

Estudio bioinformático de proteínas secretadas por *Botrytis cinerea* durante su crecimiento en distintas condiciones

Bioinformatic analysis of secreted proteins by *Botrytis cinerea* during its growth in different conditions

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|---|--------|--------|-----|-----|-----|
| HMM | keekppnnwkslfdgsaweydekageyylhlfkkklpdInteneevrkelkd.vvkwflekgidGfRldvkhvskvealesngeflheftqalnetvasrkevmtvgEvsdda | | | | | |
| HMM | k+++ +p + +++ +++++ +++++ ++ +lpdL te ++v+ e++ + +++ + +idG+R+D +++ f +I++a+ v++vgE+++++ | | | | | |
| FPP | 4688999999999999999999999999886.....7*****g*****99.....999.....789*****887 | | | | | |
| FSEQ | KKSYHPECLIDYNNATSIRVCWEGT-----NIVSLPDLRTEDSNVQAEWNTWIGQLVANYSIDGLRVDSACQQTGW-----GFFPSFQNAAG-----YVVVGEIENGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Trabajo de Fin de Grado

JUAN CARLOS GARCÍA DÍAZ

Tutorizado por Nélida Emilia Brito Alayón y Mario González Carracedo.

Grado en Biología. Julio 2017

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| Abstract | 1 |
| Introducción | 2 |
| Características generales de Botrytis cinerea | 2 |
| Secretoma temprano y secretoma tardío o glicosecretoma | 3 |
| Objetivos | 5 |
| Material y Métodos..... | 6 |
| Servidores informáticos | 6 |
| Actualización de secuencias peptídicas y anotación en EnsemblFungi | 8 |
| Identificación de las proteínas “query” a partir de análisis Blast..... | 8 |
| Identificación de proteínas redundantes en el genoma de B. cinerea | 9 |
| Resultados y discusión | 10 |
| Secuencias de las proteínas de acuerdo con la última secuenciación del genoma de B. cinerea | 10 |
| Identificación de proteínas por análisis Blast | 11 |
| Proteínas redundantes y caracterización in silico | 12 |
| a) Proteínas identificadas en el secretoma temprano y proteínas redundantes..... | 17 |
| b) Proteínas identificadas en el glicosecretoma tardío y proteínas redundantes | 19 |
| Conclusiones..... | 26 |
| Bibliografía | 28 |

Resumen

Botrytis cinerea es un hongo fitopatogénico que afecta a un gran número de especies vegetales que secreta a lo largo de su ciclo de vida un gran número de diversas proteínas. El estudio de estas proteínas es de vital importancia para conocer qué papel juegan en la interacción hongo-hospedador e identificar, de esta manera, posibles factores de virulencia. En el presente trabajo se ha realizado el análisis *in silico* de un grupo heterogéneo de proteínas pertenecientes al secretoma temprano y al glicosecretoma tardío del hongo. Se han identificado por homología con proteínas de otros hongos y por el reconocimiento de dominios conservados específicos de las correspondientes familias proteicas. Además se ha estudiado la posible existencia de otros genes en el genoma de *Botrytis* que codifiquen para proteínas similares, es decir, se analizó el grado de redundancia de cada una de ellas. Y, por último, de todas se ha realizado un análisis *in silico* utilizando diversas herramientas bioinformáticas para estimar diversos parámetros físico-químicos que aporten información sobre la posible función que cada una de ellas desempeñe en la biología del hongo.

PALABRAS CLAVE: *Botrytis cinerea*, *in silico*, secretoma.

Abstract

Botrytis cinerea is a phytopathogenic fungus able to infect a large number of plant species that secretes a large number of diverse proteins throughout its life cycle. The analysis of these proteins is essential in order to know the role that they play in the host-fungus interaction and to identify putative virulence factors. In this work, it has been carried out the *in silico* analysis of a heterogeneous group of proteins detected in the early secretoma or in the late glycoscretome of *Botrytis*. They have been identified by homology with proteins of other fungi and by the recognition of conserved domains corresponding to specific protein families. In addition, putative genes in the genome of *Botrytis* that codify for similar proteins has been studied, that is to say, the degree of redundancy of each of them was analyzed. Finally, an *in silico* analysis has been performed using different bioinformatics tools to estimate various physico-chemical parameters that provide information about the possible role of each in the fungus biology.

KEYWORDS: *Botrytis cinerea*, *in silico*, secretome

INTRODUCCIÓN

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|---|--------|--------|-----|-----|-----|
| HMM | keekeppnwwkslfdgsaweydekaqeyylhlfkkkplnteneevskalkd.vvkwfiekidGfRldvknsvskealesngeflheftqalnetvasrkevmtvgEvsdda | | | | | |
| HMATCH | k+++ +p + ++ +++++ +++++ ++ +lpdL te ++v+ e++ + +++ + +idG+R+D +++ f +f++a+ v++vgE+++++ | | | | | |
| HPP | 4688999999999999999999999999886.....7*****9*****99.....*****999.....789*****88 | | | | | |
| HSEQ | KKSYVHPFCLIDYNNATSIRKCVEGT-----NIVSLPDLRTEDSNVQAEWNIWIGQLVANYSIDGLRVDSAQQTGV-----SFFPSFQNAAG-----YVVVGEIFNGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Introducción

Características generales de *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Persoon: Fries (teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) es un hongo fitopatógeno con una gran relevancia económica y científica, debido a su capacidad infectiva en casi cualquier condición y área geográfica. Es capaz de infectar 586 géneros de plantas pertenecientes en su mayoría a la división Spermatophyta, englobando más de 1400 especies vegetales (Elad *et al.*, 2016). Entre ellas destacan principalmente, la vid, la fresa, el tomate, el pepino y flores ornamentales, provocando la enfermedad conocida como “podredumbre gris”.

Su clasificación taxonómica es la siguiente: Reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycota, clase Leotiomycetes, orden Helotiales, familia Sclerotiniaceae y género *Botrytis*. Al tratarse de un hongo pleomórfico, se le denomina *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel en su fase sexual, mientras que recibe el nombre de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr, en su fase asexual (Williamson *et al.*, 2007).

Dentro del género *Botrytis*, *B. cinerea* es la especie más estudiada debido a su gran impacto económico, causando enormes pérdidas en los cultivos. Aunque es capaz de infectar plantas sanas, este fitopatógeno ataca sobre todo a vegetales cosechados maduros, frutas u hojas senescentes, ya que las defensas de estos hospedadores son más reducidas comparadas a las de tejidos en crecimiento (Schumacher y Tudzynski 2012). Su ciclo de vida comienza en la generación, por parte del micelio, de esporas asexuales o conidias que se dispersarán mediante corrientes aéreas a otras plantas. Si se dan las condiciones idóneas, las conidias germinarán produciendo un tubo germinal que facilitará la penetración de los tejidos vegetales (Nakajima y Akutsu 2014), provocando el desarrollo de una infección primaria, que rápidamente se propagará colapsando los tejidos de la planta apareciendo los primeros síntomas de podredumbre. La maceración de los tejidos vendrá acompañada por la formación de nuevos conidióforos y conidias, que serán de nuevo transportadas por corrientes de aire o por otros vectores, cerrando así el ciclo de vida *B. cinerea* (Schumacher y Tudzynski, 2012).

Secretoma temprano y secretoma tardío o glicosecretoma

B. cinerea secreta durante la interacción con el hospedador una gran variedad de proteínas, y hasta ahora, sólo algunas de ellas se ha podido comprobar que tienen enorme relevancia en el proceso infeccioso del vegetal que atacan, actuando en diversos momentos de la infección (Nakajima y Akutsu 2014). Dependiendo del momento y las condiciones en las que sean secretadas estas proteínas, se puede hablar de distintos tipos de secretoma, siendo objeto de estudio de este trabajo dos de ellos, denominados “secretoma temprano” y “glicosecretoma tardío” (Espino *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014).

Como “secretoma temprano” se ha denominado el conjunto de proteínas que el hongo secreta durante las 16 horas de crecimiento tras la geminación de las conidias en medio mínimo suplementado con distintos extractos vegetales (Espino *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014). Las proteínas secretadas se analizaron por medio electroforesis 2-D y por espectrometría de masas en tándem. Su inicial caracterización se pudo realizar gracias a que, recientemente, se ha completado la secuenciación del genoma de dos cepas de *B. cinerea*, la cepa B05.10 (Van Kan *et al.*, 2017) y la T4 (<https://urgi.versailles.inra.fr/>). De entre las 105 proteínas analizadas, se identificaron como más abundantes proteasas, pectinasas, otras polisacárido hidrolasas y muchas con función desconocida (Espino *et al.*, 2010). El papel de la gran mayoría de estas proteínas en la biología y la virulencia del hongo está por determinar.

La glicosilación de proteínas juega un papel esencial en células eucariotas, desde hongos hasta mamíferos, determinado la estructura y función de numerosas proteínas secretadas y unidas a membrana (Lehle *et al.*, 2006). Los azúcares pueden unirse a residuos de asparagina (*N*-glicosilación) a través de un monómero de *N*-acetilglucosamina, cuando la asparagina forma parte de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido, salvo prolina (Goto, 2007). También, los azúcares se pueden unir a proteínas a través de aminoácidos hidroxilados, fundamentalmente serina y treonina (*O*-glicosilación). No existe secuencia consenso que determine la unión de azúcares a estos residuos, aunque se considera que regiones ricas en residuos de Ser/Thr determinan los lugares para este tipo de glicosilación en proteínas de eucariotas (Hutzler *et al.*, 2007). En un estudio previo, se abordó el estudio del denominado “glicosecretoma tardío” haciendo referencia con esta denominación al conjunto de glicoproteínas que *B. cinerea* secreta a lo largo de cuatro días de crecimiento en medio rico (González *et al.*, 2014). Para ello, las glicoproteínas secretadas en estas condiciones de crecimiento fueron purificadas por cromatografía de afinidad con concanavalina A y, posteriormente analizadas por electroforesis bidimensional y

espectrometría de masas en tándem (González *et al.*, 2014). En este caso, se pudieron identificar inicialmente 93 proteínas, estando incluidas la mayoría de ellas entre las familias de proteasas, polisacárido hidrolasas, oxidorreductasas y muchas otras con función desconocida (González *et al.*, 2014).

Determinar el posible papel que juega cada una de estas proteínas en la biología del hongo es una tarea compleja que requiere de un mayor conocimiento de sus características que apoye su clasificación en familias de proteínas concretas y que facilite el diseño de las estrategias experimentales a seguir para completar su estudio. En este sentido, las herramientas de bioinformática permiten predecir con un alto grado de fiabilidad valiosa información a partir de la secuencia de las proteínas al identificar en las diferentes bases de datos, proteínas de secuencias similares y de estructura y/o función conocida.

OBJETIVOS

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|--|--------|--------|-----|-----|-----|
| HMM | keekppnwkslfdgsaweydekaqeyylhlfkklpdnteneevrkelkd.vvkwflekqldGfRlDvkhvskvealesngeflheftgalnetvasrkevmtvgEvsdda | | | | | |
| MATCH | k+++ +p + ++ +++++ +++++ ++ +lpdL te ++v e++ + +++ + +dG+R+D +++ f +f++a+ v++vgE+++++ | | | | | |
| PP | 4688999999999999999999999999886.....7*****g*****99.....*****999.....789*****887 | | | | | |
| SEQ | KSYVHPFCLIDVNNATSIKVCEG-----IVSLPDLRTEDSNVQAEWNTWIGQLVANYSIDGLRVDSAGQTGV-----GFFPSFQNAAG-----YVVVGEIFNGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, se han fijado como objetivos a abordar en este trabajo de fin de grado:

1. Identificar un grupo de proteínas halladas experimentalmente en los denominados secretoma temprano y glicosecretoma tardío del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* mediante el uso de herramientas bioinformáticas.
2. Caracterizar *in silico* las proteínas identificadas.
3. Analizar el posible grado de redundancia de cada una de estas proteínas en *Botrytis cinerea*.

MATERIAL Y MÉTODOS

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|--|--------|--------|-----|-----|-----|
| HMM | keekppnawkslfdqsaweydekaqeyylhlfkkkldnteneevrkelkdvkfwlekgidGFRIDvykhvskvealesngeflheftqalnetvasrkevmtvgevsdda | | | | | |
| PMATCH | k+++ +p + +++ +++++ +++++ ++ +lpdL te ++v+ e++ + +++ + +idG+R+D +++ f +f++a+ v++vgE+++++ | | | | | |
| FP | 4688999999999999999999999999886.....7*****9*****99.....999.....789*****887 | | | | | |
| SEQ | RKSYHPECLIDYNNATSIRKWEGL-----NIVSLPDLRTEDSNVQAEWNTWIGQLVANYSIDGLRVDSAQQTGV-----GFFPSEQNAAG-----YVVVGEIFNGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Material y Métodos

Servidores informáticos

- **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): El Centro Nacional para la Información Biotecnológica es una base de datos perteneciente a la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, que se divide en distintas secciones, donde se recoge información relacionada con la biología (NCBI, 2016). Incluye la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos GenBank y la base de datos PubMed de citas y abstracts recogidos de publicaciones científicas publicadas, entre una gran variedad servidores destinados al estudio de biomoléculas, como el BLAST (Blast Local Alignment Search Tool). Esta herramienta analiza secuencias nucleotídicas o proteicas, realizando el alineamiento de una secuencia “query”, que es la secuencia problema que se quiere identificar, con las secuencias recogidas en diferentes bases de datos. Como resultado se obtiene una lista ordenada de las proteínas encontradas con cierta semejanza con la secuencia en estudio. El orden cada proteína de la base de datos que posea un cierto grado de similitud, aportando por cada comparación, el porcentaje de identidad que existe entre ambas proteínas y el e-value, valor que cuanto menor sea, más significativo será el emparejamiento.
- **EnsemblFungi** (<http://www.fungi.ensembl.org/>): Base de datos que posee una gran colección de genomas del reino Fungi. En ella se recoge la última anotación del genoma de *B. cinerea* (Van Kan *et al.*, 2017).
- **Uniprot** (<http://www.uniprot.org/>): Se trata de una base de datos donde se recopila información funcional sobre todo tipo de proteínas (UniProt Consortium, 2017).
- **EMBOSS Needle** (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/): Herramienta perteneciente al Instituto Europeo de Bioinformática o EBI (Li *et al.*, 2015), que permite realizar el alineamiento de dos secuencias proteicas elegidas, mostrando el porcentaje de similaridad e identidad entre dichas cadenas, aportando el alineamiento visual de ambas, y permitiendo conocer la posición exacta donde existen diferencias y qué tipo de diferencias son (sustitución, delección, inserción...).
- **ProtParam tool** (<http://web.expasy.org/protparam/>): Servidor bioinformático que permite calcular parámetros físico-químicos de una secuencia proteica elegida. Perteneciente al ExPASy o Sistema Experto de Análisis de Proteínas (Gasteiger *et al.*,

2005). Dichos parámetros físico-químicos son: número de aminoácidos (aa), peso molecular (PM), punto isoelectrico teórico (pI), composición de aminoácidos de la cadena, composición atómica, coeficiente de extinción, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático (IA) o el índice de hidrofobicidad o GRAVY.

- **Pfam** (<http://pfam.xfam.org/>): Generado y mantenido por el EBI. Se trata de una base de datos que recoge una gran colección de familias de proteínas (Finn *et al.*, 2016) que permite identificar los posibles dominios conservados en una secuencia de aminoácidos cualquiera y que facilitaría su inclusión en una familia proteica dada. Además, genera un esquema gráfico donde se reflejan los distintos dominios a lo largo de la cadena y, por otro lado, la familia a la que pertenece ese dominio, su descripción, el código con el que está recogido en esta base de datos o la cobertura que ocupa cada dominio en la cadena.
- **SignalP 4.1 Server** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>): Servidor bioinformático del Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas o CBS, que permite la predicción de la posible existencia del péptido señal (PS) de una proteína (Petersen *et al.*, 2011), que es un péptido de entre 5 y 30 aminoácidos que se encuentra en el extremo N-terminal de la cadena peptídica, que permite el reconocimiento de la proteína, que será enviada al retículo endoplasmático (RE), donde madurará y será enviada por su ruta correspondiente para ser secretada. Esta herramienta predice también el lugar de corte de este polipéptido señal en el momento de la maduración de la proteína, en el caso de que sea predicha la existencia del PS.
- **SecretomeP 2.0 Server** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>): Servidor perteneciente al CBS, que se utiliza como método alternativo al SignalP en las ocasiones que no se detecta la existencia de PS (Bendtsen *et al.*, 2004). En este caso, el SecretomeP es capaz de predecir la existencia de posibles rutas alternativas de secreción de la proteína.
- **NetOGlyc 4.0 Server** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>): Permite predecir lugares de posible *O*-glicosilación en la secuencia peptídica de una proteína elegida. Es un programa también perteneciente al CBS (Steentoft *et al.*, 2013).
- **NetNGlyc 1.0 Server** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>): Al igual que el anterior servidor, pertenece al CBS, y se trata de una herramienta capaz de predecir lugares de posible *N*-glicosilación en una secuencia peptídica dada (Gupta *et al.*, 2010). Los lugares que se predicen donde existe *N*-glicosilación se muestran junto a una escala de 0 a 9, que indica la fiabilidad de la existencia de este.

- **GPI-SOM: Identification of GPI-anchor signals** (<http://gpi.unibe.ch/>): Servidor destinado a la predicción de posibles anclajes glicosilfosfatidilinositol (GPI) a la membrana celular, ya que existen proteínas que son capaces de unirse a esta complejo por su extremo C-terminal, quedando unidas a la membrana por el lado extracelular. Esta unión se produce a través de un enlace fosfodiéster entre el extremo C-terminal de la proteína y una molécula de fosfoetanolamina que, a su vez, se encuentra unida a un núcleo trimanosil-glucosamina no acetilada. Esta glucosamina se une mediante otro enlace fosfodiéster a una molécula de fosfatidilinositol que se encuentra en la membrana (Fankhauser y Mser 2005).

Actualización de secuencias peptídicas y anotación en EnsemblFungi

- 1) A partir de las anotaciones de las proteínas objeto de estudio según la primera y segunda secuenciación en el genoma de *Botrytis*, buscar en bases de datos, tales como el NCBI, UniProt o <https://urgi.versailles.inra.fr> las secuencias peptídicas de aquellas proteínas de las que no se disponían por no estar incluidas en las publicaciones donde se recogen las proteínas de secretoma temprano y del “glicosecretoma tardío” (Espino *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014).
- 2) Utilizando como secuencia query la identificada en el punto anterior, realizar un análisis BLAST en la base de datos de proteínas en EnsemblFungi, y descargar la secuencia actualizada de cada proteína.
- 3) Alinear, en aquellos casos en que se dispusieran, las secuencias iniciales y las actualizadas de las proteínas utilizando el servidor EMBOSS Needle, para identificar los posibles cambios.

Identificación de las proteínas “query” a partir de análisis Blast

- 1) Realizar análisis BLAST utilizando la base de datos de proteínas que recoge las proteínas no redundantes en hongos (Fungi), en el UniProt.
- 2) Elegir la proteína revisada (con evidencias experimentales a nivel proteico) de aquellas resultantes del anterior análisis BLAST, que posea el mayor grado de identidad y con un E-value más pequeño con la secuencia query.

Identificación de proteínas redundantes en el genoma de *B. cinerea*

- 1) Utilizar como secuencia “query” la secuencia de la proteína con evidencias experimentales identificada por BLAST en el apartado anterior, para realizar un BLAST local en el EnsemblFungi frente a la base de datos que recoge la última anotación del genoma de *Botrytis*.
- 2) Elegir aquellas proteínas con alto grado de similitud y bajo E-value con la secuencia “query”.
- 3) Comprobar la identificación de las nuevas proteínas, por medio de un BLAST frente a la base de datos general no redundante del UniProt.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|--|--------|--------|-----|-----|-----|
| HMM | keekppnawkslfdqsaweydekaqeyylhflkklpdnteneevrkelkdvkfwlekgidGFRIDvykhsvkvealesngeflheftqalnetvasrkevmtvgEvsdda | | | | | |
| PMATCH | k+++ +p + +++ +++++ +++++ ++ +lpdL te ++v+ e++ + +++ + +idG+R+D +++ f +f++a+ v++vgE+++++ | | | | | |
| IPI | 4688999999999999999999999999886.....7*****9*****99.....999.....789*****88 | | | | | |
| ISEQ | RKSYHPECLIDYNNATSIRKWEGL-----NIVSLPDLRTEDSNVQAEWNTWIGQLVANYSIDGLRVDSAQQTGV-----GFFPSEQNAAG-----YVVVGEIFNGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Resultados y discusión

Secuencias de las proteínas de acuerdo con la última secuenciación del genoma de *B. cinerea*

El genoma de *Botrytis cinerea* ha sido secuenciado en tres ocasiones y en cada una de ellas, la anotación que se ha hecho de cada uno de los genes ha sido diferente. La última que se recoge en el EnsemblFungi (van Kan *et al.* 2017) utiliza la nomenclatura BcinXZgABCD, donde XZ corresponde al número del cromosoma en que se localiza el gen en cuestión y donde A,B,C y D, son números que corresponden a la anotación particular del gen. La primera anotación utilizó la nomenclatura BC1G_”ABCDE”, y en la segunda, los genes fueron anotados como B0510_”ABCDE”, donde A,B,C,D y E, son números. Debido al momento en que el análisis del secretoma temprano (Espino *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014) y del glicosecretoma se realizó (González *et al.*, 2014), las proteínas en el primero fueron anotadas como BC1G_”ABCDE” y en el segundo como B0510_”ABCDE”. Desde la publicación de la última anotación, las dos primeras dejaron de ser accesibles, por lo que, en primer lugar, en el presente trabajo, se actualizaron las secuencias de las proteínas objeto de estudio según la nueva anotación el genoma.

Para ello, se realizó un análisis en el BLAST local del EnsemblFungi frente a la base de datos que contiene la última anotación del genoma de *Botrytis*, utilizando como secuencia “query” la que se disponía de las anteriores anotaciones. Las nuevas anotaciones se recogen en la Tabla 1. Los posibles cambios en las nuevas secuencias fueron identificados tras realizar el alineamiento de la secuencia actual con la inicial utilizando el servidor EMBOSS Needle (Li *et al.*, 2015) . De las 15 secuencias estudiadas, en sólo 3 de ellas se detectaron cambios, que se detallan a continuación.

- **Bcin12g03390.1:** cambio del residuo de glutámico en la posición 229 por glicina.
- **Bcin02g01420.1:** en la anotación del gen inicialmente se había incluido un intrón, que en la nueva se ha considerado como parte de un exón. Este cambio provocó que la proteína pasase de tener 427 aminoácidos, 500 según la nueva anotación.

Tabla 1- Listado de las 15 proteínas objeto de estudio, junto a su identificación y notación en EnsemblFungi.

| <i>ID GEN</i> | <i>ANOTACIÓN</i> | <i>SECRETOMA</i> |
|---------------------|------------------|-------------------|
| <i>BC1G_04151.1</i> | Bcin04g04190.1 | TEMP ^a |
| <i>BC1G_08755.1</i> | Bcin12g03390.1 | TEMP |
| <i>BC1G_09564.1</i> | Bcin08g02390.1 | GLY ^b |
| <i>B0510_3155</i> | Bcin12g00300.1 | GLY |
| <i>B0510_903</i> | Bcin01g08110.1 | GLY |
| <i>BC1G_02623.1</i> | Bcin02g01420.1 | GLY |
| <i>BC1G_10880.1</i> | Bcin16g03950.1 | TEMP |
| <i>B0510_5392</i> | Bcin14g00810.1 | GLY |
| <i>BC1G_00896.1</i> | Bcin03g05720.1 | TEMP |
| <i>B0510_547</i> | Bcin03g01540.1 | GLY |
| <i>B0510_2640</i> | Bcin15g03320.1 | GLY |
| <i>BC1G_14153.1</i> | Bcin15g02380.1 | TEMP |
| <i>BC1G_00198.1</i> | Bcin01g07530.1 | TEMP |
| <i>B0510_4895</i> | Bcin10g05630.1 | GLY |
| <i>B0510_3922</i> | Bcin07g02940.1 | GLY |

^a Proteínas identificadas en el secretoma temprano. (Espino *et al.*, 2010).

^b Proteínas identificadas en el glicosecretoma tardío. (González *et al.*, 2014).

- **Bcin14g00810.1:** en esta secuencia, también un intrón en el gen que la codifica se considera parte de un exón en su nueva anotación, pasando la proteína de tener 482 aminoácidos a 514 aminoácidos según la nueva anotación del gen.

A partir de este momento, se ha trabajado con las secuencias recogidas en EnsemblFungi, denominando a cada proteína por su anotación en esta base de datos, tal como se expone en la Tabla 1.

Identificación de proteínas por análisis Blast

Se pudieron identificar 14 proteínas según el análisis BLAST realizado frente a la base de datos de proteínas fúngicas recogidas en UniProt (Tabla 2). De las 15 secuencias analizadas, 12 fueron identificadas de acuerdo con la proteína fúngica contrastada experimentalmente que según el análisis BLAST mostró un mayor porcentaje de identidad con un E-value, más bajo (Tabla 2). En el caso de dos secuencias (Bcin08g02390.1 y


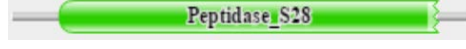


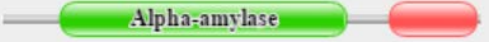



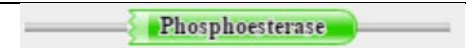



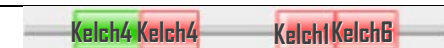
Bcin01g07530.1), la identificación se realizó en función de la proteína fúngica con mayor porcentaje de identidad y menor E-value según el análisis BLAST, pero cuya posible función ha sido inferida por homología con otras proteínas, pero no experimentalmente. En todos estos casos, la posible identificación de estas proteínas se confirmó analizando las secuencias con el servidor Pfam. Este servidor identifica dominios conservados que permiten clasificar las proteínas en familias proteínas con una gran fiabilidad. En todas las proteínas, los dominios encontrados coincidieron con los esperados de acuerdo con la identificación realizada a partir del análisis BLAST (Tabla 2). Por último, la proteína Bcin03g05720.1 no pudo ser identificada ya que ninguna de las proteínas homólogas encontradas en el análisis BLAST tenía función conocida. Tampoco el análisis de la secuencia en el Pfam arrojó ningún dominio conservado de alguna familia proteica.

Proteínas redundantes y caracterización *in silico*

En estudios previos, se ha descrito una gran redundancia en proteínas secretadas por *B. cinerea*. Así se han identificado al menos 14 aspartic proteasas, 6 poligalacturonasas, 2 pectin-metilesterasas, etc. Por ello, se decidió estudiar la posible redundancia entre el grupo de proteínas identificadas en el secretoma temprano y glicosecretoma de *Botrytis* (Espino *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014) analizadas en el presente trabajo. Con este objetivo, se realizó una búsqueda por medio de un BLAST local en la base de datos que recoge la última anotación del genoma de *Botrytis* de genes que pudieran codificar para proteínas con un alto grado de identidad con las secuencias en estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.

Todas las secuencias fueron analizadas utilizando los servidores detallados en la sección de Material y Métodos con el fin de predecir dominios conservados o regiones de interés como motivo de anclaje GPI o péptido señal, así como diferentes parámetros físico-químicos tales peso molecular (PM), pI, lugares de *N*-glicosilación y/o *O*-glicosilación e índice alifático (Tabla 3).

Tabla 2- Identificación de las proteínas de *Botrytis* según análisis BLAST. Se aporta el esquema de los dominios conservados detectados en cada una de ellas según el Pfam.

| PROTEÍNA DE TEMP O GLYC | PROTEÍNA SIMILAR | ORGANISMO | E-VALUE | IDENTIDAD (%) | DOMINIOS |
|-------------------------|---|--------------------------------|----------------------|---------------|---|
| Bcin04g04190.1 | Glucoamilasa (P69328) ^a | <i>Aspergillus terreus</i> | 0.0 | 61.2 |  |
| Bcin12g03390.1 | | | 6.2e ⁻¹⁷⁵ | 42.9 | |
| Bcin08g02390.1 | Serina carboxipeptidasa putativa K12H4.7 (W9CF83) | <i>Sclerotinia borealis</i> | 0.0 | 91.5 |  |
| Bcin12g00300.1 | Beta-galactosidasa A (Q700S9) | <i>Penicillium spp.</i> | 0.0 | 60.5 |  |
| Bcin01g08110.1 | Alfa-galactosidasa A (P28351) | <i>Aspergillus niger</i> | 0.0 | 54.9 |  |
| Bcin02g01420.1 | Alfa amilasa 1 (Q01117) | <i>Lipomyces kononenkoae</i> | 0.0 | 60.0 |  |
| Bcin16g03950.1 | 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (Q4WM08) | <i>Aspergillus fumigatus</i> | 0.0 | 72.4 |  |
| Bcin14g00810.1 | Proteína secretada no caracterizada (D4AK94) | <i>Arthroderma benhamiae</i> | 6.9e ⁻¹⁶⁶ | 54.5 |  |
| Bcin03g05720.1 | | | | | No se encontró ninguna coincidencia en la secuencia |
| Bcin03g01540.1 | Deshidrogenasa patE (A1CFL2) | <i>Aspergillus clavatus</i> | 0.0 | 54.8 |  |
| Bcin15g03320.1 | Fosfastasa ácida (P37274) | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 6.2e ⁻¹⁰⁴ | 50.2 |  |
| Bcin15g02380.1 | Aspergillopepsina-2 (P24665) | <i>Aspergillus niger</i> | 3.4e ⁻⁹⁵ | 55.6 |  |
| Bcin01g07530.1 | Proteína glicósido hidrolasa de la familia 125 (A0A0C3DJS4) | <i>Oidiodendron maius</i> | 0.0 | 73.0 |  |
| Bcin10g05630.1 | Probable Beta-glucosidasa F (A1DMR8) | <i>Neosartorya fischeri</i> | 0.0 | 62.4 |  |
| Bcin07g02940.1 | Proteína “kelch-like” terF (Q0D1p4) | <i>Aspergillus terreus</i> | 8.1e ⁻⁷⁷ | 40.0 |  |

^a Notación en UniProt

^b Proteína no revisada

^c CBM: dominio de unión a celulosa

^d GMC: Glucosa-Metanol-Colina

^e Fn3: fibronectina tipo III

Tabla 3- Análisis del conjunto de proteínas encontradas en el genoma de *B. cinerea*, separándolas según su clasificación.

| DESCRIPCIÓN | Nº aa | PM (Da) | pl | Ser/Thr (%) | IA | PS | Punto de corte de PS | N-Glyc (posición del aa) | O-Glyc (posición del aa o zonas) | GPI |
|--|-------|-----------|------|-------------|-------|----|----------------------|---|---|-----|
| Glucosilinas (EC 3.2.1.3) | | | | | | | | | | |
| Glucosilina (GH15), dominio de unión a almidón (CBM20)- Bcin04g04190.1 | 672 | 70617.45 | 5.38 | 14.6/11.2 | 76.47 | Sí | ^a | 16/234/462 | 42 lugares (503-572) | 0 |
| Glucosilina (GH15), dominio de unión a almidón (CBM20)- Bcin12g03390.1 | 615 | 66972.85 | 5.39 | 9.6/6.0 | 80.00 | Sí | 200 ^b | 498/512/526/585 | 8 lugares (466-483) | 0 |
| Proteína hipotética glucosidasa familia 15- Bcin04g00030.1 | 552 | 59115.11 | 4.47 | 10.3/10.0 | 71.16 | Sí | 98/120 ^b | 139/175/198/209/328/370/440 | 22 lugares (26-30) (470-535) | 1 |
| Carboxipeptidasas Pro-Xaa (EC 3.4.16.2) | | | | | | | | | | |
| Pro-Xaa carboxipeptidasa (Merops 28S)- Bcin08g02390.1 | 544 | 60222.05 | 5.57 | 7.9/7.2 | 67.46 | Sí | 18-19 | 48/63/106/137/169/232/252/306/423/448/528 | 41/49/257/308/314/531/532/535 | 0 |
| Beta-galactosidasas (EC 3.2.1.23) | | | | | | | | | | |
| Beta-galactosidasa (GH35)- Bcin12g00300.1 | 1012 | 109825.61 | 5.42 | 8.7/8.8 | 77.59 | Sí | 18-19 | 246/406/423/462/622/700/741/762/916/921 | 22 lugares (393-412) (697-710) (868-879) (993-1006) | 0 |
| Beta galactosidasa (inferida por homología)- Bcin11g02180.1 | 1010 | 111784.29 | 5.60 | 6.6/7.3 | 79.65 | Sí | 20-21 | 428/460/593/627/709/713/743/901/917/986 | 10 lugares 392/399/407/701-715/875/997 | 0 |
| Beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) | | | | | | | | | | |
| Beta glucosidasa (inferida por homología)- Bcin03g08710.1 | 845 | 90995.64 | 5.27 | 7.3/6.9 | 76.11 | Sí | 21-22 | 64/311/318/478/522/563/688/716 | 15 lugares 31/34/353-367/476/663-737 | 0 |
| Proteína hipotética glucosidasa hidrolasa familia 3- Bcin15g02440.1 | 824 | 85699.19 | 5.70 | 10.1/9.3 | 83.42 | Sí | 17-18 | 223/337/643 | 54 lugares (324-328) (432-444) (552-619) (738-786) | 0 |
| Proteína hipotética glucosidasa hidrolasa familia 3- Bcin09g04850.1 | 961 | 104741.59 | 5.10 | 7.1/5.1 | 78.20 | Sí | - | 8/147/188/333/404/440/697 ^b | 108/111/117/122/124/129/583/841/843 | 0 |
| Beta-glucosidasa (inferida por homología)-Bcin09g06990.1 (Isoforma 1) | 790 | 84971.97 | 4.70 | 10.1/4.9 | 82.96 | Sí | 27-28 | 53/77/135/221/261/320/237/439/454/563/602/703 | 12 lugares 41/47/226/(362-366)/(663-672) | 0 |
| Beta-glucosidasa (inferida por homología)-Bcin09g06990.2 (Isoforma 2) | 759 | 81740.48 | 4.87 | 10.0/5.0 | 82.49 | Sí | - | 4/28/86/172/212/271/278/390/405/532/571/672 | 12 lugares 177/313-317 (416-426) (632-641) | 0 |
| Beta-glucosidasa (inferida por homología)-Bcin09g06990.3 (Isoforma 3) | 741 | 79717.06 | 4.75 | 10.0/4.7 | 82.91 | Sí | - | 4/28/86/172/212/271/278/390/405/514/553/654 | 8 lugares 177/313-317 (616-623) | 0 |
| Beta-glucosidasa (inferida por homología)-Bcin09g06990.4 (Isoforma 4) | 808 | 86995.39 | 4.81 | 10.1/5.2 | 82.56 | Sí | 27-28 | 53/77/135/221/261/320/237/439/454/581/620/721 | 14 lugares 41/47/226/(362-366)/(465-475) (681-690) | 0 |

^aSignalP no reconoce secuencia señal, pero sí SecretomeP. No aporta posición exacta.

^bExiste una Pro cercana que puede provocar un punto de N-glyc erróneo.

Tabla 3 (Continuación)- Análisis del conjunto de proteínas encontradas en el genoma de *B. cinerea*, separándolas según su clasificación.

| DESCRIPCIÓN | Nº aa | PM (Da) | pI | Ser/Thr (%) | IA | PS | Punto de corte de PS | N-Glyc (posición del aa) | O-Glyc (posición del aa o zonas) | GPI |
|--|-------|----------|------|-------------|-------|----|----------------------|---|--|-----|
| Beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) | | | | | | | | | | |
| Proteína hipotética glucósido hidrolasa familia 3- Bcin10g05590.1 (Isoforma 1) | 892 | 95659.02 | 4.55 | 8.3/7.4 | 74.29 | Sí | - | 35/93/243/347/354/ 386/473/554/567/573/ 595/700/732/747/871 | 19 lugares (15-62)/ 389/391/630/ 637/703 | 0 |
| Proteína hipotética glucósido hidrolasa familia 3- Bcin10g05590.2 (Isoforma 2) | 887 | 95071.64 | 4.51 | 8.0/7.6 | 76.79 | Sí | - | 30/88/238/342/349/ 381/468/549/562/568/ 590/695/727/742/866 | 14 lugares (28-57)/ 384/(625-632)/698 | 0 |
| Alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22) | | | | | | | | | | |
| Alfa-galactosidasa (GH27)- Bcin01g08110.1 | 537 | 58913.33 | 4.87 | 9.1/6.1 | 86.63 | Sí | 25-26 | 5/38/47/85/197/ 225/354 | 423/425 | 1 |
| Alfa-galactosidasa (inferida por homología)- Bcin03g02710.1 | 502 | 54183.43 | 4.43 | 7.4/7.4 | 78.76 | Sí | 20-21 | 83/176/357/378/ 444/464 | 325/333/334/423 | 0 |
| -Alfa-galactosidasa (inferida por homología)- Bcin02g01640.1 | 454 | 50603.83 | 4.81 | 7.9/4.9 | 78.02 | Sí | 23-24 | 25/56/294 | 34/35/36/37/44 | 0 |
| Alfa-amilasas (EC 3.2.1.1) | | | | | | | | | | |
| Alfa-amilasa (GH13)- Bcin02g01420.1 | 500 | 54313.99 | 5.53 | 10.4/7.4 | 86.44 | Sí | 22-23 | 176/216 | 44/49/155/162/449 | 1 |
| Proteína hipotética glucósido hidrolasa familia 13- Bcin08g02130.1 | 561 | 62307.51 | 4.56 | 8.7/10.9 | 77.36 | Sí | 33-34 | 64/103/190/230/298/ 384 ^b /416/485/515 | 10 lugares (55-169) (461-536) | 1 |
| Proteína hipotética glucósido hidrolasa familia 13- Bcin03g05800.1 | 544 | 61530.31 | 5.10 | 7.7/7.4 | 78.66 | Sí | - | 140/303/423/443/505 | 149/152/473/486/487 | 0 |
| Proteína hipotética glucósido hidrolasa familia 13- Bcin13g05110.1 | 549 | 59707.35 | 4.50 | 8.2/8.2 | 72.60 | Sí | - | 48/85/146/180/220/ 468/490 | 14 lugares (151-156) (371-381) (502-515) | 1 |
| Fitasas (EC 3.1.3.26) | | | | | | | | | | |
| Desconocida, similar a fitasa- Bcin14g00810.1 | 514 | 55289.66 | 4.51 | 8.6/6.8 | 69.12 | Sí | 18-19 | 25/76/115/131/212/ 232/259/386 | 152/238/333/337/405 | 0 |
| Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) | | | | | | | | | | |
| Celobiohidrolasa- Bcin16g03950.1 | 450 | 47467.01 | 4.42 | 10.4/12.2 | 58.96 | Sí | 16-17 | - | 17 lugares (34-71) (176-347) (407-429) | 1 |
| Glucanasa (inferida por homología)- Bcin13g02100.1 | 516 | 53192.00 | 5.59 | 10.5/11.6 | 61.92 | Sí | 17-18 | 285/449 | 34 lugares (27-71) (178-367) (406-477) | 0 |
| Glucanasa (inferida por homología)- Bcin09g01110.1 | 599 | 61112.02 | 4.17 | 15.4/11.0 | 61.12 | Sí | 18-19 | 199/279/573 | 75 lugares (24-77) (399-433) (445-567) | 0 |

^aSignalP no reconoce secuencia señal, pero sí SecretomeP. No aporta posición exacta.

^bExiste una Pro cercana que puede provocar un punto de N-glyc erróneo.

Tabla 3 (Continuación)- Análisis del conjunto de proteínas encontradas en el genoma de *B. cinerea*, separándolas según su clasificación.

| DESCRIPCIÓN | Nº aa | PM (Da) | pl | Ser/Thr (%) | IA | PS | Punto de corte de PS | N-Glyc (posición del aa) | O-Glyc (posición del aa o zonas) | GPI |
|---|-------|----------|------|-------------|-------|----|----------------------|--|--|-----|
| Oxidorreductasas (EC 1.1.99.-) | | | | | | | | | | |
| Oxidorreductasa- Bcin03g01540.1 | 628 | 66882.12 | 4.61 | 8.9/8.1 | 79.71 | Sí | 22-23 | 47/91/128/184/431/576 | 25/120/130/187/194/197/198/200/208 | 1 |
| Similar a GMC oxidorreductasa (inferida por homología)- Bcin05g05950.1 | 612 | 65529.88 | 6.54 | 11.9/7.2 | 78.51 | Sí | 18-19 | 178 | 14 lugares 21/26/103/ (169-190) | 0 |
| Similar a GMC oxidorreductasa (inferida por homología)- Bcin13g05870.1 | 620 | 65696.21 | 5.41 | 10.3/7.3 | 91.27 | Sí | - | 78/96/163/205/307/322/352/434/478/501 | 43/44/106/128/203/207/208/213/437/529 | 0 |
| Similar a GMC oxidorreductasa (inferida por homología)- Bcin09g04570.1 | 578 | 64042.56 | 5.42 | 5.2/4.8 | 83.49 | No | - | 222/343/436 | - | 0 |
| Proteína putativa GMC oxidorreductasa (inferida por homología)- Bcin11g01840.1 | 611 | 65827.16 | 5.20 | 11.0/5.1 | 85.71 | Sí | 18-19 | 36/78/184/420/450/469/473 | 28/29/185/186/187/189/194/422/425/428 | 0 |
| Fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) | | | | | | | | | | |
| Fosfatasa ácida- Bcin15g03320.1 | 438 | 49275.30 | 5.18 | 4.8/7.8 | 81.26 | Sí | 19-20 | 163/230/252/284/319 | 11 lugares (30-77) (367-389) | 0 |
| Proteína hipotética no caracterizada (Fosfatasa)- Bcin04g02460.1 | 460 | 50229.18 | 4.29 | 9.1/8.0 | 77.37 | Sí | 18-19 | 2/131/162/189/208/235/252/337/344/391 | 14 lugares 187/ (345-431) | 1 |
| Proteína hipotética no caracterizada (Fosfatasa)- Bcin13g05870.1 | 452 | 48775.21 | 4.83 | 9.7/7.5 | 77.50 | Sí | 21-22 | 53/97/155/195/220/298/305/ | 21 lugares 148/ (354-419) | 1 |
| Proteasas glutámicas (EC 3.4.21.82) | | | | | | | | | | |
| Proteasa glutámica (G01)- Bcin15g02380.1 | 257 | 26298.00 | 4.58 | 10.9/14.0 | 72.84 | Sí | 18-19 | 53/165 | 15/36/48/49/52/84/217/224 | 0 |
| Proteína hipotética similar a cadena pesada de asperillopepsina- Bcin07g02280.1 | 249 | 26117.05 | 4.55 | 12.4/12.0 | 84.30 | Sí | 17-18 | 43/143 | 13/14/20/217 | 0 |
| Desconocidas | | | | | | | | | | |
| Bcin03g05720.1 | 155 | 16517.59 | 4.59 | 9.0/12.9 | 82.71 | Sí | 20-21 | - | 18/19/23/73/122 | 0 |
| Bcin01g07530.1 | 516 | 57062.96 | 4.71 | 10.9/7.2 | 79.44 | Sí | 21-22 | 57/136/253/396 | 14 lugares (17-45)/183/ (259-273) | 1 |
| Similar a beta-glucosidasa (GH3)- Bcin10g05630.1 | 888 | 93649.97 | 5.98 | 9.5/7.2 | 86.69 | Sí | 21-22 | 89/130/276/347/379/419/432/453 ^b /582/734/751/867 | 23 lugares (36-70) (381-388) (682-753) | 0 |
| Desconocida, dominio kelch- Bcin07g02940.1 | 344 | 37576.08 | 5.51 | 7.8/9.3 | 72.33 | Sí | 16-17 | 25/175 | 82 | 0 |

^aSignalP no reconoce secuencia señal, pero sí SecretomeP. No aporta posición exacta.

^bExiste una Pro cercana que puede provocar un punto de N-glyc erróneo.

a) Proteínas identificadas en el secretoma temprano y proteínas redundantes

Glucoamilasas (EC 3.2.1.3)

Las glucoamilasas son enzimas que actúan sobre las cadenas de polisacáridos que conforman el almidón y el glucógeno, catalizando la reacción de hidrólisis de residuos terminales de beta-D-glucosa unidos por enlace alfa(1→4) de los extremos no reductores de dichas cadenas, liberando beta-D-glucosa. Pertenecen a la familia 15 de las glicosil hidrolasas (GH15) y poseen un dominio de unión a carbohidratos (Tabla 2). Dos glucoamilasas (Bcin04g04190.1 y Bcin12g03390.1) fueron encontradas en el secretoma temprano de la cepa B05.10 del hongo (Espino *et al.*, 2010), y en el presente trabajo se ha identificado un gen en el genoma de *Botrytis* que codifica para una tercera glucoamilasa (Bcin04g00030.1). Todas ellas mostraron un alto porcentaje de identidad con una glucoamilasa (P69328) secretada por *Aspergillus niger* cuya función ha sido demostrada experimentalmente (Sauer *et al.*, 2000). Todas ellas son proteínas muy glicosiladas, pudiendo llegar a tener más de 40 posibles lugares de O-glicosilación, y con alto porcentaje en residuos de Ser/Thr, que suelen ser diana de la maquinaria de O-glicosilación (González *et al.*, 2014). Estos lugares de O-glicosilación se sitúan en zonas bisagra entre ambos dominios GH15 y CBM. Poseen péptido señal, aunque solo se predice el punto de corte para Bcin12g03390.1 y, por último, la proteína Bcin04g00030.1 posee un posible anclaje GPI a la membrana, factor que posibilita que dicha enzima sea capaz de realizar su función junto a la membrana, de forma que los productos generados por su acción sean más fácilmente asimilables.

Como se ha explicado, son proteínas halladas en el secretoma temprano de *Botrytis*, por lo que realizan su función en las primeras etapas del desarrollo del organismo, posiblemente degradando el almidón procedente del vegetal que utiliza como hospedador, obteniendo productos asimilables con los que proseguir su desarrollo.

Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91)

Se trata de un tipo de celulasas que degradan celulosa por la hidrólisis de enlaces beta-(1→4) D-glucosídicos de las cadenas de beta-glucosa que componen este polímero, liberando celobiosa de los extremos terminales, no reductores de dichas cadenas. Junto con la celobiohidrolasa identificada en el secretoma temprano del hongo (Espino *et al.*, 2010),

Bcin16g03950.1, se han identificado otras dos proteínas (Bcin13g02100.1 y Bcin09g01110.1) con la misma actividad catalítica. Estas proteínas mostraron un alto porcentaje de identidad con la beta-1,4-D-glucano celobiohidrolasa (Q4WM08) de *A. fumigatus* caracterizada experimentalmente (Bromley *et al.*, 2006). Para las tres proteínas se prevé un dominio conservado en las glicosil hidrolasas de la familia 7 (GH7), y destaca el elevado número de lugares de *O*-glicosilación (17 lugares para Bcin16g03950.1, 34 para Bcin13g02100.1 y, en mucho mayor número, 75 para Bcin09g01110.1). Las tres enzimas muestran péptido señal responsable de su destino hacia la vía de secreción. Bcin16g03950.1 posee un motivo de anclaje GPI, por lo que es capaz de adherirse a la membrana celular, mientras que Bcin12g02100.1 y Bcin09g01110.1 no presentan anclajes de este tipo.

Estas enzimas probablemente intervienen en la degradación de celulosa de la pared vegetal del hospedador, y al secretarse en las primeras etapas del crecimiento del hongo, podrían participar en la fase de penetración de los tejidos vegetales para establecer una infección primaria en la planta.

Proteasas glutámicas (EC 3.4.21.82)

Las proteasas glutámicas son enzimas proteolíticas que poseen un residuo de ácido glutámico en su centro activo. En el presente trabajo, se han identificado únicamente 2 proteasas glutámicas (Bcin15g02380.1 y Bcin07g02280.1), codificadas por el genoma de *Botrytis*. Ambas presentan un alto porcentaje de identidad con la aspergilopepsina-2 (P24665) de *A. niger*, peptidasa aspergiloglutámica dimérica insensible a pepstatina (Sasaki *et al.*, 2012). Ambas proteínas de *Botrytis* presentan altos porcentajes de residuos de Ser/Thr, aunque no por ello poseen elevado número de posibles lugares de *O*-glicosilación (8 lugares para Bcin15g02380.1 y 4 para Bcin07g02280.1). También para ambas se predice péptido señal con punto de corte definido. Son proteínas que actúan en etapas tempranas del proceso de infección, por lo que pueden ser enzimas degradadoras de proteínas presentes en las células vegetales, provocando su destrucción y, por lo tanto, podrían intervenir en la virulencia del hongo y servir para la obtención de nutrientes a partir de la degradación de los tejidos vegetales.

Con función desconocida

- **Bcin03g05720.1:** No se han encontrado proteínas similares a esta proteína que posean evidencias experimentales de su función, e incluso en este caso, el análisis de los dominios que existen en la secuencia de esta proteína por medio del servidor Pfam tampoco se encontró ninguna coincidencia en su base de datos. Es importante destacar que solo se han encontrado proteínas homólogas a esta en los géneros *Sclerotinia* y *Phialocephala*, siendo ambos hongos fitopatógenos ascomicetos, dentro del orden Helotiales, al igual que *Botrytis*. Esto puede significar que son proteínas con función aún desconocida, secretadas por un reducido grupo de hongos, que sería interesante estudiar por su especificidad en estos organismos.

b) Proteínas identificadas en el glicosecretoma tardío y proteínas redundantes

Serin carboxipeptidasas (3.4.16.6)

Estas proteasas solo cortan el enlace en el extremo C-terminal de una cadena peptídica y presentan un residuo de serina muy conservado en el centro catalítico. No se han encontrado proteínas similares a Bcin08g02390.1 estudiadas experimentalmente en otros hongos. Se trata de una proteína con 8 lugares potenciales de ser *O*-glicosilados y termoestable según el valor del índice alifático calculado por el servidor ProtParam. Sólo se identificaron proteínas con cierta homología con Bcin08g02390.1 en otros hongos fitopatógenos de la división Ascomycota, de las que tampoco se conoce en qué procesos intervienen en el ciclo de vida de cada hongo.

Beta-galactosidasas (EC3.2.1.23)

Únicamente se han encontrado 2 genes en el genoma de que codifiquen para proteínas con esta función (Bcin12g00300.1 y Bcin11g02180.1), siendo proteínas de gran tamaño que sobrepasan los 1000 aminoácidos. Las beta-galactosidasas catalizan la reacción de hidrólisis de enlaces beta-glicosídicos que unen una galactosa con un residuo orgánico, este conjunto galactosa-residuo orgánico se denomina galactósido. Presentan alto grado de identidad con la beta-galactosidasa A (Q700S9) de *Penicillium spp.* que ha sido estudiada su estructura tridimensional (Rojas *et al.*, 2004). Como es de esperar al haberse obtenido en el glicosecretoma, están *O*-glicosiladas, y se prevén un alto número de posibles residuos *N*-glicosilados, de hasta 10 posibles lugares en ambos casos. Ambas proteínas poseen dominios

conservados idénticos, presentan péptido señal con sus respectivos puntos de corte, no poseen anclajes GPI a la membrana y, en general, presentan características muy parecidas, por lo que es posible que actúen en el mismo proceso y momento del ciclo de vida del hongo.

Alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22)

Junto a la proteína encontrada en el glicosecretoma de *Botrytis* (González *et al.*, 2014), denominada Bcin01g08110.1, se han encontrado 2 posibles alfa-amilasas codificadas por el genoma de *B. cinerea* (Bcin03g02710.1 y Bcin02g01640.1). Este tipo de proteínas, también denominadas melibiasas, catalizan la reacción de hidrólisis de los grupos alfa-galactosil terminales de glicolípidos y glicoproteínas. La proteína similar a ellas, que ha sido estudiada experimentalmente, es “Alfa-galactosidasa A” de *A. niger*, la cual se expresa únicamente en presencia de galactosa o polímeros que contengan este monómero (de Vries *et al.*, 1999). Todas las proteínas encontradas a partir de genes del genoma de *B. cinerea* poseen un dominio melibiasa, que es el que posee el centro activo de la función alfa-galactosidasa. Poseen bajo número de lugares de *O*-glicosilación, ya que Bcin01g08110.1 solo posee 2 lugares, Bcin03g02710.1 presenta 4 y Bcin02g01640.1 presenta 5 lugares. Para ambas proteínas se prevé péptido señal y sólo para Bcin01g08110.1 un posible lugar de anclaje GPI a la membrana celular.

Alfa-amilasas (EC 3.2.1.1)

A partir de la alfa-amilasa encontrada en el glicosecretoma de *Botrytis* (González *et al.*, 2014), denominada Bcin02g01420.1, se han encontrado 3 genes que codifican para proteínas con función alfa-amilasa en el genoma de este hongo (Bcin08g02130.1, Bcin03g05800.1 y Bcin13g05110.1), presentando alto grado de similitud con la “alfa-amilasa 1” de *L. kononenkoae*, (Steyn y Pretorius 1995), con función alfa-amilasa, que consiste en catalizar la hidrólisis de enlaces alfa-glucosídicos de distintos polisacáridos, principalmente almidón o glucógeno, y liberando así residuos de glucosa y maltosa. Igual que todas aquellas proteínas pertenecientes al glicosecretoma, poseen varios lugares de *O*-glicosilación: Bcin02g01420.1 presenta 5 lugares, Bcin08g02130.1 tiene 10 posiciones, Bcin03g05800.1 5 lugares y Bcin13g05110.1 14 lugares. Todas presentan péptido señal, aunque solo para las dos primeras se ha obtenido el punto de corte de dicho PS. Es destacable que 3 de las 4 proteínas poseen anclaje GPI, siendo Bcin03g05800.1 la única que no lo presenta, no estando anclada a la membrana celular.

Es posible que estas proteínas actúen en *B. cinerea* degradando almidón procedente de las células vegetales, el cual puede ser utilizado como almacenamiento de energía extracelular, y el estar la mayoría de las proteínas ancladas a la membrana permite que actúen cerca de ella, obteniendo los productos de su reacción rápidamente.

Fitasas (3.1.3.26)

Las fitasas son un tipo de fosfatasa, que catalizan la hidrólisis del myo-inositol (1,2,3,4,5,6)-hexaquisfosfato (ácido fítico), produciendo myo-inositol (1,2,3,5,6)-pentaquisfosfato y fosfato inorgánico libre. La proteína Bcin14g00810.1 se trata de una proteína única, ya que no se han encontrado genes que codifiquen proteínas similares en el genoma de *Botrytis*. Se han observado similitudes entre las secuencias de esta proteína y una proteína secretada por el hongo *Arthroderma benhamiae*, un tipo de hongo dermatofito ascomiceto, la cual se denomina “Proteína secretada no caracterizada ARB_04696”. Se trata de un hongo patógeno muy especializado, causante de micosis superficiales en humanos, infectando y multiplicándose en estructuras queratinosas del hospedador, ya que poseen actividad queratinolítica y que secreta multitud de proteasas, muchas de ellas determinantes en la virulencia del hongo (Burmester *et al.*, 2011).

El hecho de que *B. cinerea* sintetice una única proteína de este tipo, puede llevar a realizar estudios sobre dicha proteína, siendo objetivo de algún tipo de fármaco que inhiba su síntesis y pudiendo observar los posibles efectos en la biología del hongo o en su virulencia.

Oxidoreductasas (EC 1.1.99.-)

Se han descrito en este estudio 5 proteínas similares entre sí con esta función, sintetizadas por *B. cinerea*, siendo: Bcin03g01540, Bcin05g05950.1, Bcin13g05870.1, Bcin09g04570.1 y Bcin11g01840.1. Las oxidoreductasas catalizan reacciones de oxidación y reducción, mediante la transferencia de hidrógeno y electrones entre sustratos. Una proteína con alto grado de identidad a estas se trata de “deshidrogenasa patE” de *A. clavatus*, estando involucrada en la biosíntesis de patulina, que es una micotoxina secretada por distintas especies de hongos, interviniendo en procesos de hidroxilación de compuestos intermedios de la ruta de biosíntesis de este metabolito (Artigot *et al.*, 2009). Estas proteínas poseen características diferentes entre sí. En primer lugar, se observa que la proteína Bcin09g04570.1 es la única que no posee péptido señal, característica que conlleva a predecir que no debería

ser secretada. Esta misma proteína no presenta posibles lugares de *O*-glicosilación, mientras que las restantes presentan en torno a 10 lugares de *O*-glicosilación. Por otro lado, mientras que la proteína Bcin05g05950.1 presenta un pI cercano a la neutralidad (6,54), el resto posee un pI al menos una unidad inferior, en torno a pH 5. Por último, la proteína Bcin03g01540.1 es la única que posee un anclaje GPI.

Esto puede significar que son proteínas que actúan en diferentes procesos de oxidorreducción, probablemente actuando sobre diferentes sustratos y en diferentes momentos del ciclo de vida del hongo, puesto que la proteína sujeto se obtuvo en el glicosecretoma de la cepa B05.10 (González *et al.*, 2014), mientras que se ha obtenido una probable oxidoreductasa similar que no posee lugares de *O*-glicosilación, por lo que no podría ser purificada junto a este grupo de glicoproteínas.

Fosfatasas ácidas (EC 3.1.3.2)

Las enzimas con actividad fosfatasa catalizan la reacción de hidrólisis de un monoéster fosfato liberando alcohol y fosfato. En el genoma de *B. cinerea* se han encontrado 3 genes que codifican para proteínas que pueden ser capaces de llevar a cabo esta reacción, que son Bcin15g03320.1, Bcin04g02460.1 y Bcin13g05870.1, teniendo similitud con “Fosfatasa ácida fosfato-represible” de *P. chrysogenum*, cuya síntesis es reprimida por el fosfato inorgánico existente en el medio (Haas *et al.*, 1992). Presentan péptido señal, siendo predicho el punto de corte de este mismo, presentan grado de *O*-glicosilación variable, ya que Bcin15g03320.1 posee 11 lugares sensibles, Bcin04g02460.1 posee 14 y Bcin13g05870.1, con un mayor número, presenta 21 lugares de posible *O*-glicosilación. Bcin15g03320.1 es la única que no posee anclaje GPI a la membrana.

Es posible que la función de estas proteínas sea la captación de fosfato inorgánico del medio, que es necesario para el correcto funcionamiento del organismo, presentando proteínas adheridas a la membrana y otras secretadas al medio, sin adhesión a esta.

Beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21)

Las beta-glucosidasas catalizan, en sustratos como la celulosa, la reacción de hidrólisis de enlaces (1→4)-beta-glicosídicos que unen residuos terminales, no reductores de beta-D-

glucósidos, con la liberación de glucosa. A partir de la beta-glucosidasa Bcin10g05630.1 encontrada en el glicosecretoma de *Botrytis* (González *et al.*, 2014), se han identificado 4 genes que codifican proteínas similares a ella: Bcin15g02440.1, Bcin09g04850.1, Bcin09g06990.1, Bcin10g05590.1. Presentan similitud con la proteína encontrada en *N. fischeri*, denominada “Probable beta-glucosidasa F”, de la que no se han encontrado artículos científicos que traten sobre ella. Existe una diferencia notable entre ellas, ya que mientras que la proteína Bcin15g02440.1 presenta 54 lugares de posible *O*-glicosilación, las restantes proteínas presentan en torno a 15 lugares posibles. Ninguna de ellas posee anclajes GPI a la membrana, por lo que deben ser enviadas al medio extracelular, donde realizarán su función. Dos de las proteínas sintetizadas por *B. cinerea* presentan distintas isoformas. Por un lado, Bcin09g06990 presenta 4 isoformas diferentes, cuyas secuencias nucleotídicas poseen pequeñas diferencias en la disposición de los intrones y exones (Fig. 1) y, por otro lado, la proteína Bcin10g05590 presenta 2 isoformas, cuyas diferencias se encuentran al inicio de la secuencia nucleotídica del gen, donde la isoforma Bcin10g05590.1 presenta un exón, el cual no existe en la secuencia del gen que codifica la proteína Bcin10g05590.2 (Fig. 2.).

Las proteínas glucósido hidrolasas o glucosidasas son las proteínas más abundantes encontradas en el glicosecretoma del hongo en anteriores estudios (González *et al.*, 2014), ya que poseen la función de degradar compuestos como la celulosa y hemicelulosa, que abundan en las paredes vegetales del organismo hospedador, por lo que será necesario un alto número de proteínas de esta familia para la correcta degradación de los tejidos vegetales, por lo que se predice que estas proteínas poseen una especial relevancia en la virulencia del hongo gracias a su función degradadora

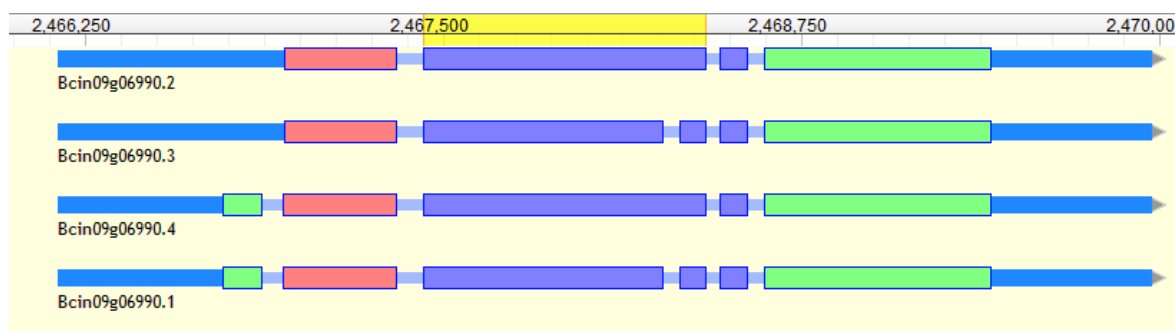


Fig. 1 Representación de las distintas isoformas de la proteína Bcin09g06990, observando los intrones y exones por las que están formadas.

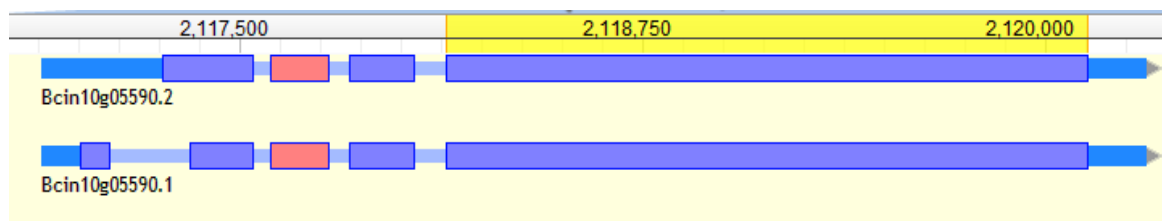


Fig. 2 Representación de las distintas isoformas de la proteína Bcin10g05590, observando los intrones y exones por las que están formadas.

Glicosil hidrolasa de la familia 125

No se han encontrado proteínas similares a la proteína Bcin01g07530.1 que posean evidencias experimentales. El análisis de su secuencia en Pfam aporta un único dominio glicosil hidrolasa de la familia 125, dominio alfa-manosidasa metal-independiente. Las alfa-manosidasas producen la hidrólisis de diversos polímeros, como alfa-manobiosa, que posean manosa, liberando manosa unida por enlace alfa(1→2) a los extremos terminales, no reductores.

Debido a que no se han encontrado proteínas estudiadas experimentalmente, se han estudiado los organismos que presentan proteínas no revisadas similares a ella, dando como resultado nuevamente un listado de organismos que pertenecen a la división Ascomycota. Se trata de una proteína con 14 lugares de posible *O*-glicosilación y que presenta un anclaje GPI a la membrana. No ha sido posible conocer su función, aunque el ser encontrada únicamente en hongos ascomicetos indica que debe poseer alguna función relevante en la biología de estos.

Desconocidas

- **Bcin07g02940.1:** Proteína única en el genoma de *B. cinerea*, de la que se desconoce su función. Presenta distintos dominios kelch, y posee alto grado de identidad con “proteína “kelch-like” terF” de *A. terreus*, que interviene en la biosíntesis de terreína, un metabolito secundario fúngico con actividad ecológica, antimicrobiana, antiproliferativa y antioxidativa, siendo complicado aún asignar una función específica a esta enzima (Zaehle *et al.*, 2014). Con un único lugar de posible *O*-glicosilación ha sido purificada junto al glicosecretoma obtenido a partir de la cepa B05.10 de *B. cinerea* (González *et al.*, 2014).

En este caso, nuevamente, es posible estudiar la estructura y función de la proteína para crear fármacos que desactiven su síntesis y observar así, cuáles serán las consecuencias sobre el proceso infeccioso que lleva a cabo el hongo.

CONCLUSIONES

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|--|--------|--------|-----|-----|-----|
| HMM | keekppnwksifdgsaweydekayeyihlflkkipdInteeneevrkelkdvkfwlekidGfRlDvkhvskvealesngeflheftqalnetvasrkevmtvgEvsda | | | | | |
| HMATCH | k+++ +p + +++ ++++ +++++ ++ +lpdL te ++v+ e++ + +++ + +idG+R+D +++ f +f++a+ v++vgE+++++ | | | | | |
| FP | 468899999999999999999999886.....7*****g*****99.....*****999.....789*****887 | | | | | |
| SEQ | KKSYHPPFLIDYNNATSIKVCWEGT-----NIVSLPDLRTEDSNVQAEWNTWIGQLVANYSIDGLRVDSAQQTGV-----GFFPSFQNAAG-----YVVVGEIFNGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Conclusiones

1. Se han identificado dos proteínas secretadas por *B. cinerea* que son únicas (Bcin14g00810 y Bcin07g02940), ya que no se han encontrado proteínas similares a ellas en este hongo, por lo que pueden ser objeto de futuros estudios, con los que conseguir una mejor caracterización sobre su papel en la biología y virulencia del hongo, y hacer posible la creación de fármacos que inhiban su secreción.
2. Se ha observado que las beta-glucosidasas, son el grupo de proteínas más numeroso de este estudio, que perteneciendo al glicosecretoma y presentando 5 posibles proteínas con esta función, sugiere que son proteínas de gran relevancia en el proceso infeccioso sobre la planta, favoreciendo una correcta maceración de los tejidos.
3. La proteína Bcin07g02940 presenta homología con “proteína “kelch-like” terF” de *A. terreus*, la cual interviene en la biosíntesis de la terreína, un metabolito con propiedades interesantes, por lo que la proteína Bcin07g02940 interviene en la biosíntesis de algún metabolito de *B. cinerea* con propiedades igualmente llamativas.
4. Se ha identificado la proteína Bcin08g02390.1 como una peptidasa que se encuentra únicamente en hongos, algo que no es muy común en este tipo de proteínas, por lo que el estudio de esta proteína puede mostrar nuevas características sobre este amplio grupo de organismos.

Conclusions

1. It has been identified two unique proteins secreted by *B. cinerea* (Bcin14g00810 and Bcin07g02940), since they have not been found proteins similar to them in this fungus, reason why they can be subject of future studies, obtaining a better characterization about its role in the biology and virulence of the fungus, and make possible the creation of drugs that inhibit its secretion.
2. It has been observed that beta-glucosidases are the largest group in this study, that, belonging to the glycosetome and presenting 5 possible proteins with this function (2 of them with different isoforms), leads to think that they have a great relevance in the infective process on the plant, producing a correct maceration of the plant tissues.
3. The protein Bcin07g02940 shows homology with the *A. terreus* “Kelch-like protein terF, which is involved in the biosynthesis of terrein, a metabolite with clearly interesting properties. Therefore, it is a way for future studies, observing if Bcin07g02940 intervenes in the biosynthesis of some metabolite of *B. cinerea* with equally striking properties.
4. The protein Bcin08g02390.1 has been identified as a peptidase only found in fungi, which is not very common in this type of proteins, so its study may show new characteristics about this large group of organisms.

...

BIBLIOGRAFÍA

| Alpha-amylase | Alpha amylase, catalytic domain | Domain | CL0058 | 81 | 293 | 95 |
|---------------|---|--------|--------|-----|-----|-----|
| #HMM | keekppnwwkslfdgsaweydekaqeyylhlfkkkpldnteevzkelkd.vvkwlekgidGfRlDvkhvskvealesngeflheftgalnetvasrkevmtvgEvssda | | | | | |
| #MATCH | k+++ +p + +++ +++++ +++++ ++ +lpL te ++v+ e++ + +++ + +idG+R+D +++ | | | | | |
| #PP | 4688999999999999999999999999886.....7*****99.....*****999.....789*****88 | | | | | |
| #SEQ | KKSYHRPFCLIDYNNATSIRVCWEGE-----NIVSLPDLRTEDSNVQAEWNTWIGQLVANYSIDGLRVDGAQQTGV-----SFFPSFQNAAG-----YVVVGEIFNGDI | | | | | |
| DUF1966 | Domain of unknown function (DUF1966) | Domain | CL0369 | 340 | 387 | 340 |

Bibliografía

- Artigot, M.P., Loiseau, N., Laffitte, J., Mas-Reguieg, L., Tadrist, S. et al.** 2009. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology*. **155**:1738-1747.
- Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., Von Heijne, G., Brunak, S.** 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection*. **17**:349-356.
- Bromley, M., Gordon, C., Rovira-Graells, N., Oliver, J.** 2006. The *Aspergillus fumigatus* cellobiohydrolase B (cbhB) promoter is tightly regulated and can be exploited for controlled protein expression and RNAi. *FEMS Microbiology Letters*. **264**:246-254.
- Burmester, A., Shelest, E., Glckner, G., Heddergott, C., Schindler, S. et al.** 2011. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biology* **12**:R7.
- de Vries, R.P., van den Broeck, Hetty C, Dekkers, E., Manzanares, P., de Graaff, L.H. et al.** 1999. Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:2453-2460.
- Elad, Y., Pertot, I., Prado, A.M.C., Stewart, A.** 2016. Plant hosts of *Botrytis* spp., p. 413-486. *En: Fillinger, S. and Elad, Y. (eds.), Botrytis—The Fungus, The Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. Springer, Heidelberg.
- Espino, J.J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R. et al.** 2010. The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics*. **10**:3020-3034.
- Fankhauser, N., Mser, P.** 2005. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*. **21**:1846-1852.
- Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J. et al.** 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*. **44**:279-285.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R. et al.** 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, p. 571-607. *En: Walker, J.M. (ed.), The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, New York.
- González, M., Brito, N., González, C.** 2014. Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology*. **14**:254.
- Goto, M.** 2007. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **71**:1415-1427.
- Gupta, R., Jung, E., Brunak, S.** 2016. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. 2004. Ref Type: Unpublished Work.
- Haas, H., Redl, B., Friedlin, E., Stffler, G.** 1992. Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum* phoA gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene*. **113**:129-133.

- Hutzler, J., Schmid, M., Bernard, T., Henrissat, B., Strahl, S.** 2007. Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**:7827-7832.
- Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angewandte Chemie International Edition*. **45**:6802-6818.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H. et al.** 2015. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*. **43**:580-584.
- Nakajima, M., Akutsu, K.** 2014. Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology: JGPP*. **80**:15-23.
- NCBI R.C.** 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. **44**:D7.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne G., Nielsen, H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*. **8**:785-786.
- Rojas, A.L., Nagem, R., Neustroev, K.N., Arand, M., Adamska, M. et al.** 2004. Crystal structures of β -galactosidase from *Penicillium* sp. and its complex with galactose. *Journal of molecular biology*. **343**:1281-1292.
- Sasaki, H., Kubota, K., Lee, W.C., Ohtsuka, J., Kojima, M. et al.** 2012. The crystal structure of an intermediate dimer of aspergilloglutamic peptidase that mimics the enzyme-activation product complex produced upon autoproteolysis. *Journal of Biochemistry*. **152**:45-52.
- Sauer, J., Sigurskjold, B.W., Christensen, U., Frandsen, T.P., Mirgorodskaya, E. et al.** 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. **1543**:275-293.
- Schumacher, J., Tudzynski, P.** 2012. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*, p. 225-241. *En: Pérez, J., Di Pietro, A. (eds.) Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi*. Springer, Heidelberg.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B. et al.** 2013. Precision mapping of the human α -GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal*. **32**:1478-1488.
- Steyn, A.J., Pretorius, I.S.** 1995. Characterization of a novel α -amylase from *Lipomyces kononenkoae* and expression of its gene (LKA1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **28**:526-533.
- UniProt Consortium** 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* **45**:158-169.
- Van Kan, J.A., Stassen, J.H., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A., Faino, L. et al.** 2017. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*. **18**:75-89.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., van Kan, J.A.** 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*. **8**:561-580.
- Zaehle C., Gressler M., Shelest E., Geib E., Hertweck C. et al.** 2014. Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity. *Chemistry & Biology*. **21**:719-731.