

Factores Bioticos

Biotecnología: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección adecuada de la mancha angular del algodón.

Dra. Roxana Roeschlin
Ing. Agr. Gonzalo Scarpín - MP 3/0206
Ing. Agr. Horacio Martín Winkler
Ing. Agr. Pablo Dileo
Dr. Marcelo Paytas - MP 3/0116
EEA Reconquista

roeschlin.roxana@inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

El algodón es un cultivo que al ser afectado por un gran número de enfermedades y plagas depende en gran medida del uso de diversos productos químicos para su crecimiento y desarrollo. Una de las enfermedades de distribución a nivel mundial es la mancha angular del algodón (MAA), causado por la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*). *Xmc* es capaz de infectar todos los órganos de la planta y causar defoliación prematura de las hojas, debilitamiento del tallo, pudrición y caída prematura de bochas, y reducción de la calidad de algodón debido a la tinción de las fibras a causa del crecimiento bacteriano. Se han encontrado más de 20 razas de *Xcm* en el mundo, siendo la raza 18 una de las más agresivas y mayormente distribuidas. Actualmente, no se han encontrado productos químicos que controlen la enfermedad. Sin embargo, a nivel mundial las estrategias de manejo de la MAA incluyen el análisis y tratamiento de las semillas, el seguimiento y vigilancia de los cultivos, rotación y utilización de variedades resistentes. En Argentina, la producción algodonera se basa principalmente en la utilización de cuatro variedades comerciales: NuOpal y DP402, consideradas tolerantes a la MAA; y Guazuncho2000 y DP1238, resistentes a la MAA.

Actualmente, las técnicas biotecnológicas basadas en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (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. El método implica 3 etapas de análisis: la amplificación por PCR de secuencias blanco usando cebadores específicos, la purificación del producto de PCR y la secuenciación del ADN amplificado. Los cebadores específicos para la amplificación de secuencias parciales de dos genes conservados, *gyrB* (subunidad B de la ADN girasa) y *lepA* (proteína de unión a GTP) son apropiados para la identificación de especies dentro del género *Xanthomonas*. Su confiabilidad en la identificación de especies de *Xantho-*

monas ha demostrado ser útil para diagnóstico temprano de las enfermedades y estudios filogenéticos. El diagnóstico de las enfermedades emergentes y diseño de estrategias sostenibles para el control de las mismas requiere la identificación precisa del agente causal para luego estudiar las dinámicas de cambios poblacionales de dichos patógenos.

OBJETIVOS

- Aislar e identificar fenotípicamente la bacteria *Xcm* asociada a la MAA en cultivares de algodón.
- Caracterizar molecularmente la colección de aislamientos de *Xcm*

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue realizado en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA en Reconquista durante las campañas 2016/17 y 2017/18. El diagnóstico y la identificación de la MAA se realizó sobre lotes sembrados con diferentes genotipos de algodón pertenecientes al banco de germoplasma INTA Saenz Peña y variedades comerciales. Cada genotipo fue examinado después del cut-out en etapa de maduración, analizándose por cada genotipo 2 a 3 plantas al azar. Se recolectaron hojas y bochas con posibles síntomas de MAA para posterior aislamiento e identificación de *Xcm*.

Las zonas infectadas presentes en cada una de las muestras recolectadas fueron cortadas en pequeños pedazos (4 x 2 mm), esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% P/V por 4 min y lavadas con agua destilada estéril dos veces. Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas en 500 µl de 10 mM MgCl₂. Las suspensiones bacterianas fueron aisladas en placas de Petri con medio NA (nutritivo-agar) e incubadas a 30°C por 24 a 72h. Aquellas colonias de color amarillo, de forma convexa y brillantes (características fenotípicas típicas de *Xanthomonas* spp.), fueron reaisladas en una nueva placa con medio NA y conservadas en 20% P/V glicerol a -20°C.



A través de análisis moleculares se determinó a que subgrupo dentro del género *Xanthomonas* pertenecen los aislamientos obtenidos. Para ello, se realizó la amplificación mediante PCR de secuencias parciales de los genes *gyrB* y *lepA*. En paralelo, se realizaron ensayos de infección en plantas de algodón con los aislamientos bacterianos obtenidos bajo invernadero. Para ello, las variedades Chaco 510 (Ch510), Paymaster 145 (Pay145) y DeltaPine 50 (DP50), conocidas por su susceptibilidad a *Xcm*, fueron inoculadas por infiltración con las suspensiones bacterianas y fotografiadas luego de 7 días post-infección (dpi). Luego, el patógeno fue reaislado a partir de los síntomas producidos siguiendo la metodología descripta previamente para verificar que sus características morfológicas coincidan con las previamente identificadas para culminar el cumplimiento de los Postulados de Koch.

RESULTADOS

Diagnóstico de síntomas relacionados a la MAA e identificación morfológica de *Xanthomonas* spp. en cultivares de algodón

El proyecto de análisis de la diversidad de razas de *Xcm* en el norte de la provincia de Santa Fe se inicia con el diagnóstico de la presencia de síntomas relacionados a la MAA en cultivares de algodón sembrados en la EEA INTA Reconquista durante las campañas 2016/17 y 2017/18. En la Figura 1A se muestran síntomas representativos observados en bochas de algodón. El análisis de diferentes genotipos de algodón permitió el aislamiento de diversas colonias bacterianas (Figura 1B; Tabla 1). En total se identificaron 30 aislamientos bacterianos los cuales mostraron coloración amarilla y mucoide, características fenotípicas típicas de *Xanthomonas* spp (Figura 1C).

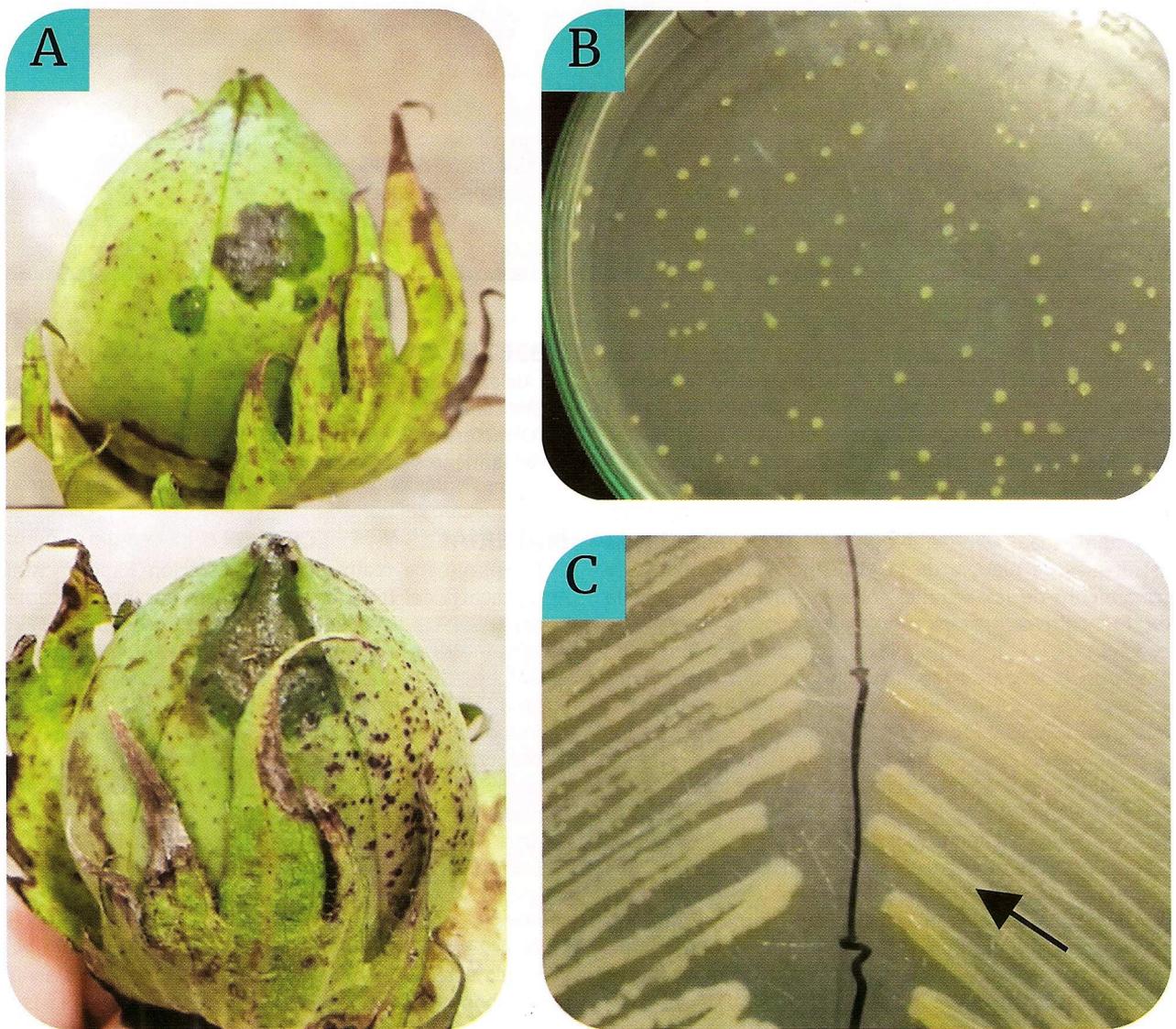


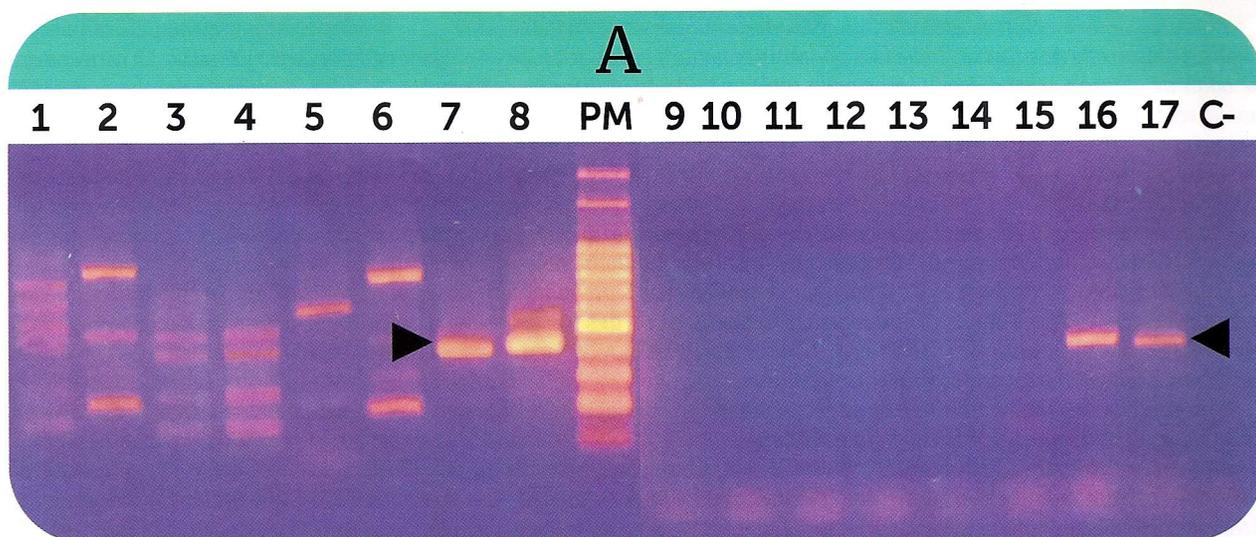
Figura 1. Sintomatología y caracterización fenotípica de las cepas de *Xanthomonas* spp. A. Imágenes representativas de la sintomatología observada en bochas de algodón pertenecientes al genotipo DP50 observado en la campaña 2017/18. B. Colonias obtenidas en placas de Petri. C. Morfología de las colonias aisladas en el medio NA. La flecha señala la coloración propia de *Xanthomonas* spp.

Tabla 1. Cepas bacterianas de *Xanthomonas* aisladas en la EEA INTA Reconquista

Campaña 2016/17			Campaña 2017/18		
Aislado	Origen	Tejido/Fruto	Aislado	Origen	Tejido/Fruto
1	Poraite INTA	Hoja	8	NuOpal	Hoja
2	Cacique INTA	Hoja	9	Ch510	Hoja
3	NuOpal	Bocha	10	Ch510	Hoja
4	SP6565	Hoja	11	NuOpal	Hoja
5	SP41255	Hoja	12	NuOpal	Hoja
6	SP1276	Hoja	13	Ch510	Hoja
7	SP187	Bocha	14	Ch510	Hoja
			15	Ch510	Hoja
			16	DP50	Bocha
			17	DP50	Hoja
			18	DP50	Bocha
			19	DP50	Bocha
			20	DP50	Bocha
			21	DP50	Hoja
			22	Pay145	Hoja
			23	Pay145	Hoja
			24	Pay145	Hoja
			25	Pay145	Hoja
			26	Pay145	Bocha
			27	Pay145	Bocha
			28	NuOpal	Hoja
			29	NuOpal	Bocha
			30	NuOpal	Hoja

Caracterización molecular de los aislamientos de *Xanthomonas* spp. productoras de la MAA

Para la caracterización molecular, los pares de cebadores *gyrB* y *lepA* fueron utilizados para amplificar el ADN total proveniente de los 30 aislamientos bacterianos. Los productos de amplificación de aproximadamente 500 pares de bases (pb) y 900 pb correspondieron a las amplificaciones de las secuencias parciales de los genes *gyrB* y *lepA*. Los resultados demostraron que sólo 4 aislamientos analizados poseen las secuencias esperadas. Como se muestra en la Figura 2, los aislamientos 7, 8, 16 y 17 resultaron ser positivos.



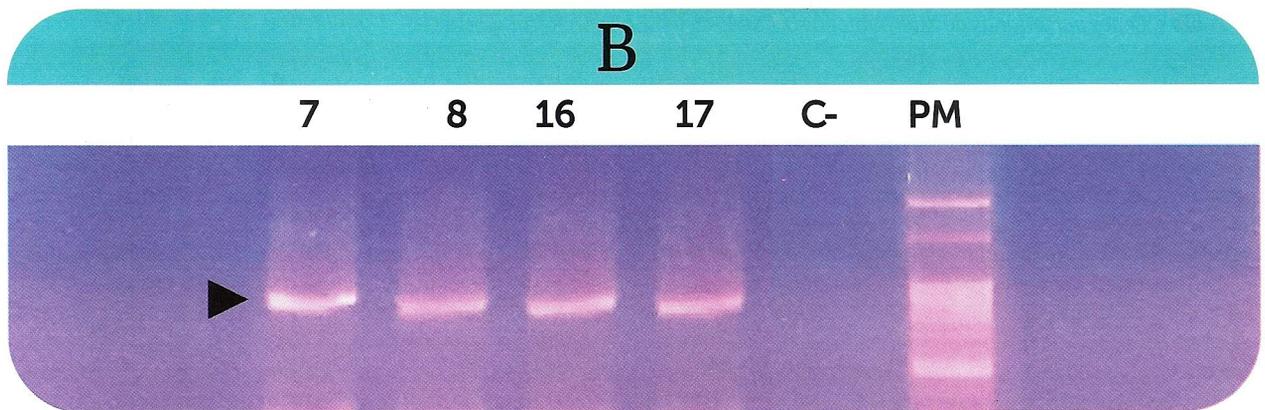


Figura 2. Identificación molecular de *Xcm*. A. Amplificación parcial del gen *gyrB*. Gel de agarosa de los productos de PCR de los aislamientos 1 a 17. La flecha indica el producto de PCR de *gyrB* de aproximadamente 500pb para los aislamientos 7 (SP187), 8 (NuOpal), 16 y 17 (DP50). B. Amplificación parcial del gen *lepA*. Gel de agarosa de los productos de PCR de los aislamientos 7, 8, 16 y 17. La flecha indica el producto de PCR de *lepA* de aproximadamente 900 pb. C : control negativo de reactivos; PM: marcador de peso molecular.

Ensayos de patogenicidad en hojas de algodón

Paralelamente a la caracterización molecular se realizaron ensayos de interacción planta patógeno bajo condiciones de invernadero. Para llevar a cabo este estudio se inocularon plantas de algodón por el método de infiltración con suspensiones bacterianas de los 4 aislamientos identificados molecularmente como *Xcm*. Estos estudios demostraron que los aislamientos identificados son capaces de inducir la sintomatología propia de MAA, que consiste en un macerado y aclaramiento en el área inoculada luego de 10 días post-inoculación. En la *Figura 3* se muestran los síntomas obtenidos en los genotipos de algodón DP50, Ch510 y Pay145 infiltrados con el aislamiento 7.



Figura 3. Desarrollo de síntomas inducidos por el aislamiento 7 en los genotipos de algodón DP50, Ch510 y Pay145. La cara abaxial de hojas de algodón expandidas fue inoculada por el método de infiltración con suspensiones bacterianas de *Xanthomonas*. Las imágenes fueron tomadas 10 días post infección.

CONCLUSIÓN

Durante las campañas analizadas se observó la presencia de síntomas relacionados a la MAA en bochas y hojas presentes en ciertos genotipos de algodón susceptibles a *Xanthomonas* spp.

El diagnóstico morfológico y molecular de los aislamientos bacterianos permitió la identificación de 4 cepas pertenecientes a *Xcm*. Para corroborar estos resultados, se deberá determinar la secuencia de los productos de PCR obtenidos. Para ello, los productos de PCR serán purificados y enviados a secuenciar el ADN amplificado a través del servicio de secuenciación Macrogen (Korea).

Bajo condiciones de invernadero se pudo mediante ensayos de patogenicidad reproducir la sintomatología de MAA en plantas de algodón susceptibles a la enfermedad.

En base a los resultados obtenidos durante ambas campañas donde se detectó la presencia de MAA, se considera necesario continuar con el seguimiento y diagnóstico de la enfermedad a campo para contribuir al manejo integrado de *Xcm*, agente causal de la mancha angular de algodón.

