

PRESENCIA DE *B. CINEREA* EN CASTILLA Y LEÓN, CONDICIONES FAVORABLES PARA SU DESARROLLO Y OTROS ASPECTOS RELEVANTES

# *Botrytis cinerea*, un patógeno necrotrofo polífago presente en todos nuestros viñedos

**Ernesto P. Benito, Thais Martins, M. Costa, Raúl Martín Domínguez y Arturo P. Eslava.**

Área de Genética. Departamento de Microbiología y Genética. Centro Hispano Luso e Investigaciones Agrarias. Universidad de Salamanca.

**Este grupo de trabajo de la Universidad de Salamanca centra su investigación en valorar la incidencia de *B. cinerea* en los viñedos de Castilla y León y en caracterizar las poblaciones del patógeno presentes en los mismos. Con este objeto, durante las campañas de los años 2001 y 2002 y, más recientemente, de los años 2006 y 2007 ha realizado visitas y prospecciones periódicas con recogida de material en viñedos representativos de las zonas productoras de Castilla y León, incluyendo zonas acogidas a distintas denominaciones de origen y en algunos casos zonas reconocidas con la mención Vinos de la Tierra. En este artículo se detallan los resultados de dichas visitas y prospecciones periódicas.**

**E**l viñedo es un sistema vivo enormemente complejo en el que coexisten e interaccionan numerosos y muy diversos organismos: plantas, animales, microorganismos, etc. En particular, la flora microbiana asociada al cultivo de la vid es abundante y diversa. En muchos casos, distintos tipos de microorganismos se desarrollan de forma saprofita sobre tejidos y órganos que constituyen una fuente extraordinariamente rica de nutrientes de fácil acceso, como es el caso de las flores y de los frutos, pero no determinan alteraciones fisiológicas en la planta ni causan el deterioro de las mismas.

En casos concretos, incluso algunos de estos microorganismos han encontrado aplicaciones prácticas y fundamentales en fases concretas del proceso productivo, como es el caso de determinadas cepas de levadura utilizadas en los procesos de fermentación del vino. Pero en otras muchas ocasiones la planta debe hacer frente a microorganismos cuya capacidad de supervivencia depende en gran medida de su habilidad y de su capacidad para atacar y debilitar a la propia planta de vid y de obtener a partir de la misma los nutrientes esenciales para

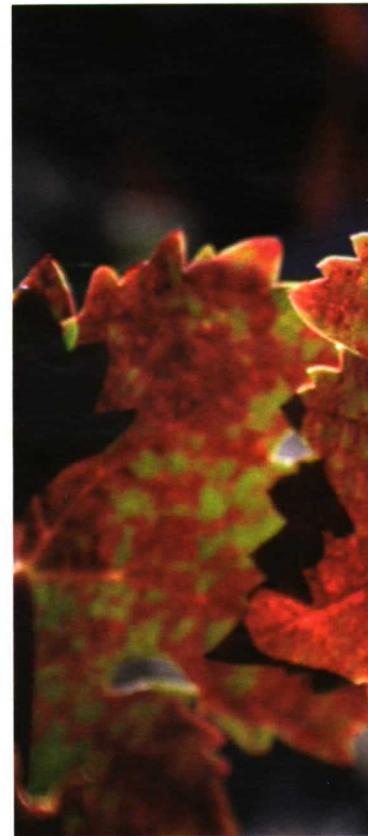
su desarrollo. Hablamos en este caso de microorganismos patógenos causantes de enfermedad y que pueden afectar de manera muy importante al cultivo de la vid en distintas fases del proceso productivo.

Efectivamente cuidar, mantener y mejorar el estado sanitario de cualquier cultivo en general, y de la vid en particular, es objetivo fundamental de la agricultura moderna. Ello exige un conocimiento detallado no sólo de la especie vegetal con la que en cada caso se trabaja, sino también de los distintos microorganismos causantes de enfermedades con los que aquélla interacciona y, en cada caso, de las poblaciones de un determinado patógeno presentes en la zona en la que se cultiva. *Botrytis cinerea* es uno de los principales hongos patógenos de la vid (Jarvis, 1977). Es el agente causal de la enfermedad conocida como podredumbre gris, así denominada por el aspecto aterciopelado y de color gris que adquieren los tejidos afectados y en cuya superficie esporula abundantemente el patógeno. La podredumbre gris de la vid ha existido desde siempre en los viñedos de prácticamente todo el mundo. El patógeno siempre está presente en el campo, pero la enfermedad muestra una incidencia variable dependiendo de numerosos factores tales como la climatología, la sensibilidad de la variedad utilizada, las técnicas de manejo del cultivo aplicadas, el sistema de conducción de las cepas, la poda realizada, la densidad de plantación, el abonado, la situación del cultivo en zonas de ladera o de valle, etc.

Causa daños directos sobre el cultivo en campo porque puede infectar todos los órganos verdes de la planta, incluidas las hojas, siendo los más importantes los frutos.

Con frecuencia la infección se produce en las primeras fases del desarrollo de las flores y en los frutos inmaduros, infección que atraviesa una fase de latencia durante la cual el hongo no determina la aparición de ningún tipo de síntoma y manifestándose únicamente cuando los frutos ya maduran (revisado en Elmer y Michailides, 2004).

Pero además este patógeno determina importantísimas pérdidas económicas en la industria del vino como consecuencia de la alteración de las características organolépticas de los vinos derivados de frutos infectados, debido a la acumulación de sustancias que produce el propio patógeno y, en menor medida, de los residuos fitosanitarios utilizados para su tratamiento.



*B. cinerea* es un patógeno de características peculiares que dificultan de manera importante las posibilidades de control del mismo. Se trata de un hongo ubicuo, presente en todas las regiones del mundo. Esporula muy profusamente sobre los tejidos infectados sobre restos vegetales y las esporas son fácilmente transportadas por el aire y por insectos. Los climas templados y húmedos, en los que se practica una agricultura más activa e intensa, facilitan su desarrollo. Es un patógeno necrotrófico (van Kan, 2007) que crece sobre tejido muerto (por ejemplo sobre restos vegetales de campañas anteriores), debilitado o senescente. Evidencias recientes sugieren que *B. cinerea* induce la muerte celular de tejidos sanos del huésped para facilitar su colonización (Govrin and Levine, 2000). Sabemos, además, que puede infectar células vivas intactas y que a partir del punto inicial de infección puede colonizar los tejidos sanos adyacentes.

Por otra parte, en su ciclo de vida produce estructuras enormemente resistentes a condiciones adversas, los esclerocios, que le permiten sobrevivir en el campo durante el invierno y producir una nueva generación de propágulos al iniciarse la nueva temporada.

Por último, y es ésta una cuestión fundamental, se trata de un patógeno polífago, que infecta un amplio rango de huéspedes (Jarvis, 1977) (se han descrito más de 235 especies vegetales diferentes infectadas por *B. cinerea*), a diferencia de lo que sucede con otras especies del género *Botrytis* caracterizadas por infectar una única especie



vegetal o muy pocas especies relacionadas. Este hecho complica enormemente el posible control del patógeno ya que, aunque se ejerzan medidas de control sobre un cultivo dado, el patógeno podrá infectar huéspedes susceptibles cultivados en las proximidades y refugiarse en los mismos.

Finalmente, cabe destacar que *B. cinerea* es un patógeno que presenta una gran variabilidad fisiológica en el campo. Esta variabilidad le proporciona una enorme plasticidad y capacidad de adaptación que explica, al menos en parte, la frecuente aparición de cepas resistentes a los distintos fungicidas que se han ido desarrollando frente a *B. cinerea*.

Los tratamientos químicos han constituido la práctica más habitual de control del patógeno. Su aplicación depende principalmente de la disponibilidad de fungicidas para cada cultivo y del estado de desarrollo de resistencias contra esos fungicidas en cada caso. En la actualidad para el control de *B. cinerea* sobre la vid los fungicidas recomendados son iprodiona, procimidona, pirimetanil y vinclozolina.

## Estrategias de control

Precisamente los tratamientos químicos han constituido la práctica más habitual de control del patógeno (revisado en Leroux, 2004). Su aplicación depende principalmente de la disponibilidad de fungicidas para cada cultivo y del estado de desarrollo de resistencias contra esos fungicidas en cada caso. Fungicidas no sistémicos con múltiples sitios de acción, tales como chlorothalonil, dicloran, mancozeb, maneb y thiramhan han estado disponibles desde hace mucho tiempo para controlar la podredumbre causada por *Botrytis*, ya que no han surgido demasiados problemas de resistencias. Su aplicación es limitada, no obstante, porque actúan sólo de manera preventiva y su utilización se ha restringido muy severamente.

Se logró una mejora sustancial en el control de la podredumbre gris con la introducción de los benzimidazoles a finales de la década de 1960 y de las dicarboximidazoles a principios de la década de 1970. Después de unos años de utilización estos fungicidas perdieron su alta actividad inicial debido a la aparición y selección de resistencias y se redujo significativamente su utilización.

A pesar de que la presión de selección ha disminuido muy notablemente, aún persisten las resistencias a ambos tipos de fungicidas, en particular a los benzimidazoles. El diethofencarb, que mostró inicialmente una buena actividad de control contra las cepas resistentes a los benzimidazoles, perdió también eficacia muy rápidamente debido a la aparición de resistencias.

Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis de esterol, que tienen un amplio rango de acción contra hongos, fueron introducidos a partir de la década de 1970. Sin embargo, sólo algunos de estos fungicidas han mostrado actividad frente a *B. cinerea* en condiciones de campo. Estos compuestos son el tebuconazole y el prochloraz. En general, el uso de fungicidas inhibidores de la biosíntesis de esterol no es común.

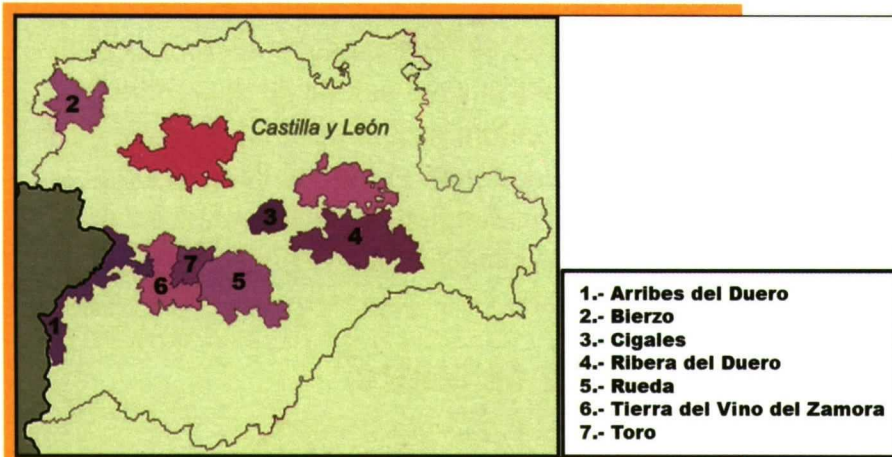
Otros fungicidas de reciente desarrollo que muestran actividad frente a *B. cinerea* son los phenylpyrroles fenpiclonil y fludioxanil y la anilino pirimidina mepanipyrim. En la actualidad para el control de *B. cinerea* sobre la vid los fungicidas recomendados son iprodiona, procimidona, pirimetanil y vinclozolina.

Pero la aplicación de fungicidas para el control de patógenos conlleva un coste muy importante desde el punto de vista medioambiental. Las restricciones para su utilización son cada vez más fuertes y se hace necesario desarrollar estrategias de control alternativas. Se ha trabajado fundamentalmente en tres tipos de estrategias:

- En primer lugar las prácticas culturales, que pueden reducir los niveles de inóculo y crear unas condiciones ambientales menos favorables para el desarrollo de la infección. Estas prácticas incluyen medidas de higiene, tales como la retirada de tejidos muertos, senescentes o infectados, que reducen la cantidad de inóculo y los posibles sitios de inicio de la infección. En la medida de lo posible se debe evitar la pro-

## Figura 1.

Denominaciones de origen en la Comunidad de Castilla y León en las que se llevan a cabo prospecciones periódicamente en el curso de nuestros trabajos.



ducción de heridas en el tejido vegetal, ya que éstas facilitan enormemente la entrada del patógeno. Por otra parte, una baja densidad de cultivo (dentro de ciertos límites) crea un microclima menos favorable para el desarrollo de la enfermedad. Se puede conseguir espaciando adecuadamente las plantas en el campo o eliminando hojas en cada planta individual. Cabe considerar también la aplicación de tratamientos foliares con nitrato cálcico, que retrasan la senescencia y determinan una reducción en la susceptibilidad de las plantas a *B. cinerea*. Otras medidas tienen por objeto reducir la exposición de las esporas del patógeno a agua superficial (en las plantas huéspedes) que se consigue con una adecuada ventilación (y/o calefacción). Estas prácticas culturales contribuyen a disminuir la incidencia en la enfermedad y son particularmente útiles cuando se combinan con otros métodos.

• En segundo lugar consideramos el control biológico. Desde la década de los 70 se ha trabajado sobre las posibilidades que ofrecen distintos organismos antagonistas de *B. cinerea*, tales como *Aureobasidium* spp., *Bacillus subtilis*, *Gliocladium* spp y *Trichoderma* spp., como agentes de control biológico. La mayor parte de las investigaciones se han centrado en especies del género *Trichoderma*, que se comportan como micoparásitos (Dubos, B. 1992). Un problema general en relación con el control biológico con antagonistas es el estrecho rango de temperaturas en el que se manifiesta su máxima actividad de control

en comparación con la temperatura óptima de crecimiento de *B. cinerea*. No obstante, *T. harzianum* ha sido probada con éxito en Israel, Europa, Suráfrica, Nueva Zelanda, etc., sobre vid, calabaza, tomate, fresa, judía, zanahoria y kiwi. A pesar de los numerosos resultados positivos que se han obtenido, la aplicación de agentes de control biológico no es la principal estrategia de control de la enfermedad causada por *B. cinerea*. Sólo cuando se ha combinado su utilización con la de otros métodos de control se han obtenido resultados satisfactorios.

• Finalmente consideramos la mejora genética de la resistencia contra *B. cinerea*. Si bien es probablemente la estrategia más "limpia" y ecológica, es ciertamente una estrategia difícil y compleja, ya que no se han descrito genes mayores de resistencia frente a este patógeno en ninguna especie vegetal. Esto probablemente es debido a la gran diversidad de mecanismos de infección que un patógeno de sus características posee. En algunos cultivares de algunas especies, propiedades morfológicas (tales como el grosor de la cutícula o la vellosidad de la epidermis) o diferencias en el crecimiento (por ejemplo en la maduración de los frutos o en la densidad de frutos en el racimo o de las hojas) pueden facilitar que la planta evite o escape a la acción del patógeno. Estas características suelen ser caracteres poligénicos, controlados por un número variable de genes, lo que complica su transferencia a los cultivares de interés. No obstante se han logrado resultados parciales interesantes en algunos casos.

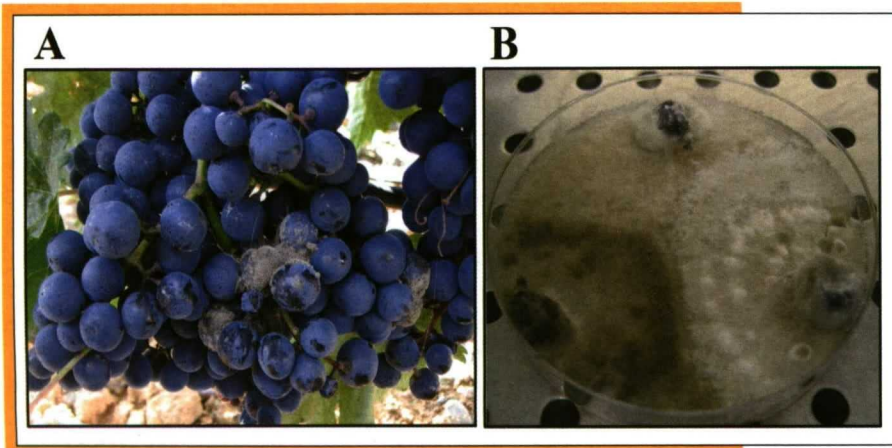
## Las poblaciones de *B. cinerea* en los viñedos de Castilla y León

Nuestro grupo en la Universidad de Salamanca está interesado en valorar la incidencia de *B. cinerea* en los viñedos de Castilla y León y en caracterizar las poblaciones del patógeno presentes en los mismos. Con este objeto, durante las campañas de los años 2001 y 2002 y, más recientemente, de los años 2006 y 2007 hemos realizado visitas y prospecciones periódicas con recogida de material en viñedos representativos de las zonas productoras de Castilla y León (figura 1), incluyendo zonas acogidas a distintas denominaciones de origen y en algunos casos zonas reconocidas con la mención Vinos de la Tierra.

Las visitas se realizaron durante las semanas previas a la vendimia, generalmente en la última semana de septiembre y en la primera semana de octubre. Cuando durante el mes de septiembre se produjeron precipitaciones más o menos abundantes y las temperaturas resultaron moderadas fue más frecuente la detección mediante simple inspección visual de *B. cinerea* en racimos infectados (figura 2a) en todos los viñedos visitados. A partir de estos racimos resultó sencillo aislar y purificar en el 100% de los casos cepas de campo de *B. cinerea* responsables de la producción de podredumbre gris, tal y como hemos podido comprobar en el laboratorio al reproducir los síntomas en experimentos de inoculación en condiciones controladas. No obstante, en todas las vistas realizadas, independientemente de la zona y de las condiciones climáticas, también se recogieron muestras de racimos de vid asintomáticos de las distintas variedades cultivadas. Una vez en el laboratorio, a partir de estos materiales (bayas de los racimos), y siguiendo procedimientos microbiológicos rutinarios para la purificación de microorganismos a partir de material vegetal, se trató de detectar la presencia de *B. cinerea* en aquéllos. Para ello

## Figura 2.

A. Síntomas de podredumbre gris sobre la propia cepa de vid en el viñedo (variedad Tempranillo). B. Aspecto morfológico de distintas cepas de *B. cinerea* desarrollándose sobre medio de cultivo sintético en el laboratorio a partir de bayas procedentes de un mismo racimo.



muestras de bayas de cada racimo recogido fueron lavadas superficialmente con agua destilada y luego colocadas sobre placas de medio de cultivo rico. En la campaña del año 2007, particularmente favorable para el desarrollo de *B. cinerea*, fue posible aislar y purificar cepas del patógeno en un porcentaje muy elevado de las muestras procesadas (85%), lo que supone que en las fechas próximas a la vendimia, aunque los racimos o las bayas individuales no manifiesten síntomas de podredumbre gris, *B. cinerea* está presente en la gran mayoría de ellos.

En la campaña del año 2007 se procesaron además muestras asintomáticas recogidas en fechas anteriores, durante la segunda quincena de agosto. En este estudio, las bayas analizadas de cada racimo fueron lavadas con agua estéril y desinfectadas superficialmente por tratamiento con lejía antes de proceder a su colocación sobre placas de medio de cultivo. En este caso, en un 35% de las muestras fue posible aislar y purificar *B. cinerea*, lo que indica que en muchos racimos asintomáticos *B. cinerea* está presente ya en el interior del fruto en esas fechas. Por lo tanto, las infecciones por *B. cinerea* se producen en muchos casos con anterioridad a la maduración de los frutos y el patógeno permanece asintomático presumiblemente a la espera de que se produzcan condiciones adecuadas para su desarrollo.

Una segunda observación que debemos destacar es la enorme variabilidad en relación con características morfológicas fácilmente apreciables visualmente que detectamos entre los diferentes aislados recogidos a partir de muestras de diferentes racimos. Con frecuencia, a partir de bayas diferentes procedentes de un mismo racimo, o incluso a partir de una misma baya, es posible aislar cepas claramente diferentes de *B. cinerea* (figura 2b). Estas diferencias morfológicas constituyen únicamente un primer nivel de variación entre aislados que luego se corrobora y amplía mediante análisis fisiológicos y genéticos más

detallados. Por lo tanto, en nuestros viñedos coexisten cepas de *B. cinerea* que manifiestan características muy diversas. Desde el punto de vista del manejo de la enfermedad en el campo, estas observaciones tienen unas implicaciones importantes.

Para poder llevar a cabo una caracterización fisiológica y genética precisa de las poblaciones del patógeno es necesario trabajar con cepas que constituyan entidades biológicas únicas. Con este objeto, a partir de cada cepa de campo recogida se prepara un cultivo monospórico, derivado de una única espora. Y éste es el material con el que trabajamos posteriormente en el laboratorio. En el caso de *B. cinerea*, aún así, y por tratarse de un hongo ascomiceto multinucleado y con frecuencia heterocarionte, no siempre es posible garantizar de manera absoluta que cada aislado monospórico represente un único genotipo.

Nuestro grupo está llevando a cabo una caracterización fisiológica y genética de la población de aislados de *B. cinerea* que ha sido recogida (Molina, 2004; Tello 2006; Tello y col., 2007). La caracterización fisiológica se centra en la valoración de la capacidad de infección de cada aislado de una serie de huéspedes de interés. Para ello se determina la capacidad de penetración del patógeno en el tejido del huésped originando lesiones dispersivas y la capacidad de colonización del tejido infectado. Posteriormente evaluamos la capacidad de crecimiento saprofítico de las distintas cepas y, finalmente, analizamos la existencia de correlaciones entre las variables analizadas. Nuestros resultados demuestran que las cepas aisladas pueden infectar huéspedes y tejidos diversos, habiendo analizado su capacidad de infección sobre hojas de tomate, hojas de tabaco, frutos de manzana, hojas de vid, etc. Las distintas cepas muestran además diferencias importantes sobre cada huésped en cuanto a la capacidad de penetración y en cuanto a la capacidad de colonización del tejido infectado. Los datos



## HydroPC, la excelencia en goteros integrados

Le presentamos el Hydro PC, gotero de última generación, autocompensante con opción antidrenante y ahora en tubería de 12 mm.

Su tecnología de vanguardia y los exigentes controles de calidad a los que es sometido, hacen del HydroPC el referente mundial en goteros integrados.

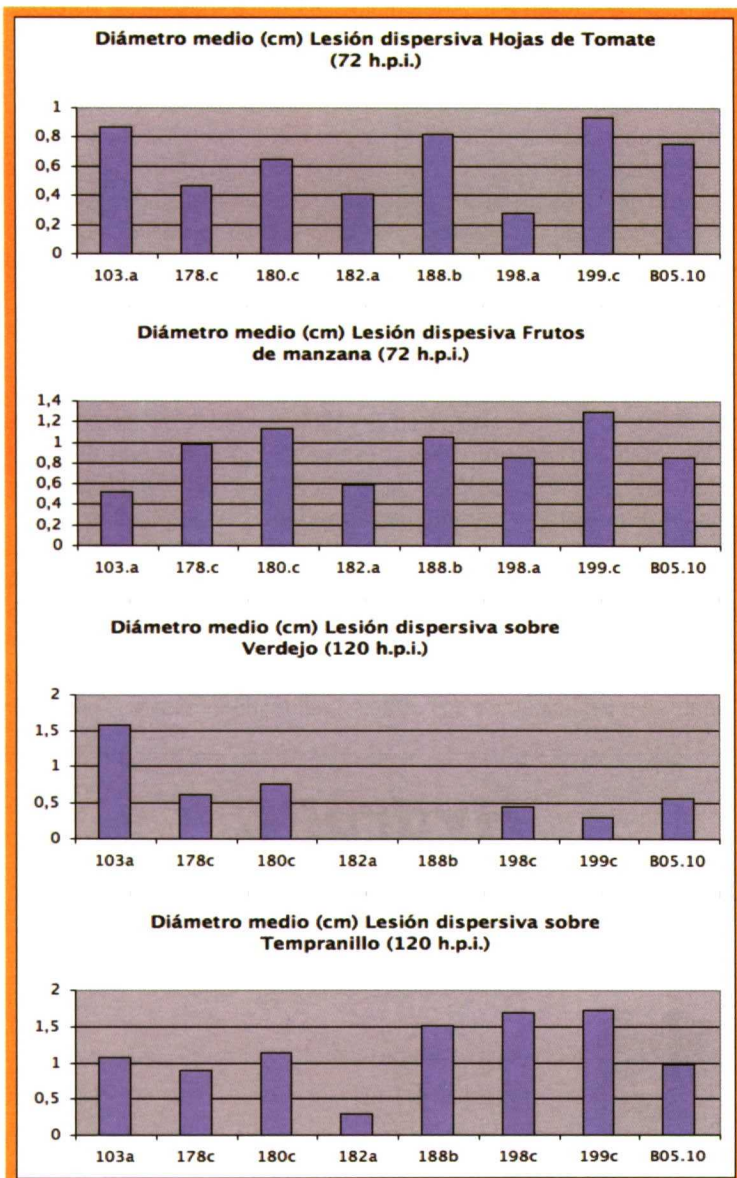
BRIGHT IRRIGATION  
**riego inteligente**

**Disponibile con tecnología Rootguard<sup>®</sup>,  
el riego por goteo subterráneo  
eficiente y de confianza**

**PLASTRO**  
IBERICA

### Figura 3.

**Evaluación de la agresividad de una muestra de cepas de campo de *B. cinerea* mediante la estimación del diámetro medio de las lesiones dispersivas que producen sobre cuatro huéspedes distintos: A. Sobre hojas de tomate. B. Sobre frutos de manzana; C. Sobre hojas de vid variedad Verdejo; D. Sobre hojas de vid variedad Tempranillo.**



generados sugieren que cada cepa en particular dispone de unas habilidades específicas en relación con el carácter patogenicidad y que posee un perfil de patogenicidad casi único (Tello y col., 2007). Es decir, fisiológicamente la población de aislados es enormemente diversa.

La **figura 3** pone de manifiesto el distinto comportamiento que muestran los aislados de una muestra reducida de los aislados purificados en el curso de nuestro trabajo y evaluados sobre hojas de tomate (Panel A), sobre frutos de manzana (Panel B) y sobre hojas de dos variedades de vid, Verdejo (Panel C) y Tempranillo (Panel D) para caracterizar su capacidad de maceración del tejido infectado mediante la estimación del diámetro medio de las lesiones producidas. Es interesante destacar que, tomadas en conjunto, las cepas analizadas parecen tener más problemas para infectar a la variedad Verdejo de Vid que a la variedad Tempranillo. En otras palabras, la variedad Verdejo parece ser más resistente al conjunto de cepas analizadas. Hemos obtenido resultados similares cuando hemos ampliado el número de cepas del patógeno objeto de estudio. Aunque los resultados son preliminares y deben ser ampliados, estas observaciones son ciertamente interesantes

desde el punto de vista aplicado a la hora de considerar la búsqueda de posibles factores de resistencia a la enfermedad en materiales (variedades) autóctonos.

Junto con esta caracterización fisiológica, que está siendo extendida en la actualidad, nos proponemos llevar a cabo una caracterización genética de la colección de aislados recogidos que nos permita analizar posibles correlaciones entre diversidad fisiológica y diversidad genética. Los primeros resultados obtenidos confirman la impresión que se deriva de la caracterización fisiológica: existe una gran diversidad genética en las poblaciones naturales de *B. cinerea* presentes en nuestros viñedos. Consideramos que la información derivada de esta caracterización fisiológica y genética nos ayudará a comprender la dinámica de las poblaciones del patógeno en campo y a determinar y valorar sus posibles relaciones de especificidad con las distintas variedades de vid cultivadas en nuestra comunidad autónoma, informaciones éstas esenciales a la hora de considerar posibles estrategias de control del patógeno.

## Conclusiones

*B. cinerea* está presente en todos nuestros viñedos. Su presencia se hace más evidente en aquellas campañas en las que se producen condiciones favorables para el desarrollo del patógeno, pero éste siempre está presente. Aunque la enfermedad se manifiesta determinando problemas importantes en fechas próximas a la vendimia, al menos una fracción importante de los frutos en los viñedos han sido infectados ya en fechas más tempranas. A la hora de estudiar el manejo del patógeno en campo debemos considerar a *B. cinerea* como un patógeno generalista, con capacidad para infectar muy numerosos huéspedes alternativos en los que puede refugiarse. Debemos considerarlo, además, como una población dinámica integrada por individuos muy diversos de características fisiológicas muy distintas. ■

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer su colaboración a los Consejos Reguladores de las distintas Denominaciones de Origen de Castilla y León. Los trabajos que se describen han sido, y están siendo, realizados gracias a la financiación de los proyectos SA069/01 de la Junta de Castilla y León y Botrytismp (SA-06/2005) y Dghongospatvid (SA-02-C2-1) del ITACyL.

## Bibliografía

- Dubos, B. (1992). Biological control of Botrytis: state of the art. In Recent Advances in Botrytis Research - Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium, Heraklion, Crete, Greece. (Verhoeff, K., Malathrakis, N.E y Williamson B., eds), pp. 169-178. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen.
- Elmer, P.A.G. y Michailides, T.J. (2004) Epidemiology of Botrytis cinerea in Orchard and Vine Crops. En: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. y Delen, N., eds.), pp. 243-272. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Govrin, E.M. y Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea. *Curr Biol* 10: 751-757.
- Jarvis W.R. 1977. Botrytinia and Botrytis species- Taxonomy, physiology and pathogenicity. A guide to the literature. Monograph no. 14. Ottawa, Research Branch, Canada Department of Agriculture.
- Leroux, P. (2004) Chemical control of Botrytis and its resistance to chemical fungicides. En: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds.), pp. 195-222. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Molina R. (2004). Mecanismos de patogenicidad en Botrytis cinerea: el papel de las formas activas de oxígeno. Tesina de Licenciatura, Universidad de Salamanca.
- Tello M.L. (2006). Purificación, identificación y estimación de la patogenicidad de una colección de aislados de campo de Botrytis cinerea recogidos en viñedos de las Arribes del Duero. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Salamanca.
- Tello, M.L., Arranz, M., Benito-Pescador, D., Turrión Gómez, J.L., Molina, R., García Benavides, P., Eslava, A.P. y Benito, E.P. (2007) "Cepas de Botrytis cinerea causantes de podredumbre gris en viñedos de las Arribes del Duero". *Innovación y Tecnología Agroalimentaria* 2: 125-143.
- Van Kan, J.A.L. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* 11:247-253.