

FITOPATOLOGÍA

Publicación oficial de la Sociedad Española de Fitopatología



Año 2023

Número 9



HONGOS Y OOMICETOS FITOPATÓGENOS

Entrevistas a: Rafael M. Jiménez
Díaz y Soledad Verdejo-Lucas

Enfermedades de frutales
con fitoplasmas

In memoriam: Javier Romero
Cano, María Arias Delgado,
José Ramón Díaz-Ruiz Alba y
Marisol Luis Arteaga

Nuevas herramientas biotecnológicas para el control de enfermedades: *Botrytis cinerea* como modelo

DOLORES FERNÁNDEZ ORTUÑO es profesora e investigadora del Dpto. de Microbiología de la Universidad de Málaga (UMA) y del IHSM-UMA-CSIC “La Mayora”. Doctora por la UMA, realizó dos estancias posdoctorales, en Rothamsted Research (Reino Unido) y en la Universidad de Clemson (EE. UU.). En la UMA, codirige el grupo de investigación “Diseño racional de fitosanitarios”, cuyos principales objetivos son aportar soluciones para el control del oídio de las cucurbitáceas y la botritis, mediante la identificación de nuevas dianas, proteínas esenciales para el desarrollo o la patogenicidad de estos hongos, y el diseño de nuevas moléculas con acción fungicida como antifúngicos y polinucleótidos. Todo ello, para incrementar el número de herramientas disponibles para el control integrado de estas enfermedades,

DOLORES FERNÁNDEZ-ORTUÑO^{1,2}, ALMUDENA ESCOBAR-NIÑO³, FRANCISCO JAVIER FERNÁNDEZ-ACERO³, JONATAN NIÑO-SÁNCHEZ^{4,5}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga (UMA)

²Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, Universidad de Málaga, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Málaga

³Laboratorio de Microbiología y Proteómica. Instituto de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO), Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz

⁴Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales, ETSIIAA

⁵Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR), ETSIIAA Universidad de Valladolid, Palencia

La producción agrícola sigue siendo atacada por una gran cantidad de plagas, enfermedades y malas hierbas que pueden reducir el rendimiento de los cultivos entre el 10 % y el 40 %, causando pérdidas anuales de 279 000 millones de euros a nivel mundial. Entre las enfermedades que atacan a los cultivos, los hongos son el principal grupo de patógenos por el número de especies y su importancia económica. Entre ellos destaca *Botrytis cinerea*, hongo causante de la enfermedad de la botritis, también conocida como moho gris o podredumbre gris, en más de 1000 especies de plantas, incluidas verduras y hortalizas, frutales y plantas ornamentales, causando pérdidas económicas anuales de más de 9000 millones de euros en todo el mundo. Debido a su amplia gama de hospedadores y su impacto económico, *B. cinerea* es considerado como el segundo hongo patógeno de plantas más importante desde el punto de vista agronómico^[1].

Las importantes pérdidas económicas que causa *B. cinerea*, tanto en cosecha como en postcosecha, hacen indispensable el desarrollo de distintas prácticas y estrategias

que eviten o, al menos, reduzcan los daños ocasionados por este patógeno. Sin embargo, este hongo es difícil de controlar debido a su amplia variedad de mecanismos de ataque, a sus múltiples hospedadores, y al hecho de sobrevivir, durante largos periodos, en forma de esclerocios, lo que hace complejo el desarrollo de estrategias para su control. Hoy en día, el método de control de la botritis más utilizado es el control químico, mediante la aplicación de fungicidas durante el desarrollo de los cultivos. Así, por ejemplo, en 2018, el 24 % de los tratamientos fungicidas llevados a cabo en cultivos hortícolas fueron antibotritis. No obstante, existen otras estrategias como son el control biológico, la mejora genética y las prácticas culturales. Actualmente, se intenta realizar una gestión integrada que combine todas las estrategias anteriormente mencionadas intentando posponer al máximo el uso de fungicidas.

Aunque el control químico es el método más usado para combatir la infección por *B. cinerea*, este hongo es capaz de desarrollar resistencia a estas sustancias químicas rápidamente, por lo que ha sido catalogado

contribuyendo así al desarrollo de una agricultura más sostenible y productiva.

ALMUDENA ESCOBAR NIÑO es licenciada en Bioquímica y doctora en Genética y Microbiología por la Universidad de Sevilla (US) sobre producción de biodiésel por bacterias. Desde 2020 es profesora ayudante de Microbiología en la Universidad de Cádiz (UCA). Está trabajando en la aplicación de enfoques proteómicos innovadores a organismos no modelo, como hongos fitopatógenos y microalgas, y su aplicación para el desarrollo de nuevos productos antifúngicos y biomédicos.

FRANCISCO JAVIER FERNÁNDEZ-ACERO NIÑO es licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Córdoba (UCO) y doctor en Microbiología por la Universidad de Cádiz; formación postdoctoral en el Instituto Max Planck for Plant Beading Research (Colonia, Alemania) y en el Plant Sciences Department en

por el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) como un patógeno de alto riesgo de desarrollo de resistencia a fungicidas. La presencia de aislados de *B. cinerea* multirresistentes es un hecho bien descrito en numerosos países del mundo, incluyendo el nuestro^[2, 3]. El desarrollo de la resistencia a fungicidas es un proceso evolutivo. El fungicida está ejerciendo presión de selección en la población del patógeno mientras está atacando a la población inicial (o silvestre) pero no a la población alterada (o mutante). El uso excesivo o mal uso de un modo de acción fungicida puede acelerar significativamente estos cambios en la población. Aunque se han descrito distintos mecanismos involucrados en la resistencia a fungicidas (detoxificación del fungicida, sobreexpresión de la diana o expulsión desde el sitio de acción), el más comúnmente observado en los aislados de *B. cinerea* es la alteración del sitio de acción del fungicida, a través de un cambio en la secuencia genética codificante de la enzima o proteína diana del compuesto^[2].

A pesar de que el uso de fungicidas es el método de control más eficaz, el futuro del sector agrícola pasa por la construcción de una estrategia en la que la reducción del uso de estos compuestos en el control de enfermedades se ha convertido en un objetivo a cumplir en muchos países, con un especial énfasis en los últimos años. Para ello, la Comisión Europea, en el marco de las estrategias propuestas dentro del Pacto Verde Europeo, ha presentado la estrategia “De la granja a la mesa”, en favor de un sistema alimentario equitativo, saludable y respetuoso con el medio ambiente en el que se pretende reducir, entre otros, el uso de pesticidas en un 50 % para el año 2030. Las principales razones son las de conseguir una mayor calidad de los productos, promover un sistema de producción menos dañino con el medio ambiente y que no implique riesgos para la salud, además de para reducir los costes de producción. La reducción de los fungicidas pasa por un uso

más racional que maximice la efectividad de las aplicaciones y limite su número al mínimo. Sin embargo, nuevas plagas y enfermedades se desarrollarán y, de no contar con suficientes innovaciones y un marco regulatorio adecuado, podrán aumentar las resistencias presentes en los cultivos; disminuyendo claramente su producción. Por ello, actualmente existe una necesidad urgente de nuevas herramientas de protección de cultivos que puedan ser compatibles con un entorno agrícola cambiante y cada vez más sostenible. En esta línea, el silenciamiento génico por ARN interferente, el desarrollo de péptidos bioactivos y el uso de aptámeros, tienen mucho que aportar y pueden ser una oportunidad para la innovación en este sector.

Control mediante silenciamiento génico inducido por pulverización. Avances en la administración de moléculas de ARN mediante nanoencapsulación

El silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS, del inglés *Spray-Induced Gene Silencing*) es una técnica que se basa en la aplicación externa de ARN de doble cadena (ARNdc) sobre un organismo con el fin de desencadenar una regulación específica en la expresión de uno o varios genes mediante el mecanismo biológico del ARN de interferencia. Este fenómeno fue descrito por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, y más tarde ha sido demostrado en animales, mamíferos, plantas y hongos. En cuanto a la protección de cultivos, el ARNdc se diseña específicamente para tener una secuencia complementaria a genes del patógeno que están implicados en el proceso de infección; así, el ARNdc, una vez dentro de las células del patógeno, reconocería los ARN mensajeros (ARNm) correspondientes a dichos genes y “silenciaría” su expresión mediante el mecanismo de ARN de interferencia, que está conservado en la mayoría de organismos eucariotas y que se

UCDavis (Davis, California, EE. UU). Desde 2012 es profesor titular de Microbiología en la Universidad de Cádiz. Durante este período, su campo de especialización se ha centrado en el desarrollo de enfoques proteómicos innovadores para organismos no modelo, como hongos fitopatógenos, levaduras enológicas y microalgas. Su interés se ha centrado en la aplicación de enfoques proteómicos para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas, como fungicidas respetuosos con el medio ambiente o nuevos péptidos antitumorales.

JONATAN NIÑO SÁNCHEZ es licenciado en Biología Fundamental y Biotecnología, licenciado en Bioquímica y doctor en Agrobiotecnología en la Universidad de Salamanca (USAL). Realizó estancias postdoctorales en las Universidades de California-Davis y California-Riverside (EE. UU) y en la Universidad de Valladolid (Uva),

encarga de degradar transcritos específicos con el fin de evitar su traducción.

La eficiencia y la seguridad de esta técnica se basa en la homología entre las secuencias del gen o genes diana que se pretenden silenciar y la molécula de ARNdc aplicada, lo que minimiza el riesgo de efectos no deseados en la planta y en su microbioma. Aunque se produjesen efectos no deseados, estos serían transitorios, pudiéndose reemplazar rápidamente la molécula de ARNdc con un coste muy reducido. Además, la estrategia SIGS no requiere una completa homología en toda la secuencia del ARNm para llevar a cabo su efecto, lo que evita que se establezcan mutaciones puntuales que generen estirpes resistentes, que es un efecto adverso en fungicidas y plaguicidas agroquímicos como se ha comentado anteriormente.

B. cinerea se ha establecido como una especie modelo para el estudio de la técnica SIGS por la comunidad científica debido a su gran impacto como patógeno de especies vegetales y productos de postcosecha, y por tratarse de una especie muy estudiada y de relativo fácil manejo en el laboratorio. De esta manera, en 2016, junto con una publicación que demostraba que la técnica SIGS es efectiva en el control de la fusariosis de la espiga del trigo, se demostró de igual manera que lo es en el control de la podredumbre gris producida por *B. cinerea* en diversos frutos (tomate, fresa, uva) y cultivos (lechuga, cebolla, rosa)^[4]. En este primer trabajo, los genes diana de *B. cinerea* seleccionados para el diseño de las moléculas de ARNdc fueron los genes *dicer-like* (*BcDCL1* y *BcDCL2*), esenciales en el patógeno^[4]. Posteriores estudios han dilucidado nuevas dianas génicas útiles en el control de *B. cinerea* mediante SIGS. Entre las más reseñables se encuentran los genes responsables de la síntesis del ergosterol, *BcERG11*, *BcERG1*, *BcERG13*, o los genes *BcTIM44*, *BcTRR1*, *BcPRD11*, *BcNOB1*, también útiles en el control

mediante SIGS de *Sclerotinia sclerotiorum*, así como diversos genes esenciales previamente descritos (*BcSAS1*, *Bcchs1*, *BcEF2*, *BcBMP3*).

En 2018, un estudio detalló por primera vez cómo en la comunicación planta-patógeno *Arabidopsis thaliana* es capaz de enviar ARN a través de vesículas extracelulares al patógeno *B. cinerea* durante el proceso de infección como mecanismo de defensa. Este fenómeno natural de comunicación es conocido como ARN de interferencia entre reinos, ya que algunos de estos ARN de doble cadena desencadenan silenciamiento génico con el fin de inhibir la virulencia del patógeno. Mediante la secuenciación de las moléculas de ARN contenidas en las vesículas de *A. thaliana* en la infección por *B. cinerea* y posterior identificación de ARNm de *B. cinerea* potencialmente regulados, se determinaron 33 potenciales dianas génicas. Tres de estos genes (*BcVPS51*, *BcDCTN1* y *BcSacI*), involucrados en el tráfico de vesículas del patógeno, fueron seleccionados para diseñar una molécula de ARNdc que se ha demostrado eficaz en el control del patógeno^[5]. Por lo tanto, el estudio de los ARN implicados en la interacción planta-patógeno es de gran utilidad para dilucidar nuevas dianas génicas eficaces en la tecnología SIGS.

Sin embargo, existen diversos factores que limitan la tecnología SIGS en un uso generalizado en la agricultura a fecha de hoy. Algunas de estas limitaciones están ligadas a la naturaleza del patógeno: i) debe poseer una maquinaria completa de silenciamiento génico, requisito que cumple *B. cinerea* puesto que posee proteínas funcionales Dicer-like, un completo complejo proteico RISC y polimerasas dependientes de ARN para la amplificación de la señal de silenciamiento; y ii) debe ser capaz de internalizar el ARNdc aplicado de manera exógena, lo que, en el caso de *B. cinerea*, se ha demostrado que es capaz de realizar de manera muy eficiente.

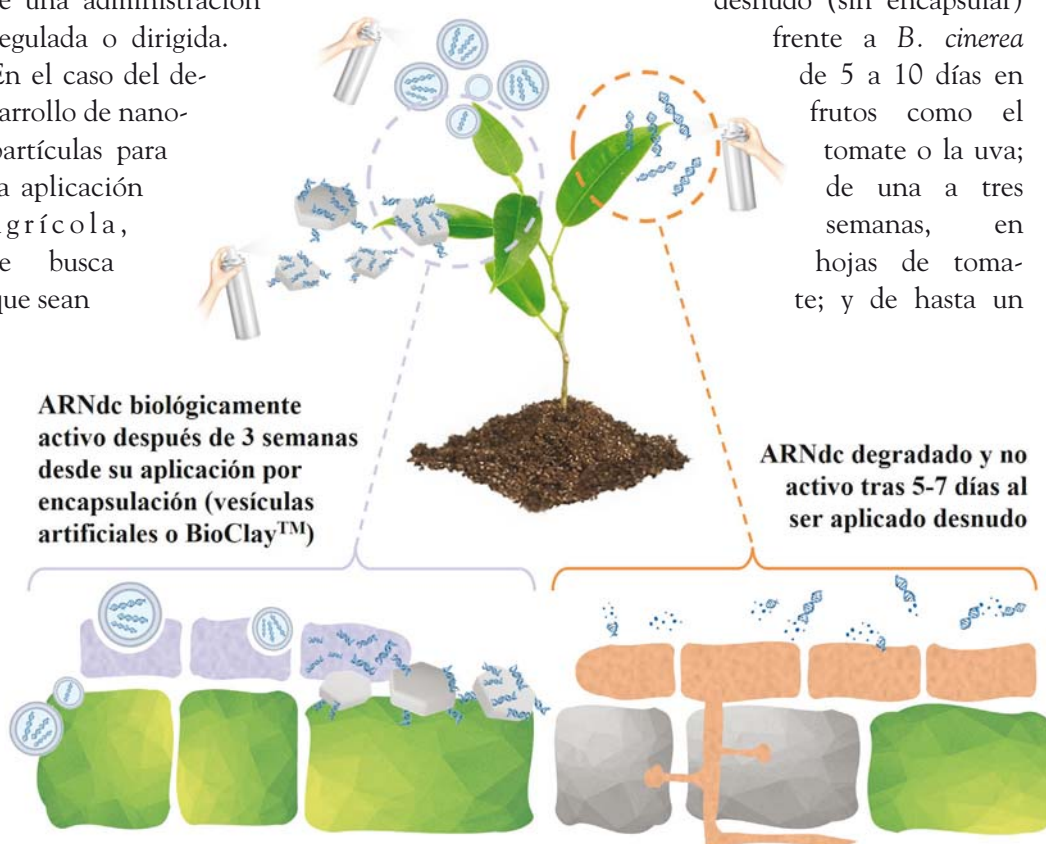
beneficiario Horizon Europe MSCA. Desde 2023 es profesor ayudante doctor en el área de Sanidad Vegetal en la UVa y pertenece al Instituto Universitario de Investigación Forestal Sostenible (iuFOR). Su línea de investigación es el desarrollo de nuevos biofungicidas basados en ARN y su aplicación mediante el uso de nanotecnología en sistemas agrícolas y forestales.

La comunidad científica está desarrollando diferentes métodos de encapsulación en nanopartículas que proporcionen protección al ARNdc y una entrega eficaz al patógeno

Por otra parte, también hay limitaciones propias de la técnica. La primera es el coste de producción de ARNdc, que, afortunadamente, ha disminuido drásticamente desde 12 500 \$ por gramo de ARNdc en 2008, a 60 \$ en 2018, y hasta 0,50-4,00 \$ hoy en día. La segunda y más crucial es la inestabilidad que presentan las moléculas de ARNdc en el ambiente, debido a que son susceptibles a la radiación, a la lluvia y, en especial, a las nucleasas existentes en las superficies de tejidos vegetales. Para superar este hándicap, la comunidad científica está desarrollando diferentes métodos de encapsulación en nanopartículas que proporcionen protección al ARNdc y una entrega eficaz al patógeno. En este sentido, se están generando multitud de nanopartículas diferentes no sólo para la aplicación de ARNdc, sino para cualquier tipo de sustancia activa que sea fácilmente degradable, o que necesite una administración regulada o dirigida. En el caso del desarrollo de nanopartículas para la aplicación agrícola, se busca que sean

de fácil absorción y que promuevan una acción sistémica mediante su movimiento a través de la planta. En general, estas nanopartículas se dividen en tres grandes grupos: orgánicas (basadas en vesículas artificiales, en liposomas, en polímeros, en proteínas transportadoras); inorgánicas (nanopartículas sintéticas de arcilla aniónica, metal y sílice); y aquellas basadas en carbono (*carbon dots*, nanotubos, *nanohorns*, fullerenos, *nanobeads*, nanofibras, nanodiamantes, etc.). El uso de la nanotecnología en SIGS está testándose de manera muy positiva en el control *B. cinerea*. En primer lugar, utilizando una arcilla aniónica, en particular hidróxidos dobles laminares (LDH)^[6] que, junto a la molécula de ARNdc específica, ha dado lugar al producto BioClay™. La administración tópica de BioClay™ extiende la protección que ofrece la aplicación de ARNdc desnudo (sin encapsular)

frente a *B. cinerea* de 5 a 10 días en frutos como el tomate o la uva; de una a tres semanas, en hojas de tomate; y de hasta un



La encapsulación de las moléculas de ARNdc mediante nanotecnología confiere una protección efectiva de su integridad que consigue extender la durabilidad antifúngica en la tecnología SIGS (Figura elaborada por Jonatan Niño Sánchez).

Para dilucidar los mecanismos implicados en el proceso infectivo, diversos estudios han utilizado la proteómica como herramienta fundamental de análisis

Los procesos de comunicación planta-patógeno se realizan a través de receptores de membrana y cascadas de transducción de señales, esenciales para desencadenar rutas específicas y el éxito final de la infección

mes, en plantas adultas de garbanzo. Seguidamente, se ha testado el uso de vesículas artificiales como transportadores, una aproximación que imita el fenómeno natural de comunicación entre la planta y el patógeno fúngico por medio de vesículas extracelulares. Las vesículas artificiales son compuestos no tóxicos constituidos principalmente por moléculas de fosfolípidos y esteroides, y, al igual que el LDH, protegen al ARNdc de su degradación por nucleasas, además de ofrecer una mayor estabilidad en la superficie de los tejidos vegetales debido a fuerzas de adhesión^[5]. La mejora de la estabilidad mediante la encapsulación de ARNdc en vesículas conduce a una protección prolongada mediante SIGS, que se refleja en un aumento de la protección en el cultivo del tomate y de la vida de hasta tres semanas^[5] [véase figura].

En conclusión, la aplicación externa de moléculas de ARNdc mediante la tecnología SIGS es una alternativa prometedora al uso de fungicidas químicos, especialmente desarrollada en el control de *B. cinerea*. A falta de un mayor desarrollo respecto a su aplicación que permita un uso global, los productos basados en ARN están entrando en el mercado, complementando a los productos de control tradicionales.

La proteómica en el control de *B. cinerea*

Una de las principales características de *B. cinerea* es su alta capacidad para desarrollar distintas herramientas enfocadas a completar con éxito su ciclo de infección y propagación. Estas herramientas tienen orígenes variados y son conocidas como factores de patogenicidad o virulencia. La mayoría de estos factores tienen naturaleza proteica o son sintetizados por proteínas. Al conjunto de proteínas sintetizadas por un organismo, tejido, célula, cepa, etc. en un momento y condición determinadas se le denomina proteoma, y el área encargada de su estudio es la proteómica. Por tanto, la proteómica es un conjunto de técnicas

que nos permite el análisis y la identificación de todas las proteínas sintetizadas por un organismo en una determinada condición experimental.

De entre todas las -ómicas, la proteómica se ha constituido como la herramienta ideal para el análisis de los factores de patogenicidad/virulencia sintetizados por *B. cinerea*, debido a diversos motivos. A diferencia del genoma, el proteoma es un sistema altamente dinámico que varía en función de las condiciones ambientales, fisiológicas y patológicas del organismo, como resultado de mecanismos de regulación a nivel molecular. Estos mecanismos incluyen la expresión diferencial, modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, capaces de redirigir la función biológica de cualquier péptido sintetizado. A su vez, está descrito en otros sistemas biológicos que la correlación transcrito-proteína no es buena, concluyendo que el proteoma es el producto final y, por tanto, es el nivel relevante de análisis. Por esta razón, los estudios de proteómica representan uno de los enfoques más apropiados para analizar procesos biológicos y comprender la compleja red de interacciones involucradas en las funciones celulares, como sería el proceso infectivo de *B. cinerea*.

Para dilucidar los mecanismos implicados en el proceso infectivo, diversos estudios han utilizado la proteómica como herramienta fundamental de análisis. Esta técnica ha evolucionado desde la proteómica de primera generación que, basada en el uso de geles bidimensionales como técnica de separación de proteínas, utilizaba los sistemas de ionización por láser y detectores de tiempo de vuelo (MALDI TOF/TOF) como técnica de identificación de proteínas. Estas aproximaciones adolecían de problemas de reproducibilidad que se mitigaban aumentando el número de réplicas, eran tremendamente arduos y difíciles, así como poco precisos. Aun así, el primer trabajo sobre proteómica en

En 2021 se describieron las proteínas de la superficie del hongo, lo que representó el primer surfactoma de la especie

Aproximadamente la mitad de las proteínas codificadas en el genoma de *B. cinerea* aún no han sido encontradas, detectadas o cuantificadas mediante proteómica en ninguna de las aproximaciones realizadas

B. cinerea permitió desentrañar sus primeros factores de patogenidad, establecer los mejores protocolos y determinar la variabilidad fenotípica de este hongo^[7]. En los últimos años, la mejora de las técnicas de análisis de proteínas junto con la publicación y constante actualización del genoma de *B. cinerea* han mejorado la calidad y precisión de estas aproximaciones. Los progresos han permitido un análisis más preciso de procesos biológicos esenciales en la infección, como serían los de comunicación planta-patógeno. Estos procesos se realizan a través de receptores de membrana y cascadas de transducción de señales, esenciales para desencadenar rutas específicas y el éxito final de la infección. En este contexto, en 2016 se realizó la primera descripción del membranoma de *B. cinerea*, siendo también una primera aproximación para el estudio de las cascadas de señalización del fitopatógeno. Avanzando en este sentido, en 2021 se describieron las proteínas de la superficie del hongo, lo que representó el primer surfactoma de la especie^[8]. En ambos estudios se han realizado enfoques proteómicos para estudiar los cambios en las cascadas de transducción de señales de *B. cinerea* en respuesta a diferentes fuentes de carbono y elicitores de origen vegetal, glucosa (GLU) y paredes celulares de tomate desproteinizadas (TCW). Utilizando el mismo enfoque experimental se ha analizado el secretoma, el fosfoproteoma, el fosfomembranoma y el proteoma de las vesículas extracelulares^[9, 10]. Además, se estudiaron los cambios fenotípicos en la biología de los hongos, específicamente la producción de toxinas. El análisis mediante ontología génica (*Gene Ontology*, GO) permite unificar y agrupar (según su proceso biológico, función molecular o componente celular) cada proteína identificada usando un vocabulario estructurado y común, especialmente útil en la anotación de genes, productos genéticos y secuencias. Según el análisis GO, hay más procesos biológicos y funciones moleculares descritas en GLU

en la mayoría de los subproteomas analizados, destacando el aumento en las categorías relacionadas con la señalización. Estos resultados concuerdan con el elevado número de proteínas totales identificadas en GLU, lo que probablemente indica un metabolismo más variado y activo del hongo. Sin embargo, el fosfomembranoma fue el único subproteoma que presentó un mayor número de categorías GO en TCW, lo que puede indicar un papel crucial como interruptor en el cambio entre estados patogénicos de aquellas proteínas de membrana reguladas por fosforilación. Al analizar solo las anotaciones GO relacionadas con la transducción de señales, se reveló que había proteínas relacionadas con la señalización TOR, el sistema de transducción de señales “fosforelay” y la señalización mediada por lípidos de inositol, solo en condiciones de GLU. Por el contrario, la anotación GO de señalización mediada por calcio solo está presente entre las proteínas identificadas en condiciones de TCW. La identificación de las proteínas incluidas en estas cascadas de transducción de señales proporcionará a la comunidad investigadora nueva información sobre el proceso de infección por *B. cinerea* y posibles candidatos de factores de patogenidad/virulencia, superación de las defensas de las plantas y nuevas dianas terapéuticas.

A pesar de todos estos avances, cuando comparamos los datos obtenidos en todas las aproximaciones proteómicas realizadas hasta la fecha^[8] con las últimas actualizaciones del genoma de *B. cinerea* (2012) e intentamos correlacionar ambas bases de datos, el resultado obtenido solamente alcanza el 54 %. Este dato sugiere que aproximadamente la mitad de las proteínas codificadas en el genoma de *B. cinerea* aún no han sido encontradas, detectadas o cuantificadas mediante proteómica en ninguna de las aproximaciones realizadas. Dicho de otra forma, la mitad del genoma del hongo parece ser críptico, expresándo-

Hasta la fecha, el uso de los aptámeros se ha centrado principalmente en fines clínicos con aplicaciones terapéuticas a través de su uso como fármacos, principalmente antivirales

Los aptámeros parecen ser buenos candidatos como agentes terapéuticos para proteger los cultivos a los que a los que ataca *B. cinerea*

se en condiciones aún por determinar. Estos datos confirman que este hongo dispone de un arsenal de herramientas todavía más diverso de lo que se pensaba.

No obstante, y a pesar de los avances en las aproximaciones realizadas hasta la fecha, la proteómica también ha permitido el estudio de nuevos factores implicados en la virulencia, como, por ejemplo, los péptidos bioactivos. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos generadas como resultado de la degradación de una fuente proteica por una o varias proteasas; el resultado de esta hidrólisis produce péptidos con un papel importante, como agonista y antagonista de opioides, antioxidantes, anticoagulantes, reguladores de la concentración de colesterol, presión arterial o como antifúngicos y antibióticos. Estos péptidos también pueden ser sintetizados *de novo* mediante la actividad de las péptido sintetas no ribosomales (NRPS). La capacidad de *B. cinerea* para producir estos péptidos, y alguna actividad de estos, habían sido previamente descritas, pero su presencia y papel durante el ciclo infeccioso aún no están del todo claros. Los parámetros de análisis de estos péptidos han sido optimizados en el IVAGRO (Cádiz) mediante la hidrólisis de proteínas vegetales, así como los ensayos de su eficacia fitotóxica, propiedades antibióticas o antifúngicas. Los ensayos fitotóxicos de los péptidos bioactivos obtenidos mostraron que *B. cinerea* es capaz de producir péptidos bioactivos con actividades fitotóxicas y antibióticas, ya sea transformando proteínas vegetales (TCW) o mediante síntesis *de novo* (GLU). Estos péptidos están siendo analizados y secuenciados en el servicio de proteómica del IVAGRO para determinar, por primera vez, el papel de estos péptidos durante el ciclo de infección; y resaltar la posible aplicación biotecnológica de este proceso en la valorización de biomasa mediante la transformación de residuos vegetales industriales en compuestos bioactivos.

Uso de aptámeros para el control de *B. cinerea*

Los aptámeros se definen como una secuencia sencilla de oligonucleótidos de ADN o ARN, de corta longitud, que reconocen moléculas diana de pequeño tamaño o complejos multiméricos. Desde que se descubrieron en 1990, se abrió un gran campo de posibilidades a su paso, cuyo mayor éxito se ha conseguido en los últimos 10 años. Los aptámeros han atraído la atención científica porque tienen propiedades únicas, como su sencilla y corta estructura y que puedan plegarse tridimensionalmente con facilidad, de forma que la unión a su molécula diana es adecuada, precisa y muy estable; además de tener una elevada afinidad y especificidad hacia ella. Estas moléculas se han utilizado con éxito en diferentes áreas de la biotecnología; sin embargo, y hasta la fecha, el uso de los aptámeros se ha centrado principalmente en fines clínicos con aplicaciones terapéuticas a través de su uso como fármacos, principalmente antivirales. Esta línea de progreso en terapia se ha visto recompensada recientemente, estando el primer fármaco basado en aptámeros aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE). Por otro lado, las ventajas que presentan han creado cierta curiosidad por parte de la industria alimentaria, agroalimentaria o química. Hasta la fecha, estas moléculas se han desarrollado y utilizado con éxito en la detección de alérgenos, antibióticos, microorganismos y micotoxinas en alimentos, pesticidas y residuos fertilizantes.

Debido a la gran dificultad para controlar al hongo fitopatógeno *B. cinerea*, los aptámeros parecen ser buenos candidatos como agentes terapéuticos para proteger los cultivos a los que ataca. Esto se debe, principalmente, a que son capaces de unirse de forma específica y con gran afinidad

El uso de nuevos “biofungicidas” basados en el mecanismo biológico del ARN de interferencia, proteínas antimicrobianas y aptámeros son una opción prometedora y sostenible para el control de la podredumbre gris

a las moléculas diana, inhibiendo su función. Estudios recientes llevados a cabo por el grupo de investigación “Diseño racional y sostenible de fitosanitarios”, de la Universidad de Málaga, han mostrado resultados prometedores sobre el uso de dos aptámeros capaces de inhibir una proteína implicada en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno, clave en la patogénesis de *B. cinerea*. Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado porcentajes de reducción de la enfermedad de la botritis en torno al 60 %, indicando el potencial de estos oligonucleótidos para su posible inclusión dentro de los diferentes programas de control de la enfermedad (López-Laguna *et al.*, en preparación).

Conclusión final

El uso de nuevos “biofungicidas” basados en el mecanismo biológico del ARN de interferencia, proteínas antimicrobianas y aptámeros son una opción prometedora y sostenible para el control de la podredumbre gris causada en un amplio rango de especies vegetales por *B. cinerea*. Avanzar en el desarrollo de estos nuevos biofungicidas mejorando su aplicación (nanoencapsulación) y profundizando en el conocimiento de dianas más eficaces (estudio de proteómica en la comunicación planta-patógeno) tendrá como resultado un descenso del uso de agroquímicos en nuestros cultivos como exige el plan Europeo “De la granja a la mesa”.

REFERENCIAS

- [1] Dean, R. *et al.* (2012) “The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology”. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 414-430.
- [2] Fernández-Ortuño, D. *et al.* (2016) “Characterization of resistance to six chemical classes of site-specific fungicides registered for gray mold control on strawberry in Spain”. *Plant Dis.* **100**: 2234-2239.
- [3] Fernández-Ortuño, D. *et al.* (2017) “Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain”. *Plant Dis.* **101**: 1306-1313.
- [4] Wang, M. *et al.* (2016). “Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection”. *Nat. Plants* **2**: 1-10.
- [5] Qiao, L. *et al.* (2023). “Artificial nanovesicles for dsRNA delivery in spray-induced gene silencing for crop protection”. *Plant Biotechnol. J.* **21**: 854-865.
- [6] Niño-Sánchez, J. *et al.* (2022). “BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*”. *J. Integr. Plant Biol.* **64**: 2187-2198.
- [7] Liñeiro, E. *et al.* (2016). “Contribution of proteomics research to understanding *Botrytis* biology and pathogenicity”. Capítulo en *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*, pp 315-333. Springer Nature. Berlín, Alemania.
- [8] Escobar-Niño, A. *et al.* (2021). “Unravelling the initial triggers of *Botrytis cinerea* infection: First description of its surfactome”. *J. Fungi* **7**: 1021-1039.
- [9] Escobar-Niño, A. *et al.* (2023). “The adaptation of *Botrytis cinerea* extracellular vesicles proteome to surrounding conditions: Revealing new tools for its infection process”. *J. Fungi* **9**: 872-897..
- [10] Escobar-Niño, A. *et al.* (2021). “Deciphering the dynamics of signaling cascades and virulence factors of *B. cinerea* during tomato cell wall degradation”. *Microorganisms* **9**: 1837-1863.

