

COMBINACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTIRPES COMERCIALES DE BRADIRHIZOBIOS PARA LA SOJA.

López S. M. Y. ^(1, 2) & P. A. Balatti ^(1, 2)

(1) Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

(2) Centro de investigaciones en Fitopatología - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad Nacional de La Plata - La Plata (1900) Argentina. E-mail:

pbalatti@agro.unlp.edu.ar

RESUMEN:

La soja es una planta exótica en la Argentina en donde los suelos carecen de los simbioses específicos que nodulan esta leguminosa. A partir de la introducción de su cultivo en la Argentina se establecieron en los suelos poblaciones naturales que habitualmente compiten con los rizobios incorporados por medio de los inoculantes. De esta manera se ve comprometido el éxito de un proceso clave como es el de la inoculación, para que la planta desarrolle nódulos fijadores de N con las estirpes de rizobios seleccionados. En la Argentina, Brasil y Uruguay se utilizan distintas cepas para la formulación de inoculantes comerciales, por lo que es importante disponer de herramientas que permitan diferenciar rápidamente a estas estirpes de Bradyrhizobios. Por ello el objetivo de este trabajo fue desarrollar un conjunto de reacciones que permitan discriminar a los Bradyrhizobios de los inoculantes comerciales. Es decir, que permitan controlar la calidad de un inoculante comercial en lo que hace a su contenido. Para tal fin se combinaron reacciones de amplificación utilizando REP-PCR, BOX-PCR, multiplex-PCR y la amplificación de un fragmento interno de RS alfa. Los inoculantes comerciales que se utilizan en Brasil, Uruguay y Argentina se formulan preferentemente con cinco cepas, tres *Bradyrhizobium japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y dos *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019). La combinación de las reacciones mencionadas permite diferenciar a estas cepas en cultivos puros y a partir de colonias.

Palabras clave:

Bradyrhizobium Inoculantes Soja.

Introducción

La soja (*Glycine max* L. Merr) es dentro de las leguminosas uno de los granos más importantes a nivel mundial debido a su gran contenido proteico. La soja de la misma manera que gran parte de las leguminosas establece simbiosis con bacterias Gram (-) del suelo conocidas comúnmente como rizobios, en la que la planta nutre a la bacteria con carbono y la bacteria fija el N del aire y se lo entrega a la planta.

Se ha propuesto y se ha comprobado la coevolución de los organismos que interactúan entre sí, tanto a través de interacciones positivas como lo es la simbiosis de fijación de N, como cuando se trata de interacciones negativas como la de un patógeno y su hospedante (Eva H. Stukenbrock and Bruce A. McDonald, 2008). Esto explica porque los suelos de la Argentina de la misma manera que en Brasil y Uruguay carecen de rizobios que nodulan soja. Esto hace que los mismos se deban incorporar en el momento de la siembra lo que

consiste en adicionar a la superficie de la semilla una suspensión de alta densidad de bacterias fijadoras de N.

Bradyrhizobium japonicum fue considerado hasta 1980 el simbiote por excelencia de la soja (Fred et al., 1932). Sin embargo, el aislamiento de rizobios a partir de nuevas regiones del planeta y la disponibilidad de herramientas moleculares permitió a los investigadores identificar y/o reclasificar rizobios que ya se conocían como nuevos simbiotes de la soja. En el género *Bradyrhizobium*, se han descrito tres nuevas especies, dos de crecimiento lento, *B. japonicum* (Fred et al., 1932), *B. elkanii* (Kuykendal et al., 1992) y una de crecimiento extra lento *B. liaoningense* (Xu et al., 1995).

Las empresas formulan inoculantes comerciales para los tres países. Uno de los aspectos importantes de los inoculantes es analizar la calidad de los mismos, que radica en el número de células vivas por unidad de formulación, en ausencia de contaminantes y en comprobar por medio de fingerprints que la formulación tiene un alto número de la o las bacterias deseadas. En Argentina un porcentaje importante de los inoculantes están formulados con la estirpe E109 de *B. japonicum*, en Brasil y en Uruguay pueden contener las estirpes SEMIA5080, SEMIA5079, SEMIA5019 y SEMIA587.

En parte debido a lo reportado por Vachot-Griffin et al., 2005 quienes propusieron el uso de una combinación de fingerprints generados por 5 pares de primers distintos y en parte porque a veces es difícil distinguir entre algunas de las estirpes mencionadas que forman parte de los inoculantes comerciales, se planteó el objetivo de este trabajo que consistió en combinar un conjunto de reacciones de amplificación con el fin de discriminar en mezclas bacterianas y/o en formulaciones comerciales la composición bacteriana de la misma.

Materiales y Métodos

Estirpes bacterianas. Las estirpes utilizadas en este estudio fueron las cepas *B. japonicum* E109, SEMIA5079, SEMIA5080 y *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019. Stocks de estas cepas con 10% de glicerol se mantienen en freezer a -70°C. A partir de los stocks se realizaron estrías en medio Extracto de levadura, Manitol y Agar (EMA) se incubaron a 28°C por 7 días, luego de lo cual se mantuvieron en heladera. A partir de las estrías se iniciaron cultivos líquidos de estas estirpes en medio extracto de levadura manitol, los que se incubaron a 28°C y se airearon por agitación a 150 rev.min⁻¹ (Vincent, 1970). La calidad de los cultivos se determina en base a la apariencia y morfología de las colonias y observando un expandido del cultivo por tinción de Gram.

Extracción de ADN genómico. A partir de los cultivos líquidos de las estirpes en estudio se procedió a aislar el ADN genómico total (Sambrook et al., 1990).

Primers. Las secuencias de los primers de oligonucleótidos usados para las PCR se muestran en la Tabla 1.

Condiciones de PCR. Las condiciones de la reacción Box-PCR fueron: 50-100 ng de ADN molde, 50 pmol de primer, 2.0 mM de dNTPs, 1X de buffer PCR y 0.6U de Taq DNA polimerasa en un volumen final de 15 µl. El programa de la reacción fue un ciclo de 7 min a 94°C; 35 ciclos a 94°C por 1 min, 53°C por 1 min y 8 min a 65°C y finalmente un ciclo a 65°C por 16 min. La mezcla de la reacción REP-PCR contuvo 50 ng de ADN molde, 12.5 pM de cada primer, 2.5 mM de dNTPs, 1X de buffer PCR y 2.5U de Taq ADN polimerasa en un volumen final de 15 µl. el programa de la termocicladora fue: un ciclo de 3 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 1 min a 74°C, se finaliza con un ciclo de 10 min a 74°C.

Se utilizó también una reacción Multiplex – PCR que amplifica mediante un par de primers como SAR y SAL (Pastorino *et al.*, 2003), un fragmento de 900 pb correspondiente a la secuencias repetitiva de *Bradyrhizobium RS α* . La mezcla de reacción estuvo constituida por 10-20 ng de ADN molde, 0.5 mM de cada primer, 2.0 mM de dNTPs, 1X de buffer PCR y 2.5U de Taq ADN polimerasa en un volumen final de 15 μ l. El programa de la termocicladora consistió en un ciclo de 3 min a 94°C y 35 ciclos de 45 s a 95°C, 1 min a 65°C y finalmente 4 min a 72°C. Utilizando el producto de esta amplificación, que es el fragmento de 900 pb *RS α* , se procedió a realizar otra amplificación en tándem *RS α* . Para esto se realizó una mezcla de reacción que contenía 10-20 ng de fragmento molde; 2,0 mM de dNTPs; 1X de buffer PCR 1.5 de cloruro de magnesio, una concentración de 400 nM de cada primer y por último se adicionó 1U de Taq polimerasa. El programa de la termocicladora consistió en un ciclo de 4 min a 95°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C; a este le siguieron 30 ciclos de 1 min a 94°C; 1 min a 55°C y 1 min a 72°C; y un ciclo final de 5 min a 72°C (Minamisawa *et al.*, 1998).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados como primers de PCR

Primer	5'-3' nucleotide sequence	Primer	5'-3' nucleotide sequence
BOX	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	17	ACGCATACAACGACAGAGCC
REP1R	IIICGICGICATCIGGC	18	TCAAATCGCGCTGCAACGTC
REP21	ICGICTTATCIGGCCTAC	SAR	GGCTCGGCTCTGTCTGTTGTATGC
		SAL	AGCGGGCGCGGATAGTTCTGTTG

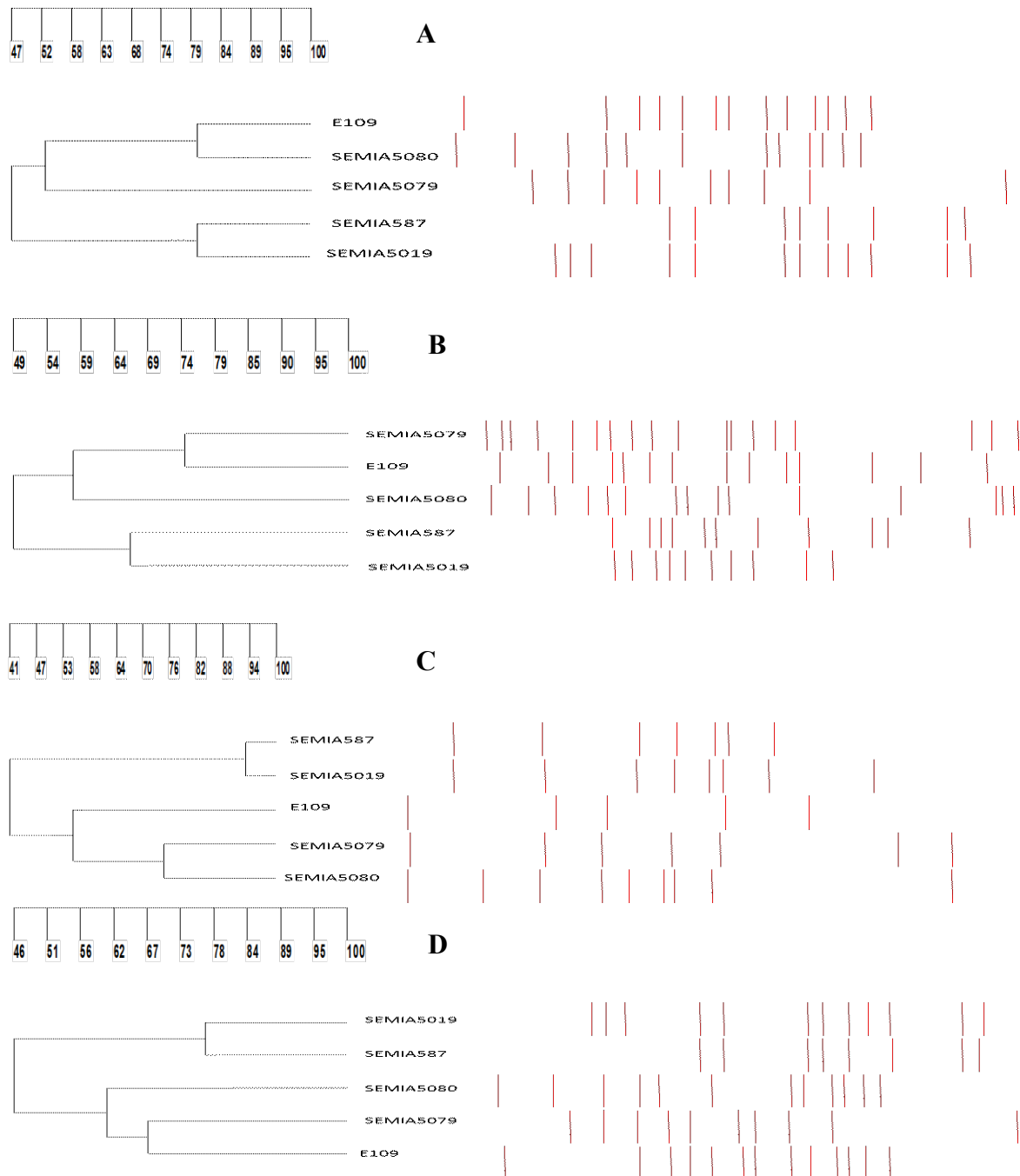
Para comprobar la eficiencia de la técnica se utilizaron inoculantes comerciales de los cuales se realizó una serie de diluciones y se sembraron un medio extracto de levadura, manitol agar suplementado con rojo congo. Las últimas tres diluciones, se incubaron en placas a 28°C durante 7 días al cabo de los cuales se repicaron las colonias a otra placa y al mismo tiempo se realizaron las reacciones de identificación utilizando una suspensión de las colonias en agua como templado de ADN.

RESULTADOS Y CONCLUSION

En la Fig. 1 a, b, c y d, se presentan los resultados de las amplificaciones realizadas. Puede verse que el nivel de similitud en general fue mayor entre los *B. japonicum* 5080, 5079 y E109 que entre estos y las estirpes de *B. elkanii* 587 y 5019. Esto se ve reflejado en el fenograma en que se analizan los fingerprints de cada método de amplificación en conjunto. Esto en primer lugar muestra que cada cepa tiene un fingerprint propio con la combinación de estas amplificaciones aun cuando los niveles de similitud entre las estirpes fue alto como es el caso de las dos estirpes de *B. elkanii* 587 y 5019.

Las reacciones permitieron identificar en las formulaciones comerciales a las bacterias con que se formularon los mismos tanto a partir de medio líquido como a partir de suspensión de colonias.

Fig. 1 Fenogramas estableciendo la similitud entre los genomas de las cepas comerciales de inoculantes obtenidos a partir de reacciones de amplificación BOX (A), REP (B) y RS α (C) y la combinación de todas ellas (D). Análisis realizado con el Software Gene Directory Syngene Inc.



Bibliografía

- De Bruijn F. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequence and Taq polymerase chain reaction to fingerprint the genome of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(1992):2180-2187.
- Fred, EB; FL Baldwin & E McCoy. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Study in Science N°5, Madison, Wis., USA.

- Kuykendall, LD; B Saxena; TE Devine & SE Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1992 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. can. J. Microbiol. 38(1992):501-505.
- Minamisawa K; T Isawa; Y Nakasuka & N Ichikawa. 1998. New *Bradyrhizobium japonicum* strain that possess high copy numbers of the repeated sequence RS α . Applied and Environmental Microbiology 65(1998):1845-1851.
- Pastorino GN; V Alcantará & PA Balatti. 2003. Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* [L.] Merr) by a multiplex PCR reaction. FEMS Microbiology letters 229(2003):153-158.
- Sambrook J & T Maniatis, Jr. 1989. C Nolan (ed.). Molecular cloning a laboratory manual. Vol. 1. 2da edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stukenbrock EH & BA McDonald. 2008. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. Ann. Rev. of Plant Pathol. 46(2008):75-100.
- Vachot-Griffin AM & JE Thies. 2005. Fingerprinting the Australian rhizobial inoculant mother cultures using refined PCR protocols yields beneficial inoculant management applications. Australian J. of Experimental Agriculture 45(2005):141-150.
- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP handbook 15, Blackwell Scientific Publ. Oxford, England 164 p.
- Xu LM; C Ge; Z Cui; J Li & H Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(1995):706-711.