

Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales

Programa Nacional de Cultivos Industriales
Centro Regional Chaco - Formosa
Centro Regional Tucumán - Santiago del Estero
Centro Regional Santa Fé

Algodón



algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman, 1843. 9° Congreso Brasileiro de Algodón. 7 septiembre de 2013. Brasilia. 175-2.

13- Sosa M., Vitti Scarel D., Almada M. 2009. Avance del Picudo del Algodonero (*Antho-*

nomus grandis Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) en el departamento General Obligado (Santa Fe). INTA Estación Experimental Agropecuaria Reconquista. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 279.

Nuevo método para la evaluación del comportamiento sanitario de variedades de algodón frente a enfermedad azul

Verónica C. Delfosse¹, Yamila C. Agrofoglio¹, María F. Casse², Esteban Hopp¹, Iván Bonacic Kresic² y Ana J. Distéfano¹.

1- INTA, Instituto de Biotecnología, CICVyA. 2- INTA, EEA Sáenz Peña, CR Chaco-Formosa. Correo-e: distefano.ana@inta.gob.ar, delfosse.veronica@inta.gob.ar

El algodón (*Gossypium* spp.) representa una de las especies textiles de más amplia difusión como fuente de fibra natural y es uno de los cultivos económicamente más importantes del mundo. En nuestro país es un cultivo regional clave para el Noreste de Argentina (NEA) siendo la cadena agroindustrial del algodón muy importante en el aspecto económico y social de la región. Se cultiva en una amplia zona ecológica entre los 25° y 31° de latitud sur y comprende las provincias de Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Salta, Santa Fe y Santiago del Estero. Chaco es la principal provincia algodонера, con una participación del 54% de la superficie total sembrada en el país cubriendo en los últimos años aproximadamente 600.000 hectáreas (7).

La enfermedad de origen viral más importante en el cultivo de algodón en Sudamérica es la enfermedad azul. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en la República Centroafricana en el año 1949 y partir de ese momento se reportó en varias regiones de África, Asia y América. En Argentina puede señalarse como antecedente lo que durante la campaña agrícola 1982/83 se denominó "mal de Misiones" y afectó en la provincia de Misiones a variedades de algodón producidas por INTA. La enfermedad es

producida por el *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) (3). El virus es transmitido en forma circulativa y no-propagativa por el pulgón del algodón *Aphis gossypii*. La transmisión es mediada por áfidos que se alimentan de plantas infectadas con CLRDV, adquieren el virus y luego al alimentarse en plantas sanas lo transmiten. El virus posee un genoma de ARN simple cadena positiva y está restringido a las células acompañantes de floema de plantas de algodón, es por ello que no es posible la transmisión mecánica desde una planta enferma a una planta sana. Los síntomas característicos de la enfermedad son enanismo por acortamiento de los entrenudos, enrollamiento de las hojas, textura coriácea con coloración verde oscura-azulada y las nervaduras se tornan amarillas en infecciones severas (Fig. 1, A).

En Argentina y Brasil la enfermedad azul representa un serio problema para la producción de algodón, ocasionando elevadas pérdidas de rendimiento si las plantas se infectan en estadios tempranos de su desarrollo volviéndose improductivas. Si los áfidos transmisores no son controlados durante la época de siembra, la infección viral puede llegar a afectar la productividad del material susceptible hasta en un 80%, causando importantes pérdidas económicas. Los insectos

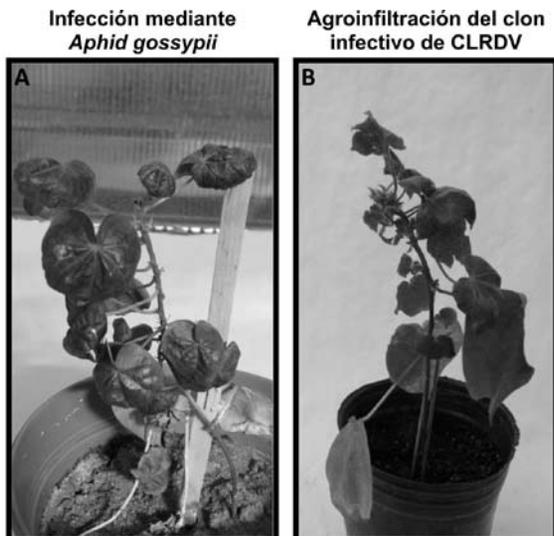


Figura 1. Plantas de algodón variedad NC33B, susceptibles a la infección por CLRDV. A. Planta infectada mediante áfidos (*Aphis gossypii*) virulíferos. B. Planta agroinfiltrada con el clon infectivo de CLRDV. En ambos casos los experimentos se realizaron en invernáculo y condiciones controladas.

tizadas son efectivos para el control de los áfidos transmisores de la enfermedad, pero son caros, tóxicos para el ambiente y no proveen protección durante todo el ciclo del cultivo. El desarrollo y uso de cultivares de algodón resistentes a la enfermedad constituyen la mejor herramienta de control. Royo y col. (6) realizaron un relevamiento de 283 variedades de algodón contra enfermedad azul bajo condiciones de infección natural a campo y encontraron que la gran mayoría de las variedades provenientes de Estados Unidos son susceptibles y la resistencia existe en el germoplasma proveniente de los países Africanos como así también en nuevos materiales genéticos derivados del germoplasma africano (6).

Tradicionalmente, en los programas de mejoramiento del cultivo de algodón, la selección de variedades con resistencia genética a la enfermedad azul se realiza mediante la infección de las plantas con insectos vectores virulíferos que fueron criados en el laboratorio y que adquirieron el virus de plantas infectadas. Este método es complejo porque requiere de mucho tiempo para mantener la población de áfidos viable durante todo

el año, instalaciones especiales para evitar el escape de los insectos y a su vez la cantidad de vectores disponible limita el número de material a evaluar. Otra estrategia para la evaluación del material es la siembra bajo condiciones de infección natural a campo. Estas determinaciones son muy dependientes de las infestaciones naturales de áfidos, las cuales no presentan una distribución uniforme en el campo. Esta variabilidad puede alterar el resultado y otorgar características resistentes a plantas susceptibles que no han sido infectadas. Por otro parte, la incidencia de la infección, dependiente de la presencia del áfido, es variable en cada campaña. Más aún, la sincronización entre la presencia de los vectores y el estadio de desarrollo de la planta es indispensable para la identificación de genotipos resistentes (9).

En el año 2010 el grupo logró por primera vez la secuencia completa del genoma del virus CLRDV asociado a la enfermedad azul del algodónero (3). La información del genoma completo permitió la construcción de un clon infectivo del CLRDV con el objetivo de desarrollar una metodología alternativa de infección que permitiera independizarse del sistema tradicional de evaluación con el áfido transmisor (2). Un clon infectivo consiste en clonar el genoma completo de un virus, en este caso el *Cotton leafroll dwarf virus*, y colocarlo en un vector que permite expresar el genoma viral en la planta e iniciar el ciclo de infección, tal cual como sucede en su ciclo natural. En el nuevo sistema de infección el clon infectivo del virus es introducido en la planta de algodón a través de un método eficiente de inoculación que se denomina agroinfiltración. Esta técnica utiliza una bacteria como vehículo para transportar el genoma viral dentro de la célula vegetal. *Agrobacterium tumefaciens* es una α -proteobacteria con la capacidad de transferir a una planta hospedadora un fragmento de ADN a partir una molécula de ADN circular denominado plásmido-Ti. Se trata del único organismo conocido con

la capacidad de transferir genes de manera lateral entre reinos (de bacterias a plantas). Para ello *Agrobacterium* reconoce señales producidas en una herida de la planta (fenoles, monosacáridos o pH bajo). Estas señales inducen la expresión de genes de virulencia en la bacteria cuyos productos son necesarios para el procesamiento y transporte del T-ADN de la bacteria a la célula vegetal. Esta capacidad de transmisión de ADN es extensamente explotada por la biotecnología, como herramienta para transferir y en algunos casos insertar genes foráneos dentro de las plantas (7).

Para el desarrollo del clon infectivo del CLRDV se colocó una copia en ADN (ADNc) del genoma completo del CLRDV bajo el control de un promotor de origen viral (denominado 35S, proveniente del virus del mosaico de la coliflor) (Fig. 2). Esto asegura la expresión del genoma del virus dentro de la planta. Se utilizó el plásmido pBin19 para incorporar la construcción viral dentro de *A. tumefaciens*. Una vez obtenida la bacteria portadora de la construcción viral, la agroinfiltración se realizó en los dos cotiledones de plantas de algodón de la variedad NC33B y Guazuncho 2, variedades susceptibles y resistentes a CLRDV, respectivamente, en estadio de una hoja verdadera expandida. Transcurridas las tres semanas posteriores a la inoculación, se comenzaron a observar los primeros síntomas de infección en aquellas plantas con germoplasma susceptibles al virus mientras que las plantas resistentes no desarrollaron la enfermedad (Fig. 2). A las seis semanas postinoculación, las plantas manifestaron síntomas similares a los desarrollados por una planta infectada a través del método tradicional con el áfido virulífero (Fig. 1, A y B). A continuación se realizaron distintos ensayos moleculares a través de los cuales se pudo confirmar la presencia del genoma viral y sus productos génicos en aquellas hojas que no habían sido infiltradas (hojas superiores). A través de la técnica de Northern blot se confirmó la presencia del genoma a

ARN viral en las hojas superiores y mediante Western blot se confirmó la presencia de la proteína de la cápside del virus en el tejido sin agroinfiltrar. Estos resultados confirman que la inoculación del clon infectivo a través de la agroinfiltración permite la replicación viral en el sitio de infección, la movilidad de las partículas entre células contiguas y a su vez su distribución en forma sistémica hacia las hojas superiores. De esta manera el virus logra establecer la infección y se manifiestan los síntomas típicos de la infección natural. A su vez, se demostró que el virus presente en las plantas infectadas con el clon infectivo puede ser transmitido por el insecto vector. Para ello se utilizaron áfidos avirulíferos alimentados en las plantas infectadas por el clon infectivo que luego fueron transferidos a plantas sanas. Tiempo después, las plantas sanas manifestaron los síntomas de la enfermedad azul, indicando que el virus que se genera a partir del clon infectivo posee las mismas características del virus obtenido en las infecciones naturales y conserva la capacidad de ser transmitido por el insecto vector.

La técnica de infección desarrollada representa una herramienta biotecnológica muy importante y podrá utilizarse como sistema de infección de rutina en los programas de mejoramiento de algodón siendo un método más sencillo y económico que el sistema de pulgones infectivos. El clon infectivo permitirá acelerar la selección de posibles genes de resistencia y/o tolerancia al CLRDV en el germoplasma de algodón, que puedan ser utilizados en mejoramiento e introgresión en variedades élite. Además, permitirá realizar distintos tipos de estudios para avanzar en el conocimiento del patosistema algodón-virus-vector. En este sentido, se demostró que la agroinfiltración del clon infectivo en plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* permite establecer la infección en ellas (2). Si bien no son plantas de interés agronómico, ni huéspedes naturales del virus, ambas represen-

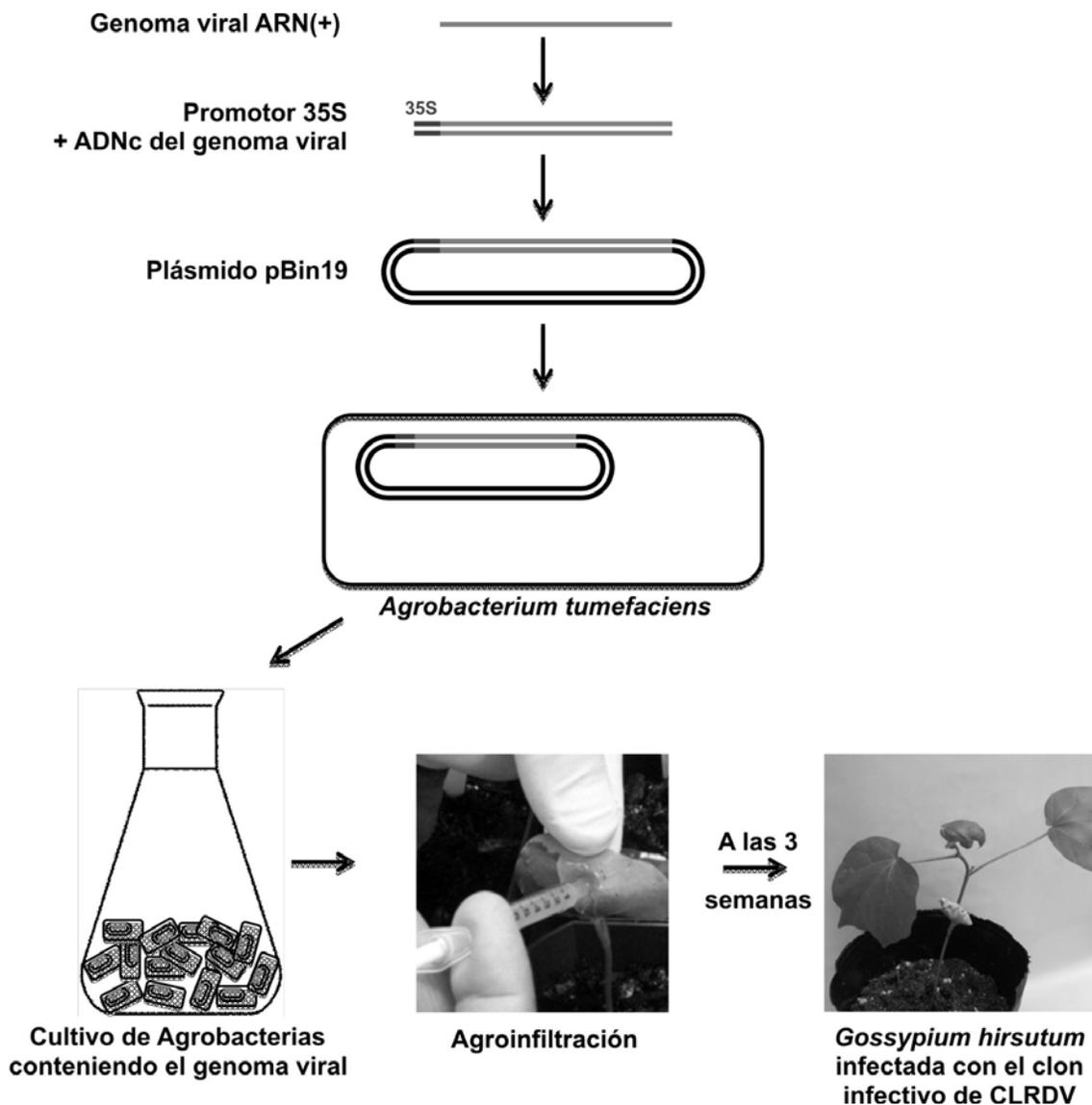


Figura 2. Representación gráfica de la construcción de un clon infeccioso de CLRDV y su incorporación en *Agrobacterium tumefaciens* para la inoculación en cotiledones de plantas de algodón. A las tres semanas postinoculación se observan los primeros síntomas en las hojas jóvenes.

tan grandes herramientas para el estudio y caracterización de la interacción entre la planta y el virus. Entre las ventajas de poder trabajar con estas especies se encuentra el hecho de que cuentan con la totalidad de sus genomas secuenciados, ensamblados y ampliamente estudiados. Además, existe una amplia variedad de conocimientos obtenidos a partir de estudios realizados con ellas (4,5). Es por ello que la utilización del clon infeccioso en plantas modelo permitirá explotar estas ventajas en pos de poder dilucidar las funciones virales del CLRDV. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado en

Nicotiana benthamiana para la caracterización funcional de la proteína PO del CLRDV como supresor del mecanismo de silenciamiento postranscripcional del hospedante, uno de los mecanismos de defensa contra patógenos que poseen las plantas (1). El presente trabajo se realizó en forma conjunta entre el grupo de investigación en el cultivo de algodón perteneciente al Laboratorio Regional de Patología Vegetal de la Estación Experimental Agropecuaria Roque Sáenz Peña, INTA-Chaco y el grupo de Virología Molecular de virus de algodón del Instituto de Biotecnología del INTA-Castelar.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Delfosse V.C., Agrofoglio Y.C., Casse M.F., Kresic I.B., Hopp H.E., Ziegler-Graff V., Distéfano A.J. 2014. The P0 protein encoded by *cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus Res.* 180:70-5.
2. Delfosse V. C., Casse M. F., Agrofoglio Y. C., Bonacic Kresic I., Hopp H. E., Ziegler-Graff V., Distéfano A.J. 2013. Agroinoculation of a full-length cDNA clone of *cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research* 175(1):64-70.
3. Distéfano A.J., Bonacic Kresic. I., Hopp H.E. 2010. The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, *cotton leafroll dwarf virus*, confirms that it is a new member of the genus Polerovirus. *Archives of Virology* 155 (11): 1849-54.
4. Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(8):1015-26.
5. Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science.* 282(5389):662, 679-82.
6. Royo O.M., Erazzu L., Bonacic I., Poisson J., Montenegro A. (2003) Screening of cotton germplasm for "blue disease" under natural field infestation. *In: Swanepoel A (ed) Proceedings of the world cotton research conference-3, Cape Town, South Africa.* Agricultural Research Council-Institute for Industrial Crops (Publisher), pp 305–316.
7. Sistema Integrado de Información Agropecuaria, enero 2015. <http://www.sii.gov.ar/>
8. Tzfira T, Citovsky V. 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 17(2):147-54.
9. Violic A.D., Granados G., Marathée J.P., Paliwal R.L. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.

Análisis comparativo de dos sistemas productivos algodoneiros de pequeños productores de Santiago del Estero

Fernando Garay¹, Mario Mondino^{1,2}, Daniel Werenizky¹ y Mario Berton²

1- Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero. 2- INTA, EEA Santiago del Estero, CR Tucumán-Santiago del Estero.

Correo-e: fegaray@unse.edu.ar; mondino.mario@inta.gov.ar

INTRODUCCIÓN

El algodón es un cultivo tradicional en Santiago del Estero ocupando el segundo lugar en superficie sembrada y el primero en volumen producido (12).

Una clara particularidad de la producción de algodón en la provincia de Santiago del Estero es la composición de los estratos productivos y la distribución de las superficies de siembra, la que sigue una tendencia similar a lo que acontece a nivel nacional (15). Los productores minifundistas (hasta 10 ha) y pequeños (10-30 ha) representan el grueso de los productores con un 87,6 %

del total, sin embargo siembran solamente el 17,3% del total de la superficie provincial. Por el contrario los grandes productores representan el 1,9% del total, pero son responsables de la siembra de más del 50 % de la superficie con algodón (15).

Paz (18) menciona que la pequeña explotación campesina tradicional se distingue dentro de la estructura agraria por diferentes aspectos de su particular funcionamiento: a) son productores agropecuarios que producen en situaciones de escasez de recursos naturales y capital; b) utilizan principalmente mano de obra familiar en el