

Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*

Ernesto P. Benito, Mónica Arranz y Arturo P. Eslava

Area de Genética, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, España

Resumen

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno importante que infecta una amplia variedad de plantas y que puede hacer uso de diferentes mecanismos de infección. Aunque se ha observado cierta variabilidad genética en algunas especies en cuanto a su resistencia a *B. cinerea*, en ningún caso se ha encontrado una relación gen a gen. El desarrollo de genotipos resistentes resulta, por lo tanto, complicado. Cualquier intento de control de la enfermedad exige un conocimiento detallado tanto de los mecanismos de infección del hongo como de los mecanismos de defensa de la planta. La aplicación de distintas aproximaciones experimentales está permitiendo analizar en detalle el proceso de infección del patógeno sobre distintos huéspedes, describir los elementos que participan en cada fase del mismo e identificar aquellos factores de patogenicidad que son esenciales para que tenga lugar el establecimiento de la interacción. La caracterización de estos últimos proporcionará información acerca de elementos clave sobre los que intervenir con el objeto de desarrollar estrategias de control duraderas, efectivas y respetuosas con el medio ambiente.

Botrytis cinerea, Factor de patogenicidad, Ciclo de infección

Pathogenicity factors in *Botrytis cinerea*

Summary

Botrytis cinerea is an important plant pathogenic fungi with a wide host range, which can make use of different infection mechanisms. Although genetic variation for resistance to *B. cinerea* has been observed within some species, no gene-for-gene relationship has been found. The development of resistant genotypes is, therefore, complicated. Any attempt to develop control strategies makes it necessary a detailed knowledge of both the fungal infection mechanisms and the plant defence mechanisms. The application of different experimental approaches allows the analysis of the infection process in different hosts, the description of the elements that participate in each stage of the process and the identification of those pathogenicity factors which are essential for the establishment of the interaction. The characterisation of the latter will provide information about key elements of the infection process as the basis for the development of effective, long term and environmentally friendly control strategies.

Key words

Botrytis cinerea, Pathogenicity factor, Disease cycle

Botrytis cinerea Pers.: Fr [teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel], agente causal de la "podredumbre gris", infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección [1]. El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene en cultivos de importancia tales como vid, tomate, fresa, ornamentales... son muy numerosos los estudios que se han realizado sobre la biología de *B. cinerea*, sobre las interacciones en las que éste participa y sobre los posible métodos de control del patógeno [2]. La mayor parte de las estrategias de control utilizadas hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos. Sin embargo, la utilización de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los fungicidas utilizados. Las posi-

Dirección para correspondencia:

Dr. Ernesto P. Benito
Area de Genética, Dpto. de Microbiología y Genética,
Universidad de Salamanca, Edificio Departamental,
Plaza de los Doctores de la Reina s/n,
37007 Salamanca, España
Tel. y fax: 923 294663;
E-mail: Benito@www-micro.usal.es

bilidades de desarrollar estrategias de control basadas en genotipos resistentes son reducidas, ya que no se han descrito genes de resistencia en las especies que infecta y, además, la diversidad fenotípica que muestran los distintos aislamientos del hongo es enorme. En este contexto, y con el objeto de diseñar estrategias de control válidas, resulta imprescindible profundizar en el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad del hongo y de los mecanismos de defensa de la planta.

El análisis de los mecanismos de infección supone caracterizar los factores de patogenicidad del hongo. La genética molecular, aplicada al análisis de las interacciones planta-patógeno, está poniendo al alcance del investigador poderosas herramientas de trabajo que posibilitan estrategias experimentales muy útiles para profundizar en el análisis de los mecanismos que participan en estos procesos. En esta comunicación describimos en primer lugar el ciclo general de infección de *B. cinerea* sobre una planta huésped tipo. Se presentan a continuación las distintas aproximaciones experimentales que pueden resultar válidas para tratar de identificar aquellos factores importantes para que tenga lugar el proceso de infección, y se consideran algunos de los resultados que cada estrategia ha proporcionado.

FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *B. CINEREA*

Ciclo de infección. Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire [1]. Una vez que la spora ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en varias fases (Figura 1): 1) la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped; 2) su penetración en el tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, bien directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas); 3) el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta; 4) en muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en la áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias; 5) transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

FACTORES DE PATOGENICIDAD: APROXIMACIONES EXPERIMENTALES PARA SU IDENTIFICACIÓN

Cada fase del proceso de infección requiere diferentes estadios de desarrollo e implica la participación de diferentes "determinantes" o "factores" de patogenicidad. Definiremos "factor de patogenicidad" como cualquier factor que contribuya a la penetración, invasión, colonización y maceración de un tejido vegetal vivo. Su identificación puede abordarse desde distintos puntos de vista y aplicando estrategias experimentales diferentes.



Figura 1. Ciclo de infección de *B. cinerea*.

Aproximaciones dirigidas. En primer lugar, y teniendo en cuenta las numerosas descripciones que sobre la fisiología y la bioquímica del proceso de infección se han realizado en distintas interacciones en las que participa *B. cinerea*, es posible considerar ciertos factores que a priori pudieran estar implicados en alguna de las fases del proceso de patogénesis. Algunos han atraído un interés especial y su posible participación ha sido investigada en detalle. Es el caso de enzimas como una cutinasa, presumiblemente necesaria para la penetración a través de la cutícula [3,4], enzimas hidrolíticas extracelulares tales como endo- y exo-poligalacturonasas [5], pectin metil esterases [6], pectin liasas [7], enzimas celulolíticas [8], ... implicadas en la degradación de la pared celular vegetal, o proteasas [7,9] implicadas en la degradación de membranas celulares. Para progresar sobre su huésped *Botrytis* necesita que el tejido que va invadiendo esté muerto [10], lo que sugiere la participación, además, de toxinas producidas por el propio patógeno que matan las células que a continuación coloniza. Por otra parte, la planta despliega diversos mecanismos de defensa ante el ataque del patógeno, entre ellos la producción de distintos tipos de fitoalexinas [11]. *B. cinerea*, a su vez, produce enzimas responsables de la detoxificación de estos compuestos, enzimas que también han atraído un considerable interés [12].

Para determinar si alguno de los factores objeto de estudio es esencial en el proceso de patogénesis es necesario disponer de mutantes deficientes específicamente en cada uno ellos, y de un sistema experimental que permita comparar su capacidad para infectar a la planta huésped con la de la cepa silvestre. En la actualidad es posible obtener mutantes alterados en cualquier gen de interés de *B. cinerea* mediante técnicas de interrupción génica, una vez se dispone del alelo silvestre del mismo. En algunos de los casos mencionados este tipo de análisis ya ha sido completado. Así, se ha aislado el gen *cutA*, codificador de una enzima cutinasa de 18 kDa [13] para la cual evidencias experimentales previas permitían anticipar un papel importante durante la fase de penetración [3]. Se han obtenido mutantes deficientes en este gen cuyo análisis funcional indica que éstos no manifiestan ninguna alteración apreciable en relación con la cepa silvestre en cuanto a su capacidad de penetración en la célula huésped, demostrando que la enzima cutinasa codificada por el *cutA* no es esencial en el proceso de patogénesis [14]. Recientemente ha sido aislado el gen codificador de una enzima endopoligalacturosasa y, como en el caso anterior, se han obtenido mutantes deficientes en el mismo mediante interrupción génica [15]. El análisis funcional realizado con los mismos indica que este factor no es esencial durante las fases de penetración y de formación de lesión

nes primarias, pero que sí es importante para la diseminación del patógeno a partir de éstas, ya que las cepas mutantes originan lesiones primarias en igual medida que la cepa silvestre, pero muestran una capacidad de formar lesiones dispersivas reducida [15].

Aproximaciones no dirigidas. Es posible aplicar estrategias experimentales alternativas para la identificación de factores de patogenicidad que no prejuzgan la participación de ningún "factor" en particular. Estas estrategias pueden dividirse en dos grandes grupos: a) aquellas basadas en el aislamiento y caracterización de mutantes deficientes en su capacidad para infectar la planta huésped, y b) aquellas basadas en el análisis de genes del patógeno que se expresan diferencialmente durante el proceso de patogénesis.

a) **Obtención de mutantes.** La obtención de estirpes mutantes alteradas en un proceso dado y la caracterización de sus deficiencias han constituido herramientas de gran utilidad para analizar muy distintos procesos biológicos, incluida la capacidad de un determinado patógeno para infectar a su planta huésped. La complementación de las deficiencias inducidas en las cepas mutantes mediante transformación con genotecas de ADN genómico de cada organismo en concreto ha permitido aislar los genes correspondientes. A los procedimientos clásicos basados en la utilización de agentes químicos y radiaciones para obtener mutantes, se suman en la actualidad estrategias basadas en la interrupción del gen de interés mediante la integración dirigida de distintos tipos de fragmentos de ADN. Estas técnicas han resultado particularmente eficientes en diferentes sistemas cuando se han incluido enzimas de restricción en la mezcla de transformación (REMI - restriction enzyme-mediated integration -) [16,17]. Estos procedimientos resultan muy útiles para obtener mutantes y analizar cualquier proceso de interés, ya que posibilitan el aislamiento del gen alterado simplemente aislando las secuencias de ADN genómico adyacentes al punto de inserción. Desafortunadamente la obtención de cepas mutantes estables de cualquier tipo en *B. cinerea* resulta muy difícil debido a la naturaleza multinucleada (media de 3-12 núcleos por conidio) [18] y posiblemente heterocarionte [19] de sus conidios. Una dificultad adicional se deriva del hecho de que numerosas estirpes del patógeno manifiestan niveles de ploidía elevados [20]. En consecuencia, la utilidad de este tipo de estrategias en el caso particular de *B. cinerea* resulta muy limitada. Recientemente se han aislado cepas haploides derivadas de las cepas poliploides utilizadas rutinariamente en el trabajo de laboratorio, que no manifiestan alteración apreciable alguna en sus características, incluidas sus capacidades para infectar a la planta huésped, en relación con las cepas a partir de las cuales se han obtenido [20]. Estas cepas constituyen un material adecuado para realizar el tipo de análisis indicado [14,15].

b) **Análisis de expresión génica diferencial.** La identificación y el análisis de genes del hongo que son expresados preferentemente durante su interacción con la planta puede permitir detectar genes que son importantes para el proceso de patogénesis en cada una de las fases consideradas. Es ésta una aproximación funcional para cuya aplicación se asume que el patrón de expresión génica del hongo *in planta* refleja la activación de los mecanismos específicos necesarios para que la interacción tenga lugar. Por lo tanto, mediante la caracterización de aquellos genes del hongo que se expresan específicamente durante la interacción resultará posible obtener información sobre aquellos mecanismos así como sobre los factores de patogenicidad implicados en los mismos y que son

esenciales para que la infección tenga lugar. Esta estrategia permite, además, obtener información sobre el estado fisiológico y metabólico del hongo durante la interacción. En nuestro laboratorio estamos aplicando esta aproximación al análisis de la interacción *B. cinerea*-tomate, concretamente al análisis de los mecanismos que son activados específicamente durante los estadios iniciales de la interacción (reconocimiento del huésped y penetración) y durante la formación de lesiones dispersivas. Para su estudio se ha establecido, en primer lugar, un sistema de inoculación artificial que proporciona eficiencias de infección elevadas y resultados reproducibles [21]. Disponiendo de material infectado, se ha iniciado la comparación, mediante "differential display", de los patrones de expresión del hongo y de la planta durante la interacción en las fases indicadas con los patrones de expresión tanto del hongo durante su crecimiento saprofito como de la planta sana. Para distinguir entre los genes del hongo que se expresan diferencialmente durante la interacción y los genes de la planta que se expresan en respuesta al patógeno se han incluido en este análisis comparativo los patrones de expresión de la planta infectada con otros patógenos característicos (*Phytophthora infestans* y el Virus de la Necrosis de tabaco). Este análisis ha permitido aislar varios fragmentos de ADNc derivados de genes de *B. cinerea* cuya expresión es específicamente inducida *in planta* o cuyo nivel de expresión aumenta significativamente durante la interacción [22]. La caracterización de algunos de los genes correspondientes está actualmente en curso. Los primeros resultados obtenidos demuestran que mediante la aplicación de estos procedimientos es posible detectar genes relacionados con la capacidad del hongo para infectar a su huésped. Es el caso del gen *Bde47*, que manifiesta un aumento muy importante en sus niveles de expresión durante los estadios iniciales del proceso de infección (penetración), durante la fase de formación de lesiones dispersivas y durante la fase final de maceración del tejido infectado. El gen ha sido aislado y se conoce su secuencia de nucleótidos así como la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida, secuencias que no presentan homología significativa con ninguna secuencia incluida en las bases de datos. El análisis funcional en curso del mismo indica que su producto génico participa en el proceso de patogénesis, ya que mutantes alterados específicamente en este gen obtenidos mediante interrupción génica manifiestan alteraciones en su capacidad para infectar a la planta huésped (resultados no publicados).

PERSPECTIVAS

La aplicación de diferentes aproximaciones experimentales está proporcionando información básica sobre los mecanismos que participan en el establecimiento de las interacciones huésped-patógeno en las que *B. cinerea* está implicado y sobre los factores de patogenicidad que en ellos participan. El desarrollo de técnicas de control eficientes supone identificar factores esenciales sobre los que resulte factible intervenir para controlar el progreso del patógeno. Hasta el momento no se ha podido demostrar que ninguno de los factores estudiados, al menos cuando se consideran individualmente, resulte esencial en el proceso de patogénesis. Son observaciones que no resultan sorprendentes tratándose de un patógeno tan versátil como *B. cinerea* que puede hacer uso de diferentes mecanismos para infectar la planta huésped. Probablemente esta versatilidad resulta de la combinación y acción simultánea de distintos factores. Indudablemente, el carácter "capacidad para infectar a un huésped" de un organismo patógeno es un carácter complejo y multifactorial.

rial. El desarrollo de métodos de control eficientes quizás suponga la identificación de "factores de patogenicidad" más generales e integradores. En este sentido, la caracterización de aquellos procesos mediante los cuales el patógeno percibe una nueva situación, la presencia de un huésped, y de los mecanismos mediante los cuales la señal recibida es transmitida y procesada resultando en la activación de mecanismos de infección específicos, puede ofre-

cer posibilidades de intervención válidas. Será interesante determinar si en *B. cinerea* en particular, y en hongos fitopatógenos en general, existen rutas de transducción de señales específicas de patogénesis, o bien si existen elementos de rutas de transducción de señales generales que desempeñan funciones específicas en procesos de patogenicidad.

Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas recibidas de la Comisión Europea (contrato n° ERBFMBICT960969) y de la CICYT (proyecto n° PB97-1307).

Bibliografía

- Jarvis WR. *Botryotinia* and *Botrytis* species. Taxonomy and pathogenicity. Can Dep Agric. Monogr 15, Harrow, Ontario, Canada. 1977.
- Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR. (Eds) The biology of *Botrytis*. Academic Press, London. 1980.
- Salinas J. Function of cutinolytic enzymes in the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. 1992; Tesis Doctoral, Universidad de Utrecht, Holanda.
- Salinas J, Verhoeff K. Microscopical studies on the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. Eur J Plant Pathol 1995; 101: 377-386.
- Johnston DJ, Williamson B. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. Mycol Res 1992; 96: 342-349.
- Reignault P, Mercier M, Bompeix G, Boccara M. Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies. Microbiology 1994; 140: 3249-3255.
- Movahedi S, Heale JB. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. Physiol Mol Plant Pathol 1990b; 36: 303-324.
- Sasaki I, Nagayama H. β -glucosidase from *Botrytis cinerea*: its relation to the pathogenicity of the fungus. Biosci Biotech Biochem 1994; 58: 616-620.
- Movahedi S, Heale JB. Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. Physiol Mol Plant Pathol 1990a; 36: 289-302.
- Clark CA, Lorbeer JW. Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. Phytopathology 1976; 66: 1279-1289.
- Mansfield JW. Mechanisms of resistance to *Botrytis*. En: The Biology of *Botrytis*. Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR. (Eds). Academic Press, London. 1980; pp. 181-218.
- Pezet R, Pont V, Hoang-Van K. Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. Physiol Mol Plant Pathol. 1991; 39: 441-450.
- van der Vlugt-Bergmans CJB, Wagemakers CAM, van Kan JAL. Cloning and expression of the Cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. Mol Plant-Microbe Interact 1997; 10: 21-29.
- 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.
- ten Have A, Mulder W, Visser J, van Kan JAL. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. Mol Plant-Microbe Interact 1998; 11:1009-1016.
- Kuspa A, Loomis WF. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 8803-8807.
- Bölker M, Böhnert HU, Braun KH, Görl J, Kahmann R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). Mol Gen Genet 1995; 248: 547-552.
- Phillips DJ, Margosan DA, Mackey BE. Size, nuclear number, and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. Phytopathology 1987; 77: 1606-1608.
- Faretra F, Antonacci E, Pollastro S. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. J Gen Microbiol 1988; 134: 2543-2550.
- Büttner P, Koch F, Voigt K, et al. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. Curr Genet. 1994; 25: 445-450.
- Benito EP, ten Have A, van't Klooster, JW, van Kan JAL. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. Eur J Plant Pathol 1998; 104: 207-220.
- Benito EP, Prins T, van Kan JAL. Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. Plant Mol Biol 1996; 32:947-957.