

# Bacteriosis del algodón

## Caracterización molecular del agente causal de la mancha angular del algodón en el norte de Santa Fe

Lic. Biot. Lorenzini Fernando  
 Ing. Agr. Dileo Pablo  
 Ing. Agr. Winkler Horacio  
 Ing. Agr. Scarpin Gonzalo MP 3/206  
 Dr. Muchut Robertino  
 Dra. Cereijo Antonela  
 Dr. Paytas Marcelo MP 3/116  
 Dra. Roeschlin Roxana

EEA INTA Reconquista  
 lorenzini.fernando@inta.gob.ar

### Introducción

La bacteriosis o Mancha Angular del algodón (MAA) es una enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*), que se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de algodón del mundo, causando importantes pérdidas del rendimiento en cultivares susceptibles a la enfermedad. El patógeno es capaz de enfermar a la planta de algodón en cualquier estadio de su desarrollo, y produce diferentes sintomatologías según el órgano vegetal afectado: MAA y necrosis de nervaduras en hojas y brácteas, brazo negro en tallos y ramas, además de lesión y podredumbre de cápsulas. Sin embargo, debido a la naturaleza hemibiotrófica del patógeno, el estadio inicial de la enfermedad comienza como lesiones con apariencia “mojada” o “húmeda”, es decir, manchas acuosas, tanto en tejido foliar como en las cápsulas. A medida que la enfermedad avanza y empeora, se produce la necrosis de las zonas afectadas, bloqueando los vasos xilemáticos y provocando así la posterior defoliación y/o caída de las cápsulas.

Las estrategias de manejo de la MAA a lo largo del tiempo han consistido en el uso de semillas deslintadas al ácido, la destrucción de rastros, la rotación de diferentes cultivos en las áreas de siembra, y la utilización de variedades resistentes a *Xcm*. Es por esto último que un enfoque sumamente importante de los programas o ensayos de pre-mejoramiento y mejoramiento del algodón, hace hincapié en la búsqueda de materiales genéticos que posean resistencia o tolerancia a diversas cepas de *Xcm*, para evitar la liberación de variedades al mercado que puedan verse afectadas por la MAA, repercautiendo así en la rentabilidad del cultivo.

*Xcm* es una bacteria que cambia su material genético y evoluciona, volviéndose capaz de infectar una amplia gama de variedades de algodón. A la actualidad, se han identificado más de 22 razas de *Xcm*, siendo de todas ellas, la raza 18 considerada como una de las más agresivas y peligrosas para el sistema productivo algodónero mundial. Actualmente, hay poca o nula información acerca de la

variabilidad poblacional de *Xcm* en el sistema algodónero provincial, problemática que debe abordarse para evaluar el comportamiento del germoplasma disponible de algodón y que permita su mejoramiento genético frente a las diferentes razas de *Xcm* presentes en la zona.

Previamente, nuestro grupo de investigación ha identificado y aislado durante la campaña 2018/2019, 36 cepas bacterianas a partir de bochas y hojas con síntomas de MAA, presentes en ciertos genotipos de algodón susceptibles a la enfermedad (Lorenzini et al., 2019, APPA).

El presente trabajo busca sentar bases en el conocimiento de la variabilidad genética del patógeno en el sector productivo algodónero del norte santafesino, al realizar la caracterización molecular de aislamientos bacterianos provenientes de órganos de algodón afectados por la MAA. Los resultados presentados en este artículo formaron parte del trabajo de tesina de grado para obtener el título de **Licenciado en Biotecnología** de Lorenzini, Fernando (Directora: Dra. Roeschlin, Roxana; Co-director: Dr. Paytas, Marcelo).

### Objetivo

Caracterizar molecularmente aislamientos de la bacteria *Xcm*, agente causal de la MAA, de manera de sentar bases en el conocimiento de la diversidad de razas en el norte santafesino.

### Materiales y Metodos

#### Cepas bacterianas y material vegetal utilizados

Fueron utilizadas 36 cepas bacterianas aisladas de tejido de algodón de las variedades DP 50 y Poraite INTA, mostrando sintomatología de MAA tanto en bochas como en hojas, durante la campaña 2018/19. Asimismo, fueron utilizados cotiledones completamente expandidos de algodón variedad DP 50 (susceptible a MAA), crecidos en invernadero bajo condiciones semi-controladas.

#### Ensayos de patogenicidad en algodón susceptible a MAA

Colonias frescas (24-48 hs de crecimiento) de las bacterias utilizadas fueron crecidas en medio de cultivo Agar Nutritivo. Se prepararon suspensiones bacterianas, a partir de las colonias crecidas, en una solución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> estéril. Las suspensiones bacterianas fueron inoculadas en la cara abaxial (inferior) de los cotiledones utilizando una jeringa sin aguja. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en invernadero y monitoreadas durante 10 días.

#### Caracterización molecular de los aislamientos

De manera de caracterizar molecularmente los aislamientos, se realizó la amplificación por PCR (del inglés, Reacción en Cadena de la Polimerasa) de una región parcial del gen *lepA*, conservado dentro del género *Xanthomonas*. Los productos de PCR obtenidos fueron corroborados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### Análisis filogenético

Los productos de PCR obtenidos para el gen *lepA* fueron

enviados para su secuenciación al servicio provisto por *Macrogen Inc* (Corea). Una vez obtenidas las secuencias, las mismas fueron alineadas con secuencias *lepA* de 219 cepas de *Xanthomonas* de diversas especies utilizando el software MAFFT, y se construyó un árbol filogenético utilizando el software IQtree.

### Resultados y Discusión

#### Ensayos de patogenicidad en algodón susceptible a MAA

Suspensiones de 36 aislamientos bacterianos, obtenidos a partir de genotipos de algodón que presentaron síntomas de MAA, fueron inoculados en cotiledones de algodón susceptible a la enfermedad (variedad DP 50) y monitoreados fenotípicamente a distintos días post-inoculación (dpi). Los aislamientos 7 y 19 mostraron sintomatología típica de MAA a partir de los 5 dpi en cotiledones, tal como se muestra en la Figura 1.

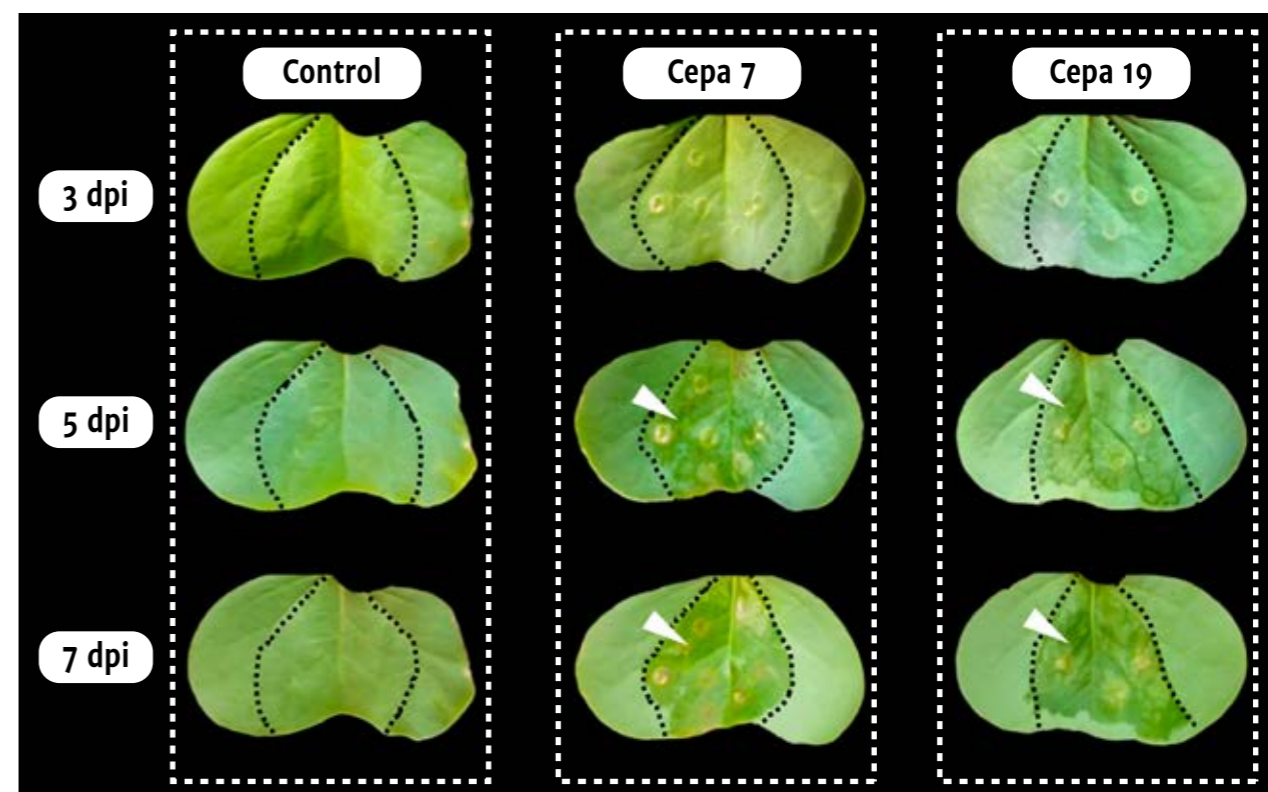


Figura 1. Fenotipos de MAA generados al inocular la cara abaxial (inferior) de cotiledones de algodón variedad DP 50 con los aislamientos 7 y 19, observados a diferentes días post inoculación (dpi). Las flechas blancas señalan las zonas de MAA. Las líneas punteadas definen el área de inoculación. Como control negativo (Control) se utilizó una solución de MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

#### Caracterización molecular de los aislamientos

Resulta de gran importancia conocer las razas de *Xcm* que circulan en nuestra región, para así desarrollar las estrategias biotecnológicas de mejoramiento del cultivo de algodón que respondan a los estreses presentes. Actualmente, las técnicas moleculares basadas en la utilización de la PCR, son metodologías simples y confiables aplicadas para estudios de microbiología, y particularmente útiles para el diagnóstico de enfermedades bacterianas de plantas. Estos métodos moleculares proporcionan cada vez más niveles de discriminación entre bacterias estrechamente relacionadas. La amplificación de una región parcial del gen *lepA*, conservado para *Xanthomonas*, permitió demostrar que los aislamientos 7 y 19, que provocaron sintomatología de MAA en tejido de algodón susceptible a la enfermedad, pertenecen efectivamente al género bacteriano mencionado, acorde a los productos de PCR obtenidos y analizados en gel de agarosa al 1% (Figura 2).



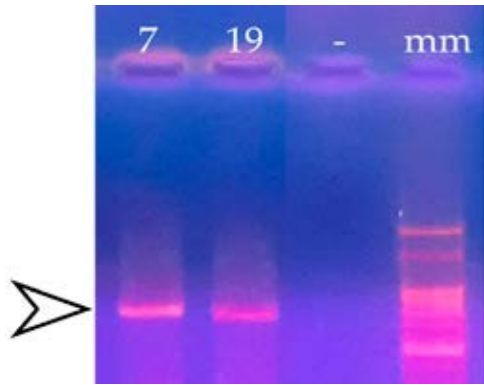


Figura 2. Caracterización molecular de los aislamientos bacterianos 7 y 19, mediante la amplificación de una región parcial del gen lepA. La flecha blanca indica los productos de PCR de lepA de aproximadamente 900 pb. "-": control negativo. "mm": marcador de masa molecular Ladder 100pb precisión.

**Análisis filogenético**

Para determinar a qué grupo de bacterias pertenecen los aislamientos obtenidos, fue necesario compararlos genéticamente con una base de datos de organismos bacterianos similares que permita clasificarlos y agruparlos. Para ello, se realizó un análisis filogenético de las secuencias de lepA de 219 cepas presentes en un banco de datos genéticos de bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas*, y se las comparó con las secuencias obtenidas de los aislamientos 7 y 19. Este análisis clasificó a las 219 secuencias analizadas en 8 grandes especies y subespecies dentro del género *Xanthomonas*. Las cepas en estudio (cepas 7 y 19) fueron agrupadas junto con aislamientos pertenecientes a *Xcm*, confirmando que las mismas pertenecen efectivamente al grupo de patógenos productores de MAA (Figura 3A).

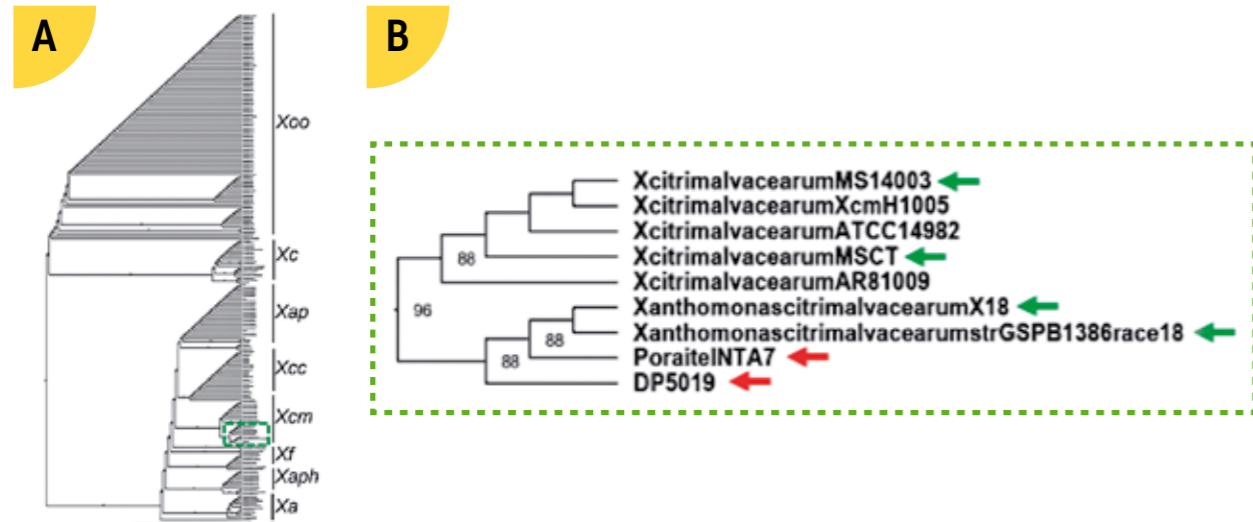


Figura 3. Análisis filogenético de los aislamientos de bacterianos obtenidos en este trabajo. A: Árbol filogenético completo con el total de secuencias analizadas, el cual fue construido basado en las secuencias parciales de lepA de 219 cepas diferentes de *Xanthomonas* y las 2 cepas en estudio del presente trabajo. Los programas MAFFT e IQTree fueron utilizados para el alineamiento y la construcción del árbol, respectivamente. Xa: *Xanthomonas alfalfae*; Xap: *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*; Xaph: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; Xc: *Xanthomonas campestris*; Xcc: *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; Xcm: *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*; Xf: *Xanthomonas fuscans*; Xoo: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. B: Subgrupo perteneciente a *Xcm* en el cual fueron agrupadas las secuencias lepA de las cepas 7 y 19. Las flechas rojas señalan las cepas en estudio (PoraitelNTA7: Cepa 7; DP5019: Cepa 19). Las flechas verdes señalan cepas de *Xcm* pertenecientes a la raza 18.

Es necesario recalcar que como se observa en la Figura 3B, las secuencias obtenidas de las cepas 7 y 19 fueron sub-agrupadas dentro del grupo de las *Xcm* junto con otras cepas, algunas pertenecientes a la raza 18. Sin embargo, se desconoce la raza a la cual pertenecen las demás bacterias agrupadas junto a las cepas en estudio. Con el fin de corroborar de manera precisa a qué raza pertenecerían los aislamientos 7 y 19 de *Xcm* obtenidos, será necesario un estudio filogenético de mayor amplitud, utilizando la secuencia de dos o más genes conservados y, en simultáneo, la utilización de ensayos de patogenicidad en materiales vegetales de algodón que presenten diferentes genes de resistencia a las diversas razas de *Xcm*.

**Conclusiones**

Se realizó la caracterización molecular de dos cepas de *Xcm* obtenidas mediante el aislamiento de tejido infectado de MAA durante la campaña 2018/19. La caracterización molecular, junto con el análisis filogenético realizado, permitieron demostrar que las cepas 7 y 19 de la colección de aislamientos obtenida, pertenecen efectivamente al grupo de las *Xcm*, agente causal de la MAA. A su vez, las cepas fueron sub-agrupadas dentro de un sub-grupo junto con algunas cepas pertenecientes a la raza 18 de *Xcm*, sugiriendo que las cepas en estudio podrían pertenecer a dicha raza bacteriana.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo presentan una base de valioso interés para el programa de mejoramiento genético del cultivo de algodón, con enfoque en características fitosanitarias de las variedades utilizadas, en relación a *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, agente causal de la mancha angular en algodón.

Desde ICAC proponen aclarar estas "VERDADES" sobre el algodón

**1** ICAC estima que una sola tonelada de algodón proporciona empleo durante todo el año para 5 o 6 personas, a menudo en algunos de los lugares más empobrecidos de la tierra.

El algodón ocupa solo el 3% de la superficie agrícola del mundo, pero satisface el 27% de las necesidades textiles del mundo. ¡Eso está haciendo que tu fibra valga la pena! A nivel mundial, el uso de la tierra del algodón se ha mantenido relativamente constante en los últimos 50 años, pero el volumen de fibra producida ha aumentado.

**2**

**3** ¡El algodón se usa para hacer mucho más que tela cómoda! Una tonelada de semillas de algodón produce alrededor de 145 kilos de aceite, que se pueden usar para cocinar, cosméticos y jabón, entre otras cosas, mientras que la harina y el pellets de semillas de algodón se pueden usar como alimento para animales y fertilizante.

El algodón es una xerofita, una planta que requiere muy poca agua para crecer. Básicamente es un cultivo del desierto, con un sistema de raíces profundas que es ideal para climas áridos. Una planta de algodón necesita agua en momentos críticos durante su crecimiento para producir un buen rendimiento, pero la mayoría de las veces, ¡la lluvia estacional (a veces asistida por riego) es todo lo que necesita el algodón!

**4**

**5** ¿El algodón orgánico ofrece mejor calidad que el algodón convencional? En una palabra: No. Hay muchos factores que pueden afectar la calidad del algodón, pero si se cultiva de manera orgánica o convencional no está entre ellos.

¿Qué puedes hacer con 100 kg de algodón? 100 pares de jeans, 550 camisetitas para hombres, 3.000 pañales, 130.000 billetes de \$100, 300.000 bolas de algodón ¡También se puede usar para hacer filtros de café, jabón, aderezos para ensaladas, carpas, encuadernaciones de libros, redes de pesca y cosméticos!

**6**

