

## Análisis de inoculantes comerciales

### Material recibido (19/03/2014):

Cepas control: *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (TC 182-519), *Bradyrhizobium elkanii* U-1302 - SEMIA5019 (TC 119-504).

### Lotes:

Lote 1: Inoculante Brasil St (SEMIA 5019-5079), se recibió por duplicado

Lote 2: Inoculante Brasil St (SEMIA 5019-5079), se recibió por duplicado

Lote 3: Inoculante Brasil St (SEMIA 5019-5079), se recibió por duplicado

Lote 4: Inoculante Brasil St (SEMIA 5019-5079) EXP020201, se recibió por duplicado.

### Métodos:

⇒ Recuento y pureza:

Se realizaron de las dos muestras de cada uno de los lotes, 10 diluciones seriadas 1/10 y se plaquearon 100 µl de las últimas 3 por triplicado.

### Resultado:

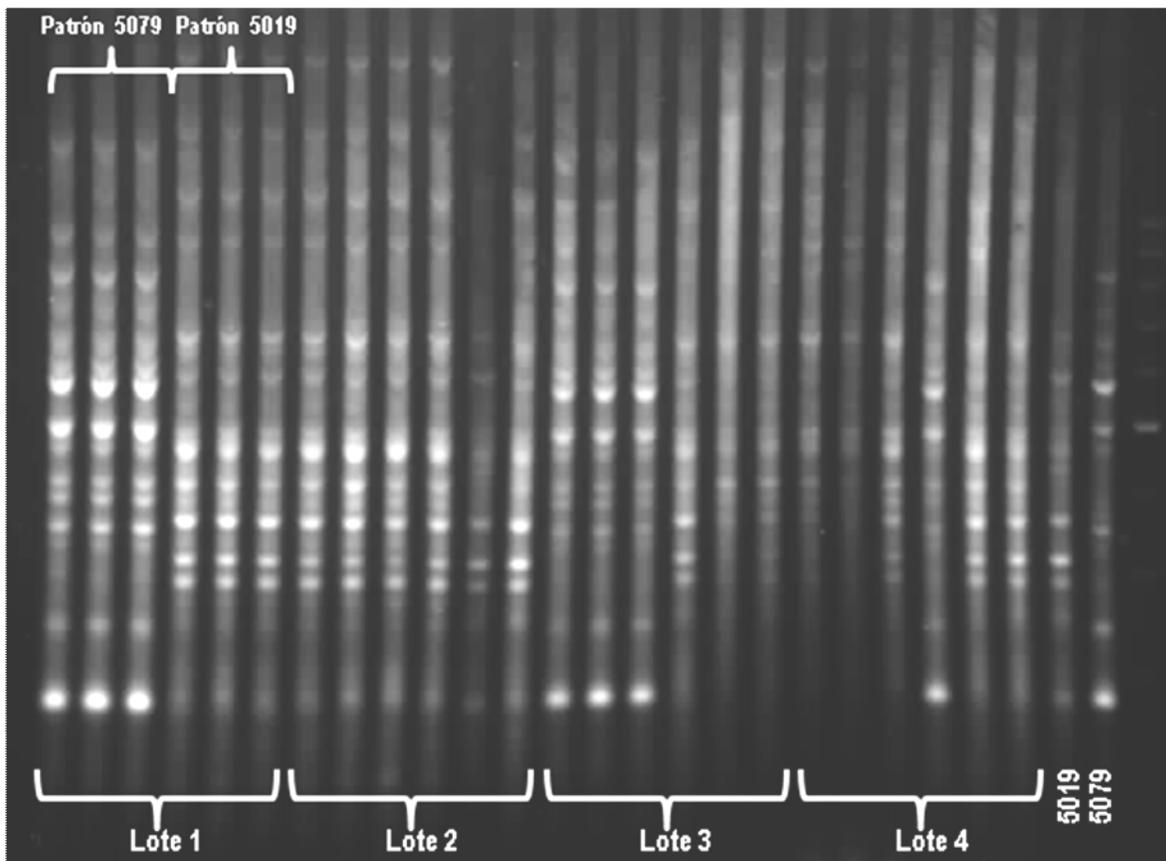
Lote	Ufc Dilución 10 <sup>-9</sup>	Ufc Dilución 10 <sup>-10</sup>	Título (ufc/ml)	% aproximado de colonias de <i>B. japonicum</i> (Semia 5079)
1-1	8	3	1,9.10 <sup>11</sup>	60 %
1-2	12	-	1,2.10 <sup>11</sup>	65 %
2-1	6	1	8.10 <sup>10</sup>	65 %
2-2	12	-	1,2.10 <sup>11</sup>	65 %
3-1	19	4	3.10 <sup>11</sup>	75 %
3-2	20	3	2,5.10 <sup>11</sup>	75 %
4-1	10	1	1.10 <sup>11</sup>	60%
4-2	20	-	2.10 <sup>11</sup>	75 %

Luego de verificar la pureza y el título de los inoculantes se seleccionaron 6 colonias por cada lote para el análisis molecular.

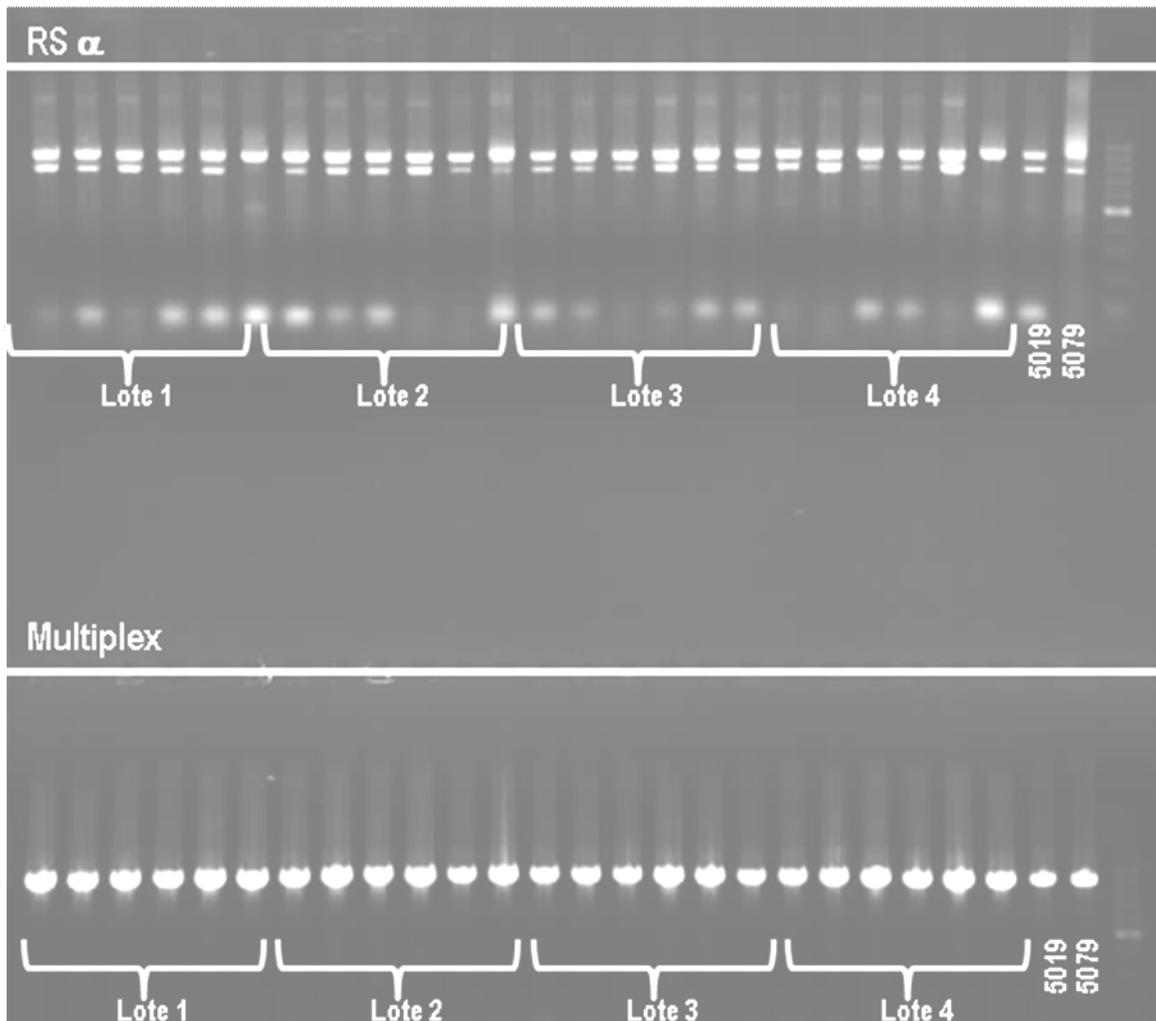
Las colonias seleccionadas se repicaron a placas con medio fresco y a partir de ellas se realizó una extracción rápida de ADN por shock térmico en buffer fosfato.

⇒ Marcadores moleculares evaluados:

Reacción Box: Los elementos BOX son amplificados utilizando el primer BOXA1R de acuerdo a las condiciones de reacción sugeridas por Versalovic *et al.*, 1994; De Bruijn, 1992.



Reacción multiplex y RS  $\alpha$ : La reacción PCR-multiplex permite amplificar una secuencia de 900 pb del elemento de inserción RS $\alpha$  para cepas *Bradyrhizobium*. Esta reacción combinada con un segundo par de primer, que amplifica un fragmento de 730 pb de la secuencia *no/BT* de las cepas *Sinorhizobium fredii*; permite distinguir entre ambas cepas (Pastorino *et al.*, 2003). Luego de esta primera reacción se utiliza el producto de amplificación para realizar la reacción con los primers 17 y 18 con las condiciones de reacción sugeridas por (Minamisawa *et al.*, 1998; López y Balatti, 2012).



REP-PCR (amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos). Se utilizaron los primers y las condiciones de reacción sugeridos por Versalovic *et al.*, 1994.