



ANÁLISIS DE LA ISLA SIMBIÓTICA DE CEPAS COMERCIALES Y BRADYRHIZOBIOS NATURALIZADOS QUE DIFIEREN EN SU CAPACIDAD DE FIJAR NITRÓGENO

Silvina López¹; Graciela Pastorino²; Pedro Balatti¹²³

¹Instituto de Fisiología Vegetal – CONICET - UNLP; ² Cátedra de Microbiología Agrícola – Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP; ³ Centro de Investigaciones en Fitopatología – UNLP

Introducción

Los suelos de la Argentina con historia del cultivo de soja contienen bradyrhizobios naturalizados. La fuente de estos son los inoculantes comerciales, por ello estas poblaciones están compuestas por representantes de las estirpes comerciales y mutantes naturales, que difieren en su capacidad de fijación de Nitrógeno (N), fenotipo que es probable sea el resultado de mutaciones en la isla simbiótica. El objetivo del trabajo es analizar e identificar los cambios de secuencias o regulatorios que generan fenotipos diferenciales de fijación de nitrógeno.

Materiales y métodos

Amplificación de la isla simbiótica

Se diseñaron 7 pares de primers, que en reacciones de PCR generaron amplicones de 7741 pb, 6591 pb, 5998 pb, 9793 pb, 8954 pb, 9632 pb y 5996 pb. El conjunto de estos fragmentos constituyen la isla simbiótica que contiene a gran parte de los genes de nodulación y fijación de N de *Bradyrhizobium*. Se analizaron los fragmentos de 4 cepas (163, 366, 2112 y 953), que en base a análisis genotípicos previos, se identificaron como aislados de *B. japonicum*. El control fue la estirpe comercial en E109.

RFLP

Los amplicones se analizaron por RFLP, utilizando las enzimas *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *EcoRV* y *XhoI*. El estudio genómico se orientó a los genes ubicados en la región polimórfica. Se amplificaron cuatro fragmentos conteniendo a los genes *nopP*, *nifE*, *nifN-nifX* y *nifS-fixU*. Sobre los mismos se realizó un análisis de restricción empleando las enzimas *HinfI*, *BbuI* y *PstI*. El polimorfismo se repitió únicamente en la restricción del fragmento conteniendo el gen *blr1752* (*nopP*).

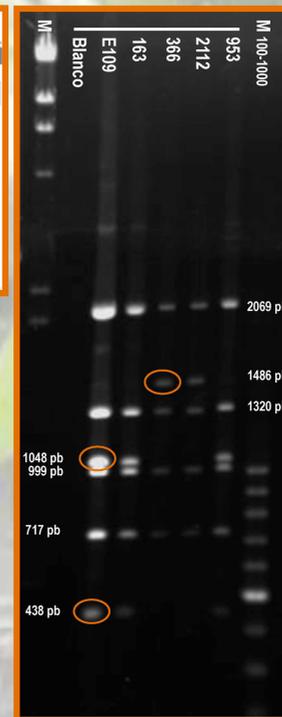
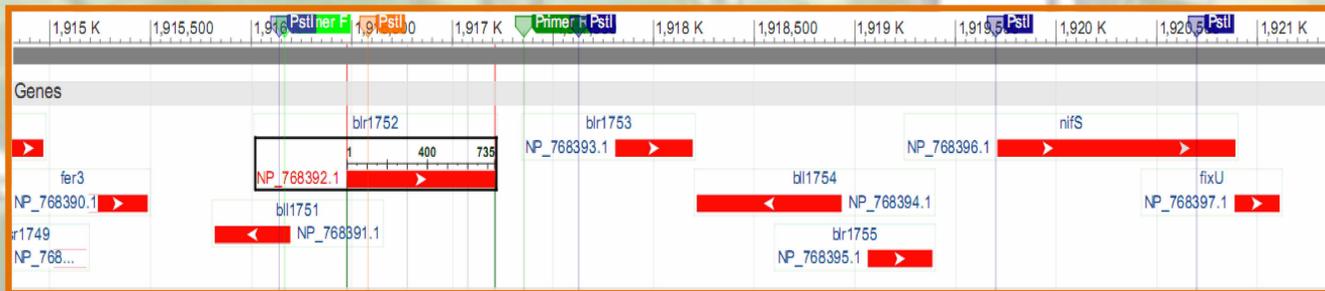


Foto 1. Digestión del amplicón de 6591 pb con la enzima *PstI*.

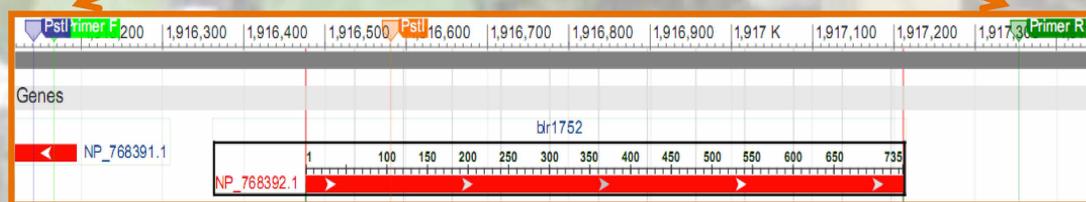


Gráfico 1. En la parte superior se muestran los genes contenidos en el amplicón de 6591 pb de la cepa USDA110 de *B. japonicum* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los marcadores azules corresponden a los sitios de corte de *PstI* y en naranja el sitio de corte *PstI* ausente en las cepas 366 y 2112. En la parte inferior se muestra el fragmento amplificado para estudiar la región polimórfica encontrada.

Amplificación de gen *Nop P* y secuenciado

Se amplificó un fragmento de 1207 pb conteniendo el gen *nopP* completo (735 pb). Se secuenció el fragmento para las 5 cepas en estudio y se realizó un Blast con las secuencias de ADN y la correspondiente traducción de la proteína.



Foto 2. Región polimórfica de 1207 pb conteniendo el gen *nopP*.

| Species/Abbn | DNA Sequences | Translated Protein Sequences |
|--------------|---|--------------------------------------|
| 1. E109 NopP | ME PGGSSSE TRAYLNSGPPIVEIDQRSFDRG | Q RFLGRDIMNIAINPQEYSDFVSKKAERAATVAGS |
| 2. 163 NopP | ME PGGSSSE TRAYLNSGPPIVEIDQRSFDRG | Q RFLGRDIMNIAINPQEYSDFVSKKAERAATVAGS |
| 3. 953 NopP | ME PGGSSSE TRAYLNSGPPIVEIDQRSFDRG | Q RFLGRDIMNIAINPQEYSDFVSKKAERAATVAGS |
| 4. 366 NopP | ME PGGSSSE TRAYLNSGPPIVEIDQRSFDRG | Q RFLGRDIMNIAINPQEYSDFVSKKAERAATVAGS |
| 5. 2112 NopP | ME PGGSSSE TRAYLNSGPPIVEIDQRSFDRG | Q RFLGRDIMNIAINPQEYSDFVSKKAERAATVAGS |
| 1. E109 NopP | YSATHYDPA R P V R FFSYQLGDET V GLLRAGGPVRI KGETFREKFG RNDLTSVVDLRVTHPLVENAGDI | |
| 2. 163 NopP | YSATHYDPA R P V R FFSYQLGDET V GLLRAGGPVRI KGETFREKFG RNDLTSVVDLRVTHPLVENAGDI | |
| 3. 953 NopP | YSATHYDPA R P V R FFSYQLGDET V GLLRAGGPVRI KGETFREKFG RNDLTSVVDLRVTHPLVENAGDI | |
| 4. 366 NopP | YSATHYDPA R P V R FFSYQLGDET V GLLRAGGPVRI KGETFREKFG RNDLTSVVDLRVTHPLVENAGDI | |
| 5. 2112 NopP | YSATHYDPA R P V R FFSYQLGDET V GLLRAGGPVRI KGETFREKFG RNDLTSVVDLRVTHPLVENAGDI | |
| 1. E109 NopP | LLEYQLRED GDDPLILSKPGLP GMEPRLAEMGFVHVGRNHVVLDPHQHPEVWTKNENDQWQRV GKPTK | |
| 2. 163 NopP | LLEYQLRED GDDPLILSKPGLP GMEPRLAEMGFVHVGRNHVVLDPHQHPEVWTKNENDQWQRV GKPTK | |
| 3. 953 NopP | LLEYQLRED GDDPLILSKPGLP GMEPRLAEMGFVHVGRNHVVLDPHQHPEVWTKNENDQWQRV GKPTK | |
| 4. 366 NopP | LLEYQLRED GDDPLILSKPGLP GMEPRLAEMGFVHVGRNHVVLDPHQHPEVWTKNENDQWQRV GKPTK | |
| 5. 2112 NopP | LLEYQLRED GDDPLILSKPGLP GMEPRLAEMGFVHVGRNHVVLDPHQHPEVWTKNENDQWQRV GKPTK | |
| 1. E109 NopP | YLSKVEDDDAAAESTVQADYSDEDDPSVYLERVLTGLSME | |
| 2. 163 NopP | YLSKVEDDDAAAESTVQADYSDEDDPSVYLERVLTGLSME | |
| 3. 953 NopP | YLSKVEDDDAAAESTVQADYSDEDDPSVYLERVLTGLSME | |
| 4. 366 NopP | YLSKVEDDDAAAESTVQADYSDEDDPSVYLERVLTGLSME | |
| 5. 2112 NopP | YLSKVEDDDAAAESTVQADYSDEDDPSVYLERVLTGLSME | |

Gráfico 2. Alineamiento de las secuencias de las proteínas Nop P (244 aa) de las 5 cepas en estudio. En celeste se marca la diferencia en el aminoácido N° 34 que se encontró en el análisis RFLP correspondiente a una diferencia puntual en el secuencia nucleotídica en la posición 101 pb del gen en el sitio de corte de la enzima *PstI*.

Resultados y conclusiones

El análisis RFLP mostró diferencias en el amplicón de 6591 pb, que codifica a los genes *nifE*, *nifN-nifX*, *nifS-fixU* y *nopP* (*blr1752*). La restricción con endonucleasas resultó en dos patrones, uno típico de las cepas 163 y 953 e idéntico al de la cepa E109 (control); el otro fue típico de los aislados 366 y 2112. Se realizaron estudios adicionales sobre las secuencias de los genes ubicados en la región polimórfica, solo se encontraron diferencias en las secuencias del gen *blr1752* (*nopP*). Se encontró que la mutación genera un cambio en el aminoácido 34 que se corresponde con la posición 101 pb del gen, en donde el codón CAG (Gln - Q) cambia por CGG (Arginina - Arg o R), tal como se predijo en el análisis de restricción.

La proteína que codifica el gen *nopP* esta asociada la represión del mecanismo de defensa de las plantas. Nop P es excretada por las células bacterianas y actúan en el citoplasma vegetal modificando su metabolismo y suprimiendo las defensas de la planta contra microorganismos, lo que facilita la infección de las raíces por los rizobios. Las mutaciones en la secuencia que codifica esta proteína probablemente son clave en la capacidad competitiva y de nodulación de los mutantes y por lo tanto resulta interesante estudiar el rol biológico de la misma.