integrated within the baculovirus genome. Molecular and Cellular Biology, 10(6), pp. 3067-3077.

Fu, H. e Dooner H. K., 2002. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(14), pp. 9573-9578.

Gao, X., Hou, Y., Ebina, H., Levin, H. L. e Voytas, D. F., 2008. Chromodomains direct integration of retrotransposons to heterochromatin. Genome Research, 18(3), pp. 359-369.

Garcia-Benitez, C., Melgarejo, P., De Cal, A. e Fontaniella, B., 2016. Microscopic analyses of latent and visible *Monilinia fructicola* infections in nectarines. PloS ONE, 11(8), e0160675.

Gell, I., De Cal, A., Torres, R., Usall, J. e Melgarejo, P., 2009. Conidial density of *Monilinia* spp. on peach fruit surfaces in relation to the incidences of latent infections and brown rot. European Journal of Plant Pathology, 123(4), pp. 415-424.

Ghiurcuta, C. G. e Moret, B. M. E., 2014. Evaluating synteny for improved comparative studies. Bioinformatics, 30(12), pp. I9-I18

Gillespie, J. H., 1991. The causes of molecular evolution. Oxford University Press, New York and Oxford.

Gladyshev, E., 2017. Repeat-induced point mutation and other genome defense mechanisms in Fungi. Microbiology Spectrum, 5(4), FUNK-0042-2017.

Goyon, C., Barry, C., Grégoire, A., Faugeron, G. e Rossignol, J.-L., 1996. Methylation of DNA repeats of decreasing sizes in *Ascobolus immersus*. Molecular and Cellular Biology, 16(6), pp. 3054-3065. Guang, S., Bochner, A. F., Pavelec, D. M., Burkhart, K. B., Harding, S., Lachowiec, J. e Kennedy, S., 2008. An argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. Science, 321(5888), pp. 537-541.

Haas, B. J., Delcher, A. L., Wortman, J. R. e Salzberg, S. L., 2004. DAGchainer: a tool for mining segmental genome duplications and synteny. Bioinformatics, 20(18), pp. 3643-3646.

Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M. V., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P. C., Bollmann, S. R., Bos, J. I. B., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J. C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M. A., Fugelstad, J., Gilroy, E. M., Gnerre, S., Green, P. J., Grenville-Briggs, L. J., Griffith, J., Grünwald, N. J., Horn, K., Horner, N. R., Hu, C. H., Huitema, E., Jeong, D.-H., Jones, A. M. E., Jones, J. D. G., Jones, R. W., Karlsson, E. K., Kunjeti, S. G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., MacLean, D., Chibucos, M. C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H. J. G., Morgan, W., Morris, P. F., Munro, C. A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzón, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D. C., Schumann, U. D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D. J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P. J. I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B. C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P. R. J., Whisson, S. C., Judelson, H. S., Nusbaum, C., 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. Nature, 461(7262), pp. 393-398.

Hamann, A., Feller, F. e Osiewacz, H. D., 2000. Yeti – A degenerate gypsy-like LTR retrotransposon in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. Current Genetics, 38(3), pp. 132-140.

Hane, J. K., Rouxel, T., Howlett, B. J., Kema, G. H. J., Goodwin, S. B. e Oliver, R. P., 2011. A novel mode of chromosomal evolution peculiar to filamentous Ascomycete fungi. Genome Biology, 12(5), R45.

Hane, J. K., Williams, A. H., Taranto, A. P., Solomon, P. S., Oliver, R.P. 2015. Repeat-induced point mutation: a fungal-specific, endogenous mutagenesis process. In: van den Berg M, Maruthachalam K, editors. Genetic transformation systems in fungi vol 2, Fungal Biology Springer, Cham. p 55-68.

Hansen, L. J. e Sandmeyer, S. B., 1990. Characterization of a transpositionally active Ty3 element and identification of the Ty3 integrase protein. Journal of Virology, 64(6), pp. 2599-2607.

Hansen, L. J., Chalker, D. L. e Sandmeyer, S. B., 1988. Ty3, a yeast retrotransposon associated with tRNA genes, has homology to animal retroviruses. Molecular and Cellular Biology, 8(12), pp. 5245-5256.

Harada, Y., Nakao, S., Sasaki, M., Sasaki, Y., Ichihashi, Y. e Sano, T., 2004. *Monilia mumecola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. Journal of General Plant Pathology, 70(6), pp. 297-307.

Hartmann, F. E., Sánchez-Vallet, A., McDonald, B. A. e Croll, D., 2017. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. ISME Journal, 11(5), pp. 1189-1204.

Haug-Baltzell, A., Jarvis, E. D., McCarthy, F. M. e Lyons, E., 2015. Identification of dopamine receptors across the extant avian family tree and analysis with other clades uncovers a polyploid expansion among vertebrates. Frontiers in Neuroscience, 9, 361.

Haug-Baltzell, A., Stephens, S. A., Davey, S., Scheidegger, C. E. e Lyons, E., 2017. SynMap2 and SynMap3D: Web-based whole-genome synteny browsers. Bioinformatics, 33(14), pp. 2197-2198.

Havecker, E. R., Gao, X. e Voytas, D. F., 2004. The diversity of LTR retrotransposons. Genome Biology, 5(6), 225.

Hilber-Bodmer, M., Knorst, V., Smits, T. H. M. e Patocchi, A., 2012. First report of asian brown rot caused by *Monilia polystroma* on apricot in Switzerland. Plant Disease, 96(1), pp. 146-146.

Höck, J. e Meister, G., 2008. The Argonaute protein family. Genome Biology, 9(2), 210.

Holb, I. J., 2003. The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.): I. Important features of their biology. International Journal of Horticultural Science, 9(3-4), pp. 23-36.

Holst-Jensen, A., Kohn, L. M., Jakobsen, K. S. e Schumacher, T., 1997. Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia (Sclerotiniaceae)* based on coding and noncoding rDNA sequences. American Journal of Botany, 84(5), pp. 686-701.

Holtz, B. A., Michailides, T. J. e Hong, C., 1998. Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. Plant Disease, 82(12), pp. 1375-1380.

Honey, E. E., 1928. The Monilioid species of *Sclerotinia*. Mycologia, 20(3), pp. 127-157.

Hong, C. e Michailides, T. J., 1998. Effect of temperature on the discharge and germination of ascospores by apothecia of *Monilinia fructicola*. Plant Disease, 82(2), pp. 195-202.

Horns, F., Petit, E., Yockteng, R. e Hood, M. E., 2012. Patterns of repeat-induced point mutation in transposable elements of basidiomycete in fungi. Genome Biology and Evolution, 4(3), pp. 240-247.

Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G. e Tanović, B., 2018. Fungicide sensitivity, growth rate, aggressiveness and frost hardiness of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolates. European Journal of Plant Pathology, 151(2), pp. 389-400.

Hu, M.-J., Cox, K. D., Schnabel, G. e Luo, C.-X., 2011. *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. PLoS ONE, 6(9), e24990.

Inouye, S., Yuki, S. e Saigo, K., 1986. Complete nucleotide sequence and genome organization of a *Drosophila* transposable genetic element, 297. European Journal of Biochemistry, 154(2), pp. 417-425.

Jagannath, A e Wood, M. J. A., 2009. Localization of double-stranded small interfering RNA to cytoplasmic processing bodies is ago2 dependent and results in up-regulation of GW182 and argonaute-2. Molecular Biology of the Cell, 20(1), pp. 521-529.

Jänsch, M., Frey, J. E., Hilber-Bodmer, M., Broggini, G. A. L., Weger, J., Schnabel, G. e Patocchi, A., 2012. SSR marker analysis of *Monilinia fructicola* from Swiss apricots suggests introduction of the pathogen from neighbouring countries and the United States. Plant Pathology, 61(2), pp. 247-254.

Jardim, S. S., Schuch, A. P., Pereira, C. M. e Loreto, E. L. S., 2015. Effects of heat and UV radiation on the mobilization of transposon mariner-Mos1. Cell Stress and Chaperones, 20(5), pp. 843-851.

Jiao, W.-B. e Schneeberger, K., 2020. Chromosome-level assemblies of multiple *Arabidopsis* genomes reveal hotspots of rearrangements with altered evolutionary dynamics. Nature Communications, 11, 989.

Jones, D. T., Taylor, W. R. e Thornton, J. M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Bioinformatics, 8(3), pp. 275-282.

Jurka, J., 2003. Repetitive DNA: detection, annotation, and analysis. Introduction to Bioinformatics: a theoretical and Pratical Approach. Humana Press, Totowa.

Jurka, J., Klonowski, P., Dagman, V. e Pelton, P., 1996. Censor – A program for identification and elimination of repetitive elements from DNA sequences. Computers and Chemistry, 20(1), pp. 119-121.

Kable, P. F., 1972. Brown rot of stone fruits on the Murrumbidgee irrigation areas. III*. Influence of weather conditions during the harvest period on disease incidence in canning peaches. Australian Journal of Agricultural Research, 23(6), pp. 1035-1044.

Kaneko, I., Tanaka, A. e Tsuge, T., 2000. REAL, an LTR retrotransposon from the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. Molecular and General Genetics, 263(4), pp. 625-634.

Kang, S., 2001. Organization and distribution pattern of MGLR-3, a novel retrotransposon in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Fungal Genetics and Biology, 32(1), pp. 11-19.

Kang, S., Lebrun, M. H., Farral, L. e Valent, B., 2001. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(5), pp. 671-674.

Kapitonov, V. V. e Jurka, J., 2008. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. Nature Reviews Genetics, 9(5), pp. 411-412.

Kapitonov, V. V., Tempel, S. e Jurka, J., 2009. Simple and fast classification of Non-LTR retrotransposons based on phylogeny of their RT domain protein sequences. Gene, 448(2), pp. 207-213.

Kato, S., Matsuo, K., Takahashi, N., Takano, T. e Nishimura, N., 1987. The entire nucleotide sequence of baboon endogenous virus DNA: A chimeric genome structure of murine type C and simian type D retroviruses. The Japanese Journal of Genetics, 62(2), pp. 127-137.

Khan, E., Mack, J. P. G., Katz, R. A., Kulkosky, J. e Skalka, A. M., 1991. Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. Nucleic Acids Research, 19(4), pp. 851-860.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2), pp. 111-120.

Kimura, M., 1983. The neutral allele theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge.

Kjærbølling, I., Vesth, T., Frisvad, J. C., Nybo, J. L., Theobald, S., Kildgaard, S., Petersen, T. I., Kuo, A., Sato, A., Lyhne, E. K., Kogle, M. E., Wiebenga, A., Kun, R. S., Lubbers, R. J. M., Mäkelä, M. R., Barry, K., Chovatia, M., Clum, A., Daum, C., Haridas, S., He, G., LaButti, K., Lipzen, A., Mondo, S., Pangilinan, J., Riley, R., Salamov, A., Simmons, B. A., Magnuson, J. K., Henrissat, B., Mortensen, U. H., Larsen, T. O., de Vries, R. P., Grigoriev, I. V., Machida, M., Baker, S. E. e Andersen, M. R., 2020. A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section Flavi. Nature Communications, 11, 1106.

Klein, S. J. e O'Neill, R. J., 2018. Transposable elements: genome innovation, chromosome, diversity, and centromere conflict. Chromosome Research, 26(1), pp. 5-23.

Knapp, G. D., Németh, J. B., Barry, K., Hainaut, M., Henrissat, B., Johnson, J.,
Kuo, A., Lim, J. H. P., Lipzen, A., Nolan, M., Ohm, R. A., Tamás, L., Grigoriev, I.
V., Spatafora, J. W., Nagy, L. G. e Kovács, G. M., 2018. Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. Scientific Reports, 8, 6321.

Kohany, O., Gentles, A. J., Hankus, L. e Jurka, J., 2006. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. BMC Bionformatics, 7,474.

Kojima, K. K., 2019. Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. Genes and Genetic Systems, 94(6), pp.233-252.

Koonin, E. V., Zhou, S. e Lucchesi, J. C., 1995. The chromo superfamily: New members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. Nucleic Acids Research, 23(21), pp. 4229-4233.

Kossack, D. S. e Kinlaw, C. S., 1999. IFG, a gypsy-like retrotransposon in *Pinus* (Pinaceae), has an extensive history in pines. Plant Molecular Biology, 39(3), pp. 417-426.

Kramerov, D. A. e Vassetzky, N. S., 2011. Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. Heredity, 107(6), pp. 487-495.

Kreidl, S., Edwards, J. e Villalta, O. N., 2015. Assessment of pathogenicity and infection requirements of *Monilinia* species causing brown rot of stone fruit in Australian orchards. Australasian Plant Pathology, 44(4), pp. 419-430.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. e Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6), pp. 1547-1549.

Kumekawa, N., Ohmido, N., Fukui, K., Ohtsubo, E. e Ohtsubo, H., 2001. A new gypsy-type retrotransposon, RIRE7: Preferential insertion into the tandem repeat sequence TrsD in pericentromeric heterochromatin regions of rice chromosomes. Molecular and General Genetics, 265(3), pp. 480-488.

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409(6822), pp. 860-921.

Landi, L., De Miccolis Angelini, R. M., Pollastro, S., Abate, D., Faretra, F. e Romanazzi, G., 2018. Genome sequence of the brown rot fungal pathogen *Monilinia fructigena*. BMC Research Notes, 11(1), 758.

Landi, L., Feliziani, E. e Romanazzi, G., 2016. Surveys for *Monilinia* spp. on stone fruit in centraleastern Italy. Acta Horticulturae, 1144, pp. 225-230.

Landi, L., Pollastro, S., Rotolo, C., Romanazzi, G., Faretra, F. e De Miccolis Angelini, R. M., 2020. Draft genomic resources for the brown rot fungal pathogen *Monilinia laxa*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 33(2), pp. 145-148.

Lantos, A., Petróczy, M., Oláh, R. e Palkovics, L., 2017. Characterization of *Monilinia linhartiana* isolates. Journal of Plant Pathology, 99(3), pp. 583-591.

Larena, I. e Melgarejo, P., 1996. Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium* oxysporum f sp lycopersici by a lytic enzyme-producing *Penicillium* purpurogenum. Biological Control, 6(3), pp. 361-367.

Le, T.-N., Schumann, U., Smith, N. A., Tiwari, S., Khang Au, P. C., Zhu, Q.-H., Taylor, J. M., Kazan, K., Llewellyn, D. J., Zhang, R., Dennis, E. S. e Wang, M.-B., 2014. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. Genome Biology, 15(9), 458.

Leblanc, P., Desset, S., Dastuague, B. e Vaury, C., 1997. Invertebrate retroviruses: ZAM a new candidate in *D. melanogaster*. The EMBO Journal, 16(24), pp. 7521-7531.

Lee, H.-C., Chang, S.-S., Choudhary, S., Aalto, A. P., Maiti, M., Bamford, D. H. e Liu, Y., 2009. QiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. Nature, 459(7244), pp. 274-277.

Lee, H.-C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z. A., Freitag, M., Selker, E. U., Mello, C. C. e Liu, Y., 2010. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. Molecular Cell, 38(6), pp. 803-814.

Leng, P., Klatte, D. H., Schumann, G., Boeke, J. D. e Steck, T. L., 1998. Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. Nucleic Acids Research, 26(8), pp. 2008-2015.

Leung, A. K. L. e Sharp, P. A., 2013. Quantifying argonaute proteins in and out of GW/P-bodies: implications in microRNA activities. Advances in Experimental Medicine and Biology, 768, pp.165-182.

Lichtin, N., Salvo-Garrido, H., Till, B., Caligari, P. D. S., Rupayan, A., Westermeyer, F. e Olivos, M., 2020. Genetic and comparative mapping of *Lupinus luteus* L. highlight syntenic regions with major orthologous genes controlling anthracnose resistance and flowering time. Scientific Reports, 10, 19174.

Lino, L. O., Pacheco, I., Mercier, V., Faoro, F., Bassi, D., Bornard, I. e Quilot-Turion, B., 2016. Brown rot strikes prunus fruit: an ancient fight almost always lost. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(20), pp. 4029-4047.

Loiseau, V., Peccoud, J., Bouzar, C., Guillier, S., Fan, J., Gueli Alletti, G., Meignin, C., Herniou, E. A., Federici, B. A., Wennmann, J. T., Jehle, J. A., Cordaux, R. e Gilbert, C., 2021. Monitoring insect transposable elements in large double-stranded DNA viruses reveals host-to-virus and virus-to-virus transposition. Molecular Biology and Evolution, 38(9), pp. 3512-3530.

Luo, Y. e Michailides, T. J., 2001. Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 91(9), pp.864-872.

Luo, Y. e Michailides, T. J., 2003. Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. Phytopathology, 93(1), pp. 102-111.

Lyons, E., e Freeling, M., 2008. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. The Plant Journal, 53(4), pp. 661-673.

Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J. e Freeling, M., 2008. The value of nonmodel genomes and an example using SynMap within CoGe to dissect the hexaploidy that predates the rosids. Tropical Plant Biology, 1, pp. 181-190.

Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J., Alam, M., Ming, R., Tang, H., Wang, X., Bowers, J., Paterson, A., Lisch, D., Freeling, M., 2008. Finding and comparing syntenic regions among *Arabidopsis* and the outgroups papaya, poplar, and grape: CoGe with rosids. Plant Physiology, 148(4), pp. 1772-1781.

Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D. e Lopez, R., 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Research, 47(W1), pp. W636-W641.

Majorek, K. A., Dunin-Horkawicz, S., Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Nowotny, M., Ginalski, K. e Bunjnicki, J. M., 2014. The RNase H-like superfamily: new members, comparative structural analysis and evolutionary classification. Nucleic Acids Research, 42(7), pp. 4160-4179.

Malagnac, F., Grégoire, A., Goyon, C., Rossignol, J.-L. e Faugeron, G., 1999. Masc2, a gene from *Ascobolus* encoding a protein with a DNA-methyltransferase activity in vitro, is dispensable for in vivo methylation. Molecular Microbiology, 31(1), pp. 331-338.

Malik, H. S. ed Eickbush, T. H., 1999. Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR retrotransposons. Journal of Virology. 73(6), pp. 5186-5190.

Marchler-Bauer, A. e Bryant, S. H., 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. Nucleic Acids Research, 32(WEB SERVER ISS.), pp. W327-W331.

Marco, A. e Marín, I., 2008. How Athila retrotransposons survive in the *Arabidopsis genome*. BMC Genomics, 9,219.

Mari, M., Casalini, L., Baraldi, E., Bertolini, P. e Pratella, G. C., 2003. Susceptibility of apricot and peach fruit to *Monilinia laxa* during phenological stages. Postharvest Biology and Technology, 30(1), pp. 105-109.

Marín, I. e Lloréms, C., 2000. Ty3/Gypsy retrotransposons: Description of new *Arabidopsis thaliana* elements and evolutionary perspectives derived from comparative genomic data. Molecular Biology and Evolution, 17(7), pp. 1040-1049.

Marks, R. A., Hotaling, S., Frandsen, P. B. e VanBuren, R., 2021. Representation and participation across 20 years of plant genome sequencing. Nature Plants, 7(12), pp. 1571-1578.

Marlor, R. L., Parkhurst, S. M. e Corces, V. G., 1986. The *Drosophila melanogaster* gypsy transposable element encodes putative gene products homologous to retroviral proteins. Molecular and Cellular Biology, 6(4), pp. 1129-1134.

Martini, C. e Mari, M., 2014. Phostharvest decay. *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa (Monilinia* rot, brown rot). Accademic Press, San Diego.

Mathias, S. L., Scott, A. F., Kazazian Jr., H. H., Boeke, J. D. e Gabriel, A., 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. Science, 254(5039), pp. 1808-1810.

Matzke, M. A. e Mosher, R. A., 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nature Reviews Genetics, 15(6), pp. 394-408.

Matzke, M. A., Kanno, T. e Matzke, A. J., 2015. RNA-Directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. Annual Review of Plant Biology, 66, pp. 243-267.

McArt, S. H., Miles, T. D., Rodriguez-Saona, C., Schilder, A., Adler, L. S. e Grieshop, M. J., 2016. Floral scent mimicry and vector-pathogen associations in a pseudoflower-inducing plant pathogen system. PLoS ONE, 11(11), e0165761.

McDonald, M. C., Taranto, A. P., Hill, E., Schwessinger, B., Liu, Z., Simpfendorfer, S., Milgate, A. e Solomon, P. S., 2019. Transposon- mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein ToxA between three fungal wheat pathogens. mBio, 10(5), e01515-19.

McHale, M. T., Roberts, I. N., Noble, S. M., Beaumont, C., Whitehead, M. P., Seth, D. e Oliver, R. P., 1992. CfT-I: an LTR-retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. Molecular and General Genetics, 233(3), pp. 337-347.

Mhiri, C., De Wit, P. J. G. M. e Grandbastien, M.-A., 1999. Activation of the promoter of the Tnt1 retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 12(7), pp. 592-603.

Michailides, T. J., Ogawa, J. M. e Opgenorth, D. C., 1987. Shift of *Monilinia* spp. and distribution of isolates sensitive and resistant to benomyl in California prune and apricot orchards. Plant Disease, 71, pp. 893-896.

Michaille, J. J., Mathavan, S., Gaillard, J. e Garel, A., 1990. The complete sequence of mag, a new retrotransposon in *Bombyx mori*. Nucleic Acids Research, 18(3), pp. 674.

Moelling, K., Broecker, F., Russo, G. e Sunagawa, S., 2017. RNase H as gene modifier, driver of evolution and antiviral defense. Frontiers in Microbiology, 8(SEP), 1745.

Montuschi, C., Baschieri, T., Rimondi, S., Rossi, R., Antoniacci, L. e Bugiani, R., 2016. *Monilinia fructicola* in Emilia-Romagna: 2010-2015 survey on the regional territory. Atti Giornate Fitopatologiche, Chianciano terme.

Mount, S. M. e Rubin, G. M., 1985. Complete nucleotide sequence of the *Drosophila* transposable element copia: Homology between copia and retroviral proteins. Molecular and Cellular Biology, 5(7), pp. 1630-1638.

Murata, H. e Yamada, A., 2000. marY1, a member of the gypsy group of long terminal repeat retroelements from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. Applied and Environmental Microbiology, 66(8), pp. 3642-3645.

Muszewska, A., Hoffman-Sommer, M. e Grynberg, M., 2011. LTR retrotransposons in Fungi. PLoS ONE, 6(12), e29425.

Muszewska, A., Steczkiewicz, K., Stepniewska-Dziubinska, M. e Ginalski, K., 2019. Transposable elements contribute to fungal genes and impact fungal lifestyle. Scientific Reports, 9, 4307.

Nadeau, J. H., 1989. Maps of linkage and synteny homologies between mouse and man. Trends in Genetics, 5(3), pp. 82-86.

Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. Journal of Molecular Biology, 48(3), pp. 443-453.

Neumann, P., Novák, P., Hoštáková, N. e MacAs, J., 2019. Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. Mobile DNA, 10(1),0144.

Pace II, J. K., Gilbert, C., Clark, M. S. e Feschotte, C., 2008. Repeated horizontal transfer of a DNA transposon in mammals and other tetrapods. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(44), pp.17023-17028.

Pace, J. K. e Feschotte, C., 2007. The evolutionary history of human DNA transposons: evidence for intense activity in the primate lineage. Genome Research, 17(4), pp. 422-432.

Panaud, O., 2016. Horizontal transfers of transposable elements in eukaryotes: the flying genes. Comptes Rendus Biologies, 339(7-8), pp. 296-299.

Pantazidis, A., Labrador, M. e Fontdevilla, A., 1999. The retrotransposon Osvaldo from *Drosophila buzzatii* displays all structural features of a functional retrovirus. Molecular Biology and Evolution, 16(7), pp. 909.921.

Papavasileiou, A., Testempasis, S., Michailides, T. J. e Karaoglanidis, G. S., 2015. Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. Plant Pathology, 64(2), pp. 416-424.

Park, M., Sarkhosh, A., Tsolova, V. ed El-Sharkawy, I., 2021. Horizontal transfer of LTR retrotransposons contributes to the genome diversity of *Vitis*. International Journal of Molecular Sciences, 22(19), 10446.

Passarge, E., Horsthemke, B. e Farber, R. A., 1999. Incorrect use of the term synteny. Nature Genetics, 23(4), pp. 387.

Patel, R., 2011. Orthologous gene identification in plant species. University of Toronto.

Pavanello, E. P., Berghett, M. R. P., Schultz, E. E., Thewes, F. R., Schmidt, S. F. P. e Brackmann, A., 2018. Peach brown rot control and the relationship of latent infection with postharvest disease. Revista Ceres, 65(6), pp. 517-526.

Payer, L. M. e Burns, K. H., 2019. Transposable elements in human genetic disease. Nature Reviews Genetics, 20(12), pp. 760-772.

Petróczy, M. e Palkovics, L., 2009. First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. European Journal of Plant Pathology, 125(2), pp. 343-347.

Petróczy, M., Szigethy, A. e Palkovics, L., 2012. *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. Trees Structure and Function, 26, pp. 153-164.

Pitchiaya, S., Mourao, M. D. A., Jalihal, A. P., Xiao, L., Jiang, X., Chinnaiyan, A. M., Schnell, S. e Walter, N. G., 2019. Dynamic recruitment of single RNAs to processing bodies depends on RNA functionality. Molecular Cell, 74(3), pp. 521-533.

Plissonneau, C., Benvenuto, J., Mohd-Assaad, N., Fouché, S., Hartmann, F. E. e Croll, D., 2017. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. Frontiers in Plant Science, 8, 119.

Poniatowska, A., Michalecka, M. e Bielenin, A., 2013. Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. European Journal of Plant Pathology, 135(4), pp. 855-865.

Porquier A., Morgant G., Moraga J., Dalmais B., Luyten I., Simon A., Pradier J.-M., Amselem J., Collado I. G., Viaud M., 2016. The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)₂Cys₆ transcription factor BcBot6. Fungal Genetics and Biology, 96, pp. 33-46.

Price, A. L., Jones, N. C. e Pevzner, P. A., 2005. De novo identification of repeat families in large genomes. Bioinformatics, 21(SUPPL. 1), pp. i351-i358.

Razeto-Barry, P., Díaz, J. e Vásquez, R. A., 2012. The nearly neutral and selection theories of molecular evolution under the fisher geometrical framework: substitution rate, population size and complexity. Genetics, 191(2), pp. 523-534.

Ricci, M., Peona, V., Guichard, E., Taccioli, C. e Boattini, A., 2018. Transposable elements activity is positively related to rate of speciation in mammals. Journal of Molecular Evolution, 86(5), pp. 303-310.

Rizzon, C., Marais, G., Gouy, M. e Biémont, C., 2002. Recombination rate and the distribution of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. Genome Research, 12(3), pp. 400-407.

Romano, N. e Mancino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Molecular Microbiology, 6(22), pp. 3343-3353.

Roquis, D, Robertson, M., Yu, L., Thieme, M., Julkowska, M. e Bucher, E., 2021. Genomic impact of stress-induced transposable element mobility in *Arabidopsis*. Nucleic Acids Research, 49(18), pp. 10431-10447.

Runjindamai, N., Jeffries, P. e Xu, X.-M., 2014. Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. European Journal of Plant Pathology, 140(1), pp. 1-17.

Saigo, K., Kugimiya, W., Matsuo, Y., Inouye, S., Yoshioka, K. e Yuki, S., 1984. Identification of the coding sequence for a reverse transcriptase-like enyme in a transposable genetic element in *Drosophila melanogaster*. Nature, 312(5995), pp. 659-661.

Saitou, N. e Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolutions, 4(4), pp. 406-425.

Samarajeewa, D. A., Sauls, P. A., Sharp, K. J., Smith, Z. J., Xiao, H., Groskreutz, K. M., Malone, T. L., Boone, E. C., Edwards, K. A., Shiu, P. K. T., Larson, E. D. e Hammond, T. M., 2014. Efficient detection of unpaired DNA requires a member of the rad54-like family of homologous recombination proteins. Genetics, 198(3), pp. 895-904.

Santana, M. F., Silva, J. C. F., Mizubuti, E. S. G., Araújo, E. F. e Queiroz, M. V., 2014. Analysis of Tc1-Mariner elements in *Sclerotinia sclerotiorum* suggests recent activity and flexible transposases. BMC Microbiology, 14, 256.

Schaack, S., Gilbert, C. e Feschotte, C., 2010. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. Trends in Ecology and Evolution, 25(9), pp. 537-546.

Schmidt, S. M., Lukasiewicz, J., Farrer, R., van Dam, P., Bertoldo, C. e Rep, M., 2016. Comparative genomics of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* reveals the secreted protein recognized by the *Fom-2* resistance gene in melon. New Phytologist, 209(1), pp. 307-318.

Schrader, L., Kim, J. W., Ence, D., Zimin, A., Klein, A., Wyschetzki, K., Weichselgartner, T., Kemena, C., Stökl, J., Schultner, E., Wurm, Y., Smith, C. D., Yandell, M., Heinze, J., Gadau, J. e Oettler, J., 2014. Transposable element islands facilitate adaptation to novel environments in an invasive species. Nature Communications, 5, 5495.

Shabalina, S. A. e Koonin, E. V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. Trends in Ecology Evolution, 23(10), pp. 578-587.

Shi, J., Ma, X., Zhang, J., Zhou, Y., Liu, M., Huang, L., Sun, S., Zhang, X., Gao, X., Zhan, W., Li, P., Wang, L., Lu, P., Zhao, H., Song, W. e Lai, J., Chromosome conformation capture resolved near complete genome assembly of broomcorn millet. Nature Communications, 10, 464.

Shiu, P. T. K., Raju, N. B., Zickler, D. e Metzenberg, R. L., 2001. Meiotic silencing by unpaired DNA. Cell, 107(7), pp. 905-916.

Siebold, P. F. V. e Zuccarini J. G., 1835-1841. Flora japonica sive plantae quas in imperio japonico collegit, descripsit, ex parte in ipsis locis pingendas curvait. Sectio Prima Continens Plantas-Ornatui vel Usul inservientes.

Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L. e Xenarios, I., 2013. New and continuing developments at PROSITE. Nucleic Acids Research, 41(D1), pp. D344-D347.

Singh, P. K., Thakur, S., Rathour, R., Variar, M., Prashanthi, S. K., Singh, A. K., Singh, U. D., Sharma, V., Singh, N. K. Sharma, T. R., 2014. Transposon-based high sequence diversity in Avr-Pita alleles increases the potential for pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* populations. Functional and Integrative Genomics, 14(2), pp. 419-429.

Slot, J. C. e Rokas, A., 2010. Multiple GAL pathway gene clusters evolved independently and by different mechanisms in fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(22), pp. 10136-10141.

Smit, A. F. A. and Hubley, R. (2008-2015). RepeatModeler Open-1.0. http://www.repeatmasker.org.

Smyth, D. R., Kalitsis, P., Joseph, J. L. e Sentry, J. W., 1989. Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to Ty3 of yeast and the gypsy group of *Drosophila*. Proceedings of the National Accademy of Sciences of the United States of America, 86(13), pp. 5015-2019.

Springer, M. S., Davidson, E. H. e Britten, R. J., 1991. Retroviral-like element in a marine invertebrate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88(19), pp. 8401-8404.

Stauber, L., Prospero, S., Croll, D., 2020. Comparative genomics analyses of lifestyle transitions at the origin of an invasive fungal pathogen in the genus *Cryphonectria*. mSphere, 5(5), pp. 1-17.

Stein, L. D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M. R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., Coulson, A., D'Eustachio, P., Fitch, D. H. A., Fulton, L. A., Fulton, R. E., Griffiths-Jones, S., Harris T. W., Hillier, L W., Kamath, R., Kuwabara, P. E., Mardis, E. R., Marra, M. A., Miner, T. L., Minx, P., Mullikin, J. C., Plumb, R. W., Rogers, J., Schein, J. E., Sohrmann, M., Spieth, J., Stajich, J. E., Wei, C., Willey., D., Wilson, R. K., Durbin, R. e Waterston, R. H., 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. PLoS Biology, 1(2), pp. 166-192.

Stein, N., 2013. Brenner's encyclopedia of genetics (second edition). Synteny (syntenic genes). Accademic Press, San Diego.

Svoboda, P., 2020. Key mechanistic principles and considerations concerning RNA interference. Frontiers in Plant Science, 11, 1237.

Tanda, S., Mullor, J. L. e Corces, V. G., 1994. The *Drosophila* tom retrotransposon encodes an envelope protein. Molecular and Cellular Biology, 14(8), pp. 5392-5401.

Tang, H., Bomhoff, M. D., Briones E., Zhang L., Schnable, J. C. e Lyons, E., 2015. SynFind: Compiling syntenic regions across any set of genomes on demand. Genome Biology and Evolution, 7(12), pp. 3286-3298.

Tang, H., Lyons, E., Pedersen, B., Schnable, J. C., Paterson, A. H. e Freeling, M., 2011. Screening synteny blocks in pairwise genome comparisons through integer programming. BMC Bioinformatics, 12, 102.

Tang, W. W. C., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H. G., Floros, V. I., Bradshaw, C. R., Hackett, J. A., Chinnery, P. F. e Surani, M. A., 2015. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. Cell, 161(6), pp. 1453-1467.

Tate, K. G. e Wood, P. N., 2000. Potential ascospore production and resulting blossom blight by *Monilinia fructicola* in unsprayed peach trees. New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science, 28(3), pp. 219-224.

Touchman, J., 2010. Comparative Genomics. Nature Education Knowledge, 3(10), 13.

Tran, T. T., Li, H., Nguyen, D. Q., Sivasithamparam, K., Jones M. G. K. e Wylie, S. J., 2020. Comparisons between genetic diversity, virulence and colony morphology of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolates. Journal of Plant Pathology, 102(3), pp. 743-751.

Tuller, T., 2011. Codon bias, tRNA pools and horizontal gene transfer. Mobile Genetic Elements, 1(1), pp. 75-77.

Uricaru, R., 2010 Algorithms for genome comparison applied to bacterial genomes. Bioinformatics. Université Montpellier.

Valero-Jiménez, C. A., Veloso, J., Staats, M. e van Kan, J. A. L., 2019. Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity. BMC Genomics, 20(1), 203.

Van de Wouw, A. P., Elliott, C. E., Popa, K. M. e Idnurm, A., 2019. Analysis of Repeat Induced Point (RIP) mutations in *Leptosphaeria maculans* indicates variability in the RIP process between fungal species. Genetics, 211(1), pp. 89-104.

Van Kan, J. A. L., Stassen, J. H. M., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A. J., Faino, L., Farmer, A. D., Papasotiriou, D. G., Zhou, S., Seidl, M. F., Cottam E., Edel, D., Hahn, M., Schwartz, D. C., Dietrich, R. A., Widdison, S. e Scalliet, G., 2017. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Pathology, 18(1), pp. 75-89.

van Leeuwen, G. C. M., Baayen, R. P., Holb, I. J. e Jeger, M. J., 2002. Distiction of the asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. Mycological Research, 106(4), pp. 444-451.

Vasić, M., Duduk, N. e Ivanović, M. S., 2013. First report of brown rot caused by *Monilia polystroma* on apple in Serbia. Plant Disease, 97(1), pp. 145-145.

Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J. e De Cal, A., 2010. Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. Plant Disease, 94(8), pp. 1048-1054.

Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N. e De Cal A., 2012. Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. European Journal of Plant Pathology, 133(3), pp. 585-598.

Wang, D e Gao, F., 2019. Comprehensive analysis of replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* genomes. Frontiers in Microbiology, 10, 2122.

Wang, L., Xu, X., Yang, J., Chen, L., Liu, B., Liu, T. e Jin, Q., 2018. Integrated microRNA and mRNA analysis in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum*. BMC Genomics, 19(1), 993.

Wang, X., Darwiche, S. e Heitman, J., 2013. Sex-induced silencing operates during opposite-sex and unisexual reproduction in *Cryptococcus neoformans*. Genetics, 193(4), pp. 1163-1174.

Wang, X., Hsueh, Y.-P. Li, W., Floyd, A., Skalsky, R. e Heitman, J., 2010. Sexinduced silencing defends the genome of *Cryptococcus neoformans* via RNAi. Genes and Development, 24(22), pp. 2566-2582.

Watson, J. D. e Crick, F. H. C., 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 171(4356), pp.737-738.

Watts, J. M., Dang, K. K., Gorelick, R. J., Leonard, C. W., Bess Jr, J. W., Swanstrom, R., Burch, C. L. e Weeks, K. M., 2009. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. Nature, 460(7256), pp. 711-716.

Weaver, D. C., Shpakovski, G. V., Caputo, E., Levin, H. L. e Boeke, J. D., 1993. Sequence analysis of closely related retrotransposon families from fission yeast. Gene, 131(1), pp. 135-139.

Weber, B. e Schmidt, T., 2009. Nested Ty3-gypsy retrotransposons of a single *Beta procumbens* centromere contain a putative chromodomain. Chromosome Research, 17(3), pp. 379-396.

Wei, L., Gu, L., Song, X., Cui, X., Lu, Z., Zhou, M., Wang, L., Hu, F., Zhai, J., Meyers, B. C. e Cao, X., 2014. Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(10), pp. 3877-3882.

Wicker T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P. e Schulman, A. H., 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nature Reviews Genetics, 8(12), pp. 973-982.

Willetts, H. J. e Harada, Y., 1984. A review of apothecial production by *Monilinia* fungi in Japan. Mycologia, 76(2), pp. 314-325.

Winter, G., 1883. Uber einege Nordamerikanische pilz. Hedwigia.

Wisecaver, J. H., Slot, J. C. e Rokas, A., 2014. The evolution of fungal metabolic pathways. PLoS Genetics, 11(9), e1005449.

Withers, J. B. e Beemon K. L., 2011. The structure and function of the Rous sarcoma virus RNA stability element. Journal of Cellular Biochemistry, 112(11), pp. 3085-3092.

Wong, S. e Wolfe, K. H., 2005. Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation. Nature Genetics, 37(7), pp. 777-782.

Xiao, H., Vierling, M. M., Kennedy, R. F., Boone, E. C., Decker, L. M., Sy, V. T., Haynes, J. B., Williams, M. A. e Shiu, P. K. T., 2021. Involvement of RNA granule proteins in meiotic silencing by unpaired DNA. G3: Genes, Genomes, Genetics, 11(10), jkab179. Xin, Y., Ma, B., Zeng, Q., He, W., Qin, M. e He, N., 2021. Dynamic changes in transposable element and gene methylation in mulberry (*Morus notabilis*) in response to *Botrytis cinerea*. Horticulture Research, 8(154).

Xiong, Y. ed Eickbush T. H., 1988. Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. Molecular Biology and Evolution, 5(6), pp. 675-690.

Xu, Z. e Wang, H., 2007. LTR-FINDER: An efficient tool for the prediction of fulllength LTR retrotransposons. Nucleic Acids Research, 35(SUPPL.2), pp. W265-W268.

Yang, Z., 1997. PAML: A program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Bioinformatics, 13(5), pp. 555-556.

Yin, L. F., Chen, S. N., Cai, M. L., Li, G. Q. e Luo, C. X., 2014. First report of brown rot of apricot caused by *Monilia mumecola*. Plant Disease, 98(5), pp. 694-694.

Yin, L.-F., Chen, S.-N., Chen, G.-K, Schnabel, G., Du, S.-F., Chen, C., Li, G.-Q. e Luo, C.-X., 2015. Identification and characterization of three *Monilinia* species from plum China. Plant Disease, 99(12), pp. 1775-1783.

Yoshida, K., Saunders, D. G. O., Mitsuoka, C., Natsume, S., Kosugi, S., Saitoh, H., Inoue, Y., Chuma, I., Tosa, Y., Cano, L. M., Kamoun, S. e Terauchi, R., 2016. Host specialization of the blast fungus *Magnaporthe oryzae* is associated with dynamic gain and loss of genes linked to transposable elements. BMC Genomics, 17, 370.

Yuki, S., Inouye, S., Ishimaru, S. e Saigo, K., 1986. Nucleotide sequence characterization of a *Drosophila* retrotransposon, 412. European Journal of Biochemistry, 158(2), pp. 403-410.

Zeng, F., Lian, X., Zhang, G., Yu, X., Bradley, C. A., Ming., R., 2017. A comparative genome analysis of *Cercospora sojina* with other members of the pathogen genus *Mycosphaerella* on different plant hosts. Genomics Data, 13, pp. 54-63.

Zhao, M., Zhou, J. Y., Li, Z. D., Song, W. W., Gong, T. e Tan, H., 2011. Boty-like retrotransposons in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contain the additional antisense gene brtn. Virology, 417(2), pp. 248-252.

Zhao, M., Zhou, J. Y., Li, Z. D., Song, W. W., Tan, Y. J. e Tan, H., 2009. Boty-II, a novel LTR retrotransposon in *Botrytis cinerea* B05.10 revealed by genomic sequence. Electronic Journal of Biotechnology, 12(3).

Zhao, T., 2018. Synteny-based phylogenomic networks for comparative genomics. Tesi di dottorato, Wageningen.

Zhou, E., Jia, Y., Singh, P., Correll, J. C. e Lee, F. N., 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AVR-Pita alters virulence. Fungal Genetics and Biology, 44(10), pp. 1024-1034.

Zhou, Q. e Haymer, D. S., 1997. Molecular structure of yoyo, a gypsy-like retrotransposon from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Genetica, 101(3), pp. 167-178.

Zhu X. Q. e Guo, L. Y., 2010. First report of brown rot on plum caused by *Monilia* polystroma in China. Plant Disease, 94(4), pp. 478-478.

Zhu, X.-Q., Niu, C.-W., Chen, X.-Y. e Guo, L.-Y., 2016. *Monilinia* species associated with brown rot of cultivated apple and pear fruit in China. Plant Disease, 100(11), pp. 2240-2250.