

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que causa pérdidas millonarias en la agricultura a escala global. En esta tesis doctoral se ha analizado el papel en el proceso infeccioso de la *O*-glicosilación del conjunto de proteínas secretadas por el hongo (secretoma). Para ello se ha estudiado la presencia y distribución de presuntos sitios de *O*-glicosilación en el secretoma de *B. cinerea* y otros hongos, se han generado y caracterizado mutantes afectados en el primer paso de la vía de *O*-glicosilación, y se ha caracterizado el conjunto de proteínas *O*-glicosiladas secretadas por *B. cinerea*.

La *O*-glicosilación en la biología y virulencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

Estudio de la función de las protein-*O*-manosiltransferasas.

ULL | Universidad de La Laguna

MARIO ANDRÉS GONZÁLEZ CARRACEDO

TESIS DOCTORAL

DPTO. BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA

LA LAGUNA, FEBRERO 2015

**La *O*-glicosilación en la biología y virulencia del
hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Estudio de la
función de las protein-*O*-manosiltransferasas.**

**Memoria presentada por D. Mario Andrés González Carracedo
para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de La
Laguna.**

Directores de tesis:

**Dr. Celedonio González Díaz y Dra. Nélida Brito Alayón.
Profesores titulares de la U. D. de Bioquímica y Biología
Molecular.**

La Laguna, 2015.

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

El **Dr. Celedonio González Díaz** y la **Dra. Nélica Brito Alayón**, profesores titulares de la Unidad Departamental de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna

CERTIFICAN:

Que el licenciado en Biología **Mario Andrés González Carracedo** ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación encaminados a la obtención del grado de Doctor, con el título:

“La O-glicosilación en la biología y virulencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Estudio de la función de las protein-O-manosiltransferasas”

Revisada la presente memoria, estiman que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor y en consecuencia autorizan su presentación como tesis doctoral para defensa pública ante el tribunal que sea designado al efecto.

Y para que así conste, se expide la presente certificación en La Laguna a 23 de Enero de 2015.

Fdo. Celedonio González Díaz

Fdo. Nélica Brito Alayón

DPTO. BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y
GENÉTICA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El **Dr. Julio Ávila Marrero**, Director del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Laguna

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**La O-glicosilación en la biología y virulencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Estudio de la función de las protein-O-manosiltransferasas**” presentada por el licenciado **Mario Andrés González Carracedo** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Celedonio González Díaz** y la **Dra. Nélida Brito Alayón** en la Unidad Departamental de Bioquímica y Biología Molecular, y da conformidad a la admisión a trámite de la presente memoria.

Y para que así conste, se expide la presente certificación en La Laguna, a 23 de Enero de 2015.

VºBº DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Dr. Julio Tomás Ávila Marrero

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar sinceros agradecimientos a todas las personas que me han apoyado, motivado y ayudado durante los cinco años de realización de esta tesis.

A mis directores, Nélida y Celedonio, por hacer que la ciencia parezca algo sencillo cuando no lo es, por motivarme, aconsejarme, ayudarme y comprenderme en todo momento.

A mis padres, Milagros y Ruperto, que siempre me han apoyado durante estos años, escuchándome y ofreciéndome todo cuanto he necesitado para alcanzar mi sueño, y también a mis hermanas, Sara y Laura, que me han ofrecido su ayuda y apoyo incondicional en cada momento.

A mis grandes amigos y compañeros de laboratorio, Judith, Jose, y Marcos, con quienes he aprendido desde el primer día, y he compartido tantos buenos momentos.

A los profesores del departamento, en especial Pablo y Julio por tratarme como uno más de su laboratorio y por ofrecerme su ayuda, y a Ignacio y Siverio por estar ahí cuando lo he necesitado.

A mis compañeros de departamento, Rebeca, Oscar, Deborah, Norberto, Elisa... con quienes he compartido muchísima información y tan buenos momentos he pasado.

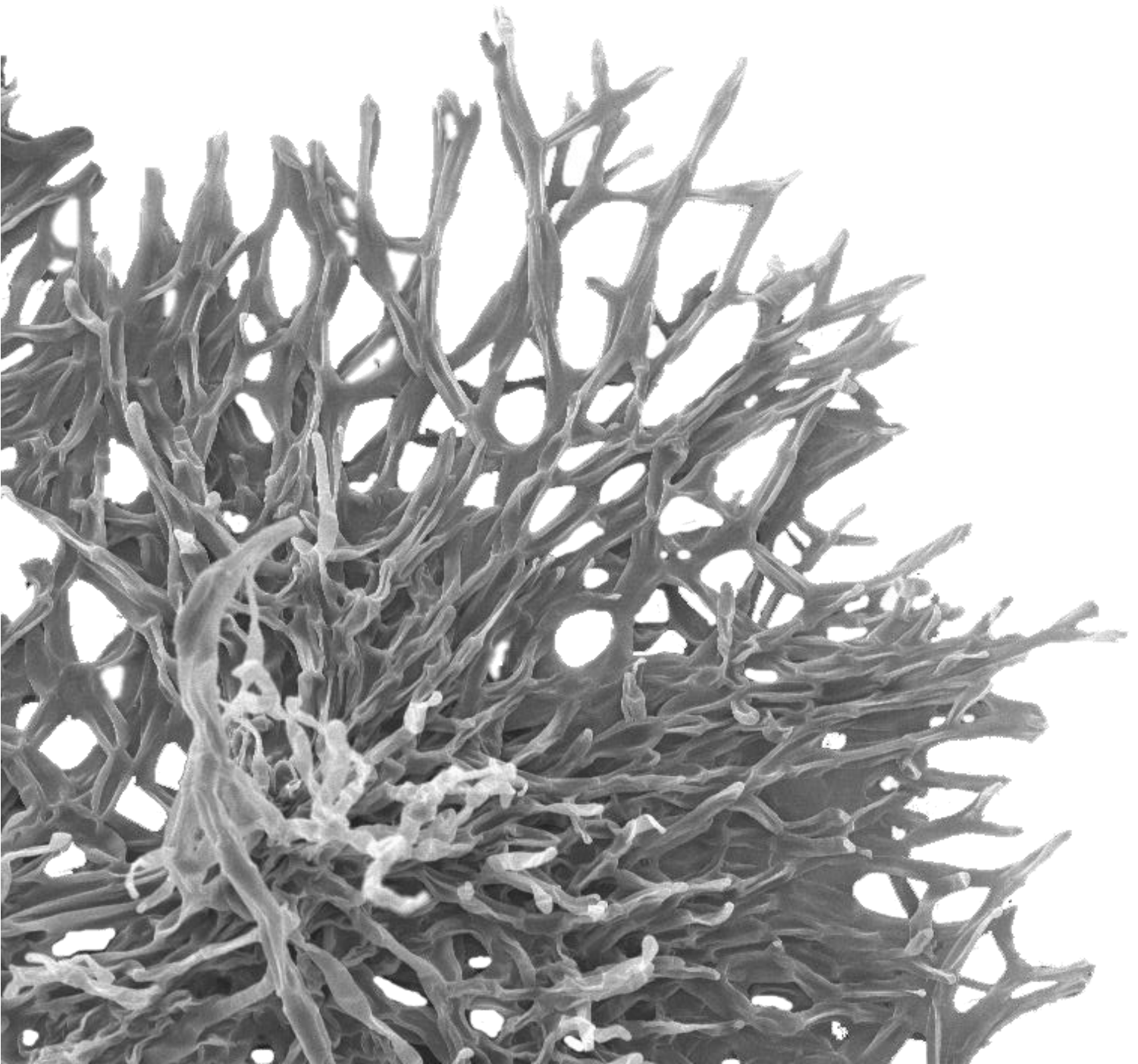
A la ULL, a la ACIISI y a EMBO por su apoyo económico durante todos estos años de tesis. Sin ellos, esta tesis nunca hubiera sido posible.

A mis amigos de toda la vida que siempre me han ofrecido su ayuda sin pedir nada a cambio y a todas aquellas personas que me han motivado y ayudado durante esta etapa de mi vida que siempre recordaré con mucha felicidad.

Gracias a todos por ayudarme a cumplir un sueño.

“SIN DUDA NO HAY PROGRESO”

Charles Darwin (1809 -1882)



ESTRUCTURA DE LA TESIS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio del papel de la *O*-glicosilación de proteínas en la biología y virulencia del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Los apartados en los que se estructura este trabajo son los siguientes:

Introducción general.

Objetivos.

Material y métodos.

Resultados y discusión.

Conclusiones.

Referencias bibliográficas.

Publicaciones.

Esta tesis ha sido presentada por la modalidad de compendio de publicaciones, por lo que, cumpliendo con la normativa que la regula, contiene un resumen de los resultados y la discusión. La totalidad de este trabajo ha sido publicada en tres artículos científicos que se han incluido en el apartado de Publicaciones (1, 2 y 3):

1. **González, M.**, Brito, N. y González C. (2012). High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-*O*-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiology* 12:213. Journal citation report (2012): 3,104.
2. **González, M.**, Frías, M., Brito, N. y González C. (2013). *Botrytis cinerea* Protein *O*-Mannosyltransferases Play Critical Roles in Morphogenesis, Growth, and Virulence. *pLOS ONE* 8(6): e65924. Journal citation report (2013): 3,530.
3. **González, M.**, Brito, N. y González C. (2014). Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein *O*-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology* 14:254. Journal citation report (2013): 2,976.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- **%G:** Porcentaje mínimo de glicosilación, o contenido mínimo en Ser/Thr (*Percentage of Glycosylation*).
- **aa:** Aminoácido.
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*).
- **cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario.
- **mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **bcpmt1, 2 y 4:** Genes de *B. cinerea* que codifican para las protein-*O*-manosiltransferasas de las subfamilias 1, 2, y 4 respectivamente.
- **BcSpl1:** *Botrytis cinerea* Snod-prot Like 1
- **BLAST:** Herramienta de búsqueda basada en alineamientos locales (*Basic Local Alignment Search Tool*).
- **BSA:** Suero de albumina bovina (*Bovine Serum Albumin*).
- **CAZY:** Base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (*Carbohydrate Active Enzymes*).
- **CFEM:** Dominio común en proteínas extracelulares de membrana en hongos, relacionado con la virulencia (*Common in fungal extracellular membrane proteins domain*).
- **CR:** Rojo congo (*Congo Red*).
- **Ct:** Ciclo umbral (*Threshold cycle*).
- **cv.:** Cultivar o cepa cultivar.
- **CW:** Blanco de calcoflúor (*Calcofluor White*).
- **DNasa:** Desoxirribonucleasa.
- **DTT:** Ditionitrosol.
- **ECM:** Matriz extracelular (*Extracellular Matrix*).
- **ExPASy:** Sistema experto de análisis de proteínas (*Expert protein analysis system*).
- **f. sp.:** Forma especial (*Forma specialis*).
- **GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green fluorescence protein*).
- **GPI:** Glicosilfosfatidilinositol
- **HGR:** Región hiper-*O*-glicosilada (*Hyper-O-Glycosylated Region*).
- **hpi:** Horas post inoculación.
- **HR:** Respuesta hipersensible (*Hypersensitive response*).
- **Macro-XRR:** Algoritmo que identifica regiones ricas en una característica (X) en un conjunto de secuencias proteicas (*X-Rich Region*).
- **ORF:** Pauta de lectura abierta (*Open reading frame*).
- **p/v:** Porcentaje en peso/volumen.
- **PAMP:** Patrón molecular asociado a patógenos (*Pathogen associated molecular pattern*).
- **pb:** Pares de bases.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).

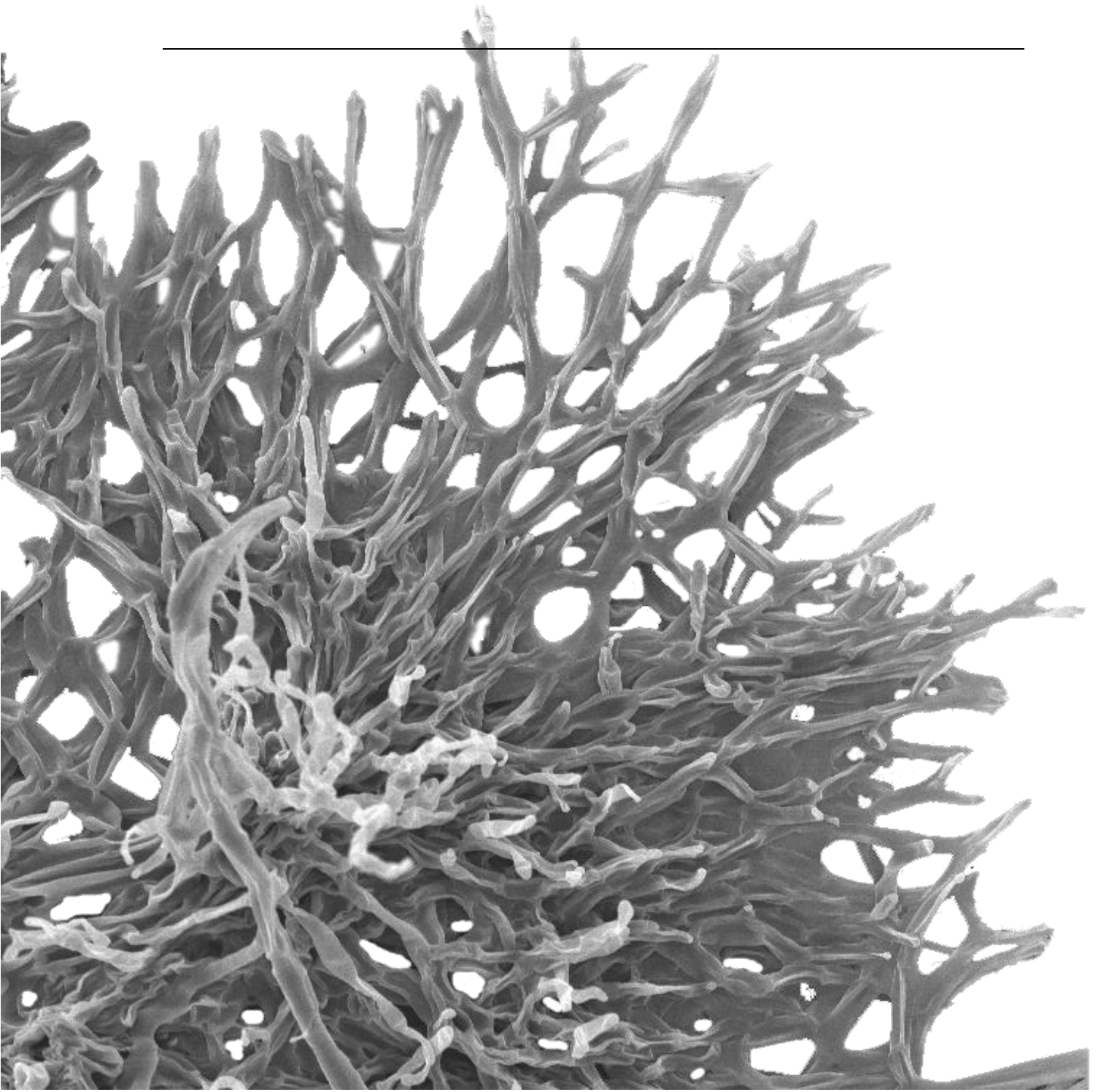
- **pHGR:** Región para la que se predice hiper-*O*-glicosilación *in silico* (***predicted Hyper-O-Glycosylated Region***).
- **pI:** Punto isoeléctrico.
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (***Phenylmethylsulfonyl fluoride***).
- **pmt:** Gen que codifica para una protein-*O*-Manosiltransferasa.
- **PMT:** Protein-*O*-Manosiltransferasa.
- **PMT1, 2 y 4:** Subfamilias 1, 2 y 4 de las Protein-*O*-Manosiltransferasas respectivamente.
- **PRR:** Receptor de reconocimiento de patrones (***Pattern recognition receptor***).
- **pv.:** Variedad patógena (***Pathovar***).
- **PVDF:** Di-fluoruro de polivinilideno (***Poly-Vinylidene DiFluoride***).
- **Q-RT-PCR:** PCR cuantitativa a tiempo real (***Quantitative real time PCR***).
- **RE:** Retículo Endoplasmático.
- **RNasa:** Ribonucleasa.
- **rpm:** Revoluciones por minuto.
- **S:** Separador (***Separator***).
- **SD:** Desviación estándar (***Standard deviation***).
- **SDS:** Dodecil sulfato sódico.
- **SDS-PAGE:** Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y SDS (***Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis***).
- **Ser/Thr:** Serina más treonina.
- **Ser:** Serina.
- **SGI:** Inhibición del crecimiento en plántulas (***Seedling growth inhibition***).
- **Spots:** Puntos proteicos identificados en geles de electrophoresis bidimensional.
- **TCA:** Ácido tricloroacético (***Tri-cloro acetic acid***).
- **Thr:** Treonina.
- **ufc:** Unidades formadoras de colonias
- **W:** Ventana de búsqueda (***Window***).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Botrytis cinerea</i>	3
Métodos de control de la infección y desarrollo de nuevas estrategias.....	6
Identificación de nuevos factores de patogenicidad.....	7
<i>N</i> - y <i>O</i> -glicosilación de proteínas: Generalidades	9
<i>O</i> -glicosilación: Las protein- <i>O</i> -manosiltransferasas	10
<i>O</i> -glicosilación: Funciones.....	13
Justificación del presente trabajo	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Organismos, cepas y condiciones de cultivo.....	23
Aislamiento de conidias de <i>B. cinerea</i>	24
Estudio de la viabilidad de conidias y esclerocios de <i>B. cinerea</i>	24
Conservación de las conidias de <i>B. cinerea</i> en gel de sílice	25
Ensayos de virulencia de <i>B. cinerea</i>	25
Ensayos de la fuerza de adhesión de <i>B. cinerea</i> al tejido vegetal	26
Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM)	26
Ensayos de penetración en epidermis de cebolla	27
Ensayo de la actividad necrotizante y de inhibición del crecimiento de plántulas de tabaco	27
Extracción de DNA genómico de <i>B. cinerea</i>	27
Extracción y purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	28
Electroforesis de ácidos nucleicos.....	29
Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	29
Transferencia Southern	29
PCR (Polymerase Chain Reaction)	30
PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR).....	31
Preparación de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	32
Yeast recombinational cloning (YRC).....	33
Transformación de protoplastos de <i>B. cinerea</i>	34
Plásmidos utilizados para la generación de nuevas construcciones de DNA	35
Nuevas construcciones de DNA y cepas de <i>B. cinerea</i> generadas en este trabajo.....	36
Obtención de fracciones proteicas a partir de cultivos de <i>B. cinerea</i>	39
Purificación de glicoproteínas extracelulares mediante cromatografía de afinidad.	40
Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	41

Electroforesis bidimensional de proteínas (EF-2D)	42
Identificación de proteínas mediante MALDI TOF/TOF y LC-MS/MS	42
Detección y cuantificación de proteínas recombinantes mediante transferencia Western	43
Detección de glicoproteínas en membranas mediante transferencia Eastern	43
Tratamiento con Exo-manosidasas.....	43
Herramientas bioinformáticas utilizadas en este trabajo	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
NetOGlyc 3.1 es una herramienta válida para la predicción de regiones hiper- <i>O</i> -glicosiladas en proteínas fúngicas.....	49
Un gran número de proteínas fúngicas con secuencia señal poseen regiones ricas en Ser/Thr y están potencialmente <i>O</i> -glicosiladas	50
Las proteínas fúngicas son ricas en regiones potencialmente hiper- <i>O</i> -glicosiladas.....	51
El genoma de <i>B. cinerea</i> contiene tres genes <i>bcpmt</i> que se expresan constitutivamente	52
Las cepas $\Delta bcpmt$ muestran una reducción del crecimiento en cultivo axénico, producen menos conidias y más esclerocios	53
La cepa $\Delta bcpmt2$ muestra sensibilidad frente al blanco de calcoflúor, al SDS y a la agitación del medio de cultivo	53
Las cepas $\Delta bcpmt$ presentan una morfología atípica y producen menor cantidad de ECM.....	54
Las tres cepas $\Delta bcpmt$ son menos virulentas, siendo $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$ incapaces de penetrar el tejido vegetal	55
Identificación de proteínas <i>O</i> -glicosiladas mediante 2D – MALDI-TOF/TOF	56
Purificación y análisis del glicosecretoma de <i>B. cinerea</i>	56
Ocho de cada diez proteínas del glicosecretoma contienen regiones ricas en Ser/Thr y casi la mitad poseen pHGRs.....	58
Las regiones ricas en Ser/Thr retienen parcialmente a las proteínas en el micelio	59
Sobreexpresión de proteínas <i>O</i> -glicosiladas en <i>B. cinerea</i>	60
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
PUBLICACIONES.....	81
Publicación 1	81
Publicación 2	93
Publicación 3	117

INTRODUCCIÓN



Botrytis cinerea

Botrytis cinerea Pers.:Fr., tal como se conoce en su forma más común (anamórfica o asexual), es un hongo fitopatógeno necrotrofo capaz de infectar más de 235 especies de plantas diferentes [1]. Este hongo causa la enfermedad conocida como “podredumbre gris”, que se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y/o estadio de desarrollo del cultivo, y prácticamente en cualquier área geográfica [2,3]. Recientemente, *B. cinerea* ha sido considerado como el segundo hongo fitopatógeno en un ranking mundial, en base a criterios científico-económicos [3].

Según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, *Botrytis cinerea* pertenece a la división *Ascomycota*, clase *Leotiomycetes*, orden *Helotiales* y familia *Sclerotiniaceae* [4]. En este estado asexual, el hongo se caracteriza por su micelio de hifas filamentosas, y por reproducirse por medio de conidias, unidades reproductivas no móviles, especializadas y asexuales, que participan en la diseminación de la infección y favorecen la resistencia frente a condiciones ambientales adversas. El nombre del género deriva del término griego *botrytis* (“grupos de uvas”), debido a la organización de las esporas en los conidióforos en forma de racimos. Por otra parte, el epíteto de la especie “*cinerea*” deriva del latín, ya que podría traducirse como “de color gris ceniza”, haciendo referencia al color grisáceo de las conidias acumuladas en las últimas etapas de la infección del tejido vegetal.

La ubiquidad y persistencia de *B. cinerea* se atribuye a su gran variabilidad genética y morfológica [5,6], lo que le permite crecer bajo múltiples condiciones ambientales facilitando la infección de especies vegetales localizadas en áreas geográficas muy diversas. Bajo condiciones climáticas y fisiológicas favorables, este hongo es capaz de colonizar prácticamente todas las especies de dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas bulbosas, pudiendo infectar diversos órganos de la planta y en diferentes etapas de su crecimiento. Entre sus hospedadores habituales se incluye una amplia gama de plantas importantes en agricultura como verduras y hortalizas (tomate, pimiento, calabaza, etc.), plantas ornamentales (rosas, geranios, claveles, etc.) y plantas frutales (vid, fresa, kiwi, etc.). Además, el ataque de este organismo no sólo se produce sobre plantas creciendo en el campo o en el invernadero, sino que también provoca enfermedades en la post-cosecha, comenzando en general con una infección latente en el cultivo que se desarrolla posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento [7,8].

En su fase reproductiva sexual, también denominada forma teleomórfica, al hongo se le conoce con el nombre de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. En esta fase utiliza ascosporas o esporas sexuales que se originan por meiosis dentro de hifas modificadas en forma de saco, denominadas ascas. Dado que esta forma sexual ha sido raramente observada en la naturaleza en el último siglo [9], la mayor parte de los estudios realizados con este hongo (incluyendo todos los estudios realizados en este trabajo) se han hecho en su estado imperfecto, es decir, como *Botrytis cinerea*. En la actualidad, la comunidad de investigadores en micología tiende a eliminar esta doble denominación de las especies fúngicas. En el XVI *International Botrytis Symposium* celebrado en Bari (2013), se acordó

proponer a la Comisión Internacional de Taxonomía Fúngica (www.fungaltaxonomy.org) adoptar el nombre de *Botrytis cinerea* como denominación única de la especie.

La forma de dispersión principal de *B. cinerea* se produce mediante conidias asexuales. Una vez que estas conidias entran en contacto con la superficie de un nuevo hospedador, durante las primeras 24 horas, periodo conocido como “fase temprana” de la infección, se produce la adhesión, germinación, y penetración del tubo germinal a través del tejido vegetal, dando lugar a la formación de una lesión primaria. A continuación se desarrolla el periodo conocido como “fase tardía” de la infección, que se caracteriza por un rápido crecimiento y expansión de la lesión necrótica. Las diferentes etapas del ciclo de vida se pueden resumir en los siguientes puntos (**Fig. 1**):

1. Adhesión y germinación de las conidias en la superficie del hospedador. Inicialmente la adhesión está mediada por interacciones hidrofóbicas, aunque en etapas más avanzadas esta unión se hace más fuerte debido a la producción por parte del hongo de un glucano extracelular denominado cinereano, al que se le han atribuido propiedades adhesivas [9]. Posteriormente, se produce la germinación de la conidia favorecida en condiciones de alta humedad, presencia de nutrientes (fosfato, glucosa, etc.), o por la producción de ciertas hormonas por parte del hospedador [10]. La germinación culmina con la formación del tubo germinal, responsable de la penetración en los tejidos vegetales.

2. Penetración y formación de la lesión primaria. Los tubos germinales acceden al tejido vegetal, utilizando o bien aperturas naturales como estomas o heridas, o bien penetrando directamente la epidermis vegetal. En este último caso, se ha observado la formación de estructuras especializadas muy similares a los apresorios producidos por otros hongos fitopatógenos, que morfológicamente consisten en un engrosamiento del extremo de las hifas y que contienen la maquinaria para la penetración de la epidermis [11]. Durante este proceso participan enzimas degradadoras de las envueltas celulares, toxinas y hormonas, que en su conjunto producen la muerte de las células adyacentes generando la lesión primaria [9,12].

3. Producción de necrosis generalizada o estado de latencia. El hongo lleva a cabo la invasión y colonización de los tejidos circundantes al lugar de la lesión primaria, provocando su maceración. Es un proceso rápido que conlleva la muerte de las células vegetales. Si las condiciones son favorables, la lesión se puede convertir en una necrosis generalizada a nivel de toda la planta. Además, el hongo puede producir estructuras de resistencia denominadas esclerocios [13], consideradas como las estructuras más importantes implicadas en la supervivencia de *Botrytis*, ya que son capaces de sobrevivir a la radiación ultravioleta, la desecación y los ataques microbianos, en parte gracias a los β -glucanos de su cubierta melanizada [14].

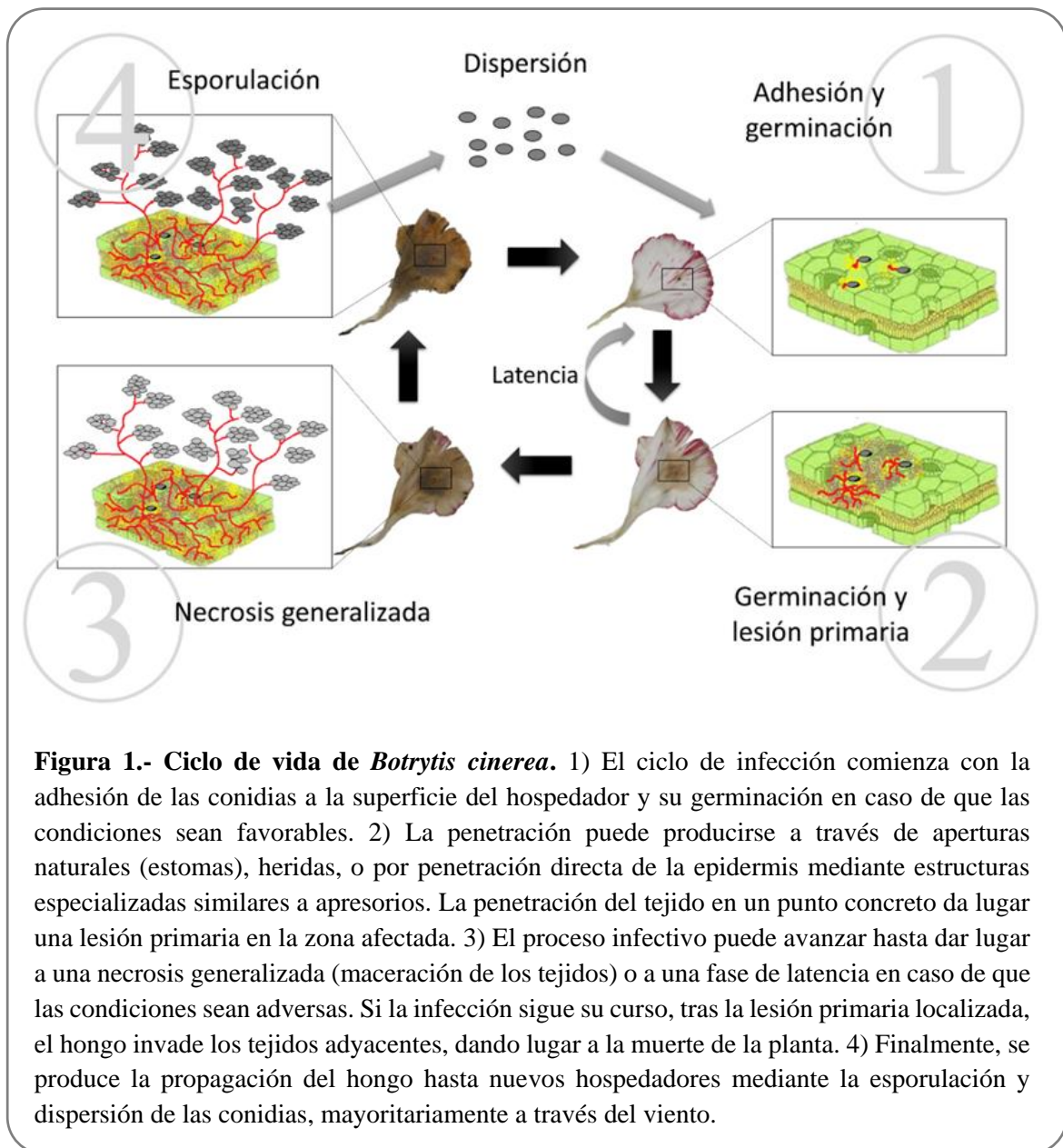


Figura 1.- Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*. 1) El ciclo de infección comienza con la adhesión de las conidias a la superficie del hospedador y su germinación en caso de que las condiciones sean favorables. 2) La penetración puede producirse a través de aperturas naturales (estomas), heridas, o por penetración directa de la epidermis mediante estructuras especializadas similares a apresorios. La penetración del tejido en un punto concreto da lugar a una lesión primaria en la zona afectada. 3) El proceso infectivo puede avanzar hasta dar lugar a una necrosis generalizada (maceración de los tejidos) o a una fase de latencia en caso de que las condiciones sean adversas. Si la infección sigue su curso, tras la lesión primaria localizada, el hongo invade los tejidos adyacentes, dando lugar a la muerte de la planta. 4) Finalmente, se produce la propagación del hongo hasta nuevos hospedadores mediante la esporulación y dispersión de las conidias, mayoritariamente a través del viento.

Los esclerocios permiten al hongo, por ejemplo, sobrevivir a inviernos muy fríos en regiones con climas extremos y germinar de nuevo en primavera para retomar su ciclo vital. Sin embargo, si las condiciones ambientales son adversas y/o la acción de las defensas de la planta (reforzamiento de la pared celular, generación de especies reactivas del oxígeno, etc.) impiden el progreso de la infección, el hongo detiene el proceso infectivo y se forman lesiones latentes que pueden retomar la infección de la planta más tarde si las condiciones se tornan favorables.

4. Esporulación y dispersión. Típicamente se produce en el tejido completamente necrosado e invadido por el hongo y conlleva la producción y maduración de un gran número de conidias que, transportadas mayoritariamente por el viento y por insectos, permiten la propagación del hongo a nuevos hospedadores.

Métodos de control de la infección y desarrollo de nuevas estrategias

B. cinerea es genética y morfológicamente heterogéneo, lo que le posibilita un crecimiento y desarrollo adaptado a condiciones de cultivo desiguales [7]. Además, como se ha descrito, es capaz de atacar a cultivos en cualquier estado de desarrollo, incluida la post-cosecha, infecta cualquier órgano vegetal y es capaz de crecer a temperaturas de almacenamiento muy bajas. Todo ello provoca que el control de *B. cinerea* no resulte nada sencillo. Los métodos de control más utilizados actualmente se podrían encuadrar en tres bloques principales:

1. Métodos de prevención. Las prácticas agrarias tradicionales para el control de otros organismos fitopatógenos, tales como la desinfección de semillas, retirada de restos de cultivos anteriores, la aireación, la calefacción, el tipo de riego, etc. [15-18], siguen siendo primordiales para reducir la incidencia de la podredumbre gris, aunque por sí solas no bastan para controlar la infección por *B. cinerea*.

2. Métodos químicos de control. Los métodos de control basados en el uso de fungicidas son aún los más utilizados [19], destacando benomilo, carbendazima, captan y diclofuanida como los de uso más frecuente. No obstante, la utilización de fungicidas es cada vez más problemática debido a la contaminación ambiental que éstos producen, existiendo numerosas restricciones en cuanto al tipo, forma de aplicación o manejo. Por otra parte, su uso supone un elevado coste económico: en España la cuarta parte del gasto en productos fitosanitarios se dedicó a fungicidas en el año 2013, estimándose en 197,3 millones de euros [20]. Sin embargo, el principal problema para el control de este hongo es, sin duda, la continua aparición de cepas resistentes a los fungicidas utilizados tradicionalmente, favorecida por la alta variabilidad genética de *B. cinerea* [21,22]. La dispersión de estas cepas en los cultivos puede convertir en ineficaces, en un futuro no muy lejano, algunos de los tratamientos actualmente empleados en la lucha contra la infección. Todo lo anterior ha provocado que el desarrollo de nuevos métodos de control sea cada vez más necesario [19].

3. Métodos de control alternativos. En los últimos años se han intentado desarrollar estrategias de control alternativas, entre las que destaca el uso de microorganismos de biocontrol. Estos microorganismos suelen colonizar las heridas en los tejidos vegetales utilizando todos los nutrientes disponibles, lo que dificulta la germinación de las esporas de otros organismos patógenos. En la lucha contra *Botrytis cinerea* destacan ciertas especies bacterianas [23,24], levaduras [25], diversos hongos micoparásitos, como *Pythium periplocum* [26], *Acremonium Strictum* [27] y, especialmente, *Trichoderma harzianum* [28], ya comercializado. Sin embargo, los resultados obtenidos con el empleo de estos organismos como biocontrol poseen una escasa reproducibilidad [29] y su uso presenta una serie de riesgos que tienen que ser continuamente evaluados, como por ejemplo el desplazamiento de especies nativas, o efectos indeseados sobre el ecosistema o sobre los propios seres humanos (toxicidad, patogenicidad, alergia, etc.) [30].

Otra estrategia consiste en aprovechar los recursos genéticos naturales de algunas especies vegetales que muestren cierta resistencia frente a *Botrytis*. El cruzamiento de estas especies con cultivares comerciales de alto interés en agricultura, pero con menor resistencia al hongo, permitiría la obtención de plantas más resistentes a la infección. Esta práctica ya se ha ensayado con distintas estirpes de tomate, y se han obtenido nuevos cultivares que presentan una mayor resistencia frente a *B. cinerea*, aunque siguen siendo parcialmente susceptibles a la enfermedad [31,32]. La obtención de plantas resistentes a *Botrytis* también se ha realizado mediante la introducción en el genoma del vegetal de genes procedentes de otras plantas que confieran resistencia frente al hongo [33-36], y también provocando, por manipulación genética, un retraso artificial de la maduración de sus frutos que puede conducir a una menor susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea* [37].

Ninguno de estos métodos es totalmente efectivo para el control de la podredumbre gris, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias de lucha contra *Botrytis cinerea* sigue siendo un área de investigación prioritaria. Aunque es muy posible que nunca se descubra una “bala de plata” que permita acabar con esta plaga, seguramente el futuro nos deparará sistemas de lucha contra el hongo que resulten más eficaces, menos dañinos para la salud y el medio ambiente, y que tengan un menor coste económico.

Identificación de nuevos factores de patogenicidad

Aunque en un sentido amplio el término factor de patogenicidad (o factor de virulencia) engloba elementos de diversa naturaleza (metabolitos, estrategias de colonización, polisacáridos, ...), es común restringir su aplicación a aquellos genes, y a las proteínas que estos codifican, que contribuyen de manera significativa en cualquier etapa del proceso infeccioso, tales como la adhesión, la penetración, la expansión de las lesiones, la maceración de los tejidos de la planta, la inhibición del sistema inmunológico vegetal, etc. Por ello, los factores de virulencia deben ser únicamente necesarios para mantener intacta la capacidad infectiva de *B. cinerea*, y por tanto, en sentido estricto no deben afectar al crecimiento del organismo patógeno en cultivo axénico.

La identificación de factores de virulencia en *Botrytis cinerea* presenta un gran interés, en cuanto puede conducir al desarrollo de nuevas formas de lucha contra la infección, estableciendo mecanismos que permitan neutralizar este tipo de factores. Como se ha citado anteriormente, la estrategia de invasión de *B. cinerea* es la típica de un organismo necrotrofo, es decir, el hongo mata las células en el área de infección y luego crece extrayendo nutrientes del tejido muerto. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que esta interacción necrófaga hongo-planta es mucho más complicada de lo que se preveía. Puesto que el hongo secreta gran cantidad de enzimas hidrolíticas capaces de degradar los tejidos de la planta, inicialmente se entendía que estas eran responsables en gran medida de la muerte del tejido vegetal. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que el hongo es capaz de causar la muerte en las células vegetales de una forma más sutil, mediante la inducción de la respuesta hipersensible (HR), un tipo de muerte celular programada puesta en marcha por la propia planta en respuesta a la infección por el hongo [4,38,39]. La HR constituye una eficaz protección contra organismos fitopatógenos biotrofos [40], ya que

crea una barrera de células muertas en torno a la infección que imposibilita el avance de estos organismos. Sin embargo, está cada vez más claro que organismos necrotrofos, tales como *B. cinerea*, pueden aprovechar la HR en su propio beneficio, ya que crecen sobre el tejido necrosado [41]. Además, *B. cinerea* secreta una serie de proteínas y metabolitos capaces de inducir activamente la HR en las células que circundan el área de infección [4,38,39,42-44]. Es más, recientemente se ha demostrado [45] que *B. cinerea* secreta gran número de RNAs de pequeño tamaño capaces de modular la respuesta defensiva vegetal durante la infección, haciendo uso del sistema de interferencia por RNA de la planta. Está claro, por tanto, que *B. cinerea* tiene un alto grado de sofisticación a la hora de infectar las plantas: por un lado induce las defensas vegetales mediante la secreción de los metabolitos o proteínas adecuadas, y además modula esas defensas mediante interferencia por RNA, de manera que la respuesta defensiva acaba favoreciendo la infección.

Como se ha descrito anteriormente, las primeras etapas del desarrollo *in planta* de *B. cinerea* son cruciales en el establecimiento de una infección exitosa y pueden conducir o bien a la aparición de un punto necrótico en la zona de infección, en el que la planta restringe al patógeno, o bien a la penetración exitosa de los tejidos vegetales con lo que se extiende la lesión. En esta batalla, la principal munición que el hongo puede utilizar es el conjunto de proteínas (secretoma), metabolitos, o RNAs de pequeño tamaño secretados en ese momento. Diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, han prestado especial atención al estudio del secretoma, ya que suele considerarse como una pieza clave en la capacidad infectiva del hongo. Este aspecto se ha puesto de manifiesto en los últimos años, ya que una de las características más importantes en los genomas de las dos cepas de *B. cinerea* que han sido completamente secuenciados recientemente [46,47], es que se predice un gran número de proteínas de secreción, correspondiendo aproximadamente al 10% de todos los polipéptidos codificados en dichos genomas. Se han realizado varios estudios del secretoma que produce *B. cinerea* bajo diferentes condiciones de cultivo [48-54], y estos estudios han confirmado la existencia de un conjunto de proteínas muy abundante y con diferentes funciones.

Entre las proteínas secretadas por *B. cinerea* estudiadas hasta el momento, destacan aquellas involucradas en la degradación de los diversos componentes de las envueltas celulares como la celulosa [55], hemicelulosa [56], cutina [57], pectina [58,59], lípidos [60] o proteínas [61,62]. Pero se han estudiado también proteínas involucradas en otros procesos tales como la producción de especies activas de oxígeno [63] o la inducción de necrosis en los tejidos vegetales, ya sea porque funcionan como toxinas [64] o porque son capaces de inducir de la respuesta hipersensible en el hospedador [42,44,65]. Además, en el secretoma existen muchas proteínas de función completamente desconocida. Hasta ahora, entre todas las proteínas estudiadas, únicamente se han descrito los siguientes factores de patogenicidad:

1. La xilanasa Xyn11A [56], que además de su papel en la degradación del xilano, también es capaz de inducir, independientemente de su actividad enzimática, la respuesta de defensa en el hospedador contribuyendo al proceso infeccioso desarrollado por el hongo [44].

2. La pectinmetilesterasa BcPME1 [66] y las endopoligalacturonas BcPG1 [67] y BcPG2 [68], implicadas en la degradación de la pectina. La proteína BcPG1, además, es otra proteína capaz de inducir la respuesta de defensa en la planta [65,69], siendo reconocida como un PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) por *Arabidopsis* [70].

3. La superóxido dismutasa BcSOD1 [63], una enzima capaz de convertir el anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. No está claro si su contribución a la virulencia estriba en su capacidad de degradar el superóxido, o en su capacidad de producir y acumular H₂O₂, puesto que parece claro que *B. cinerea* secreta peróxido de hidrógeno en las fases tempranas de la infección y que esto favorece dicha infección [71].

4. La proteína BcSpl1 [42,43,72], de la familia de las cerato-plataninas, que induce tanto la respuesta hipersensible como la respuesta sistémica adquirida en el hospedador, contribuyendo parcialmente a la virulencia del hongo.

5. La endoarabinasa BcAra1 [73], que lleva a cabo la degradación del polisacárido arabinano, presente en la pared celular vegetal. La mutación del gen correspondiente provoca una disminución de la infección solamente en ciertas especies vegetales, indicando que este factor de virulencia es específico de hospedador.

***N*- y *O*-glicosilación de proteínas: Generalidades**

La glicosilación de proteínas, es decir, la adición de residuos y/o cadenas de carbohidratos a ciertas proteínas diana para sintetizar así glicoproteínas, es una de las modificaciones postraduccionales más frecuentes. Evolutivamente, se trata de un proceso muy conservado ya que las glicoproteínas juegan un papel fundamental en todas las células eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos [74]. Aproximadamente el 10% de todas las proteínas anotadas en las bases de datos son glicoproteínas [75], y se cree que esta proporción es mucho mayor si sólo se consideran las proteínas secretadas. Es muy posible, por tanto, que existan muchas glicoproteínas entre las proteínas del secretoma de *Botrytis cinerea*, y que la glicosilación juegue un papel fundamental en la virulencia del hongo.

Se conocen dos tipos principales de glicosilación de proteínas, la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación, ambas diferentes, pero evolutivamente muy conservadas aunque con bastantes diferencias respecto al tipo y el número de moléculas de carbohidratos presentes en las glicoproteínas [76,77]. En la *N*-glicosilación, los carbohidratos se unen a las proteínas diana a través de residuos de asparagina contenidos en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr [77], en la que X corresponde a cualquier aminoácido excepto prolina. En las células eucariotas, las cadenas de *N*-oligosacáridos son diversas respecto al tipo de azúcares que portan, pero el primer residuo de azúcar unido a la proteína es siempre *N*-acetilglucosamina.

En el caso de la *O*-glicosilación, los carbohidratos, principalmente *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina, manosa, galactosa o glucosa, se unen a las proteínas mediante aminoácidos que poseen un grupo hidroxilo, principalmente serina y treonina, y en mucha menor medida tirosina, hidroxiprolina e hidroxilisina [77,78]. Las

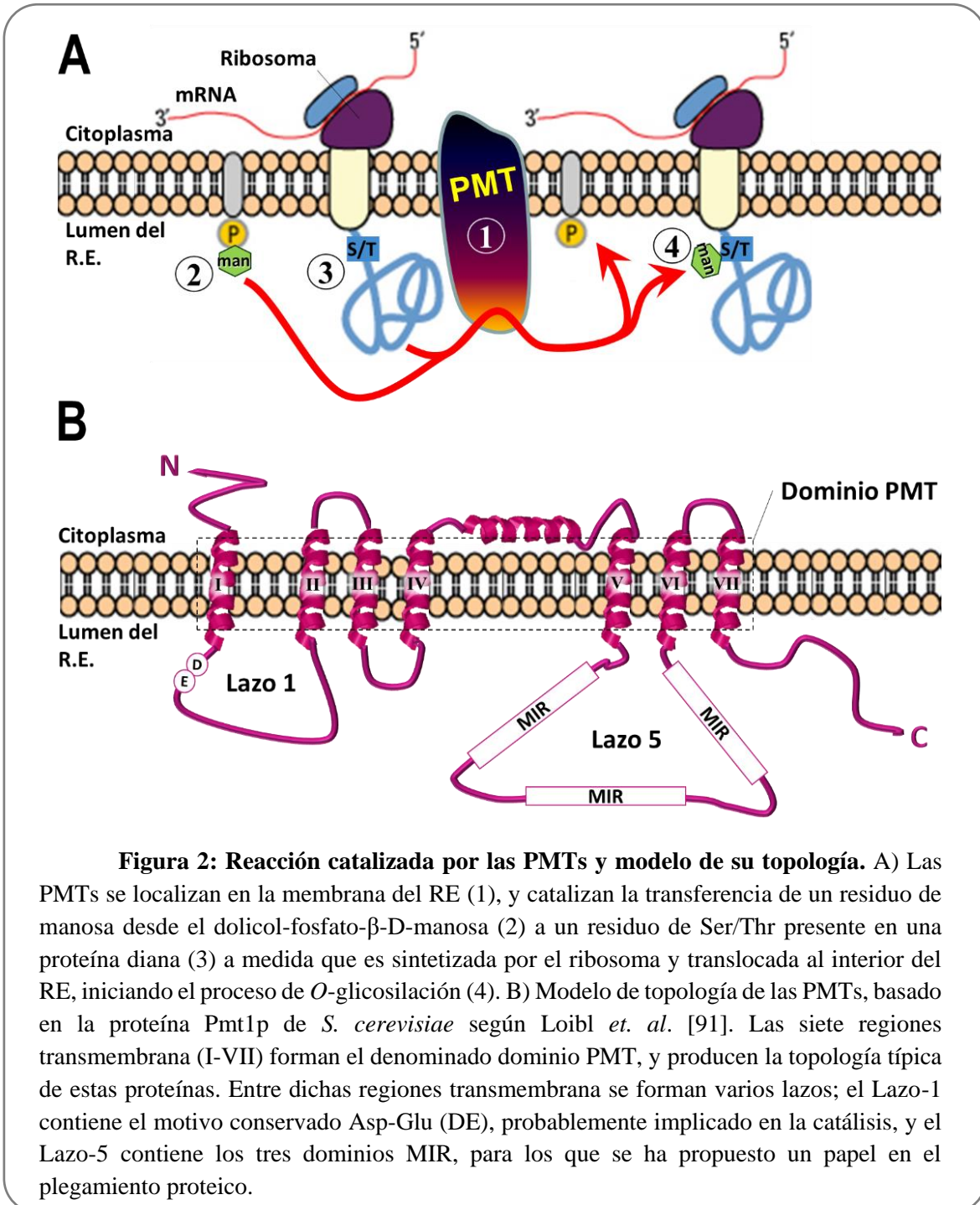
cadena de *O*-glicanos son mucho más heterogéneas que las de *N*-glicanos, tanto en lo que respecta al tipo de azúcares, como a su forma de unión a las proteínas [74,76,77]. En el caso de la *O*-glicosilación no se conoce ninguna secuencia consenso de unión en las proteínas *O*-glicosiladas, lo que ha dificultado su estudio, aunque sí existen herramientas bioinformáticas que permiten predecir con cierta exactitud los sitios de *O*-glicosilación en proteínas de mamíferos [79]. Es comúnmente aceptado, además, que las regiones proteicas con gran cantidad de residuos de Ser y Thr suelen constituir buenos sustratos para la maquinaria de *O*-glicosilación [80-82], de manera que estas regiones ricas en Ser y Thr suelen considerarse como regiones potencialmente *O*-glicosiladas.

***O*-glicosilación: Las protein-*O*-manosiltransferasas**

Los aspectos moleculares de la *O*-glicosilación han sido estudiados especialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [74,83-85] y, en menor medida, en hongos filamentosos. Tanto en levaduras como en hongos filamentosos, el primer paso de la ruta de *O*-glicosilación tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE) y comienza generalmente mediante la adición de un residuo de manosa activado a un residuo de Ser/Thr presente en una proteína diana, lo que ha provocado que este proceso sea conocido igualmente como *O*-manosilación. Sin embargo, muy raramente también se ha observado la unión de galactosa o glucosa directamente a los residuos de Ser/Thr, como en el caso del género *Trichoderma* [77]. El primer paso de la ruta de *O*-manosilación está catalizado por una familia de enzimas presentes en la membrana del RE [78], conocidas como dolicol-fosfato- β -D-manosa:protein-*O*-mannosiltransferasas (EC 2.4.1.109), o comúnmente como protein-*O*-manosiltransferasas o PMTs. Concretamente, las PMTs se encargan de catalizar la transferencia de un residuo de manosa desde una molécula donadora (dolicol-fosfato- β -D-manosa) a un residuo de Ser o Thr presente en la proteína diana, generando un enlace de tipo α -D-manosídico entre la proteína y el azúcar, e iniciando el proceso de *O*-manosilación (**Fig. 2A**). Recientemente, se ha descubierto que este paso ocurre, al menos parcialmente, de manera simultánea a la translocación del polipéptido naciente hacia el lumen del RE [86]. La cadena oligosacáridica es extendida posteriormente, a medida que la glicoproteína continúa su recorrido por la ruta de secreción a través de la región *Cis* y *Medial* del Aparato de Golgi, mediante la acción de otras α 1,2-manosiltransferasas de la familia KTR y α 1,3-manosiltransferasas de la familia MNN1 [77,84,87,88]. De esta manera, en levaduras se sintetizan principalmente glicoproteínas que contienen cadenas lineales compuestas de hasta cinco residuos de manosa. Sin embargo, en el caso de hongos filamentosos, como en el género *Aspergillus*, se ha observado la presencia de cadenas más complejas y ramificadas, que pueden contener también glucosa o galactosa, o incluso residuos de manosa a los que se añaden grupos cargados como sulfato o fosfato [77,78].

Las PMTs conforman una familia de proteínas altamente conservada y están presentes desde organismos procariotas hasta mamíferos [78], sin embargo, hasta ahora no se han descrito en plantas. Estas enzimas son, por tanto, muy buenas candidatas como dianas frente a las que diseñar nuevas estrategias de control contra hongos fitopatógenos. El uso de inhibidores específicos de las PMTs no solo no dañaría al organismo vegetal hospedador,

sino que además es muy posible que tampoco afectase a mamíferos, dado que existen ciertas diferencias en la maquinaria de *O*-glicosilación entre hongos fitopatógenos, plantas y mamíferos [89]. Se ha observado, por ejemplo, que la expresión heteróloga de las PMTs de mamíferos en mutantes de *S. cerevisiae* para estos mismos genes no permite restaurar la actividad *O*-manosiltransferasa [90].



Los análisis filogenéticos han permitido clasificar a este grupo de enzimas en tres subfamilias principales: PMT1, PMT2 y PMT4 [92,93]. En levaduras como *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *Pichia pastoris*, las subfamilias PMT1 y PMT2 son redundantes y contienen 2 o 3 miembros, mientras que la subfamilia PMT4 posee un solo representante

[83,94,95]. En el caso de otras levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, y en todos los hongos filamentosos que se han estudiado hasta la fecha, solamente existe un representante de cada subfamilia de las PMTs [74]. Curiosamente, la subfamilia PMT1 parece estar restringida a hongos y levaduras, ya que en mamíferos solamente se ha identificado un único representante de las subfamilias PMT2 y PMT4 [91].

En base a su actividad manosiltransferasa, las PMTs se clasifican dentro la familia 39 de las glicosil-transferasas (GT39) en la base de datos CAZY (*Carbohydrate Active Enzymes*). Son enzimas residentes en la membrana del RE y presentan dos dominios muy conservados (**Fig. 2B**). El primero de ellos, denominado dominio PMT, le confiere su topología a esta familia de proteínas. Este dominio consiste en dos grupos de regiones transmembrana (TM): un primer grupo formado por cuatro TM cerca del extremo *N*-terminal (TM I – IV), y un segundo grupo formado por tres TM cerca del extremo *C*-terminal (TM V – VII). Esta topología es típica de las PMTs, y ha sido dilucidada principalmente mediante el estudio de la proteína Pmt1p de *S. cerevisiae* [96]. Entre las TM I y II se forma un bucle orientado hacia el lumen del RE, denominado Lazo-1. Mediante ensayos de mutagénesis dirigida, se ha descrito que la mutación de un motivo muy conservado, denominado motivo ácido DE (Asp-Glu), presente en el Lazo-1, causa la pérdida prácticamente completa de la actividad manosiltransferasa de las proteínas Pmt1p y Pmt2p de *S. cerevisiae*, lo que indica que esta región debe estar implicada en la catálisis [97]. El segundo dominio conservado se denomina dominio MIR, debido a que se detectó inicialmente en tres tipos de proteínas: Manosiltransferasas, Receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R) y Receptor de Rianodina (RyR). Este dominio se aloja en otro bucle orientado también hacia la zona luminal del RE, entre las TM V y VI, que se ha denominado Lazo-5. En el Lazo-5 se encuentran tres repeticiones de este dominio MIR, altamente conservadas, y se ha demostrado que también son esenciales para la actividad manosiltransferasa en *S. cerevisiae* [92]. Recientemente, la estructura tridimensional de los tres dominios MIR de la proteína Pmt4p de *S. cerevisiae* ha sido modelizada, puesto que presenta un elevado grado de homología con la proteína SDF2 de *Arabidopsis thaliana* [91]. Las proteínas de tipo de SDF2 (*Stromal Cell-Derived Factor-2*) son pequeñas proteínas hidrofílicas que están presentes tanto en plantas como en animales, pero no en hongos. Su función está relacionada con la respuesta al estrés del RE, puesto que interaccionan con diferentes chaperonas y co-chaperonas, jugando un papel esencial en el plegamiento proteico. Por ello, se ha sugerido que los dominios MIR deben llevar a cabo este papel en hongos y levaduras [91].

Una característica muy importante de las PMTs es su capacidad para asociarse entre ellas, formando homo- y/o heterodímeros. En *S. cerevisiae*, las proteínas de la familia PMT1 (Pmt1p y Pmt5p) forman heterodímeros con las proteínas de la familia PMT2 (Pmt2p y Pmt3p), mientras que la única proteína de la familia PMT4 forma homodímeros [98,99]. Se ha demostrado que el heterodímero Pmt1p-Pmt2p es responsable del 90% de la actividad manosiltransferasa en *S. cerevisiae* [98]. Sin embargo, recientemente se ha descrito que en el caso del hongo filamentosos *Aspergillus nidulans*, con una única PMT por familia, estas proteínas forman heterodímeros en cualquier tipo de combinación posible, y que la única proteína de la familia PMT4 forma además homodímeros [100].

Respecto a la actividad catalítica de las PMTs, se ha observado que ciertos derivados ácidos sintetizados químicamente a partir del compuesto Rodanina-3-acético, son capaces de inhibir a la proteína PMT1 de *C. albicans* [101]. Otros trabajos realizados en *P. pastoris* han demostrado que la sustitución del aminoácido fenilalanina, localizado en la posición 664 de la proteína Pmt2p (Phe664), por un residuo de serina, provoca resistencia frente a este tipo de inhibidores así como una disminución de la actividad manosiltransferasa del complejo Pmt1p-Pmt2p [102]. El residuo Phe664 se encuentra formando parte de un lazo citoplasmático localizado entre las TM VI y VII, implicado en la formación de dicho heterodímero [92], por lo que parece que este inhibidor actúa impidiendo la dimerización de la PMTs y no directamente sobre el centro activo de estas enzimas. Sin embargo, otros aminoácidos conservados han sido a su vez identificados como importantes para la formación del complejo Pmt1p-Pmt2p, como por ejemplo la Arginina 138, que está localizada cerca de la región TM-II, o bien como esenciales para la actividad manosiltransferasa, como los aminoácidos Arg64 y Glu78, localizados cerca del motivo DE [92]. En su conjunto, estos resultados implican que las PMTs poseen una muy elevada complejidad estructural y funcional, dado su carácter de proteínas integrales de RE con múltiples regiones transmembrana. Lo anterior, sumado a su capacidad de formar complejos entre sí, hace muy complicado dilucidar su estructura tridimensional y, por lo tanto, el diseño *in silico* de inhibidores específicos de estas proteínas.

Finalmente, respecto a la identificación de proteínas diana, o sustratos susceptibles de ser glicosilados por las PMTs, se han desarrollado algunos estudios [80,81] que han permitido identificar unas pocas proteínas como sustratos de las PMTs tanto en levaduras [80] como en hongos filamentosos [81,103]. Todas las proteínas diana de las PMTs que se conocen actualmente están presentes en la membrana celular, la pared celular o son secretadas. En *S. cerevisiae* se han descrito al menos 23 proteínas diana [80], sin embargo, sólo se han identificado experimentalmente unas pocas en hongos filamentosos [81,103-105]. Dado el papel trascendente que juegan las PMTs en la biología y la virulencia fúngicas [91,106-108], la caracterización de estas dianas en hongos es muy posible que conduzca a identificación de nuevos factores de virulencia.

***O*-glicosilación: Funciones**

La función fisiológica de la *O*-glicosilación se ha estudiado principalmente en levaduras como *S. cerevisiae* y en algunos hongos filamentosos, principalmente del género *Aspergillus* o *Ustilago*, mediante el análisis de cepas en las que se ha mutado uno o más genes *pmt*. Cabe destacar que hasta ahora no ha sido posible aislar ninguna cepa mutante para todos los genes *pmt* de manera simultánea y que además, la delección de los genes de la subfamilia PMT2 suele causar letalidad en estos organismos. Los resultados que se derivan del análisis de estas cepas mutantes para uno o varios genes *pmt* indican que la *O*-glicosilación es muy importante para el correcto crecimiento, morfología, desarrollo y virulencia, tanto en hongos filamentosos como en levaduras [83,105,107,109-114]. Asimismo, el estudio del fenotipo de estas cepas mutantes ha permitido establecer importantes funciones de la *O*-glicosilación, como son el mantenimiento de la integridad de la pared celular fúngica y la morfología celular, el correcto desarrollo y diferenciación de las

hifas o la capacidad de respuesta frente al estrés ambiental [78,85,115-118]. A nivel molecular, se ha demostrado que la *O*-glicosilación mejora la estabilidad y la solubilidad de las proteínas de secreción, las protege frente a la degradación mediada por proteasas y funciona como un determinante para su envío a los diferentes compartimentos celulares durante el proceso de secreción, entre otros procesos [77]. Recientemente se ha observado en *S. cerevisiae* que el heterodímero Pmt1p–Pmt2p se une de forma transitoria a ciertas chaperonas del RE implicadas en el plegamiento oxidativo de proteínas, al complejo Hrd1p involucrado en la degradación de proteínas asociada al RE, o al complejo p24 implicado en el control de la exportación de proteínas desde el RE [119]. Estos resultados, así como otros trabajos realizados también en esta levadura [118,120], indican que las manosiltransferasas están implicadas en el control del correcto plegamiento de las proteínas en el RE y en la regulación de la exportación de dichas proteínas hacia el Aparato de Golgi.

En *S. cerevisiae*, los mutantes afectados en sólo uno de los genes *pmt* sí son viables, pero la delección simultánea de tres de estos genes, siempre que se trate de un representante de cada subfamilia causa letalidad [83]. En el caso del patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, que sólo posee un representante de cada subfamilia de las PMTs [111], la única proteína de la subfamilia PMT2 es esencial para el crecimiento, mientras que la delección de los genes de las subfamilias PMT1 y PMT4 provoca fallos en su resistencia frente al estrés y reducción de su virulencia [111]. Por otra parte, la delección del gen *pmt2* de *S. pombe* es letal según Willer *et al.* [89], aunque otros trabajos indican que esta proteína no es esencial para este organismo [121]. Tampoco lo es en el caso de *P. pastoris* [95]. La mutación independiente de los genes de las subfamilias PMT1 y PMT4 en *S. pombe* provoca un fenotipo pleiotrópico, presentando una morfología celular alterada, una composición anormal de la pared celular, y fallos durante la división celular y el reconocimiento para el apareamiento sexual de las células [89,121]. Finalmente, los mutantes múltiples para los genes de las subfamilias PMT1 y PMT4 de *S. pombe* y *C. neoformans* son letales [89,111].

En el caso de hongos filamentosos, el estudio de los genes *pmt* mediante mutagénesis dirigida ha revelado resultados similares. Así, la supresión de uno o varios genes *pmt* puede provocar letalidad, causar importantes defectos de crecimiento y conidiación e incluso la pérdida total de la virulencia, por ejemplo en el caso de los géneros *Aspergillus* [77] o *Ustilago* [81,114]. Es especialmente interesante el caso de *U. maydis*, en el que se ha descrito que la supresión del único gen de la subfamilia PMT4 causa una completa pérdida de su capacidad para penetrar el tejido vegetal, sin afectar a ningún otro proceso de su ciclo de vida [114].

En el caso de eucariotas superiores, la *O*-manosilación de proteínas es igualmente un proceso fundamental y ha sido estudiado principalmente en *Drosophila melanogaster* y en humanos. En ambos casos, solamente se han identificado dos genes *pmt* (POMT1 y POMT2) pertenecientes a las subfamilias PMT2 y PMT4, y ninguno de la familia PMT1 [122,123]. En la mosca de la fruta, la mutación de uno o ambos genes *pmt* mediante interferencia por RNA causa el fenotipo conocido como “rotated abdomen” (*rt*), que consiste en una rotación de entre 30° y 60° de la zona abdominal, producida durante el proceso de desarrollo larvario de la mosca [123]. En humanos, la *O*-manosilación es un

proceso muy importante, ya que alteraciones en esta ruta se asocian a un conjunto de enfermedades denominadas Distrofias Musculares Congénitas (CMDs) [124]. Una de las CMDs más importantes es el síndrome de Walker-Warburg, que se produce debido a varias mutaciones diferentes en los genes *pmt* [124-126]. La disminución de la actividad manosiltransferasa provoca que una de las glicoproteínas diana, el α -dístroglicano, sea glicosilada deficientemente y disminuya su capacidad de unión a la matriz extracelular (ECM). Como resultado se produce un desorden durante el proceso de migración neuronal embrionario, que causa malformaciones cerebrales severas [124-126]. En este campo, el estudio de las PMTs de levaduras ha resultado especialmente importante para descifrar las causas de muchas de estas enfermedades [74].

Justificación del presente trabajo

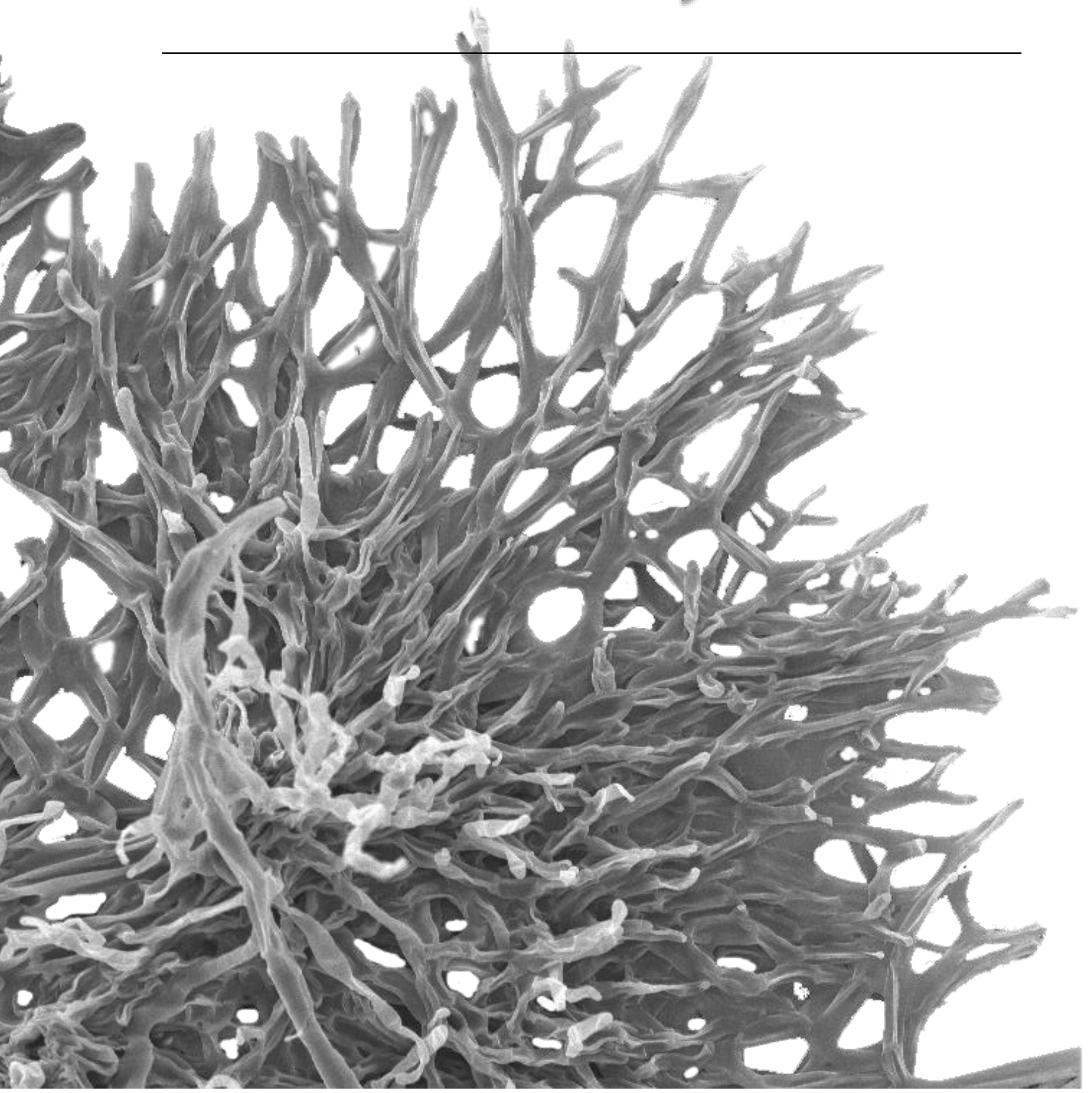
Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que causa daños económicos de gran importancia. Aunque en estos momentos existen fungicidas relativamente eficaces contra esta plaga, las cada vez mayores restricciones en su uso y la frecuente aparición de cepas resistentes convierten en prioritario el diseño de nuevas estrategias de control alternativas, más eficaces y menos dañinas para el medio ambiente. En este sentido, el sistema más utilizado hoy en día para la búsqueda de tratamientos contra cualquier enfermedad infecciosa consiste en identificar, primero, factores de virulencia del organismo patógeno y diseñar, a continuación, estrategias que actúen específicamente sobre dicha/s diana/s. Con esta tesis doctoral se pretende contribuir a la primera parte de esta estrategia general, es decir, se persigue la identificación de factores de patogenicidad de *B. cinerea* contra los que en el futuro puedan ser diseñadas estrategias de control racionales para combatir eficazmente esta enfermedad vegetal.

Una de las armas con las que cuenta *B. cinerea* para atacar a sus hospedadores es el conjunto de proteínas extracelulares (secretoma), en el que ya se han identificado varios factores de patogenicidad y en el que es muy posible que se identifiquen muchos más. Por otra parte, estudios recientes indican que la *O*-glicosilación de proteínas en la vía de secreción es un proceso esencial en la biología fúngica. Puesto que es conocido que la *O*-glicosilación tiene una alta prevalencia entre las proteínas extracelulares, es lícito esperar que este proceso en sí, así como muchas de las proteínas *O*-glicosiladas del secretoma, puedan constituir factores de patogenicidad.

Mediante las tres publicaciones que constituyen esta tesis doctoral, se ha realizado un amplio estudio sobre el papel de la *O*-glicosilación en la biología y virulencia de *B. cinerea*. En el primer artículo, con la finalidad de obtener una visión global sobre la importancia y prevalencia de la *O*-glicosilación en hongos filamentosos, se ha llevado a cabo, mediante herramientas bioinformáticas, un análisis exhaustivo sobre la presencia y distribución de las regiones ricas en Ser/Thr, así como de regiones para las que se predice una abundante *O*-glicosilación, tanto en el genoma de *Botrytis cinerea* como en los genomas de otros siete organismos fúngicos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei*). En el segundo artículo, se han caracterizado mutantes carentes de una

de las tres protein-*O*-manosiltransferasas (PMTs) codificadas por el genoma de *B. cinerea*, afectados en el primer paso de la *O*-glicosilación, y se ha analizado la contribución de cada una de estas PMTs a los diferentes aspectos del ciclo de vida del hongo (morfología, crecimiento, esporulación, virulencia, etc...), así como las diferencias en el secretoma del hongo provocadas por la mutación de estos genes. Finalmente, mediante técnicas de proteómica, en el tercer artículo se ha realizado un estudio pormenorizado del conjunto de proteínas glicosiladas secretadas por *B. cinerea*, identificando nuevos sustratos potenciales de las PMTs, que podrían funcionar como nuevos factores de virulencia.

OBJETIVOS



En base a lo anteriormente expuesto, se han propuesto los siguientes objetivos para esta tesis doctoral:

1. Estudiar *in silico* la presencia y distribución de regiones ricas en serina y treonina, y de regiones que potencialmente posean alta densidad de *O*-glicosilación en las proteínas del secretoma de *Botrytis cinerea* y otros hongos.

En el caso de *B. cinerea*, trabajos previos, tanto de nuestro grupo [56] como de otros [63,66,67], señalan que muchas de las proteínas secretadas por el hongo son necesarias para la infección. Además, resultados recientes hacen sospechar que muchas de ellas contienen regiones con un alto contenido en los aminoácidos serina y treonina, en las que se espera que exista una alta densidad de *O*-glicosilación [55]. En la presente tesis doctoral se ha analizado *in silico* la totalidad de las secuencias proteicas contenidas en el genoma tanto de *Botrytis cinerea* como de otros hongos cuyo genoma ha sido secuenciado, con la finalidad de analizar la presencia, distribución y abundancia de estas regiones ricas en serina y treonina en todas las proteínas con secuencia señal para la secreción. Además, se han desarrollado herramientas bioinformáticas para predecir la posible existencia, localización y abundancia de regiones altamente *O*-glicosiladas en el conjunto de proteínas.

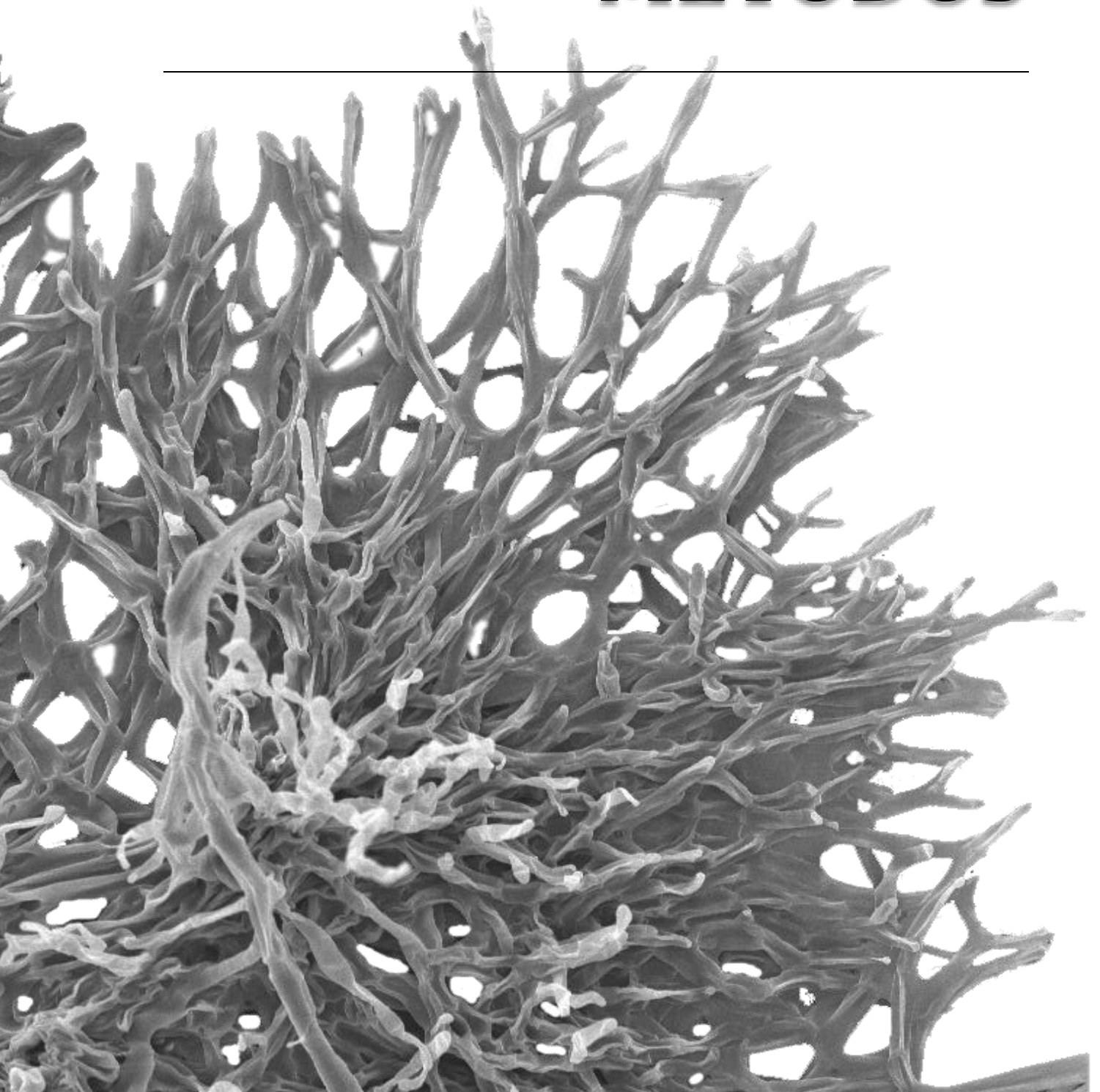
2. Estudiar mediante mutagénesis dirigida el papel de los genes *pmt* en el crecimiento y proceso infectivo de *Botrytis cinerea*.

Como aproximación experimental para el estudio de la *O*-glicosilación en *B. cinerea*, se han identificado los genes *pmt* presentes en el genoma del hongo, y se ha caracterizado la función de cada uno de ellos en su ciclo de vida. Se ha estudiado el patrón de expresión de cada uno de estos genes, su contribución a la morfología de las hifas fúngicas, su papel en el crecimiento, el desarrollo sexual y la virulencia, así como los cambios en el secretoma derivados de la mutación de cada uno de estos genes.

3. Identificar proteínas diana de las PMTs presentes en el secretoma de *Botrytis cinerea*, que puedan funcionar como factores de virulencia.

Una vez caracterizados los genes *pmt* presentes en el genoma de *B. cinerea*, se ha abordado la identificación del conjunto de proteínas *O*-glicosiladas presentes en el secretoma del hongo, y se han caracterizado algunos de sus componentes más prominentes. Un conocimiento detallado de estas proteínas esperamos que sea útil en el futuro para la identificación de factores de virulencia entre las glicoproteínas secretadas por *B. cinerea*.

MATERIAL Y MÉTODOS



Organismos, cepas y condiciones de cultivo

***Botrytis cinerea* (B. cinerea) B05.10** [127]: cepa haploide derivada de la cepa SAS56, cedida por el Dr. P. Tudzynski (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Alemania) y cuyo genoma ha sido secuenciado [46,47]. De manera rutinaria para su mantenimiento en el laboratorio, y/o para los ensayos de crecimiento tanto de la cepa silvestre de *B. cinerea* como de las cepas derivadas de esta, se usaron los siguientes medios de cultivo:

- MEA (*Malt Extract Agar*): Extracto de malta (Pronadisa) al 3 %.
- YGG (*Yeast extract + Glucose + Gamborg's*): Extracto de levadura (Pronadisa) al 0,5%, glucosa 100 mM, Gamborg's B5 (Duchefa Biochemie) al 0,3%.
- YGG-Low (*Yeast extract + Low Glucose + Gamborg's*): Extracto de levadura (Pronadisa) al 0,5%, glucosa 10 mM, Gamborg's B5 (Duchefa Biochemie) al 0,3%.
- SH (*Sucrose + HEPES*): Sacarosa 600 mM, HEPES 5 mM, NH₄H₂PO₄ 1 mM, pH 6.5.
- PDA (*Potato Dextrose Agar*): Potato dextrose agar (Duchefa Biochemie) al 3,9%.
- GB5 (*Gamborg's B5*): Gamborg's B5 (Duchefa Biochemie) al 0,3%, glucosa 10 mM.
- MB (*MES-Basal*): Gamborg's B5 (Duchefa Biochemie) al 0,3%, glucosa 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, MES 10 mM, pH 5,5.

Todos los medios fueron suplementados con micro-agar (Duchefa Biochemie) al 1,5% en los casos en que fue necesario. Para su almacenamiento a largo plazo, las cepas de *B. cinerea* se mantuvieron o bien como conidias, o bien como micelio (en el caso de las cepas que no producen conidias), en glicerol al 15% y a -80°C. Para su uso rutinario, las conidias se guardaron en gel de sílice a 4°C [128], o bien el micelio, también a 4°C, en el caso de las cepas que no producen conidias.

***Escherichia coli* XL1-Blue** (Stratagene): *recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^q ZΔM 15 Tn10* (Tet^r)]. Esta cepa bacteriana se cultivó, rutinariamente, en medio Luria Bertani (LB) (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, pH 7,5), con los antibióticos tetraciclina 10 µg/ml y/o ampicilina 50 µg/ml cuando fue necesario, en condiciones aeróbicas a 37°C. Las bacterias fueron conservadas a largo plazo a -80°C, resuspendidas en glicerol al 15%.

***Saccharomyces cerevisiae* FGSC 9721 (FY 834)**: Esta cepa de *S. cerevisiae* presenta auxotrofia a uracilo [129], y ha sido utilizada en los experimentos de *Yeast Recombinational Cloning* [130]. Se cultivó rutinariamente en medio YPD (extracto de levadura al 1%, triptona al 2%, glucosa al 2%). Para su almacenamiento a largo plazo, las células fueron resuspendidas en glicerol al 15% y congeladas a -80°C.

***Nicotiana tabacum* cv. Havana y *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker.** Las plantas de las dos especies vegetales se mantuvieron en una cámara de crecimiento y germinación (Ing. Climas, España), controlando la temperatura, la humedad y el fotoperiodo. Las semillas de tabaco fueron esterilizadas mediante incubación en un recipiente cerrado con una atmósfera saturada de gas cloro (obtenido a partir de la mezcla de 20 ml de lejía comercial con 5 ml de HCl al 37%) durante 1 hora, y su posterior ventilación durante 2 horas. Las semillas de tomate se trataron primero con una dilución 1:1 de lejía comercial en agua con tritón X-100 al 0,1%, durante 10 minutos con agitación suave, y posteriormente se lavaron con agua estéril. Tras la esterilización, todas las semillas se guardaron en condiciones de sequedad y a 4°C por largos periodos de tiempo. Para el desarrollo de plántulas, las semillas esterilizadas primero fueron incubadas a 4°C durante 2 días en oscuridad total para romper el periodo de dormancia. Las semillas de tabaco fueron germinadas en medio sólido Murashige and Skoog (MS) (MS al 0,5% y agar al 0,8%, pH 5,7) durante 1 semana y posteriormente las plántulas fueron trasplantadas a tierra. En el caso del tomate, las semillas se plantaron directamente en tierra.

Aislamiento de conidias de *B. cinerea*

Se inocularon placas de tomate-agar (extracto de frutos de tomate al 25% y agar al 2%, pH 5,5) con conidias, o bien con porciones de agar conteniendo micelio joven. Los cultivos fueron incubados durante 10-12 días a 20°C en oscuridad, con intervalos de luz UV cercana de 15 minutos por cada 4 horas. Una vez el hongo hubo producido una cantidad suficiente de conidias, se siguió el método descrito por Benito *et al.* [131], con ciertas modificaciones. Se añadió a cada placa 15 ml de agua estéril, y se separaron las conidias removiendo con ayuda de un asa de siembra de vidrio. A continuación, la suspensión obtenida fue filtrada a través de algodón hidrófilo para retirar los restos de micelio y el filtrado se centrifugó (5 min; 1500 x g) para recoger las conidias en el fondo del tubo. Finalmente, las conidias se resuspendieron en 50 ml de agua estéril, se volvieron a centrifugar y se concentraron en 1,5 ml de agua estéril. La cantidad de conidias se cuantificó mediante un hemocitómetro.

Estudio de la viabilidad de conidias y esclerocios de *B. cinerea*

Para analizar la viabilidad de las conidias producidas por las diferentes cepas de *B. cinerea*, se sembraron por agotamiento en medio YGG y el cultivo se mantuvo durante 16 horas a 20°C en oscuridad. A continuación, se recontó el número de conidias germinadas y el número de conidias no germinadas bajo el microscopio. El porcentaje de conidias germinadas respecto al total se utilizó como una medida de la viabilidad de las conidias.

Para analizar la viabilidad de los esclerocios, fueron recogidos a partir de placas con medio tomate-agar, tras 15 días de incubación en oscuridad continua, mediante un bisturí estéril. Los esclerocios fueron lavados 3 veces con agua estéril durante 10 minutos, y luego durante 3 minutos con NaClO al 1% para eliminar las posibles hifas adheridas a su superficie. Finalmente, fueron inoculados en placas con medio YGG-agar y se recontó el número de

esclerocios que germinaron tras 48 horas de cultivo a 20°C en oscuridad. El porcentaje de esclerocios germinados respecto al total se utilizó como una medida de la viabilidad de los mismos.

Conservación de las conidias de *B. cinerea* en gel de sílice

Con el fin de disponer en todo momento de conidias viables de las cepas de *B. cinerea*, reduciendo al máximo el riesgo de contaminación, se utilizó sílica gel (Sigma-Aldrich, tamaño de partícula 63-200 µm) para su conservación, siguiendo una modificación del método de Delcan y colaboradores [128]. Las conidias, una vez aisladas, fueron resuspendidas en 2 ml de una disolución estéril de leche desnatada al 10% en agua. Se espolvoreó gel de sílice seco y estéril sobre ella, empapando toda la mezcla de leche desnatada y conidias. A continuación, se repartió la mezcla por toda la superficie de la placa y se dejó secar a 37°C durante toda la noche. Finalmente, se pulverizó la mezcla seca con un asa de siembra de vidrio estéril y se repartió en alícuotas que se conservaron a 4°C hasta su uso.

Ensayos de virulencia de *B. cinerea*

Los ensayos de virulencia de las diferentes cepas de *B. cinerea* se llevaron a cabo por inoculación en hojas de tomate (cv. Moneymaker), hojas de tabaco (cv. Havana), hojas de vid, pétalos de gerbera, pétalos de clavel, frutos de tomate y uvas. Las inoculaciones consistieron en porciones de agar con micelio joven (cubos de 0,2 cm de lado), a los que una vez colocados sobre el tejido vegetal, se añadieron 20 µl de agua estéril para facilitar la adherencia. En los casos en los que se indica más adelante, se realizó una herida en el material vegetal con una aguja estéril justo en el lugar de inoculación, para favorecer la penetración del hongo a través de la cubierta vegetal, salvo en uvas, donde se utilizó la herida producida tras separar los pedúnculos de la baya.

El tejido vegetal infectado se mantuvo en condiciones de alta humedad (sobre papel de filtro humedecido, dentro de recipientes cerrados), a 22°C, y las lesiones fueron registradas fotográficamente a intervalos de 24 horas después de la inoculación. En cada caso se realizaron al menos 30 réplicas experimentales. En el caso de las infecciones en hojas de tomate, tabaco y vid, se calculó la velocidad de infección considerada como el incremento del radio de la lesión en milímetros por día. Para ello, la forma de las lesiones se aproximó a una elipse, se midió la longitud de ambos radios, y se calculó su media geométrica, de manera que se obtuvo el radio de un círculo hipotético con un área equivalente a la elipse. A partir de los radios medidos de esta manera a diferentes días para cada infección individual, se calculó una recta de regresión cuya pendiente es la velocidad de expansión de la lesión (mm/día). Finalmente, se calculó la media y la desviación estándar para el conjunto de réplicas experimentales.

Ensayos de la fuerza de adhesión de *B. cinerea* al tejido vegetal

Para medir la fuerza con la que *B. cinerea* se adhiere al tejido vegetal, se colocaron porciones de agar (cubos de 0,5 cm de lado), sobre la superficie de hojas de tabaco y vid, y las inoculaciones se incubaron durante los tiempos indicados en condiciones de alta humedad a 22°C. Transcurrido este tiempo, las hojas se lavaron con agua, en agitación lenta durante 5 minutos. Finalmente se contó el número de porciones de agar que se mantuvieron adheridas a la hoja para cada cepa como una medida de la capacidad de adhesión.

Para obtener una medida cuantitativa de la fuerza de adhesión, se prepararon inoculaciones siguiendo el protocolo descrito en el párrafo anterior. Tras el tiempo de incubación indicado en cada caso, se midió la fuerza con la que la porción de agar con micelio estaba adherida a la hoja con un dinamómetro (Ventus, 0,1 N). Para ello, se fijó el dinamómetro a un soporte, y se acopló a su extremo una aguja curva en la que se insertó el bloque de agar en cada ensayo y se tiró lentamente de él. La fuerza de adhesión indicada por el dinamómetro justo en el momento en que el agar se desprendía de la hoja, se registró para al menos 10 porciones de agar en cada condición ensayada.

Microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para observar al microscopio óptico la cantidad de ECM producida por las diferentes cepas de *B. cinerea*, se llevó a cabo una tinción con tinta china. Para ello, se incubaron porciones de micelio con tinta china durante 5 minutos sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos, se presionó ligeramente y las muestras fueron entonces examinadas directamente al microscopio óptico (Olympus BX-50).

Con el objetivo de determinar posibles modificaciones de la pared celular, se llevó a cabo una tinción con el colorante fluorescente *Calcofluor White* (CW) (Sigma F3543). La tinción se llevó a cabo durante 5 minutos, añadiendo una gota de disolución de CW (CW 0,05%, KOH 3,75%, glicerol 4,35%), sobre una porción de micelio colocada sobre un portaobjetos. A continuación, las muestras se lavaron dos veces con la misma disolución, pero esta vez sin colorante, y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Olympus BX-50, equipado con un filtro U-MWIB.

Para obtener las imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), se colocaron porciones de micelio sobre filtros MF-Millipore (0,22 μm), en placas de Petri con medio MB. Dos días después de la inoculación, se recogieron los filtros con el micelio crecido y se fijaron con vapores de glutaraldehído al 25% en una campana de vacío durante 24 horas. A continuación, se procedió a la deshidratación de las muestras, colocando un recipiente con sílica gel (Merck 01925, tamaño de partícula 1-3mm) dentro de la campana de vacío durante 5 días. Una vez desecadas, las muestras fueron recubiertas con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300.

Ensayos de penetración en epidermis de cebolla

Para estudiar la capacidad de penetración de las diferentes cepas de *B. cinerea* a través del tejido vegetal, se cortaron pequeños trozos de epidermis de cebolla y se colocaron en portaobjetos con la cara interior (hidrofóbica) hacia arriba. A continuación, fueron inoculadas con un pequeño trozo de micelio crecido durante 4 días en caldo YGG y se añadió una gota del mismo medio. Las muestras se incubaron en una cámara húmeda hasta observar claramente que el micelio estaba creciendo sobre la superficie vegetal (1 día para la cepa silvestre, y 2-4 días para las cepas mutantes de los genes *bcpmt*). Seguidamente, las muestras se tiñeron con una disolución de azul tripán al 0,05% en lactofenol, durante 5 min. Después de eliminar el exceso de colorante con agua, la epidermis se examinó bajo luz visible o UV (filtro de U-MWIB) con el microscopio de fluorescencia. Con el fin analizar la penetración mediante SEM, las muestras fueron tratadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

Ensayo de la actividad necrotizante y de inhibición del crecimiento de plántulas de tabaco

Se creció *B. cinerea* en medio YGG-Low, inoculado con $3 \cdot 10^6$ conidias/ml, durante 16 horas. Se recogió el sobrenadante por filtración a través de cuatro capas de papel de filtro y, finalmente, se centrifugó (20 min, 16 000xg), para eliminar posibles restos de micelio.

El sobrenadante fue utilizado para infiltrar hojas adultas de *Nicotiana tabacum* (cv. Havana) con aproximadamente 50 µl en el envés de las hojas, usando una jeringa de 1 ml sin aguja para no producir herida. Para favorecer la entrada de la disolución en el tejido, las plantas fueron previamente mantenidas en condiciones que favorecían el exceso de transpiración. Los efectos de la infiltración fueron registrados fotográficamente a lo largo del tiempo.

Para realizar los ensayos de inhibición del crecimiento de plántulas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, cv. Havana), las plántulas se obtuvieron previa esterilización de las semillas con gas cloro [132] y germinación en placas de Petri con medio Murashige-Skoog (Pronadisa, Spain) a la mitad de concentración indicada por el fabricante, durante 20-30 días en el fitotrón. Transcurrido este tiempo, se transfirió cada una de estas plántulas en sendos pocillos de una placa de microtítulo de 96 pocillos, conteniendo 200 µl de cada sobrenadante y se mantuvieron durante 6-8 días en un fitotrón bajo condiciones de humedad, temperatura y fotoperiodo controlados. Al finalizar el tiempo de incubación, el aspecto de las plántulas fue registrado fotográficamente y se midió el peso fresco mediante una balanza de precisión.

Extracción de DNA genómico de *B. cinerea*

El DNA genómico de *B. cinerea* se obtuvo siguiendo el método desarrollado previamente en nuestro laboratorio [133], modificación del método clásico de preparación de DNA genómico de hongos de Möller *et al.* [134]. Para ello, se inoculó una placa de Petri que contenía 20 ml de medio YGG, o bien con conidias o bien con una porción de agar con

micelio, y se incubó durante tres días a 20°C en agitación lenta. Al cabo de este tiempo, el micelio fue recogido mediante filtración y, aproximadamente 60 mg del mismo, fueron transferidos a un tubo Eppendorf conteniendo 0,7g de arena de mar de grano fino (Panreac, 211160). A continuación, se añadieron 300 µl de tampón TE 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM) y se disgregó el micelio durante 30 segundos haciendo uso de una punta azul de pipeta sellada en el extremo, a modo de mortero. La misma punta fue luego acoplada a un taladro común (500 W, 2800 rpm) y usada para homogeneizar la muestra durante 1 minuto. Luego se añadieron otros 200 µl de tampón TE 10X, junto con 50 µl de SDS al 20% y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml), y se incubó el homogeneizado a 60°C durante 30 min. A continuación se agujeró el fondo del tubo con una aguja al rojo vivo, se colocó este sobre otro tubo sin tapa y se centrifugó durante 5 minutos a 4500 x g. El filtrado se recogió y se transfirió a un nuevo tubo, donde se añadió NaCl a una concentración final de 1,4 M y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) a una concentración final del 1,2 %. La muestra se incubó a 65°C durante 10 min, se añadió un volumen de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1), se mezcló suavemente y se incubó a 0°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 10 segundos, y 800 µl del sobrenadante fueron transferidos a un nuevo tubo, para centrifugar nuevamente a 15500 x g durante 10 min a 4°C. 650 µl de la fase acuosa se transfirieron a un nuevo tubo y se añadió acetato amónico a una concentración final de 1,7 M. La muestra se mezcló suavemente y se congeló a -80°C durante, al menos, 30 min. Tras este tiempo, se dejó descongelar y se centrifugó a 15500 x g durante 10 min a 4°C. Seguidamente, se transfirieron 900 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se incubaron con 2 µl de RNasa (10 µg/µl) durante 15 min a 37°C. Finalmente, para precipitar el DNA genómico, se añadieron 0,55 volúmenes de isopropanol e, inmediatamente, se centrifugó durante 5 min. El sobrenadante fue decantado cuidadosamente y el sedimento se lavó dos veces, con etanol al 70%. Para eliminar completamente los restos de etanol, se dejó secar el tubo abierto a 37°C durante unos minutos y, finalmente, el sedimento fue resuspendido en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

Extracción y purificación de DNA plasmídico de *E. coli*

Para la extracción de plásmidos de *E. coli* se usó, de manera rutinaria, el kit Quick Clean 5M Miniprep (GenScript, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando se requería una pequeña cantidad de DNA plasmídico y se necesitaba analizar un elevado número de muestras, por ejemplo para realizar rastreos mediante digestión con enzimas de restricción en busca de clones positivos en los clonajes realizados en vectores plasmídicos, se llevó a cabo una extracción rápida denominada TENS. Para ello, se centrifugó 1,5 ml de un cultivo bacteriano crecido durante toda una noche a 37°C, se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en el líquido residual. Se añadieron 300 µl de disolución TENS (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaOH 0,1 M, SDS 0,5%), y se mezcló por inversión del tubo. A continuación, se añadieron 150 µl de acetato sódico 3 M ajustado con ácido acético a pH 5,2, y se mezcló nuevamente por inversión. Los tubos se centrifugaron durante 2 min a 15500 x g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo en el que se mezcló con 0,9 ml de etanol absoluto a -20°C para

precipitar el DNA plasmídico. Finalmente, se centrifugó 5 min, el sedimento fue lavado con etanol al 70% y el DNA se resuspendió en 20 μ l de tampón TE.

Cuando se requería una gran cantidad de DNA plasmídico, por ejemplo para llevar a cabo la transformación de *B. cinerea*, se realizó una purificación a gran escala siguiendo una modificación del método descrito por Sambrook *et al.* [135]. Para ello, se resuspendió el sedimento bacteriano proveniente de 200 ml de cultivo en 4,5 ml de GTE (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM), y se añadieron 9 ml de una disolución de NaOH 0,2 M y SDS al 1%. Se neutralizó a continuación con 6,75 ml de acetato potásico 5 M ajustado a pH 4,8 con ácido acético y se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos para eliminar los restos bacterianos. Tras filtrar el sobrenadante, se mezcló con 12 ml de isopropanol y después de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente, el DNA precipitado fue recogido por centrifugación a 13000 x g durante 10 minutos. El sedimento se incubó con 1 ml de agua conteniendo 100 μ g de RNasa durante 10 minutos, y se fenolizó con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico. Finalmente, se precipitó el DNA plasmídico añadiendo 1/10 volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C, y se centrifugó a 13000 x g durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados del sedimento con etanol al 70% y el sedimento se resuspendió en 100 μ l de agua, conservándose a -20°C, hasta su utilización.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis de DNA en geles de agarosa se realizó en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM), usando geles de agarosa a una concentración entre el 0,5 y el 1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar las bandas de DNA, se añadieron 5 μ l del colorante fluorescente REALSAFE Nucleic Acid Staining Solution (REAL, Valencia, España) por cada 100 ml de gel. Las muestras objeto de análisis se mezclaron con 1/10 volumen de tampón de carga 10x (azul de bromofenol al 0,25%, EDTA 10 mM, sacarosa 40%) y las electroforesis se desarrollaron a 100 V. El tamaño de los fragmentos se determinó comparando su patrón de migración con el de marcadores de tamaño conocido (DNA Molecular Weight Marker XVII, Roche).

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de electroforesis de agarosa, se utilizó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery kit (Zymo Research, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Transferencia Southern

La transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nailon cargadas positivamente con tamaño de poro de 0,45 μ m (Roche, Ref. 11417240001), se realizó por capilaridad durante toda la noche, utilizando como disolución de transferencia SSC 10x (citrato sódico 0,34 M pH 7, NaCl 3 M). Las membranas se prehibridaron a 42°C durante 30 minutos con tampón de hibridación (SSC 5x, N-lauril-sarcosina 0,1%, SDS 0,02%, formamida 40%, reactivo de bloqueo Blocking Reagent Roche, al 1,6%) y, posteriormente,

se hibridaron toda la noche a la misma temperatura con disolución de hibridación conteniendo la sonda de DNA, marcada con digoxigenina usando el kit DIG DNA Labeling (Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. La visualización de las bandas de hibridación se realizó utilizando el anticuerpo secundario anti-DIG-AP (Roche, Suiza) a una dilución 1/10000, y su detección con el sustrato CDP-Star (Roche, Suiza), cuya señal quimioluminiscente fue captada mediante el sistema de ChemiDoc (Bio-Rad, EE.UU.).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Las reacciones de amplificación por PCR fueron realizadas utilizando la DNA polimerasa con actividad correctora, *Phusion* DNA polymerase (Finnzymes, Keilaranta, Finlandia), si los productos de las reacciones iban a ser clonados posteriormente. En el resto de los casos, la polimerasa utilizada fue *Taq* DNA polimerase (GenScript, EE.UU.). En todos los casos se desarrollaron reacciones de 25 – 50 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante. El termociclador utilizado fue MyCycler™ Thermal Cycler (Bio Rad).

Los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando el kit de purificación Quickclean PCR purification kit (Genscript, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los cebadores utilizados en este trabajo (Invitrogen, Escocia) y las secuencias de nucleótidos de cada uno de ellos se indican en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' – 3')
Nour-Hyg-FOR	CTCTAGAGCCGCATTCCC
Nour-Hyg-REV	TAAGCTTGATATCTGTTAGTAATC
Pmt1-5'-For	CCACAGCAACTCGTTCGC
Pmt1-5'-Rev	GCCCGAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGTACTTCAGATGAAAATCG
Pmt1-3'-For	GATGATTACTAACAGATATCAAGCTTATCACAGGAGACAGTACGG
Pmt1-3'-Rev	AGCCAGCCATAACTTGGC
Pmt1-Nest- For	AAGATTGTTACAGCAAGC
Pmt1-Nest- Rev	CGTTTGCTATGATACTCG
Pmt2-5'- For	AAAGAGTGGCAATTTGGC
Pmt2-5'- Rev	GCCCGAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGCTCGAATGTCTGCGAGG
Pmt2-3'- For	GATGATTACTAACAGATATCAAGCTTACTTAACCACTGCTTCCG
Pmt2-3'- Rev	AACTGGGTACAGTCCAGC
Pmt2-Nest- For	AAGTAGACTACTATGCAAGG
Pmt2-Nest- Rev	TTAAGCTCGTCATACCCG
Pmt4-5'- For	GGCTAATTTTAGCCTCCCGCCGAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGAAGAAATCCTAAGGGACG
Pmt4-3'- Rev	GATGATTACTAACAGATATCAAGCTTATCGAAGTAGTATTCAAGG
Pmt4-3'- Rev	TGTCTTGCTAAACCCACG
Pmt4-Nest- For	AATGTGAATGTTGATCTCG
Pmt4-Nest- Rev	AGTCTTTTCTAACCTTCC
Hyg-RW	GAGTTCAGCCATGGATCG
pmt1-FW	GGAAGAGGTTATTTGCTGC

Nombre	Secuencia (5' – 3')
pmt1-RV	CATCGAATACCACTGC
pmt2-FW	GCTCGTAGGAGAATTGACG
pmt2-RV	CGCACCAGAAGCAACAGC
pmt4-FW	CGGAGCAGTTGTCAGAGC
pmt4-RV	AACTGAACCACCTTTCCG
ActA-FW	GGTAACATTGTTATGTCTGG
ActA-RV	CTTGACCTTCATCGACG
Pmt1_RT_FW	AAAAGTGCACACCGCGC
Pmt1_RT_RV	TCCATCACCGTCTCCTGG
Pmt2_RT_FW	GGAACGAGAAATTGCCTGC
Pmt2_RT_RV	GCACAAGTGCCTGTTCCG
Pmt4_RT_FW	GATAACCGTACCCGATCCC
Pmt4_RT_RV2	CAAGAAAAGTTGACGGCCC
pCRPOGG-FW	TCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGCAATTCCTCACTCTCG
pCRPOGG-RV	TACTTACCTCACCCCTTGAAACCATGGTGAACCCGGGATGATG
pCRPOGGST-FW	TGGGAATGGATGAACTTTACAAAGCGACCACTTCCGCTGCCGTTG
pCRPOGGST-RV	TCATACATCTTATCTACATACGCTATCCGGCAGCTGTGCTGCC
CAMBIA-FW	TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAGAATTTCGAGCTCGGTACCCG
CAMBIA-RV	CCAGCCAGCCAACAGCTC
NDN-Cambia-FW	TGCCGGTCGGGAGCTGTTGGCTGGCTGGTACTGGGAAAACCTGGC
NDN-Cambia-RV	TGTTTACACCACAATATATCCTGCCACAAATAGGGGTTCCGCGC
NDN-FW	TTTGTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAGCCGATTCATTAATGCAGC
NDN-RV	CTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTACTTCACGACAATAGCACGGAC
CMYC-FW	TCACATCACAATCGATCCAACCATGGAACAAAACTCATCTCAG
CMYC-RV	TAATCATACATCTTATCTACATACGAAGCTTTCAATGATGATGATGATGATGG
EPG1-FW	TCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGGTTCAACTTCTCTCAATGGC
EPG1-CMIC-RV	CCTCTCTGAGATGAGTTTTTGTTCACACTTGACACCAGATGGGAG
IGE-FW	TCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGTTCTCCAAGACCTTCATCG
IGE-CMIC-RV	CCTCTCTGAGATGAGTTTTTGTTCAGCGTACTCCCAAGCGGAAGGGC
SUN-FW	TCCATCACATCACAATCGATCCAACCATGAAGTTCACCCAGTTTC
SUN-CMIC-RV	CCTCTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGATGAGAAGACGTATGTAGCG
NOUR-RV-check	CAGGCGCTCTACATGAGC
NR-FW-check	AGGATGGTTTGGTTTCGG
NR-RV-check	GTCTGAGATAGCCCTACGG
NR-MBD-SMA	TCCCCGGGTTTACCATGATCGGGTCCA
NR-MBD-BAM	CGGGATCCACCTCCTTTAAGCGCTTT

* Las características de cada uno de estos cebadores, así como los detalles de su uso se describen en la **Publicación 2 (Fig. S3 y Tabla S2)** y en la **Publicación 3 (Archivo Adicional 2)**.

PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR)

Los estudios de la expresión de los genes *bcpmt* se llevaron a cabo mediante Q-RT-PCR. El micelio de *B. cinerea* utilizado para la extracción de RNA fue preparado como se explica en [61]. La extracción de RNA total a partir del micelio de *B. cinerea*, y a partir de

hojas de tomate infectadas con el hongo, se llevó a cabo con el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El posible DNA genómico contaminante presente en las muestras fue eliminado mediante el tratamiento con DNaseI libre de RNasa (Roche, Suiza).

La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA total, utilizando el kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, EE.UU.). Para las reacciones de PCR se usó el sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (Bio-Rad, EE.UU.) y la mezcla de ensayo iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EE.UU.), que contiene todos los reactivos necesarios para la PCR además de la sonda fluorescente SYBRgreen. Como gen de referencia se amplificó el gen *actA* (actina, código de acceso en el genoma de *B. cinerea*: BC1G_08198.1) de *B. cinerea*, con el fin de normalizar el nivel de la expresión génica entre todas las muestras. Cuando fue posible, los cebadores utilizados para Q-RT-PCR fueron diseñados de manera que uno de los dos sitios de unión de cebadores estuviera en la unión entre dos exones, para evitar así la amplificación de DNA genómico. Los cebadores utilizados para analizar la expresión de cada gen *bcpmt* se detallan en la **Publicación 2 (Fig. S3 y Tabla S2)**, y su secuencia en la **Tabla 1**.

Las reacciones de amplificación se analizaron finalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con la finalidad de verificar la amplificación de un único fragmento en cada reacción de PCR. Las cantidades relativas de mRNA se calcularon por el método $\Delta\Delta C_t$ a partir de tres determinaciones independientes del ciclo umbral (C_t), y usando en cada caso la muestra control (tratamiento a tiempo 0) como calibrador [136,137]. La desviación de la media para cada muestra, se calculó a partir de la desviación estándar (SD) en el valor $\Delta\Delta C_t$, utilizando la expresión $2^{-(\Delta\Delta C_t \pm SD)}$, lo que resulta en barras de error no simétricas en torno al valor medio cuando se representa gráficamente.

Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* XL1-Blue se realizó por choque térmico siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.* [135], con el que se obtuvo habitualmente una eficiencia de transformación de 10^8 colonias/µg de DNA plasmídico.

Para la preparación de células competentes de *E. coli*, se inocularon 5 ml de medio LB suplementado con tetraciclina (10 µg/ml) con una colonia de la cepa de *E. coli* XL1-Blue previamente crecida en una placa de LB-agar con tetraciclina, y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se inocularon 200 ml de medio SOB (triptona al 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,01 M, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) con 0,4 ml del cultivo anterior y se incubó a 18°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4-0,6 a 600 nm. A continuación, el cultivo se incubó en un baño de hielo durante 5 min, y las células se recogieron por centrifugación a 500 x g durante 10 min. El sedimento celular fue resuspendido en 40 ml de tampón TB (Hepes-KOH 10 mM pH 6,7, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 55 mM) a 0°C, e incubado durante 10 min en hielo. Se recogieron de nuevo las células por centrifugación y, esta vez, se resuspendieron en 16 ml de TB frío, al que se añadió 1,2 ml de DMSO (dimetilsulfoxido). Finalmente, las células competentes se

distribuyeron en alícuotas de 0,1 ml, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Para la transformación por choque térmico, se descongeló una alícuota de células competentes en un baño de hielo, se añadió el DNA plasmídico en un volumen menor o igual a 10 µl, y la mezcla se incubó en hielo durante 10 min. La mezcla se incubó entonces 90 segundos a 42°C, para rápidamente añadir 1 ml de medio LB. Finalmente, se incubó el cultivo durante una hora a 37°C y se sembraron las células en placas de LB-agar con los antibióticos adecuados para su selección.

Yeast recombinational cloning (YRC)

Esta técnica permite el clonaje simultáneo de múltiples fragmentos de DNA en un mismo vector. Los diferentes fragmentos que conforman la construcción final son amplificados mediante PCR, añadiendo extremos solapantes de 20-25 pb que guían el ensamblaje en el orden y orientación adecuados. En este trabajo se usaron los vectores pNDN-OGG y pCBN para llevar a cabo esta estrategia, que contienen el casete de expresión del gen *URA3*, ambos linearizados en el sitio de restricción *Nco1* (véase más abajo). Los fragmentos amplificados por PCR y el vector linearizado son luego co-transformados en la cepa de *S. cerevisiae* FGSC 9721 (FY 834), auxótrofa para uracilo. La maquinaria de recombinación de la levadura lleva a cabo la correcta recombinación homóloga de dichos fragmentos (mediante los extremos homólogos solapantes,) para generar el plásmido final y las colonias que portan el plásmido son seleccionadas en un medio sin uracilo. Los experimentos de YRC se desarrollaron tal como indica J. Schumacher y colaboradores [130], con ciertas modificaciones. Una colonia de *S. cerevisiae* FGSC 9721 (FY 834) se utilizó para inocular 5 ml de medio YPD y el cultivo se dejó crecer O/N a 30°C y una agitación de 200 rpm. Al día siguiente, 3 ml de este preinóculo se utilizaron para inocular 50 ml de medio YPD y el cultivo se dejó crecer (30°C y 200 rpm) hasta alcanzar una Abs_{600} de 0,6 - 0,7. Las células fueron centrifugadas (10 min, 3000 x g) y lavadas con 50 ml de agua, para ser recogidas de nuevo por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de LiOAc 100 mM pH 7.5. La suspensión se centrifugó nuevamente (10 min, 1400 x g) y las levaduras fueron resuspendidas finalmente en 400 µl de LiOAc 100 mM pH 7.5.

Para llevar a cabo la transformación, 50 µl de la suspensión de células se mezclaron con 150 ng del vector digerido, 5 µl (50-100 ng) de cada fragmento amplificado por PCR, 250 µl de una disolución de PEG (MW 3350) al 50%, 36 µl de LiOAc 1M y 10 µl de una disolución de DNA de esperma de salmón a 10 mg/ml. Se añadió agua hasta un volumen final de 400 µl y se mezcló bien con el vortex. Las muestras se incubaron 30 minutos a 30°C y otros 30 minutos a 42°C. Los tubos se centrifugaron (30 segundos, 15000 x g) y se eliminó el sobrenadante, dejando en el fondo del tubo unos 50 µl en los que se resuspendieron las células. La suspensión resultante fue extendida sobre una placa con medio SD sin uracilo (2% glucosa, 0,7% Difco-“*Yeast Nitrogen Base whitout Amino acids*”, 0,08% Clontech-“*Ura DO supplement*”, pH 5,8), y las placas se incubaron 2-3 días a 30°C. Finalmente, se añadió 1 ml de agua a la placa, se recogieron todas las colonias raspando con un asa de

siembra y se pasaron a un Eppendorf. Las células fueron centrifugadas (30 segundos, 15000 x g) y se realizó la extracción de DNA plasmídico utilizando el Kit E.Z.N.A. Yeast Plasmid Kit (OMEGA bio-tek), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de esta extracción fue utilizado directamente para transformar *E. coli* por choque térmico.

Transformación de protoplastos de *B. cinerea*

La transformación de *B. cinerea* se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de Hamada *et al.* [138], modificado por van Kan [57]. Para la obtención de protoplastos del hongo, se inocularon 300 ml de caldo de extracto de malta (*Bacto malt extract*, DIFCO) al 1% con una suspensión de conidias de la cepa de *Botrytis cinerea* a transformar, a una concentración final de $1,5 \times 10^6$ conidias/ml. El cultivo se incubó durante 16-20 horas a 20°C con una agitación de 180 rpm y se centrifugó (10 min; 1000 x g) para recoger las conidias germinadas, que fueron lavadas 2 veces con 50 ml de disolución KC (KCl 0,6 M, CaCl₂ 50 mM). Seguidamente, las conidias fueron resuspendidas en 50 ml de la misma disolución, esta vez suplementada con la mezcla de enzimas líticas *Lysing enzymes from Trichoderma Harzianum* (L-1412, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 7,5 mg/ml. La suspensión fue incubada hasta un máximo de 2 horas a 20°C en agitación (140 rpm), comprobando la formación de protoplastos cada 30 min bajo el microscopio. Cuando el número de protoplastos fue adecuado, se filtró la suspensión para eliminar el micelio sin digerir, en primer lugar a través de tejido de nailon (Buisine, Clermont, Francia) de 25 µm y, posteriormente, de 10 µm. El filtrado se centrifugó entonces (10 min, 100 x g) para sedimentar los protoplastos obtenidos, que fueron lavados con 50 ml de disolución KC y resuspendidos en esta misma disolución a una concentración final de 10^8 protoplastos/ml.

Para la transformación de los protoplastos de *B. cinerea*, 1-5 µg de la muestra de DNA con el que se deseaba transformar fueron precipitados con acetato potásico/etanol, y el sedimento de DNA fue resuspendido en 95 µl de disolución KC. Tras incubar durante 5 minutos en hielo, se añadió 5 µl de espermidina (Sigma-Aldrich) 5 mM y se volvió a incubar otros 5 minutos en hielo, para añadir entonces 100 µl de la suspensión de protoplastos, incubando de nuevo la mezcla 5 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 100 µl de una disolución al 25% de polietilenglicol 3350 (Sigma-Aldrich) en Tris-HCl 10 mM pH 7,4, CaCl₂ 50 mM y la mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente, para añadir entonces otros 500 µl de la misma disolución de polietilenglicol, incubar 10 min a temperatura ambiente y mezclar, finalmente, con 200 µl de disolución KC. Cada mitad de la suspensión de protoplastos se mezcló con 100 ml de medio SH-agar precalentado a 46°C, para dispensar inmediatamente en placas de Petri. Tras 20 horas de incubación a 20°C, se cubrió las placas con un volumen de aproximadamente 10 ml de SH-agar /placa suplementado con 100 µg/ml de higromicina (Duchefa, Holanda) o nourseotricina (WERNER Bioagents, Alemania), según los casos, y se incubaron a 20°C durante 4 o 5 días más, hasta observar la aparición de colonias transformantes resistentes al antibiótico. Estas colonias fueron transferidas a placas de MEA suplementadas con 100 µg/ml del antibiótico requerido, y se incubaron a 20°C durante 2-3 días.

Dado que las células de *B. cinerea* son multinucleadas, siempre fue necesario obtener cepas homocariontes a partir de los transformantes originales, en las que todos los núcleos fuesen idénticos y contuviesen el DNA transformante. Para aislar homocariontes, las cepas transformantes fueron transferidas a placas de tomate-agar para que produjeran conidias en abundancia, se aislaron conidias como se ha descrito anteriormente y se sembraron por agotamiento en placas de MEA conteniendo 100 µg/ml del antibiótico adecuado para su selección. Las placas se incubaron a 20°C durante 12 horas, y con ayuda de un microscopio óptico invertido y un bisturí estéril se recortaron de 10-20 bloques de agar conteniendo 1 única conidia germinada para ser transferidos a placas de MEA conteniendo 100 µg/ml de antibiótico. Los nuevos cultivos se incubaron a 20°C durante 2-3 días, para finalmente realizar una extracción de DNA genómico y analizar el carácter homocarionte de las conidias seleccionadas mediante PCR y/o transferencia southern, tal como se ha descrito anteriormente.

Plásmidos utilizados para la generación de nuevas construcciones de DNA

pLOB1: plásmido de 5286 pb, cedido por el Dr. J.A.L. van Kan (Wageningen Agricultural University, Holanda). Deriva del vector pUC18 y confiere resistencia a higromicina al contener el gen *hph* de *E. coli*, que codifica para la higromicina fosfotransferasa (código de acceso del GenBank AJ439603) [138]. Este plásmido, además confiere resistencia a ampicilina como marcador selectivo en procariotas.

pPICZ α A: plásmido de 3593 pb, incluido en el kit *EasySelect Pichia expression kit* (Invitrogen, EE.UU.). Vector de expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* bajo el control del promotor del gen de la alcohol oxidasa (*AOX-1*) de *P. pastoris*. Contiene secuencias que codifican el factor α de secreción de *S. cerevisiae*, que dirige a las proteínas heterólogas al medio extracelular, el epítipo *c-myc* y una cola de 6 residuos de histidina (6xHis), útiles como marcadores o tags de las proteínas expresadas. Además, contiene el gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* que aporta resistencia a la zeocina, bajo el control del promotor *EM7* de *E. coli* y del promotor *TEF1* de *Pichia*, de manera que la misma selección se puede usar en la levadura y en *E. coli*.

pNR2: plásmido de 5200 pb cedido por el Dr. J.A.L. van Kan (Wageningen Agricultural University, Holanda). Este plásmido confiere resistencia a nourseotricina, puesto que contiene gen *nat1* de *Streptomyces noursei*, que codifica para la nourseotricina acetil transferasa [58].

pOptGFP: plásmido de 6576 pb cedido por el Dr. Matthias Hahn (Technischen Universität Kaiserslautern, Alemania) que contiene el casete de expresión para el gen *eGFP* optimizado para la expresión en *B. cinerea* [139], bajo el control del promotor *oliC* y el terminador del gen *niaD* de la nitrato reductasa. Contiene también el casete de resistencia para la higromicina del plásmido pLOB1.

pNDN-OGG: plásmido de 10626 pb, cedido por la Dra. J. Schumacher, que se describe en detalle en [130]. Este plásmido deriva del *Yeast shuttle vector* pRS426. El plásmido pNDN-OGG contiene el gen URA3, que permite ser utilizado como marcador en la selección de los correspondientes transformantes de *S. cerevisiae* FY 834 en un medio sin uracilo. Además, contiene dos fragmentos homólogos a las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *niaD* de *B. cinerea*, que codifica para la enzima nitrato reductasa (código de acceso en el genoma de *B. cinerea*: BC1G_09772.1). Las regiones flanqueantes 5' y 3' guían la integración del DNA localizado entre ellas hacia este locus en el genoma. El fragmento 3' corresponde al terminador del gen *niaD*, que a su vez en el plásmido se utiliza como terminador del casete de resistencia a nourseotricina, compuesto por el gen *nat1* bajo el control del promotor *trpC* de *A. nidulans*. El vector también contiene un casete de expresión para el gen *eGFP* bajo el control del promotor *oliC* y el terminador *gluc* de *B. cinerea*.

pCRP-GFP: plásmido de 7062 pb, derivado del plásmido pOptGFP. Su construcción se describe en detalle en [72]. Contiene la fusión del gen *bcspl1* de *B. cinerea*, con su secuencia señal para la secreción al medio extracelular y los epítomos *c-myc* y 6xHis, en su extremo carboxilo, con el gen *eGFP*. La expresión del gen de fusión está controlada por el promotor *OliC* de *A. nidulans* y el terminador del gen *niaD* de *B. cinerea*.

pBHT2: plásmido de 8958 pb, derivado del plásmido pCAMBIA1300, cuya construcción se describe en detalle en [140]. Confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y en *Agrobacterium tumefaciens* y contiene las secuencias necesarias para llevar a cabo la transformación mediada por *A. tumefaciens*.

Nuevas construcciones de DNA y cepas de *B. cinerea* generadas en este trabajo

1. Interrupción dirigida de los genes *bcpmt1*, *bcpmt2* y *bcpmt4*: La estrategia utilizada para la interrupción de los tres genes *bcpmt* se describe en la **Publicación 2 (Fig. S3)**. Las construcciones de DNA necesarias se generaron mediante la técnica de *Double Joint-PCR* (DJ-PCR), siguiendo un método descrito previamente [141,142], con algunas modificaciones. En primer lugar, un fragmento de 2606 pb, que contiene el casete de resistencia a higromicina, fue amplificado a partir del plásmido pLOB1 utilizando la pareja de cebadores Nour-Hyg-FOR / Nour-Hyg-REV. En segundo lugar, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 500 pb de cada uno de los tres genes *bcpmt* a partir de DNA genómico de *B. cinerea* B05.10, que fueron utilizados como regiones flanqueantes del marcador de resistencia en cada una de las construcciones destinadas a la interrupción de los tres genes. En el caso del gen *bcpmt1*, se utilizó la pareja de cebadores Pmt1-5'-For / Pmt1-5'-Rev para amplificar la región flanqueante en su extremo 5', y la pareja Pmt1-3'-For / Pmt1-3'-Rev para amplificar la región flanqueante en su extremo 3'. En el caso del gen *bcpmt2*, se utilizaron las parejas de cebadores Pmt2-5'-For / Pmt2-5'-Rev y Pmt2-3'-For / Pmt2-3'-Rev para amplificar respectivamente ambas regiones flanqueantes de dicho gen. Y, en el caso del gen *bcpmt4*, Pmt4-5'-For / Pmt4-5'-Rev para la región 5' y Pmt4-3'-For / Pmt4-3'-Rev para la región 3'. Los cebadores 5'-Rev y 3'-For para cada gen *bcpmt* fueron

diseñados de manera que incluyen colas homólogas a los extremos del casete de resistencia a higromicina, necesarias para generar los casetes de interrupción de cada uno de los genes *bcpmt* mediante DJ-PCR.

Una vez amplificados todos los fragmentos, para la obtención de cada una de las tres construcciones, se utilizaron cantidades equimolares del casete de resistencia a higromicina y de las dos regiones flanqueantes de cada gen para fusionarlas mediante DJ-PCR [141,142]. Finalmente, para obtener gran cantidad de cada uno de los casetes de interrupción, éstos fueron amplificados utilizando como molde 2 µl del producto de la DJ-PCR anterior, y las parejas de cebadores Pmt1-Nest-FOR / Pmt1-Nest-REV, Pmt2-Nest-FOR / Pmt2-Nest-REV o Pmt4-Nest-FOR / Pmt4-Nest-REV, respectivamente para los genes *bcpmt1*, *bcpmt2* y *bcpmt4*. Las secuencias de todos los cebadores utilizados en este apartado se encuentran descritas en la **Tabla 1**.

Los productos de estas amplificaciones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, fueron purificados y comprobadas las construcciones resultantes mediante digestión con enzimas de restricción (**Publicación 2, Fig. S3A**). 5 µg de cada uno de ellos fueron utilizados para transformar protoplastos de *B. cinerea*, tal como se ha descrito anteriormente, con el fin de interrumpir cada uno de los tres genes *bcpmt*. De los transformantes obtenidos, se purificaron homocariontes y, finalmente, para asegurar la correcta interrupción de estos genes y la ausencia de copias adicionales del DNA transformante, se aisló DNA y las muestras fueron analizadas mediante transferencia southern y PCR (**Publicación 2, Fig. S3B**). De esta manera se obtuvieron tres nuevas cepas de *B. cinerea*, que se han denominado $\Delta bcpmt1$, $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$.

2. Construcción de nuevos plásmidos y expresión de proteínas recombinantes en *B. cinerea*:

pNDN-GFP: Este plásmido de 11118 pb, se utilizó para expresar en *B. cinerea* una proteína de fusión, compuesta por la proteína reportera GFP, la proteína fitotóxica de *B. cinerea* BcSpl1 [42,43,72] y los epítomos *c-myc* y 6xHis. Para su construcción, el plásmido pNDN-OGG [130] fue linearizado en el sitio *NcoI* y utilizado como vector para introducir, mediante YRC, un fragmento de DNA amplificado a partir del plásmido pCRP-GFP con la pareja de cebadores CRPOGG-FW / CRPOGG-RV. Este fragmento de DNA contiene i) la ORF completa del gen *bcspl1* de *B. cinerea* [42] sin el codón de terminación, ii) los epítomos *c-myc* y 6xHis (procedentes originalmente del plásmido PICZαA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y iii) el gen *eGFP* procedente del plásmido pOptGFP [139].

pNDN-GFP-ST: Este plásmido de 11355 pb deriva del plásmido pNDN-GFP. Se utilizó para expresar en *B. cinerea* una nueva proteína de fusión que incorpora, además de lo descrito anteriormente para el plásmido pNDN-GFP, una región rica en Ser/Thr contenida en la proteína Cel5A de *B. cinerea*, que funciona presumiblemente como sustrato para la O-glicosilación [55]. Para la construcción de pNDN-GFP-ST, el plásmido pNDN-GFP fue linearizado en su sitio *NotI* y se utilizó como vector para introducir mediante YRC un fragmento de 299 pb, que contiene esta región rica en Ser/Thr, obtenido por PCR a partir de

DNA genómico de *B. cinerea* B05.10 con los cebadores CRPOGGST-FW / CRPOGGST-RV.

pCBN: Plásmido de 13797 pb, que se construyó como un vector intermedio para la obtención de otros tres plásmidos que se citan a continuación (pCBN-EPG, pCBN-IGE y pCBN-SUN). Se construyó mediante YRC, fusionando los tres fragmentos de DNA siguientes: i) un fragmento de 6583 pb amplificado a partir del plásmido pBHT2 [140], con los cebadores CAMBIA-FW / CAMBIA-RV, ii) un fragmento de 3452 pb amplificado a partir del plásmido pNDN-OGG [130], con los cebadores NDN-CAMBIA-FW / NDN-CAMBIA-RV, y digerido con *EcoRI* and *HindIII*, y iii) un fragmento de 4175 pb, también amplificado a partir del plásmido pNDN-OGG, utilizando en este caso los cebadores NDN-FW / NDN-RV.

pCBN-EPG: Este plásmido, de 14235 pb, fue utilizado para sobreexpresar en *B. cinerea* la proteína recombinante BcPG1 (acc. no. B0510_5388) [143]. Se construyó mediante YRC, introduciendo en el vector pCBN, digerido con *NcoI* y *HindIII*, los siguientes fragmentos de DNA: i) un fragmento de 121 pb que contiene los dos epítomos (*c-myc* y 6xHis) amplificados a partir del plásmido pPICZ α A con los cebadores CMYC-FW / CMYC-RV, ii) un fragmento de 1196 pb, que contiene la ORF del gen que codifica la proteína BcPG1 (con su secuencia señal para la secreción al medio extracelular y sin el codón de terminación), amplificado a partir de DNA genómico de *B. cinerea* B05.10 utilizando los cebadores EPG1-FW / EPG1-CMIC-RV.

pCBN-IGE: Este plásmido, de 13705 pb, fue utilizado para sobreexpresar en *B. cinerea* la proteína recombinante BcIEB1 (acc. no. B0510_2361), una proteína de función desconocida que fue identificada como posible sustrato de las PMTs de *B. cinerea* en el presente trabajo. pCBN-IGE se construyó mediante YRC, introduciendo en el vector pCBN, digerido con *NcoI* y *HindIII*, los siguientes fragmentos de DNA: i) un fragmento de 121 pb que contiene los dos epítomos (*c-myc* y 6xHis) amplificados a partir del plásmido pPICZ α A con los cebadores CMYC-FW / CMYC-RV, y ii) un fragmento de 666 pb, que contiene la ORF del gen que codifica la proteína BcIEB1 (con su secuencia señal y sin el codón de terminación), amplificado a partir de DNA genómico de *B. cinerea* B05.10 utilizando los cebadores IGE-FW / IGE-CMIC-RV.

pCBN-SUN: Este plásmido, de 14558 pb, fue utilizado para sobreexpresar en *B. cinerea* la proteína recombinante BcSUN1 (acc. no. B0510_8844), otra de las proteínas de función desconocidas que fue identificada como posible sustrato de las PMTs de *B. cinerea* en el presente trabajo. pCBN-SUN se construyó mediante YRC, introduciendo en el vector pCBN, digerido con *NcoI* y *HindIII*, los siguientes fragmentos de DNA: i) un fragmento de 121 pb que contiene los dos epítomos (*c-myc* y 6xHis) amplificados a partir del plásmido pPICZ α A con la pareja de cebadores CMYC-FW / CMYC-RV, y ii) un fragmento de 1519 pb, que contiene la ORF del gen que codifica la proteína BcSUN1 (con su secuencia señal y sin el codón de terminación), amplificado a partir de DNA genómico de *B. cinerea* B05.10 utilizando los cebadores SUN-FW / SUN-CMIC-RV.

Como se ha descrito anteriormente, el plásmido pNDN-OGG permite la integración dirigida de construcciones de DNA en el locus *niaD* de *B. cinerea* y, puesto que todos los plásmidos descritos anteriormente derivan en última instancia de pNDN-OGG [130], todos ellos permiten llevar a cabo este tipo de integración dirigida. Esto facilita, además, obtener cepas homocariontes de *B. cinerea* para todos los transformantes, con el objetivo de obtener la máxima expresión posible de los genes recombinantes que, en todos los casos, está controlada por el promotor fuerte y constitutivo *oliC* y el terminador *gluc* de *B. cinerea*.

Para la transformación de *B. cinerea*, se utilizaron 1-5 µg de los siguientes fragmentos lineales derivados de los plásmidos anteriores: un fragmento *SacI*-*ApaI* obtenido a partir del plásmido pNDN-GFP (5605 pb) o bien a partir del plásmido pNDN-GFP-ST (5842 pb); un fragmento *NotI*-*PstI* obtenido a partir de pCBN-EPG (7398 pb) o a partir de pCBN-IGE (6868 pb); o un fragmento *NotI*-*XbaI* obtenido a partir del plásmido pCBN-SUN (6898 pb). Para constatar la correcta integración en el locus *niaD* de las construcciones, se realizó una extracción de DNA de cada cepa transformante, y se realizaron dos reacciones de PCR diferentes, utilizando parejas de cebadores en las que uno de ellos se une a la región de DNA que se ha integrado, y el otro se une a la región adyacente al locus *niaD*, en una zona no incluida en el DNA transformante. El carácter homocarionte de todos los transformantes se corroboró por la ausencia del gen *niaD* mediante PCR, con los cebadores NR-MBD-Sma / NR-MBD-Bam. Las secuencias de todos los primers utilizados en este apartado se encuentran descritas en la **Tabla 1**, y su uso se describe en la **Publicación 3 (Archivo adicional 2)**. De esta manera, finalmente, se obtuvieron cinco nuevas cepas de *B. cinerea*, que sobreexpresan diferentes proteínas recombinantes, y que fueron denominadas BcBSp11-GFP, BcBSp11-GFP-ST, BcPG1, BcIEB1 y BcSUN1.

Obtención de fracciones proteicas a partir de cultivos de *B. cinerea*

Precipitación de proteínas extracelulares. Para la purificación del secretoma de *B. cinerea*, placas con 20 ml de medio YGG fueron inoculadas con 5-20 cubos de agar de aproximadamente 2 mm de lado, conteniendo micelio joven (el número de porciones de agar dependió de la velocidad de crecimiento de cada cepa). Los cultivos se mantuvieron durante 4 días a 20°C sin agitación, se separó el micelio del medio de cultivo mediante filtración a través de varias capas de papel de filtro y las proteínas extracelulares se precipitaron con metanol-cloroformo según Wessel y Flugge [144]. Para ello, se añadieron sucesivamente 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, agitando 1 minuto en un agitador de tipo vórtex tras cada adición, y dejando en reposo durante otro minuto antes de la siguiente. Posteriormente, se centrifugó a 15000 x g durante 10 minutos, se descartó la fase superior y se añadieron 3 volúmenes de metanol. La mezcla se centrifugó a 15000 x g durante 10 minutos para obtener las proteínas sedimentadas. Una vez evaporado el metanol, las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso. La cantidad de proteínas obtenidas se estimó cargando una alícuota en un gel de electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes, junto con cantidades conocidas de albúmina de suero bovino, como se ha descrito previamente [50]. Típicamente, a partir de una placa con 20 ml

de medio de cultivo se obtuvieron 10-20 µg de proteínas en el caso de la cepa *Δbcpmt2* y 70-100 µg para el resto de las cepas.

Obtención de fracciones proteicas enriquecidas en proteínas de la ECM. Con el fin de obtener proteínas débilmente unidas a la ECM, el micelio que había quedado retenido en los filtros descritos en el apartado anterior se lavó dos veces con 50 ml de agua fría, durante 15 minutos y en agitación lenta. Seguidamente se centrifugó la suspensión (1000 x g, 6 min), se eliminó el sobrenadante residual y se añadió aproximadamente el mismo volumen que el ocupado por el micelio, de una disolución de NaCl 300 mM, para llevar a cabo la extracción de proteínas durante 20 minutos con agitación lenta. Finalmente, se centrifugó nuevamente a 1000 x g durante 6 minutos y las proteínas contenidas en el sobrenadante fueron precipitadas con metanol-cloroformo y se cuantificaron como se ha explicado en el apartado anterior.

Obtención de fracciones proteicas enriquecidas en proteínas de las membranas celulares. En este caso, las mismas muestras de micelio utilizadas en el apartado anterior, después de haber realizado la extracción con sal, fueron lavadas de nuevo con agua fría en las mismas condiciones descritas anteriormente. Seguidamente, una parte del micelio (aproximadamente 0,2 g) se homogeneizó en un FastPrep - 24 MP BeadBeater, junto con 400 µl de tampón de lisis frío (Tris-HCl 75 mM pH 7, EDTA 1,5 mM, sacarosa 1M, inhibidor de proteasas “*Complete Protease Inhibitor*, Roche”) y bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro, a 60 m/s durante 1 minuto. A continuación, el tubo se perforó en su parte inferior con una aguja, y su contenido se centrifugó brevemente en el interior de un nuevo tubo de microcentrífuga vacío. El filtrado resultante se centrifugó durante 15 min a 3000 x g y 4°C, se recogió el sobrenadante, y se centrifugó durante 1 hora a 145000 x g en una ultracentrífuga, también a 4°C. El sedimento obtenido, que contiene la fracción correspondiente a las membranas celulares, se resuspendió en Laemmli-Sample Buffer (LSB), y se cuantificaron las proteínas presentes en la muestra como se ha explicado anteriormente.

Purificación de glicoproteínas extracelulares mediante cromatografía de afinidad.

Para la purificación del conjunto de glicoproteínas extracelulares secretadas al medio extracelular por *B. cinerea*, o glico-secretoma, 10 placas con 20 ml de medio YGG-Low cada una fueron inoculadas con 5-20 porciones de agar de 2 mm de lado, conteniendo micelio joven (el número de porciones de agar dependió de la velocidad de crecimiento de cada cepa). Los cultivos se mantuvieron durante 4 días a 20°C sin agitación, se filtraron a través de cuatro capas de papel de filtro y el filtrado fue congelado a -20°C hasta su uso.

El filtrado (aproximadamente 100 ml) fue equilibrado añadiendo 1/3 de su volumen de una disolución de unión 4X (Tris-HCl 80 mM pH 7.4, NaCl 2 M, MnCl₂ 4 mM, CaCl₂ 4 mM), centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó a través de una columna de cromatografía pre-empaquetada Hi-Trap Con-A 4B (GE Healthcare 28-9520-85), con un flujo de 1 ml/ml. Las proteínas unidas inespecíficamente a la matriz fueron

eliminadas mediante un lavado con 15 ml de disolución de unión 1X, a un flujo de 1 ml/min. Finalmente, el conjunto de glicoproteínas fue eluído de la columna con disolución de elución (disolución de unión 1X suplementada con metil- α -D-glucopiranosido 300 mM), y un flujo de 0,5 ml/min. Se recogieron 4 fracciones de 1 ml cada una y la concentración de proteínas en cada una de ellas se determinó mediante el método de Bradford [145]. Normalmente, las fracciones 2-4 contenían la mayoría de las glicoproteínas, y se unieron en una única muestra. Típicamente, para cada cepa se obtuvieron 25-110 μ g de glicoproteínas, y el mayor rendimiento se obtuvo para la cepa silvestre B05.10.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

El fraccionamiento de proteínas por electroforesis se llevó a cabo por medio de electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en SDS (SDS-PAGE) basada en el método de Laemmli [146], y utilizando el sistema Mini-Protean 3 de Bio-Rad. Según se indica en cada caso, se utilizaron o bien geles Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad), o bien geles discontinuos preparados tal y como se indica a continuación. En primer lugar, se preparó el gel de separación al porcentaje de reticulación elegido, normalmente al 12%T. Para ello se mezcló: 1,7 ml de agua, 2 ml de acrilamida/bisacrilamida 29:1, 1,25 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 y 25 μ l de SDS 20%. Tras desgasificar la mezcla, se añadieron 25 μ l de persulfato amónico al 10% y 2,5 μ l de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina, Sigma-Aldrich) y fue vertida entre los dos vidrios del sistema Mini-Protean 3 de Bio-Rad, cubriendo la superficie lentamente con 1-2 ml de agua para luego dejar polimerizar durante una hora. A continuación, se preparó el gel de compactación al 4%T, compuesto por la mezcla de: 1,83 ml de agua, 400 μ l de acrilamida/bisacrilamida 29:1, 750 μ l de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y 15 μ l de SDS 20%. Tras desgasificar, se añadieron 15 μ l de persulfato amónico al 10% y 3 μ l de TEMED, y la mezcla se añadió sobre el gel de separación ya polimerizado. Se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 1 hora. Los pocillos fueron entonces lavados con tampón de cámara (Tris 25 mM, Glicina 0,2 M pH 8,3, SDS 0,1%), para eliminar los posibles restos de acrilamida.

Las muestras de proteínas fueron resuspendidas en LSB (SDS 2%, β -mercaptoetanol 1%, glicerol 10%, Tris-HCl 60 mM pH 6,8, azul de bromofenol 0,0016%), incubadas durante 10 min en agua hirviendo, y cargadas en los pocillos. La electroforesis se desarrolló con tampón de cámara a una diferencia de potencial de 200 V. Los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal [147], fijando primero las proteínas con una disolución etanol:acético:agua; 5:1:4 durante al menos una hora, y tiñendo seguidamente con Coomassie Brilliant blue G250 (Sigma-Aldrich) al 0,1% en una mezcla de ácido ortofosfórico 2%, sulfato amónico 10% y metanol 20%, durante toda una noche. El tamaño de las proteínas se estimó comparando su patrón de migración con marcadores de tamaño conocido (Prestained SDS-Page Standar, Bio-Rad).

Electroforesis bidimensional de proteínas (EF-2D)

El análisis del secretoma de *B. cinerea* se realizó mediante electroforesis bidimensional (EF-2D), siguiendo el procedimiento descrito por Espino *et al.* [50]. Las muestras de proteínas extracelulares, obtenidas como se ha descrito anteriormente, fueron resuspendidas en el volumen adecuado de ReadyPrep sequential extraction Reagent 2 (BioRad), para obtener 10 µg de proteínas totales en 125 µl de disolución. La electroforesis 2D se llevó a cabo de acuerdo con los procedimientos estándar de BioRad. La primera dimensión (isoelectroenfoque) se realizó en tiras de gradiente de pH inmovilizado ReadyStrip IPG-Strip, con un rango de pH entre 3 y 10, en el equipo de electroenfoque PROTEAN IEF Cell (BioRad). La segunda dimensión (SDS-PAGE) en geles de electroforesis Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (BioRad). Finalmente, los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal, como se ha indicado anteriormente.

El análisis del glico-secretoma de *B. cinerea* se realizó igualmente mediante EF-2D. En este caso, 10 µg de glicoproteínas totales en cada muestra (aisladas como se describió más arriba) fueron precipitadas con metanol-cloroformo y el sedimento fue enviado directamente al Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España), donde se desarrolló la EF-2D utilizando tiras de gradiente de pH inmovilizado ReadyStrip IPG-Strip, con un rango de pH entre 3 y 11 para el isoelectroenfoque, geles 10% Mini-PROTEAN TGX precast gels (BioRad) para la segunda dimensión y la tinción de las glicoproteínas en los geles se llevó a cabo con plata [148].

Identificación de proteínas mediante MALDI TOF/TOF y LC-MS/MS

La identificación de las proteínas contenidas en los spots de los geles de EF-2D se realizó mediante análisis MALDI TOF/TOF, tal como se describe en [149]. Para asignar las secuencias proteicas a las huellas peptídicas obtenidas, se utilizó el software MASCOT v.2.2.04 (Matrix Science, London, UK), realizando una búsqueda de secuencias en la base de datos de proteínas no redundante del NCBI (National Center for Biotechnology Information, E.E.U.U.) NCBIInr_20120720 (19248190 secuencias; 6604124933 residuos), con los siguientes parámetros de búsqueda: enzima, tripsina; máximo número de sitios sin cortar permitidos, 1; carbamidometil cisteína como modificación por el tratamiento con iodoacetamida; modificaciones variables, oxidación de metioninas; tolerancia de masa establecida en ±50 ppm para precursores y en ±0.3 Da para los iones de fragmentación obtenidos en MS/MS. El intervalo de confianza para la identificación de proteínas fue ≥ 95% ($p < 0.05$), y solamente los péptidos con un valor de iones individuales por encima del umbral de identidad se consideraron correctamente identificados.

En el caso del glico-secretoma de *B. cinerea*, se llevó a cabo una identificación masiva y semi-cuantitativa de todas las proteínas presentes en el mismo, mediante LC-MS/MS. En este caso, la totalidad de cada una de las muestras de glicoproteínas fue precipitada con metanol – cloroformo y el sedimento fue enviado al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid, España). Las muestras fueron resuspendidas en un

volumen adecuado de LSB (100 µl como máximo) y analizadas mediante LC-MS/MS, básicamente como se describe en Clemente et al. [150]. La identificación de las huellas peptídicas se llevó cabo mediante el software SEQUEST (Proteome Discoverer 1.3, Thermo Scientific), realizando una búsqueda frente a la base de datos uniprot-fungi.fasta, con los siguientes parámetros: enzima, tripsina; máximo número de sitios sin cortar permitidos, 2; carbamidometil cisteína como modificación por el tratamiento con iodoacetamida; modificaciones variables, oxidación de metioninas; tolerancia de masa establecida en ± 10 ppm para precursores y en ± 0.8 Da para los iones de fragmentación obtenidos en MS/MS. La tasa de falsos positivos (*False discovery rate*; FDR) permitida fue < 0.01 .

Detección y cuantificación de proteínas recombinantes mediante transferencia Western.

Las proteínas fueron electrotransferidas a partir de geles de SDS-PAGE a membranas de Nitrocelulosa (Whatman Protran BA 85), utilizando el sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Para la detección de las bandas proteicas en las membranas se utilizaron, dependiendo de los casos, los anticuerpos primarios monoclonales anti-GFP (Roche, Suiza) ó anti-*c-myc* (Roche, Suiza), a una dilución 1:1000. En todos los casos, la dilución del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, EE.UU.) fue de 1:3000. La actividad peroxidasa se reveló con el sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, EE.UU.) y la quimioluminiscencia generada fue captada mediante el sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Detección de glicoproteínas en membranas mediante transferencia Eastern

Las proteínas fueron electrotransferidas a partir de geles Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad) a membranas de PVDF, Immobilon PVDF membranes (Millipore), utilizando el sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Las membranas fueron procesadas como se detalla en [151], utilizando 1 µg/µl de Concanavalina-A biotinilada (Sigma C2272) para detectar glicoproteínas, y 0.5 µg/ml de Estreptavidina-Peroxidasa (Sigma S5512), para detectar la concanavalina biotinilada. La actividad peroxidasa se reveló con el sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, EE.UU.) y la quimioluminiscencia generada fue captada mediante el sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad)

Tratamiento con Exo-manosidasas

Para estudiar el contenido en carbohidratos en las glicoproteínas recombinantes sobreexpresadas en cultivos de *B. cinerea* y el tipo de enlaces existentes entre ellos, se trataron con dos exo-manosidasas: $\alpha 1$ -6-exo-manosidasa (New England Biolabs, P0727S) y $\alpha 1$ -2,3-exo-manosidasa (New England Biolabs, P0729S). Para ello, se inocularon 50 ml de medio YGG-Low con una concentración de conidias de $3 \cdot 10^6$ conidias/ml y se incubaron durante 16 horas en agitación a 150 rpm y 22°C. El medio de cultivo fue recogido mediante filtración a través de cuatro capas de papel de filtro y congelado hasta su uso. Una alícuota

de 1 ml de cada sobrenadante se precipitó con metanol-cloroformo [144] y el sedimento se resuspendió en 10 μ l de agua desionizada. La desglucosilación se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ l conteniendo 1 μ l de enzima (lo que equivale a 40 unidades de α 1-2,3 y/o 32 unidades de α 1-6), el tampón y la albúmina de suero de bovino suministrados con la enzima. Las reacciones se incubaron primero durante 18 horas a 37°C para luego, tras añadir 1 μ l adicional de enzima, prolongar la incubación durante 2 horas más. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón LSB.

Herramientas bioinformáticas utilizadas en este trabajo

Obtención de todas las secuencias proteicas codificadas por varios genomas fúngicos. El conjunto de secuencias de proteínas utilizadas en el estudio *in silico* sobre la O-glicosilación se obtuvo en todos los casos a partir de bases de datos públicas y disponibles en Internet. Las secuencias de todas las proteínas codificadas por los genomas de *Magnaporthe grisea* (cepa 70-15), *Sclerotinia sclerotiorum* (cepa 1980), *Ustilago maydis* (cepa 521), *Aspergillus nidulans* (cepa FGSC A4) y *Neurospora crassa* (cepa N15) se obtuvieron a partir de la base de datos del Instituto Broad (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea). Las secuencias de *Botrytis cinerea* (cepa T4), *Trichoderma reesei* (cepa QM6a) y *Saccharomyces cerevisiae* (cepa S288C) se obtuvieron, respectivamente, desde las bases de datos URGI (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Botrytis>), JGI (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>), y SGD (<http://www.yeastgenome.org>). Las secuencias de todas las proteínas codificadas por cada genoma fueron descargadas y transferidas a una hoja de cálculo *Microsoft Excel 2010* con la ayuda del servidor *Fasta2tab* (<http://darwin.biochem.okstate.edu/fasta2tab>).

Predicción de secuencia señal en las proteínas. Todas las secuencias proteicas obtenidas en el apartado anterior fueron analizadas para predecir la presencia de secuencia señal para su secreción, mediante el uso de la versión descargable del servidor *SignalP 3.0* [152], que presenta una pequeña tasa de falsos positivos (15%). Por otra parte, la predicción de secuencia señal en el conjunto de glicoproteínas identificadas mediante LC-MS/MS se llevó a cabo utilizando el servidor *SignalP 4.1* [153]. La posible presencia de secuencias señal alternativas se analizó utilizando el servidor *SecretomeP 2.0* [154]. En los dos últimos casos se utilizó la versión web de estos servidores, utilizando los parámetros definidos por defecto.

Predicción de los sitios de O- y N-glicosilación. El conjunto de proteínas potencialmente secretadas obtenidas a partir del estudio *in silico* fue analizado para identificar los sitios potenciales de O-glicosilación mediante la herramienta de predicción *NetOGlyc 3.1* [79]. Las posiciones de aquellos residuos potencialmente O-glicosilados detectadas por los servidores fueron guardadas como un archivo de texto directamente desde el navegador web. Los archivos fueron editados mediante *Microsoft Word 2010* para transformar estos datos a un formato de tabla apropiado, que fue incorporado finalmente en una hoja de cálculo *Microsoft Excel 2010* (**Publicación 1, Archivo Adicional 2**). En el caso de glicoproteínas identificadas mediante LC-MS/MS se utilizó el servidor *NetOGlyc 4.0*.

Para la predicción de los sitios de *N*-glicosilación en el conjunto de glicoproteínas identificadas mediante LC-MS/MS se utilizó el servidor *NetNGlyc 1.0*, y los datos fueron transformados de la misma manera (**Publicación 3, Archivo Adicional 1**).

Aleatorización de las posiciones de *O*-glicosilación en las proteínas. Con la finalidad generar un conjunto de proteínas que pudiese usarse como control en el análisis bioinformático acerca de la presencia y distribución de los sitios de *O*-glicosilación, las posiciones de *O*-glicosilación fueron distribuidas al azar en las proteínas. Para ello se utilizaron las mismas proteínas para las que se predijo secuencia señal, y el mismo número total de sitios de *O*-glicosilación que se había predicho anteriormente para cada proteína individual. La única diferencia es que la posición individual de cada sitio de *O*-glicosilación fue generada aleatoriamente utilizando la función *Rand* en *Microsoft Excel*, teniendo en cuenta la longitud de cada proteína individual y sin asignar dos sitios de *O*-glicosilación a un mismo residuo.

Nuevas herramientas bioinformáticas diseñadas en este trabajo: *Macro-XRR*. Para estudiar la presencia y distribución, tanto de regiones ricas en residuos de serina y treonina, como de regiones potencialmente hiper-*O*-glicosiladas (pHGRs) en las proteínas con secuencia señal y en las glicoproteínas identificadas mediante LC-MS/MS, se desarrolló un algoritmo denominado *Macro-XRR (X-Rich-Regions)* que se ejecuta como una Macro en una hoja de cálculo de *Microsoft Excel*. El diseño de este algoritmo se llevó a cabo mediante *Microsoft Visual Basic for Applications*. Aunque en este trabajo sólo hemos usado el algoritmo *Macro-XRR* para detectar regiones de las proteínas con un alto contenido en residuos de Ser/Thr, o con un alto número de posibles *O*-glicosilaciones, también se puede utilizar perfectamente para buscar el agrupamiento de cualquier tipo de modificación de aminoácidos a lo largo de una secuencia, es decir, para buscar regiones ricas en una característica X (donde X representa el tipo de aminoácido o modificación de interés).

El algoritmo simplemente procesa una lista con las posiciones numéricas de los aminoácidos que presenten esta característica de interés y devuelve una lista de las regiones de cada proteína que son ricas en este tipo de aminoácido. La versión de la *Macro-XRR* en *Microsoft Excel* está disponible on-line (<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/213>), puesto que forma parte de la **Publicación 1 (Archivo Adicional 4)**. Es capaz de analizar simultáneamente hasta 1.500 proteínas y está programada para la búsqueda de regiones hiper-*O*-glicosiladas (pHGRs). Básicamente, la aplicación analiza los datos utilizando tres parámetros. En primer lugar, busca regiones de una longitud dada, llamada *Ventana (W)*, que tiene una *Densidad (%G)* de residuos que presentan la característica de interés por encima de un valor mínimo. Cuando dos o más de las regiones encontradas de esta manera se superpongan o estén separadas entre sí por un número de aminoácidos menor que el tercer parámetro, *Separador (S)*, el algoritmo las combina en una sola. Los tres parámetros (*W*, *%G*, y *S*) pueden ser establecidos por el usuario. En todos los casos, el principio y el final de las regiones ricas en X se establece como el primer y el último aminoácido que cumpla con las propiedades deseadas, de manera que, por ejemplo, para *W* = 20 y *%G* = 25% (al menos un 25% de residuos de tipo X en una ventana de 20 aminoácidos), se podrían detectar regiones ricas en X con un tamaño mínimo de 5 aminoácidos, aunque la búsqueda se realiza en base a una ventana de 20 residuos. Los

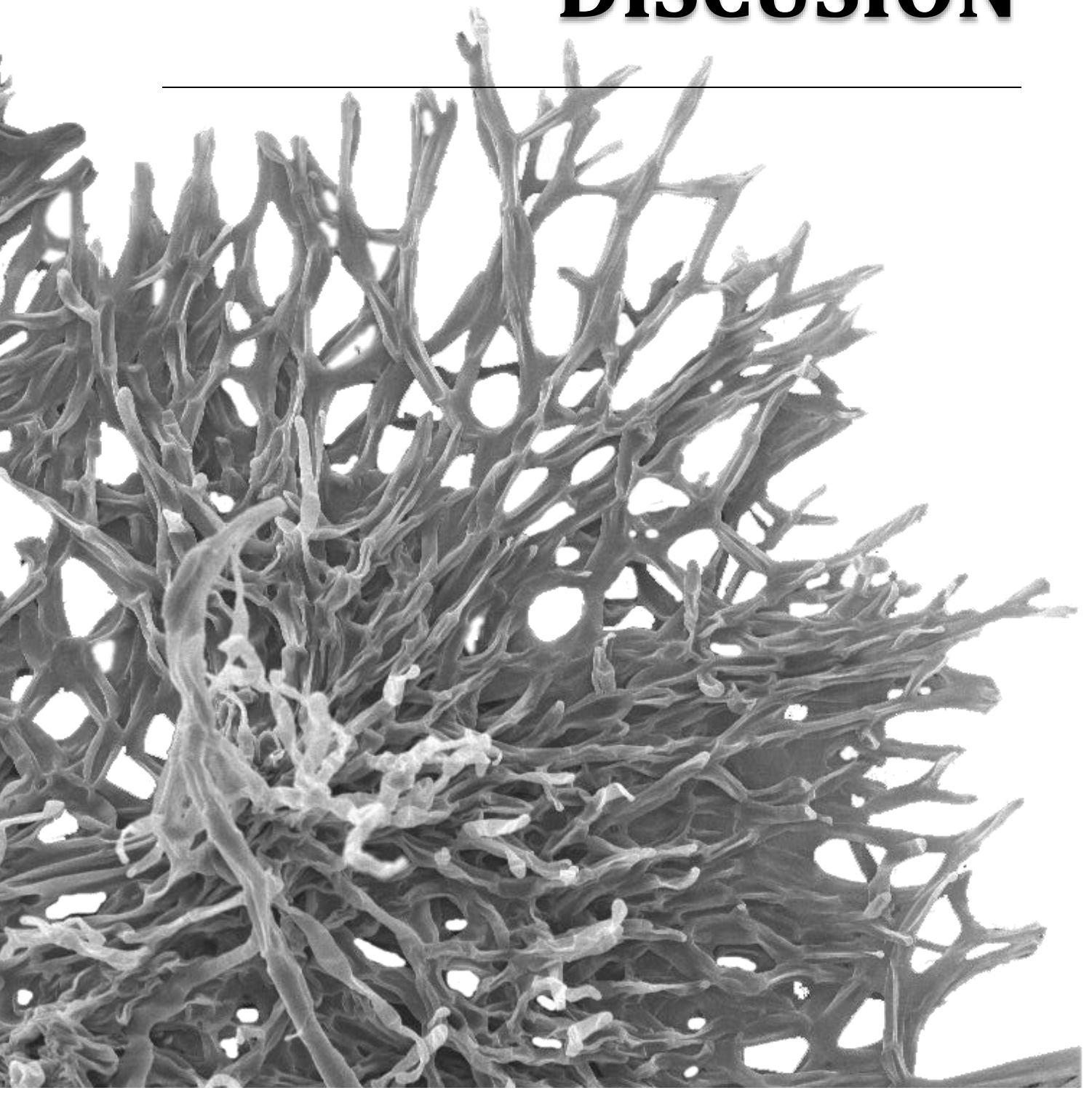
resultados del análisis se presentan como un archivo con extensión *pdf* que contiene los datos de todas las regiones ricas en X detectadas para cada proteína, tanto gráficamente como en forma de tabla, así como varios gráficos con estadísticas para todo el conjunto de proteínas analizadas.

Distribución por familias de las secuencias de glicoproteínas. En el caso de las glicoproteínas identificadas mediante LC-MS/MS, la asignación de una familia adecuada a cada secuencia proteica se realizó mediante dos criterios complementarios. Por una parte, se analizó la similitud de cada secuencia con proteínas de función conocida detectadas mediante el algoritmo BLAST [155]. Simultáneamente, se analizó la presencia de dominios conservados identificados por el servidor Pfam [156]. En los casos donde no se detectó una similitud muy elevada con alguna proteína de función conocida, las secuencias fueron clasificadas como “Dudosas” (*Dubious*), pero el mejor resultado obtenido en la búsqueda BLAST, o la familia y/o dominios conservados detectados mediante el servidor Pfam, se indicaron igualmente. En estos casos, las proteínas se incluyen en la familia correspondiente, tal como se define por BLAST y/o Pfam. Sólo aquellas proteínas sin ninguna similitud clara en la búsqueda BLAST y que no presentaron dominios conservados, se incluyen en la familia “Desconocidas” (*Unknown*).

Análisis de las proteínas PMT de *B. cinerea*. Los alineamientos de secuencias y los análisis filogenéticos se realizaron con el servidor CLUSTALW2 [157]. La predicción de regiones transmembrana en las proteínas PMT de *B. cinerea* se llevó a cabo con los servidores TMHMM 2.0 [158], PredictProtein [159,160], y Phobius [161]. Para la representación simultánea de las regiones transmembrana de todas las proteínas de cada subfamilia PMT (**Publicación 2, Fig. S1**), se calculó el promedio de la posición inicial y final de cada región transmembrana para todas las proteínas de la subfamilia, según los datos obtenidos del servidor Phobius, a partir del alineamiento (**Publicación 2, Fig. S2**). La identificación de los dominios conservados en las proteínas PMT de *B. cinerea* se llevó a cabo con el servidor *InterPro Scan* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>). Finalmente, para obtener los perfiles hidropáticos promedio de cada subfamilia de las PMT (**Publicación 2, Fig. S1**), se determinó el índice de Kyte-Doolittle promedio para todos los residuos en la misma posición de cada alineamiento. Para realizar la representación gráfica, a partir de los datos anteriores se calculó el índice promedio utilizando ventanas de un tamaño de 15 posiciones del alineamiento.

Análisis estadísticos. En todos los casos donde se necesitó un análisis estadístico de los datos, se utilizó el software SPSS 17 (IBM). Para las pruebas de significación estadística se utilizó o bien el test *T-student*, siempre que los datos presentasen una distribución normal (la distribución de los datos se analizó previamente con la prueba de Kolmogorov-Smirnov), o bien la prueba de Mann-Whitney, si la distribución de la muestra no era normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



NetOGlyc 3.1 es una herramienta válida para la predicción de regiones hiper-*O*-glicosiladas en proteínas fúngicas

El primer objetivo de esta tesis doctoral consistía en estudiar *in silico* la presencia, distribución y abundancia de las regiones ricas en Ser/Thr y de las regiones altamente *O*-glicosiladas en el conjunto de proteínas con secuencia señal codificadas por los genomas de *B. cinerea* y de otros organismos fúngicos. Como se ha descrito, actualmente no existen herramientas bioinformáticas para predecir sitios de *O*-glicosilación en proteínas fúngicas. Por lo tanto, se analizó la eficacia del servidor NetOglyc 3.1 [79,162], diseñado originalmente para predecir sitios de *O*-glicosilación en proteínas de mamíferos.

Para ello, se compararon los sitios de *O*-glicosilación observados experimentalmente para un conjunto de 30 proteínas de hongos con los sitios de *O*-glicosilación predichos por NetOglyc para el mismo conjunto de proteínas (**Publicación 1, Archivo Adicional 1**). Los resultados indican que este servidor predice correctamente el 54% de los sitios de *O*-glicosilación en proteínas de hongos, un valor no muy diferente del 67% obtenido con proteínas de mamíferos [79]. No obstante, NetOglyc produce una mayor tasa de falsos positivos en el caso de las proteínas fúngicas, por lo que se calculó un factor de corrección (0,68) para obtener una estimación aproximada del número real de *O*-glicosilaciones.

A continuación, se utilizaron las posiciones de *O*-glicosilación predichas por este servidor para detectar regiones hiperglicosiladas ó pHGRs (regiones con al menos un 25% de aminoácidos *O*-glicosilados según NetOGlyc, identificadas en una ventana de búsqueda de 20 aa), mediante el algoritmo *Macro-XRR*. Los resultados indican que prácticamente todas las regiones hiperglicosiladas observadas experimentalmente ó HGRs (regiones con al menos un 20% de aminoácidos *O*-glicosilados según datos experimentales, identificadas en una ventana de búsqueda de 20 aa) fueron también identificadas a partir de los datos de NetOglyc (**Publicación 1, Fig. 1A**).

Este aumento en la eficacia de predicción se debe a que las HGRs suelen coincidir con regiones ricas en Ser/Thr (regiones con un contenido de serina más treonina de al menos un 40%, identificadas en una ventana de búsqueda de 20 aa), y éstas últimas suelen estar altamente *O*-glicosiladas tanto en mamíferos como en hongos. De hecho, al analizar la presencia de regiones ricas en Ser/Thr con la *Macro-XRR* se observó que la mayoría coinciden tanto con HGRs como con pHGRs. Sin embargo, al estudiar el número de aminoácidos que forman parte de una región rica en Ser/Thr y que a la vez forman parte de una HGR real, y compararlo con el número de residuos que forman parte de una pHGR y que a la vez están contenidos en una HGR real (**Publicación 1, Fig. 1B**), se concluye que un aminoácido contenido en una región rica en Ser/Thr tiene una probabilidad de 0,34 de formar parte de una HGR real, mientras que un aminoácido localizado en una pHGR tiene una probabilidad de 0,61 de formar parte de una HGR real. Esto indica que la detección de HGRs a partir de pHGRs es el doble de fiable que si se hiciera a partir de la mera determinación de las regiones ricas en Ser/Thr. Por lo tanto, el servidor NetOGlyc, a pesar de mostrar un uso limitado en la predicción de sitios de *O*-glicosilación individuales en proteínas fúngicas, es

muy eficaz en la predicción de regiones hiperglicosiladas, mostrando una fiabilidad mayor que la mera determinación de regiones ricas en Ser/Thr.

Un gran número de proteínas fúngicas con secuencia señal poseen regiones ricas en Ser/Thr y están potencialmente O-glicosiladas

La presencia de secuencia señal para la secreción permite que las proteínas entren en la ruta de secreción, y que por lo tanto puedan ser O-glicosiladas por las PMTs. Con el objetivo de identificar todas las proteínas con secuencia señal codificadas en los genomas de cuatro hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Ustilago maydis*), otros tres hongos no fitopatógenos (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma reesei*) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó el servidor SignalP 3.0. Los resultados indican que el número de proteínas para las que se predice secuencia señal (**Publicación 1, Archivo Adicional 2**), fue bastante variable entre los ocho genomas fúngicos analizados oscilando entre un 10,1% (*S. cerevisiae*) y un 18,2% (*M. grisea*) del total de las proteínas codificadas en cada genoma (**Publicación 1, Tabla 1**). Sin embargo, no se observó ninguna relación clara entre el número de proteínas que potencialmente entran en la ruta de secreción y el carácter fitopatógeno o no fitopatógeno de los organismos estudiados.

De las proteínas con secuencia señal, entre el 38,1% (*M. grisea*) y el 61,3% (*U. maydis*) presentan al menos una región rica en Ser/Thr (**Publicación 1, Tabla 2**), con una longitud media que osciló entre 32,1 residuos (*M. grisea*) y 65,4 residuos (*S. cerevisiae*), aunque también se detectaron regiones mucho mayores. De este análisis se pudo concluir que, como promedio, aproximadamente la mitad de las proteínas con secuencia señal de los organismos fúngicos estudiados poseen al menos una región rica en Ser/Thr, con un contenido en estos aminoácidos de un 40% o más, y con una longitud media de 40,1 aminoácidos.

Al utilizar el servidor NetOglyc para predecir los sitios de O-glicosilación (**Publicación 1, Archivo Adicional 2**) se observó que el porcentaje de proteínas con secuencia señal para las que se predice al menos una O-glicosilación fue menor en la levadura *S. cerevisiae* (42,1%) que en los hongos filamentosos analizados, variando entre un 58,9% (*S. sclerotiorum*) y un 74,0% (*N. crassa*) (**Publicación 1, Tabla 1**). Para la mayoría de estas proteínas se predicen múltiples residuos O-glicosilados, alcanzando decenas o incluso cientos de ellos en la misma proteína (**Publicación 1, Figura 2**). El número promedio de O-glicosilaciones por proteína se estimó entre 5 a 10 sitios (utilizando el factor de corrección propuesto en el apartado anterior), excepto en el caso de *S. cerevisiae*, que presenta un número mucho más elevado. En concordancia con la gran abundancia de proteínas para las que se predice O-glicosilación, experimentos de transferencia Eastern (**Publicación 2, Fig. 11B**) realizados a partir de extractos de proteínas extracelulares de *B. cinerea* mostraron una gran abundancia de proteínas glicosiladas en estas preparaciones.

En el genoma de *B. cinerea* se predicen varias proteínas con un grado de O-glicosilación muy elevado (**Publicación 1, Archivo Adicional 2**), que no es compatible con un plegamiento globular típico de enzimas o proteínas efectoras. A esto hay que sumar que

para la mayoría de ellas se predice además la presencia de un anclaje GPI, lo que conduce a la hipótesis de que estas proteínas altamente *O*-glicosiladas pueden estar implicadas en el mantenimiento de la estructura de la pared celular o la ECM. Un ejemplo es la proteína de *B. cinerea* Bofut4_P104050.1 (903 aa; 453 presuntamente *O*-glicosilados) de la que sólo existe homóloga en el hongo *S. sclerotiorum* que, al igual que *B. cinerea*, es un organismo fitopatógeno con amplio rango de hospedadores. Esta proteína es además interesante porque posee dos motivos CFEM, identificado en proteínas fúngicas que participan en la virulencia [163]. Otras proteínas, también presuntamente hiperglicosiladas, se detectaron solamente en estos dos organismos, lo que plantea la cuestión de que pudiesen realizar una contribución importante a la biología y/o virulencia de estos patógenos con amplio rango de hospedadores.

Las proteínas fúngicas son ricas en regiones potencialmente hiper-*O*-glicosiladas

Entre el 18% (*S. cerevisiae*) y el 31% (*N. crassa*) de todas las proteínas con secuencia señal que fueron analizadas contienen al menos una pHGR, identificada con el algoritmo *Macro-XRR* a partir de las predicciones realizadas con el servidor NetOglyc. (**Publicación 1, Tabla 2 y Archivo Adicional 3**). Su tamaño medio oscila entre 32,3 aa. (*U. maydis*) y 66,9 aa. (*S. cerevisiae*), aunque alcanzan en algunos casos longitudes de hasta varios cientos de residuos. Como promedio para el conjunto de proteínas fúngicas con secuencia señal, de las 8 especies analizadas, aproximadamente una cuarta parte posee al menos una pHGR, con una longitud media de 45,5 aminoácidos.

Con el fin de descartar que estas pHGRs puedan ser consecuencia de una agrupación casual de los sitios de *O*-glicosilación predichos, sin una causa biológica subyacente, se hizo un estudio similar pero distribuyendo al azar los sitios de glicosilación de cada proteína. Se observó que tanto el número de proteínas que presentan pHGRs como el número de estas regiones fueron considerablemente menores (**Publicación 1, Fig. 3**). De estos resultados se concluye que, al menos en la mayoría de las proteínas fúngicas, debe existir una presión selectiva que favorece el agrupamiento de los sitios de *O*-glicosilación para que formen HGRs.

Cuando se estudió la ubicación de las pHGRs a lo largo de la secuencia de las proteínas (**Publicación 1, Fig. 4A**) se observó que con mayor frecuencia se localizaban en zonas cercanas a los extremos N- y C-terminales, especialmente cercanas a este último, en todos los genomas examinados con la excepción de *S. cerevisiae*. Además, cuando se seleccionó de entre las proteínas con secuencia señal de *B. cinerea* un subconjunto de proteínas contenidas en la base de datos CAZY (*Carbohydrate Active Enzymes*) como una muestra representativa de enzimas extracelulares, esta tendencia fue bastante más acusada (**Publicación 1, Fig. 4C**) [164,165].

En un trabajo realizado por Fernández-Álvarez *et al.*, a partir del genoma de *U. maydis* [81] se identificaron *in silico*, mediante una aproximación alternativa, 64 posibles proteínas diana de la manosiltransferasa PMT4. De ellas, 14 proteínas fueron también incluidas en el presente trabajo por presentar secuencia señal, y 13 de estas últimas

presentaron pHGRs. Además, las pHGRs se encuentran claramente solapadas con las zonas que potencialmente sirven como sustrato para PMT4 descritas por Fernández-Álvarez *et al.* Por otra parte, en el estudio experimental del secretoma temprano de *B. cinerea* realizado por nuestro grupo de investigación [50], se identificaron 105 proteínas. Al analizar estas proteínas con la *Macro-XRR*, para 26 de ellas se predijo la presencia de al menos una pHGR. Muchas de estas proteínas con pHGRs están involucradas en el metabolismo de la pared celular o la ECM del hongo, y el resto son enzimas líticas implicadas en la degradación de diversos sustratos solubles, o son proteínas con función desconocida. Curiosamente, con una única excepción, no se encontraron enzimas degradadoras de la pared celular vegetal, por lo que se podría especular que este tipo de proteínas podrían llevar a cabo su función de una forma más óptima si se mantienen retenidas en la proximidad de las hifas fúngicas. Es posible que las HGRs pudiesen proporcionar esta capacidad mediante la integración de las proteínas en la ECM de glucano secretada por *B. cinerea* [166,167].

Estos resultados indican, en definitiva, que existe una gran prevalencia de pHGRs entre las proteínas secretadas por los ocho organismos estudiados. No es de extrañar, por consiguiente, que los mutantes de hongos afectados en la *O*-glicosilación muestren fenotipos pleiotrópicos [77] que incluyen reducción de la viabilidad y de la virulencia [81,114]. Por ello, a continuación se analiza el papel que juega la *O*-glicosilación en el ciclo de vida de *B. cinerea*, mediante el estudio de mutantes de las diferentes protein-*O*-manosiltransferasas.

El genoma de *B. cinerea* contiene tres genes *bcpmt* que se expresan constitutivamente

En hongos, el primer paso en la adición de cadenas de azúcares a residuos de Ser o Thr durante la *O*-glicosilación de proteínas es catalizado por las protein-*O*-manosiltransferasas (PMTs), de las cuales existen en hongos 3 subfamilias diferentes (PMT1, 2 y 4). Mediante una búsqueda BLAST se identificaron tres secuencias proteicas de *B. cinerea* homólogas a las PMTs de *S. cerevisiae*, una por subfamilia, cuyos genes se denominaron *bcpmt1*, *bcpmt2* y *bcpmt4* (**Publicación 2, Fig. 1A**). Las tres proteínas presentan una alta similitud de secuencia con otras PMTs identificadas previamente en varios organismos fúngicos (**Publicación 2, Fig. S2**), así como un perfil hidropático parecido y una distribución similar de los dominios y motivos de secuencia conservados que son típicos de las PMTs [78] (**Publicación 2, Fig. S1, Fig. S2**).

El análisis de la expresión de los genes *bcpmt* mediante Q-RT-PCR mostró que los tres genes se expresan bajo todas las condiciones ensayadas (**Publicación 2, Fig. 1B**), presentando niveles de expresión similares entre sí y constantes en el tiempo, tanto en cultivo axénico como *in planta* durante la infección (**Publicación 2, Fig. 1C**). Estos resultados son consistentes con los estudios de expresión de los genes *pmt* en otros organismos fúngicos, como por ejemplo, *C. neoformans* [111], *A. nidulans* [107,109] y la levadura *S. cerevisiae* [85], en la que también se ha observado una expresión prácticamente constitutiva de los tres genes.

Las cepas $\Delta bcpmt$ muestran una reducción del crecimiento en cultivo axénico, producen menos conidias y más esclerocios

Mediante la sustitución de la secuencia codificante de cada gen *bcpmt* por un casete de resistencia a higromicina, se aislaron cepas homocariontes mutantes para cada uno de estos genes, que fueron identificadas y caracterizadas mediante PCR y análisis por transferencia Southern (**Publicación 2, Fig. S3**). Estas cepas se denominaron respectivamente $\Delta bcpmt1$, $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$.

Los estudios sobre la velocidad de crecimiento en diferentes medios utilizados habitualmente para el cultivo de *B. cinerea* (**Publicación 2, Fig. 2**) indicaron que la cepa $\Delta bcpmt2$ es la más afectada en el crecimiento, mientras que las cepas $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt4$ presentaron una reducción de su tasa de crecimiento del 23-62% (en función del medio de cultivo) en comparación con la cepa silvestre. En trabajos previos, se ha descrito que los mutantes de los genes *pmt* de otros hongos pueden recuperar parcialmente la tasa de crecimiento en medios suplementados con estabilizadores osmóticos [83,107,168]. De hecho, la presencia de estabilizadores osmóticos en el medio de cultivo tuvo un pequeño efecto estimulante del crecimiento en la cepa silvestre de *B. cinerea* y en $\Delta bcpmt1$, y un efecto mucho mayor en $\Delta bcpmt4$ y, sobre todo, en $\Delta bcpmt2$ (**Publicación 2, Fig. 3**), lo que apunta a un posible papel, especialmente de BcPMT2, en la O-glicosilación de proteínas estructurales de la pared de *B. cinerea*.

Por otro lado, la cepa $\Delta bcpmt2$ fue completamente incapaz de esporular y tampoco produjo esclerocios (**Publicación 2, Fig. 4**). Además, las colonias del mutante $\Delta bcpmt2$ mostraron una pigmentación muy oscura cuando se crecieron en oscuridad, probablemente debido a una gran acumulación de melanina (**Publicación 2, Fig. 4A**). En las cepas $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt4$, el número de conidias producidas también se redujo considerablemente (**Publicación 2, Fig. 4B**), aunque no se observó ninguna diferencia en su capacidad de germinación con respecto a la cepa silvestre. Estas dos cepas, además, mostraron un aumento en el número de esclerocios producidos bajo luz continua (**Publicación 2, Fig. 4C**), indicando que la luz no tiene sobre ellas el efecto represor sobre la formación de esclerocios descrito para la cepa silvestre [11].

La cepa $\Delta bcpmt2$ muestra sensibilidad frente al blanco de calcoflúor, al SDS y a la agitación del medio de cultivo

Con el objeto de analizar el posible grado de afectación de la pared celular, se cultivaron los distintos mutantes para las PMTs en presencia de diferentes compuestos que afectan específicamente el ensamblaje de la pared celular o la síntesis de sus componentes. Los resultados muestran que el blanco de calcoflúor ejerce un efecto inhibitor del crecimiento muy potente en la cepa $\Delta bcpmt2$ y en menor medida en las cepas $\Delta bcpmt1$, $\Delta bcpmt4$, comparado con el efecto que ejerce sobre la cepa silvestre (**Publicación 2, Fig. 5A**). Del mismo modo, la adición de SDS provocó una inhibición del crecimiento significativa solamente en el caso de la cepa $\Delta bcpmt2$ (**Publicación 2, Fig. 5A**). Cuando se cultivaron las cepas bajo agitación lenta (**Publicación 2, Fig. 5C y D**), se observó una mayor reducción en el tamaño de las colonias de las cepas $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt4$ que en el caso de la

cepa silvestre, lo que sugiere que la resistencia mecánica se ve afectada también en estos dos mutantes. Este efecto no se pudo determinar para $\Delta bcpmt2$ puesto que ya de por sí genera colonias muy pequeñas y compactas. Finalmente, la presencia de una pared celular debilitada fue corroborada al digerir el micelio con una mezcla de enzimas líticas que degradan la pared celular. Las cepas $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt2$ liberaron alrededor de dos veces más protoplastos por gramo de peso seco que la cepa silvestre, y tres veces más en el caso de la cepa $\Delta bcpmt4$.

En conjunto, estos resultados indican que las tres proteínas BcPMT contribuyen, de una manera u otra, a la estructura, la estabilidad o la rigidez de las envolturas celulares de *B. cinerea*. Es un hecho contrastado que las proteínas O-glicosiladas juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la pared celular fúngica [78,169], y esto también podría ser cierto para la ECM en el caso de *B. cinerea* [166]. Nuestros resultados sugieren que, en el caso de *B. cinerea*, la glicosilación de las proteínas presentes en la pared celular o la ECM es llevada a cabo por las tres BcPMTs, pero especialmente por BcPMT2.

Las cepas $\Delta bcpmt$ presentan una morfología atípica y producen menor cantidad de ECM

La observación al microscopio óptico de las hifas de las cepas $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$ reveló la presencia de células hinchadas, con forma de globo (**Publicación 2, Fig. 6A**). Estas alteraciones morfológicas revertieron parcialmente cuando se añadió un estabilizador osmótico al medio de cultivo (**Publicación 2, Fig. 6A**), lo que apunta a la presencia de una pared celular debilitada. En mutantes de los genes *pmt* de otros hongos, como *Aspergillus awamori* [103], *A. nidulans* [107,109], *A. fumigatus* [170] o *N. crassa* [171], también se ha descrito una morfología similar. El patrón de ramificación de las hifas también fue diferente para $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$, presentando un mayor número de puntos de ramificación en los dos casos (**Publicación 2, Fig. 6B**).

Experimentos de tinción con tinta china (**Publicación 2, Fig. 7A**) mostraron además que la ECM parece estar ausente en el mutante $\Delta bcpmt2$, y su cantidad se reduce en cierta medida en las cepas $\Delta bcpmt4$ y $\Delta bcpmt1$, especialmente cuando el hongo fue cultivado con agitación lenta. Una de las funciones propuestas para los polisacáridos extracelulares que forman parte de la ECM es la retención de agua en la zona circundante a las células [172] y, efectivamente, se pudo comprobar que la cepa $\Delta bcpmt2$ posee una capacidad de retención de agua bastante más pequeña que la cepa silvestre (**Publicación 2, Fig. 7B**), mientras que $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt4$ muestran valores intermedios, en consonancia con la cantidad de ECM revelada mediante la tinción con tinta china.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que las proteínas O-glicosiladas deben ser componentes cruciales de la ECM y que, entre ellas, se encuentran proteínas que son principalmente sustratos de BcPMT2, y en menor medida de BcPMT4. En concordancia con estos resultados, la delección del gen *pmt4* en el patógeno humano *Cryptococcus neoformans* también se traduce en una reducción de aproximadamente un 50% en el tamaño de la cápsula de polisacárido que rodea a las células de este organismo [111].

Los fenotipos descritos hasta ahora para los tres mutantes *pmt* de *B. cinerea*, así como los descritos para otros hongos filamentosos [107,109,114,168,173], no concuerdan con el patrón de dimerización de proteínas PMT descrito para *S. cerevisiae* [99] (PMT1/PMT2 y PMT4/PMT4). Si este patrón de dimerización es necesario para que las PMTs sean activas en *Botrytis*, entonces los fenotipos de las cepas $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt2$ serían similares, lo que, en función de los resultados descritos anteriormente, claramente no ocurre. Recientemente se ha descrito que las PMTs del hongo *A. nidulans* forman heterodímeros en cualquier tipo de combinación posible [100], lo que concuerda mejor con los fenotipos observados para los mutantes *bcpmt*.

Las tres cepas $\Delta bcpmt$ son menos virulentas, siendo $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$ incapaces de penetrar el tejido vegetal

Ensayos de virulencia en diversos hospedadores (**Publicación 2, Fig. 8**) revelaron que la cepa $\Delta bcpmt2$ es incapaz de infectar hojas intactas, pétalos o frutos de cualquiera de los hospedadores ensayados, y que las cepas $\Delta bcpmt1$ y $\Delta bcpmt4$ eran menos virulentos que la cepa silvestre. Se observó además, que la presencia de heridas en el tejido vegetal favorecía que las lesiones producidas por las cepas mutantes casi se igualaran a las producidas por la cepa silvestre (**Publicación 2, Tabla 1**), especialmente en el caso de $\Delta bcpmt4$, sugiriendo un papel de las PMTs en la penetración, de forma similar a lo descrito para el gen homólogo a *bcpmt4* en *U. maydis* [114].

La capacidad de penetrar el tejido vegetal se analizó en epidermis de cebolla (**Publicación 2, Fig. 9**). Tres aproximaciones experimentales diferentes (tinción con lactofenol azul-tripán y observación al microscopio óptico; observación de la autofluorescencia de las células de cebolla; y microscopía electrónica de barrido), indican que las cepas $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$ no son capaces de penetrar el tejido vegetal intacto. Además, se analizó si los mutantes *bcpmt* mostraban alguna deficiencia en la adhesión a la superficie vegetal, midiendo la fuerza con la que porciones de agar con micelio se adhieren a hojas de tabaco o vid. Los resultados mostraron que las cepas $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$, y en menor medida $\Delta bcpmt1$, presentan una capacidad reducida de adhesión (**Publicación 2, Fig. 10**).

El conjunto de ensayos realizados en distintos hospedadores confirman que los tres mutantes $\Delta bcpmt$ muestran una virulencia reducida, fundamentalmente debido a que son incapaces de adherirse y penetrar la superficie intacta de la planta hospedadora. Es interesante observar que los tres mutantes $\Delta bcpmt$ difieren entre sí, en lo que se refiere a la virulencia, de una manera similar a lo que se ha observado para cualquier otro aspecto de su fenotipo, es decir, $\Delta bcpmt2$ es el mutante con el fenotipo más afectado, $\Delta bcpmt1$ es el más similar a la cepa silvestre, y $\Delta bcpmt4$ presenta características intermedias.

Identificación de proteínas *O*-glicosiladas mediante 2D – MALDI-TOF/TOF

A la vista de la notable contribución de las PMTs a la virulencia de *B. cinerea*, se decidió abordar la identificación de sus sustratos, que pudiesen jugar un papel importante en la patogenicidad. Los cambios en el patrón de *O*-glicosilación de las proteínas secretadas por las cepas $\Delta bcpmt$ pueden provocar un comportamiento electroforético distinto de las mismas. Estas modificaciones fueron utilizadas para identificar proteínas que sirven como sustratos de las diferentes PMT. Análisis mediante SDS-PAGE de los secretomas, de las fracciones enriquecidas en proteínas de la ECM y de las proteínas extraídas de las membranas celulares (**Publicación 2, Fig. 11A**), mostraron cambios significativos en el patrón de bandas para los tres mutantes $\Delta bcpmt$ respecto a la cepa silvestre.

El análisis de los secretomas por electroforesis bidimensional (**Publicación 2, Fig. 11C**) mostró que el patrón de spots observado en el gel de la cepa $\Delta bcpmt1$ fue el más parecido al de la cepa silvestre, mientras que en el caso de la cepas $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$ se detectaron numerosas diferencias, en algunos casos apareciendo nuevos spots y en otros desapareciendo existentes en el secretoma de la cepa silvestre. Doce de los spots con una clara modificación en su movilidad electroforética (**Publicación 2, Fig. 11C**) fueron recortados de los geles y se identificaron un total de 10 proteínas en ellos (**Tabla 2**). Casi todas ellas (9 sobre 10) presentan en sus secuencias regiones con un alto contenido en Ser/Thr (40 % o más) y, por tanto, constituyen potenciales sustratos de las PMT de *B. cinerea*. Además, prácticamente todas ellas habían sido identificadas como proteínas potencialmente *O*-glicosiladas en el estudio *in silico* realizado previamente y discutido en apartados anteriores.

Purificación y análisis del glicosecretoma de *B. cinerea*

Como estrategia alternativa para identificar el mayor número posible de glicoproteínas secretadas al medio extracelular (glicosecretoma), se llevó a cabo una purificación de glicoproteínas mediante cromatografía de afinidad con concanavalina-A, a partir del medio de cultivo de las cuatro cepas del hongo. Como un indicador de la eficacia de la purificación lograda, se consideró en los análisis por SDS-PAGE, la desaparición de la banda correspondiente a la proteína más abundante en el secretoma de *B. cinerea* la proteasa aspártica BcAp8 [175], para la que no se predice *O*-glicosilación (**Publicación 3, Fig. 1**).

En este caso, se observaron nuevamente diferencias entre los glicosecretomas de las cepas mutantes y la cepa silvestre analizados por SDS-PAGE (**Publicación 3, Fig. 1B**), especialmente en el caso de $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$. Experimentos de electroforesis 2D y MALDI TOF/TOF, con las muestras de glicoproteínas purificadas a partir de la cepa silvestre y $\Delta bcpmt1$ revelaron un patrón de spots relativamente simple y permitieron la identificación de un total de 18 proteínas a partir de 29 spots recortados de los geles correspondientes a estas dos cepas (**Publicación 3, Fig. 2 y Archivo Adicional 1**). En algunos casos (spots 4, 10, 12 y 13) la misma proteína se identificó en varios spots que forman trenes de carga

(diferente pI), o incluso en algunos spots (4 y 12) con diferente movilidad en la segunda dimensión (aparentemente con diferente peso molecular) (**Publicación 3, Fig. 2**).

Tabla 2. Proteínas extracelulares con movilidad electroforética alterada en los geles 2D de las cepas $\Delta bcpmt$.

Spot	Nombre del gen	Similitud con otras proteínas de función conocida	Observaciones
1, 2, 11	BC1G_12374.1- BofuT4_P023950.1	Similar a proteínas de unión a IgE (BcIEB1).	Movilidad alterada en $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$.
3	BC1G_08658.1- BofuT4_P123410.1	Similar a carboxipeptidasa-A.	Desaparece en $\Delta bcpmt2$.
4	BC1G_02163.1- BofuT4_P011930.1	Snod-prot Like 1 ó cerato-platanina (BcSp11)	Movilidad alterada en $\Delta bcpmt2$ y $\Delta bcpmt4$ [42].
5	BC1G_04151.1- BofuT4_P095270.1	Similar a glucoamilasa.	Presente solo en $\Delta bcpmt1$.
6	BC1G_02021- BofuT4_P061670.1	Similar a GMC-oxidorreductasas.	Presente solo en $\Delta bcpmt2$.
7	BC1G_03070- BofuT4_P134040.1	Proteasa aspártica (BcAp8).	Movilidad alterada en $\Delta bcpmt2$.
8	BC1G_11143.1- BofuT4_P089370.1	Endopoligalacturonasa-1 (BcPG1).	Movilidad alterada en $\Delta bcpmt2$. Necesaria para la plena virulencia en <i>B. cinerea</i> . [67]
9	BC1G_08642- BofuT4_P123260.1	Desconocida.	Presente solo en $\Delta bcpmt2$.
10	N/A- BofuT4_P024480.1	<i>ekdA</i> .	Presente solo en $\Delta bcpmt2$, solo se encuentra una proteína homóloga en <i>S. sclerotiorum</i> . [174]
12	BC1G_10789.1- BofuT4_P064400.1	Similar a alfa-L-arabinofuranosidasas.	Presente solo en $\Delta bcpmt4$.

Los glicosecretomas también se analizaron mediante LC-MS/MS, y se identificaron 157 proteínas a partir de las cuatro cepas, 93 de ellas identificadas en el secretoma de la cepa silvestre (**Publicación 3, Archivo Adicional 1**). De las 18 proteínas identificadas mediante electroforesis 2D y MALDI TOF/TOF (apartado anterior), 17 fueron detectadas también por LC-MS/MS, sumando un total de 158 proteínas diferentes. 48 de estas proteínas se describen por primera vez como componentes del secretoma de *B. cinerea*, 18 en la cepa silvestre y las 30 restantes en el glicosecretoma de las cepas mutantes. El resto han sido descritas previamente en otros estudios [48-52,176,177]. La mayoría de las proteínas identificadas (133 de 158) mostraron péptido señal según SignalP, y otras 22 proteínas mostraron características para ser secretadas mediante alguna ruta de secreción alternativa, según el servidor SecretomeP [154].

La comparación de los datos de abundancia relativa obtenidos por LC/MS-MS de las glicoproteínas más abundantes mostró que la mutación de cualquiera de los genes *bcpmt* no produce la desaparición de ninguna glicoproteína que esté presente en el glicosecretoma de

la cepa silvestre (**Publicación 3, Tabla 1**). Este hecho dificultó en gran medida la identificación de proteínas que fueran sustrato de una PMT en concreto. Por otra parte, estos datos parecen indicar que las proteínas glicosiladas son el resultado de la participación de varias PMTs, en vez de originarse mediante la acción de una sola de ellas, y son consistentes con que las PMTs de *B. cinerea* formen dímeros funcionales en cualquier tipo de combinación posible, tal como se ha propuesto para *Aspergillus nidulans* [100].

Las 158 proteínas fueron clasificadas en familias (**Publicación 3, Archivo Adicional 1**) en base a similitudes de secuencia con proteínas de función conocida (análisis con el algoritmo BLAST) y a la presencia de dominios conservados (búsqueda en el servidor Pfam), tal como se detalla en material y métodos. La distribución de las proteínas por familias fue similar para la cepa silvestre y las tres cepas $\Delta bcpmt$ (**Publicación 3, Fig. 3**), lo que indica que cada PMT no actúa preferentemente sobre una determinada familia de proteínas, al menos de una forma muy evidente. A partir de estos resultados, es posible concluir que el glicosecretoma de *B. cinerea* está compuesto principalmente por hidrolasas de polisacáridos (~36%), seguido de proteasas (~14%) y oxidorreductasas (~13%). El resto de las familias (~37%) están representadas por una cantidad similar de proteínas y contribuyen siempre menos del 10% a la composición total.

Ocho de cada diez proteínas del glicosecretoma contienen regiones ricas en Ser/Thr y casi la mitad poseen pHGRs

Las secuencias de las 158 glicoproteínas identificadas experimentalmente en el glicosecretoma de *B. cinerea* se utilizaron para llevar a cabo un análisis *in silico* similar al descrito en la primera parte de esta tesis doctoral. En primer lugar hay que destacar que los residuos de Ser y Thr son muy abundantes entre las 158 glicoproteínas. Como promedio, el 38% de todos los residuos de estas proteínas son Ser ó Thr, mientras que en las proteínas potencialmente secretadas descritas en el análisis *in silico* inicial, fue de solamente un 17%. En segundo lugar, la proporción de proteínas con regiones ricas en Ser/Thr, así como el número total de estas regiones, es comparativamente mayor para el conjunto de las 158 glicoproteínas identificadas experimentalmente que para el conjunto de proteínas potencialmente secretadas (**Publicación 3, Fig. 4A**). Por ejemplo, el 80% de las glicoproteínas muestra regiones con al menos un 40% de contenido en Ser/Thr, mientras que sólo el 46% de las proteínas potencialmente secretadas exhibieron este tipo de regiones. En particular, en 7 de las 158 glicoproteínas identificadas experimentalmente se detectaron regiones de 20-32 residuos, en las que al menos el 80% de los aminoácidos son Ser o Thr.

Cuando se analizó la *O*- y la *N*-glicosilación en el conjunto de glicoproteínas purificadas, el número promedio de residuos potencialmente *O*-glicosilados (según NetOglyc) fue aproximadamente tres veces mayor que el número de *N*-glicosilaciones (según NetNGlyc). Haciendo uso de la *Macro-XRR*, se observó que el 45% de estas proteínas presentan pHGRs, aproximadamente el doble de la cifra obtenida para el conjunto de proteínas potencialmente secretadas (23%)[82] (**Publicación 3, Fig. 4B**). Sin embargo, esta tendencia no se detectó para los sitios de *N*-glicosilación. Finalmente, se observó en todas ellas una marcada tendencia de las regiones ricas en Ser/Thr y, especialmente de las pHGRs,

a localizarse cerca del extremo C-terminal (**Publicación 3, Fig. 4C**), aunque también son comunes en el extremo N-terminal inmediatamente después del péptido señal.

Las regiones ricas en Ser/Thr retienen parcialmente a las proteínas en el micelio

Una de las hipótesis que se habían planteado a partir del análisis *in silico* inicial hacía referencia a que la presencia de HGRs podría contribuir a la retención de las proteínas en la pared celular o la ECM. Por lo tanto, las proteínas con un patrón de glicosilación alterado en los mutantes *Δbcpmt* deberían escapar más fácilmente de la pared celular y la ECM, acumulándose en mayor medida en el medio de cultivo. Para contrastar esta hipótesis, se llevaron a cabo dos aproximaciones complementarias. En primer lugar, utilizando los datos de LC-MS/MS (número de cuentas espectrales), se calculó la abundancia relativa de cada proteína en los mutantes *Δbcpmt* respecto a su abundancia en el glicosecretoma de la cepa silvestre. Seguidamente, con estos datos, se calcularon las medias de abundancias relativas de las proteínas con y sin pHGRs respecto a la cepa silvestre. Los resultados obtenidos (**Publicación 3, Figura 4D**) muestran que la abundancia relativa de las proteínas que poseen pHGRs es de media 1,4 veces mayor en los glicosecretomas de los mutantes que en el glicosecretoma de la cepa silvestre, mientras que no se observaron diferencias de abundancia entre los mutantes y la cepa silvestre en las proteínas que no contienen pHGRs. Estos resultados corroboran la hipótesis de que las pHGRs contribuyen en cierta medida a la retención de las proteínas en la pared celular o la ECM.

En segundo lugar, como aproximación experimental para validar esta hipótesis, se generaron dos cepas de *B. cinerea* que expresaron sendas proteínas de fusión. Ambas contienen la proteína BcSpl1 [42] fusionada a la proteína reportera GFP, pero diferenciadas en que una de ellas (BcSpl1-GFP-ST) posee además una región rica en Ser/Thr en su extremo C-terminal, originalmente procedente de la endoglucanasa Cel5A [55], y la otra (BcSpl1-GFP) no contiene esta región. Los niveles de fluorescencia de las cepas transformantes, observados al microscopio de fluorescencia, fueron ligeramente diferentes (**Publicación 3, Fig. 5A**). El análisis de extractos proteicos procedentes del micelio y del sobrenadante mediante transferencia Western con anticuerpos monoclonales anti-GFP, permitió estimar qué porcentaje de proteína de fusión es liberada al medio extracelular en cada cepa (**Publicación 3, Figura 5B y C**). Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de proteína de fusión liberada entre ambas cepas, aunque el efecto de la introducción de la cola rica en Ser/Thr en la proteína no fue espectacular. Así, solamente el 18,2% de la proteína de fusión que posee la región rica en Ser/Thr es liberada al medio extracelular, mientras que si esta región no está presente, este porcentaje asciende hasta un 27,7%.

Con el objetivo de relacionar la glicosilación con este efecto de retención de las glicoproteínas en la ECM o la pared celular, fue necesario comprobar experimentalmente si la región rica en Ser/Thr que forma parte de la proteína de fusión está realmente O-glicosilada. Para ello, una muestra del secretoma de estas cepas fue tratada con α 1-6-exo-manosidasa y α 1-2,3-exo-manosidasa, y el resultado se analizó mediante transferencia Western con anticuerpos anti *c-myc* (**Publicación 3, Figura 6**). Como consecuencia del

tratamiento con α 1-2,3-exo-manosidasa, se observó una reducción considerable del tamaño de la proteína BcSpl1-GFP-ST, que no se detectó en el caso de la proteína BcSpl1-GFP. Estos resultados indican, por lo tanto, que la región rica en Ser/Thr de BcSpl1-GFP-ST está altamente glicosilada, y esto sumado a los resultados anteriores, permite concluir que la glicosilación de esta región contribuye a la retención de la proteína en la pared celular y/o la ECM. Como se ha comentado, este efecto de la glicosilación puede ser importante fisiológicamente para *B. cinerea*, ya que la actividad de enzimas que actúan sobre sustratos solubles para producir nutrientes asimilables por las células fúngicas puede ser más eficiente si estas enzimas se mantienen retenidas en la proximidad de las células.

Sobreexpresión de proteínas *O*-glicosiladas en *B. cinerea*

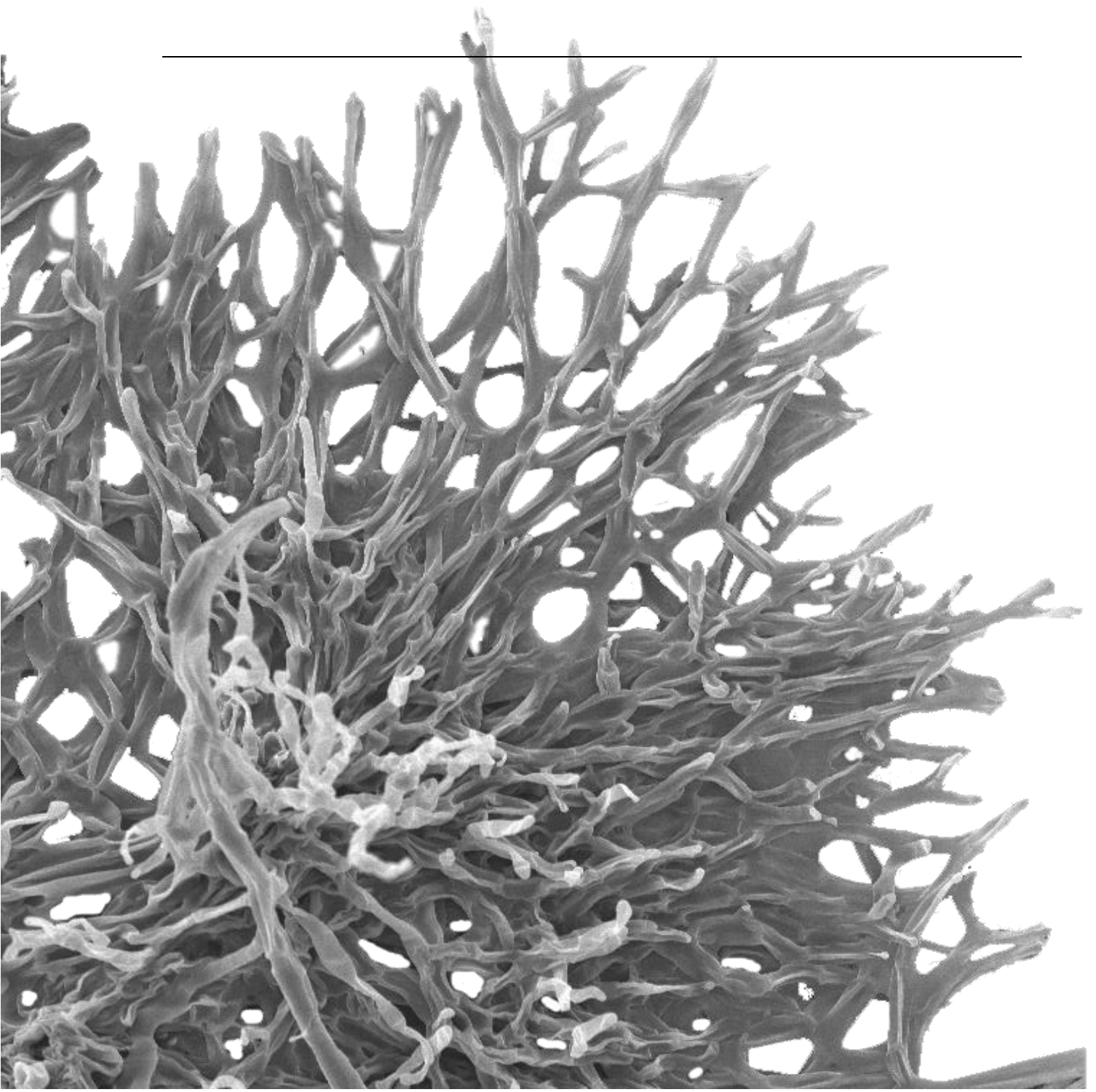
Tres de las proteínas detectadas como componentes del glicosecretoma fueron sobreexpresadas en *B. cinerea* (ver Material y Métodos). Una de ellas es la endopoligalaturonasa BcPG1, reconocida como un factor de patogenicidad de *B. cinerea* [67], y también como PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) en su interacción con *Arabidopsis* [70]. Las otras dos proteínas poseen funciones desconocidas, y las hemos denominado BcIEB1 (B0510_2361, similar a proteínas de unión a IgE) y BcSUN1 (B0510_8844, similar a los miembros de la familia SUN de levaduras). La elección de estas tres proteínas se basó en que difieren en el número o longitud de las regiones ricas en Ser/Thr y en el número de *O*-glicosilaciones que se predice *in silico* para cada una de ellas (**Publicación 3, Archivo Adicional 1**).

Los medios de cultivo procedentes de estas cepas fueron tratados α 1-6-exo-manosidasa y α 1-2,3-exo-manosidasa y el producto de la digestión se analizó mediante transferencia Western con anticuerpos anti *c-myc* (**Publicación 3, Figura 6**). Como consecuencia del tratamiento con manosidasas, se observó una reducción del tamaño que fue considerable para BcSUN1 (estimado en 20-25 kDa), limitado para BcIEB1 (estimado en 1-2 kDa), y no detectable para BcPG1, en concordancia con la cantidad de sitios de glicosilación predichos para las tres proteínas con el servidor NetOGlyc. Al igual que lo observado para la proteína de fusión BcSpl1-GFP-ST, esta reducción del peso molecular se observó sólo para la incubación con la α 1-2,3-exo-manosidasa. Estos resultados indican, por lo tanto, que al menos BcSUN1 y BcIEB1 están altamente glicosiladas y que las cadenas de azúcares contienen primordialmente manosas enlazadas por enlaces glicosídicos de tipo α 1-2 o α 1-3. Este tipo de enlaces también se han descrito en otras glicoproteínas de hongos y levaduras, [77].

Los medios de cultivo de las cepas que sobreexpresan BcIEB1, BcPG1 y BcSUN1 fueron utilizados para analizar si eran capaces de provocar respuestas de defensa en plantas. Su infiltración en hojas de tabaco adultas produjo necrosis de la zona infiltrada tras 24 horas para todas las muestras, sin diferencia en la intensidad o el curso temporal de la respuesta entre las cepas transformantes y la cepa silvestre. Con el fin de analizar si este efecto necrótico en el hospedador está relacionado con la inducción de las defensas vegetales, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de crecimiento de plántulas de tabaco [178-180]. Los medios de cultivo de las tres cepas que sobreexpresan las proteínas recombinantes se

mostraron considerablemente más eficientes en la inhibición del crecimiento de las plántulas de tabaco, en comparación con el medio obtenido a partir de la cepa silvestre (**Publicación 3, Figura 7**). Además, las plántulas mostraron síntomas necróticos que eran claramente más intensos. Estos resultados no son sorprendentes en el caso de la proteína BcPG1, ya que, como se ha descrito, esta proteína es reconocida como un PAMP por un receptor de tipo PRR en *Arabidopsis* [70]. Sin embargo, la habilidad para inducir las defensas vegetales por las otras dos proteínas si es un hecho completamente inesperado. A este respecto, es tentador especular que la parte responsable de la inducción de las defensas de las plantas sea la fracción de carbohidratos, ya que se trata de una característica compartida por las tres proteínas, pero es evidente que la explicación alternativa, es decir, la presencia de diferentes secuencias de aminoácidos en las tres proteínas que pueden actuar como elicitores es perfectamente plausible.

CONCLUSIONES



1. El análisis de los genomas de cuatro organismos fúngicos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Ustilago maydis*) y otros cuatro no fitopatógenos (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*), indica que como promedio aproximadamente una décima parte de las proteínas codificadas por cada uno de ellos son potencialmente secretadas, no existiendo una relación entre el carácter fitopatógeno o no de estos organismos y el porcentaje de proteínas potencialmente secretadas.

2. La mitad de estas proteínas potencialmente secretadas posee al menos una región con alto contenido en residuos de serina y treonina. Asimismo, para el 23,6% se predice al menos una región hiperglicosilada, en las que uno de cada cuatro aminoácidos está potencialmente *O*-glicosilado, y que se localizan con frecuencia cerca de los extremos amino o carboxilo de las proteínas.

3. El genoma de *Botrytis cinerea* contiene tres genes que codifican para Protein-*O* manosiltransferasas, o PMTs, que hemos denominado *bcpmt1*, *bcpmt2* y *bcpmt4*. Estos genes se expresan de forma constitutiva tanto en cultivo axénico como durante la infección. Las tres proteínas que codifican son estructuralmente similares al resto de PMTs fúngicas y poseen todos los dominios y motivos conservados en esta familia.

4. BcPMT2 es la manosiltransferasa que contribuye en mayor medida a la *O*-glicosilación de proteínas implicadas en mantener la estructura de la pared celular y la matriz extracelular, y es también esencial para el correcto crecimiento, dispersión y virulencia de *Botrytis cinerea*.

5. BcPMT4 está implicada en menor medida en la *O*-glicosilación de proteínas estructurales de la pared o la matriz, aunque también contribuye al crecimiento y dispersión del hongo. También participa de alguna manera en la *O*-glicosilación de proteínas que intervienen en la penetración de la superficie de la planta por parte del hongo, afectando drásticamente el proceso infectivo.

6. La ausencia de BcPMT1 apenas causó alteraciones fenotípicas, por lo que su contribución en la *O*-glicosilación de *Botrytis cinerea* no es esencial.

7. El glicosecretoma de *Botrytis cinerea* está constituido por al menos 158 proteínas de las que aproximadamente un 36% son hidrolasas de polisacáridos, un 14% son proteasas y un 13% son oxidorreductasas. 8 de cada 10 contienen como mínimo una región rica en serina y treonina, y para el 45% se predicen regiones hiperglicosiladas que muestran también una clara tendencia a situarse en los extremos de las proteínas.

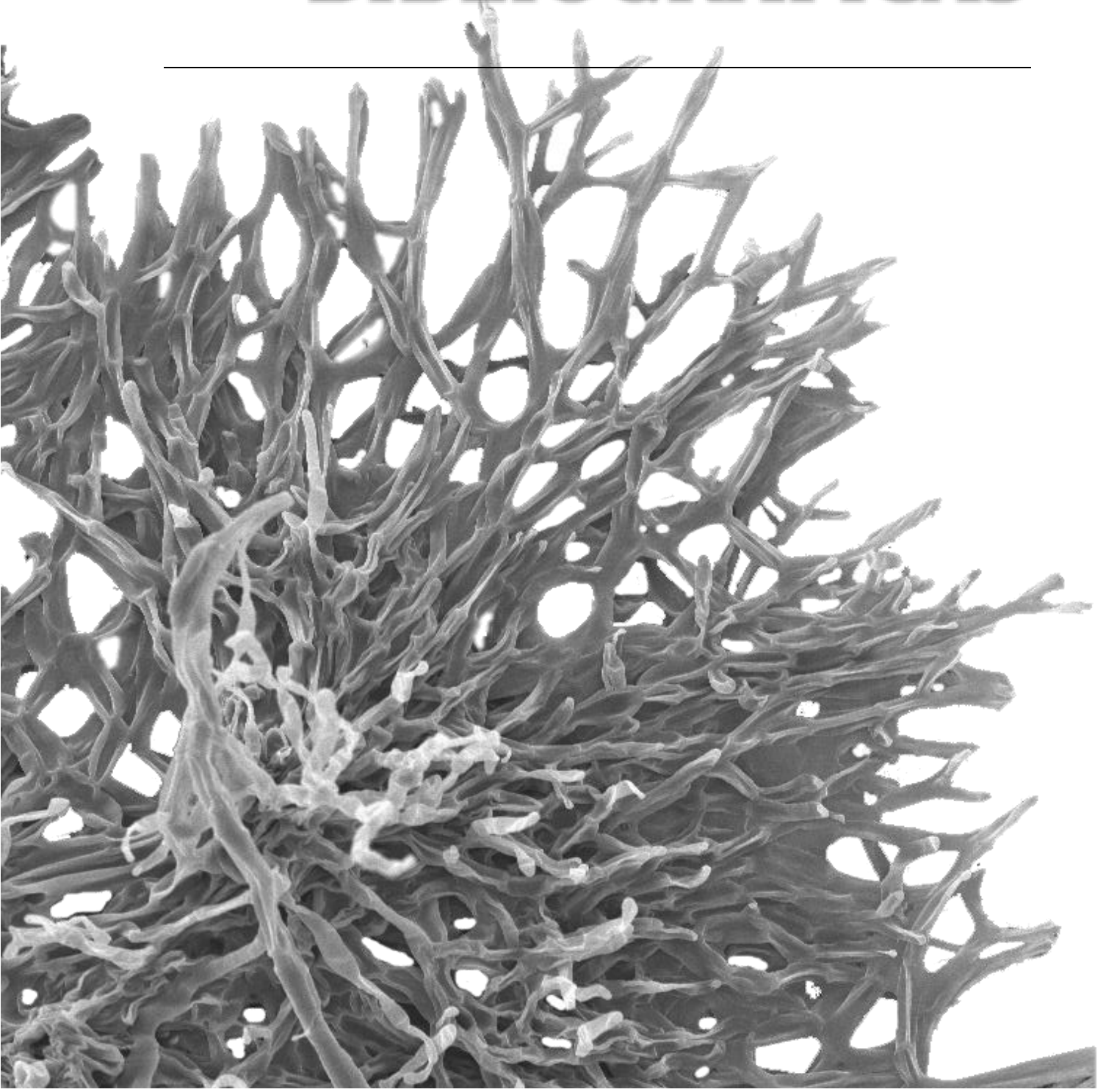
8. La mutación de los genes *bcpmt* permitió identificar 9 proteínas secretadas por *B. cinerea* con movilidad electroforética alterada y que presentan en sus secuencias regiones con un alto contenido en serina y treonina, constituyendo potenciales sustratos de las PMTs del hongo.

9. La presencia de regiones ricas en residuos de serina y treonina *O*-glicosilados causa una retención parcial de las proteínas en la pared celular y/o en la matriz extracelular del hongo.

10. Las cadenas glicosídicas de dos de las proteínas potencialmente hiperglicosiladas del glicosecretoma de *Botrytis cinerea*, BcIEB1 y BcSUN1, contienen primordialmente manosas enlazadas por enlaces glicosídicos de tipo α 1-2 o α 1-3.

11. Una mayor concentración de las glicoproteínas BcPG1, BcIEB1 o BcSUN1 en el secretoma de *B. cinerea* produce un incremento de su capacidad para inhibir el crecimiento de plántulas de tabaco, en comparación con la cepa silvestre, lo que posiblemente indica que estas proteínas son reconocidas por el sistema inmune vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Referencias bibliográficas

1. **Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N.** 2004. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction, p. 1-8. *En:* Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
2. **Jarvis, W. R.** 1977. *Botrytinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph No. 15. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
3. **Dean, R., van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G. D.** 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 414-430.
4. **Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. y Van Kan, J. A. L.** 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.
5. **Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. y Brygoo, Y.** 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Mol. Biol. Evol.* 14: 1177-1185.
6. **Staats, M., Van Baarlen, P. y Van Kan, J. A. L.** 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Mol. Biol. Evol.* 22: 333-346.
7. **Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. y Jarvis, W. R.** 1980. *The biology of Botrytis*. Academic Press, London.
8. **Droby, S. y Lichter, A.** 2004. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management, p. 349-367. *En:* Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
9. **Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. y Van Kan, J. A. L.** 2000. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens, p. 33-64. *En:* Kronstad, J. (ed.), *Fungal Pathology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
10. **Osharov, N. y May, G. S.** 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 153-160.
11. **Schumacher, J. y Tudzynski, P.** 2012. Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*, p. 225-241. *En:* Pérez-Martín, J. and Di Pietro, A. (eds.), *Morphogenesis and pathogenicity in fungi*. Springer, Berlin/Heidelberg.
12. **Tenberge, K. B.** 2004. Morphology and cellular organisation in *Botrytis* interactions with plants, p. 67-84. *En:* Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/ Boston/ London.
13. **Holz, G., Coertze, S. y Williamson, B.** 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces, p. 9-28. *En:* Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/ Boston/ London.
14. **Backhouse, D. y Willetts, H. J.** 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Can. J. Microbiol.* 30: 171-178.
15. **Legard, D. E., Mertely, J. C., Xiao, C. L., Chandler, C. K., Duval, J. R. y Price, J. P.** 2002. Cultural and chemical control of *Botrytis* fruit rot of strawberry in annual winter production systems. *Proceedings of the Fourth International Strawberry Symposium, Vols 1 and 2* 651-654.
16. **Legard, D. E., Xiao, C. L., Mertely, J. C. y Chandler, C. K.** 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Dis.* 84: 531-538.

17. **Jarvis, W. R.** 1998. Control de enfermedades en cultivos de invernadero. Mundi-Prensa, Madrid.
18. **Elad, Y. y Stewart, A.** 2004. Microbial control of *Botrytis* spp., p. 223-241. *En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
19. **Leroux, P.** 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides, p. 195-222. *En: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
20. **Anuario de Estadística 2013;** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2013.
21. **Hahn, M., Leroch, M., Mosbach, A., Mernke, D., Kretschmer, M., Walker, A. S. y Fillinger, S.** 2010. " Multidrug resistance" in *Botrytis cinerea*: Molecular basis and practical relevance of a new fungicide resistance mechanism in agriculture. *Julius-Kühn-Archiv* 428: 172.
22. **Hahn, M.** 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *J. Chem. Biol.* 7: 133-141.
23. **Donmez, M. F., Esitken, A., Yildiz, S. y Ercisli, S.** 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *J. Anim. Plant Sci.* 21: 758-763.
24. **Magnin-Robert, M., Quantinet, D., Couderchet, M., Aziz, A. y Trotel-Aziz, P.** 2013. Differential induction of grapevine resistance and defense reactions against *Botrytis cinerea* by bacterial mixtures in vineyards. *Biocontrol* 58: 117-131.
25. **Liu, J., Wisniewski, M., Artlip, T., Sui, Y., Droby, S. y Norelli, J.** 2013. The potential role of *PR-8* gene of apple fruit in the mode of action of the yeast antagonist *Candida oleophila* in postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol. Technol.* 85: 203-209.
26. **Paul, B.** 1999. *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiol. Lett.* 181: 277-280.
27. **Choi, G. J., Kim, J. C., Jang, K. S., Cho, K. Y. y Kim, H. T.** 2008. Mycoparasitism of *Acremonium strictum* BCP on *Botrytis cinerea*, the gray mold pathogen. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 167-170.
28. **Cheng, C. H., Yang, C. A. y Peng, K. C.** 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* Mycelium in Culture Conditions. *Phytopathology* 102: 1054-1063.
29. **Gielen, S., Aerts, R. y Seels, B.** 2004. Biocontrol agents of *Botrytis cinerea* tested in climate chambers by making artificial infection on tomato leaves. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 69: 631-639.
30. **Kumar, J.** 2012. Evaluation of Risks Related to the Release of Biocontrol agents Active against Plant Pathogens. Centre of advanced faculty training in plant pathology.
31. **Chetelat, R. T., Cisneros, P., Stamova, L. y Rick, C. M.** 1997. A male-fertile *Lycopersicon esculentum* x *Solanum lycopersicoides* hybrid enables direct backcrossing to tomato at the diploid level. *Euphytica* 95: 99-108.
32. **Finkers, R., van den, B. P., van, B. R., Ten, H. A., van Heusden, A. W., van Kan, J. A. y Lindhout, P.** 2007. Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 114: 585-593.
33. **Lorito, M., Woo, S. L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. y Fernandez, I. G.** 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens [published erratum appears in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998 Oct 13;95(21):12734]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 7860-7865.

34. **Agüero, C. B., Uratsu, S. L., Greve, C., Powell, A. L. T., Labavitch, J. M., Meredith, C. P. y Dandekar, A. M.** 2005. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Mol. Plant Pathol.* 6: 43-51.
35. **Kirubakaran, S. I., Begum, S. M., Ulaganathan, K. y Sakthivel, N.** 2008. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 918-927.
36. **Jeon, E. H., Pak, J. H., Kim, M. J., Kim, H. J., Shin, S. H., Lee, J. H., Kim, D. H., Oh, J. S., Oh, B. J., Jung, H. W. y Chung, Y. S.** 2012. Ectopic expression of ubiquitin-conjugating enzyme gene from wild rice, OgUBC1, confers resistance against UV-B radiation and *Botrytis* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19;427: 309-314.
37. **Elad, Y. y Evensen, K. B.** 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85: 637-643.
38. **Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A. y Viaud, M.** 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* 277: 1-10.
39. **van Kan, J. A.** 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11: 247-253.
40. **Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. y Prats, E.** 2008. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59: 501-520.
41. **Govrin, E. M. y Levine, A.** 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10: 751-757.
42. **Frías, M., González, C. y Brito, N.** 2011. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* 192: 483-495.
43. **Frías, M., Brito, N. y González, C.** 2013. The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. *Mol. Plant Pathol.* 14: 191-196.
44. **Noda, J., Brito, N. y Gonzalez, C.** 2010. The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biol.* 10: 38.
45. **Weiberg, A., Wang, M., Lin, F. M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H. D. y Jin, H.** 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science.* 342: 118-123.
46. **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., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthouard, V. Á., 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., González, 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. y Dickman, M.** 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 7: e1002230.
47. **Staats, M. y van Kan, J. A. L.** 2012. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryotic Cell* 11: 1413-1414.

48. **Shah, P., Atwood, J. A., Orlando, R., El, M. H., Podila, G. K. y Davis, M. R.** 2009. Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *J. Proteome Res.* 8: 1123-1130.
49. **Shah, P., Gutiérrez-Sánchez, G., Orlando, R. y Bergmann, C.** 2009. A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics* 9: 3126-3135.
50. **Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R. y González, C.** 2010. The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10: 3020-3034.
51. **Li, B., Wang, W., Zong, Y., Qin, G. y Tian, S.** 2012. Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 11: 4249-4260.
52. **Girard, V., Cherrad, S., Dieryckx, C., Gonçalves, I., Dupuy, J. W., Bonneu, M., Rascle, C., Job, C., Job, D. y Vacher, S.** 2012. Proteomic analysis of proteins secreted by *Botrytis cinerea* in response to heavy metal toxicity. *Metallomics* 4: 835-846.
53. **González-Fernández, R., Aloria, K., Valero-Galván, J., Redondo, I., Arizmendi, J. M. y Jorrín-Novo, J. V.** 2013. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *J. Proteomics*.
54. **Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carbú, M., Wieneke, U., Cantoral, J. M. y Schimdt, J.** 2010. 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *Proteomics* 10: 2270-2280.
55. **Espino, J. J., Brito, N., Noda, J. y González, C.** 2005. *Botrytis cinerea* endo- β -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66: 213-221.
56. **Brito, N., Espino, J. J. y González, C.** 2006. The endo- β -1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 25-32.
57. **Van Kan, J. A. L., van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T. y van der Vlugt-Bergmans, C. J. B.** 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 30-38.
58. **Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L. y Van Kan, J. A. L.** 2005. Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: *Bcpme1* and *Bcpme2* are dispensable for virulence of strain B05.10. *Mol. Plant Pathol.* 6: 641-652.
59. **Fu, J., Prade, R. y Mort, A.** 2001. Expression and action pattern of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) rhamnogalacturonan hydrolase in *Pichia pastoris*. *Carbohydr. Res.* 330: 73-81.
60. **Reis, H., Pfiffi, S. y Hahn, M.** 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 6: 257-267.
61. **ten Have, A., Espino, J. J., Dekkers, E., Sluyter, S. C. V., Brito, N., Kay, J., González, C. y van Kan, J. A.** 2010. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet. Biol.* 47: 53-65.
62. **ten Have, A., Dekkers, E., Kay, J., Phylip, L. H. y Van Kan, J. A. L.** 2004. An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology* 150: 2475-2489.
63. **Rolke, Y., Liu, S. J., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K. M., Siewers, V., Tenberge, K. B., Tudzynski, B. y Tudzynski, P.** 2004. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* 5: 17-27.

64. **Schouten, A., van Baarlen, P. y van Kan, J. A. L.** 2008. Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol.* 177: 493-505.
65. **Poinssot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thevenot, P. y Pugin, A.** 2003. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 553-564.
66. **Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C. y Boccara, M.** 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 360-367.
67. **ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. y van Kan, J. A.** 1998. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1009-1016.
68. **Kars, I., Krooshof, G. H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J. A. E. y Van Kan, J. A. L.** 2005. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.* 43: 213-225.
69. **Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentejac, M. y Pugin, A.** 2006. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 429-440.
70. **Zhang, L., Kars, I., Essenstam, B., Liebrand, T. W., Wagemakers, L., Elberse, J., Tagkalaki, P., Tjoitang, D., Van den Ackerveken, G. y van Kan, J. A.** 2014. Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the arabidopsis receptor-like protein responsiveness to *Botrytis* poligalacturonase1 *Plant Physiol.* 164: 352-364.
71. **Patel, R. M., Van Kan, J. A. L., Bailey, A. M. y Foster, G. D.** 2008. RNA-mediated gene silencing of superoxide dismutase (*bcsod1*) in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 98: 1334-1339.
72. **Frías Marcos, Brito Nélida, González Mario y Gonzalez, C.** 2013. The phytotoxic activity of the cerato-platanin BcSpl1 resides in a two-peptide motif in the protein surface. *Mol Plant Pathol.* 15:342-51.
73. **Nafisi, M., Stranne, M., Zhang, L., van, K. J. y Sakuragi, Y.** 2014. The endo-arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.*
74. **Lehle, L., Strahl, S. y Tanner, W.** 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45: 6802-6818.
75. **Hanisch, F. G.** 2001. *O*-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* 382: 143-149.
76. **Burda, P. y Aebi, M.** 1999. The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426: 239-257.
77. **Goto, M.** 2007. Protein *O*-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 1415-1427.
78. **Lommel, M. y Strahl, S.** 2009. Protein *O*-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* 19: 816-828.
79. **Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R. y Brunak, S.** 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type *O*-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153-164.
80. **Hutzler, J., Schmid, M., Bernard, T., Henrissat, B. y Strahl, S.** 2007. Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein *O*-mannosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 7827-7832.

81. **Fernández-Álvarez, A., Marín-Menguiano, M., Lanver, D., Jiménez-Martín, A., Elías-Villalobos, A., Pérez-Pulido, A. J., Kahmann, R. y Ibeas, J. I.** 2012. Identification of *O*-mannosylated Virulence Factors in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 8: e1002563.
82. **González M, Brito N y González C.** 2012. High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-*O*-glycosylated in the extracellular proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiol.* 12: 213.
83. **Gentzsch, M. y Tanner, W.** 1996. The PMT gene family: protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* 15: 5752-5759.
84. **Lussier, M., Sdicu, A. M. y Bussey, H.** 1999. The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426: 323-334.
85. **Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. y Tanner, W.** 1999. Protein *O*-mannosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426: 297-307.
86. **Loibl, M., Wunderle, L., Hutzler, J., Schulz, B. L., Aebi, M. y Strahl, S.** 2014. Protein O-mannosyltransferases associate with the translocon to modify translocating polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* 289: 8599-8611.
87. **Lussier, M., Sdicu, A. M., Winnett, E., Vo, D. H., Sheraton, J., Dusterhoft, A., Storms, R. K. y Bussey, H.** 1997. Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of KTR5, KTR6 and KTR7 and definition of the nine-membered KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast.* 13: 267-274.
88. **Romero, P. A., Lussier, M., Veronneau, S., Sdicu, A. M., Herscovics, A. y Bussey, H.** 1999. Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology.* 9: 1045-1051.
89. **Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. y Strahl, S.** 2005. Protein *O*-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol.* 57: 156-170.
90. **Willer, T., Valero, M. C., Tanner, W., Cruces, J. y Strahl, S.** 2003. O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 621-630.
91. **Loibl, M. y Strahl, S.** 2013. Protein O-mannosylation: what we have learned from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833: 2438-2446.
92. **Girrbach, V., Zeller, T., Priesmeier, M. y Strahl-Bolsinger, S.** 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein *O*-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem.* 275: 19288-19296.
93. **Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. y Strahl, S.** 2002. Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein *O*-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology.* 12: 771-783.
94. **Peltroche-Llacsahuanga, H., Goyard, S., d'Enfert, C., Prill, S. K. H. y Ernst, J. F.** 2006. Protein O-mannosyltransferase isoforms regulate biofilm formation in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3488-3491.
95. **Nett, J. H., Cook, W. J., Chen, M. T., Davidson, R. C., Bobrowicz, P., Kett, W., Brevnova, E., Potgieter, T. I., Mellon, M. T., Prinz, B., Choi, B. K., Zha, D., Burnina, I., Bukowski, J. T., Du, M., Wildt, S. y Hamilton, S. R.** 2013. Characterization of the *Pichia pastoris* protein-*O*-mannosyltransferase gene family. *PLoS. One.* 8: e68325.
96. **Strahl-Bolsinger, S. y Scheinost, A.** 1999. Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein *O*-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 274: 9068-9075.

97. **Lommel, M., Schott, A., Jank, T., Hofmann, V. y Strahl, S.** 2011. A conserved acidic motif is crucial for enzymatic activity of protein *O*-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 286: 39768-39775.
98. **Gentzsch, M., Immervoll, T. y Tanner, W.** 1995. Protein *O*-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: the protein *O*-mannosyltransferases Pmt1p and Pmt2p function as heterodimer. *FEBS Lett.* 377: 128-130.
99. **Girrbach, V. y Strahl, S.** 2003. Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein *O*-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J. Biol. Chem.* 278: 12554-12562.
100. **Kriangkripiat, T. y Momany, M.** 2014. *Aspergillus nidulans* Pmts form heterodimers in all pairwise combinations. *FEBS Open Bio* 4: 335-341.
101. **Orchard, M. G., Neuss, J. C., Galley, C. M., Carr, A., Porter, D. W., Smith, P., Scopes, D. I., Haydon, D., Vousden, K., Stubberfield, C. R., Young, K. y Page, M.** 2004. Rhodanine-3-acetic acid derivatives as inhibitors of fungal protein mannosyl transferase 1 (PMT1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3975-3978.
102. **Argyros, R., Nelson, S., Kull, A., Chen, M. T., Stadheim, T. A. y Jiang, B.** 2013. A phenylalanine to serine substitution within an *O*-protein mannosyltransferase led to strong resistance to PMT-inhibitors in *Pichia pastoris*. *PLoS. One.* 8: e62229.
103. **Oka, T., Sameshima, Y., Koga, T., Kim, H., Goto, M. y Furukawa, K.** 2005. Protein *O*-mannosyltransferase A of *Aspergillus awamori* is involved in *O*-mannosylation of glucoamylase I. *Microbiology.* 151: 3657-3667.
104. **Harrison, M. J., Nouwens, A. S., Jardine, D. R., Zachara, N. E., Gooley, A. A., Nevalainen, H. y Packer, N. H.** 1998. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulase-producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Eur. J Biochem.* 256: 119-127.
105. **Zhou, H., Hu, H., Zhang, L., Li, R., Ouyang, H., Ming, J. y Jin, C.** 2007. *O*-Mannosyltransferase 1 in *Aspergillus fumigatus* (AfPmt1p) is crucial for cell wall integrity and conidium morphology, especially at an elevated temperature. *Eukaryot. Cell.* 6: 2260-2268.
106. **Deshpande, N., Wilkins, M. R., Packer, N. y Nevalainen, H.** 2008. Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* 18: 626-637.
107. **Goto, M., Harada, Y., Oka, T., Matsumoto, S., Takegawa, K. y Furukawa, K.** 2009. Protein *O*-mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 8: 1465-1474.
108. **Lengeler, K. B., Tielker, D. y Ernst, J. F.** 2008. Protein-*O*-mannosyltransferases in virulence and development. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 528-544.
109. **Oka, T., Hamaguchi, T., Sameshima, Y., Goto, M. y Furukawa, K.** 2004. Molecular characterization of protein *O*-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 150: 1973-1982.
110. **Prill, S. K. H., Klinkert, B., Timpel, C., Gale, C. A., Schroppel, K. y Ernst, J. F.** 2005. PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol. Microbiol.* 55: 546-560.
111. **Willger, S. D., Ernst, J. F., Alspaugh, J. A. y Lengeler, K. B.** 2009. Characterization of the PMT gene family in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS. One.* 4: e6321.
112. **Olson, G. M., Fox, D. S., Wang, P., Alspaugh, J. A. y Buchanan, K. L.** 2007. Role of protein *O*-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell.* 6: 222-234.

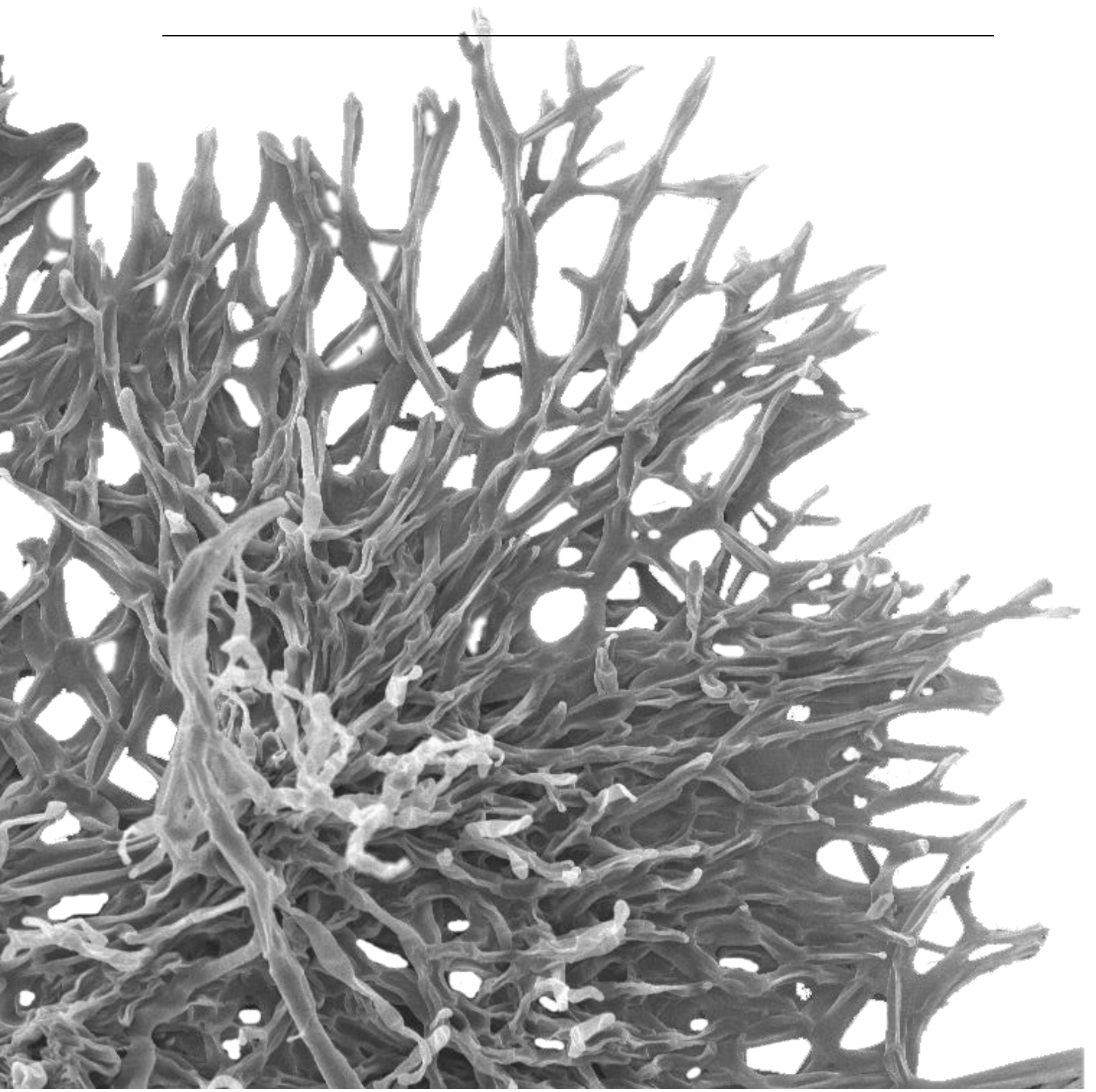
113. **Rouabhia, M., Schaller, M., Corbucci, C., Vecchiarelli, A., Prill, S. K., Giasson, L. y Ernst, J. F.** 2005. Virulence of the fungal pathogen *Candida albicans* requires the five isoforms of protein mannosyltransferases. *Infect. Immun.* 73: 4571-4580.
114. **Fernández-Álvarez, A., Elías-Villalobos, A. y Ibeas, J. I.** 2009. The *O*-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 21: 3397-3412.
115. **Timpel, C., Strahl-Bolsinger, S., Ziegelbauer, K. y Ernst, J. F.** 1998. Multiple functions of Pmt1p-mediated protein *O*-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273: 20837-20846.
116. **Sanders, S. L., Gentzsch, M., Tanner, W. y Herskowitz, I.** 1999. *O*-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *J Cell Biol.* 145: 1177-1188.
117. **Lommel, M., Bagnat, M. y Strahl, S.** 2004. Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* *O*-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol.* 24: 46-57.
118. **Hirayama, H., Fujita, M., Yoko-o T y Jigami, Y.** 2008. *O*-mannosylation is required for degradation of the endoplasmic reticulum-associated degradation substrate Gas1p via the ubiquitin/proteasome pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 143: 555-567.
119. **Goder, V. y Melero, A.** 2011. Protein *O*-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *J. Cell Sci.* 124: 144-153.
120. **Nakatsukasa, K., Okada, S., Umebayashi, K., Fukuda, R., Nishikawa, S. y Endo, T.** 2004. Roles of *O*-mannosylation of aberrant proteins in reduction of the load for endoplasmic reticulum chaperones in yeast. *J Biol Chem.* 279: 49762-49772.
121. **Tanaka, N., Fujita, Y., Suzuki, S., Morishita, M., Giga-Hama, Y., Shimoda, C. y Takegawa, K.** 2005. Characterization of *O*-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330: 813-820.
122. **Akasaka-Manyá, K., Manyá, H., Hayashi, M. y Endo, T.** 2011. Different roles of the two components of human protein *O*-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411: 721-725.
123. **Ichimiya, T., Manyá, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T. y Nishihara, S.** 2004. The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein *O*-mannosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 279: 42638-42647.
124. **van, R. J., Brunner, H. G. y van, B. H.** 2005. Glyc-*O*-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin. Genet.* 67: 281-289.
125. **Willer, T., Valero, M. C., Tanner, W., Cruces, J. y Strahl, S.** 2003. *O*-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 621-630.
126. **Lommel, M., Willer, T. y Strahl, S.** 2008. POMT2, a key enzyme in Walker-Warburg syndrome: somatic sPOMT2, but not testis-specific tPOMT2, is crucial for mannosyltransferase activity in vivo. *Glycobiology.* 18: 615-625.
127. **Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B. y Tudzynski, P.** 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr. Genet.* 25: 445-450.
128. **Delcan, J., Moyano, C., Raposo, R. y Melgarejo, P.** 2002. Storage of *Botrytis cinerea* using different methods. *J. Plant Pathol.* 84: 3-9.

129. **Winston, F., Dollard, C. y Ricupero-Hovasse, S. L.** 1995. Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*. 11: 53-55.
130. **Schumacher, J.** 2012. Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genet. Biol.* 49: 483-497.
131. **Benito, E. P., ten Have, A., van't Klooster, J. W. y Van Kan, J. A. L.** 1998. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 207-220.
132. **Clough, S. J. y Bent, A. F.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
133. **González, C., Noda, J., Espino, J. J. y Brito, N.** 2008. Drill-assisted genomic DNA extraction from *Botrytis cinerea*. *Biotechnol. Lett.* 30: 1989-1992.
134. **Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. y Geiger, H. H.** 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 6115-6116.
135. **Sambrook, J. y Russell, D. W.** 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
136. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. 2008.
137. **Schmittgen, T. D. y Livak, K. J.** 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3: 1101-1108.
138. **Hamada, W., Reignault, P., Bompeix, G. y Boccara, M.** 1994. Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Curr. Genet.* 26: 251-255.
139. **Leroch, M., Mernke, D., Koppenhoefer, D., Schneider, P., Mosbach, A., Doehlemann, G. y Hahn, M.** 2011. Living colors in the Gray Mold pathogen *Botrytis cinerea*: Codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 2887-2897.
140. **Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M. y Kang, S.** 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91: 173-180.
141. **Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland, M. y Ladisch, S.** 2004. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* 32: e19.
142. **Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y. y Scazzocchio, C.** 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41: 973-981.
143. **Ten, H. A., Mulder, W., Visser, J. y van Kan, J. A.** 1998. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 1009-1016.
144. **Wessel, D. y Flügge, U. I.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.
145. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
146. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

147. **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. y Ehrhardt, W.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 9: 255-262.
148. **Westermeyer, R. y Marouga, R.** 2005. Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience Reports* 25: 19-32.
149. **Varela, C., Mauriaca, C., Paradela, A., Albar, J. P., Jerez, C. A. y Chávez, F. P.** 2010. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol.* 10: 7.
150. **Clemente, P., Peralta, S., Cruz-Bermudez, A., Echevarría, L., Fontanesi, F., Barrientos, A., Fernandez-Moreno, M. A. y Garesse, R.** 2013. hCOA3 Stabilizes Cytochrome c Oxidase 1 (COX1) and Promotes Cytochrome c Oxidase Assembly in Human Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 288: 8321-8331.
151. **Gravel, P. y Golaz, O.** 1996. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes using lectin blotting, p. 603-617. *En: Walker, J. M. (ed.), The protein protocols handbook.* Humana Press, New York.
152. **Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. y Brunak, S.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.
153. **Petersen, T. N., Brunak, S., von, H. G. y Nielsen, H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 8: 785-786.
154. **Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G. y Brunak, S.** 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design & Selection* 17: 349-356.
155. **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
156. **Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R. y Bateman, A.** 2010. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids. Res.* 38: D211-D222.
157. **Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. y Lopez, R.** 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
158. **Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. y Sonnhammer, E. L. L.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305: 567-580.
159. **Rost, B., Sander, C., Casadio, R. y Fariselli, P.** 2008. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* 4: 521-533.
160. **Rost, B., Yachdav, G. y Liu, J.** 2004. The predictProtein server. *Nucl. Acids. Res.* 32: W321-W326.
161. **Käll, L., Krogh, A. y Sonnhammer, E. L.** 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction - the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 35: W429-W432.
162. **NetOGlyc 3.1 Server.** 2012. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc-3.1>
163. **Kulkarni, R. D., Kelkar, H. S. y Dean, R. A.** 2003. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28: 118-121.
164. **The Carbohydrate-Active enZYmes (CAZy) database.** 2012. <http://www.cazy.org>

165. **Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B.** 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl. Acids. Res.* 37: D233-D238.
166. **Doss, R. P.** 1999. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 404-408.
167. **Gil-ad, N. L., Bar-Nun, N. y Mayer, A. M.** 2001. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 109-113.
168. **Mouyna, I., Kniemeyer, O., Jank, T., Loussert, C., Mellado, E., Aïmanianda, V., Beauvais, A., Wartenberg, D., Sarfati, J., Bayry, J., Prevost, M. C., Brakhage, A. A., Strahl, S., Huerre, M. y Latge, J. P.** 2010. Members of protein *O*-mannosyltransferase family in *Aspergillus fumigatus* differentially affect growth, morphogenesis and viability. *Mol Microbiol.* 76: 1205-1221.
169. **Bowman, S. M. y Free, S. J.** 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays.* 28: 799-808.
170. **Fang, W., Ding, W., Wang, B., Zhou, H., Ouyang, H., Ming, J. y Jin, C.** 2010. Reduced expression of the *O*-mannosyltransferase 2 (AfPmt2) leads to deficient cell wall and abnormal polarity in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology.* 20: 542-552.
171. **Bowman, S. M., Piwowar, A., Ciocca, M. y Free, S. J.** 2005. Mannosyltransferase is required for cell wall biosynthesis, morphology and control of asexual development in *Neurospora crassa*. *Mycologia.* 97: 872-879.
172. **Laspidou, C. S. y Rittmann, B. E.** 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 36: 2711-2720.
173. **Kriangkripipat, T. y Momany, M.** 2009. *Aspergillus nidulans* protein *O*-mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot. Cell.* 8: 1475-1485.
174. **van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Wagemakers, C. A. M. y Van Kan, J. A. L.** 1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 21-29.
175. **Ten, H. A., Espino, J. J., Dekkers, E., Van Sluyter, S. C., Brito, N., Kay, J., Gonzalez, C. y van Kan, J. A.** 2010. The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal. Genet. Biol.* 47: 53-65.
176. **Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Cantoral, J. M. y Schmidt, J.** 2009. Proteomic analysis of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* during cellulose degradation. *Proteomics* 9: 2892-2902.
177. **Gonzalez-Fernandez, R., Aloria, K., Valero-Galvan, J., Redondo, I., Arizmendi, J. M. y Jorriño, J. V.** 2014. Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *J. Proteomics.* 97:195-221.
178. **Gómez-Gómez, L., Felix, G. y Boller, T.** 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18: 277-284.
179. **Gómez-Gómez, L. y Boller, T.** 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5: 1003-1011.
180. **Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Allen, C. y Bent, A. F.** 2004. Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 696-706.

PUBLICACIÓN 1



RESEARCH ARTICLE

Open Access

High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes

Mario González, Nélica Brito and Celedonio González*

Abstract

Background: O-glycosylation of secretory proteins has been found to be an important factor in fungal biology and virulence. It consists in the addition of short glycosidic chains to Ser or Thr residues in the protein backbone via O-glycosidic bonds. Secretory proteins in fungi frequently display Ser/Thr rich regions that could be sites of extensive O-glycosylation. We have analyzed *in silico* the complete sets of putatively secretory proteins coded by eight fungal genomes (*Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, and *Saccharomyces cerevisiae*) in search of Ser/Thr-rich regions as well as regions predicted to be highly O-glycosylated by NetOGlyc (www.cbs.dtu.dk).

Results: By comparison with experimental data, NetOGlyc was found to overestimate the number of O-glycosylation sites in fungi by a factor of 1.5, but to be quite reliable in the prediction of highly O-glycosylated regions. About half of secretory proteins have at least one Ser/Thr-rich region, with a Ser/Thr content of at least 40% over an average length of 40 amino acids. Most secretory proteins in filamentous fungi were predicted to be O-glycosylated, sometimes in dozens or even hundreds of sites. Residues predicted to be O-glycosylated have a tendency to be grouped together forming hyper-O-glycosylated regions of varying length.

Conclusions: About one fourth of secretory fungal proteins were predicted to have at least one hyper-O-glycosylated region, which consists of 45 amino acids on average and displays at least one O-glycosylated Ser or Thr every four residues. These putative highly O-glycosylated regions can be found anywhere along the proteins but have a slight tendency to be at either one of the two ends.

Background

It has been estimated that more than half of all proteins are glycoproteins [1], a proportion expected to be much higher if only secretory proteins are considered. The term secretory will be used in this article as comprising all proteins entering the secretory pathway, i.e. all proteins having a signal peptide. Glycosyl residues, mainly N-acetylgalactosamine, mannose, galactose or glucose, can be linked to proteins via asparagine (N-glycosylation) or via hydroxylated amino acids including serine, threonine, and, more rarely, tyrosine, hydroxyproline

and hydroxylysine (O-glycosylation) [2,3]. The first step of O-glycosylation in fungi generally consists in the addition of 1–3 mannose units from dolichyl phosphate mannose to Ser/Thr residues in target proteins [3], by the action of protein O-mannosyltransferases (PMTs) in the endoplasmic reticulum. The initial addition of glucose or galactose residues to Ser/Thr has also been reported for *Trichoderma* [2]. The chain is then extended, as the protein continues the secretion through Golgi, by several other enzymes generating linear or branched sugar chains composed mostly of mannose residues. Yeast usually have linear sugar chains composed exclusively of mannose [4], but filamentous fungi may have branched chains containing also glucose or galactose [2,3].

* Correspondence: cglez@ull.es

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Laguna, La Laguna (Tenerife) E-38206, Spain

The physiological function of *O*-glycosylation has been established mostly by analyzing null mutants in one or more PMT genes, which show a reduced ability to add sugars to Ser/Thr residues in the secretion pathway. A role for *O*-glycosylation could be established in enhancing the stability and solubility of the proteins, in protecting from proteases, as a sorting determinant, and in the development and differentiation of the fungal hyphae [2]. It is common that the knock-out of a particular PMT gene, or the simultaneous deletion of several of them, causes loss of viability or strong defects such as lower conidiation, changes in fungal morphology, etc. [2], emphasizing the importance of *O*-glycosylation for the biology of fungal organisms. Regarding phytopathogenic fungi, it is very interesting the fact that the deletion of an individual PMT gene in *Ustilago maydis* completely abolished pathogenicity of the fungus by eliminating the ability to penetrate the plant tissue, without otherwise affecting the *U. maydis* life cycle [5,6]. Additionally, *O*-glycosylation may play an important role in the regulation of enzymatic activity, as has been shown for the *Aspergillus awamori* Gluco-amylase, which has a Ser/Thr-rich domain that carries several *O*-linked oligomannose structures necessary for the activity of the enzyme against raw, but not against dissolved, starch [7].

In metazoans, mucin-type *O*-glycosylation sites are found grouped in clusters in protein regions rich in Ser and Thr residues [8]. Proteins containing mucin-like *O*-glycosylation are often found bound to the plasma membrane constituting the glycocalyx, or in the extracellular medium contributing to the formation of the extracellular matrix or the gel-like mucus in the mucosal surfaces. Mucins seem to be restricted to metazoans, where they appeared soon in evolution [9], and *in silico* analysis has been applied to the identification of mucins in animal species with sequenced genomes [9,10]. To our knowledge, a similar approach has never been used in fungi despite the fact that fungal secretory proteins are frequently highly glycosylated and contain Ser/Thr-rich regions predicted to be the site of high density *O*-glycosylation of the polypeptide chains [11]. Here we have analyzed *in silico* the presence and distribution of such regions among the putatively secretory proteins coded by the genomes of *S. cerevisiae*, four plant-pathogenic filamentous fungi (*Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Ustilago maydis*) and three non-pathogenic filamentous fungi (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* and *Trichoderma reesei*). The results show a high frequency of Ser/Thr rich regions in the secretory proteins for all the fungi studied, as well as the prediction of regions highly *O*-glycosylated for about 25% of them.

Results

NetOGlyc 3.1 can predict regions with a high density of *O*-glycosylation in fungal proteins

Part of the results presented here relies on the prediction of *O*-glycosylation by the web-based server NetOGlyc 3.1 [12,13]. This tool consists of a Neural Network trained on mucin-type mammalian *O*-glycosylation sites (*O*-N-acetylgalactosamine) and thus has not been designed to predict fungal *O*-glycosylation sites (mainly *O*-mannose). In order to check the usefulness of NetOGlyc for fungal proteins, we used all the available fungal proteins with experimentally confirmed *O*-glycosylation sites that were produced in their natural host, only 30 to our knowledge (Additional file 1), and compared them with the predictions of NetOGlyc for the same group of proteins. NetOGlyc predicted a total of 288 *O*-glycosylation sites for the whole set, while the number of experimentally-determined *O*-glycosylation sites was 197. The number of sites predicted by NetOGlyc that were actually found experimentally was 106. Therefore, the server accurately predicts 54% of the experimentally-found *O*-glycosylation sites, which is not much worse than the value of 67% found for the same parameter with mammalian proteins, for which the system was designed [12]. However, NetOGlyc seems to produce a higher rate of false positives for fungal proteins than for mammalian proteins and therefore overestimates the number of *O*-glycosylation sites. The parameter defined as specificity (the fraction of all positive predictions that are correct) by Julenius et al. [12] showed a value of 37% for fungal proteins while it was 68% for mammalian proteins. Although these differences are certainly not small, the accuracy of NetOGlyc with fungal proteins is, in our opinion, higher than what one could expect from the poor conservation in the molecular mechanisms involved in protein *O*-glycosylation between fungi and mammals [14]. The relationship between the number of experimental vs. predicted *O*-glycosylation sites, 197 divided by 288, was used to correct the statistics about fungal proteins calculated from NetOGlyc results, such as the average number of *O*-glycosylation sites per protein, to compensate the overestimation produced by NetOGlyc. The number of predicted *O*-glycosylation sites multiplied by 0.68 was therefore taken as a rough estimation of the actual number of *O*-glycosylation sites.

Despite its relatively poor prediction of individual *O*-glycosylation sites, NetOGlyc showed a much higher accuracy in the prediction of highly *O*-glycosylated regions (HGRs), defined as regions not smaller than 20 amino acids of which at least 25% are *O*-glycosylated Ser or Thr residues. Details about how HGRs are calculated can be found in the Materials and Methods section. Figure 1A shows HGRs found in the set of proteins with experimentally determined *O*-glycosylation sites. Almost

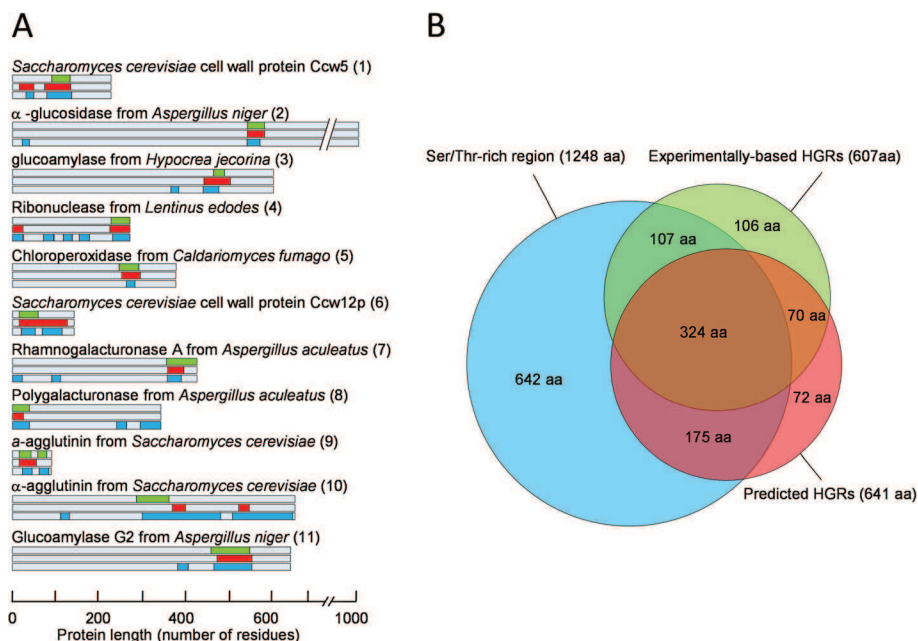


Figure 1 Comparison of experimentally confirmed HGRs with those predicted by NetOGlyc (pHGRs) and with Ser/Thr-rich regions in the same set of proteins. **A**: Experimental HGRs are represented as green boxes and pHGRs as red boxes. Ser/Thr-rich regions are represented as blue boxes. HGRs have a minimum of 15% O-glycosylated residues in the case of the experimental data, or 25% in the case of NetOGlyc-predicted O-glycosylation sites (to correct for the overestimation produced by NetOGlyc). Ser/Thr rich regions have a minimum Ser/Thr content of 40%. Numbers in brackets identify these proteins in Additional file 1, with more information for each of them including references. **B**: Venn diagram displaying the number of amino acid coincidences in the three kinds of regions. Each area is proportional to the number of amino acids (also displayed in the figure) which are inside a given type of region (or in several of them simultaneously) for the whole protein set.

all of them were also predicted by NetOGlyc. The reason for this increase in performance could be related to the fact that these hyper-O-glycosylated regions need to be also Ser/Thr-rich regions, which are predicted to be hyper-O-glycosylated both in mammals and in fungi, only that in fungi the exact O-glycosylated site is somehow predicted in the wrong amino acids. To assess this possibility we also studied the presence of Ser/Thr-rich regions in the control set of proteins, defined as protein regions with a minimum Ser/Thr content of 40% over a window of at least 20-aa (Figure 1A). The results showed that actually most experimental HGRs are also rich in Ser/Thr. However, when we explored numerically the overlap between experimental HGRs and predicted HGRs (pHGRs) or Ser/Thr-rich regions (Figure 1B), we observed that NetOGlyc did a better job at predicting O-glycosylation-rich regions than the mere determination of Ser/Thr content. We can summarize the data in Figure 1B by saying that an amino acid within a pHGR, predicted by NetOGlyc, has a probability of 0.61 of being inside a real HGR, while the same probability is just 0.34 for an amino acid within a Ser/Thr-rich region. We can conclude, therefore, that NetOGlyc, although being of limited use in the prediction of single O-glycosylation sites in fungal proteins, can be effective in the prediction

of highly O-glycosylated regions, which is the aim of this work.

Fungal signalP-positive proteins frequently display Ser/Thr-rich regions

As a first step in the study of O-glycosylation in fungal secretory proteins, we determined the set of proteins for which a signal peptide was predicted by SignalP (Additional file 2), for the 8 genomes analyzed in this study. The number of putatively secretory proteins varied widely, with the maximum number being displayed by *M. grisea* and the minimum corresponding to *S. cerevisiae* (Table 1). No clear relationship was observed between the number of proteins entering the secretory pathway by any given fungus and their biology. Phytopathogenic fungi, for example, seem to have a tendency to have a slightly higher number of proteins predicted to have signal peptide, but *U. maydis* is a clear counterexample.

We then used the MS Excel macro "XRR", explained in the Material and Methods section, to identify Ser/Thr-rich regions among all the SignalP-positive proteins coded by the eight fungal genomes. The parameters used in the analysis ($W = 20$, $\%G = 40$, $S = 5$) ensured that all regions found were at least 20-amino acids long

Table 1 Predictions obtained from SignalP and NetOGlyc for the proteins coded by the eight fungal genomes

Organism	Total number of proteins	Predicted to have signal peptide ^a	Predicted to have signal peptide and to be O-Glycosylated ^b
<i>Botrytis cinerea</i> T4	16360	1910 (11.7%)	1146 (60.0%)
<i>Magnaporthe grisea</i>	11109	2023 (18.2%)	1400 (69.2%)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14522	1551 (10.7%)	913 (58.9%)
<i>Ustilago maydis</i>	9129	837 (12.8%)	603 (72.0%)
<i>Aspergillus nidulans</i>	10560	1453 (13.8%)	932 (64.1%)
<i>Neurospora crassa</i>	9907	1250 (12.6%)	929 (74.3%)
<i>Trichoderma reesei</i>	9129	1169 (9.2%)	695 (59.5%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5900	594 (10.1%)	250 (42.1%)
Global average	10827	1348.4 (12.4%)	858.5 (63.7%)

^a As predicted by SignalP, percentages are calculated in relation to the total number of proteins.

^b As predicted by SignalP and NetOGlyc, percentages are calculated in relation to the number of proteins predicted to have signal peptide.

and had a minimum Ser/Thr content of 40%. Between 38.1% (*M. grisea*) and the 61.3% (*U. maydis*) of all proteins with predicted signal peptide contain at least one Ser/Thr-rich region (Table 2). Their average length was similar for the 8 genomes, varying between 32.1 residues (*M. grisea*) and 65.4 residues (*S. cerevisiae*), although regions much longer were found for all the organisms. Therefore, about half of fungal proteins with predicted signal peptide show at least one region with a 40%, or more, Ser/Thr content and with an average length of 40.1 amino acids.

Most fungal secretory proteins are predicted to be O-glycosylated

We then used the NetOGlyc 3.1 server to detect the presence of potentially O-glycosylated Ser/Thr residues in the sets of signalP-positive proteins. A respectable

number of proteins showed at least one Ser or Thr residue for which O-glycosylation is predicted (Additional file 2). A little less than half of *S. cerevisiae* signalP-positive proteins (42.1%) display at least one O-glycosylation, but the percentage is always higher for filamentous fungi, ranging from 58.9% for *Sclerotinia sclerotiorum* to 72.0% for *U. maydis* (Table 1). It is necessary to insist at this point that these numbers refer only to the predictions carried out by NetOGlyc 3.1, which seems to overestimate the actual number of O-glycosylation sites (see above).

About 20-30% of O-glycosylated proteins are predicted to have sugars added to only one Ser/Thr residue (Figure 2), but most of them have multiple O-glycosylation sites reaching dozens or even hundreds of putatively O-glycosylated Ser/Thr residues in the same protein, in all the genomes studied. Correcting for the overestimation of the number of O-glycosylation sites, as explained above, the average number of O-glycosylations per protein is predicted to be in the range 5–10 sites per protein, except in the case of *S. cerevisiae* with a much higher number. This yeast seems therefore to differ clearly from filamentous fungi in the sense that it possesses quite a lower number of O-glycosylated proteins (Table 1), only partially explained by the smaller genome size, but they are more extensively O-glycosylated (Figure 2).

If we look at individual proteins we can find some with an extremely high number of O-glycosylation sites (Additional file 2). The protein with the highest proportion of predicted O-glycosylated residues is the *M. grisea* protein MG06773.4, of unknown function, with about half of its 819 amino acids being predicted to be O-glycosylated. Next is the *S. cerevisiae* protein YIR019C (Muc1), a mucin-like protein necessary for the yeast to grow with a filamentous pseudohyphal form [15]. Muc1 is a 1367-amino acids protein, of which 42% are predicted to be O-glycosylated. Similar examples can be

Table 2 Ser/Thr-rich regions and pHGRs predicted in secretory proteins from the eight fungi

Organism	Ser/Thr-rich regions				Predicted hyper-O-glycosylated regions			
	No. of regions	No. of proteins ^a	Length average	Maximal length	No. of regions	No. of proteins ^a	Length average	Maximal length
<i>Botrytis cinerea</i> T4	1850	966 (50.6%)	41.5	1133	606	434 (22.7%)	45.6	437
<i>Magnaporthe grisea</i>	1190	770 (38.1%)	32.1	769	421	543 (26.8%)	36.9	753
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1502	782 (50.4%)	41.6	1216	512	356 (23%)	45.8	361
<i>Ustilago maydis</i>	1037	513 (61.3%)	33.7	618	276	214 (25.6%)	32.3	145
<i>Aspergillus nidulans</i>	1202	729 (50.2%)	33.9	499	345	269 (18.5%)	45.9	507
<i>Neurospora crassa</i>	1329	714 (57.1%)	35.6	700	538	389 (31.1%)	38.8	622
<i>Trichoderma reesei</i>	933	546 (46.7%)	36.6	617	311	233 (19.9%)	52.2	418
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	496	265 (44.6%)	65.4	1429	174	108 (18.2%)	66.9	821
Global average	1192.4	660.6 (49%)	40.1	872.6	397.9	318.3 (23.6%)	45.5	508

^a Values in brackets represent the percentage with respect to the number of secretory proteins.

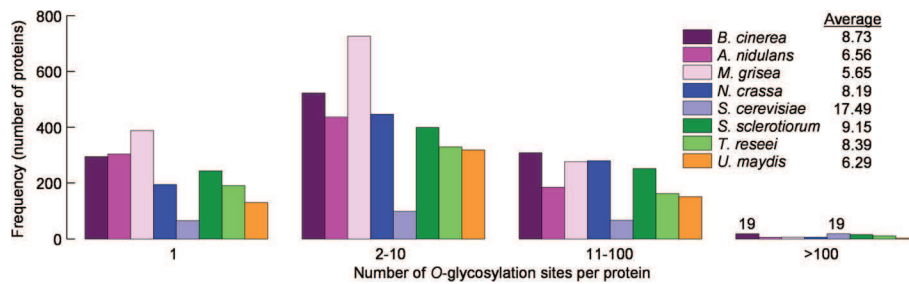


Figure 2 Frequency distribution of the number of O-glycosylation sites per protein predicted by NetOGlyc. Inset displays the average number of O-glycosylated residues per protein, corrected by multiplying by 0.68 to compensate the overestimation of O-glycosylated sites produced by the server on fungal proteins. See details in the text.

found in the rest of the genomes, with at least a few proteins predicted to have more than 25% of their residues O-glycosylated.

Fungal proteins are rich in pHGRs

The glycosylation positions obtained from NetOGlyc were analyzed with the MS Excel macro XRR in search of O-glycosylation-rich regions. The raw results can be found in Additional file 3 and a summary is presented in Table 2. All the genomes analyzed code for plenty of secretory proteins with pHGRs. Between 18% (*S. cerevisiae*) and 31% (*N. crassa*) of all proteins with predicted signal peptide contain at least one pHGR. The average length of pHGRs was similar for the eight genomes, varying between 32.3 residues (*U. maydis*) and 66.9 residues (*S. cerevisiae*), although pHGRs could be found of any length between the minimum, 5 residues, to several hundred. All genomes coded for proteins predicted to have quite large pHGRs, the record being the 821-aa pHGR found in the *S. cerevisiae* protein Muc1 discussed above. Globally, we could summarize these data by saying that among the set of secretory fungal proteins

predicted by NetOGlyc to be O-glycosylated, about one fourth shows at least one pHGR having a mean length of 23.6 amino acids and displaying, on average, an O-glycosylated Ser or Thr residue every four amino acids.

One possible concern about pHGRs is whether they are the result of a real tendency of the predicted O-glycosylation sites to be together forming hyper-O-glycosylated regions or, on the contrary, they are just a consequence of having proteins with a high number of O-glycosylation sites that, being so much, have no choice but be close to one another forming pHGRs. To address this question we randomized the O-glycosylation positions for all the proteins. In this new set of data, the proteins displayed the same number of O-glycosylation sites as predicted by NetOGlyc but their positions were chosen at random. When these hypothetical proteins were analyzed in search of pHGRs, we obtained the results presented in Figure 3. The number of proteins displaying pHGRs was considerably smaller when the positions of the O-glycosylation sites were randomized. Between 42.6% (*S. cerevisiae*) to 75.7% (*M. grisea*) of the proteins displaying pHGRs with the O-glycosylation sites

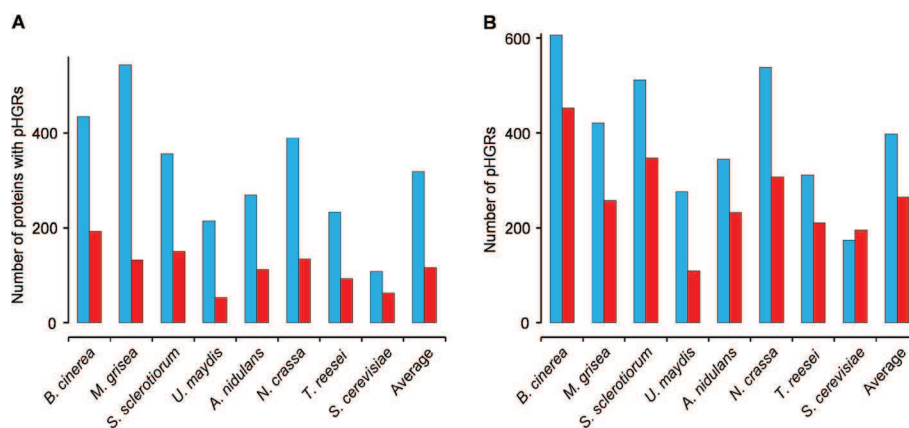


Figure 3 Effect of the randomization of the position of the O-glycosylation sites on pHGR prediction. Number of proteins with pHGRs (A) and total number of pHGRs (B) found in every genome with the O-glycosylation positions predicted by NetOGlyc (blue columns) or the randomized positions (red columns).

predicted by NetOGlyc lost them with the randomization of the *O*-glycosylation positions, indicating that at least in the majority of proteins there is really a selective pressure to localize the *O*-glycosylation sites grouped in pHGRs. The total number of pHGRs was also lower with the randomized data (Figure 3B), although in this case the difference was not so big, and in the case of *S. cerevisiae* the total number of pHGRs actually increased with the randomization of the *O*-glycosylation positions. The reason for this result may be related to the presence of proteins predicted to have a very high number of *O*-glycosylation sites in this yeast, for which the randomization of the *O*-glycosylation positions leads to the scattering of the sites throughout the whole protein and the appearance of a greater number of smaller pHGRs. As discussed before, *S. cerevisiae* differentiates from the rest of the organisms under study in the sense that it possesses a higher proportion of these highly *O*-glycosylated proteins (Figure 2).

pHGRs show a small tendency to be located at protein ends

We then addressed the question of whether the location of pHGRs shows a random distribution along the length of the proteins or, alternatively, there is preference for any given regions such as the C- or N-terminus. The central positions of all pHGRs detected for any given organism were calculated and classified in ten different groups according to their relative location along their respective protein. The first group contained those pHGRs having their center in the N-terminal 10% of the protein

sequence; the second group those with center in the second 10%, and so on. Figure 4A shows the frequency distribution of these ten groups for the eight fungi and indicates that there is no clear preference for any protein region, although slightly higher frequencies are observed for the N- and C-terminus, especially the latter, for almost all fungi examined. The clearer exception is *S. cerevisiae*, which seems to have a tendency to bear pHGRs in the central part of proteins. This tendency is confirmed by the fact that a similar study made with the set of data in which the *O*-glycosylation positions were randomized (Figure 4B) resulted in a completely different distribution, with pHGRs more homogeneously scattered along the length of proteins.

The location of pHGRs towards protein ends can be more clearly seen when only secretory enzymes are considered. This was studied by analyzing a specific set of proteins from *B. cinerea* predicted to have signal peptide and classified as enzymes active on polysaccharides in the CAZY database [16,17]. This list of proteins contains 177 members with signal peptide and at least one *O*-glycosylation site, as predicted by signalP and NetOGlyc, respectively. Among them, we found 72 enzymes displaying pHGRs (not shown). The distribution of these regions along the length of the respective proteins (Figure 4C) shows clearly a much more marked tendency to be located at the ends, especially at the C-terminus.

Discussion

We have shown here that the most popular *in silico* tool to predict *O*-glycosylation, NetOGlyc, is able to predict

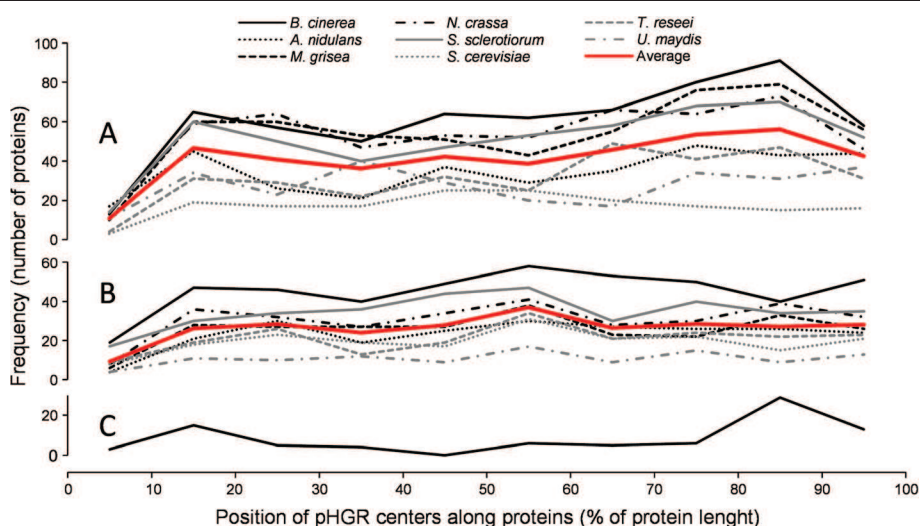


Figure 4 Distribution of pHGRs along the length of proteins. For each organism, the relative position of the centers of all pHGRs along the length of their respective protein was calculated, as percent distance from the N-terminus. The graph displays the frequency distribution of these pHGR centers in ten groups. **A:** distribution obtained with the position of *O*-glycosylation sites obtained from NetOGlyc. **B:** distribution obtained when the position of the *O*-glycosylation sites were randomized. **C:** distribution obtained for the group of *B. cinerea* secretory enzymes active on polysaccharides, using the not-randomized *O*-glycosylation positions.

O-glycosylation for fungal proteins, although with less accuracy than for mammalian proteins, and has a fairly good ability to predict regions with a high density of O-glycosylation, better than the mere search for Ser/Thr-rich regions. We have also shown that fungal secretory proteins are rich in regions with a high Ser/Thr content and are frequently predicted to have pHGRs of varying length, averaging 24 residues but going up to 821, that can be found anywhere along the proteins but have a slight tendency to be at either one of the two ends. The coincidence between Ser/Thr-rich regions and pHGRs was studied for a representative number (361) of *B. cinerea* proteins (not shown), and the results obtained are similar to those shown in Figure 1, 91% of residues within pHGRs also belonged to a Ser/Thr-rich region, while only 25% of residues inside a Ser/Thr rich region were also within an pHGR. Although the abundance of Thr, Ser, and Pro residues has been used before to search for mucin-type regions in mammalian proteins [10], these results and the comparison of predicted vs. experimental HGRs (Figure 1) clearly show that NetOGlyc is a much more restrictive and accurate way to predict hyper-O-glycosylation in fungi, mainly because it produces a lower level of false positives.

Among the proteins predicted to have pHGRs we have identified some fungal proteins with an extremely high level of O-glycosylation. The *B. cinerea* genome, for example, codes for 9 proteins with 737–1764 residues, and signal peptide for secretion, that are predicted to be O-glycosylated in more than 400 of their amino acids, as well as 11 additional smaller proteins, up to 300 amino acids, with more than 75% O-glycosylated residues (Additional file 2). Even considering that the actual number of O-glycosylation sites maybe 68% of these (see the overestimation rate calculated for NetOGlyc in the results section), this level of O-glycosylation does not seem compatible with the globular fold typical of enzymes or effector proteins, thus leading to the hypothesis that these proteins may be involved in maintaining the structure of the cell wall or the extracellular matrix. Most of them were predicted to have a GPI anchor at the C-terminus by at least one of the available prediction tools [18,19], while others were homologues to proteins classified as GPI anchored proteins in other fungi or to proteins experimentally proven to be in the cell wall. Curiously, a BLAST search revealed that 5 out of the 9 *B. cinerea* proteins with more than 400 predicted O-glycosylation sites have homologues only in the closely related fungus *S. sclerotiorum*, but not in any other organism, raising the question of whether they make any contribution to the lifestyle of these two highly successful, broad range, plant pathogens.

Some of these highly O-glycosylated proteins in *B. cinerea* display interesting similarities/motifs: Bofut4_P004110.1,

a 670-aa protein predicted to be O-glycosylated in 75% of its residues, is similar (BLAST expect value = 4×10^{-7}) to the *S. cerevisiae* protein Sed1p [20], a structural component of the cell wall. Bofut4_P104050.1, a 903-aa protein predicted to be O-glycosylated in 453 of them, is only present in *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* and has two CFEM motifs that were proposed to be involved in virulence [21]. Bofut4_P131790.1, a 938-aa protein predicted to be O-glycosylated in 414 residues, is homologous to the *Metarhizium anisopliae* protein Mad1 mediating adhesion to insect cuticle, raising the question of a putative role in spore dispersion. However, most of these proteins, with more than 400 O-glycosylated residues or with more than 75% O-glycosylated residues, have no similarity to proteins of known function. It would be especially interesting to search, among those proteins highly O-glycosylated, of candidate virulence factors involved in adhesion to the host surfaces. The existence of these O-glycosylated adhesion proteins is predicted from the fact that O-glycosylation deficient mutants in fungal pathogens have been shown to be affected in adhesion to the host [5,6,22].

An *in silico* search in *U. maydis* for a special type of O-glycosylated proteins, those predicted to be glycosylated specifically by PMT4, allowed the identification of 64 putative PMT4 substrates [6]. Only 14 of these were included in our initial set of *U. maydis* proteins used in the search for pHGRs, since the rest did not show any signal peptide in the prediction carried out with SignalP. Interestingly, 13 of these 14 proteins were also predicted to be highly O-glycosylated in this study, in a region overlapping with the putative site serving as PMT4 substrate in all but in one case in which the pHGR and the PMT4 glycosylation site were adjacent. Bearing in mind that both the results reported in this study and those of Fernández-Álvarez *et al.* [6] are plain *in silico* predictions, the fact that they coincide to a great extent encourages using these predictions in the experimental search for highly O-glycosylated regions in proteins.

We have found experimentally some of the putatively hyper-O-glycosylated *B. cinerea* proteins in the early secretome. 26 of the 105 proteins identified in the early secretome [23] are predicted to have at least one pHGR (not shown). This group contains proteins with a diverse set of functions, but is enriched in proteins that seem to be involved in the metabolism of the cell wall or extracellular matrix, such as β -1,3-glucanosyltransferase or β -1,3-endoglucanase. The rest are lytic enzymes for various soluble substrates or proteins with unknown function. Intriguingly, with the only exception of one endopolygalacturonase, no plant cell wall degrading enzymes were found in the set. This leads to the speculation of a possible role for HGRs in maintaining proteins in the extracellular matrix. Proteins involved in

turning soluble polymers into monomers, such as proteases or ribonucleases, could carry a better function if retained in the vicinity of the fungal cell, and bearing an hyper-*O*-glycosylated region could provide that property by integrating the proteins in the very prominent glucan sheath of *B. cinerea* [24,25].

Another possible role for pHGRs could be to confer a specific topological configuration to the proteins. Such seems to be the case, for example, of the cell-surface GPI-anchored adhesin Epa1p from *Candida glabrata* [26], which bears a Ser/Thr-rich region proposed to be kept in an extended rod-like conformation by *O*-glycosylation [26]. This Ser/Thr region serves to protrude the proteins' main body away from the GPI-anchored C-terminus on the cell membrane.

Given the prevalence of pHGRs among fungal secretory proteins and the variety of properties they may confer to the proteins displaying them, it is not surprising that mutants affected in *O*-glycosylation show pleiotropic phenotypes [2], including reduced viability and virulence [5,6]. *O*-glycosylation may be, therefore, worth exploring as a new target in the fight against fungal pathogens.

Conclusions

We have shown here that the web-based *O*-glycosylation prediction tool NetOGlyc can be used to identify regions in fungal secretory proteins with a high probability of being highly *O*-glycosylated. The analysis of the complete set of putatively-secretory proteins from eight fungi showed that 38-61% of them display Ser/Thr-rich regions, i.e. regions of at least 20 residues with a minimum Ser/Thr content of 40%, and that 18-31% of them contain pHGRs, i.e. regions of 20 or more residues of which at least 25% are predicted to be *O*-glycosylated. pHGRs were found anywhere along proteins but have a slight preference for the proteins ends, especially the C-terminus.

Methods

Prediction of *O*-glycosylation sites in secretory proteins

Protein sequences used in this study were obtained from publically available databases. The whole set of proteins coded by the genomes of *Magnaporthe grisea* (strain 70-15), *Sclerotinia sclerotiorum* (strain 1980), *Ustilago maydis* (strain 521), *Aspergillus nidulans* (strain FGSC A4), and *Neurospora crassa* (strain N15) were obtained from the Broad Institute [27]. Those of *Botrytis cinerea* (strain T4), *Trichoderma reesei* (strain QM6a), and *Saccharomyces cerevisiae* (strain S288C) were obtained respectively from URGI [28], JGI [29], and SGD [30].

The predicted protein sequences for each genome were downloaded and transferred to a Microsoft Excel 2010 spreadsheet with the aid of Fasta2tab [31]. All

proteins were then tested for the presence of a signal peptide for secretion, using the standalone version of SignalP 3.0 [32]. SignalP 3.0 has a false positive rate of 15%. Those proteins which gave positive result in each genome, i.e. all proteins putatively entering the secretory pathway at the endoplasmic reticulum, were then run through the web-based *O*-glycosylation prediction tool NetOGlyc 3.1 [12]. Results from NetOGlyc were saved as a text file from within the web browser and fed to Microsoft Word 2010 to transform these into an appropriate table format that could be incorporated into a Microsoft Excel 2010 spreadsheet (Additional file 2). The sets of proteins with randomized *O*-glycosylation positions were generated from the latter with the aid of the Rand function in Microsoft Excel. Each randomized set contains the same proteins as the original one. i.e. all signalP-positive proteins in a given genome, and the number of predicted *O*-glycosylation sites in every individual protein is also the same. The difference is that the position along the protein of every individual site was chosen by the generation of an appropriate random number (according to the length of each individual protein), being careful not to assign two sites to the same residue.

Detection of Ser/Thr-rich regions and pHGRs

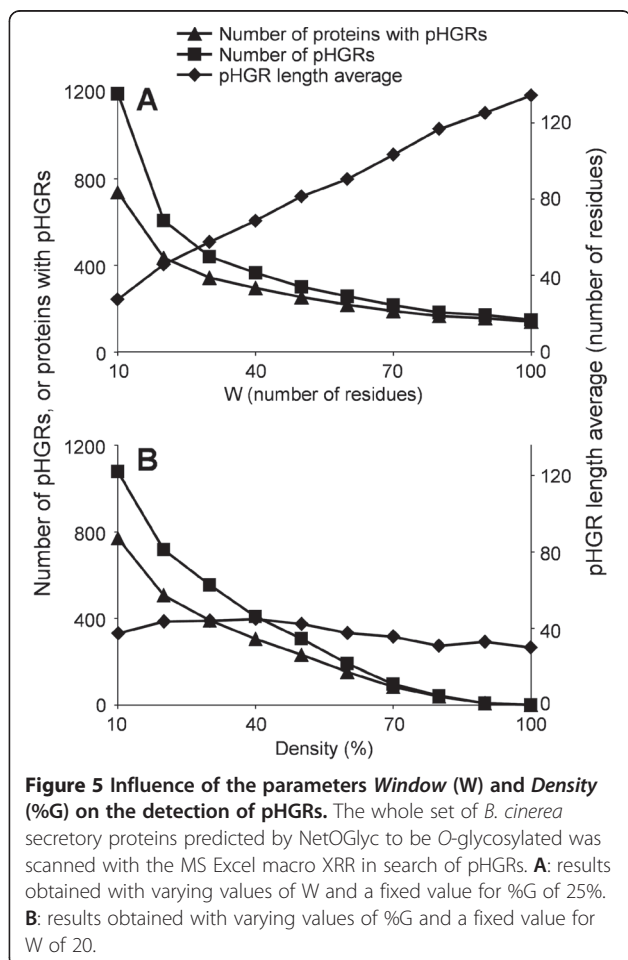
To study the presence, in signalP-positive fungal proteins, of regions that are either rich in Ser/Thr or rich in predicted *O*-glycosylation, we first developed a simple algorithm that runs as a macro (named XRR) in a Microsoft Excel spreadsheet (Additional file 4), which was written with Microsoft Visual Basic for Applications. Although we have only used it to detect clusters of amino acids with a high content in Ser/Thr residues or a high number of predicted *O*-glycosylated residues, this macro can be used to search for the clustering of any protein modification or amino acid type along a sequence, i.e., to search for X-rich regions (where X stands for the kind of amino acid one is interested in). The algorithm just processes a list with the positions of the amino acids with the desired characteristics (X) and returns a list of protein regions rich in those amino acids (X-rich region). The version of the MS Excel macro included as supplementary material (Additional file 4) is able to analyze simultaneously up to 1500 proteins and is customized to search for hyper-*O*-glycosylated regions. Basically, the application scans the data searching for regions of a given length, called *Window* (W), having a *Density* (%G) of the desired amino acid characteristic above a minimum value. These regions can either be reported as independent X-rich regions, or can be combined into a single, longer region if several of them are found that overlap or are separated from one another by a number of amino acids which is less than the parameter

Separator (S). The parameters W, %G, and S are set by the user. In any case, the beginning and end of X-rich regions are reported as the first and last amino acid with the desired properties in the group, so that for example, for W = 20 and %G = 25% (at least 5 positive hits in the window of 20 residues), X-rich regions as small as 5 amino acids could be reported. The results of the analysis are reported as a pdf file containing the data for all the X-rich regions encountered for each protein, both graphically and as a table, as well as several graphics with statistics for the whole set of proteins loaded. The influence of different values of the parameters W and %G on the detection of pHGRs was studied with the set of *B. cinerea* proteins predicted to have signal peptide (Figure 5). Lower values for both parameters, by making the analysis less stringent, resulted in a higher number of pHGRs, distributed in a broader set of proteins. Likewise, lower %G values tend to produce longer pHGRs, since the lower stringency permitted the pHGRs to be extended to neighboring regions displaying a not-so-high predicted sugar content. On the contrary, the average length of pHGRs increased with higher values of the

parameter W, since this increase would eliminate the shorter ones as they would simply not be found.

Control set of O-glycosylated proteins

In order to have a control set of proteins in the analysis of Ser/Thr-rich and predicted O-glycosylation-rich regions, we searched online databases and literature extensively in search of proteins from any fungi for which experimental evidence existed indicating O-glycosylation of at least one Ser or Thr residue, and only 30 proteins were found which were purified from its natural source (Additional file 1). The experimentally confirmed O-glycosylated positions in this set of 30 proteins were analyzed with the macro XRR to identify highly O-glycosylated regions, with the parameters set to result in low stringency (%G = 15, W = 20, S = 5). A total of 13 hyper-O-glycosylated regions were found in 12 of the 30 protein sequences (one protein displayed two separate regions), with an average length of 56 residues. Ser/Thr content in these regions resulted to be $38.5\% \pm 10.5$, a value similar to that obtained for mucin domains in animal proteins [10].



Additional files

Additional file 1: Comparison of experimental O-glycosylation sites found in fungal proteins with those predicted by NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

Additional file 2: List of SignalP-positive proteins for the eight fungal genomes with the O-glycosylation sites predicted by NetOGlyc.

Additional file 3: Results of the search for pHGRs (predicted Hyper-O-glycosylated Regions) in the SignalP-positive proteins coded by the eight fungal genomes.

Additional file 4: Microsoft Excel spreadsheet with the macro XRR used in the search for Ser/Thr-rich regions and pHGRs (predicted Hyper-O-glycosylated Regions).

Abbreviations

HGR: Hyper-O-glycosylated Region; pHGR: Predicted Hyper-O-glycosylated Region; PMT: Protein Mannosyl Transferase.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NB and CG conceived the study. All authors participated in the design/evaluation of the algorithms used as well as the different analysis carried out with them. MG drafted the initial manuscript and all authors participated in the editing and approved its final version.

Acknowledgments

Support for this research was provided by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2010-22222) and Gobierno de Canarias (PI2007/009). M.G. was supported by Gobierno de Canarias.

Received: 14 May 2012 Accepted: 17 September 2012
 Published: 20 September 2012

References

- Hanisch FG: **O-glycosylation of the mucin type.** *Biol Chem* 2001, **382**:143–149.
- Goto M: **Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, **71**:1415–1427.
- Lommel M, Strahl S: **Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans.** *Glycobiology* 2009, **19**:816.
- Lehle L, Strahl S, Tanner W: **Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2006, **45**:6802–6818.
- Fernández-Álvarez A, Elías-Villalobos A, Ibeas JI: **The O-Mannosyltransferase PMT4 Is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*.** *Plant Cell* 2009, **21**:3397–3412.
- Fernández-Álvarez A, Marín-Menguiano M, Lanver D, Jiménez-Martín A, Elías-Villalobos A, Pérez-Pulido AJ, Kahmann R, Ibeas JI: **Identification of O-mannosylated Virulence Factors in *Ustilago maydis*.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002563.
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G: **Concepts and principles of O-linked glycosylation.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998, **33**:151–208.
- Tabak LA: **The role of mucin-type O-glycans in eukaryotic development.** *Semin Cell Dev Biol* 2010, **21**:616–621.
- Lang T, Hansson GC, Samuelsson T: **Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:16209–16214.
- Lang T, Alexandersson M, Hansson GC, Samuelsson T: **Bioinformatic identification of polymerizing and transmembrane mucins in the puffer fish *Fugu rubripes*.** *Glycobiology* 2004, **14**:521–527.
- Espino JJ, Brito N, Noda J, González C: ***Botrytis cinerea* endo- β -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis.** *Physiol Mol Plant Pathol* 2005, **66**:213–221.
- Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S: **Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites.** *Glycobiology* 2005, **15**:153–164.
- NetOGlyc 3.1 Server.* <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>.
- Jensen PH, Kolarich D, Packer NH: **Mucin-type O-glycosylation—putting the pieces together.** *FEBS J* 2010, **277**:81–94.
- Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS: **Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:8419–8424.
- The Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) database.* <http://www.cazy.org>.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B: **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucl Acids Res* 2009, **37**:D233–D238.
- Fankhauser N, Maser P: **Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map.** *Bioinformatics* 2005, **21**:1846–1852.
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F: **A Sensitive Predictor for Potential GPI Lipid Modification Sites in Fungal Protein Sequences and its Application to Genome-wide Studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*.** *J Mol Biol* 2004, **337**:243–253.
- Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, Iimura Y, Ito K: **Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance.** *J Bacteriol* 1998, **180**:3381–3387.
- Kulkarni RD, Kelkar HS, Dean RA: **An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins.** *Trends Biochem Sci* 2003, **28**:118–121.
- Timpel C, Zink S, Strahl-Bolsinger S, Schroppel K, Ernst J: **Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*.** *J Bacteriol* 2000, **182**:3063–3071.
- Espino JJ, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, González C: **The *Botrytis cinerea* early secretome.** *Proteomics* 2010, **10**:3020–3034.
- Doss RP: **Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65**:404–408.
- Gil-ad NL, Bar-Nun N, Mayer AM: **The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities.** *FEMS Microbiol Lett* 2001, **199**:109–113.
- Frieman MB, McCaffery JM, Cormack BP: **Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a beta1,6 glucan-cross-linked cell wall protein.** *Mol Microbiol* 2002, **46**:479–492.
- Broad Institute.* <http://www.broadinstitute.org>.
- URGI (Unité de Recherche Génomique Info).* <http://urgi.versailles.inra.fr>.
- U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (JGI).* <http://www.jgi.doe.gov>.
- Saccharomyces Genome Database (SGD).* <http://www.yeastgenome.org>.
- Fasta2tab.* <http://darwin.biochem.okstate.edu/fasta2tab>.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: **Improved prediction of signal peptides: Signal 3.0.** *J Mol Biol* 2004, **340**:783–795.

doi:10.1186/1471-2180-12-213

Cite this article as: González et al.: High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiology* 2012 **12**:213.

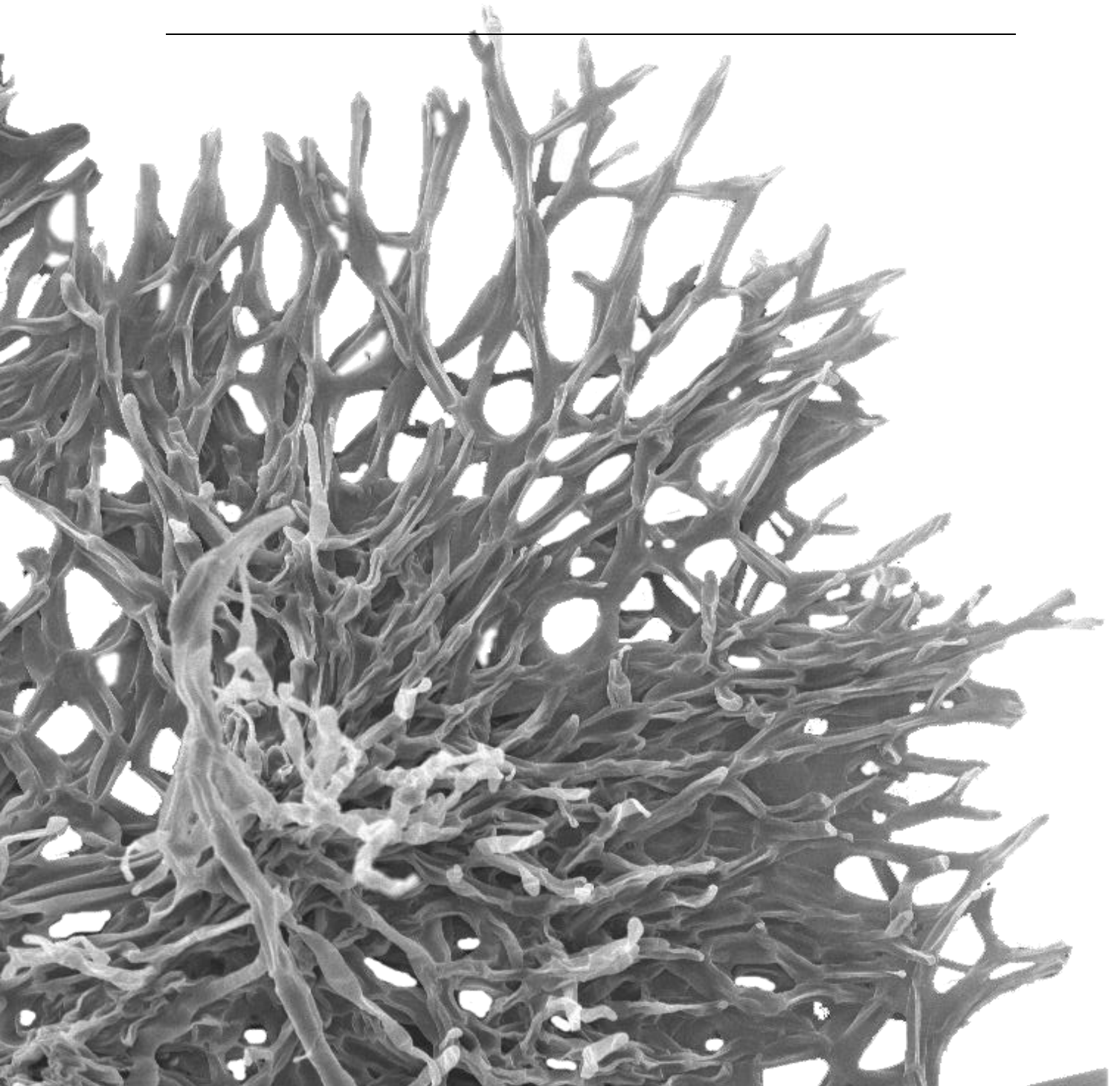
Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



PUBLICACIÓN 2



Botrytis cinerea Protein *O*-Mannosyltransferases Play Critical Roles in Morphogenesis, Growth, and Virulence

Mario González, Nélida Brito, Marcos Frías, Celedonio González*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Laguna, La Laguna (Tenerife), Spain

Abstract

Protein *O*-glycosylation is crucial in determining the structure and function of numerous secreted and membrane-bound proteins. In fungi, this process begins with the addition of a mannose residue by protein *O*-mannosyltransferases (PMTs) in the lumen side of the ER membrane. We have generated mutants of the three *Botrytis cinerea* *pmt* genes to study their role in the virulence of this wide-range plant pathogen. *B. cinerea* PMTs, especially PMT2, are critical for the stability of the cell wall and are necessary for sporulation and for the generation of the extracellular matrix. PMTs are also individually required for full virulence in a variety of hosts, with a special role in the penetration of intact plant leaves. The most significant case is that of grapevine leaves, whose penetration requires the three functional PMTs. Furthermore, PMT2 also contributes significantly to fungal adherence on grapevine and tobacco leaves. Analysis of extracellular and membrane proteins showed significant changes in the pattern of protein secretion and glycosylation by the *pmt* mutants, and allowed the identification of new protein substrates putatively glycosylated by specific PMTs. Since plants do not possess these enzymes, PMTs constitute a promising target in the development of novel control strategies against *B. cinerea*.

Citation: González M, Brito N, Frías M, González C (2013) *Botrytis cinerea* Protein *O*-Mannosyltransferases Play Critical Roles in Morphogenesis, Growth, and Virulence. PLoS ONE 8(6): e65924. doi:10.1371/journal.pone.0065924

Editor: Jae-Hyuk Yu, University of Wisconsin - Madison, United States of America

Received: March 11, 2013; **Accepted:** April 30, 2013; **Published:** June 6, 2013

Copyright: © 2013 González et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Support for this research was provided by grants AGL2010-22222 from the Ministerio de Economía y Competitividad (<http://www.mineco.gob.es>) and PI2007/009 from the Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI; <http://agencia.itccanarias.org>). MG and MF were supported by ACIISI. 85% of ACIISI funding came from the European Regional Development Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cglez@ull.es

Introduction

Protein glycosylation is an important and highly conserved posttranslational modification consisting in the addition of carbohydrate residues to target proteins. It plays essential roles in eukaryotic cells from fungi to mammals [1], being crucial in determining the structure and function of numerous secreted and membrane-bound proteins. Glycosyl residues, mainly *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine, mannose, galactose or glucose, can be linked to proteins via asparagine (*N*-glycosylation) or via hydroxylated amino acids including serine, threonine, and, more rarely, tyrosine, hydroxyproline and hydroxylysine (*O*-glycosylation). Both glycosylation pathways are conserved from prokaryotes to humans, but some differences exist in the class and number of the carbohydrate residues added [2,3]. *N*-linked oligosaccharides are diverse in the type of sugars added but, in eukaryotes, they are all bound by a GlcNAc monomer to a defined sequence in proteins, Asn-X-Ser/Thr [3], where X can be any amino acid but Pro. In contrast, *O*-linked carbohydrate chains are more heterogeneous in relation to their sugar components and the way they bind to one another and to the proteins [1–3]. Currently there is no known consensus sequence for protein *O*-glycosylation sites, although prediction tools have been developed for mammals [4] and it is generally accepted that the presence of regions rich in Ser/Thr residues in secretory proteins results in the addition of a high density of *O*-linked oligosaccharides [5–7].

O-glycosylation has been studied extensively in fungi, mainly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [1,8–10]. The first step of

the *O*-glycosylation pathway in these organisms, often referred to as *O*-mannosylation, consists in the addition of one mannose residue to Ser/Thr residues in target proteins catalyzed by dolichyl phosphate mannose-dependent protein *O*-mannosyltransferases (PMTs), located in the lumen side of the endoplasmic reticulum (ER) membrane [11]. However, the initial addition of glucose or galactose residues to Ser/Thr has also been reported for *Trichoderma* [3]. The oligosaccharide chain is then extended, as the protein continues the secretion through Golgi, by several other enzymes generating linear or branched sugar chains composed mostly of mannose residues [3,9]. Yeast usually have linear sugar chains composed exclusively of up to five mannose residues, but filamentous fungi may have branched chains containing also glucose or galactose [3,11]. PMTs have been found in both prokaryotes and eukaryotes [11], but not in plants, making these proteins promising targets in the design of novel control strategies against fungal plant-pathogens.

Phylogenetic analysis has shown that PMTs can be classified into three subfamilies: PMT1, PMT2 and PMT4 [12,13]. *S. cerevisiae* and *Candida albicans* genomes both code for one member of subfamily 4 and 2–3 members of subfamilies 1 and 2, but *Schizosaccharomyces pombe* and all filamentous fungi analyzed so far have only one representative *pmt* gene per subfamily [1]. All PMTs are ER integral membrane proteins and share similar hydropathy profiles, seven transmembrane domains have been proposed [14], as well as the presence of three MIR conserved motifs essential for the mannosyltransferase activity [12]. In *S. cerevisiae*, proteins of the PMT1 subfamily

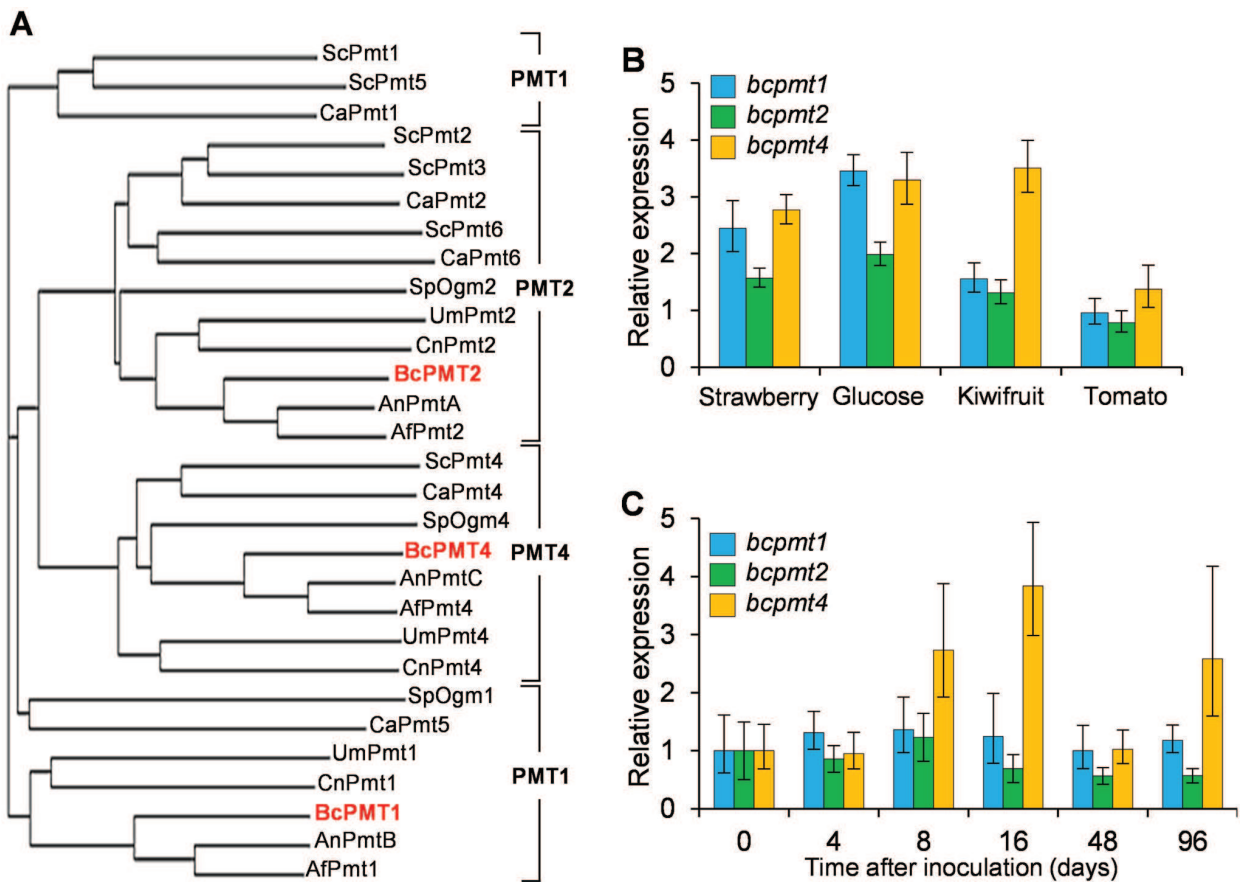


Figure 1. Phylogeny and expression of *B. cinerea* PMTs. A) Phylogenetic analysis comparing *B. cinerea* PMTs with those of various fungi. First two letters in each protein name indicates the fungus it comes from (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Ca: *Candida albicans*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Um: *Ustilago maydis*; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Bc: *Botrytis cinerea*; An: *Aspergillus nidulans*; Af: *Aspergillus fumigatus*). Accession numbers can be found in Table S1. B) and C) Q-RT-PCR analysis of *bcpmt* expression in the wild-type strain B05.10 grown either in liquid media supplemented with the indicated plant extracts or glucose (B), or in *B. cinerea*-infected tomato leaves (C). Bars represent the relative amount of mRNA with respect to ungerminated conidia as mean values (n=3) and standard deviation. doi:10.1371/journal.pone.0065924.g001

(Pmt1p and Pmt5p) form heterodimers with proteins belonging to the PMT2 subfamily (Pmt2p and Pmt3p), whereas PMT4 acts as homodimer [15]. Although bioinformatics approaches have been used to identify putative targets of specific PMTs [5,6], only a few proteins have been identified as substrates of specific PMTs in yeast [5] and in filamentous fungi [6,16].

The physiological role of O-glycosylation in fungi has been established primarily through the study of *pmt* mutants, since they are blocked in the first step of O-mannosylation. As a result, it is known that O-glycosylation is crucial for these organisms, as no mutant defective in all *pmt* genes could be isolated so far. Moreover, the deletion of single *pmt* genes, usually the one coding for a PMT2 subfamily protein, or the simultaneous deletion of several of them, can also result in lack of viability. Those single or multiple *pmt* mutants which are viable often display clear phenotypes whose study has allowed the establishment of important roles for O-glycosylation in cell wall integrity, cell morphology and proper development, sensing environmental stress, as well as in the stability, sorting, and localization of secretory proteins [10,11,17–20]. In *S. cerevisiae*, single *pmt* mutants are viable but the simultaneous disruption of three *pmt* genes, one member of each subfamily, is lethal [8]. In yeast with a single *pmt* gene per subfamily such as *Cryptococcus neoformans* [21], the

subfamily 2 gene is essential for growth, although contradictory results have been reported for *S. pombe* [22,23]. Single *S. pombe* mutants in the genes of subfamilies 1 or 4, although viable, show a pleiotropic phenotype with altered cell morphology, abnormal cell wall composition, and defective cell-cell separation and mating [22,23]. In the case of the human pathogen *C. neoformans* deletion of subfamily 1 or 4 genes also resulted in altered stress resistance and reduced virulence [21]. *S. pombe* and *C. neoformans* mutants lacking both genes from subfamilies 1 and 4 are also not viable [21,22]. The situation is similar in filamentous fungi where the PMT2 subfamily member is either essential, as in *Ustilago maydis* [24], or its deletion has a great impact in viability, as in *Aspergillus nidulans* [25]. Interestingly, deletion of the gene for the single PMT4 in *U. maydis* completely abolished pathogenicity of the fungus by eliminating the ability to penetrate the plant tissue, without otherwise affecting the *U. maydis* life cycle [24].

We have previously noted the abundance of Ser/Thr rich regions among *Botrytis cinerea* secreted proteins [7,26], which were predicted to be the site of high density O-glycosylation, pointing to this process as an important determinant in the biology and virulence of this widely distributed and crop-devastating plant pathogen. Here we report the characterization of the three *B. cinerea pmt* genes and their contribution to hyphae morphology,

growth, and virulence, as well as the identification of putative specific substrates of individual PMTs.

Results

The Three *B. cinerea* *pmt* Genes are Constitutively Expressed

A BLAST search of the *B. cinerea* T4 (<http://urgi.versailles.inra.fr/Species/Botrytis>) and B05.10 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea) genome databases, using *S. cerevisiae* PMT proteins as query sequences, allowed the identification of three putative PMT homologues. Phylogenetic analysis with CLUSTALW2 (Figure 1A) grouped each of the three putative *B. cinerea* PMTs into each PMT subfamily [1], and we therefore named these genes as *bcpmt1* (BofuT4_P160540.1/BC1G_12913.1, subfamily PMT1), *bcpmt2* (BofuT4_P003410.1/BC1G_02981.1, subfamily PMT2) and *bcpmt4* (BofuT4_P109250.1/BC1G_02548.1, subfamily PMT4). As the rest of the filamentous fungi studied so far, *B. cinerea* has a single representative of each PMT subfamily.

The comparison of the hydropathy profiles of each BcPMT with a consensus hydropathy profile for the corresponding PMT subfamily (Figure S1) revealed that *B. cinerea* PMTs are structurally similar to the rest of fungal PMTs, and are probably inserted in a similar way in the ER membrane. Although *in silico* prediction tools (TMHMM [27], PredictProtein [28,29], or Phobius [30]) predicted up to 12 transmembrane domains in the 3 BcPMTs (Figure S1), the coincidence of the hydropathy profiles with those of *S. cerevisiae* PMTs, which have been reported to have 7 transmembrane domains [14], and the well-known fact that protein structure is much more conserved throughout evolution than amino acid sequence [31], led us to hypothesize the same distribution of transmembrane domains (Figure S1).

The PMT and MIR domains typical of PMTs [11] are also present in the *B. cinerea* enzymes (Figure S1), and there is strong sequence similarity in the so-called loops 1 and 5 (Figure S2) with a percentage of identity always higher than 50% in a comparison with the corresponding loops of *S. cerevisiae* PMTs (not shown). These loops are located in the ER lumen and have been implicated in the mannosyl transferase activity [11]. The essential DE motif in loop 1 suggested to play a central role in catalysis [32] is also present in the three BcPMTs, as all the conserved residues and sequence motifs identified as essential for catalysis or dimerization by Girrbach *et al.* [12].

Expression analysis of the three *bcpmt* genes revealed that all of them were expressed under all conditions tested (Figure 1B). In minimal media supplemented with various plant extracts, or in the control media with glucose alone, the levels of expression were not very different from one another, ranging between 1 and 4 times the amount of mRNA present in ungerminated conidia. All 3 genes were also expressed *in planta*, in tomato leaves infected with conidia of *B. cinerea* B05.10 (Figure 1C), and the time course of the expression indicated a relatively steady pattern of expression for all three genes, with only a small increase in *bcpmt4* expression at 8 and 16 hours post-inoculation.

All *bcpmt* Mutant Strains Show Reduced Growth in Axenic Culture

Single knock-out mutants were generated for all three *bcpmt* genes by replacing the coding sequence with a hygromycin resistance cassette (Figure S3) and homokaryotic strains were identified by PCR and Southern-blot analysis (Figure S3). The resulting single *bcpmt* mutant strains were designated $\Delta bcpmt1$, $\Delta bcpmt2$, and $\Delta bcpmt4$.

All three $\Delta bcpmt$ mutants showed a lower growth rate than the wild-type strain in all media tested (Figure 2). $\Delta bcpmt2$ was not able to grow at all in 3 of the most standard *B. cinerea* growth media, Gamborg's B5, MEA and PDA, while $\Delta bcpmt1$ and $\Delta bcpmt4$ grew in these three media with a 23–62% reduction in the growth rate, as compared with the wild-type strain. These differences were smaller in the richer medium YGG and in SH, and these media even allowed the growth of $\Delta bcpmt2$. Other studies in yeast and filamentous fungi have shown that *pmt* mutants partially recover the normal growth rate levels in media supplemented with osmotic stabilizers [8,33,34]. The addition of 1 M sorbitol, 1 M sucrose, or 0.5 M KCl to the cultures in MEA (Figure 3) increased the growth rate of the wild-type strain B05.10, surprisingly, by 18%. This increase was only slightly higher for $\Delta bcpmt1$ (17–40%), but a clearer recovery of the growth rate was observed in the case of $\Delta bcpmt4$ (28–62%), and especially in the case of $\Delta bcpmt2$ (Figure 3), which did not grow at all in MEA but recovered the growth rate to 56–74% of that of the wild type with the osmotic stabilizers. The stabilizing effect of the increased osmolarity is usually interpreted by a weakened cell wall structure. A cell wall not fully able to cope with the osmotic pressure would be a growth-limiting factor at low osmolarities, but not so when osmolarities of the cell interior and the surrounding medium are similar. The fact that it is especially $\Delta bcpmt2$ the mutant that most clearly recovers the growth rate in the presence of osmotic stabilizers may represent that BcPMT2 is the main contributor to the O-glycosylation of key structural cell-wall proteins.

$\Delta bcpmt$ Strains Produce Less Conidia but More Sclerotia

The amount of conidia and sclerotia produced was determined quantitatively for the $\Delta bcpmt$ mutants grown for 15 days on tomato fruit extract, either under continuous visible light, to maximize the production of conidia, or in the dark, to maximize the production of sclerotia [35]. $\Delta bcpmt2$ was completely unable to sporulate, even when osmotic stabilizers were added to the growth medium, and no clear sclerotia formation was observed (Figure 4). However, $\Delta bcpmt2$ colonies were strongly melanized in the dark, which is one of the features of sclerotia (Figure 4A). $\Delta bcpmt4$ and especially $\Delta bcpmt1$ were able to sporulate, but the number of conidia produced was reduced (Figure 4B). This difference was larger in the dark, so that light was a more potent inducer of sporulation for

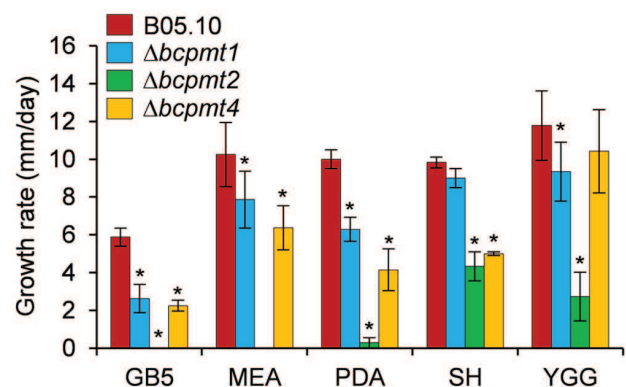


Figure 2. Growth of $\Delta bcpmt$ strains in axenic culture. Growth rates (mean values and standard deviation) of the three mutant strains and the wild type (B05.10) in different media. Media compositions are given in Experimental Procedures. Asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type in the same medium ($n \geq 3$, $p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0065924.g002

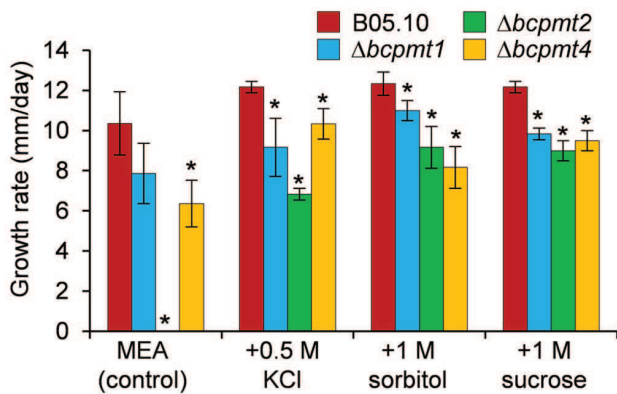


Figure 3. Effect of osmotic stabilizers on the growth of $\Delta bcpmt$ mutants. Growth rates (mean values and standard deviation) obtained in MEA plates supplemented with the indicated osmotic agents. Asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type in the same medium (n=3, p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0065924.g003

the *pmt* mutants than for the wild type. Addition of sorbitol improved sporulation only slightly in the case of $\Delta bcpmt4$ (Figure 4B). Conidia obtained from these two mutants did not show any difference in their germination rate as compared with the wild type (not shown), about 83% of conidia obtained were able to germinate in all cases. Sclerotia production, on the contrary, was higher for $\Delta bcpmt1$ and $\Delta bcpmt4$, under continuous illumination, than for the wild type (Figure 4C). Light is a strong repressor of sclerotia formation for *B. cinerea* [35] but it seems that it does not produce the same effect in the *pmt* mutants. Addition of the osmotic stabilizers KCl and sorbitol completely abolished sclerotia formation for the three mutants and for the wild type (not shown). The sclerotia produced were viable in 100% of the cases.

$\Delta bcpmt2$ Shows Sensibility to Calcofluor White, SDS and Culture Shaking

To test the integrity of the cell wall, growth rates were measured for the $\Delta bcpmt$ mutants in YGG plates, a medium that allowed the growth of the three mutants, supplemented with different concentrations of calcofluor white (CW), Congo red (CR), or sodium dodecyl sulphate (SDS). 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CW inhibited the growth of the wild-type strain and the three mutants (Figure 5A), but the inhibitory effect was stronger for $\Delta bcpmt1$, $\Delta bcpmt4$, and especially for $\Delta bcpmt2$, which was also affected at lower concentrations. Similarly, addition of SDS resulted in significant growth inhibition only for $\Delta bcpmt2$ (Figure 5A). At 0.03% SDS, the growth rate of $\Delta bcpmt2$ is reduced 77% as compared to the growth without SDS, while the reduction observed for the wild-type strain was 42%. In addition, $\Delta bcpmt4$ showed a change in its pigmentation induced by SDS (Figure 5B). Interplay between the cell wall integrity pathway and melanin biosynthesis genes has been proposed for *B. cinerea* [36], a fact that may be related with this increased pigmentation. Contrary to what has been reported for some fungi [25,37], but in accordance to others [24], the addition of CR to YGG plates did not cause any reduction in the growth rates of the wild-type strain or any of the $\Delta bcpmt$ mutants (not shown). It is necessary to note, however, that those *pmt* mutants with increased sensitivity to CR, in other fungi, show it usually at temperatures higher than what is optimal for the corresponding organism [25].

A weakened cell wall may also represent a problem for fungi growing under some kind of mechanical stress. This was tested

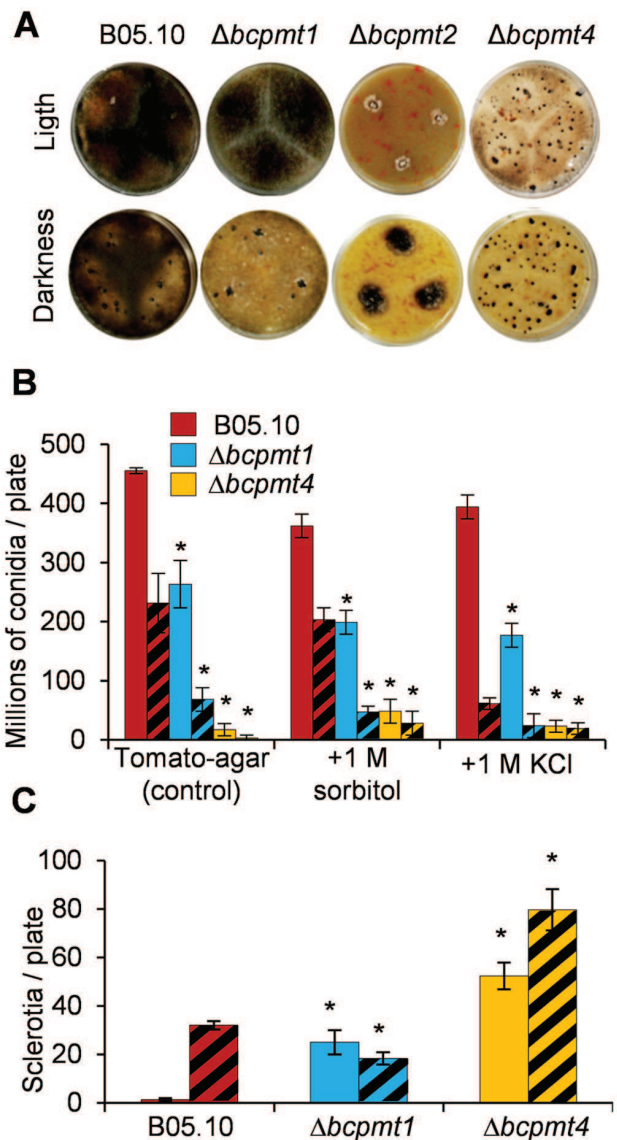


Figure 4. Conidia and sclerotia production by $\Delta bcpmt$ mutants. The indicated strains were grown under continuous light (plain bars) or in darkness (hatched bars) in tomato-agar plates. Osmotic agents were added when indicated. **A**) Appearance of the colonies 12 days after inoculation. **B**) Conidia production at day 15. **C**) Sclerotia production at day 15. Bars represent mean values (n=3) and standard deviation, and asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type in the same medium (p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0065924.g004

simply by growing the $\Delta bcpmt$ mutants in liquid YGG medium, with or without shaking, and comparing the size of the colonies formed by the mycelium expanding from individual agar plugs. The slow shaking used (60 rpm in a reciprocal shaker) caused a reduction in the colony size for every strain, included the wild type (Figure 5C and D), possibly because the turbulence in the medium makes the whole colony to be more like a wool yarn instead of the typical star-like morphology found on agar plates. This reduction, however, was much more pronounced for $\Delta bcpmt1$ and $\Delta bcpmt4$ than for the wild type, suggesting that the mechanical resistance, and therefore the structural integrity of the cell wall and/or extracellular matrix, is affected in these two

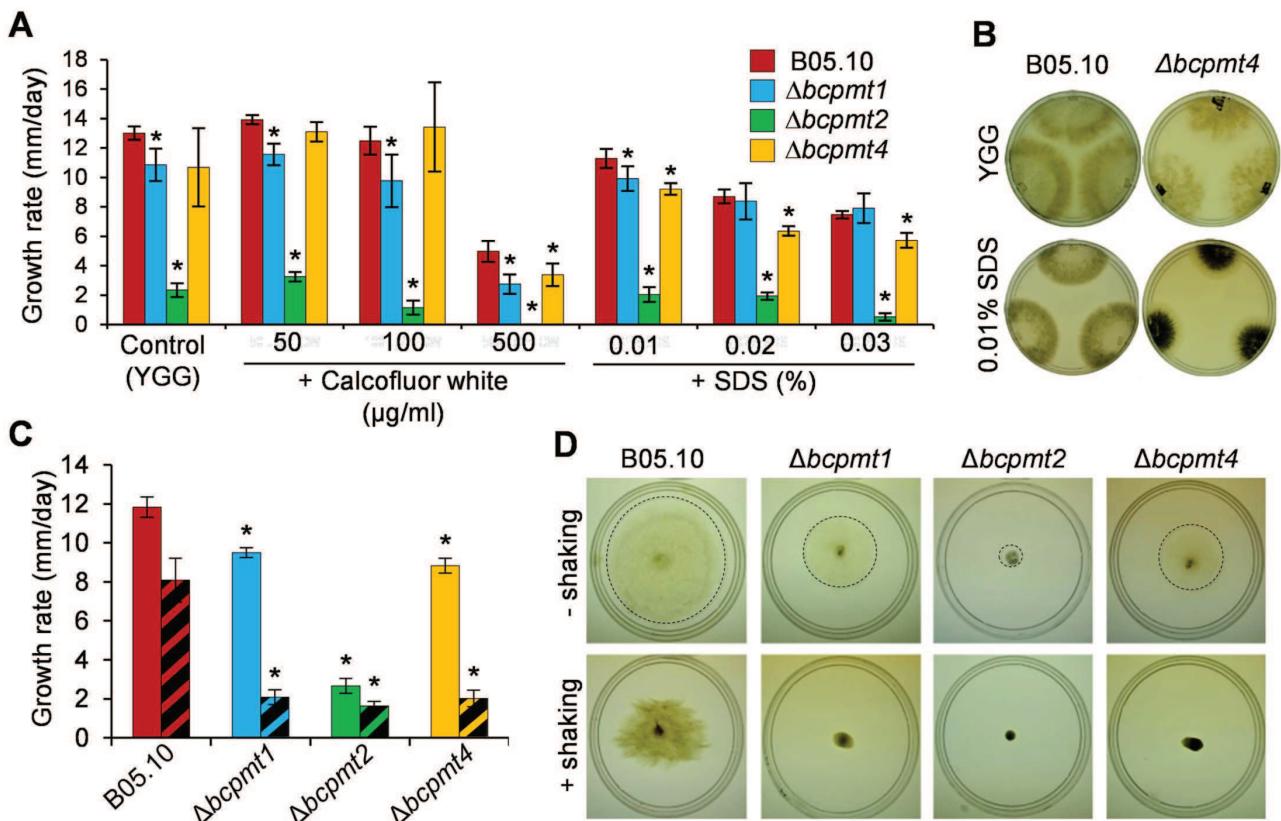


Figure 5. Effect of various chemical agents and culture shaking on the growth of $\Delta bcpmt$ mutants. **A**) Growth rate of the three mutants and the wild type (B05.10) on YGG-agar amended with calcofluor white (CW) or sodium dodecyl sulphate (SDS). **B**) Dark pigmentation of $\Delta bcpmt4$ in YGG-agar supplemented with 0.01% SDS. **C**) and **D**) Effect of culture shaking on growth rate (**C**) and colony morphology (**D**). The indicated strains were grown in liquid YGG with (hatched bars), or without (plain bars), shaking (60 rpm in a reciprocal shaker). Pictures were taken at day 4. A dashed line was drawn at the edge of colonies, where necessary, to aid visualization. Bars represent mean values (n=6) and standard deviation, and asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type in the same conditions (p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0065924.g005

mutants. The reduction in colony size caused by agitation was very small for the $\Delta bcpmt2$ mutant, but it is necessary to note that the colonies of this mutant are also very small and compact on agar and the mycelium shows an aberrant morphology, as will be explained below.

Increased sensitivity to cell wall degrading enzymes can also be taken as an indication of a weakened cell wall, and this was checked for the $\Delta bcpmt$ mutants by estimating the rate of protoplast generation from mycelium. Incubation with a mixture of enzymes displaying β -glucanase, cellulase, protease, and chitinase activities, according to the manufacturer (Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*, SIGMA L1412), resulted in the release of protoplast at an increased rate from the three mutants, as compared with the wild type (not shown). $\Delta bcpmt1$ and $\Delta bcpmt2$ released about twice the number of protoplast per gram of dry weight released by the wild type, and $\Delta bcpmt4$ released about three fold.

Taken together, all these results imply that all three BcPMT proteins contribute, one way or another, to the structure, stability, or rigidity of the *B. cinerea* cell envelopes. It has been known for long that O-glycosylated proteins play an important role in maintaining the structure of the fungal cell wall [11,38], and this may also be true for the extracellular matrix [39]. Our results suggest that in *B. cinerea* the glycosylation of this kind of proteins is carried out by the three PMTs.

$\Delta bcpmt$ Strains have Atypical Hyphal Morphology and Produce Less Extracellular Matrix

Microscopic observation of $\Delta bcpmt$ mutants, grown in the chemically defined medium MB supplemented, or not, with 1 M Sorbitol, revealed big morphological changes in the hyphae of $\Delta bcpmt2$ and $\Delta bcpmt4$, especially the former (Figure 6). The most significant of these changes was the increase in the thickness of cells and the presence of balloon-like swollen cells in these two mutants, which partially disappear when 1 M sorbitol was included in the culture (Figure 6A). As discussed before, this can be explained by a softened cell wall not able to withstand the osmotic pressure. Similar morphologies have also been observed in *pmt* mutants in *Aspergillus awamori* [16], *A. nidulans* [33,40], *A. fumigatus* [41] or *Neurospora crassa* [42]. Curiously, $\Delta bcpmt2$ also displayed a more frequent appearance of septa separating individual cells (Figure 6A), especially evident when staining with CW (not shown). The branching pattern was also different for $\Delta bcpmt2$ and $\Delta bcpmt4$, with a higher number of branching points in both of them (Figure 6B). Overall, it seems that $\Delta bcpmt1$ is morphologically similar to the wild type, $\Delta bcpmt2$ presents swollen, more frequently septated, and hyperbranched hyphae forming compact colonies, and $\Delta bcpmt4$ displays morphological characteristics which are intermediate between the wild type and $\Delta bcpmt2$. All these changes, with the clear exception of the increase in septum frequency, reverted with the addition of the osmotic

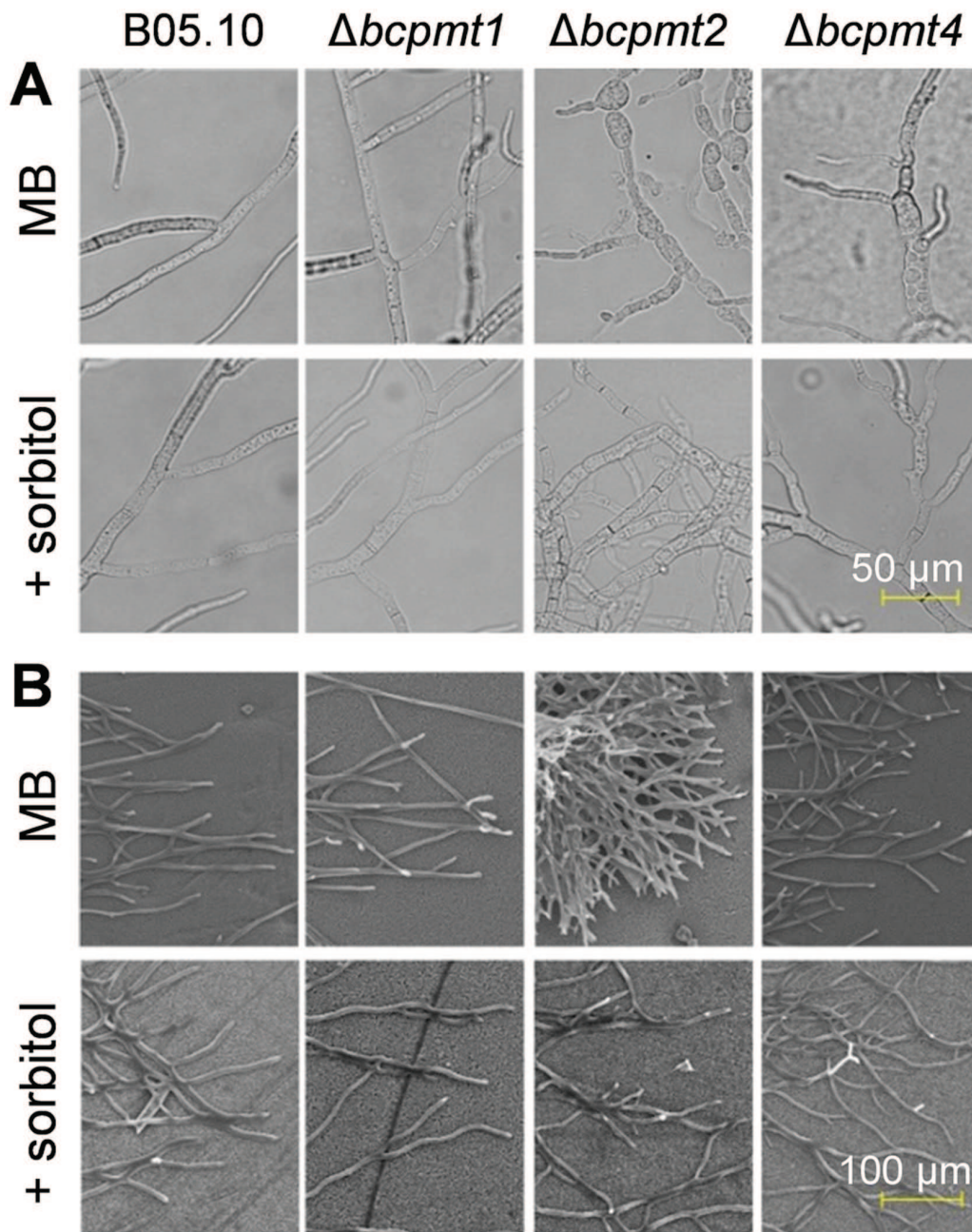


Figure 6. Hyphal morphology of the $\Delta bcpmt$ mutant strains. The three mutants and the wild type (B05.10) were grown in MB. 1 M sorbitol was added to the medium where indicated. **A)** Morphology under the microscope. **B)** Morphology under the scanning electron microscope. doi:10.1371/journal.pone.0065924.g006

stabilizer sorbitol, indicating that they are probably the consequence of the osmotic pressure acting on a weakened cell wall.

B. cinerea hyphae are surrounded by a very prominent extracellular matrix (ECM) [39,43], especially in very rich media, which can be visualized as a white halo around fungal colonies stained with India ink [44]. To analyze ECM in the $\Delta bcpmt$ mutants, fungal strains were grown in the rich medium YGG, stained, and observed under the microscope (Figure 7A). In cultures without shaking, where ECM would be more-easily retained by the mycelium, the matrix seems to be absent in $\Delta bcpmt2$, and reduced to some extent in $\Delta bcpmt4$ as compared to

the wild type. When the fungus was grown with slow agitation (60 rpm in a reciprocal shaker) the differences became more obvious and both $\Delta bcpmt1$ and $\Delta bcpmt4$, besides $\Delta bcpmt2$, displayed less matrix than the wild type, almost nothing in the case of $\Delta bcpmt4$.

One of the proposed functions of extracellular polysaccharides is the retention of water in the vicinity of the cells [45]. A common observation is that mucilaginous old cultures of *B. cinerea* grown in rich media are much more difficult to desiccate on filter paper than young cultures on minimal medium. We took advantage of this observation to indirectly estimate the amount of ECM, by

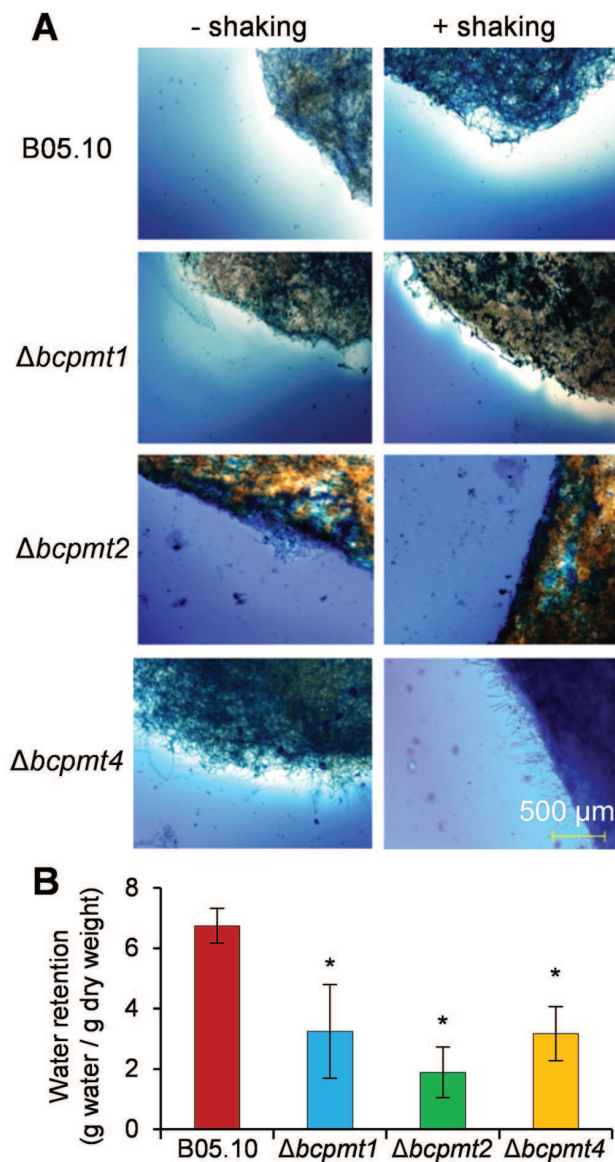


Figure 7. Effect of the mutation of *bcprt* genes on the production of extracellular matrix. **A)** India ink staining of 4-days-old mycelium of the three $\Delta bcprt$ mutants and the wild type (B05.10) grown in liquid YGG medium with or without shaking (60 rpm in a reciprocal shaker). Extracellular matrix is negatively stained against the India ink background. **B)** Water retention capabilities of the $\Delta bcprt$ mutants. All strains were grown in liquid YGG for 4 days without shaking, from a single agar plug, filtered for exactly 2.5 min on pre-weighted filter papers, weighed to determine wet weight, dried to completion at 60°C, and reweighed to determined dry weight. Water retention (difference between dry and wet weight) was normalized to dry weight. Bars represent mean values (n=3) and standard deviation, and asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type (p<0.05). doi:10.1371/journal.pone.0065924.g007

measuring the water retention capacity of the mycelium grown in rich medium. The results (Figure 7B) indicate that $\Delta bcprt2$ has a water retention capability quite smaller than the wild type, while $\Delta bcprt1$ and $\Delta bcprt4$ show and intermediate value, in good agreement with the amount of ECM revealed by India ink staining.

These results point to O-glycosylated proteins as key components of ECM, a hypothesis that was further explored by treating ECM-rich mycelium with proteinase K (Figure S4). The protease treatment partially disintegrates ECM in the wild-type strain, and does more so in the $\Delta bcprt4$ mutant, thus confirming the importance of proteins as constituents of ECM.

The Three $\Delta bcprt$ Mutants are Less Virulent; $\Delta bcprt2$ and $\Delta bcprt4$ have a Reduced Ability to Penetrate the Plant Tissue

The virulence of $\Delta bcprt$ mutants was assayed in two ways, by quantifying the percentage of inoculations able to initiate infection on various hosts, and by determining the rate of expansion of the infection for successful inoculations (Table 1, Figure 8). The results indicated that all three $\Delta bcprt$ mutant strains exhibit a reduction in their virulence when inoculated on intact plant tissue, as compared to the wild type. The percentage of inoculations producing infections was lower than the wild type for every mutant. Especially significant was the case of $\Delta bcprt2$, which was unable to infect intact leaves, petals, or fruits of any plant tested. Also noteworthy was the experiment with intact grapevine leaves, which were not infected by any of the three mutants (Table 1, Figure 8). The number of successful inoculations was also lower, in comparison to the wild type, for $\Delta bcprt1$ and $\Delta bcprt4$, especially the latter, with a percentage of inoculations giving rise to expanding infections never higher than 35%. The percentage of successful inoculations with $\Delta bcprt1$ and $\Delta bcprt4$ were also calculated with gerbera and carnation petals (not shown), and were in the same range as those with tobacco and tomato.

To analyze if these diminished capacities to produce infections are due to a reduced ability to penetrate the intact plant tissue, the same assay was repeated but this time wounds were made in the leaves with a sterile needle just below the agar plugs used as inoculum. The wounding had a stimulating effect on the infection rate for all the mutants and also for the wild type (Table 1), but the most impressive results were observed for $\Delta bcprt4$. Wounding allowed this mutant to produce infections in most of the inoculations for every plant tested including grapevine leaves. This is in good agreement with the fact that the BcPMT4 homologue in *U. maydis* has been proposed to be essential for penetration of maize leaves [24]. Recovery of the infection rate by wounding was also observed for petals of carnation and gerbera (not shown).

The speed of progression of the infections was also different for the three $\Delta bcprt$ mutants as compared to the wild type (Table 1). Under all conditions tested, the average growth rate of the radius of the infected area was significantly smaller than the corresponding value in the wild-type strain. These differences were plant-dependent and varied in the range of 44–77% for $\Delta bcprt1$, 25–61% for $\Delta bcprt4$, and 39% for $\Delta bcprt2$, with respect to the growth rate of the wild type. This parameter was calculated for $\Delta bcprt2$ only in tobacco leaves, the only plant that this mutant could infect. These values are not very different from the diminishment of growth rates in axenic culture caused by the mutation of *bcprt* genes (Figure 2), leading to the conclusion that once the infection has been established, BcPMTs do not seem to play any especially significant role which is specific to the growth in planta, different from what they do in axenic culture. The main contribution of BcPMTs to the infection process seems to reside, therefore, in its ability to facilitate the attachment or penetration of the fungus on intact plant surfaces.

This hypothesis was further explored by performing penetration assays on onion epidermis inoculated with agar plugs coming from cultures of the three mutants, or the wild type. Figure 9A shows

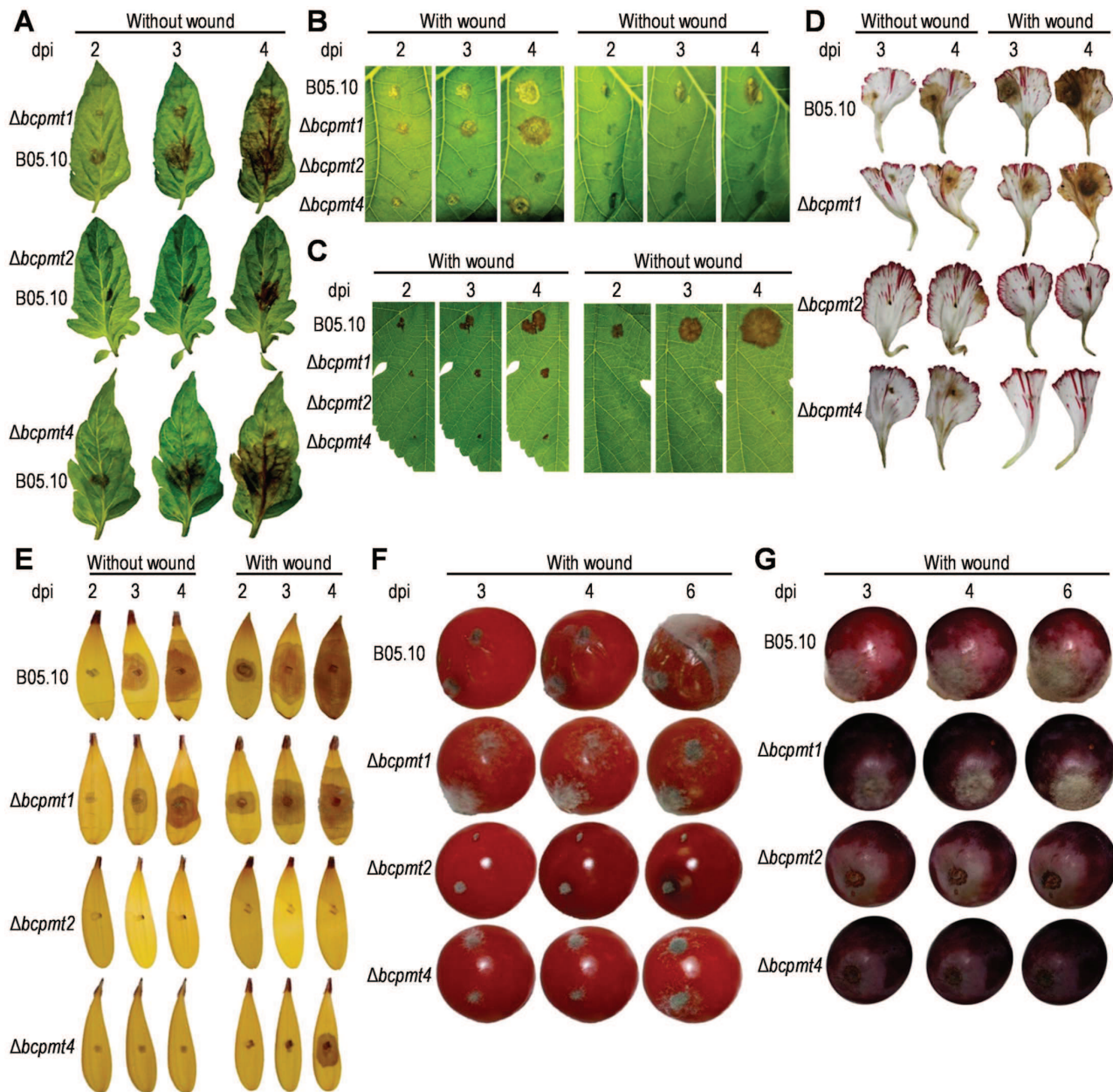


Figure 8. Virulence of $\Delta bcprt$ mutants on different plant tissues. Inoculations were done with 0.2 mm agar cubes, containing the indicated strains, on tomato (A), tobacco (B), and grapevine (C) leaves, on carnation (D) and gerbera (E) petals, and on tomato (F) and grape (G) fruits. Pictures were taken at the indicated day post inoculation (dpi). Inoculations were done either on intact plant material (without wound) or after wounding with a needle (with wound). Grapes were inoculated at the wound left by the detachment of the petiole. doi:10.1371/journal.pone.0065924.g008

pictures of samples stained with lactophenol trypan-blue, which densely stains only those hyphae that have not penetrated the plant tissue. Weakly stained hyphae inside the onion cells could be observed for the wild type and for $\Delta bcprt1$, but not for $\Delta bcprt2$ or $\Delta bcprt4$. Similarly, $\Delta bcprt2$ and $\Delta bcprt4$ were also unable to stimulate autofluorescence in onion cells (Figure 9B), a phenomenon indicative of a successful infection [46]. Finally, examination of the infected tissues with a Scanning Electron Microscope (Figure 9C) revealed the presence of fungal penetration sites displaying macerated plant tissue in the case of the wild type and the $\Delta bcprt1$ mutant, but these sites could not be found for the two

other mutants which displayed, instead, plenty of fungal hyphae growing outside the onion cells.

Another indirect test for the lack of penetration/adherence of $\Delta bcprt$ mutants on intact plant surfaces was carried out by measuring the strength with which mycelial plugs adhere to tobacco or grapevine leaves, at different times after inoculation. In first place, we tested the resistance of plugs to be washed off from the leaf surface by water, one day after inoculation and before any symptom could be seen in the leaves. On grapevine leaves, only the $\Delta bcprt2$ mutant could be removed by gentle agitation with water, while on tobacco leaves all $\Delta bcprt2$ and $\Delta bcprt4$ plugs were

Table 1. Virulence of the $\Delta bcpmt$ mutants on various hosts.

Strain	Tomato				Tobacco				Grapevine			
	Infection rate ^a (%)		Lesion growth rate ^b (mm/day)		Infection rate ^a (%)		Lesion growth rate ^b (mm/day)		Infection rate ^a (%)		Lesion growth rate ^b (mm/day)	
	w/o wound	with wound	w/o wound	with wound	w/o wound	with wound	w/o wound	with wound	w/o wound	with wound	w/o wound	with wound
B05.10	98	100	3.1±0.8		78	100	1.8±1.1		93	100	1.6±0.8	
$\Delta bcpmt1$	89	94	1.9±0.5*		69	97	1.4±0.7		0	83	0.7±0.3*	
$\Delta bcpmt2$	0	0	N/A		0	50	0.7±0.2*		0	0	N/A	
$\Delta bcpmt4$	34	79	1.6±0.6*		17	100	1.1±0.4*		0	60	0.4±0.2*	

^aPercentage of inoculations resulting in visible infections at 4 dpi (n ≥ 30). Leaves were wounded, where indicated, by puncturing with a needle. Inoculum consisted of 0.2 sq. mm agar cubes with mycelium.

^bGrowth rate of the radius of the infected area, calculated for successful inoculations (n ≥ 15).

*Asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type in the same plant.

N/A: not applicable. w/o: without.

doi:10.1371/journal.pone.0065924.t001

removed, as well as part of the $\Delta bcpmt1$ plugs (Figure 10A). The plugs with the wild type remained in the leaves in all occasions. The determination of the adherence strength, by pulling the agar plugs with a dynamometer, confirmed the lack of adherence of the plugs with $\Delta bcpmt2$, and also showed that $\Delta bcpmt1$ and $\Delta bcpmt4$ tend to bind to the leaf surface with less strength than the wild type (Figure 10B).

We can summarize these results by saying that the three $\Delta bcpmt$ mutants are greatly hampered in virulence, not only because they grow *in planta* slower than the wild type, which also happens in axenic culture, but also because they experience difficulties in adhering to/penetrating the plant surface. It is interesting to note that the three $\Delta bcpmt$ mutants seem to differ among them, in regard to virulence, in a way similar to what has been observed for any other aspect of their phenotype. That is, $\Delta bcpmt2$ is the mutant with the strongest phenotype, $\Delta bcpmt1$ is the one most similar to the wild-type, and $\Delta bcpmt4$ presents intermediate features.

Identification of Proteins Differentially O-glycosylated by $\Delta bcpmt$ Mutants

The changes in the O-glycosylation pattern introduced by the deletion of one of the *bcpmt* genes can result in an altered electrophoresis mobility of individual proteins, which may allow the identification of proteins serving as substrates of individual PMTs. This possibility was first explored by SDS-PAGE analysis of the proteins obtained from the extracellular medium, the high-salt fraction (proteins extracted with high salt from intact mycelium, presumably enriched in ECM proteins), and the cell membrane (Figure 11A). Initial trials (not shown), revealed that the amount of proteins that could be collected from the extracellular medium or by high-salt extraction was higher in cultures grown without shaking, probably because shaking greatly influences the pattern of growth (Figure 5D), so static liquid cultures were used. The results showed visible changes in the SDS-PAGE band pattern for extracellular and high-salt protein fractions from the three $\Delta bcpmt$ mutants, as compared to the wild type. These changes were more evident in case of $\Delta bcpmt2$ and $\Delta bcpmt4$, which is consistent with the more extreme phenotypes described above for these two strains. The band pattern obtained for the high-salt fraction did not differ to a great extent from that obtained for extracellular proteins, so that this fraction seems like a continuation of the extracellular medium where proteins are simply trapped in the gel-like polysaccharide forming the ECM. Protein constituents of the ECM, predicted from results in Figures 7 and S4, may be more strongly attached to the polysaccharides and therefore not amenable to extraction with high salt.

The high abundance of glycosylated proteins in these protein preparations was shown by probing these protein preparations with Concanavalin-A in a lectin-blot. The pattern obtained (Figure 11B) shows, in first place, the vast number of secretion proteins that display sugars recognized by Concanavalin-A. This great number of glycosylated proteins has been predicted with *in silico* tools in the case of O-glycosylation [7]. Notably, the most intense band of about 38 kDa in the gels stained with Coomassie blue (Figure 11A), previously identified as the aspartic protease BcAP8 [47], did not produce an equally intense band in the lectin blot. This may be related with the fact that this protein is predicted to have only two N-glycosylation sites, by NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>), and no O-glycosylation site, by NetOGlyc [7], and band intensities in the lectin-blot should relate to the amount of sugars and not to the amount of protein. In second place, despite the blurred bands typical of glycosylated proteins, this approach also resulted in clear differences in the band patterns for the wild type and the three mutants, indicating

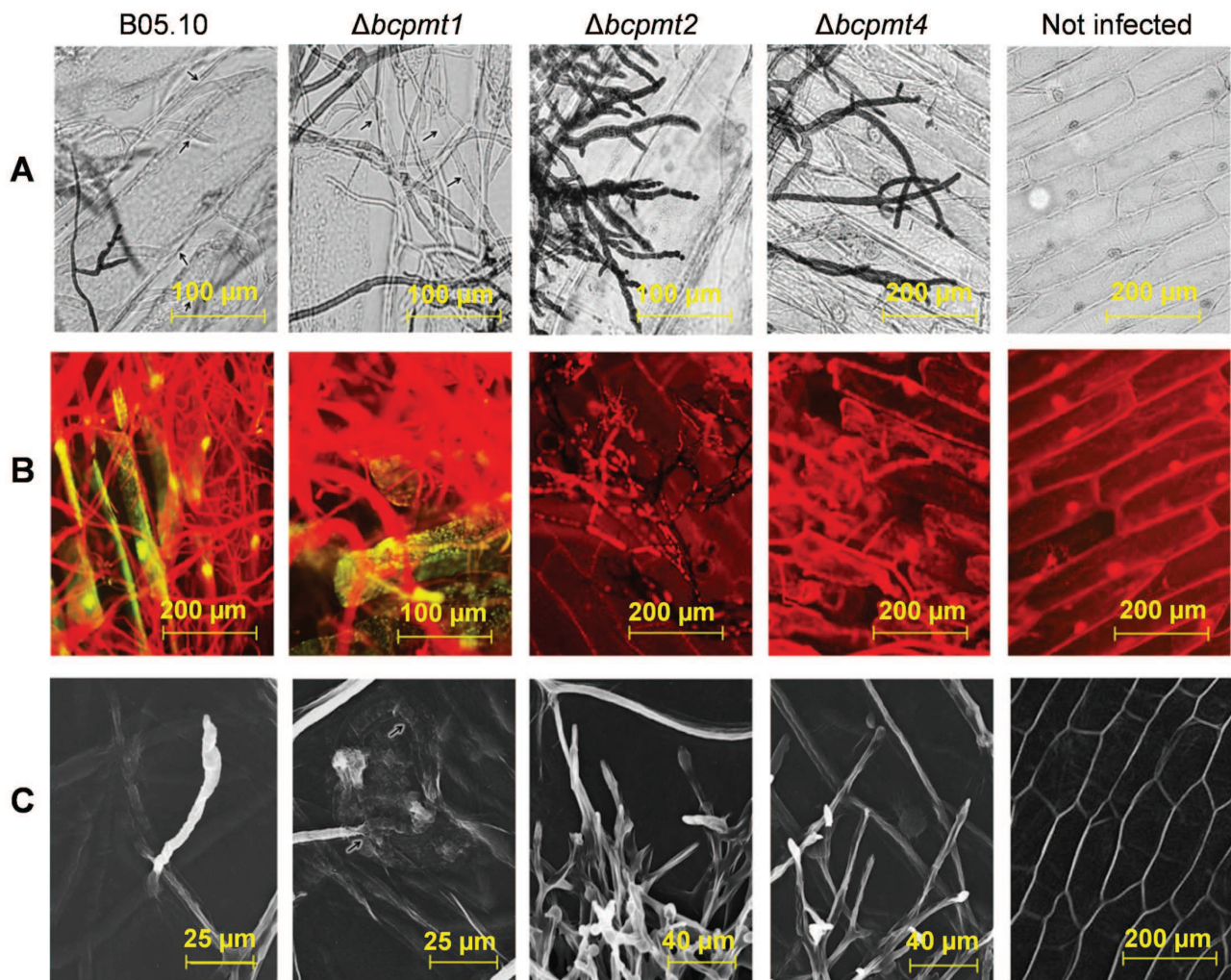


Figure 9. Penetration assays with the $\Delta bcpm1$ mutants on onion epidermis. Small pieces of mycelia from the three mutants and the wild type (B05.10) were placed on onion epidermis (inner surface up) and incubated for 1–4 days on the surface of water-agar. **A)** Samples stained with lactophenol trypan-blue. Arrows indicate unstained hyphae that have penetrated the epidermis. **B)** Fluorescence microscope observation of the same samples stained with lactophenol trypan-blue. Yellow autofluorescence is due to the release of phenolic compounds in the infected onion epidermal cells, and is an indirect indication of penetration. **C)** Observation under the scanning electron microscope. Arrows indicate the points where the mycelium has entered or is below the surface.
doi:10.1371/journal.pone.0065924.g009

that individual PMTs have different, maybe overlapping, sets of substrate proteins.

In order to identify individual proteins with differential electrophoretic mobility, two-dimensional electrophoresis were carried out to analyze the proteins secreted to the culture media by the three $\Delta bcpm1$ mutants and the wild-type (Figure 11C). As we had previously observed [48], the complexity of the protein mixture in the secretome was relatively low for the four strains, only 65 spots were observed in the gel for the wild-type strain. The spot pattern observed in the $\Delta bcpm1$ gel was the most similar to the wild type: 61 of 68 spots were also present in the wild-type strain, 7 new spots appeared and 4 disappeared. In the case of $\Delta bcpm2$, 48 of 79 spots were also in the wild-type gel, 31 new spots appeared and 17 disappeared. For the $\Delta bcpm4$ sample, 63 of 101 spots were similar to wild type, 38 new spots appeared and only 2 disappeared. Intriguingly, the 2D gel for the $\Delta bcpm4$ sample showed longer charge trains than the rest of the gels, a fact that may be in relation with differential glycosylation with charged

sugars displaying sulfate or phosphate groups, previously described in related fungus such as *Trichoderma* [3,49]. Charge trains as a result of multiple phosphorylations in intracellular proteins have a similar appearance [50]. The appearance/disappearance of spots is probably mainly a consequence of proteins changing mobility due to altered O-glycosylation, although other factors may also be relevant. For example, proteins with an altered glycosylation pattern may be incorrectly folded and may be retained in the secretion pathway. And the opposite could also be true, O-glycosylated proteins normally retained in the cell wall or ECM may end in the extracellular medium if they have an altered glycosylation pattern.

Twelve of the spots with a clear modified electrophoretic mobility (numbered in Figure 11C) were excised from the gels to identify the proteins in them by MALDI TOF/TOF. Spots 1, 2 and 11 were identified as BC1G_12374.1/BofuT4_P023950.1, a 187-aa hypothetical protein of unknown function similar to proteins described as IgE-binding proteins. This protein contains

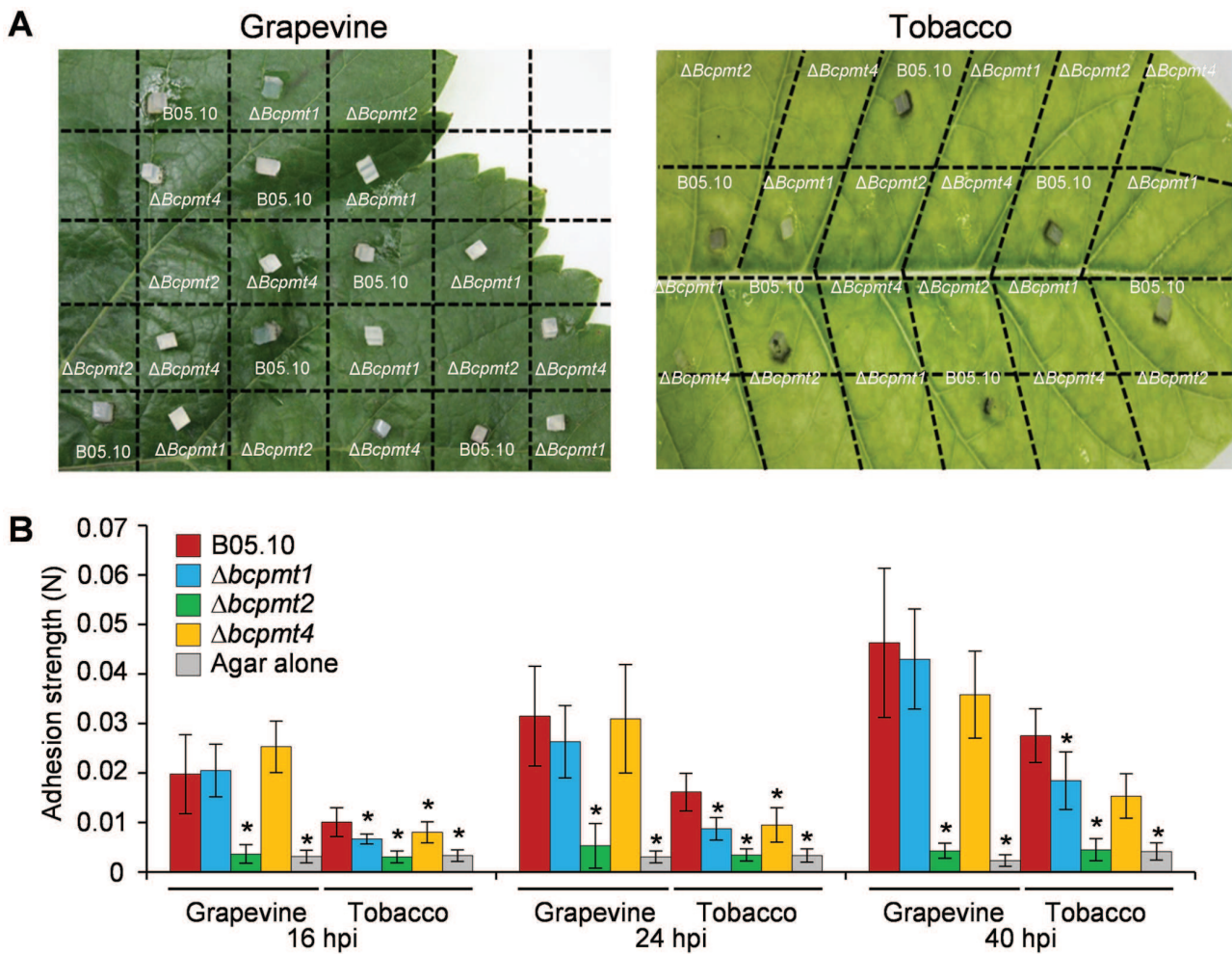


Figure 10. $\Delta bcpmt2$ is impaired in adhesion to plant surfaces. **A**) Grapevine and tobacco leaves, inoculated at random positions with mycelium plugs from the three $\Delta bcpmt$ mutants and the wild type (B05.10), were washed with water after 24-hours growth to remove non-attached plugs. **B**) Adhesion strength (mean values and standard deviation, $n \geq 10$) of agar plugs on grapevine and tobacco leaves at different times (hpi: hours after inoculation). Asterisks indicate a statistically significant difference with the wild type in the same conditions ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0065924.g010

a region of 29 amino acids with more than 40% Ser/Thr residues, which is predicted to be hyper-*O*-glycosylated [7]. Interestingly, this protein seems to be affected both in the $\Delta bcpmt2$ and in the $\Delta bcpmt4$ mutants but in a different manner, several spots in the same charge train in the wild type gel (probably all BC1G_12374.1/BofuT4_P023950.1) simply disappear in $\Delta bcpmt2$ while in $\Delta bcpmt4$ they are still present but the charge train has been enlarged. The spot number 3 was identified as BC1G_08658.1/BofuT4_P123410.1, a 484-aa protein similar to Carboxypeptidase-A. This spot disappears in the $\Delta bcpmt2$ secretome, and its sequence contains a 19-aa region with a high Ser/Thr content. Spot number 4 shows a small shift to basic pI in $\Delta bcpmt2$ and $\Delta bcpmt4$ samples, and was identified as BcSpl1, a 137-aa ceratoplatanin family protein required for full virulence and recently characterized by our group [51]. Surprisingly, no Ser/Thr-rich regions can be found in this protein and no *O*-glycosylation sites are predicted [7]. Spot number 5 is part of a charge train that appears only in $\Delta bcpmt1$ and was identified as BC1G_04151.1/BofuT4_P095270.1, a 672-aa protein similar to Glucoamylase which contains three Ser/Thr-rich regions [7]. This spot appears as part of a charge train around pH 5 that could be observed only

in $\Delta bcpmt1$, but has been previously identified at more acid pH [48]. Spot number 6 is in another charge train which was only observed in the $\Delta bcpmt2$ sample and was identified as BC1G_02021/BofuT4_P061670.1, a 628-aa protein similar to Glucose-methanol-choline oxidoreductases which contains two Ser/Thr-rich regions [7]. Spot number 7 is present only in the gel for $\Delta bcpmt2$ and was identified as BC1G_03070/BofuT4_P134040.1. This protein has been previously characterized as Aspartic protease 8 (BcAp8) [47], the most abundant secretome protein which forms the strongest spot in the gels [48] from which spot 7 seems to be a delayed fraction. Spot 8 was identified as Endopolygalacturonase 1 (BC1G_11143.1/BofuT4_P089370.1), a protein required for full virulence in *B. cinerea* [52]. This spot appeared in the gel for $\Delta bcpmt2$ at a pH more basic than we have previously observed in the wild type [48]. Bcp1 displays four Ser/Thr-rich regions [7]. Spot number 9 was present only in the $\Delta bcpmt2$ gel and was identified as BC1G_08642/BofuT4_P123260.1, a 153-aa hypothetical protein of unknown function. Its sequence contains a 20-aa Ser/Thr-rich region [7]. The spot number 10 was only present in the gel for $\Delta bcpmt2$ and was identified as BofuT4_P024480.1, no corresponding protein

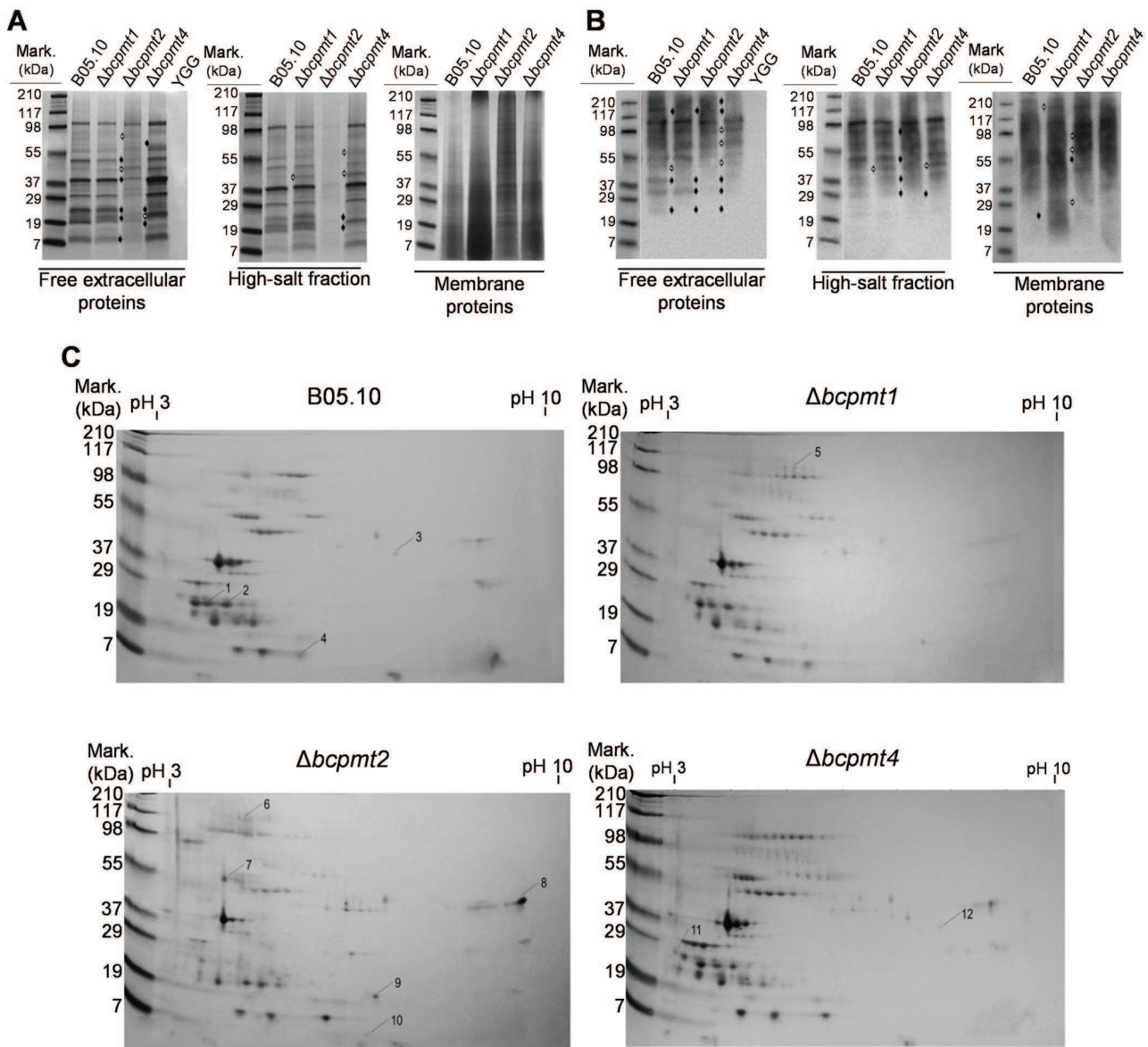


Figure 11. Patterns of protein secretion in the $\Delta bcpmt$ mutant strains. **A)** and **B)** SDS-PAGE gels of the secretory proteins produced by the three $\Delta bcpmt$ mutants and the wild type (B05.10). Proteins were either collected from the culture medium (Free extracellular proteins), extracted from intact mycelia with high-salt (High-salt fraction), or extracted from whole membranes (Membrane proteins). Proteins were either stained with Coomassie brilliant blue (A) or detected with Concanavalin A in lectin-blots (B). The control sample (YGG) shows that no proteins were obtained from the culture medium alone. White arrows point to bands that are new in the mutants and black arrows to bands that have disappeared, as compared to the wild type. **C)** Two dimensional electrophoresis of proteins isolated from the culture supernatants. Proteins in numbered spots were identified and are described in the text.

doi:10.1371/journal.pone.0065924.g011

was found in the sequenced genome of *B. cinerea* B05.10. This 121-aa protein has no known function and no similarities other than to its homologue in the closely related fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Despite having no predicted signal peptide, it has been previously found in the culture medium as an 11-kDa protein, named *ekdA*, that copurified with cutinase CutA [53], as well as in a previous proteomic study [48]. Its presence in the culture medium was explained as a leak from the cell interior [53], and this would agree with the fact that $\Delta bcpmt2$ is the mutant with the weakest cell wall. However, the fact that *ekdA* contains two Ser/Thr-rich regions would agree with extracellular location. Finally, the spot number

12 was observed only in the $\Delta bcpmt4$ sample and was identified as BC1G_10789.1/BofuT4_P064400.1, a 320-aa protein similar to alpha-L-arabinofuranosidases belonging family 62 of Glycosyl Hydrolases. This protein contains four Ser/Thr-rich regions [7].

Overall, ten different proteins have been identified with an altered electrophoretic mobility in the $\Delta bcpmt$ mutants. Almost all of them (9 out of 10) display in their sequence regions with a high Ser/Thr content (40% or more), usually considered as a key feature of regions to be subjected to O-glycosylation in the secretory pathway [5,6].

Discussion

In this work we have found that, similarly to other filamentous fungi, the *B. cinerea* genome contains three *pmt* genes, coding for representatives of each of the three PMT subfamilies. The three PMT proteins display the usual motifs and structure (transmembrane domains) typical of this kind of proteins, and show a near-constitutive expression. *pmt* genes in other systems are also expressed in all conditions examined with no significant variation. Such are the cases, for example, of the *pmt* genes from *C. neoformans* [21], which shown essentially no variation in the conditions assayed, and *A. nidulans* [33,40], also showing constitutive expression for the gene in subfamily 2 and with a small decrease relative to culture age for genes in subfamilies 1 and 4. In the case of *S. cerevisiae*, regulation of *pmt* genes along the cell cycle has been reported, with maximal expression at the late G1 phase, and indeed binding sites for the SBF transcription factor involved in activation of transcription at the late G1 phase were encountered in the promoters of most *pmt* genes [10]. Despite these variations, *S. cerevisiae* *pmt* genes are also considered to have a high constitutive expression [10].

Knockout of the *pmt* genes in *B. cinerea* resulted in an array of defects on fungal growth, morphology, and virulence. These changes are most prominent for the $\Delta bc\text{pmt}2$ mutant, which grows very poorly, producing very compact colonies with thick hyphae displaying small swollen cells and more frequent ramifications. This phenotype reverts partially with the addition of osmotic stabilizers, pointing to a weakened cell wall as the main cause. Furthermore, $\Delta bc\text{pmt}2$ was also completely unable to produce ECM and to adhere to, or penetrate, intact plant surfaces. Its growth *in planta* could only be observed in wounded tobacco leaves, from all the plant material tested. All these findings indicate that BcPMT2 contributes in a great extent to the O-glycosylation of proteins which are important to maintain the structure of the cell wall and extracellular matrix, and, either solely as a consequence of this or because of the O-glycosylation of virulence-specific proteins, BcPMT2 is also essential for virulence. Deletion of the homologous gene in other filamentous fungi results always in similar strong phenotypes, even in lack of viability. Mutants for the *bc\text{pmt}2* homologues in *A. awamori* [16] and *A. nidulans* [40] are both viable but show similar growth defects and morphology as $\Delta bc\text{pmt}2$, but the deletion of the corresponding gene in *Aspergillus fumigatus* [34], *Candida albicans* [37], and *U. maydis* [24] is lethal. Conflicting results have been reported for *S. pombe* [22,23]. PMT2 seems to be, therefore, the PMT enzyme playing the most important role in fungal basic biology, and evidences point to a crucial role in the O-glycosylation of proteins important in maintaining the structure of the fungal cell wall and extracellular matrix.

The deletion of *bc\text{pmt}4* results in a phenotype that seems to be a weaker version of the $\Delta bc\text{pmt}2$ phenotype but with added extra features. In almost every aspect assayed, such as growth rate, appearance under the microscope, production of conidia, and formation of ECM, $\Delta bc\text{pmt}4$ seems to be half-way between the wild type and $\Delta bc\text{pmt}2$. Moreover, some of these features were reverted by the addition of osmotic stabilizers, in the same way as $\Delta bc\text{pmt}2$, also pointing to a damaged cell wall in this mutant. This kind of phenotype, related with a weaker cell-wall, was also found in *pmt4* mutants of *A. nidulans* [25,33], *A. fumigatus* [34], *C. neoformans* 2844 [54], and to a minor extent in *U. maydis* [24], whose only symptom of a weakened cell-wall is an increased sensitivity to SDS. This indicates that protein substrates of BcPMT4 include cell wall proteins, although their quantity or relevance in cell wall structure is not as high as in the case of BcPMT2.

BcPMT4, on the other hand, seems to play a specific role in virulence. $\Delta bc\text{pmt}4$ is highly impaired in penetration (Figures 8 and 9, Table 1), similarly to what has been observed for the *pmt4* mutant of *U. maydis* [24]. Although the same impairment was observed in $\Delta bc\text{pmt}2$, the effect seems to be much more specific in $\Delta bc\text{pmt}4$. As compared with $\Delta bc\text{pmt}2$, $\Delta bc\text{pmt}4$ displays a general fitness phenotype in axenic culture (growth rates, sporulation, etc.) more similar to the wild type. However, its penetration ability, especially in grapevine leaves, is virtually nonexistent. These findings point to a role of PMT4 in the O-glycosylation of proteins with specific roles in penetrating the plant surface, and in this respect it is interesting that in *U. maydis* the *pmt4* mutant produces a reduced number of appressoria, and those produced are not capable to carry on to penetrate the cuticle [24].

BcPMT1 appears to be the PMT protein contributing the less to the fitness of *B. cinerea*. Although the $\Delta bc\text{pmt}1$ mutant also showed a reduction in the growth rate not very different from that obtained for $\Delta bc\text{pmt}4$, the appearance of $\Delta bc\text{pmt}1$ mycelia and colonies under the microscope (Figure 6) is very similar to the wild type. Regarding virulence, PMT1 also seems to contribute to a lesser extent, and a significant decrease was only seen for the penetration of grapevine leaves, but not tomato or tobacco leaves and onion epidermis.

One important aspect of $\Delta bc\text{pmt}$ mutants is its decreased ability to generate ECM, and the probably related lower capacity to retain water (Figure 7). Although ECM was most affected by the deletion of *bc\text{pmt}2*, the mutation of the other two genes also has the consequence of producing a somehow weaker matrix, which is more easily removed when the culture is shaken. O-glycosylated proteins are therefore expected as crucial components of ECM, and these would be substrates mainly of BcPMT2 but also of BcPMT4. The existence of these structural proteins in ECM is also predicted by the fact that ECM in the wild-type strain becomes disorganized to some extent when whole cultures are treated with proteinase K (Figure S4). The deletion of the *pmt4* gene in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* also results in about 50% reduction in the size of the polysaccharide capsule [21], a virulence factor for this organism, although the contribution of PMT2 could not be assessed because the corresponding mutant was not viable. It is tempting to make ECM, or the lack of it, responsible for the decreased adherence to plant surfaces observed for the three mutants (Figure 10), since the degree of adherence seems to be related to the amount of ECM. However, given the pleiotropic nature of the *bc\text{pmt}* mutations, the generation of mutants specifically affected in ECM would be necessary to test this hypothesis.

As has been discussed before [33], the phenotypes observed for the three *pmt* mutants in *B. cinerea* and in other fungi [24,25,33,34,40] do not easily agree with the dimerization of PMT proteins described in *S. cerevisiae* [15]. If the heterodimerization of *S. cerevisiae* PMT1 and PMT2 subfamily members, and the homodimerization of PMT4, were also true for their fungal homologues, and if this dimerization were necessary for the PMT proteins to have protein mannosylation activity, then one would expect similar phenotypes for *pmt1* and *pmt2* mutants. Since this is clearly not the case, one of the two above conditions is not true for these organisms. The usually stronger phenotype, often lethal, of the *pmt2* mutants would be compatible with the existence of PMT1/PMT2 and PMT2/PMT4 heterodimers, but this possibility has never been explored experimentally in fungi, to our knowledge.

We have identified several secretome proteins with altered electrophoretic mobility in the *pmt* mutants, which constitute potential new PMTs substrates. Almost all of them were predicted

previously to be O-glycosylated [7]. For 2 of these proteins, as well as for several more unidentified spots in 2D gels, the electrophoretic mobility was altered in more than one of the *pmt* mutants. This may be a consequence of PMT heterodimerization as has been discussed above, the O-glycosylation of proteins which are substrates of a given hetero-dimer would be affected in the two corresponding mutants, but may also be possible if individual proteins can serve as substrates to more than one PMT or PMT homo/hetero-dimer. The expression in *B. cinerea pmt* mutants of short Ser/Thr-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated [7], bound to reporter proteins, may help elucidate this matter in the future.

One important implication of this work, given the great impact that the *pmt* mutations have on virulence and viability, and given the fact that plants do not have PMTs, is the possibility of using these enzymes as targets in the design of novel control strategies against *B. cinerea*. The fact that the deletion of only one *pmt* gene, out of three, can render the fungus non-virulent suggests that PMT inhibitors may be useful in the fight against this plant pathogen, even if inhibition is not complete.

Materials and Methods

Organisms and Culture Conditions

B. cinerea strain B05.10 [55] was used as wild-type and control strain. Fungal strains were kept as conidia or mycelium (in agar plugs, for non-conidiating strains) in 15% glycerol at -80°C for long time storage, or in silica gel at 4°C for routine use [56]. Tomato-agar plates (25% tomato fruit extract, 2% agar, pH 5.5) were inoculated with silica stocks or agar plugs to obtain conidia [57]. Conidia were routinely quantified at 600 nm with a spectrophotometer. The relation between Abs_{600} and number of conidia per mL was calculated for our spectrophotometer with the aid of a hemocytometer. Sclerotia viability was assayed by washing them 3 times for 10 min with water, 3 min with 1% NaClO, again 3×10 min with water, and finally inoculating them onto YGG plates. Routine culture or growth tests were carried out in MEA (1% Malt Extract from Pronadisa, Spain), SH (600 mM Sucrose, 5 mM HEPES pH 6.5, 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), YGG (0.5% Yeast Extract from Pronadisa, 100 mM Glucose, 0.3% Gamborg's B5 from Duchefa Biochemie), PDA (3.9% Potato dextrose agar from Duchefa Biochemie), GB5 (0.3% Gamborg's B5, 10 mM Glucose), and MB (0.3% Gamborg's B5, 10 mM Glucose, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM MES pH 5.5). All media were supplemented with 1.5% agar when necessary.

Bioinformatic and Statistical Analysis

Sequence alignments and phylogenetic analyses were made with CLUSTALW2 [58], using the default settings. Transmembrane regions were predicted with TMHMM 2.0 [27], PredictProtein [28,29], and Phobius [30]. Transmembrane regions for whole PMT families (Figure S1) were represented by calculating the average start and end positions of each region, as predicted by Phobius, in the alignment (Figure S2). Conserved sequence motifs were searched for with InterPro Scan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/ipscan>). Average hydropathy profiles for whole PMT families (Figure S1) were calculated by manually determining the average Kyte-Doolittle index for all the residues in a given alignment position, in first place, and then deriving from them the average index over windows of 15 alignment positions. Statistical analysis was carried out with SPSS 17 (IBM). Statistical significance tests used were either the T-test, in those cases with a normal distribution (analyzed with the Kolmogorov-Smirnov

test), or the Mann-Whitney test, if sample distribution was not normal.

Quantitative Real Time PCR

Mycelia for RNA extraction were prepared as explained elsewhere [47]. Total RNA from *B. cinerea* and *B. cinerea*-infected tomato plants was isolated with the RNeasy plant mini kit (Qiagen). Contaminant genomic DNA was eliminated by treatment with RNase-free DNaseI. Amplification was carried out in an iCycler iQ Real-Time PCR system (Bio-Rad), with the Bio-Rad iQ SYBR Green supermix and the primers listed in Table S2. The amplification of a single fragment was verified for every PCR reaction by running the final product on a 12% polyacrylamide gel electrophoresis. The relative mRNA amounts were calculated by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method from the mean of three independent determinations of the threshold cycle [59,60]. Deviation from the mean was calculated from the standard deviation (SD) in the $\Delta\Delta\text{Ct}$ value, using the expression $2^{(\Delta\Delta\text{Ct} \pm \text{SD})}$.

bcpmt Gene Replacements

Recombinant DNA methods were performed as described by Sambrook and Russell [61]. Primers (Table S2) were from Invitrogen (Paisley, Scotland). Genomic DNA from *B. cinerea* was extracted using a method previously developed in our laboratory [62]. The gene replacement strategy is outlined in Figure S3. The replacement cassettes were constructed by DJ-PCR following a method previously described [63,64], with some modifications. The hygromycin resistance cassette (GenBank accession AJ439603) was amplified in all cases with Phusion DNA polymerase (Finnzymes, Keilaranta, Finland), and the two flanking regions homologous to the target gene (approximately 500 bp) were amplified with Taq DNA polymerase (GenScript, Piscataway, NJ, USA) from *B. cinerea* B05.10 genomic DNA. Equimolar amounts of the three fragments were fused by PCR, and the final constructs were amplified with the corresponding nested primers (Figure S3), using 2 μl of each fusion PCR as template. The resultant gene replacement cassettes were purified from agarose gels with Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, U.S.A.) and checked by digestion with restriction enzymes. *B. cinerea* transformations were carried out as described elsewhere [65,66] and transformants were then purified by single-conidia isolation on hygromycin-containing plates to ensure homokaryosis. Homokaryotic transformants were analyzed by Southern-blot and by PCR (Figure S3) to ensure the correct disruption of the *bcpmt* gene and the absence of additional copies of the transforming DNA. Southern blots were carried out with digoxigenin labeled probes using the DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche, Basel, Switzerland).

Microscopy

Staining with India ink was carried out by incubating mycelia with the dye for 5 min, and samples were then directly examined with the microscope. Staining with CW was carried out also for 5 min with CW stain solution (0.05% CW, 7.5% KOH), samples were then washed twice with 15% KOH and finally observed under an Olympus BX-50 fluorescence microscope equipped with a U-MWIB filter. For scanning electron microscopy (SEM), mycelia were grown from agar plugs over MF-Millipore filters (0.22 μm) layered on MB plates. Two days after inoculation filters were collected, fixed with 25% glutaraldehyde vapors on a vacuum hood for 24 hours, thoroughly dried with silica-gel under vacuum for 5 days, coated with gold, and observed in a JEOL JSM-6300 scanning electron microscope.

Pathogenicity Tests

Since the $\Delta bcpmt$ mutants produce little or no conidia, the indicated plant material (detached leaves, petals, or fruits) was inoculated with mycelia in agar plugs (0.2-cm YGG-agar cubes) and 20 μ l of sterile water were added over each plug to facilitate adherence. The infected plant material was incubated at 22°C under conditions of high humidity on water-soaked filter paper in closed containers, and lesions at different time-points were photographed. At least 30 replicates were performed in every case. Infections were evaluated visually and, only for tomato, tobacco and grapevine leaves, quantitative results are presented as the rate of progression of lesion size (radius in mm day⁻¹), calculated for each individual infection from three measures taken at different days. For this purpose, the shape of the lesions was approximated to an ellipse for which the two radii were measured, and lesion sizes were calculated as the geometrical mean of these two radii, that is, as the radius of a hypothetical circle with the same area as the ellipse.

The strength with which the agar plugs (5-mm agar cubes) adhere to plant surfaces was measured by slowly pulling the agar plug with a dynamometer (Ventus, 0.1 N) attached to a camera stand, with the aid of a needle curved to resemble a hook attached to the plug. The pulling force displayed by the dynamometer at the time the plug detached from the leaf was recorded for a minimum of 10 replicates.

Onion Epidermis Penetration Assays

Small pieces of onion epidermis were cut and placed on slides with the inner face up. A small piece of mycelium grown for 4 days in liquid medium was placed on it and one drop of YGG-broth with salt was added. Samples were incubated in a humid chamber until mycelia was clearly growing (1 day for the wild type and 2–4 days for the mutants) and then stained with 0.05% trypan-blue in lactophenol for 5 min. After removing the excess dye by washing with water, the epidermis was examined under visible or UV (U-MWIB filter) light with the fluorescence microscope. SEM images were obtained as explained above, but in this case the fungus was grown from agar plugs over onion epidermis and the plugs were removed before drying the samples.

Preparation of Protein Samples

In order to obtain the various protein fractions, agar plugs containing young mycelium were inoculated in plates with 20 ml of YGG-broth, approximately 5–20 plugs per plate depending on strain, and grown for 4 days without shaking. Culture media were then separated from mycelia by filtration through several layers of filter paper. Extracellular proteins were precipitated from the filtrate with methanol-chloroform according to Wessel and Flugge [67] and stored dry at -20°C until use, in several identical aliquots. The amount of proteins obtained was estimated by loading one of the aliquots to a SDS-PAGE gel along with known quantities of bovine serum albumin, as described before [48]. Typically, from one plate with 20 ml of culture medium 10–20 μ g of proteins were obtained for $\Delta bcpmt2$ and 70–100 μ g for the rest of the strains. In order to obtain proteins weakly bound to the extracellular matrix or the cell wall (referred to high-salt fraction), the mycelia retained in the filters were washed twice for 15 min with cold water under slow agitation and then extracted with high salt, by incubating with 300 mM NaCl (approximately the same volume as the mycelium) for 20 minutes under slow agitation. After centrifugation at 1000 g for 6 minutes, the proteins in the supernatant were precipitated with methanol-chloroform and quantified as explained above. In order to prepare proteins from cell membranes, the same mycelium samples were washed with

cold water again and then a portion of approximately 0.2 g was homogenized in a FastPrep-24 MP beadbeater with 400 μ l of cold Lysis Buffer (75 mM Tris-HCl pH7, 1.5 mM EDTA, 1 M Sucrose, and Complete Protease Inhibitor from Roche) and 0.5 mm glass beads at 60 m s⁻¹ for 1 min. The tube was then punctured at the bottom with a needle and briefly centrifuged inside an empty microcentrifuge tube. The resulting filtrate was first centrifuged for 15 min at 3000 g in the cold (4°C), and the supernatant was re-centrifuged for 1 h at 145 000 g, also at 4°C. The pellet containing the membrane fraction was resuspended in SDS-PAGE sample buffer and quantified as explained above. All protein preparations were analyzed by SDS-PAGE on Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad), and the gels were stained with colloidal Coomassie brilliant blue [68].

Lectin Blots

Equal amounts of protein were loaded to Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad) and then transferred to Immobilon PVDF membranes (Millipore). The membranes were then processed as explained elsewhere [69] using 1 μ g μ l⁻¹ biotinylated concanavalin-A (Sigma C2272) to detect glycosylated proteins and 0.5 μ g ml⁻¹ Streptavidin-Peroxidase (Sigma S5512) to detect the biotinylated concanavalin. Final detection of the peroxidase was carried out with 400 μ l of Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) using the Gel Doc XR+ System (Bio-Rad).

2-D Electrophoresis and Protein Identification

All reagents and equipment for 2-D electrophoresis were from Bio-Rad and were used according to the manufacturer's instructions. Dry protein samples were dissolved in the appropriate volume of ReadyPrep sequential extraction Reagent 2 to achieve 10 μ g of total protein in 125 μ l. This amount of protein was subjected to 2D electrophoresis as explained before [48] except that the pH range of the IPG strips was 3–10 and Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad) were used for the second dimension. Protein spots were excised manually from stained gels and sent to the CNB Proteomics Facility (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain) to be processed by MALDI TOF/TOF analysis as described earlier [70]. Protein identification was done with MASCOT software v.2.2.04 (Matrix Science, London, UK), searching the non-redundant NCBI protein database NCBI nr_20120720 (19248190 sequences; 6604124933 residues) with the following search parameters: enzyme, trypsin; allowed missed cleavages, 1; carbamidomethyl cysteine as fixed modification by the treatment with iodoacetamide; variable modifications, oxidation of methionine; mass tolerance was set to \pm 50 ppm for precursors and to \pm 0.3 Da for MS/MS fragment ions. The confidence interval for protein identification was set to \geq 95% ($p < 0.05$) and only peptides with an individual ion score above the identity threshold were considered correctly identified.

Supporting Information

Figure S1 Putative topology of *B. cinerea* PMTs. The hydrophobicity of each BcPMT (thick line), calculated with the Kyte-Doolittle scale and a window of 15 residues, is plotted alongside the average hydrophobicity of the corresponding PMT subfamily (thin line) derived from the alignment (Figure S2). Black lines below plot indicate the transmembrane regions predicted for the alignment, and those corresponding to the 7 transmembrane domains of *S. cerevisiae* PMTs are marked with roman numerals (question marks indicate that it is not clear which one of the two regions marked as VII is the last transmembrane domain in

S. cerevisiae [14]), PMT domains (grey boxes) and MIR subdomains (white boxes) detected by InterProScan are also marked. (TIF)

Figure S2 Alignment of fungal PMTs. Proteins were aligned by PRALINE, making use of the transmembrane regions predicted by PHOBIUS (on green background). The regions homologous to the 7 experimentally-determined transmembrane domains of *S. cerevisiae* Pmt1p are marked with roman numerals. Question marks indicate that it is not clear which region is the last transmembrane domain of Pmt1p. The catalytically-important ER-luminal loop 1 (red boxes), loop 5 (blue boxes), and DE-motif (yellow boxes) are also shown in the alignments. First two letters in protein names indicate the fungus it comes from (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Ca: *Candida albicans*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Um: *Ustilago maydis*; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Bc: *Botrytis cinerea*; An: *Aspergillus nidulans*; Af: *Aspergillus fumigatus*). Accession numbers can be found in Table S1. (PDF)

Figure S3 Generation of the three *bcpmt* knockout mutants. **A**) Strategy used to generate the three $\Delta bcpmts$ knockout mutants. The DNA constructs used in the transformation, shown below each *bcpmt* gene, contain the hygromycin resistance cassette (Hyg-R) flanked by two regions of the target gene. The position of all primers used to generate the constructs and to check the transformants are indicated (arrows). **B**) PCR and Southern-

blot analysis carried out to check the mutants. Primers used in the PCRs (left panels) are indicated below each picture. Southern-blots were carried out with the indicated genomic DNAs and restriction enzymes, and with the probes indicated in A. (TIF)

Figure S4 Partial degradation of the extracellular matrix by treatment with proteinase K. Mycelia were grown in liquid YGG medium without shaking, transferred to 0.5X phosphate buffer saline and incubated with 0.4 mg ml⁻¹ proteinase K for 4 hours before staining with India ink. Controls received no proteinase K. (TIF)

Table S1 Protein sequences used in this work. Protein sequences used in the comparative studies displayed in Figures 1 and S2. (PDF)

Table S2 Oligonucleotides used in this study. (PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NB CG. Performed the experiments: MG MF. Analyzed the data: MG NB MF CG. Wrote the paper: MG NB CG.

References

- Lehle L, Strahl S, Tanner W (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 6802–6818.
- Burda P, Aebi M (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426: 239–257.
- Goto M (2007) Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1415–1427.
- Julenius K, Molgaard A, Gupta R, Brunak S (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153–164.
- Hutzler J, Schmid M, Bernard T, Henrissat B, Strahl S (2007) Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7827–7832.
- Fernández-Álvarez A, Marin-Menguiano M, Lanver D, Jiménez-Martín A, Elias-Villalobos A, et al. (2012) Identification of O-mannosylated Virulence Factors in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 8: e1002563.
- González M, Brito N, González C (2012) High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the extracellular proteins coded by eight fungal genomes. *BMC Microbiol* 12: 213.
- Gentsch M, Tanner W (1996) The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J* 15: 5752–5759.
- Lussier M, Sdicu AM, Bussey H (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1426: 323–334.
- Strahl-Bolsinger S, Gentsch M, Tanner W (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426: 297–307.
- Lommel M, Strahl S (2009) Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* 19: 816–828.
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* 275: 19288–19296.
- Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S (2002) Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatis. *Glycobiology* 12: 771–783.
- Strahl-Bolsinger S, Scheinost A (1999) Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem* 274: 9068–9075.
- Girrbach V, Strahl S (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* 278: 12534–12562.
- Oka T, Sameshima Y, Koga T, Kim H, Goto M, et al. (2005) Protein O-mannosyltransferase A of *Aspergillus awamori* is involved in O-mannosylation of glucoamylase I. *Microbiology* 151: 3657–3667.
- Timpel C, Strahl-Bolsinger S, Ziegelbauer K, Ernst JF (1998) Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* 273: 20837–20846.
- Sanders SL, Gentsch M, Tanner W, Herskowitz I (1999) O-Glycosylation of Axl2/Bud10p by Pmt4p is required for its stability, localization, and function in daughter cells. *J Cell Biol* 145: 1177–1188.
- Lommel M, Bagnat M, Strahl S (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol* 24: 46–57.
- Hirayama H, Fujita M, Yoko-o T, Jigami Y (2008) O-mannosylation is required for degradation of the endoplasmic reticulum-associated degradation substrate Gas1*_p via the ubiquitin/proteasome pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 143: 555–567.
- Willger SD, Ernst JF, Alspaugh JA, Lengeler KB (2009) Characterization of the PMT gene family in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* 4: e6321.
- Willer T, Brandl M, Sipiczki M, Strahl S (2005) Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol* 57: 156–170.
- Tanaka N, Fujita Y, Suzuki S, Morishita M, Giga-Hama Y, et al. (2005) Characterization of O-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 813–820.
- Fernández-Álvarez A, Elias-Villalobos A, Ibeas JI (2009) The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 21: 3397–3412.
- Kriangkripiat T, Momany M (2009) *Aspergillus nidulans* protein O-mannosyltransferases play roles in cell wall integrity and developmental patterning. *Eukaryot Cell* 8: 1475–1485.
- Espino JJ, Brito N, Noda J, González C (2005) *Botrytis cinerea* endo-B-1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physiol Mol Plant Pathol* 66: 213–221.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580.
- Rost B, Sander C, Casadio R, Fariselli P (2003) Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci* 4: 521–533.
- Rost B, Yachdav G, Liu J (2004) The predictProtein server. *Nucl Acids Res* 32: W321–W326.
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction - the Phobius web server. *Nucleic Acids Res* 35: W429–W432.
- Illergård K, Ardell DH, Elofsson A (2009) Structure is three to ten times more conserved than sequence - A study of structural response in protein cores. *Proteins* 77: 499–508.
- Lommel M, Schott A, Jank T, Hofmann V, Strahl S (2011) A conserved acidic motif is crucial for enzymatic activity of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem* 286: 39768–39775.
- Goto M, Harada Y, Oka T, Matsumoto S, Takegawa K, et al. (2009) Protein O-mannosyltransferases B and C support hyphal development and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8: 1465–1474.

34. Mouyna I, Knienmeyer O, Jank T, Loussert C, Mellado E, et al. (2010) Members of protein O-mannosyltransferase family in *Aspergillus fumigatus* differentially affect growth, morphogenesis and viability. *Mol Microbiol* 76: 1205–1221.
35. Schumacher J, Tudzynski P (2012) Morphogenesis and infection in *Botrytis cinerea*. In: Pérez-Martín J, Di Pietro A, editors. Morphogenesis and pathogenicity in fungi. Berlin/Heidelberg: Springer. 225–241.
36. Liu W, Soulié MC, Perrino C, Fillinger S (2011) The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. *Fungal Genet Biol* 48: 377–387.
37. Prill SKH, Klinter B, Timpel C, Gale CA, Schroppe K, et al. (2005) PMT family of *Candida albicans*: five protein mannosyltransferase isoforms affect growth, morphogenesis and antifungal resistance. *Mol Microbiol* 55: 546–560.
38. Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28: 799–808.
39. Doss RP (1999) Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 65: 404–408.
40. Oka T, Hamaguchi T, Sameshima Y, Goto M, Furukawa K (2004) Molecular characterization of protein O-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 150: 1973–1982.
41. Fang W, Ding W, Wang B, Zhou H, Ouyang H, et al. (2010) Reduced expression of the O-mannosyltransferase 2 (AtPmt2) leads to deficient cell wall and abnormal polarity in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* 20: 542–552.
42. Bowman SM, Piwowar A, Ciocca M, Free SJ (2005) Mannosyltransferase is required for cell wall biosynthesis, morphology and control of asexual development in *Neurospora crassa*. *Mycologia* 97: 872–879.
43. Gil-ad NL, Bar-Nun N, Mayer AM (2002) The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. *FEMS Microbiol Lett* 199: 109–113.
44. Doss RP, Potter SW, Soeldner AH, Christian JK, Fukunaga LE (1995) Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 61: 260–265.
45. Laspidou CS, Rittmann BE (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res* 36: 2711–2720.
46. Zheng L, Campbell M, Murphy J, Lam S, Xu JR (2000) The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 724–732.
47. ten Have A, Espino JJ, Dekkers E, Sluyter SCV, Brito N, et al. (2010) The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genet Biol* 47: 53–65.
48. Espino JJ, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, et al. (2010) The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10: 3020–3034.
49. Christiansen MN, Kolarich D, Nevalainen H, Packer NH, Jensen PH (2010) Challenges of determining O-glycopeptide heterogeneity: a fungal glucanase model system. *Anal Chem* 82: 3500–3509.
50. Halligan BD (2009) ProMoST: a tool for calculating the pI and molecular mass of phosphorylated and modified proteins on two-dimensional gels. *Methods Mol Biol* 527: 283–98.
51. Frias M, González C, Brito N (2011) BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol* 192: 483–495.
52. ten Have A, Mulder W, Visser J, van Kan JA (1998) The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1009–1016.
53. van der Vlugt-Bergmans CJB, Wagemakers CAM, Van Kan JAL (1997) Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 21–29.
54. Olson GM, Fox DS, Wang P, Alspaugh JA, Buchanan KL (2007) Role of protein O-mannosyltransferase Pmt4 in the morphogenesis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 6: 222–234.
55. Büttner P, Koch F, Voigt K, Quidde T, Risch S, et al. (1994) Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr Genet* 25: 445–450.
56. Delcan J, Moyano C, Raposo R, Melgarejo P (2002) Storage of *Botrytis cinerea* using different methods. *J Plant Pathol* 84: 3–9.
57. Benito EP, ten Have A, van't Klooster JW, Van Kan JAL (1998) Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 104: 207–220.
58. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
59. Applied Biosystems (2008) Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. Available: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_042380.pdf. Accessed 6 March 2013.
60. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108.
61. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344 p.
62. González C, Noda J, Espino JJ, Brito N (2008) Drill-assisted genomic DNA extraction from *Botrytis cinerea*. *Biotechnol Lett* 30: 1989–1992.
63. Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, Cabello FC, Sutherland M, et al. (2004) Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* 32: e19.
64. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, et al. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41: 973–981.
65. Van Kan JAL, van't Klooster JW, Wagemakers CAM, Dees DCT, van der Vlugt-Bergmans CJB (1997) Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 30–38.
66. Hamada W, Reignault P, Bompeix G, Boccara M (1994) Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Curr Genet* 26: 251–255.
67. Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141–143.
68. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.
69. Gravel P, Golaz O (1996) Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes using lectin blotting. In: Walker JM, editor. The protein protocols handbook. New York: Humana Press. 603–617.
70. Varela C, Mauriaca C, Parada A, Albar JP, Jerez CA, et al. (2010) New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol* 10: 7.

Figure S1. Putative topology of *B. cinerea* PMTs. The hydrophobicity of each BcPMT (thick line), calculated with the Kyte-Doolittle scale and a window of 15 residues, is plotted alongside the average hydrophobicity of the corresponding PMT subfamily (thin line) derived from the alignment (Figure S2). Black lines below plot indicate the transmembrane regions predicted for the alignment, and those corresponding to the 7 transmembrane domains of *S. cerevisiae* PMTs are marked with roman numerals (question marks indicate that it is not clear which one of the two regions marked as VII is the last transmembrane domain in *S. cerevisiae* [14]). PMT domains (grey boxes) and MIR subdomains (white boxes) detected by InterProScan are also marked.

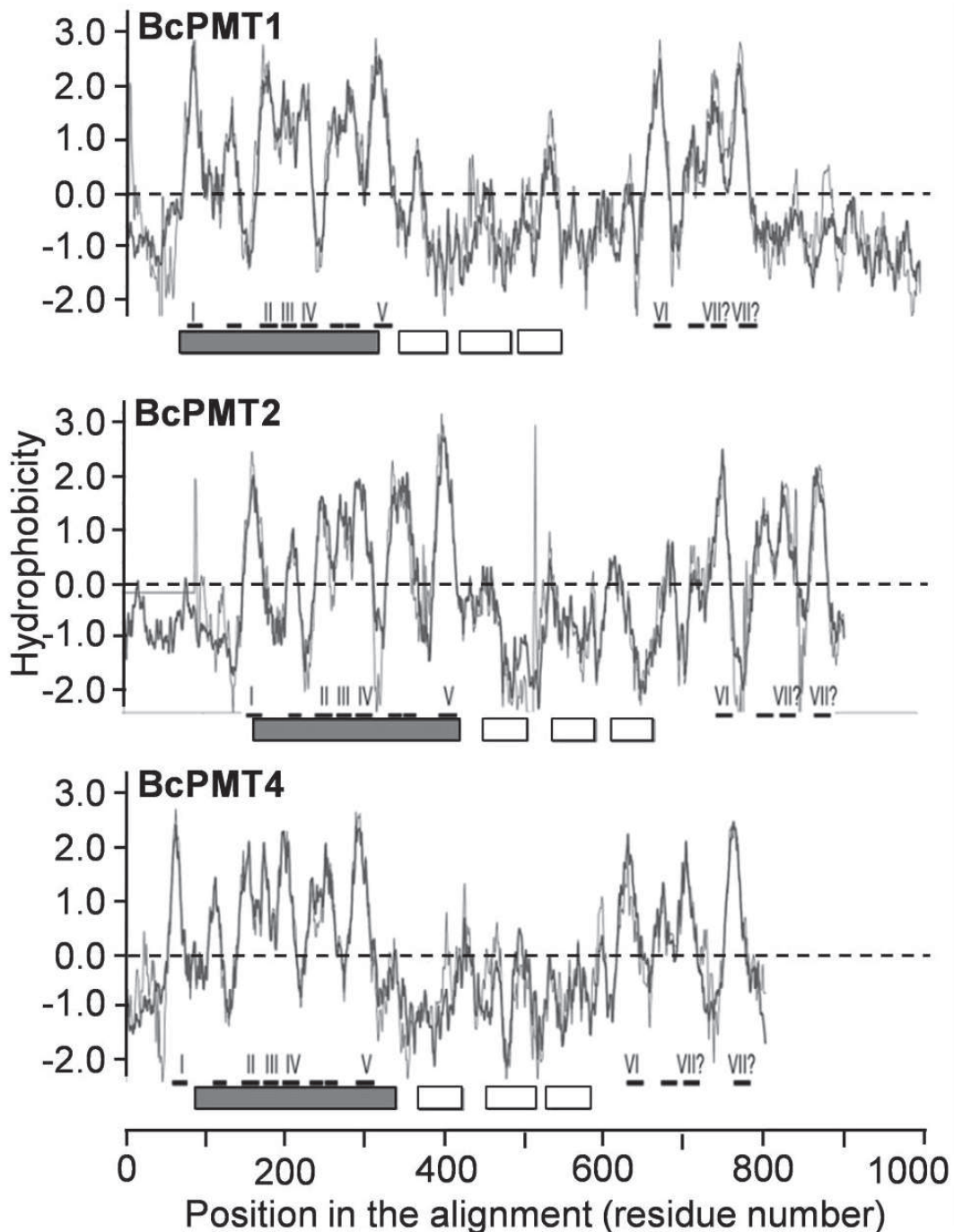


Figure S2. Alignment of fungal PMTs. Proteins were aligned by PRALINE, making use of the transmembrane regions predicted by PHOBIUS (on green background). The regions homologous to the 7 experimentally-determined transmembrane domains of *S. cerevisiae* Pmt1p are marked with roman numerals. Question marks indicate that it is not clear which region is the last transmembrane domain of Pmt1p. The catalytically-important ER-luminal loop 1 (red boxes), loop 5 (blue boxes), and DE-motif (yellow boxes) are also shown in the alignments. First two letters in protein names indicate the fungus it comes from (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Ca: *Candida albicans*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Um: *Ustilago maydis*; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Bc: *Botrytis cinerea*; An: *Aspergillus nidulans*; Af: *Aspergillus fumigatus*). Accession numbers can be found in Table S1.

Web link: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065924#s5>

Figure S3. Generation of the three *bcpmt* knockout mutants. A) Strategy used to generate the three $\Delta bcpmts$ knock-out mutants. The DNA constructs used in the transformation, shown below each *bcpmt* gene, contain the hygromycin resistance cassette (Hyg-R) flanked by two regions of the target gene. The position of all primers used to generate the constructs and to check the transformants are indicated (arrows). B) PCR and Southern-blot analysis carried out to check the mutants. Primers used in the PCRs (left panels) are indicated below each picture. Southern-blots were carried out with the indicated genomic DNAs and restriction enzymes, and with the probes indicated in A.

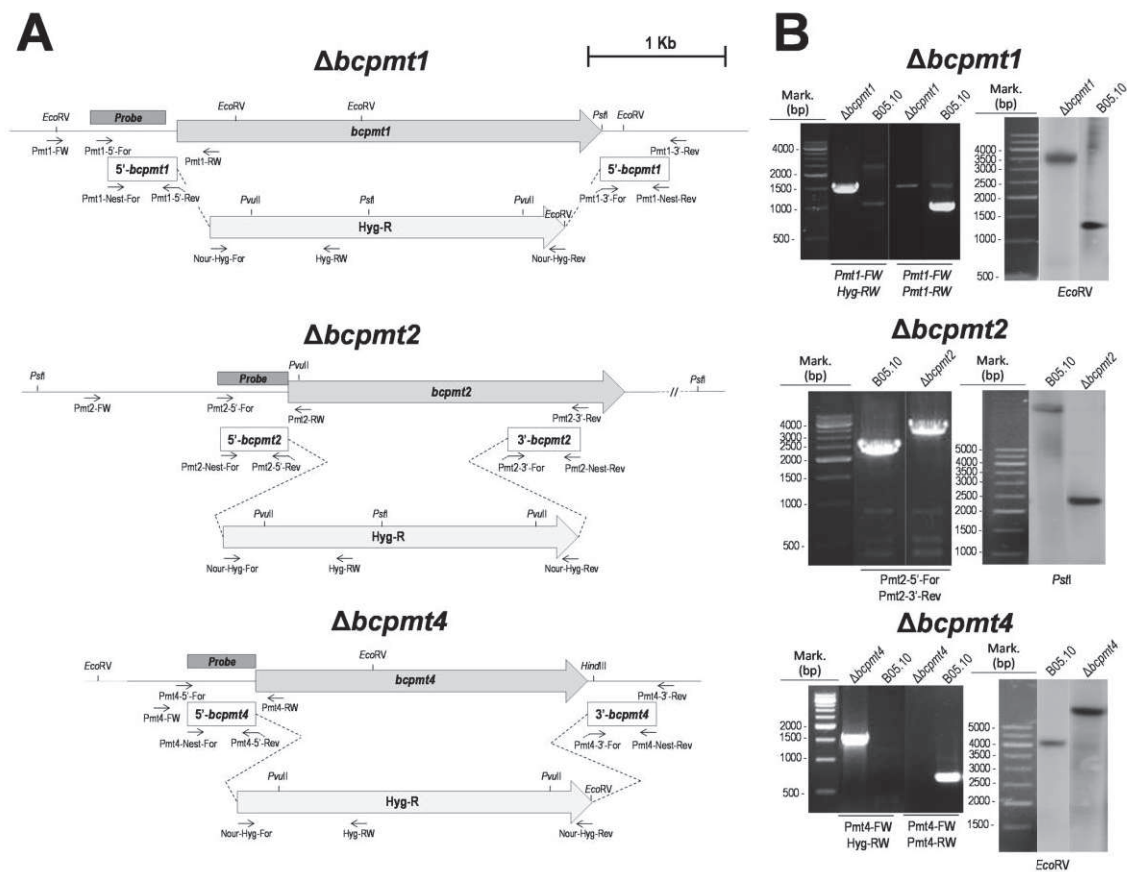


Figure S4. Partial degradation of the extracellular matrix by treatment with proteinase K. Mycelia were grown in liquid YGG medium without shaking, transferred to 0.5X phosphate buffer saline and incubated with 0.4 mg ml⁻¹ proteinase K for 4 hours before staining with India ink. Controls received no proteinase K.

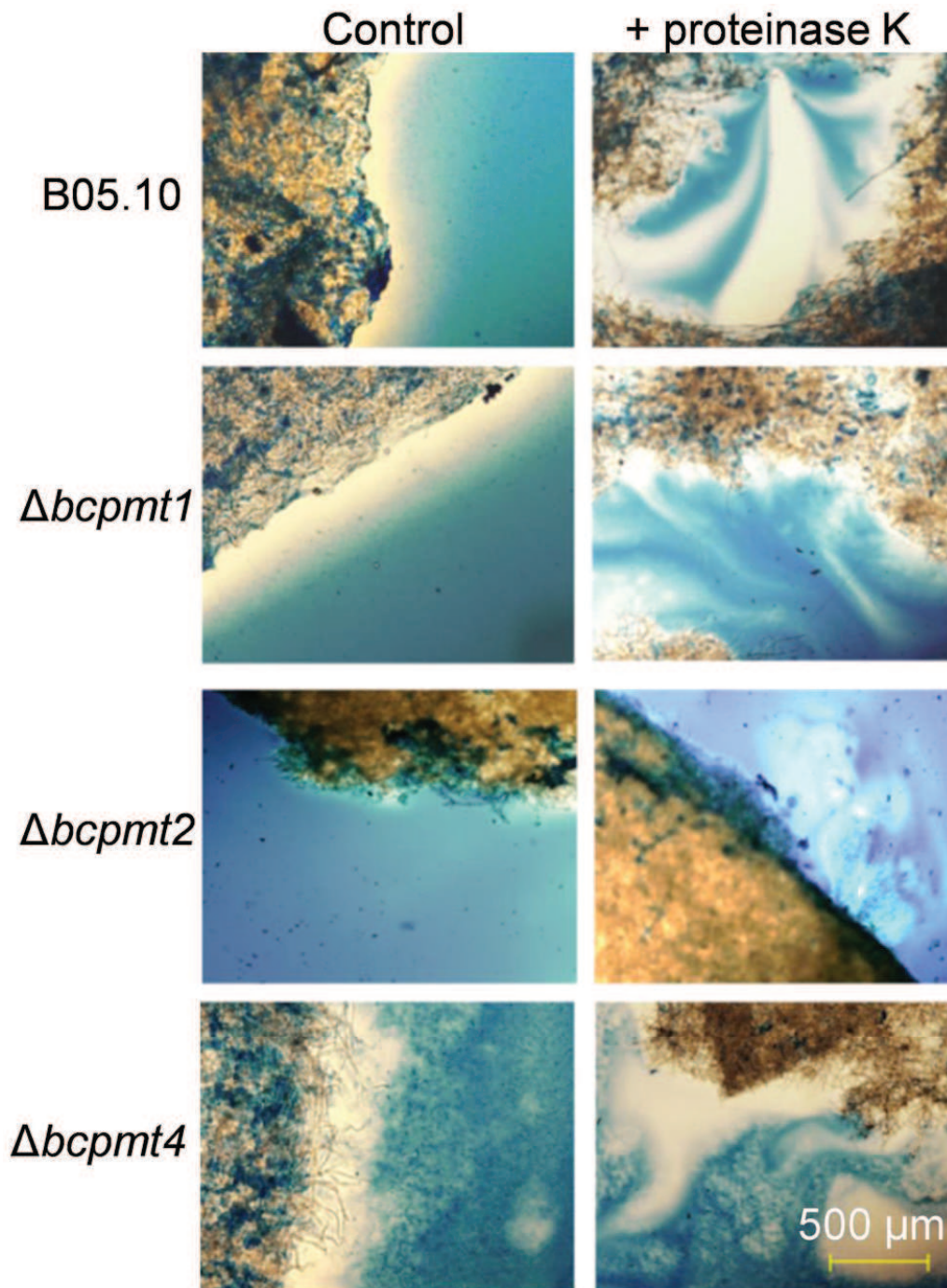


Table SI. Protein sequences used in this study

Organism	GenBank acc. number	Gene name	PMT subfamily
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010188	<i>ScPmt1</i>	1
	NP_009379	<i>ScPmt2</i>	2
	NP_014966	<i>ScPmt3</i>	2
	NP_012677	<i>ScPmt4</i>	4
	NP_010190	<i>ScPmt5</i>	1
	NP_011715	<i>ScPmt6</i>	2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_593237	<i>SpOgm1</i>	1
	NP_594135	<i>SpOgm2</i>	2
	NP_596807	<i>SpOgm4</i>	4
<i>Ustilago maydis</i>	XP_762320	<i>UmPmt1</i>	1
	XP_761621	<i>UmPmt2</i>	2
	XP_761580	<i>UmPmt4</i>	4
<i>Botrytis cinerea</i> (B05.10)	XP_001548518	<i>bcpmt1</i>	1
	XP_001558317	<i>bcpmt2</i>	2
	XP_001558914	<i>bcpmt4</i>	4
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	XP_570521	<i>CnPmt1</i>	1
	XP_567365	<i>CnPmt2</i>	2
	XP_570292	<i>CnPmt4</i>	4
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_662365	<i>AnPmtB</i>	1
	XP_662709	<i>AnPmtA</i>	2
	XP_659063	<i>AnPmtC</i>	4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_754961	<i>AfPmt1</i>	1
	XP_754961	<i>AfPmt2</i>	2
	XP_747257	<i>AfPmt4</i>	4
<i>Candida albicans</i>	XP_716993	<i>CaPmt1</i>	1
	XP_719907	<i>CaPmt2</i>	2
	XP_714280	<i>CaPmt4</i>	4
	XP_719311	<i>CaPmt5</i>	1
	XP_717283	<i>CaPmt6</i>	2

Table SII. Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5' – 3')
Nour-Hyg-FOR ^a	CTCTAGAGCCGCATTCCC
Nour-Hyg-REV ^a	TAAGCTTGATATCTGTTAGTAATC
Pmt1-5'-For ^a	CCACAGCAACTCGTTCCG
Pmt1-5'-Rev ^a	GCCCGAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGT <u>ACTTCAGATGAAAATCG</u>
Pmt1-3'-For ^a	GATGATTACTAACAGATATCAAGCTTATCACAGGAGACAGTACGG
Pmt1-3'-Rev ^a	AGCCAGCCATAACTTGGC
Pmt1-Nest- FOR ^b	AAGATTGTTACAGCAAGC
Pmt1-Nest-REV ^b	CGTTTGCTATGATACTCG
Pmt2-5'-FOR ^{a,c}	AAAGAGTGGCAATTTGGC
Pmt2-5'-REV ^{a,c}	GCCCGAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGCTCGAATGTCTGCGAGG
Pmt2-3'-FOR ^a	GATGATTACTAACAGATATCAAGCTTACTTAACCACTGCTTTCCG
Pmt2-3'-REV ^a	AACTGGGTACAGTCCAGC
Pmt2-Nest-FOR ^b	AAGTAGACTACTATGCAAGG
Pmt2-Nest-REV ^b	TTAAGCTCGTCATACCCG
Pmt4-5'-FOR ^a	GGCTAATTTTAGCCTCCCGCCCGAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGA <u>AAGAAATCCTAAGGGACG</u>
Pmt4-3'-FOR ^a	GATGATTACTAACAGATATCAAGCTTATCGAAGTAGTATTCAAGG
Pmt4-3'-REV ^a	TGTCTTGCTAAACCCACG
Pmt4-Nest-FOR ^b	AATGTGAATGTTGATCTCG
Pmt4-Nest-REV ^b	AGTCTTTTCTAACCTTCC
Hyg-RW ^c	GAGTTCAGCCATGGATCG
pmt1-FW ^c	GGAAGAGGTTATTTGCTGC
pmt1-RV ^c	CATCGAATACCACTGCG
pmt2-FW ^c	GCTCGTAGGAGAATTGACG
pmt2-RV ^c	CGCACCAGAAGCAACAGC
pmt4-FW ^c	CGGAGCAGTTGTCAGAGC
pmt4-RV ^c	AACTGAACCACCTTTCCG
Pmt1_RT_FW ^d	AAAAGTGTACACCCGCGC
Pmt1_RT_RV ^d	TCCATCACCGTCTCCTGG
Pmt2_RT_FW ^d	GGAACGAGAAATTGCCTGC
Pmt2_RT_RV ^d	GCACAAGTGC GTTGTTCG
Pmt4_RT_FW ^d	GATAACCGTACCCGATCCC
Pmt4_RT_RV ^d	CAAGAAAAGTTGACGGCCC

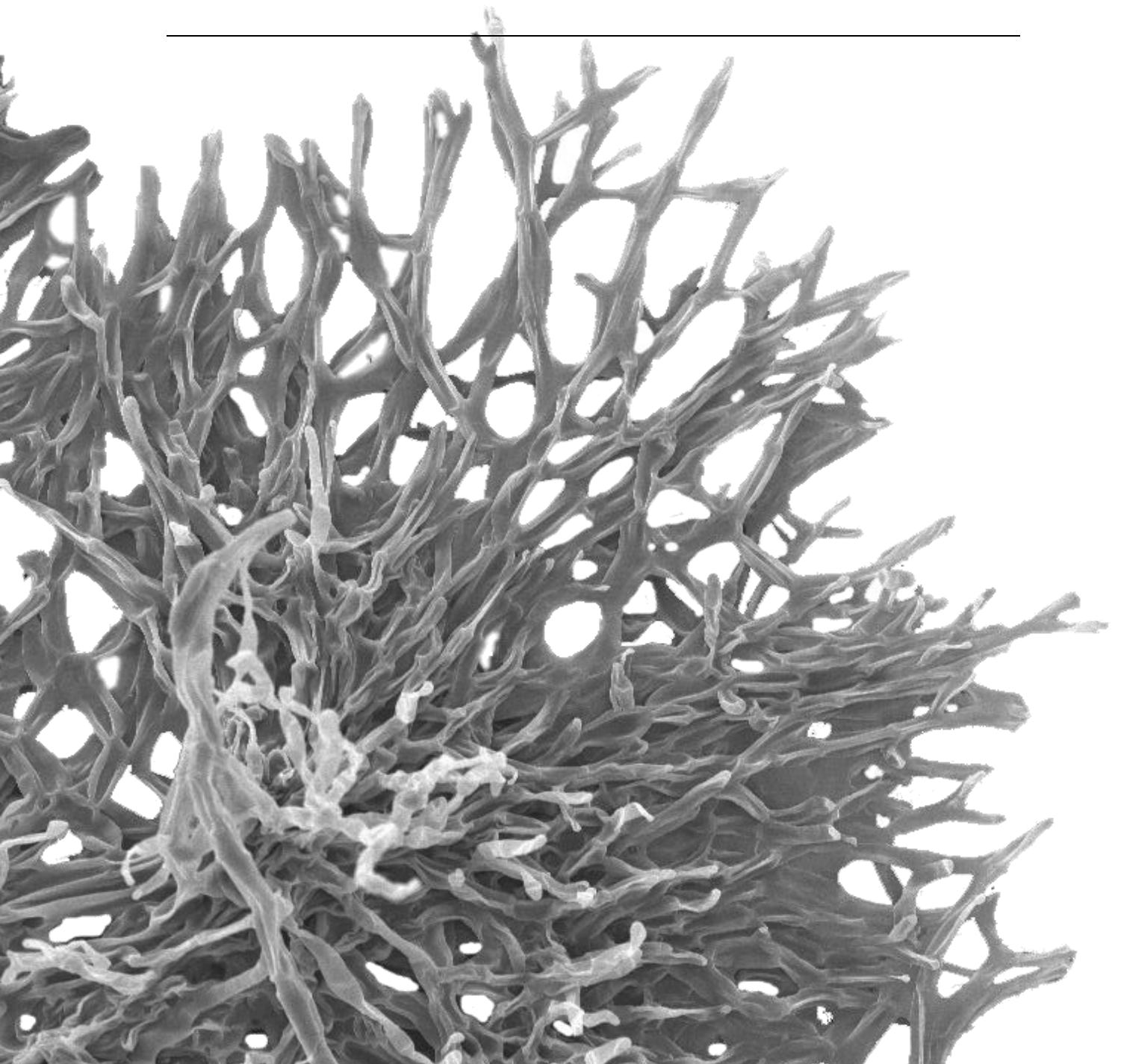
^aOligonucleotides used to amplify individual fragments to be fused by PCR to generate the knocked-out *bcpmt* genes. Underlined nucleotides indicate the regions of the *bcpmt* amplicons homologous to the hygromycin resistance cassette, which were necessary for the fusion PCR.

^bOligonucleotides used to amplify each final gene replacement cassette used to transform *B. cinerea*.

^cOligonucleotides used to check $\Delta bcpmt$ mutant strains.

^dOligonucleotides used in Q-RT-PCR.

PUBLICACIÓN 3



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants

Mario González, Nélica Brito and Celedonio González*

Abstract

Background: *Botrytis cinerea* secretes a high number of proteins that are predicted to have numerous O-glycosylation sites, frequently grouped in highly O-glycosylated regions, and analysis of mutants affected in O-glycosylation has shown, in *B. cinerea* and in other phytopathogenic fungi, that this process is important for fungal biology and virulence.

Results: We report here the purification of glycoproteins from the culture medium, for a wild-type strain of *B. cinerea* and for three mutants affected in the first step of O-glycosylation, and the identification of components in the purified protein samples. Overall, 158 proteins were identified belonging to a wide diversity of protein families, which possess Ser/Thr-rich regions (presumably highly O-glycosylated) twice as frequently as the whole secretome. Surprisingly, proteins predicted to be highly O-glycosylated tend to be more abundant in the secretomes of the mutants affected in O-glycosylation than in the wild type, possibly because a correct glycosylation of these proteins helps keep them in the cell wall or extracellular matrix. Overexpression of three proteins predicted to be O-glycosylated in various degrees allowed to confirm the presence of mannose α 1-2 and/or α 1-3 bonds, but no mannose α 1-6 bonds, and resulted in an enhanced activity of the culture medium to elicit plant defenses.

Conclusions: Glycosylation of secretory proteins is very prevalent in *B. cinerea* and affects members of diverse protein families. O-glycosylated proteins play a role in the elicitation of plant defenses.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Glyco-secretome, Mannosyltransferase

Background

Botrytis cinerea has been considered the second most important plant pathogenic fungus according to its economic and scientific importance [1], and is able to infect more than 200 plant species including many with high agronomic value [2]. The genome of two *B. cinerea* strains have been sequenced [3,4] and one of its key features is the prediction of a high number of secretory proteins, about 10% of the polypeptides coded by the genome. Proteomic studies have actually revealed an abundant and diverse set of proteins in the extracellular medium for *B. cinerea* cultures [5-11]. This set contains mainly proteins involved in the degradation of plant structures (such as cellulases, xylanases, proteases, etc.),

but also proteins with other functions such as the induction of cell death in the host [12-14], as well as plenty of proteins with unknown function [7]. The role of some of these extracellular proteins has been studied by gene knock-out to identify secretome members contributing to virulence, i.e. virulence factors, but only a few have shown to contribute modestly to the infection process [14-19].

It is known that O-glycosylation is crucial in determining the structure and function of numerous secreted and membrane-bound proteins [20]. Carbohydrate chains have been proposed to enhance the stability and solubility of proteins, to confer protection against proteases, to act as a sorting determinant, and to be involved in various development and differentiation processes [20]. We have recently shown, by an *in silico* approach, that about half of predicted proteins in fungal secretomes display Ser/Thr-rich regions, i.e. regions with at least 40% Ser/Thr in a

* Correspondence: cglez@ull.es
U.D. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Laguna, 38206 La Laguna (Tenerife), Spain

minimum of 20 contiguous residues [21], which are usually considered to display high-density of *O*-glycosylation [21-23]. Indeed, about one fourth of secretory proteins were predicted to display hyper-*O*-glycosylated regions, i.e. regions with at least 25% of residues predicted to be *O*-glycosylated [21]. In fungi, *O*-glycosylation begins with the addition of a mannose residue by protein *O*-mannosyltransferases (PMTs) in the lumen side of the endoplasmic reticulum (ER) membrane [24], a process which has recently been shown to occur, at least partially, concomitantly with the translocation of nascent polypeptides into the ER [25]. Three PMT families exist in fungi (PMT1, PMT2 and PMT4) [26,27], and filamentous fungi usually have only one *pmt* gene per family. The deletion of one or more of the *pmt* genes usually results in loss of viability or strong defects such as reduced conidia production, changes in fungal morphology, etc., emphasizing the importance of *O*-glycosylation for the fungal biology. The *B. cinerea* genome also contains three *pmt* genes [28], *bcpmt1*, 2 and 4, and the three of them, but especially *bcpmt2*, are critical for the stability of the cell wall, are necessary for sporulation, and are required for the generation of the extracellular matrix. Besides, BcPMTs are also required for full virulence in a variety of hosts, with a special role in the adhesion to, and penetration of, intact plant leaves [28].

Since PMTs have been found in both prokaryotes and eukaryotes [24], but not in plants, these proteins are promising targets in the design of novel control strategies against fungal phytopathogens. However, the ER-associated topology of these proteins [29] poses strong problems for the elucidation of their structure and the design of specific inhibitors. An indirect approach is the identification of specific PMT substrates that could also be important for fungal biology and virulence. Since we

have previously observed significant changes in the patterns of protein secretion and glycosylation by the *bcpmt* mutants [28], we have addressed here the characterization of glyco-secretome differences between wild-type *B. cinerea* and *bcpmt* mutants.

Results

Many proteins in the *B. cinerea* secretome are glycosylated

We have previously identified more than one hundred proteins in the *B. cinerea* secretome [7], and we have also observed that the appearance of the secretome in 1D- and 2D-PAGE changes radically for mutants affected in PMTs, which catalyse the first step of *O*-glycosylation [28]. This prompted us to better characterize the set of glycoproteins secreted by wild-type *B. cinerea* strain B05.10, as well as by the mutants lacking each one of the three *B. cinerea* PMTs [28]. Preliminary observations allowed us to establish static liquid cultures in Petri dishes with YGG-low medium, inoculated with mycelial plugs and incubated for 4 days, as the optimum conditions to maximize isolation of secretory proteins in the case of $\Delta bcpmt$ mutants. Culture media obtained from these plates contained plenty of proteins (Figure 1A) and the band pattern in SDS-PAGE was different for the wild type and for the $\Delta bcpmt$ mutants. Purification of glycoproteins from the culture medium by affinity chromatography with Concanavalin-A resulted in quite different band patterns (Figure 1B), with some proteins clearly disappearing and others being enriched. Notably, the band corresponding to the most abundant protein in the secretome of *B. cinerea*, the 35-kDa aspartic protease BcAp8 [30] (black arrow in Figure 1A), is completely absent after purification of glycoproteins, in accordance with the fact that no *N*- or *O*-glycosylated sites are predicted *in silico* for this

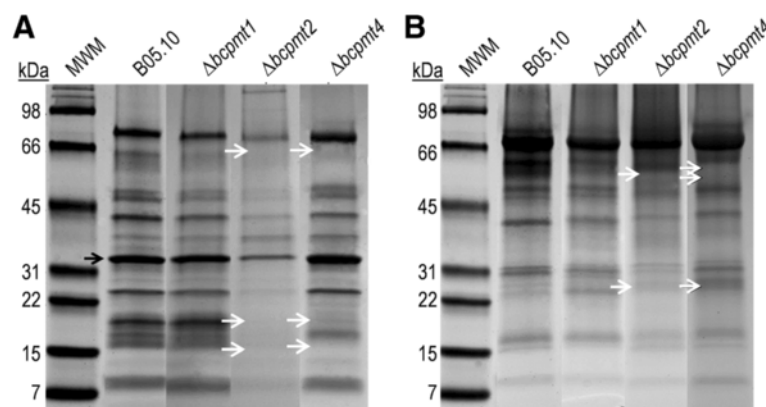


Figure 1 Glyco-secretome purification. Electrophoretic analysis of glycoproteins purified from the extracellular fraction in cultures of wild-type *B. cinerea* (B05.10) and the indicated $\Delta bcpmt$ mutants. **A:** SDS-PAGE showing all proteins precipitated from 150 μ l of culture medium. **B:** SDS-PAGE of the purified glycoprotein samples (150 μ l). Black arrow: BcAp8, a protein with no predicted glycosylation sites. White arrows: example bands appearing/disappearing in the mutant samples as compared with the corresponding wild-type sample.

protein by the NetNGlyc 1.0 [31] and NetOGlyc 4.0 [32,33] servers. Moreover, an enrichment in proteins with high molecular weight (>50 kDa) was observed for all samples after glycoprotein purification, in agreement with the fact that lectin-blot experiments also show that glycosylation is more prominent for these proteins [28]. As expected, the SDS-PAGE band pattern of purified glycoprotein samples is different for the wild type and the three $\Delta bcpmt$ mutants, especially in the case of $\Delta bcpmt2$ and $\Delta bcpmt4$.

2D electrophoresis of purified glycoproteins was carried out for B05.10 and the $\Delta bcpmt1$ mutant, and resulted in a relatively simple spot pattern (Figure 2), with not too many differences for the two samples. Some spots, however, showed clear differences in intensity, such as spot 18, which is over-expressed in the $\Delta bcpmt1$

sample. A total of 29 spots obtained from the wild-type or the $\Delta bcpmt1$ 2D gels were excised and analyzed by MALDI-TOF/TOF, resulting in the identification of 18 proteins (Additional file 1). In some cases (spots 4, 10, 12 and 13), the same protein was identified in several spots forming charge trains (different pIs), or even in spots (spots 4 and 12) with different mobility in the second dimension (different apparent molecular weight).

Identification of glycoproteins in the secretome by LC-MS/MS

The purified glycoprotein samples obtained for the four strains were also analyzed by shotgun proteomics. The total number of proteins identified was 157 in the four samples (Additional file 1). Only one of the 18 proteins identified previously from the 2D electrophoresis gels (spot 13, Pectin methylesterase BcPME1) was not identified by LC-MS/MS, so the total number of glycoproteins identified by the two methods is 158. Most proteins identified (133 of 158) showed signal peptide according to SignalP 4.1 [34,35], and 22 others showed alternative secretion features according to SecretomeP 2.0 [36,37]. Forty-eight of the 158 proteins are described here for the first time as components of the *B. cinerea* secretome, while the rest have been reported previously [5-11].

Contrary to our initial expectations, the composition of the glyco-secretome was not radically different for the wild type and for the three $\Delta bcpmt$ mutants, so that proteins clearly absent in one or more of the mutants, and therefore putative substrates of the corresponding BcPMT, are scarce. Restricting the comparative analysis to highly expressed proteins (Table 1), so that the number of spectral counts accumulated for each protein makes the comparison more significant, it results that the 13 proteins considered are all expressed in the three $\Delta bcpmt$ mutants, as well as in the wild type. Only two proteins, pectin methylesterase BcPME2 and B0510_6786 (of unknown function), have an abundance of less than 25% that of the wild type in at least one of the mutants. Noticeably, some of these proteins are actually found at elevated levels in the mutants, in comparison with the wild type. Overall, these results confirm a prominent role for PMTs in protein glycosylation, but in a way that may be more complex than anticipated. It does not seem, for example, that individual proteins are substrates of only one BcPMTs.

The 158 proteins were classified into families previously defined [7] (Additional file 1). Family assignments were made using sequence similarities with proteins of known function detected by BLAST [38], and the presence of conserved domains according to Pfam [39,40]. Distribution of glycoproteins in families was similar for the wild type and the three mutants (Figure 3). The glyco-secretome is composed mainly of polysaccharide hydrolases (~36%), followed by proteases (~14%) and oxidoreductases (~13%). The rest of the families (~37%)

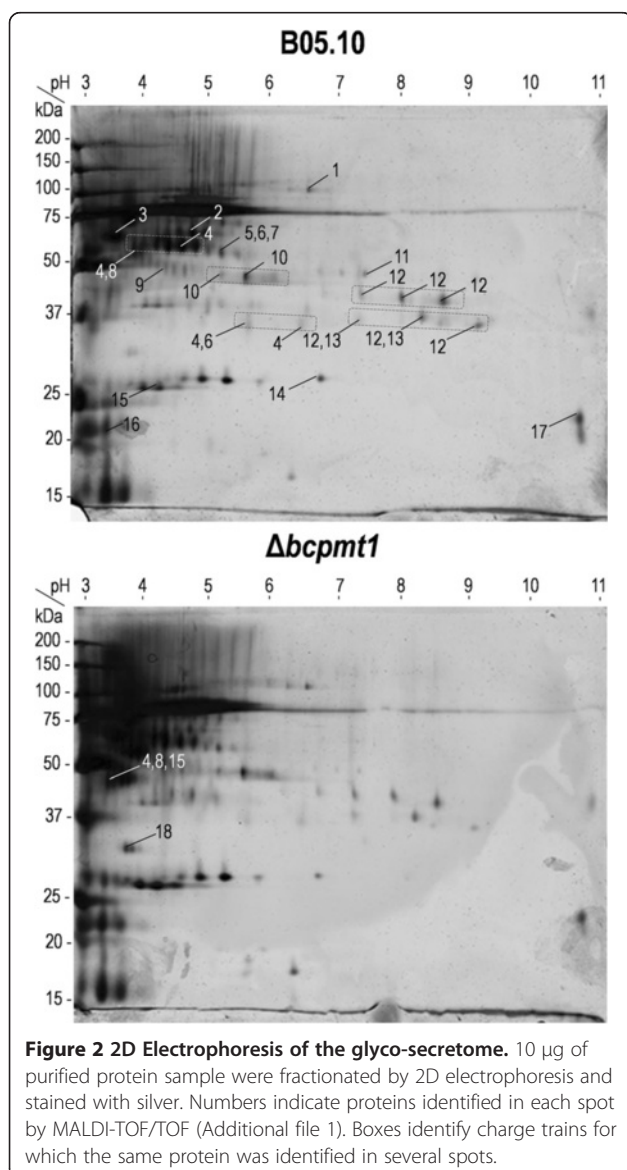


Figure 2 2D Electrophoresis of the glyco-secretome. 10 μ g of purified protein sample were fractionated by 2D electrophoresis and stained with silver. Numbers indicate proteins identified in each spot by MALDI-TOF/TOF (Additional file 1). Boxes identify charge trains for which the same protein was identified in several spots.

Table 1 Abundant proteins identified by LC-MS/MS in wild-type *B. cinerea* and the three $\Delta bcprt$ mutants

Protein name ¹ – Gene ID	Spectral counts ²			
	B05	$\Delta bcprt1$	$\Delta bcprt2$	$\Delta bcprt4$
1,3-beta-glucanosyltransferase Glycolipid anchored surface protein - B0510_3559	16	22	21	25
Alpha-amylase (GH13) - BC1G_02623.1	13	12	5	23
Beta-1,3-endoglucanase with a GPI anchor (GH17) - B0510_9551	5	15	6	17
Glucoamylase (CBM20, GH15) - B0510_2137	137	152	52	201
Glucoamylase (CBM20, GH15) - B0510_2884	30	39	15	34
Oxidoreductase - B0510_547	9	20	15	13
Pectin methylesterase BcPME2 (CE8) - B0510_344	31	37	9	4
Phospholipase C - B0510_184	11	17	14	15
Protease (Merops A1) - B0510_6952	7	18	8	12
Pro-Xaa carboxypeptidase (Merops S28) - BC1G_09564.1/BC1G_09565.1	16	23	7	15
Unknown, similar to phytase - B0510_5392	12	17	14	20
Unknown, similar to subtilase family protein - B0510_6786	21	22	4	14
Unknown, similar to yeast spore wall proteins - BC1G_10630.1	8	12	6	15

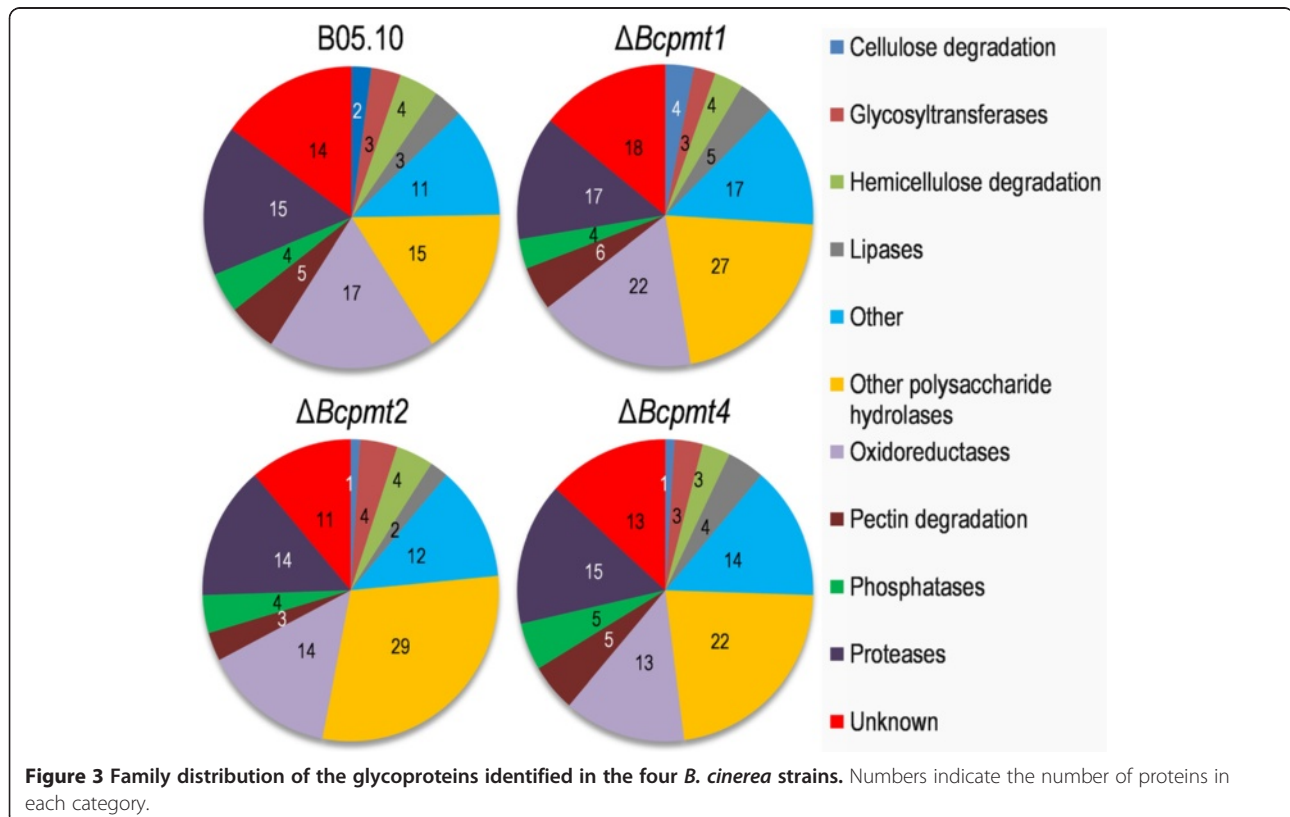
¹Protein family and/or conserved domains found in sequences are included between brackets where possible: glycosyl hydrolase family (GH...), Merops family (Merops...), carbohydrate esterase family (CE...), or carbohydrate binding modules (CBM...).

²Only proteins fulfilling the following two conditions are displayed: they have at least 15 spectral counts in one of the four strains, and they account for more than 2% of all spectral counts in one of the strains.

are represented by a similar amount of proteins and contribute always less than 10% to the overall composition. As compared with the complete secretome [7], the glyco-secretome showed an increase in polysaccharide hydrolases and oxidoreductases, but a reduction in pectinases.

Ser/Thr-rich and highly O-glycosylated regions in glycoproteins

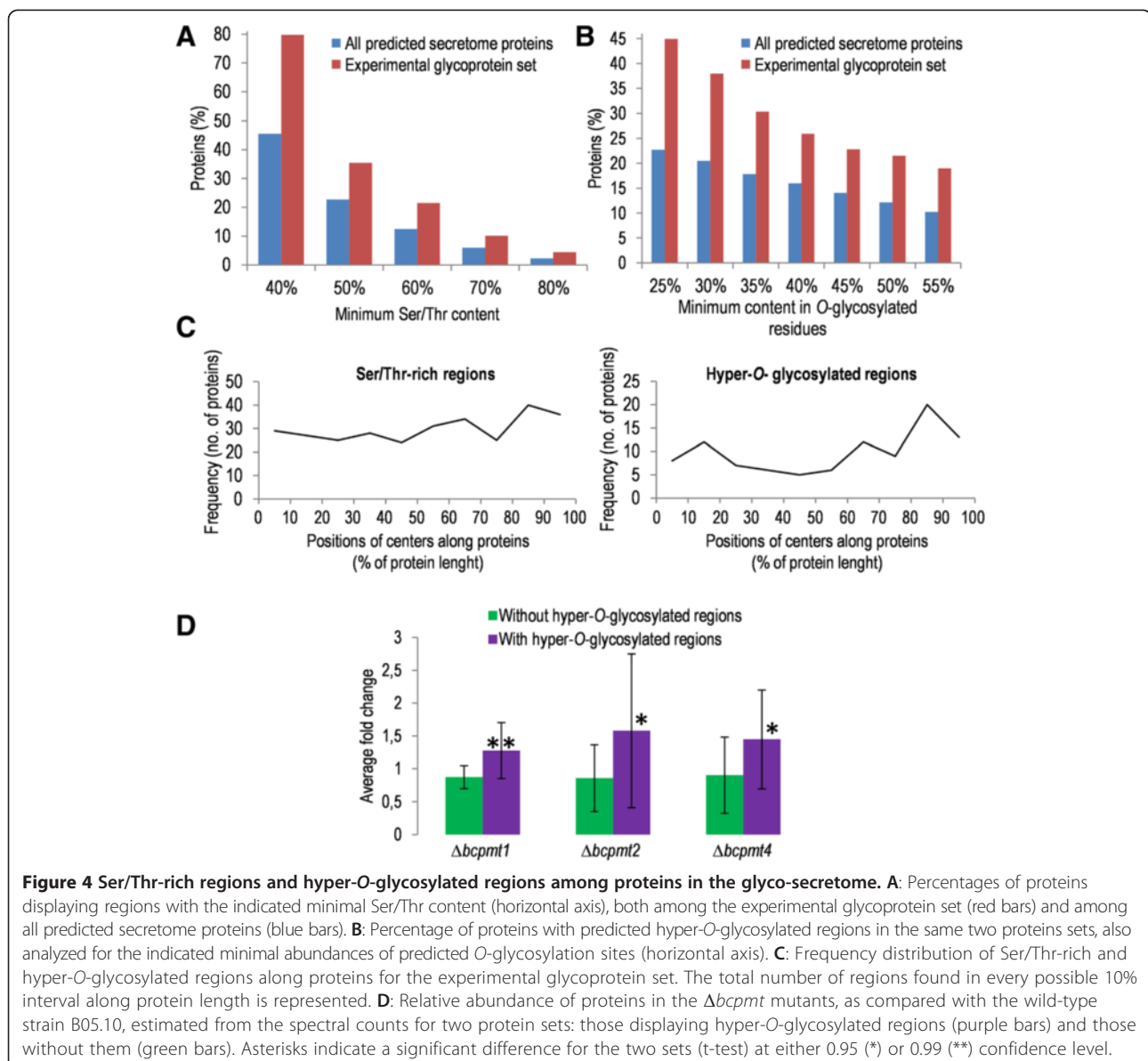
We have recently analyzed *in silico* the presence and distribution of Ser/Thr-rich regions, as well as hyper-O-glycosylated regions, in the predicted *B. cinerea*



secretome [21]. We now have the opportunity to compare those results with a similar analysis for the experimental set of actually secreted and glycosylated proteins reported here (the 158 proteins displayed in Additional file 1). The results show, in first place, that Ser and Thr residues are extremely abundant among secreted glycoproteins. On average, 38% of residues in these proteins are either Ser or Thr in the experimental glycoprotein set, while this number is just 17% for the whole predicted secretome. When the MS Excel XRR macro described previously [21] was used to study if these residues are grouped forming Ser/Thr-rich regions (Figure 4A) a big number of these was found, even when a very high Ser/Thr content was necessary for a region to be considered as Ser/Thr-rich (up to 80%). The proportion of proteins displaying Ser/Thr-rich

regions was considerably higher for the experimental set of glycoproteins than for the predicted whole secretome (Figure 4A). For example, 80% of glycoproteins displayed regions with at least 40% Ser/Thr, while only 46% of proteins in the whole predicted secretome exhibited them (Figure 4A). Moreover, the total number of Ser/Thr-rich regions was comparatively higher for the glycoprotein set: among the 158 glycoproteins 299 Ser/Thr-rich regions (with at least 40% Ser/Thr) were found, almost 2 per protein, while the whole predicted secretome (1910 proteins) contained only 1501 of these Ser/Thr-rich regions. Notably, seven proteins were found with regions of 20–32 residues in which at least 80% of them are Ser or Thr.

Similar results were obtained when glycosylation was predicted for the set of purified glycoproteins. Both



N-glycosylation and *O*-glycosylation was predicted for most of them (91% and 87% of proteins, respectively), but the average number of predicted *O*-glycosylated residues in proteins was about three times higher than the number of *N*-glycosylated ones. The predicted *O*-glycosylation positions were frequently grouped in highly-*O*-glycosylated regions (Figure 4B), but not the *N*-glycosylation sites (not shown). Using the less stringent definition of highly-*O*-glycosylated regions (regions of at least 20 residues with 25% or more *O*-glycosylation sites, see ref. 21), it results that about half of proteins (45%) in the glyco-secretome display these kind of regions, about twice the number obtained for the whole predicted secretome (23%) [21].

We observed previously, for the whole predicted secretome, that Ser/Thr-rich and predicted highly *O*-glycosylated regions have a tendency to be located toward the two ends of polypeptide chains [21]. This tendency is clearer in the case of glycoproteins and especially evident for predicted highly *O*-glycosylated regions (Figure 4C), which are frequently found in the C-terminal region of proteins and are also common at the N-terminus right after the signal peptide.

Interestingly, we found a relationship between the presence of predicted hyper-*O*-glycosylated regions in proteins and their relative abundance in the secretomes of the $\Delta bcpmt$ mutants, estimated from the spectral counts. This was done by first choosing a set of abundant proteins, for which we could calculate more reliable fold changes from spectral counts, consisting of 29 proteins with at least 10 spectral counts in one of the four *Botrytis* strains and a relative abundance of at least 1% in one of the four strains. The fold change in the amount of protein in the $\Delta bcpmt$ mutants, relative to the wild type, was then estimated from the spectral counts for each individual protein. Next, the average fold change was calculated separately for those proteins with predicted hyper-*O*-glycosylated regions and for those without them, and are displayed in Figure 4D. Statistically significant differences were found for the two groups in the three mutants, so that the relative abundance of proteins predicted to have hyper-*O*-glycosylated regions is, on average, 1.43 times higher in the secretomes of the $\Delta bcpmt$ mutants than in the secretome of the wild type. On the contrary, no difference was observed for the proteins without predicted hyper-*O*-glycosylated regions.

One possible explanation for the fact that proteins displaying hyper-*O*-glycosylated regions tend to be found at higher levels in the secretomes of the $\Delta bcpmt$ mutants is that *O*-glycosylation causes retention of the proteins in the cell wall or the extracellular matrix. These proteins, being glycosylated to a less extent in the $\Delta bcpmt$ mutants, would escape easier and accumulate to higher levels in the culture medium. To test this hypothesis, two fusion proteins were expressed in *B. cinerea* which

both contained the sequence of BcSpl1 [14], an abundant component of the *B. cinerea* secretome partially retained in the cell wall [41], fused to GFP, but differed in the presence of a Ser/Thr-rich region in the C-terminal end originally coming from the endoglucanase Cel5A [42]. Unfortunately, the level of expression seemed quite different for the two fusion proteins, as judged from the green fluorescence in the mycelium (Figure 5A) and from the western-blots with monoclonal anti-GFP antibodies (Figure 5B), and both gave various bands in the western-blot. By considering all the bands obtained in the blots, we determined for liquid cultures of each of these two strains the ratio of protein secreted to the culture medium versus the amount associated with the mycelium (Figure 5C). Although the effect of the introduction of the Ser/Thr-rich tail in the protein was not spectacular, the fusion protein displaying it showed a higher tendency to be associated with the mycelium which was statistically significant in the three repetitions of the experiment shown in Figure 5C.

Overexpression of *O*-glycosylated proteins in *B. cinerea*

Three of the proteins detected as components of the glyco-secretome were overexpressed in *B. cinerea* to further study them. These proteins were selected because they display Ser/Thr regions and are glycosylated in different degrees (Additional file 1). The three proteins were the endopolygalacturonase BcPG1, previously reported to be required for full virulence in *B. cinerea* [17] and to be perceived as a PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) by *Arabidopsis* [43], and two proteins of unknown function that we have named BcIEB1 (B0510_2361, similar to IgE Binding proteins) and BcSUN1 (B0510_8844, similar to members of the yeast SUN family). These proteins differed in the number or length of the Ser/Thr-rich regions, with BcSUN1 being predicted to be highly glycosylated by NetOGlyc 4.0 and the other two poorly glycosylated (Additional file 1).

Expression of the three genes under the control of the strong promoter *oliC* resulted in the accumulation of decent amounts of proteins in the culture medium (Figure 6). In order to check if, and how, these proteins were glycosylated we treated them with two glycosyl hydrolases: exo α 1-2,3 and exo α 1-6 mannosidases. Since all attempts to purify them from the culture media were unsuccessful, the treatment was done with a whole secretome sample and analyzed by western-blot with anti-*c-myc* antibodies (Figure 6). Reduction of protein size, as a consequence of treatment, was considerable for BcSUN1 (estimated in 20–25 kDa), limited for BcIEB1 (estimated in 1–2 kDa), and not detectable for BcPG1, in good accordance with the number of glycosylation sites predicted for the three proteins: 74, 3 and 1 (Additional file 1). This reduction was seen only for the incubation with the exo α 1-2,3

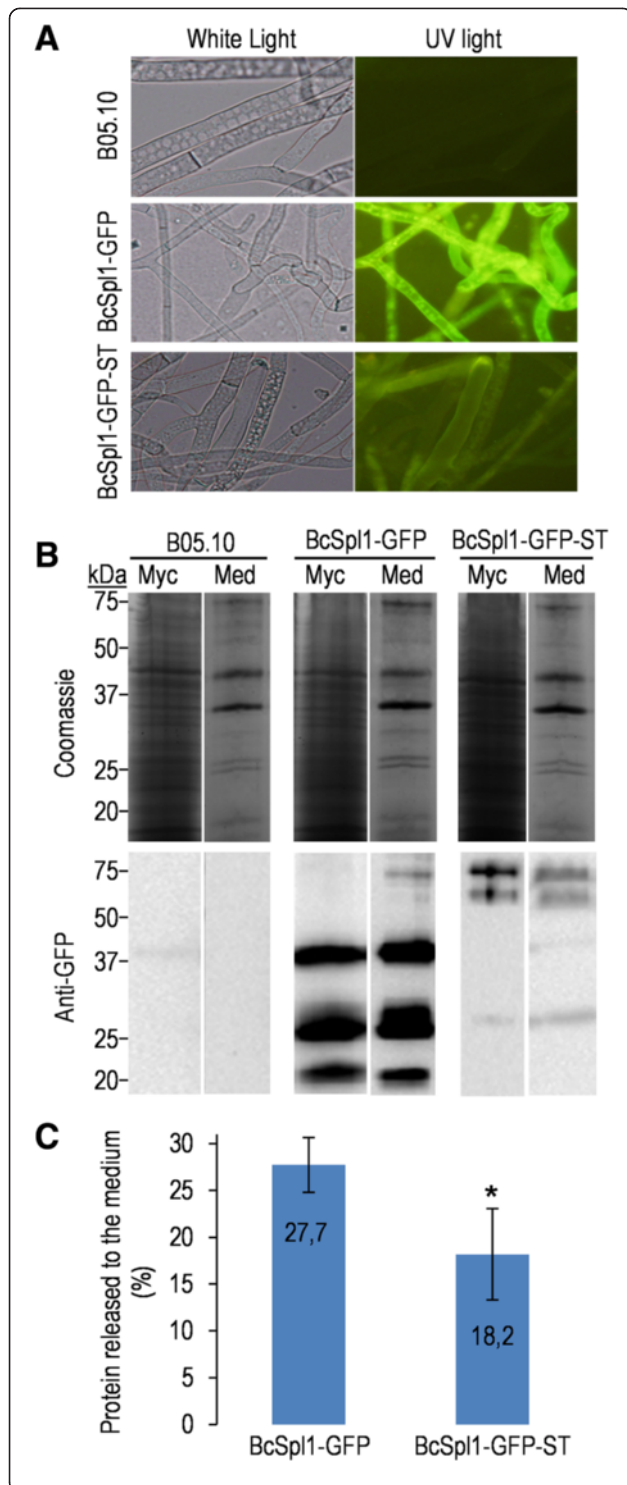


Figure 5 Ser/Thr-rich regions partially retain proteins with the mycelium. **A:** Fluorescence of transformants expressing a fusion proteins with BcSpl1, GFP, and with (BcSpl1-GFP-ST), or without (BcSpl1-GFP), a Ser/Thr-rich region from Cel5A. The wild-type strain B05.10 was used as control. **B:** SDS-PAGE and western blot (anti-GFP) comparing the amount of recombinant protein released to the culture medium (Med) and the amount associated with the mycelium (Myc) in cultures (16 hours in YGG-low medium) of the same strains as in (A). Amounts of proteins loaded were those contained in 1.125 ml of medium (1/67 of total in culture) or associated with 7.5 mg of mycelium (1/122 of total in culture). **C:** Percentages of recombinant protein released to the medium as soluble protein for the two strains, averaged for three independent cultures. Asterisk indicates a statistically significant difference between the two strains with 0.95 confidence (Mann-Whitney test).

enzyme. Treatment with exo α 1-6 mannosidase did not produced any effect by itself nor did it potentiate the effect of exo α 1-2,3. These results indicate, therefore, that at least BcSUN1 and BcIEB1 are actually glycosylated, that the amount of sugars incorporated is in accordance with the predictions carried out by NetOGlyc, and that glycosidic chains contain primordially mannoses linked by α 1-2 or α 1-3 glycosidic bonds. Additionally, the same strategy was used to assess the incorporation of mannose residues to the BcSpl1-GFP-ST fusion protein described above (Figure 6), and also in this case treatment with exo α 1-2,3 mannosidase (but not α 1-6) produced a considerable reduction in size, but not in the case of the control fusion protein BcSpl1-GFP.

Culture media from the three strains overexpressing the O-glycosylated proteins were also tested for the ability to elicit defense responses in plants by seedling growth inhibition assay [44], a sensitive and quantitative test which correlates with typical plant defence responses such as callose deposition, production of reactive oxygen species, or pathogenesis-related gene expression [45,46]. In this assay, culture media from the three overexpressing strains revealed considerably more efficient in inhibiting growth of tobacco seedling, as compared with the media obtained with the wild-type strain (Figure 7A-C). Moreover, the seedlings treated with media from the overexpressing strains showed necrotic symptoms that were clearly more intense than with the wild-type strain.

Discussion

O-glycosylated proteins are crucial components of fungal secretomes. Not only has it been predicted that more than half of secretome components display O-glycosylation sites [21], frequently in the form of highly-O-glycosylated regions, but it has also been shown that mutants affected in the first step of the O-glycosylation machinery display a vast arrays of defects including decreased virulence in the case of phytopathogens [28,47]. By purification and identification of glycoproteins, we have shown here

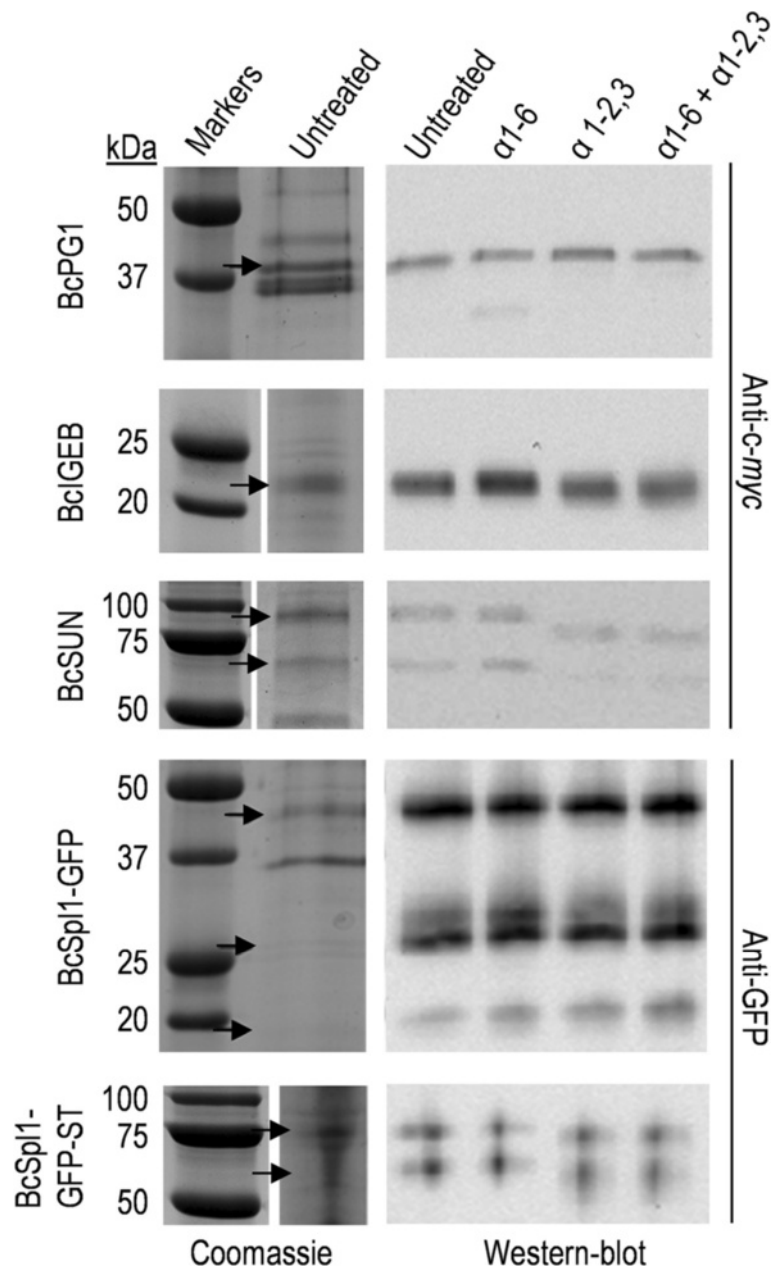
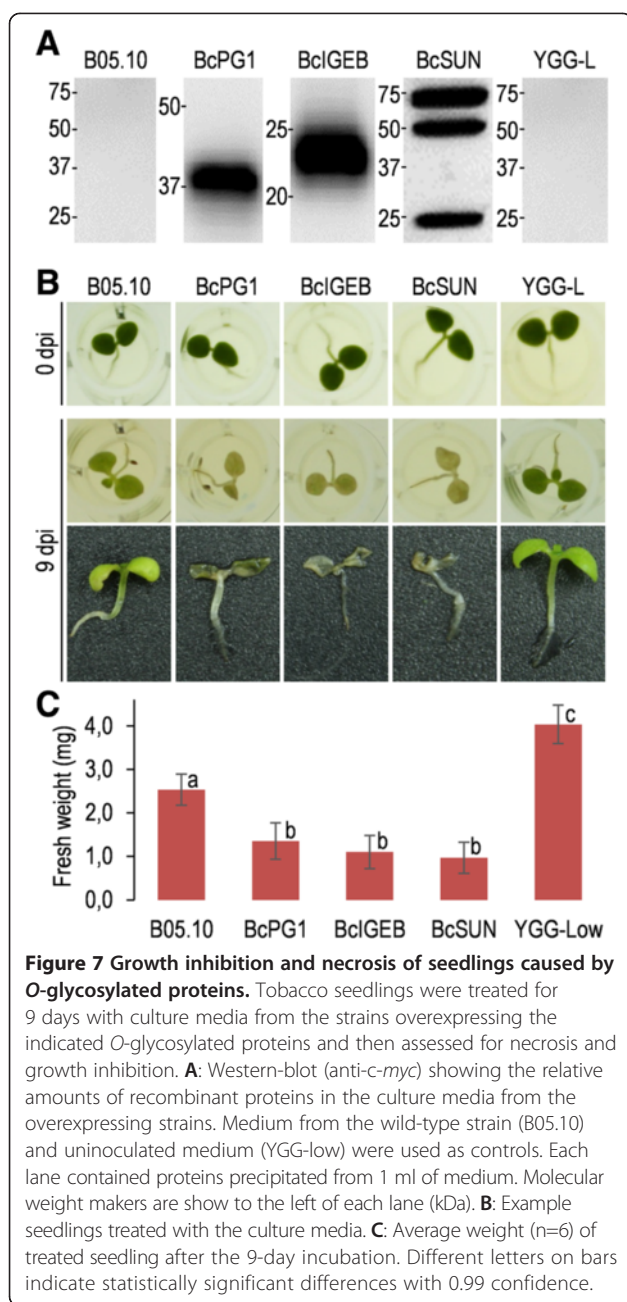


Figure 6 Deglycosylation of *B. cinerea* proteins with exo α 1-2,3 and exo α 1-6 mannosidases. Extracellular media from cultures of the strains overexpressing the indicated proteins were treated with the enzymes and analysed by western-blot with the indicated antibodies. SDS-PAGE of the untreated samples is also shown (Coomassie). The samples treated with the different enzymes, as well as the untreated controls, were identical and corresponded to 900 μ l of culture medium. Arrows point to the positions in the Coomassie-stained gels that correspond to the bands observed in the western blots.

that *B. cinerea* indeed secretes a substantial amount of these proteins. Altogether, 93 proteins were identified in the isolated glycoprotein sample for the wild-type strain B05.10, which include 18 proteins for which experimental evidence is provided here, for the first time, as components of the secretome. It is worth noting the absence, among these proteins, of the aspartic protease BcAP8, whose band is not detected in SDS-PAGE of

the purified glycoprotein sample (Figure 1) nor does it appear among the 157 proteins identified by LC-MS/MS for the same sample. This protein serves as an internal negative control for the purification of glycoproteins, since it is the most abundant protein in the secretome [7] but it lacks predicted glycosylation sites. Its absence in the purified sample indicates that the purification is working properly. Family distribution of



glycoproteins (Figure 3) is not very different from that obtained for the whole secretome sample [7], with a low number of protein classes containing most of the proteins: mainly proteases, polysaccharide hydrolases, oxidoreductases, and plenty of proteins with unknown functions. It does not seem, therefore, that glycosylation acts preferentially on specific types of proteins.

Contrary to what we expected, the composition of the glyco-secretome was not very different for the wild type and the three $\Delta bcpmt$ mutants affected in O-glycosylation. We reasoned that lack of glycosylation of specific proteins in one or more of the $\Delta bcpmt$ mutants would

prevent its retention by the lectin affinity column and so would result in its absence in the corresponding glycoprotein sample. Although there are plenty of proteins (62%) which are absent in one or more of the four strains, these correspond almost always to those with just one or a few spectral counts, so that their absence/presence may be the result of mere chance. The comparison of spectral counts for those proteins with the highest expression (Table 1), however, does not show any protein which is absent in the mutant samples. This may indicate, at least for these proteins, that they are not substrates of single PMTs (or PMT dimers) but are glycosylated by the combined action of several of them. PMTs have been shown to act as specific dimers in *Saccharomyces cerevisiae*, Pmt1/Pmt2 heterodimer and Pmt4/Pmt4 homodimer [48], and as almost all possible hetero- and homo-dimeric combinations in *Aspergillus nidulans* [49]. Our results agree better with the situation in *A. nidulans*, since a more promiscuous association of PMT monomers, to form functional dimers, would inherently imply an easier substitution of one of the PMTs by the other isoforms.

Surprisingly, more often than not, spectral counts for the most abundant proteins are higher in the $\Delta bcpmt$ mutants than in the wild-type strain B05.10 (Table 1), possibly because proteins correctly glycosylated are retained easier in the cell surroundings (cell wall and/or extracellular matrix) while those with an incomplete glycan structure escape easier. It was actually shown (Figure 4D) that proteins predicted to have hyper-O-glycosylated regions are, on average, more abundant in the glyco-secretomes of the $\Delta bcpmt$ mutants, as compared with the wild type, while the same is not true for the proteins not predicted to have hyper-O-glycosylated regions. Moreover, addition of a Ser/Thr rich region to a fusion protein expressed in *B. cinerea* increases the amount of it that remains associated with the mycelium (Figure 5), as compared with the amount found in the extracellular medium, although these results need to be taken with caution because of the different levels of GFP expression in the two strains. If confirmed, this effect of glycosylation may be physiologically important for *B. cinerea*, as enzymes acting on soluble substrates and producing assimilable nutrients for the fungal cells may be more efficient if retained closer to the cells.

The overexpression of three of the proteins predicted to be O-glycosylated allowed experimental confirmation of the post-translation modification for two of them, as a decrease in the apparent molecular mass observed in SDS-PAGE was caused by enzymatic deglycosylation (Figure 6). Although prediction of O-glycosylation carried out by NetOGlyc is only approximate for fungal proteins [21], the changes in the apparent molecular mass obtained for the three proteins are in accordance

with the number of *O*-glycosylation sites predicted (74, 3, and 1 for BcSUN1, BcIEB1, BcPG1, respectively). Incubation with two different deglycosylation enzymes showed the presence of mannose α 1-2 and/or α 1-3 bonds (Figure 6), but no mannose α 1-6 bonds were detected. These results are in agreement with the glycosyl linkages observed for other fungal and yeast proteins, usually displaying mannose α 1-2 and α 1-3 linkages [20]. Although mannose α 1-6 bonds have been observed in other fungi such as *Aspergillus* [20], they either do not exist in *B. cinerea*, at least in the proteins analyzed, or their contribution to the proteins molecular weight is not significant.

The extracellular media obtained after growing the strains overexpressing the three glycoproteins showed an enhanced ability to elicit plant defenses, as detected in seedling growth inhibition assays (Figure 7). This was not surprising in the case of BcPG1, since this proteins has recently been shown to be recognized as a PAMP by the *Arabidopsis* pattern recognition receptor RBPG1 [43], but was completely unexpected for the other two. It is tempting to speculate that it is the sugar fraction on these proteins the part responsible for the elicitation of the plant defenses, since this feature is shared by the three proteins, but clearly the alternative explanation, i.e. different amino acid sequences in the three proteins act as elicitors, cannot be ruled out at this point.

Conclusions

B. cinerea secretes plenty of glycosylated proteins belonging to a diverse set of families, with polysaccharide hydrolases, proteases, and oxidoreductases being the most abundant groups. As expected, Ser/Thr-rich regions, considered to be substrates of the *O*-glycosylation machinery, are twice more abundant in the glyco-secretome than in the whole secretome. Surprisingly, proteins predicted to

be hyper-*O*-glycosylated are more abundant in the glyco-secretomes of *O*-glycosylation deficient mutants, possibly because *O*-glycosylation causes retention in the cell wall or extracellular matrix. *O*-glycosylated proteins seem to have a prominent role in plant-pathogen interaction, since the independent overexpression of three of them in *B. cinerea* increases elicitation of plant defenses by the fungus.

Methods

Strains and growth conditions

B. cinerea strains B05.10 [50] and the three *bcpmt* knock-out mutants ($\Delta bcpmt1$, $\Delta bcpmt2$, and $\Delta bcpmt4$) [28] were maintained as conidial suspensions, or as mycelium in agar plugs for strain $\Delta bcpmt2$ (it does not produce conidia), in 15% glycerol at -80°C for long storage. For routine use, fungal strains were maintained at 4°C in silica gel [51]. Unless otherwise indicated, *B. cinerea* was grown in YGG-low medium (0.5% Yeast Extract, 10 mM glucose, and 0.3% Gamborg's B5), inoculated with 10^6 conidia per ml, at 20°C with shaking at 150 rpm. A description of all *B. cinerea* strains used in this work can be found in Table 2.

Isolation and quantification of extracellular glycoproteins

Secretome samples were obtained from fungal cultures in Petri dishes. Usually, ten plates with 20 ml of YGG-low medium were inoculated with mycelial plugs of the indicated strains and incubated 4 days at 20°C in the dark, without shaking. The culture medium was then harvested by filtration through 4 layers of filter paper and frozen at -20°C until use. After thawing, glycoproteins were purified by affinity chromatography on Concanavalin-A Sepharose. The culture medium (approx. 100 ml) was first equilibrated with 1/3 volume of 4X binding buffer (80 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 M NaCl, 4 mM MnCl_2 , 4 mM CaCl_2),

Table 2 *B. cinerea* strains used in this work

<i>Botrytis cinerea</i> strain	Description	Antibiotic resistance
B05.10	Wild-type strain of <i>B. cinerea</i> [50]	None
$\Delta Bcpmt1$	<i>bcpmt1</i> gene knock-out mutant	Hygromycin-B resistance [28]
$\Delta Bcpmt2$	<i>bcpmt2</i> gene knock-out mutant	
$\Delta Bcpmt4$	<i>bcpmt4</i> gene knock-out mutant	
B05.10 (BcSpl1-GFP)	Transformant of B05.10, expressing a fusion protein with BcSpl1 [14], GFP [58], and tags (6xHis; <i>c-myc</i>)	
B05.10 (BcSpl1-GFP-ST)	Transformant of B05.10, expressing a fusion protein with BcSpl1 [14], GFP [58], a Ser/Thr-rich region from Cel5A [42] and tags (6xHis; <i>c-myc</i>)	
B05.10 (BcPG1)	Transformant of B05.10, over-expressing the <i>B. cinerea</i> protein BcPG1, with tags (6xHis; <i>c-myc</i>)	Nourseothricin resistance. The expression construction was integrated at the <i>niaD</i> (nitrate reductase) locus [57].
B05.10 (BcIEB1)	Transformant of B05.10, over-expressing the <i>B. cinerea</i> protein BcIEB1, with tags (6xHis; <i>c-myc</i>)	
B05.10 (BcSUN1)	Transformant of B05.10, over-expressing the <i>B. cinerea</i> protein BcSUN1, with tags (6xHis; <i>c-myc</i>)	

centrifuged (1 000×g, 10 min) to remove insoluble material, and run through a Hi-Trap Con-A 4B prepacked column (GE Healthcare 28-9520-85) at a flow rate of 1 ml/min. Proteins binding non-specifically to the column were removed by washing with 15 ml of 1X binding buffer at the same flow rate. Glycoproteins were finally eluted with elution buffer (1X binding buffer supplemented with 300 mM methyl- α -D-glucopyranoside), at a flow rate of 0.5 ml/min, and 1-ml fractions were collected. Protein concentration was determined by the method of Bradford [52], and usually fractions 2–4 contained appreciable protein concentration and were pooled. Typically, about 25–110 μ g of glycoproteins were obtained, with the higher quantity corresponding to the wild-type strain B05.10.

Protein electrophoresis and identification

Unless otherwise indicated, protein samples were concentrated for electrophoresis by precipitation with methanol-chloroform [53] followed by resuspension in SDS-PAGE sample buffer. SDS-PAGEs were carried out on Any-KD Mini-PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad), and the gels were stained with colloidal Coomassie brilliant blue [54]. 2D electrophoresis were carried at the CNB Proteomics Facility (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spain), stained with silver, and the proteins in the indicated spots were then identified as explained elsewhere [28].

Protein identification by LC-MS/MS was carried out at the proteomics facility of the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid, Spain). Samples of glycoproteins were precipitated with methanol-chloroform, dried, and the pellet sent to the facility to be redissolved in SDS-PAGE sample buffer and analyzed by LC-MS/MS, basically as reported by Clemente *et al.* [55], but using a different database, uniprot-fungi.fasta, for peptide identification. False discovery rate was lower than 0.01.

Bioinformatics

Signal peptide detection was performed using the SignalP 4.1 server [34,35]. The prediction of non-classical protein secretion was done with the SecretomeP 2.0 server [36,37], using default parameters. Family assignment was done using sequence similarities to proteins of known function detected by BLAST [38,56], and the presence of conserved domains reported by Pfam [39,40]. Those proteins with no high similarity to proteins with known function were labelled as dubious, but the BLAST best hit, or the Pfam family and/or conserved domains, are also reported. In these cases, the proteins are included in the corresponding family, as defined by BLAST or Pfam. Only the proteins without any clear BLAST similarity or conserved domains are included in the “Unknown” family.

In order to search for Ser/Thr-rich regions in proteins, as well as regions predicted to be hyper-*O*-glycosylated, we used the Microsoft Excel macro XRR previously described [21]. Positions of Ser/Thr residues along every protein, and/or positions of predicted *O*-glycosylation sites identified by NetOGlyc 4.0 [32], were transferred to an Excel spreadsheet and loaded into the XRR macro. The XRR macro basically reports a list of regions with a length of at least of 20 amino acids displaying the indicated minimum content of Ser + Thr (or predicted *O*-glycosylation sites). In order to plot the distribution of the Ser/Thr-rich regions along proteins, the central positions of all Ser/Thr-rich regions was calculated as percentage distance from the N-terminus and grouped in ten categories (0-10%, 10-20%, ...), as described before [21].

Expression of recombinant proteins in *B. cinerea*

PCR amplifications were made with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) when the DNA product was to be used in cloning experiments, and *Taq* polymerase (GenScript) was used in any other case. All oligonucleotides used (Additional file 2) were from Life Technologies. Yeast recombinational cloning (YRC) was carried out as described by Schumacher [57], and plasmid extraction from *Saccharomyces cerevisiae* was made with the E.Z.N.A. Yeast Plasmid Kit (OMEGA bio-tek).

A fusion protein composed of GFP, the *B. cinerea* cerato-platanin BcSpl1, and a Ser/Thr-rich region from the *B. cinerea* protein Cel5A (a putative substrate for *O*-glycosylation) [42], was expressed in *B. cinerea* by transformation with plasmid pNDN-GFP-ST (see below). A control protein lacking the Cel5A Ser/Thr-rich region was expressed with plasmid pNDN-GFP. Plasmid pNDN-GFP was constructed by YRC introducing in plasmid pNDN-OGG [57], linearized with *Nco*I, a DNA fragment amplified from plasmid pCRP-GFP [41] with primer pair pCRPOGG-FW/pCRPOGG-RV and displaying i) the complete ORF of the *bcspl1* gene [14], ii) the *c-myc* and 6xHis epitopes (originally from pPICZ α A; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and iii) a codon-optimized GFP gene, adapted for *B. cinerea* and originally coming from plasmid pOptGFP [58]. To obtain the pNDN-GFP-ST plasmid, a 299-bp DNA fragment containing the Ser/Thr-rich region from the endo- β -1,4-glucanase Cel5A [42] was amplified with the primer pair pCRPOGGST-FW/pCRPOGGST-RV, using *B. cinerea* B05.10 genomic DNA as template, and cloned into *Not*I-linearized pNDN-GFP by YRC.

Three *B. cinerea* proteins, BcPG1 (acc. no. B0510_5388) [17], BcIEB1 (acc. no. B0510_2361) and BcSUN1 (acc. no. B0510_8844) were overexpressed in *B. cinerea* B05.10, fused to various epitopes, by transformation with plasmids pCBN-EPG, pCBN-IGE and pCBN-SUN, respectively,

which were constructed as follows. An intermediate plasmid, pCBN, was first assembled by fusing with YCR the following three fragments: i) a 6583-bp fragment amplified from plasmid pBHT2 [59] with the primer pair CAMBIA-FW/CAMBIA-RV, ii) a 3452-bp fragment amplified from plasmid pNDN-OGG [57] with the primer pair NDN-CAMBIA-FW/NDN-CAMBIA-RV and digested with *EcoRI* and *HindIII*, and iii) a 4175-bp fragment also amplified from pNDN-OGG but with primer pair NDN-FW/NDN-RV. In a second step, two inserts were cloned simultaneously by YCR in pCBN previously digested with *NcoI* plus *HindIII*: i) a 121-bp fragment coding for the 6xHis and *c-myc* epitopes amplified from pPICZαA with primer pair CMYC-FW/CMYC-RV, and ii) one of the three genes coding *B. cinerea* proteins. The latter were obtained by PCR, using *B. cinerea* B05.10 genomic DNA as template and the following primer pairs: EPG1-FW/EPG1-CMIC-RV for pCBN-EPG (expression of BcPG1), IGE-FW/IGE-CMIC-RV for pCBN-IGE (expression of BcIEB1), and SUN-FW/SUN-CMIC-RV for pCBN-SUN (expression of BcSUN1).

B. cinerea transformations were carried out as described by Hamada et al. [60], with the modifications introduced by van Kan et al. [61]. The five plasmids (pNDN-GFP, pNDN-GFP-ST, pCBN-EPG, pCBN-IGE and pCBN-SUN) were transformed into *B. cinerea* by integration in the *niaD* locus [57]. The following fragments from the plasmids were used in the transformations: *SacI*-*ApaI* fragment from pNDN-GFP (5605 bp) or pNDN-GFP-ST (5842 bp), *NotI*-*PstI* fragment from pCBN-EPG (7398 bp) or pCBN-IGE (6868 bp), and *NotI*-*XbaI* fragment from pCBN-SUN (6898 bp). These DNA fragments were all purified from agarose gels after digestion.

Transformants were analyzed by PCRs to check for the right integration events at the *niaD* locus, with primer pairs binding to the transforming DNA, on one side, and to a *niaD* region not included in the transforming DNA, on the other (see Additional file 2 for details). Homokaryosis was confirmed in every transformant by ensuring the absence of the wild-type *niaD* gene with PCR (see Additional file 2). All transformants used in the rest of the work gave the expected results in these PCRs (not shown).

Detection and quantification of recombinant proteins

The secretomes of the *Botrytis* transformants were analyzed by SDS-PAGE and western-blots using nitrocellulose membranes (Whatman Protran BA 85) and monoclonal anti-GFP or anti-*c-myc* primary antibodies (Roche) diluted 1:1000. Secondary antibodies consisted of goat anti-mouse IgG conjugated to Horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) and were used at a 1:3000 dilution. The peroxidase was detected with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Quantification of western-blot bands was done with the software Quantity One (Bio-Rad) on the

chemiluminescence signal recorded with a Gel Doc XR + system (Bio-Rad).

Seedling growth inhibition experiments

Samples to be tested in these assays consisted in culture media obtained after growing *B. cinerea* for 16 hours in YGG-low medium, inoculated with $3 \cdot 10^6$ conidia/ml. These media were filtered with 4 layers of filter paper and frozen until use. Thawed culture media were first centrifuged (20 min, 16 000xg) and 200 μ l were then added into 96-well microtiter plates and incubated with *Nicotiana tabacum* cv. Havana seedlings. After 6–8 days in a phytotron, plants were photographed and weighted. To obtain the plants, seeds were sterilized with chlorine gas [62] and germinated in Petri dishes with 20 ml of half-strength Murashige-Skoog medium (Pronadisa, Spain) for 20–30 days.

Exo-mannosidase treatment

Recombinant exo-mannosidases, α 1-6 mannosidase (P0727S) and α 1-2,3 mannosidase (P0729S), were from New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts). Proteins in 1 ml of culture medium were precipitated with methanol-chloroform [53], resuspended in water, and incubated with 40 units of α 1-2,3 and/or 32 units of α 1-6 mannosidases under standard conditions recommended by the supplier. Reactions were first incubated for 18 hours at 37°C, then the same amounts of enzyme/s were added and incubation was prolonged for 2 more hours. Reactions were stopped by the addition of SDS-PAGE sample buffer.

Additional files

Additional file 1: Protein content of the *Botrytis cinerea* glyco-secretome.

Additional file 2: Oligonucleotides used in this study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NB and CG conceived the study. All authors participated in the design of the experiments as well as the analysis/evaluation of the results. MG drafted the initial manuscript and all authors participated in the editing and approved its final version.

Acknowledgments

We are grateful to Julia Schumacher for sending the vectors for site-directed integration in the *B. cinerea niaD* locus, and for the protocols and advice regarding YCR. Support for this research was provided by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2010-22222) and Gobierno de Canarias (PI2007/009). M.G. was supported by Gobierno de Canarias.

Received: 1 July 2014 Accepted: 24 September 2014

Published online: 12 October 2014

References

- Dean R, van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD: **The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.** *Mol Plant Pathol* 2012, **13**:414–430.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N: **Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems - An introduction.** In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Edited by Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers; 2004:1–8.
- Auselem J, Cuomo CA, van Kan JAL, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillingier S, Fournier E, Gout L, Hahn M, Kohn L, Lapalu N, Plummer KM, Pradier JM, Quévillon E, Sharon A, Simon A, ten Have A, Tudzynski B, Tudzynski P, Wincker P, Andrew M, Anhouard VÁ, Beever RE, Beffa R, Benoit I, Bouzid O, et al.: **Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.** *PLoS Genet* 2011, **7**:e1002230.
- Staats M, van Kan JAL: **Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4.** *Eukaryot Cell* 2012, **11**:1413–1414.
- Girard V, Cherrad S, Dieryckx C, Gonçalves I, Dupuy JW, Bonneau M, Rascle C, Job C, Job D, Vacher S: **Proteomic analysis of proteins secreted by *Botrytis cinerea* in response to heavy metal toxicity.** *Metallomics* 2012, **4**:835–846.
- Li B, Wang W, Zong Y, Qin G, Tian S: **Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis.** *J Proteome Res* 2012, **11**:4249–4260.
- Espino JJ, Gutiérrez-Sánchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, González C: **The *Botrytis cinerea* early secretome.** *Proteomics* 2010, **10**:3020–3034.
- Fernández-Acero FJ, Colby T, Harzen A, Carbú M, Wieneke U, Cantoral JM, Schimdt J: **2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors.** *Proteomics* 2010, **10**:2270–2280.
- Shah P, Gutiérrez-Sánchez G, Orlando R, Bergmann C: **A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture.** *Proteomics* 2009, **9**:3126–3135.
- Shah P, Atwood JA, Orlando R, El MH, Podila GK, Davis MR: **Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome.** *J Proteome Res* 2009, **8**:1123–1130.
- González-Fernández R, Aloria K, Valero-Galván J, Redondo I, Arizmendi JM, Jorrín-Novo JV: **Proteomic analysis of mycelium and secretome of different *Botrytis cinerea* wild-type strains.** *J Proteomics* 2014, **97**:195–221.
- Noda J, Brito N, González C: **The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity.** *BMC Plant Biol* 2010, **10**:38.
- Cuesta Arenas Y, Kalkman ERIC, Schouten A, Dieho M, Vredendregt P, Uwumukiza B, Osés Ruiz M, van Kan JAL: **Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*.** *Physiol Mol Plant Pathol* 2010, **74**:376–386.
- Frias M, González C, Brito N: **BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host.** *New Phytol* 2011, **192**:483–495.
- Brito N, Espino JJ, González C: **The endo-β-1,4-xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**:25–32.
- Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, Joosten R, Benen JAE, van Kan JAL: **Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*.** *Plant J* 2005, **43**:213–225.
- ten Have A, Mulder W, Visser J, van Kan JA: **The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*.** *Mol Plant Microbe Interact* 1998, **11**:1009–1016.
- Valette-Collet O, Cimerman A, Reignault P, Levis C, Boccara M: **Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methyltransferase gene *Bcpe1* reduces virulence on several host plants.** *Mol Plant Microbe Interact* 2003, **16**:360–367.
- Nafisi M, Stranne M, Zhang L, van Kan J, Sakuragi Y: **The endo-arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2014, **27**:781–792.
- Goto M: **Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2007, **71**:1415–1427.
- González M, Brito N, González C: **High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the extracellular proteins coded by eight fungal genomes.** *BMC Microbiol* 2012, **12**:213.
- Hutzler J, Schmid M, Bernard T, Henrissat B, Strahl S: **Membrane association is a determinant for substrate recognition by PMT4 protein O-mannosyltransferases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7827–7832.
- Fernández-Álvarez A, Marín-Menguiano M, Lanver D, Jiménez-Martín A, Elías-Villalobos A, Pérez-Pulido AJ, Kahmann R, Ibeas JI: **Identification of O-mannosylated virulence factors in *Ustilago maydis*.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002563.
- Lommel M, Strahl S: **Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans.** *Glycobiology* 2009, **19**:816–828.
- Loibl M, Wunderle L, Hutzler J, Schulz BL, Aebi M, Strahl S: **Protein O-mannosyltransferases associate with the translocon to modify translocating polypeptide chains.** *J Biol Chem* 2014, **289**:8599–8611.
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S: **Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p.** *J Biol Chem* 2000, **275**:19288–19296.
- Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S: **Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids.** *Glycobiology* 2002, **12**:771–783.
- González M, Brito N, Frías M, González C: ***Botrytis cinerea* protein O-mannosyltransferases play critical roles in morphogenesis, growth, and virulence.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e65924.
- Strahl-Bolsinger S, Scheinost A: **Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases.** *J Biol Chem* 1999, **274**:9068–9075.
- ten Have A, Espino JJ, Dekkers E, Sluyter SCV, Brito N, Kay J, González C, van Kan JA: **The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family.** *Fungal Genet Biol* 2010, **47**:53–65.
- NetNGlyc 1.0. In [http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc].
- NetOGlyc 4.0. In [http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc].
- Steenfot C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H: **Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology.** *EMBO J* 2013, **32**:1478–1488.
- SignalP 4.1. In [http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP].
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H: **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.** *Nature Methods* 2011, **8**:785–786.
- SecretomeP 2.0. In [http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP].
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S: **Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion.** *Protein Eng Des Sel* 2004, **17**:349–356.
- BLAST. In [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi].
- Finn RD, Mistry J, Tate J, Coghill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A: **The Pfam protein families database.** *Nucl Acids Res* 2010, **38**:D211–D222.
- Pfam. In [http://pfam.xfam.org/].
- Frias M, Brito N, González M, González C: **The phytotoxic activity of the cerato-platanin BcSpl1 resides in a two-peptide motif in the protein surface.** *Mol Plant Pathol* 2014, **15**:342–351.
- Espino JJ, Brito N, Noda J, González C: ***Botrytis cinerea* endo-β-1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis.** *Physiol Mol Plant Pathol* 2005, **66**:213–221.
- Zhang L, Kars I, Essenstam B, Liebrand TW, Wagemakers L, Elberse J, Tagkalaki P, Tjoitang D, van den Ackerveken G, van Kan JA: **Fungal endopolygalacturonases are recognized as Microbe-Associated Molecular Patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES 1.** *Plant Physiol* 2014, **164**:352–364.
- Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T: **A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J* 1999, **18**:277–284.
- Gómez-Gómez L, Boller T: **FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*.** *Mol Cell* 2000, **5**:1003–1011.
- Pfund C, Tans-Kersten J, Dunning FM, Alonso JM, Ecker JR, Allen C, Bent AF: **Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2004, **17**:696–706.
- Fernández-Álvarez A, Elías-Villalobos A, Ibeas JI: **The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*.** *Plant Cell* 2009, **21**:3397–3412.

48. Girrbach V, Strahl S: Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* 2003, **278**:12554–12562.
49. Kriangkripiat T, Momany M: *Aspergillus nidulans* Pmts form heterodimers in all pairwise combinations. *FEBS Open Bio* 2014, **4**:335–341.
50. Büttner P, Koch F, Voigt K, Quidde T, Risch S, Blaich R, Brückner B, Tudzynski P: Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr Genet* 1994, **25**:445–450.
51. Delcan J, Moyano C, Raposo R, Melgarejo P: Storage of *Botrytis cinerea* using different methods. *J Plant Pathol* 2002, **84**:3–9.
52. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, **72**:248–254.
53. Wessel D, Flügge UI: A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 1984, **138**:141–143.
54. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W: Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988, **9**:255–262.
55. Clemente P, Peralta S, Cruz-Bermudez A, Echevarría L, Fontanesi F, Barrientos A, Fernandez-Moreno MA, Garesse R: hCOA3 stabilizes cytochrome c oxidase 1 (COX1) and promotes cytochrome c oxidase assembly in human mitochondria. *J Biol Chem* 2013, **288**:8321–8331.
56. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990, **215**:403–410.
57. Schumacher J: Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genet Biol* 2012, **49**:483–497.
58. Leroch M, Memke D, Koppenhoefer D, Schneider P, Mosbach A, Doehlemann G, Hahn M: Living colors in the Gray Mold pathogen *Botrytis cinerea*: Codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence. *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:2887–2897.
59. Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S: *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 2001, **91**:173–180.
60. Hamada W, Reignault P, Bompeix G, Boccardo M: Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. *Curr Genet* 1994, **26**:251–255.
61. van Kan JAL, van't Klooster JW, Wagemakers CAM, Dees DCT, van der Vlugt-Bergmans CJB: Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 1997, **10**:30–38.
62. Clough SJ, Bent AF: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998, **16**:735–743.

doi:10.1186/s12866-014-0254-y

Cite this article as: González et al.: Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology* 2014 **14**:254.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional file 2. Oligonucleotides used in this study

Primer ID.	Seq (5' → 3')	Comments
pCRPOGG-FW	TCCATCACATCACAAATCGATCCAACCATGCAATCCCAACTCTCG	Used to amplify a 542-bp DNA fragment from plasmid pCRP-GFP (see text). pCRPOGG-FW (in combination with NR-RV-check) was also used to check for the right integration event of plasmids pNDN-GFP and pNDN-GFP-ST at the <i>MiaD</i> locus.
pCRPOGG-RV	TACTTACCTCACCCCTTGAAACCAATGGTGAACCCGGGATGATG	
pCRPOGGST-FW	TGGGAATGGATGAACCTTACAAAAGCGACCACCTCCCGCTGCCGTTG	Used to amplify a 293-bp DNA fragment, which codes for the Ser/Thr-rich region of the Cel5A, from <i>B. cinerea</i> B05.10 genomic DNA (see text).
pCRPOGGST-RV	TCATACATCTTATCTACATAGGCTATCCGGCAGCTGTGCTGCC	
CAMBIA-FW	TGGCAGGATATATTGGTGTAAACAGAAATTCGAGCTCGGTACCCG	Used to amplify a 6583-bp DNA fragment from plasmid bpHT2, used to generate the vector pCBN by YRC (see text).
CAMBIA-RV	CCAGCCAGCCAACAGCTC	
NDN-CAMBIA-FW	TGCCCGTGGGGAGCTGTGGCTGGCTGGTACTGGGAAAACCCCTGGC	Used to amplify a 3452-bp DNA fragment from plasmid pNDN-OGG, used to generate the vector pCBN by YRC (see text).
NDN-CAMBIA-RV	TGTTTACACCACAATATATCTGCCACAATAGGGGTTCCGGCC	
NDN-FW	TTTGTGCCAGGATATATTGGTGTAAACAGCCGATTCATTAATGCAGC	Used to amplify a 4175-bp DNA fragment from plasmid pNDN-OGG, used to generate the vector pCBN by YRC (see text).
NDN-RV	CTAATAAACGGCTCTTTTCTCTTAGTTTACTTCAGCAATAGCAGCGAC	
CMYC-FW	TCACATCACAAATCGATCCAACCATGGAACAANAACCTCATCTCAG	Used to amplify a 121-bp DNA fragment, which codes for <i>c-myc</i> and 6xHis epitopes, from plasmid pPICZαA (see text).
CMYC-RV	TAATCATACATCTTATCTACATACGAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGG	
EPG1-FW	TCCATCACATCACAAATCGATCCAACCATGGTTCAACTTCTCTCAATGCG	Used to amplify a 1196-bp DNA fragment, which contains the complete ORF of the <i>bcpq1</i> gene, from <i>B. cinerea</i> B05.10 genomic DNA. EPG1-FW (in combination with NR-RV-check) was also used to check for the right integration event of plasmid pCBN-EPG at the <i>MiaD</i> locus.
EPG1-CMIC-RV	CCTCTTCTGAGATGAGTTTGGTTCCACACTTGACACCAGATGGGAG	
IGE-FW	TCCATCACATCACAAATCGATCCAACCATGTTCTCCAAGACCTTTCATCG	Used to amplify a 666-bp DNA fragment, which contains the complete ORF of <i>bci6b1</i> gene, from <i>B. cinerea</i> B05.10 genomic DNA. IGE-FW (in combination with NR-RV-check) was also used to check for the right integration event of plasmid pCBN-IGE at the <i>MiaD</i> locus.
IGE-CMIC-RV	CCTCTTCTGAGATGAGTTTGGTTCCAGCTACTCCCAAGCGGAAGGGC	
SUN-FW	TCCATCACATCACAAATCGATCCAACCATGAAGTTCAACCCAGTTTC	Used to amplify a 1519-bp DNA fragment, which contains the complete ORF of <i>bcsun1</i> gene, from <i>B. cinerea</i> B05.10 genomic DNA. SUN-FW (in combination with NR-RV-check) was also used to check for the right integration event of plasmid pCBN-SUN at the <i>MiaD</i> locus.
SUN-CMIC-RV	CCTCTTCTGAGATGAGTTTGGTTCTGATGAGAAGACGTATGTAGCG	
NOUR-RV-check	CAGCGCTCTACATGAGC	Used to check for the right integration event of plasmids pNDN-GFP, pNDN-GFPST, pCBN-EPG, pCBN-IGE and pCBN-SUN at the <i>MiaD</i> locus. NOUR-RV-check binds inside of the transforming DNA region, at the <i>Nat1</i> gene not present in the recipient strain. NR-FW-check binds to a <i>MiaD</i> promoter region not present in any of the plasmids.
NR-FW-check	AGGATGGTTTGGTTCCGG	
NR-RV-check	GTCTGAGATAGCCCTACGG	Used to check for the right integration event of plasmids pNDN-GFP, pNDN-GFP-ST, pCBN-EPG, pCBN-IGE and pCBN-SUN at the <i>MiaD</i> locus, in combination with the specific primers pCRPOGG-FW, EPG1-FW, IGE-FW and SUN-FW. NR-RV-check binds to a <i>MiaD</i> terminator region not present in any of the plasmids.
NR-MBD-SMA	TCCCCGGGTTTACCATGATCGGGTCCGA	Used to check the absence of the <i>MiaD</i> gene in transformants obtained by integration at the <i>miaD</i> locus, in order to ensure homokaryosis.
NR-MBD-BAM	CGGGATCCACCCTCTTTAAGCGCTTT	

