



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, 3)

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

(2) Instituto de Fisiología Vegetal - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP. CC 327, La Plata (1900), Argentina.

(3) Centro de investigaciones en Fitopatología - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - UNLP - La Plata, Argentina.

E-mail: pbalatti@agro.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La soja es una planta exótica en la Argentina y por ello los suelos probablemente carecen de los simbiontes específicos que la nodulan, los que se adicionan en el momento de la siembra a través de la inoculación. En la Argentina, Brasil y Uruguay se utilizan distintas estirpes de bradyrhizobios para la formulación de los inoculantes comerciales, en los que se utilizan preferentemente cinco cepas, tres *Bradyrhizobium japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y dos *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019). La calidad de un inoculante esta dada entre otras cosas por la especie bacteriana y la cantidad de células viables de la misma. Por ello el objetivo de este trabajo fue desarrollar una combinación de reacciones de PCR para discriminar a las especies de *Bradyrhizobium* con que se formulan los inoculantes comerciales. Vachot-Griffin *et al.* (2005) propusieron utilizar una combinación de fingerprints generados en base a 5 pares de primers distintos. Puesto que las cinco especies de bradyrhizobios mencionadas son muy semejantes entre sí, se planteo como objetivo de este trabajo desarrollar un conjunto de reacciones que permitan distinguir con precisión las estirpes a partir de cultivos líquidos o colonias.

MATERIALES Y MÉTODOS

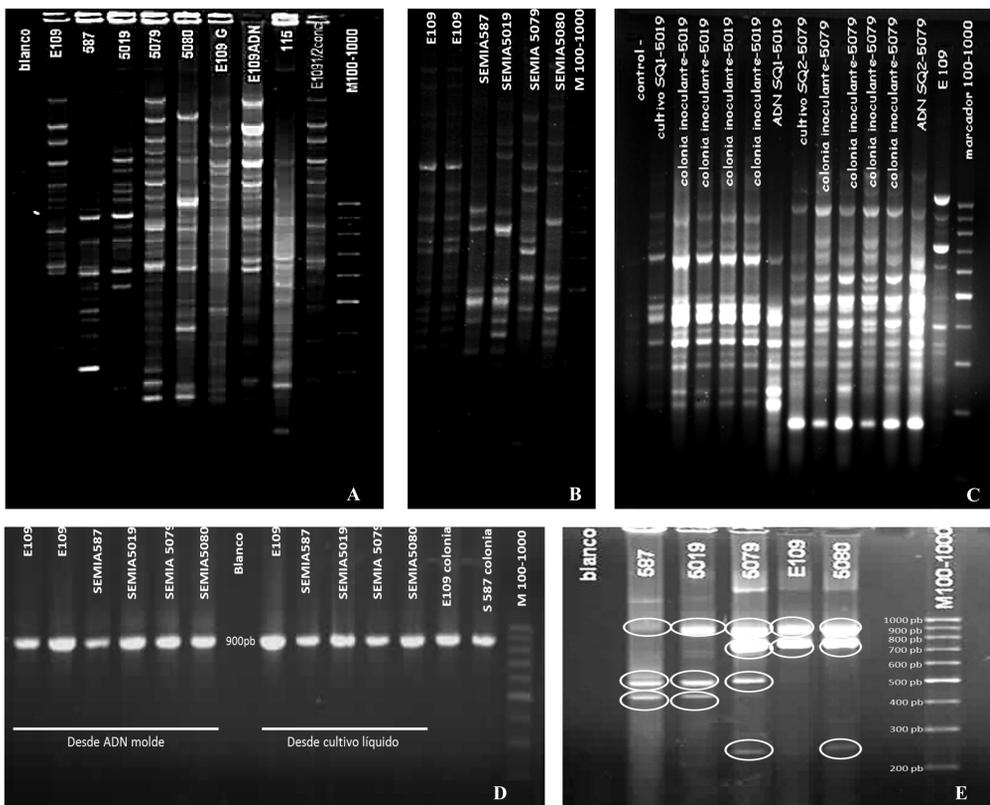


Fig. 1 Reacciones de amplificación REP (A), BOX, cepas controles (B), BOX, análisis de inoculantes (C), Multiplex (D) y RSα (E)

Primers		
Box A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic <i>et al.</i> (1991)
Rep 1R	IIIIICGICGICATCIGGC	Versalovic <i>et al.</i> (1991)
Rep 2	ICGICTTATCIGGCCTAC	Versalovic <i>et al.</i> (1991)
Multiplex SAL 1	AGCGGGCGCGGATAGTTCTGTG	Hartmann <i>et al.</i> (1996)
SAR1	GGCTCGGCTCTGCTGTGTATGC	Hartmann <i>et al.</i> (1996)
RSα - 17	ACGCATACAACGACAGAGCC	Minamisawa <i>et al.</i> (1998)
18	TCAAATCGCGCTGCAACGTC	Minamisawa <i>et al.</i> (1998)

Estirpes bacterianas. Las estirpes utilizadas en este estudio fueron las cepas *B. japonicum* E109, SEMIA5079, SEMIA5080 y *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019. Se procedió a aislar el ADN genómico (Sambrook *et al.*, 1990) de las mismas, a partir de cultivos líquidos. Para comprobar la eficiencia del método se realizó una serie de diluciones a partir de muestras de inoculantes comerciales, sembrándose en medio EMA agar incubándose las placas a 28°C durante 7 días las últimas tres diluciones. Se procedió a la identificación a partir de una suspensión de las colonias en agua como templado de ADN.

Primer	Mezcla de reacción				Condiciones de reacción			
	Taq pol. (U)	dNTPs (mmol/L)	Primers (nmol/L)	MgCl ₂ (mmol/L)	Desnaturalización	Annealing	Extensión	Ciclos
BOX	0,6	2,0	3000	2,5	94°C, 1'	53°C, 1'	65°C, 8'	35
REP	1,2	2,0	1500	2,5	94°C, 1'	40°C, 1'	65°C, 8'	30
Multiplex	2,5	2,0	500	1,5	95°C, 45''	65°C, 1'	72°C, 4'	35
RSα	1	2,0	400	1,5	94°C, 1'	55°C, 1'	72°C, 1'	30

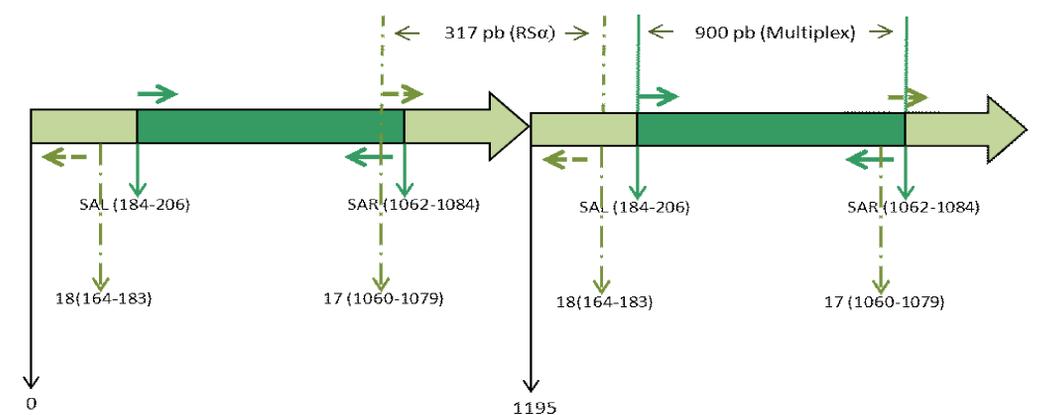


Fig. 2 Ubicación de los primers SAL/SAR y 17/18 en la secuencia RSα de Bradyrhizobium japonicum.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Luego del análisis de los perfiles generados con cada reacción de amplificación y sus correspondientes fenogramas, se realizó un análisis conjunto de estos datos para lo cual se construyó el fenograma de la Fig. 3, en el que se integran los perfiles de amplificación de las tres reacciones realizadas para cada cepa en control.

En la Fig. 3 se observa, en primer lugar 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* SEMIA587 y SEMIA5019. Por otro lado se observa la separación en dos clusters de las dos especies de *Bradyrhizobium*, un cluster formado por las cepas *B. japonicum* E109, SEMIA5079 y SEMIA 5080; y el otro cluster formado por las cepas de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019.

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. 3 Fenogramas estableciendo la similitud entre los genomas de las cepas comerciales de inoculantes obtenidos a partir de la combinación de las reacciones de amplificación BOX, REP y RSα. Análisis realizado con el Software Gene Directory Syngene Inc.

