

Análisis genético y relación con patogenicidad en *Botrytis cinerea*

Laureana Rebordinos, Inmaculada Vallejo, Milagrosa Santos, Isidro G. Collado, María Carbú y Jesús Manuel Cantoral

Laboratorio de Microbiología y Genética, CASEM, Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz, España

Resumen

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno, responsable de la enfermedad denominada "podredumbre gris", con gran repercusión en el sector agrícola de numerosos países. Se han aislado y caracterizado mediante distintas técnicas (morfológicas, bioquímicas, genéticas y moleculares) diez cepas de distinta procedencia y recogidas en años diferentes. Los resultados obtenidos muestran que existen diferencias morfológicas claras entre las distintas cepas, estableciéndose relaciones directas entre la producción de esclerocios y la patogenicidad. El tamaño de los conidios y el número de núcleos por conidio fueron caracteres muy variables entre las cepas. La electroforesis en campo pulsante mostró un cariotipo único para cada cepa, con alto polimorfismo entre las cepas y que contenía un número de bandas entre 4 y 8.

Se ha puesto a punto un sistema de transformación autónomo, mediante la utilización del plásmido pAMPF21 conteniendo la región *AMA1* de *Aspergillus nidulans*. Finalmente a partir de una genoteca de ADN genómico se ha clonado y secuenciado el gen *gdhA* implicado en el metabolismo del nitrógeno. Este gen produce un ARNm de 1,7 Kb y complementa la deficiencia en la actividad glutamato deshidrogenasa de *A. nidulans*.

Botrytis cinerea, Podredumbre gris, Fitopatógeno

Genetic analysis and relationship to pathogenicity in *Botrytis cinerea*

Summary

Botrytis cinerea is a plant-pathogenic fungus that produces the disease known as grey mould in a wide variety of agriculturally important hosts in many countries. Ten strains from different locations collected on different years have been isolated and characterized by several methods (morphological, biochemical, genetical and molecular). Results showed that clear morphological differences exist between strains, and showing a relationship between the presence of sclerotia and pathogenicity. The conidial size and the nuclear number were highly variable between different strains. Pulsed-field gel electrophoresis showed a unique karyotype for each strain, highly polymorphic between strains and with a number of bands ranging from 4 to 8.

An efficient transformation system has been achieved through the plasmid pAMPF21, containing the region *AMA1* of *Aspergillus nidulans*. Lastly, from a genomic library the *gdhA* gene has been cloned. This gene produces an rNAM of 1.7 Kb and complements the deficiency on glutamate dehydrogenase activity of *A. nidulans*.

Key words

Botrytis cinerea, Grey mould, Phytopathogen

Dirección para correspondencia:

Dr. Jesús Manuel Cantoral
Laboratorio de Microbiología y Genética, CASEM-
Universidad de Cádiz, Puerto Real,
11510 Cádiz, España
Tel.: +34 956 016156; Fax: +34 956 016180
E-mail: jesusmanuel.cantoral@uca.es

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que produce la enfermedad conocida como podredumbre gris en una amplia variedad de plantas [1]. A pesar de los intentos recientes de caracterizar este hongo desde el punto de vista genético no se han aclarado aspectos tan importantes como el número de cromosomas, su nivel de ploidía, o el número y tipo de genes implicados en patogenicidad [2-4]. La dificultad de este tipo de trabajos se debe a la naturaleza heterocariótica y posiblemente heteroploídica del hongo, que produce una alta variabilidad genética y que se manifiesta como diferencias fenotípicas entre cepas y dentro de una misma cepa (Figura 1). Estas diferencias afectan a características como el tipo de crecimiento del hongo, el volumen de los conidios o el número de micronúcleos. Además el estudio de estas características adquiere un interés especial porque existen datos que las relacionan con diferentes grados de patogenicidad [5,6]. La aplicación de técnicas moleculares como la electroforesis de campo pulsante al estudio de hongos ha permitido estudiar su organización genómica a través de los patrones de bandas obtenidos. Además, la disponibilidad de un sistema eficiente de transformación es una herramienta útil en el estudio de estructura y función de genes [2,7]. De los distintos sistemas descritos los más útiles en *Botrytis* son los que utilizan marcadores de resistencia a drogas debido a la dificultad de obtener mutantes por las características moleculares del hongo, citadas anteriormente. Por otra parte, se ha descrito que enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno participan en el proceso de invasión del patógeno [8,9].

El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar distintas cepas de *B. cinerea* mediante técnicas de Biología Molecular así como poner a punto un sistema de transformación y clonar un gen implicado en el metabolismo del nitrógeno para determinar la relación de estas características con niveles de patogenicidad del hongo.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos y vectores utilizados. Las cepas de *B. cinerea* utilizadas están recogidas en la tabla 1. Las cepas mutantes de *Aspergillus nidulans* A686 (*gdhA1*, *yA2*, *methH2*, *galA1*) y A699 (*gdhA1*, *biA1*), obtenidas del Fungal Genetics Stock Center, se utilizaron para estudios de complementación con el gen *gdhA* de *B. cinerea*.

El plásmido empleado en la transformación de *B. cinerea* fue el pAMPF21 (9,9 kb), el cual contiene el marcador de selección a fleomicina (*Sh ble*) bajo el promotor del gen *pcbC* de *Penicillium chrysogenum*, además de la región *AMA1* (5 kb), que confiere capacidad de replicación autónoma en numerosos hongos [10].

Morfología. Todas las cepas se cultivaron en medio Agar Malta (AM) (2% extracto de malta, 2% agar, p/v). Porciones de AM con micelio crecido y esporulado se transferían semanalmente a placas con medio fresco. Se estudió la morfología de todas las cepas según el carácter

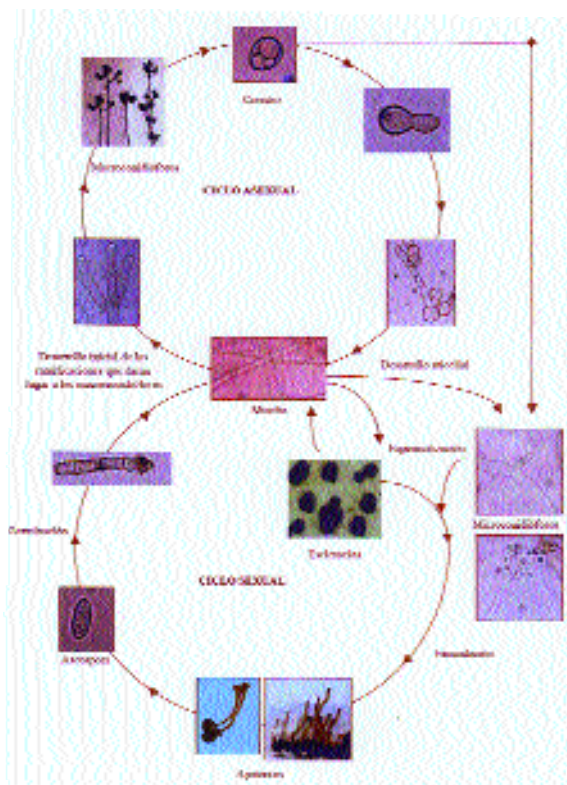


Figura 1. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea*.

predominante en cada una de ellas (micelial, conidial o esclerocial).

Tamaño de los conidios. Las preparaciones de conidios para su observación al microscopio electrónico siguió un protocolo estándar para este tipo de muestras con modificaciones específicas que se detallan en Fierro *et al.* [10]. El volumen de los conidios se calculó a través de la siguiente fórmula: $V = 4/3 \text{ pab}^2$, siendo, a = semieje mayor y b = semieje menor.

Determinación del número de núcleos. Esporas jóvenes, desarrolladas sobre placas con medio de cultivo apropiado se recogieron con Tween 20 al 0.01% y se llevaron a una concentración de $1-1,5 \times 10^6$ esporas/ml. Una vez fijadas en un portaobjetos las esporas se hidrolizaron y se tiñeron con la solución de fluorescencia (150 mg/ml acriflavina, 5 mg/ml $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 1 ml HCl 0.1 N) y se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia [11].

Tamaño de los cromosomas. Tanto la preparación de protoplastos como de ADN en los bloques de agarosa han sido previamente descritas [3].

Bioensayos de actividad patógena. Los bioensayos se realizan sobre hojas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi NC, *Vitis vinifera* var. Aledo y *Vitis vinifera* var. Palomino, siguiendo el método descrito por Vallejo *et al.* [3].

Tabla 1. Características de las cepas.

Cepa	Origen	Referencia
<i>Botrytis cinerea</i> UCA991	Aislada de <i>Vitis vinifera</i> (1991)	Este trabajo (Málaga, España)
<i>Botrytis cinerea</i> UCA992	Aislada de <i>V. vinifera</i> (1992)	Domecq (Jerez de la Frontera, España)
<i>Botrytis cinerea</i> UCA993	Aislada de <i>V. vinifera</i> (1993)	Osborne (Puerto de Sta. María, España)
<i>Botrytis cinerea</i> UCA994	Aislada de <i>V. vinifera</i> (1994)	Este trabajo (Alicante, España)
<i>Botrytis cinerea</i> UCA995	Aislada de <i>V. vinifera</i> (1993)	Este trabajo (León, España)
<i>Botrytis cinerea</i> UCA996	Aislada de <i>Cucumis sativus</i> (1996)	Este trabajo (Almería, España)
<i>Botrytis cinerea</i> 2100	Aislada de <i>Vicia faba</i> (1979)	Colección Española de Cultivos Tipo
<i>Botrytis cinerea</i> 2850	Aislada de <i>Crosus sativa</i> (1987)	Colección Española de Cultivos Tipo
<i>Botrytis cinerea</i> SAS56	Progenie ascospórica	Faretra y col., 1988
<i>Botrytis cinerea</i> SAS405	Progenie ascospórica	Faretra y col., 1988

Transformación de *B. cinerea*. La transformación de *B. cinerea* se realizó siguiendo el método descrito por Santos et al. [2] y la manipulación del ADN mediante los procedimientos descritos por Sambrook et al. [12]. El análisis molecular de los transformantes se llevó a cabo mediante hibridación no radiactiva con digoxigenina utilizando como sonda el fragmento *Hind* III-*Bam* HI de 5 kb del plásmido pAMPF21.

Construcción de una genoteca y clonación del gen *gdhA*. Se procedió a la construcción de la genoteca de *B. cinerea* en el vector de sustitución I-GEM-12 siguiendo el procedimiento descrito por Rebordinos et al. [4]. La sonda empleada para el rastreo de la genoteca fue el fragmento *Pvu* II de 760 pb que contiene parte de la secuencia del gen *gdhA* de *Aspergillus awamori* [13], marcada radiactivamente por desplazamiento de mella.

Complementación de mutantes de *A. nidulans*. La transformación de las cepas mutantes *gdh*⁻ de *Aspergillus nidulans* se realizó por el procedimiento descrito por Yelton et al. [14], con el plásmido pMSgdh1 de 7,8 kb que contiene el gen *gdhA* de *B. cinerea* en un fragmento de 3,2 kb.

RESULTADOS

Morfología. La morfología se estudió considerando el tipo de crecimiento más habitual en cada una de las cepas: micelial (M), conidial (C) o esclerocial (E) (Tabla 2). Para ello, se utilizaron las mismas condiciones de cultivo, intentando evitar variaciones debidas a cambios extracelulares.

Tamaño de los conidios. Este carácter resultó muy variable en la especie (Tabla 2). El volumen medio resultó de 69.83 mm³ y el tamaño varió entre 3,3 x 6,2 mm² y 5,0 x 9,8 mm². El análisis estadístico de los volúmenes medios de los conidios de las diferentes cepas a través de una distribución t-student, dió lugar al agrupamiento de algunas de ellas que presentaron tamaños muy similares y significativamente diferentes del resto (Tabla 3).

Número de núcleos. Nuestros resultados mostraron que el número de núcleos en *B. cinerea* es también un carácter muy variable, tanto en el interior de los conidios de una misma cepa como entre conidios de diferentes cepas. El número de núcleos varió entre 5,11 ± 0,14 en UCA993 y 11,03 ± 0,26 en SAS405 (Tabla 2). Todas las cepas resultaron estadísticamente diferentes de acuerdo al análisis de distribución t-student.

Tabla 2. Morfología predominante en diez cepas de *Botrytis cinerea*: M (micelial), C (conidial), E (esclerocial); *** alta producción, ** producción media, * baja producción, - no producción. Columna siguiente: valor medio de las dimensiones de 100 conidios de cada cepa. Última columna: número de núcleos determinado por microscopía de fluorescencia en 100 conidios de cada cepa

Cepa	Morfología			Volumen ± ES (mm ³)	Número medio de núcleos ± ES
	M	C	E		
UCA 991	***	**	*	92,04 ± 5,49	7,30 ± 0,13
UCA 992	*	***	-	30,67 ± 1,71	6,81 ± 0,26
UCA 993	**	*	-	72,12 ± 3,24	5,11 ± 0,14
UCA 994	***	**	*	57,06 ± 3,18	9,85 ± 0,29
UCA 995	***	*	*	30,26 ± 1,17	7,27 ± 0,15
UCA 996	***	**	*	98,18 ± 7,91	6,93 ± 0,17
2100	***	***	-	92,83 ± 3,43	7,06 ± 0,20
2850	*	***	-	72,49 ± 5,98	6,20 ± 0,14
SAS56	***	*	**	81,54 ± 5,06	8,30 ± 0,21
SAS405	***	*	**	68,06 ± 3,11	11,03 ± 0,26

Tabla 3. Distribución de grupos siguiendo el grado de significancia determinado a través del análisis de t-Student en relación a las dimensiones de los conidios de diez cepas de *Botrytis cinerea*.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
UCA991	UCA992	UCA993	UCA994	2850	SAS56
UCA996	UCA995	UCA996	2850	SAS56	SAS405
2100		2850		SAS405	UCA993
SAS56					

Tamaño de los cromosomas. El cariotipo electroforético mostró una alta variabilidad entre todas las cepas de *B. cinerea* (Tabla 4), como está descrito para otros hongos filamentosos [15].

La intensidad relativa de tinción bajo la luz ultravioleta de las bandas I, III y IV nos sugirió que estas bandas podían representar dobletes. Además, cuando las condiciones electroforéticas se modificaron ligeramente, aparecieron dos nuevas bandas en la cepa UCA992. Estos resultados indicaron que el número mínimo de cromosomas en *B. cinerea* es 14, número que se aproxima al anteriormente determinado en análisis citogenéticos [16] y contado, en algunas casos, mediante tinción de fluorescencia con DAPI [17].

Una banda de mayor movilidad que se detectó en todas las cepas fue previamente identificada como ADN mitocondrial [3].

Tabla 4. Tamaño de los cromosomas de diez cepas de *Botrytis cinerea* obtenido a través de electroforesis en campo pulsante.

Banda	Cepa									
	UCA991	UCA992	UCA993	UCA994	UCA995	UCA996	2100	2850	SAS56	SAS405
II	2,04	2,05	2,05	1,97	2,08	1,99	2,15	2,05	2,04	2,14
III ^a	-	2,35	2,57	2,27	2,35	2,26	2,35	2,35	2,35	2,48
IV ^a	2,82	2,81	-	2,74	2,83	2,83	2,87	2,81	2,83	2,83
V	2,96	-	2,92	-	2,91	-	-	-	-	2,91
VI	-	3,02	-	3,01	3,0	3,0	3,04	3,01	3,0	3,0
VII	3,16	-	-	-	-	3,08	-	-	-	-
VIII	3,34	3,31	-	3,30	-	-	3,30	-	-	-
IX	-	3,38	-	3,36	3,38	3,38	3,36	-	3,42	3,38
X	-	-	-	-	-	-	-	-	3,47	-
XI	3,51	3,53	-	3,51	3,52	3,52	3,51	3,54	3,52	3,52
XII	3,86	-	3,68	-	-	-	-	3,72	-	-
Total	21,69	22,36	11,22	22,04	20,07	20,06	22,49	17,48	22,92	22,22
Número	7	8	4	8	7	7	8	6	8	8

^a Posible doblete; - Ausencia de banda.

Tabla 5. Patogenicidad de diez cepas de *Botrytis cinerea*. El grado de agresividad disminuye de la parte superior a la inferior en cada columna.

<i>V. vinifera</i> var. Aledo no dañada	<i>V. vinifera</i> var. Palomino no dañada	<i>V. vinifera</i> var. Aledo dañada	<i>V. vinifera</i> var. Aledo dañada	<i>N. tabacum</i>
UCA995	UCA995	UCA996	UCA995	UCA995
UCA994	SAS405	UCA995	SAS405	UCA991
UCA991	SAS56	UCA994	SAS56	SAS56
SAS56	UCA991	UCA991	UCA991	UCA996
UCA996	2100	SAS405	2100	SAS405
SAS405	UCA996	SAS56	UCA996	UCA994
2100	UCA994	2100	2850	2100
2850	UCA993	UCA993	UCA994	UCA993
UCA993	UCA992	2850	UCA993	UCA992
UCA992	2850	UCA992	UCA992	2850

Bioensayos. En la tabla 5 se muestra el grado de patogenicidad de cada una de las cepas.

Transformación de *B. cinerea*. En primer lugar, se determinó la sensibilidad de la cepa *B. cinerea* UCA 992 al antibiótico fleomicina por transferencia de conidios a placas con medio AM conteniendo un rango de fleomicina, resultando ser 15 mg/ml la mínima concentración inhibitoria. Así mismo, se determinó la sensibilidad del micelio y la de los protoplastos siendo las concentraciones en este caso de 10 y 5 mg/ml, respectivamente.

La frecuencia de transformación obtenida resultó ser de 50-55 transformantes por mg de ADN no apareciendo colonias del hongo sin transformar a los niveles de fleomicina a los cuales era sensible. Todas las colonias obtenidas después de tres días de incubación a temperatura ambiente eran capaces de crecer normalmente y esporular en medio conteniendo antibiótico, no observándose colonias abortivas. Igualmente, dichas colonias se caracterizaron por un crecimiento lento, y, en algunos transformantes, se observaba abundante aparición de esclerocios.

Se seleccionaron cuatro transformantes para el estudio de estabilidad y análisis molecular, T1, T3, T8 y T9. La concentración máxima de fleomicina a la cual crecieron todos los transformantes fue de 30 mg/ml. Los conidios de los transformantes obtenidos que habían sido seleccionados en medio Czapeck-Dox suplementado con fleomicina, fueron recogidos con NaCl al 0,9% y plaqueados en medio agar malta sin antibiótico con objeto de estudiar la estabilidad mitótica de éstos. Se llevaron a cabo cuatro pases consecutivos en el mismo medio con y sin presión selectiva. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Media de colonias obtenidas en dos ensayos idénticos para el estudio de estabilidad de los transformantes después de 1, 2, 3 y 4 pases (1-4 p).

Pases	Sin fleomicina				30 mg/ml fleomicina				Frecuencia (%)			
	1p	2p	3p	4p	1p	2p	3p	4p	1p	2p	3p	4p
Control	907	806	986	786	0	0	0	0	0	0	0	0
T1	760	778	582	750	102	135	95	116	13,40	17,30	16,30	15,40
T3	902	885	800	722	155	163	186	125	17,18	18,41	23,25	17,30
T8	998	702	635	511	206	183	165	109	20,60	26,06	25,90	21,30
T9	315	422	437	644	121	88	86	187	38,40	20,80	19,67	29,03

El ADN extraído fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y éste se transfirió a un filtro de nilón para ser hibridado posteriormente. Se analizó el ADN total digerido con la endonucleasa de restricción *Bam* H1, la cual presenta un único punto de corte en el plásmido pAMPF21, obteniéndose monómeros del plásmido linearizado de tamaño correspondiente a 9,9 kb. El plásmido pAMPF21 se utilizó como control para estudios comparativos. Tras el análisis de los resultados obtenidos

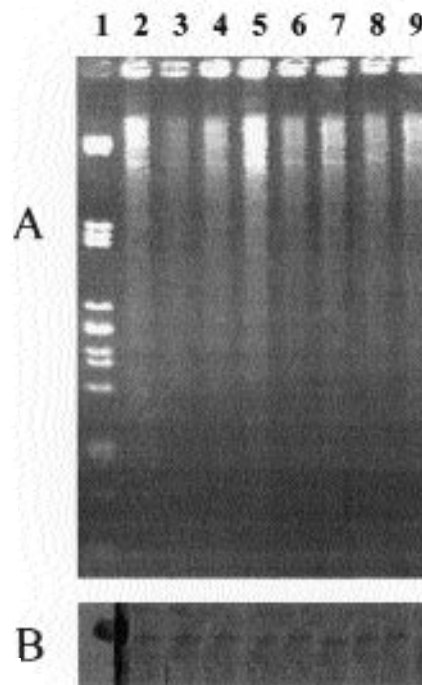


Figura 2. A. Electroforesis en gel de agarosa de los ADN totales, digeridos con *Bam* H1, extraídos de transformantes de *B. cinerea* portadores del plásmido pAMPF21. Calle 1: DNA de lambda digerido con *Pst* I. Las demás calles contienen DNA del primer y cuarto pase respectivamente de los transformantes siguientes: 2 y 3 de T1; 4 y 5: T3; 6 y 7: T8; 8 y 9: T9. B. Hibridación no radiactiva del gel durante 24 horas. Calle 1: pAMPF21 digerido con *Bam* H1, mitad del carril expuesto 10 minutos/ mitad 24 horas. Calles 2-9 descritas anteriormente.

no se detectó señal alguna a nivel de ADN cromosómico apareciendo una única banda de hibridación en todos los transformantes después del primer y cuarto pase de un tamaño de 9,9 kb (Figura 2). No existe, por tanto, ningún tipo de reorganización en los plásmidos presentes en los transformantes, confirmando que la región *AMAI* confiere capacidad de replicación autónoma en *B. cinerea*. El número de copias presente en la célula es muy bajo lo que explicaría el bajo nivel de resistencia a fleomicina de los transformantes.

Clonación del gen *gdhA* de *B. cinerea*. El rastreo de la genoteca se inició plaqueando 30.000 unidades formadoras de placas. La infección se realizó por duplicado y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, los cuales fueron hibridados con una sonda heteróloga de *A. awamori* que contenía parte de la secuencia codificante del gen *gdhA*. Como resultado se obtuvieron ocho fagos positivos y cinco de ellos fueron analizados para precisar la localización del gen buscado.

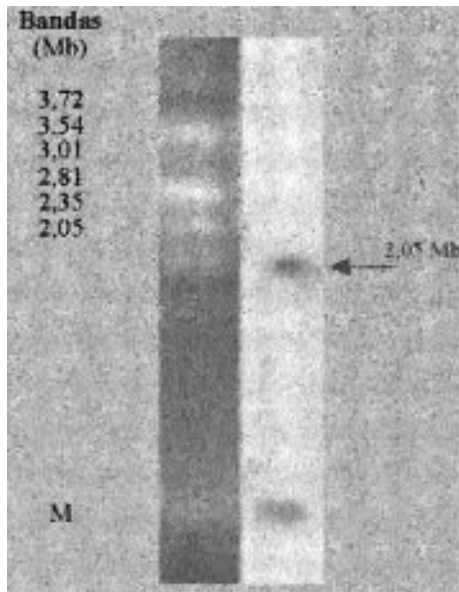


Figura 3. Localización cromosómica del gen *gdhA* en la cepa 2850 de *Botrytis cinerea*.

Complementación de mutantes. En la Figura 4, se observa el crecimiento diferencial de los transformantes frente a las dos cepas mutantes, debido a la expresión del gen *gdhA* de *B. cinerea* en *A. nidulans*.

DISCUSIÓN

Las cepas de *B. cinerea* muestran una elevada variabilidad fenotípica y genotípica. Algunas de estas diferencias, tales como el grado de patogenicidad, pueden tener una gran importancia económica. En el presente trabajo, demostramos que algunas características del hongo están directamente relacionadas con su grado de patogenicidad. Concretamente, las cepas que siempre mostraban una morfología de tipo C (UCA992 y 2850), resultaron ser las menos agresivas, mientras que las cepas que producían esclerocios eran las que formaban manchas necróticas de mayor tamaño sobre las hojas.

Por otro lado, las cepas más agresivas presentaban conidios de mayor tamaño que las restantes (UCA996) y la menos infectiva contenía los conidios de menor tamaño (UCA992).

En relación al número de núcleos en el interior de los conidios de las cepas objeto de estudio, pudimos comprobar que tres de ellas (UCA993, 2850 y UCA992), que presentaban el menor número de núcleos, eran también las cepas con menor capacidad infectiva sobre las hojas. Además, las cepas más infectivas (UCA991, UCA994, UCA995 SAS56 y SAS405) resultaron ser las que presentaban mayor número de núcleos en el interior de sus conidios. Por tanto, podemos afirmar que éste es un carácter directamente relacionado con la capacidad infectiva del hongo.

Nuestros datos indican que la relación entre el tamaño de los conidios y el número de núcleos en su interior, no es necesariamente directa entre cepas. Sin embargo, para una misma cepa, los conidios de mayor tamaño siempre presentaban el mayor número de núcleos.

Del mismo modo, realizamos un estudio comparativo entre número de núcleos y cariotipo electroforético, encontrando algunas relaciones muy interesantes. Dos cepas con un bajo número de núcleos (UCA993 y 2850) también presentaron el menor número de bandas en su

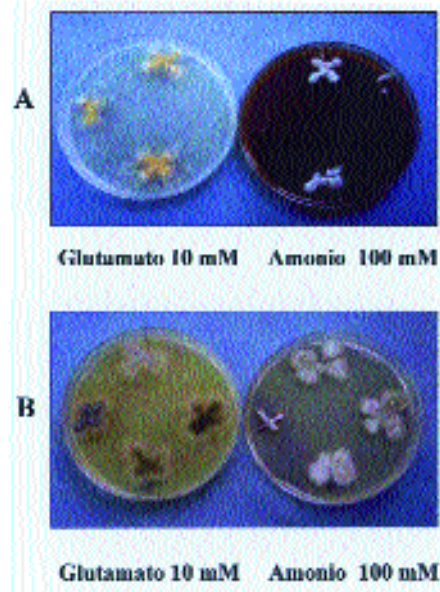


Figura 4. Complementación de mutantes de *Aspergillus nidulans*. A: *A. nidulans* 686. B: *A. nidulans* 699.

cariotipo (4 y 6, respectivamente). Al mismo tiempo, éstas eran cepas con muy baja capacidad infectiva. Una de las bandas ausentes en estas cepas fue la banda VII, la cual también faltaba en la cepa UCA992, la menos infectiva de todas. Por tanto, podría suponerse que en esta banda se encuentran algunos genes relacionados con la patogenicidad del hongo. De hecho, esta interesante relación sólo se rompió para la cepa UCA995, altamente infectiva, que presentaba la banda VII en su cariotipo. Puede ser, por tanto, que algunos genes cambien su localización cromosómica debido a fenómenos de aneuploidía o por la presencia de transposones en el genoma; ambos fenómenos han sido previamente descritos para esta especie [18,19].

En conclusión, *B. cinerea* muestra un alto grado de diversidad, que la convierte en una especie en la cual es difícil establecer relaciones entre patogenicidad y otras características, a menos que un alto número de cepas sean estudiadas. También concluimos que la mayoría de las características citológicas, morfológicas, moleculares o patológicas son independientes de a) el origen geográfico de las cepas, b) huésped del que fueron aisladas y c) año en el que fueron recogidas. La falta de datos acerca de genes implicados en la patogenicidad del hongo sugiere que el control de la fitopatogenicidad en esta especie es extremadamente complejo. Muchos genes podrían estar implicados en la agresividad de cada cepa. Además, muchos otros factores externos podrían provocar algunas variaciones en el fenotipo y enmascarar la variabilidad genética. Para determinar el control de estas características, en nuestro laboratorio estamos llevando a cabo cruzamientos entre cepas con diferentes características fenotípicas y genotípicas y clonando genes supuestamente relacionados con patogenicidad que nos permitan conocer el control de este mecanismo a nivel molecular.

Por otra parte la obtención de un sistema de transformación eficaz es interesante en este tipo de estudios. Santos *et al.* [2] desarrollaron un sistema de transformación autónomo en el que la estabilidad del plásmido se conseguía mediante reordenaciones a través de recombinación *in vivo* por mecanismos hasta el momento desconocidos. En este trabajo se describe un sistema de transformación autónomo debida a la presencia en el plásmido de la región *AMA1*. Esta región aumenta la frecuen-

cia de transformación descrita hasta el momento para *B. cinerea* [7]. Este plásmido de replicación autónoma presenta un gran interés en este hongo ya que ofrece la oportunidad de crear nuevos vectores los cuales pueden ser utilizados como herramienta para analizar la expresión de numerosos genes tanto en *Botrytis* como en otros hongos.

En relación a la patogénesis de *B. cinerea*, limitaciones nutricionales, tales como privación de nitrógeno, parecen estar ligados a este proceso y a otros aspectos morfológicos del hongo. Así, la pérdida de factores reguladores que intervienen en la asimilación de amonio reduce significativamente la virulencia en determinados hongos tanto de plantas como de animales [8,9]. En *B. cinerea* no se ha realizado ningún estudio hasta la actualidad del metabolismo del nitrógeno y carbono, y por tanto, es indispensable conocer las distintas relaciones existentes entre ambos metabolismos y las múltiples posi-

bilidades de su conexión con la patogénesis. Por ello, la clonación del gen *gdhA*, que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP, implicada en la síntesis del aminoácido esencial glutamato, y por tanto, responsable de la incorporación directa del amonio, es un primer paso en este sentido. El estudio de la regulación de este gen, la obtención de mutantes y sobre todo el análisis de la modulación del promotor del gen *gdhA* en función de la presencia de diversos sustratos, puede conducirnos a establecer una relación directa entre el metabolismo del nitrógeno y la patogénesis fúngica, y por tanto, a resolver parte de la problemática ocasionada por *B. cinerea*.

Este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas recibidas de la Junta de Andalucía (PAI grupo CV219), y la DGICYT (proyecto PB95-1235-C02-02). Agradecemos a los Drs. Juan Francisco Martín y Santiago Gutiérrez las facilidades ofrecidas a Dña. Milagrosa Santos para realizar algunos de los experimentos en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de León.

Bibliografía

- Verhoeff K, Maetrakis NE, Williamson B. Recent advances in *Botrytis* research. PUDOC Scientific, Wageningen, 1992.
- Santos M, Vallejo I, Rebordinos L, Gutiérrez S, Collado IG, Cantoral JM. An autonomously replicating plasmid transforms *Botrytis cinerea* to phleomycin resistance. FEMS Microbiol Lett 1996; 137: 153-158.
- Vallejo I, Santos M, Cantoral JM, Collado IG, Rebordinos L. Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea* strains. Hereditas 1996; 124: 31-38.
- Rebordinos L, Santos M, Vallejo I, Collado IG, Cantoral JM. Molecular characterization of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. En: Research Singpost SG Pandalai (Eds). Recent Research Developments in Phytochemistry. Trivadrum (India), 1997: 293-307.
- Phillips DJ, Margosan DA, MackKey BE. Size, nuclear number and aggressiveness of *Botrytis cinerea* spores produced on media of varied glucose concentrations. Phytopathology 1987; 77: 1606-1608.
- Pollastro S, Faretra F, Di Canio V, De Guido A. Characterization and genetic analysis of field isolates of *Botryotinia fuckelliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to dichlofluanid. Eur J Plant Pathol 1996; 102: 607-613.
- Hamada W, Reignault PH, Bompeix G, Boccara M. Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, *hph*. Curr Genet 1994; 26: 251-255.
- Froelinger E, Carpenter B. NUT-1, a major nitrogen regulator in *Magnaporthe grisea*, is dispensable for pathogenicity. Mol Gen Genet 1996; 251: 647-656.
- De Wit PJ. *C9* and *Avr9*, two major players in the gene-for-gene game. Trends Microbiol 1995; 3: 251-252.
- Fierro F, Kosalková K, Gutiérrez S, Martín JF. Autonomously replicating plasmids carrying the *AMA1* region in *Penicillium chrysogenum*. Curr Genet 1996; 29: 482-489.
- Vallejo Fernández de la Reguera I. Caracterización de diferentes cepas de *Botrytis cinerea* por técnicas Microbiológicas, Genéticas y de Biología Molecular. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz, España, 1997.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Cardoza RE, Moralejo FJ, Gutiérrez S, Casqueiro J, Fierro F, Martín JF. Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. Curr Genet 1998; 34: 50-59.
- Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1470-1474.
- Zolan ME. Chromosome-length polymorphism in fungi. Microbiol Rev 1995; 1: 686-698.
- Shirane N, Masuko M, Hayashi Y. Nuclear behaviour and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 1988; 78:1627-1630.
- Taga M, Murata M. Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence *in situ* hybridization. Chromosoma 1994; 103: 408-413.
- 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.
- Dirole A, Marches F, Fortini D, Brygoo Y. Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Appl Environ Microbiol 1995; 61:103-108.