

## DIFERENCIACION DE RIZOBIOS NATIVOS QUE NODULAN CUATRO LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN TUCUMAN, ARGENTINA

RO PEDRAZA<sup>1</sup>, CS RONCEDO<sup>1</sup>, SC de BELLONE<sup>1</sup>, CH BELLONE<sup>1</sup>, HE PEREZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900, (4000) Tucumán, Argentina. E-mail: rpedraza@herrera.unt.edu.ar

<sup>2</sup>INTA - CER Leales. Sta. Rosa de Leales. (4113) Tucumán, Argentina

Recibido 14 de noviembre de 2000, aceptado 13 de marzo de 2001

### DIFFERENTIATION OF NATIVE RHIZOBIA THAT NODULATE FOUR FORAGE LEGUMES IN TUCUMAN, ARGENTINA

In a trial with four forage legumes (*Stylosanthes scabra* cv. Seca; *Desmanthus virgatus* cv. Jaribu; *Chamaecrista rotundifolia* (Wynn Cassia) and *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro), performed in Tucumán, Argentina, five bacterial isolates that spontaneously nodulate these legumes were obtained. According to phenotypic characteristics, they belong to the fast growing rhizobia group. The isolates were differentiated by a molecular method through the random amplified polymorphic DNA (RAPD), determining that they correspond to five different strains.

**Key words:** Rhizobia, Forage legumes, RAPD.

### INTRODUCCION

La identificación de cepas nodulantes es un aspecto importante en estudios de la simbiosis rizobio-leguminosa. Uno de los problemas asociados con los estudios bacterianos es la falta de variación visible en el crecimiento de cepas de diferentes genotipos. Cepas con características fisiológicas completamente distintas pueden aparecer morfológicamente idénticas. La resistencia intrínseca a antibióticos (RIA) es un método tradicionalmente usado en la caracterización de cepas de rizobios. Sin embargo, no es siempre posible asumir que se pueda diferenciar por RIA cepas diferentes (Beck *et al.* 1993). El uso de "primers" arbitrarios para obtener polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD), que puedan ser utilizados como "huella digital" (Williams *et al.* 1990), es una de las técnicas modernas utilizada en la identificación de aislamientos rizobianos. Basado en las diferencias de los perfiles del ADN, la técnica de RAPD permite examinar la homología de cepas a nivel molecular (Harrison *et al.* 1992, Dooley *et al.* 1993).

Se propone como hipótesis de trabajo que existen cepas nativas de rizobios capaces de nodular cuatro especies de leguminosas forrajeras bajo las condiciones de suelo y clima de la provincia de Tucumán, y que las cepas difieren genéticamente entre sí, siendo

el objetivo de este trabajo determinar la nodulación espontánea de cuatro especies de leguminosas forrajeras, producida por rizobios nativos, y la diferenciación fenotípica y molecular de los aislamientos.

### MATERIALES Y METODOS

La implantación de las forrajeras se realizó en el Campo Experimental Regional Leales (C.E.R.- Leales) del Centro Regional Tucumán-Santiago del Estero del INTA, localizado en la Llanura Deprimida Salina de Tucumán, siendo el suelo un Argiusto típico (Zuccardi, Fadda 1985). En dicho predio se sembraron, sin inocular, *Stylosanthes scabra* cv. Seca; *Desmanthus virgatus* cv. Jaribu; *Chamaecrista rotundifolia* (Wynn Cassia) y *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro, elegidos por estar recomendados para las condiciones agroclimáticas de la zona del ensayo y por su buena capacidad productora de semillas (Jones, Buch 1995).

A partir de diez plantas tomadas al azar de cada especie forrajera, se recolectaron muestras de ocho nódulos por planta a partir de los cuales se realizaron los aislamientos bacterianos (Vincent 1970). La capacidad nodulante de los aislamientos se determinó inoculando los mismos en plántulas de las respectivas especies que fueron aislados. Se inocularon 5 plántulas, crecidas asepticamente, sumergiendo las raíces en una suspensión acuosa con  $10^7$  células  $ml^{-1}$ . Las plántulas fueron colocadas en macetas plásticas con suelo estéril y se incluyó igual número de plantines sin inocular como testigos. Las mismas se mantuvieron en invernadero y solo fue-

ron regadas dos veces por semana con agua estéril durante el crecimiento. A los 30 días de la inoculación, se evaluó la nodulación y se reaislaron las cepas inoculadas. A partir de los reaislamientos, se realizaron los siguientes estudios: tipificación de colonias crecidas en medio YEM (Vincent 1970), observación microscópica, coloración de Gram, prueba de acidificación del medio de cultivo (YEM con azul de bromotimol), y determinación de la RIA, cloranfenicol, ampicilina, estreptomycin y ácido nalidixico (30, 50, 75, 100, 150, 200 y 300 mg l<sup>-1</sup>), incluidos en el medio de cultivo (YEM sólido).

Para el estudio genético, se extrajo el ADN cromosómico, mediante el método de Walsh *et al.* (1991), a partir de cultivos en medio YEM sólido. El análisis de los perfiles genómicos por RAPD de cada aislamiento se realizó en un volumen final de reacción de 20 µl. La mezcla consistió en 1 µl de ADN proveniente de cada aislamiento, dNTP's 100 µM, *Taq* polimerasa (Promega) 0.75 U, buffer de la enzima 2 µl, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, "primer" 0.2 µM y agua bidestilada estéril hasta completar el volumen final. Los "primers" utilizados fueron: **AO3** AAG ACC CCT C (Biodynamics), **AO4** CTT CAC CCG A (Biodynamics), **AO5** CAC CAG GTG A (Biodynamics), **AO6** GAG TCT CAG G (Biodynamics), **AO7** CCC GAT TCG G (Biodynamics), **AO8** ACG CAC AAC C (Biodynamics), **AO9** CTA ATG CCG T (Biodynamics) y **OPJ20** AAG CGG CCT C (Operon Technologies). El programa de amplificación consistió en un ciclo de 3 min, a 94°C, 45 ciclos de 30 seg, a 92°C, 1 min, a 35°C, 2 min, a 72°C, un

ciclo de 5 min, a 72°C y finalmente 12 h, a 4°C. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% en TBE 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg ml<sup>-1</sup>) y se lavaron con agua destilada para su observación sobre transiluminador de UV. El análisis por RAPD se repitió tres veces con cada "primer" y se incluyeron muestras sin ADN como control negativo. Los polimorfismos de ADN de cada aislamiento, fueron agrupados según el método de análisis de pares de grupos no ponderados (UPGMA), (Sneath, Sokal 1973), utilizando los procedimientos de Cluster y Tree del programa NTSYS-pe 2.02f (Applied Biostatistics, Inc.). La similitud entre cada par de cepas se calculó con el coeficiente Dice.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que las cuatro leguminosas nodulan espontáneamente. El estudio fenotípico de las bacterias señala que estas corresponden a bastones pequeños, Gram negativos, que acidifican el medio de cultivo y que en medio YEM con rojo congo los aislamientos crecen en forma rápida (24 - 48 h, a 30°C), produciendo colonias gomosas. Esto permite inferir que los aislamientos pertenecen a representantes de la familia *Rhizobiaceae* y que corresponden al grupo de rizobios de crecimiento rápido. De los numerosos aislamientos bacterianos obtenidos de

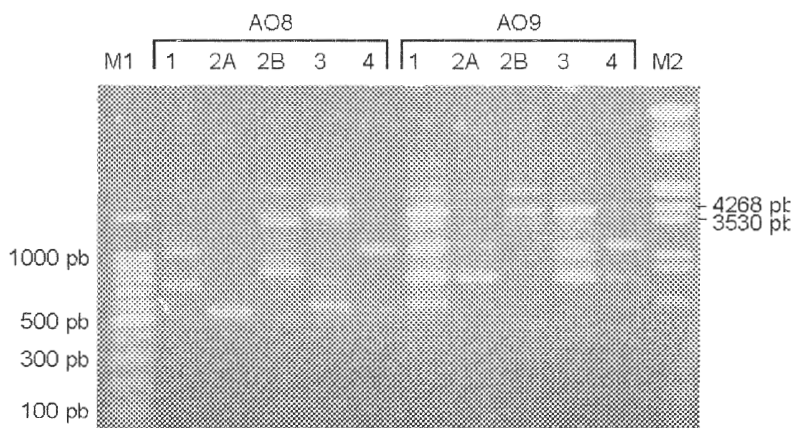


Figura 1. Electroforesis de ADN amplificado por RAPD con los "primers" AO8 y AO9 (Biodynamics). M1: Marcador de peso molecular (Ladder 100 bp, Promega). 1: cepa aislada de *Chamaecrista rotundifolia* (Wynn Cassia); 2A y 2B: cepas aisladas de *Stylosanthes scabra* cv. Seca; 3: cepa aislada de *Desmanthus virgatus* cv. Jaribu; 4: cepa aislada de *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro; M2: Marcador de peso molecular (Lambda DNA/EcoR I + Hind III, Promega).

Figure 1. Electrophoresis of DNA amplified by primers AO8 and AO9. M1 and M2 are molecular weight markers. Numbers indicate strain and host from where they were isolated.

cada especie forrajera, se decidió tomar uno de cada especie para determinar la capacidad nodulante, resistencia a antibióticos y estudio genético, dada la "aparente" homogeneidad fenotípica observada. En el caso de *Stylosanthes*, se tomaron dos aislamientos como inóculo, debido al diferente tipo de colonia observada en medio sólido: translúcidas brillosas y translúcidas opacas. Al evaluar la nodulación en las cuatro leguminosas, se observó que hay diferencias en cantidad (11 - 30 nódulos/planta), tamaño (1,3 - 2,3 mm), color (rosado oscuro - rosado claro) y forma (esferoidal - irregular) de los nódulos.

Los resultados obtenidos en el análisis de resistencia intrínseca a cuatro antibióticos, evaluada según el crecimiento o no de las cepas, indican un comportamiento diferente entre algunas cepas (*Wynn Cassia*, *Stylosanthes*), mientras que entre otras se trataría de cepas similares (los dos aislamientos de *Stylosanthes* entre sí, y los aislamientos de *Desmanthus* y *Macroptilium*), (datos no mostrados). Con la técnica de RAPD, se observó que los patrones de ADN difieren en todos los aislamientos, tanto en número como en tamaño de las bandas (Figura 1). Al realizar el agrupamiento de las cepas, en función de los patrones genómicos, y considerando que el índice de similitud utilizado (Dice) confiere mayor peso a la presencia de bandas, sin tomar en cuenta a las ausentes, el fenograma configurado revela la diferencia genética existente entre las cepas (dato no mostrado).

Se concluye que cuatro leguminosas forrajeras implantadas en Tucumán nodulan espontáneamente con rizobios nativos; que los mismos pertenecen al grupo de crecimiento rápido y que las cepas analizadas son diferentes a nivel molecular. Si bien la región del ADN amplificado al azar por RAPD no es necesariamente la que determina la resistencia a

antibióticos, para los fines perseguidos en este estudio, el método RAPD constituyó una herramienta útil en la caracterización molecular de cepas, permitiendo diferenciar cepas que se mostraron similares en cuanto a su respuesta frente a los antibióticos probados.

## REFERENCIAS

- Beck DP, Materon LA, Afandi F. 1993. Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. Technical Manual N°19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria. 389 pp.
- Dooley JJ, Harrison SP, Mytton LR, Dye M, Cresswell A, Skot L. 1993. Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Can. J. Microbiol.* 39: 665-673.
- Harrison SP, Mitón LR, Skot L, Dye M, Cresswell A. 1992. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. *Can. J. Microbiol.* 38: 1009-1015.
- Jones RM, Buch GA. 1995. Yield and population dynamics of *Chamaecrista rotundifolia* cv. Wynn coastal south-eastern Queensland as affected by stoking rate and rainfall. *Tropical Grassland*. 29: 65-73.
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practices of numerical classification. San Francisco, W.H. Freeman.
- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N° 15. Oxford - Blackwell Scientific Publications. 164 pp.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. 10: 506-513.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zuccardi R, Fadda G. 1985. Bosquejo Agroecológico de la Provincia de Tucumán. Miscelánea N° 86. F.A.Z.-U.N.T. 63 pp.