

NUEVAS ESTRATEGIAS BASADAS EN OLIGONUCLEÓTIDOS *para controlar Botrytis cinerea*

Los oligonucleótidos pueden mejorar el control de *Botrytis cinerea* y reducir la dependencia de los fungicidas convencionales. Los aptámeros y las tecnologías basadas en ARNi actúan de forma específica sobre procesos esenciales del patógeno, abriendo nuevas alternativas para un manejo más preciso y sostenible del moho gris.

ALBA LÓPEZ-LAGUNA^{1,2}, ALEJANDRO PÉREZ-GARCÍA^{1,2}, DOLORES FERNÁNDEZ-ORTUÑO^{1,2}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

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

El moho gris, causado por *Botrytis cinerea*, es una de las enfermedades fúngicas más importantes a escala mundial. Este hongo necrótrofo y polífago puede infectar más de 1.400 especies vegetales y afecta a cultivos de gran valor económico, como el tomate, la uva o la fresa (Dean *et al.*, 2012; Elad *et al.*, 2016). Parte de su éxito se debe a su gran capacidad de adaptación y a los numerosos mecanismos que utiliza para infectar y colonizar los tejidos vegetales (Bi *et al.*, 2023). Aunque existen distintas medidas de manejo integrado, el control de *B. cinerea* sigue dependiendo, en buena medida, del uso de fungicidas químicos. El problema es que su aplicación repetida favorece la selección de poblaciones resistentes. De hecho, *B. cinerea* está considerado un patógeno de alto riesgo para el desarrollo de resistencias (FRAC, 2025), y ya se han descrito casos frente a numerosas familias de fungicidas, entre ellas los inhibidores de la quinona

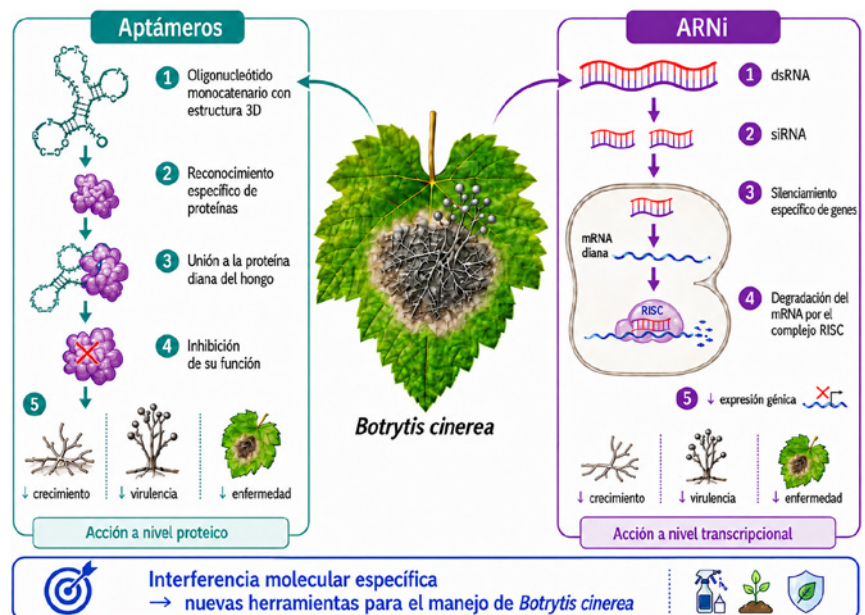


FIGURA 1
Estrategias basadas en oligonucleótidos para el control de *Botrytis cinerea*.

externa (QoI), los fenilpirroles y los inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI) (Veloukas *et al.*, 2014; Fernández-Ortuño *et al.*, 2015, 2017). A esto se suman los fenotipos

de resistencia múltiple a fármacos (MDR), que pueden reducir al mismo tiempo la sensibilidad frente a fungicidas químicamente diferentes (Kretschmer *et al.*, 2009).

La aparición de resistencias, junto con la preocupación por los residuos de los fungicidas y sus posibles efectos sobre organismos no diana y ecosistemas, ha impulsado la búsqueda de métodos de control más específicos y sostenibles. Como se resume en la **Figura 1**, los oligonucleótidos permiten actuar de forma dirigida sobre distintos componentes moleculares de *B. cinerea*. Entre las estrategias más prometedoras se encuentran los aptámeros y las tecnologías basadas en interferencia por ARN (ARNi), que actúan a nivel proteico y transcripcional, respectivamente.

Aptámeros como nuevos agentes para la protección vegetal

Los aptámeros son pequeñas moléculas de ADN o ARN monocatenario capaces de plegarse y adoptar estructuras tridimensionales que reconocen

sus dianas con una elevada afinidad y selectividad (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Suelen obtenerse mediante SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), un proceso de selección *in vitro* en el que grandes colecciones de oligonucleótidos pasan por sucesivas rondas de selección hasta identificar aquellos que se unen mejor a la molécula de interés (Tuerk and Gold, 1990; Banerjee, 2010; **Figura 2A**). Gracias a esta capacidad de reconocimiento se les conoce con frecuencia como “anticuerpos químicos”. Sin embargo, presentan algunas ventajas frente a los anticuerpos convencionales: pueden sintetizarse de forma reproducible, son moléculas pequeñas y estables y permiten introducir con facilidad modificaciones químicas o unirlos a diferentes sistemas de transporte (Brody and Gold, 2000;

Missailidis and Hardy, 2009). Estas características han favorecido su uso en biomedicina, tanto en diagnóstico como en terapia, donde se ha demostrado que pueden reconocer moléculas muy concretas y modificar su función (Ku *et al.*, 2015).

En agricultura, su desarrollo ha sido más reciente. Las primeras aplicaciones se centraron en biosensores capaces de detectar patógenos, micotoxinas, residuos de pesticidas y otros contaminantes (He *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2013; Amaya-González *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020; **Figura 2B**). También se han diseñado sistemas para la detección temprana de bacterias y virus fitopatógenos (Komorowska *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2024). En cambio, su utilización para bloquear directamente la infección todavía ha sido poco estudiada. Una de las primeras pruebas de este potencial fue aportada por Abdeeva *et*

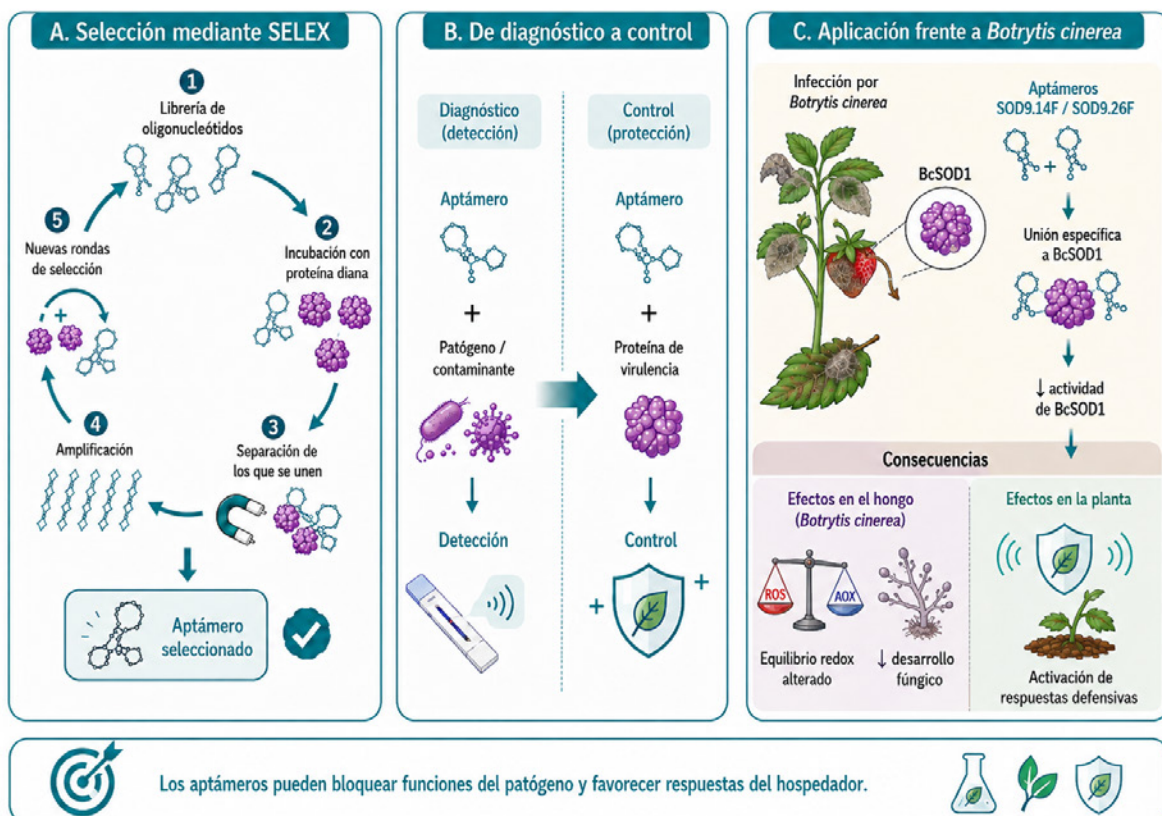


FIGURA 2
Selección de aptámeros mediante SELEX y evolución de su aplicación desde el diagnóstico hasta el control de *Botrytis cinerea*.



FIGURA 3
Principales estrategias de ARNi para controlar a *Botrytis cinerea*.

al. (2023). Estos autores demostraron que la expresión en *Arabidopsis thaliana* de un aptámero de ARN dirigido contra HopU1, un efector de *Pseudomonas syringae*, aumentaba la resistencia de la planta frente a la infección. Aunque este sistema requería modificar genéticamente la planta, el estudio demostró que bloquear de manera específica una molécula relacionada con la virulencia podía utilizarse como estrategia de protección vegetal.

Más recientemente, López-Laguna *et al.* (2025) trasladaron esta idea al control de hongos fitopatógenos mediante aptámeros de ADN dirigidos contra BcSOD1, una proteína de *B. cinerea* implicada en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno generadas durante la infección (**Figura 2C**). Los aptámeros SOD9.14F y SOD9.26F reconocieron específicamente esta proteína e inhibieron su actividad. Su aplicación redujo la germinación de los conidios, el desarrollo del moho gris y la biomasa fúngica en tomate y manzana. Además de este efecto directo sobre el hongo, los análisis transcriptómicos

mostraron cambios en procesos relacionados con la detoxificación y el equilibrio redox de *B. cinerea*, junto con una activación de las respuestas defensivas de la planta. Este resultado coincide con otros estudios que indican que distintas moléculas de ácidos nucleicos pueden actuar como inductores de las defensas vegetales (Vega-Muñoz *et al.*, 2023). Por tanto, los aptámeros podrían tener un doble interés: bloquear de forma específica funciones del patógeno y, al mismo tiempo, favorecer determinadas respuestas del hospedador.

Estos trabajos amplían el papel de los aptámeros en sanidad vegetal, tradicionalmente ligado al diagnóstico, y muestran que también pueden utilizarse como moléculas capaces de interferir directamente con la infección.

ARNi como estrategia para el control de *Botrytis cinerea*

El ARN interferente (ARNi) es un mecanismo natural de regulación génica mediante el cual pequeñas moléculas de ARN reconocen transcritos concretos y favorecen su degradación.

El proceso puede iniciarse a partir de ARN de doble cadena (dsRNA), que es procesado por enzimas Dicer o Dicer-like para generar pequeños ARN interferentes (siRNA). Estos siRNA se incorporan posteriormente al complejo RISC, que los utiliza como guía para reconocer y degradar los ARN mensajeros complementarios (Islam and Sherif, 2020; Padilla-Rojí *et al.*, 2023). En *B. cinerea*, este sistema no solo está presente, sino que también participa en la infección. El hongo produce pequeños ARN capaces de entrar en las células vegetales y silenciar genes relacionados con la inmunidad de la planta, un fenómeno conocido como ARNi entre reinos (Weiberg *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017), permitiendo utilizar el propio sistema de silenciamiento como herramienta para controlar al patógeno. Este conocimiento ha impulsado el desarrollo de tres aproximaciones principalmente: VIGS, HIGS y SIGS (**Figura 3**). El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) utiliza vectores virales para generar las moléculas de ARN responsables del silenciamiento y se ha emplea-

do sobre todo como herramienta de investigación. En *B. cinerea*, la expresión de fragmentos de *BcDCL1* y *BcDCL2* mediante vectores virales consiguió reducir la enfermedad, aunque la necesidad de utilizar virus compatibles limita su aplicación práctica (Liu *et al.*, 2002; **Figura 3A**). El silenciamiento génico inducido por el hospedador (HIGS), por su parte, hace que la propia planta produzca los ARN dirigidos contra genes del patógeno. Durante la infección, estas moléculas pueden transferirse al hongo y reducir la expresión de los genes seleccionados. En *B. cinerea*, el silenciamiento de *BcDCL1*, *BcDCL2* y *BcTOR* ha permitido disminuir la biomasa fúngica y el desarrollo de lesiones (Wang *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2019; Figura 3B). Sin embargo, la necesidad de modificar genéticamente la planta sigue siendo una limitación para su aplicación más generalizada. En este contexto, el

silenciamiento génico inducido por pulverización (SIGS) evita este problema, ya que se basa en aplicar directamente dsRNA o siRNA sobre la superficie de las plantas. Estas moléculas pueden ser absorbidas por *B. cinerea* o entrar primero en los tejidos vegetales y transferirse posteriormente al hongo (Wang and Jin, 2017; Worrall *et al.*, 2019; Figura 3C). Al no requerir plantas transgénicas y permitir modificar con facilidad la secuencia del dsRNA, el SIGS se ha convertido en una de las alternativas más prometedoras para utilizar ARNi en protección vegetal.

B. cinerea es un fitopatógeno especialmente adecuado para esta estrategia porque presenta una elevada capacidad para captar ARN del medio (Qiao *et al.*, 2021). Numerosos trabajos han mostrado que la aplicación de dsRNA dirigido contra genes importantes para el hongo puede reducir su crecimiento y el desarrollo

de la enfermedad (**Figura 4**). Además, no existe una única diana posible. Hasta ahora se han estudiado genes relacionados con procesos muy diversos, como la propia maquinaria de ARNi (*BcDCL1*, *BcDCL2*; Wang *et al.*, 2016), la biosíntesis de ergosterol (*erg13*, *erg11/CYP51*, *erg1*; Nerva *et al.*, 2020; Duanis-Assaf *et al.*, 2022), la síntesis de la pared celular y la traducción (*chs1*, *EF2*; Nerva *et al.*, 2020), la señalización celular (*Bmp1*, *Bmp3*; Spada *et al.*, 2021, 2023), la penetración en el hospedador (*Pls1*; Spada *et al.*, 2023) o el tráfico vesicular (*VPS51*, *DCTN1*, *SAC1*; Qiao *et al.*, 2021). Esta diversidad muestra una de las principales fortalezas del SIGS: la posibilidad de adaptar la estrategia a diferentes procesos necesarios para la infección. Más recientemente, López-Laguna *et al.* (2026a) ampliaron este repertorio mediante el silenciamiento de *sdhB* y *cytB*, dos genes relacionados

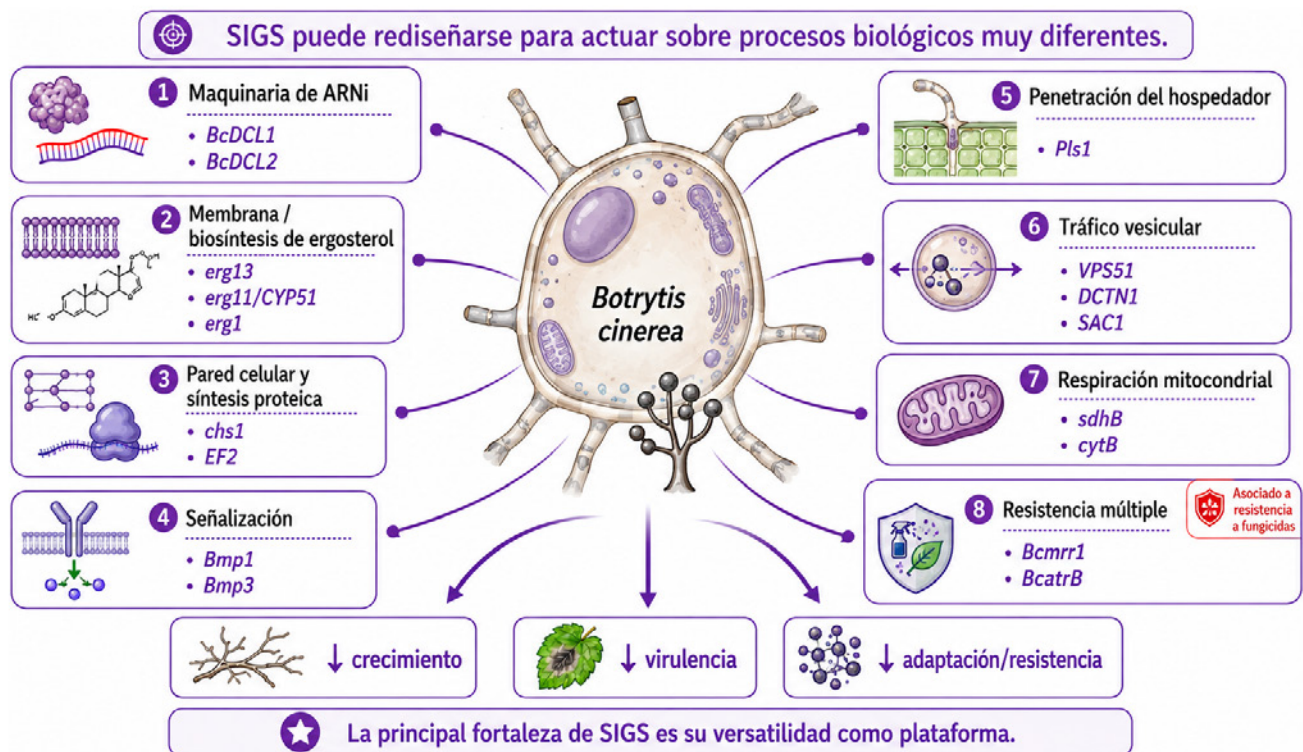


FIGURA 4

Diversidad de procesos celulares de *Botrytis cinerea* susceptibles de silenciamiento mediante SIGS.

con la respiración mitocondrial. Los dsRNA dirigidos contra estos genes redujeron el desarrollo de *B. cinerea*, y el efecto fue mayor cuando ambos se silenciaron simultáneamente mediante una única molécula de dsRNA. Asimismo, el ARNi puede utilizarse contra mecanismos asociados a la resistencia a fungicidas. López-Laguna *et al.* (2026b) estudiaron el silenciamiento del factor de transcripción Bcmrr1 y del transportador BcatrB, ambos relacionados con fenotipos MDR. Los tratamientos redujeron el desarrollo del patógeno tanto en la cepa de referencia sensible B05.10 como en un aislado de campo multi-resistente. En el caso de Bcmrr1, el efecto protector se mantuvo además durante un período prolongado en plantas de tomate. Estos resultados muestran que el SIGS no solo puede dirigirse contra funciones esenciales del hongo, sino también contra mecanismos que contribuyen a su resistencia frente a los tratamientos químicos.

Combinación de ARNi con fungicidas convencionales

El SIGS también puede emplearse

junto con fungicidas convencionales para aprovechar mecanismos de acción diferentes pero complementarios. Mientras que el ARNi reduce la cantidad de determinados transcritos, los fungicidas suelen actuar directamente sobre proteínas ya sintetizadas. De este modo, ambas herramientas pueden interferir con una misma ruta biológica desde niveles distintos o actuar sobre procesos relacionados con la sensibilidad del patógeno al tratamiento.

López-Laguna *et al.* (2026a) estudiaron esta posibilidad combinando un dsRNA dirigido simultáneamente contra *sdhB* y *cytB* con los fungicidas SDHI boscalida y QoI azoxistrobin, cuyas dianas moleculares son las proteínas *SdhB* y *CytB*, respectivamente. Las combinaciones mejoraron el control de *B. cinerea* respecto a los tratamientos individuales y mostraron una interacción principalmente sinérgica. Este efecto también se observó en aislados resistentes en los que los fungicidas utilizados por separado presentaban una eficacia limitada. Además, otro estudio de López-Laguna *et al.* (2026b) combinó in vitro un dsRNA dirigido contra

Bcmrr1 con dosis reducidas de fludioxonil. En este caso, la combinación mejoró el control y permitió recuperar parcialmente la sensibilidad al fungicida en algunos aislados MDR. A diferencia del ejemplo anterior, el dsRNA no actuaba sobre la misma diana que el fungicida, sino sobre un mecanismo regulador relacionado con la resistencia.

Estos resultados muestran que la combinación de ARNi y fungicidas puede plantearse de dos formas: actuando sobre genes relacionados con la misma ruta afectada por el producto químico o interfiriendo con mecanismos que ayudan al hongo a tolerar el tratamiento. Ambas opciones permiten diseñar combinaciones adaptadas a distintos perfiles de resistencia y podrían contribuir a mejorar la eficacia de ingredientes activos actualmente autorizados, así como a explorar la posible recuperación de materias activas previamente retiradas.

Bibliografía

Queda a disposición del lector interesado en el correo electrónico: redaccion@editorialagricola.com

PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque los resultados obtenidos hasta el momento muestran el potencial de los oligonucleótidos para controlar *B. cinerea*, todavía existen varios obstáculos antes de poder trasladar estas estrategias de forma generalizada al campo. Entre los principales retos se encuentran la estabilidad de estas moléculas, su persistencia en condiciones ambientales y su capacidad para llegar de manera eficaz hasta sus dianas. Será necesario, por tanto, desarrollar formulaciones capaces de protegerlas frente a la degradación y favorecer su absorción por los tejidos vegetales o por el propio patógeno.

Los sistemas de formulación y transporte representan una de las líneas de investigación más prometedoras. En el caso de los aptámeros, su incorporación a liposomas, nanopartículas u otros nanotransportadores podría mejorar su estabilidad y biodisponibilidad (Yin *et al.*, 2023). De manera similar, estos sistemas pueden aumentar la persistencia y facilitar la absorción del dsRNA utilizado en SIGS (Mitter *et al.*, 2017).

Otro aspecto fundamental es la producción a gran escala. Los avances en los sistemas biotecnológicos de fabricación de dsRNA y otros oligonucleótidos están reduciendo progresivamente los costes y mejorando la viabilidad de estas tecnologías (Shepherd *et al.*, 2019; Verdonckx and Vanden Broeck, 2022). La combinación de métodos de producción más eficientes con formulaciones que garanticen una adecuada estabilidad y biodisponibilidad será clave para que estas moléculas puedan convertirse en productos fitosanitarios.

En definitiva, el futuro de estas estrategias dependerá de demostrar una eficacia reproducible más allá de las condiciones experimentales y de resolver los principales retos asociados a su producción, formulación y aplicación a escala agrícola. Superar estas limitaciones permitirá avanzar desde la prueba de concepto hacia el desarrollo de biofungicidas basados en oligonucleótidos eficaces y viables. Su elevada especificidad y naturaleza no transgénica en el caso de las aplicaciones exógenas refuerzan su potencial como nuevas herramientas de precisión para la protección vegetal.