

## CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE *Sinorhizobium meliloti* EN EL SUDESTE BONAERENSE

CC CASTELLARI, AM QUADRELLI, NS GONZALEZ, FS LAICH

FCA-UNMdP EEA-INTA Balcarce cc276 CP 7620 Balcarce, BsAs.

E-mail: aquadrelli@balcarce.inta.gov.ar

Recibido 2 de mayo de 2000, aceptado 11 de abril de 2001

### QUANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *Sinorhizobium meliloti* IN THE SOUTHEAST OF BUENOS AIRES PROVINCE

The low persistence of Lucerne has been attributed to nodulation problems. This depends on many factors among them pH values and presence of rhizobium population in the soil. Soil samples were taken up to 1,20 m in twelve Lucerne sites, and soil pH and Most Probable Number of *S. meliloti* were determined. At all studied sites *S. meliloti* population was detected and in seven of them the MPN were  $10^3$ - $10^4$  *S. meliloti* g<sup>-1</sup> of dry soil. The regression between pH and log MPN of *S. meliloti* was not significant. The PCR-fingerprinting employed for isolates characterisation showed 10 different patterns. The patterns of standard strains differed among them and with the isolates obtained.

**Key words:** *S. meliloti*- soil pH- Most Probable Number- PCR-fingerprinting.

### INTRODUCCION

La alfalfa (*Medicago sativa* L) se asocia específicamente con *Sinorhizobium meliloti* efectuando la fijación de nitrógeno atmosférico. La baja perdurabilidad de los alfalfares llevó a que se reflexionara sobre la responsabilidad que la asociación *M. sativa*-*S. meliloti* podría tener en dicho fenómeno. (González *et al.* 1997). Determinaciones realizadas en suelos de cinco partidos del sudoeste de la Pcia de Bs As, demostraron que el pH fue uno de los principales responsables de los valores estimados de NMP de *R. meliloti* (Sagardoy 1981). Por otra parte, Del Papa *et al.* (1999), caracterizaron aislamientos de *S. meliloti* obtenidos de suelos con valores de pH ácidos. El presente trabajo tuvo por finalidad: i) cuantificar en suelos cultivados con alfalfa el tamaño de las poblaciones de *S. meliloti* en superficie y en profundidad ii) determinar la magnitud de la relación entre el pH de los suelos y el tamaño de las poblaciones de *S. meliloti* iii) caracterizar aislamientos de *S. meliloti* que fueron aislados de nódulos considerados como efectivos y establecer la existencia de similitudes con los patrones de cepas de referencia recomendadas para inoculantes comerciales.

### MATERIALES Y METODOS

En los partidos de Tandil y General

Alvarado (Pcia de Bs As) se seleccionaron 12 sitios con cultivos de alfalfa representativos de la zona con más de dos años de implantación. Todos los cultivos fueron inoculados con productos comerciales. Los muestreos se efectuaron durante el mes de mayo. En cada cultivo se realizó una calicata de 1,20 m de profundidad o hasta la presencia del horizonte con tosca. Las muestras de suelo se tomaron desde el horizonte superficial y a través del perfil, siempre que se determinara la presencia de nódulos. Se determinó, pH en agua (1:2,5); materia orgánica; fósforo disponible (Bray 1) y fueron estimadas las poblaciones de *S. meliloti* con la técnica del Número Más Probable (NMP) por infección en plantas, modificada por Brockwell (1980). Para ello se realizaron 5 diluciones con 4 tubos de repetición por dilución. Los tubos se colocaron en una cámara de cultivo con luz artificial a 21°C durante 5 semanas. El NMP de bacterias presentes en la muestra fue estimado utilizando la tabla presentada por Brockwell (1980). De estos sistemas experimentales se aisló y purificó *S. meliloti* de nódulos de aspecto efectivo (color rojizo y mayor tamaño) que se consideraron, podrían contribuir con la fijación de N<sub>2</sub>. La superficie de los nódulos se trató con alcohol 70° durante 1 minuto, hipoclorito al 3 % durante 3 minutos y 7 lavados con agua destilada estéril. Los aislamientos se obtuvieron en medio de cultivo extracto de levadura-manitol-rojo congo agarizado y posteriormente verificados en plántulas de alfalfa creciendo en medio de cultivo Jensen (Vincent 1970). Como cepas de referencia se utilizaron B399, B58 y B401 provistas por el IMIZA del INTA Castelar. Los aislamientos y las cepas de referencia se culti-

varon en medio sólido con triptona y extracto de levadura (TY) para luego ser transferidas a medio líquido TY e incubadas durante 48 h a 28° C bajo agitación (180 rpm). La extracción del DNA total de cada aislamiento y de cada cepa de referencia se realizó por la técnica de precipitación con isopropanol (Sambrook *et al.* 1989). Utilizando la técnica de la Polimerasa Chain Reaction (PCR) y el iniciador Nod H se determinó para cada aislamiento la presencia del gen *nod* específico de *S. meliloti*. La secuencia del iniciador fue: Nod H Rsp-r (5'-TCA AAG AAC CTC GCG-3') y Nod H Rsp-f (5'-CTC TTG ACG CCG AAG AAT AC-3'). Los componentes de la PCR por cada 25 µl fueron: 2.5

Tabla 1. Características químicas y NMP de *S. meliloti* g<sup>-1</sup> de suelo seco de los 12 sitios estudiados. Table 1. Chemical characteristics and Most Probable Numbers of *S. meliloti* g<sup>-1</sup> of dry soil in 12 farms.

| Sitio | Clas. Soil Taxonomy                  | Prof (cm) | Mat Org (%) | P (mg kg <sup>-1</sup> ) | PH  | NMP    |
|-------|--------------------------------------|-----------|-------------|--------------------------|-----|--------|
| 1     | Argiudol Típico Serie Mar del Plata  | 0-20      | 5.4         | 7.5                      | 5.7 | 57     |
|       |                                      | 21-40     | 1.8         | 1.6                      | 6.0 | ND     |
|       |                                      | 41-60     | 1.1         | 1.0                      | 6.7 | SD     |
|       |                                      | 61-80     | 0.6         | 1.3                      | 7.0 | SD     |
|       |                                      | 81-100    | 0.2         | 9.2                      | 8.1 | 9      |
| 2     | Argiudol Típico Serie Tandil         | 0-20      | 4.7         | 8.2                      | 5.7 | 1800   |
|       |                                      | 21-40     | 1.0         | 1.6                      | 6.8 | SD     |
|       |                                      | 41-60     | 0.7         | 2.2                      | 7.3 | 2349   |
|       |                                      | 61-80     | 0.5         | 2.4                      | 7.9 | 9      |
|       |                                      | 81-120    | 0.1         | 8.4                      | 8.1 | 370    |
| 3     | Paleudol Petrocálcico Serie Balcarce | 0-20      | 5.2         | 24                       | 5.6 | ND     |
|       |                                      | 21-40     | 1.2         | 1.8                      | 6.0 | SD     |
|       |                                      | 41-60     | 1.0         | 1.5                      | 6.3 | SD     |
|       |                                      | 61-80     | 0.6         | 2.4                      | 6.8 | SD     |
|       |                                      | 81-100    | 0.1         | 8.9                      | 7.8 | 2700   |
| 4     | Paleudol Petrocálcico Serie Balcarce | 0-20      | 5.0         | 10.8                     | 6.3 | 517    |
|       |                                      | 21-40     | 1.6         | 10.5                     | 6.5 | 4504   |
|       |                                      | 41-60     | 1.0         | 9.7                      | 7.1 | 1453   |
|       |                                      | 61-80     | 0.7         | 32.6                     | 7.4 | 87     |
|       |                                      | 81-100    | 0.4         | 141.2                    | 7.8 | 56056  |
| 5     | Argiudol Típico Serie Mar del Plata  | 0-20      | 5.9         | 10.7                     | 6.8 | 30     |
|       |                                      | 21-40     | 1.4         | 13.1                     | 7.1 | 3169   |
|       |                                      | 41-60     | 0.6         | 10.2                     | 7.4 | 1453   |
|       |                                      | 61-80     | 0.6         | 9.5                      | 7.6 | 8393   |
|       |                                      | 81-90     | 0.4         | 52.5                     | 8.0 | 4288   |
| 6     | Argiudol Típico Serie Mar del Plata  | 0-20      | 7.1         | 15.1                     | 6.0 | 273    |
|       |                                      | 21-40     | 2.3         | 3.9                      | 6.0 | 76     |
|       |                                      | 41-60     | 1.2         | 2.5                      | 6.4 | 9605   |
|       |                                      | 61-80     | 0.9         | 3.7                      | 6.8 | SD     |
|       |                                      | 81-120    | 0.3         | 14.4                     | 7.3 | 599    |
| 7     | Paleudol Petrocálcico Serie Balcarce | 0-20      | 6.2         | 11.9                     | 5.9 | ND     |
|       |                                      | 21-40     | 2.3         | 2.8                      | 6.3 | 9      |
|       |                                      | 41-60     | 1.6         | 1.7                      | 6.7 | SD     |
|       |                                      | 61-80     | 1.2         | 1.2                      | 6.8 | 8      |
|       |                                      | 81-100    | 0.6         | 4.5                      | 6.8 | 166    |
| 8     | Paleudol Petrocálcico Serie Balcarce | 0-20      | 7.1         | 28.9                     | 6.1 | ND     |
|       |                                      | 21-40     | 5.4         | 2.3                      | 6.2 | 71     |
|       |                                      | 41-60     | 2.3         | 1.3                      | 6.5 | 21     |
|       |                                      | 61-80     | 0.9         | 0.9                      | 6.5 | 22     |
|       |                                      | 81-110    | 0.3         | 2.5                      | 6.9 | 262700 |
| 9     | Paleudol Petrocálcico Serie Balcarce | 0-20      | 7.5         | 12.9                     | 6.0 | 61     |
|       |                                      | 21-40     | 5.3         | 1.6                      | 6.1 | 128    |
|       |                                      | 41-60     | 2.6         | 1.2                      | 6.5 | 18     |
|       |                                      | 61-80     | 1.5         | 0.3                      | 6.7 | 29     |
|       |                                      | 81-100    | 0.8         | 0.9                      | 6.8 | 99     |
| 10    | Paleudol Petrocálcico Serie Balcarce | 0-20      | 6.1         | 6.6                      | 6.1 | 550    |
|       |                                      | 21-40     | 3.7         | 1.6                      | 6.4 | 4884   |
|       |                                      | 41-60     | 1.5         | 1.4                      | 6.6 | 11637  |
|       |                                      | 61-80     | 0.8         | 1.7                      | 6.9 | 59869  |
| 11    | Paleudol Petrocálcico Serie Azul     | 0-20      | 7.7         | 13.4                     | 6.5 | ND     |
|       |                                      | 21-40     | 5.2         | 4.8                      | 7.4 | 13546  |
|       |                                      | 41-60     | 2.8         | 1.5                      | 7.5 | 134239 |
|       |                                      | 61-80     | 2.6         | 1.5                      | 7.7 | 1500   |
| 12    | Argiudol Típico Serie Mar del Plata  | 0-20      | 6.7         | 14.2                     | 6.0 | 8      |
|       |                                      | 21-40     | 1.6         | 3.6                      | 6.1 | 10382  |
|       |                                      | 41-60     | 0.8         | 2.3                      | 6.6 | 34465  |
|       |                                      | 61-80     | 0.4         | 3.0                      | 7.4 | 2282   |
|       |                                      | 81-100    | 0.2         | 6.4                      | 8.1 | 2282   |

ND: no detectable por la técnica del NMP. SD: sin determinar

µl de bovine serum albumin (BSA), 2.5 µl de buffer Tris (pH 8.3), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl de deoxirribonucleótidos (dNTPs), 2.5 µl primer, 2.5 µl primer, 0.2 µl de la enzima *Taq* polimerasa (Promega) y 10 µl del DNA del aislamiento. Las condiciones de los ciclos fueron: 94° C por 15 segundos acompañado de 35 ciclos a 94° C-10 segundos, 55° C-10 segundos y 72° C-30 segundos, finalizando con 72° C a 30 segundos. Luego de la reacción 10 µl de cada producto PCR fue separado en gel de agarosa al 0.8 % conteniendo 1 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. La caracterización molecular se realizó con la PCR-fingerprinting, utilizando los iniciadores ERIC1, ERIC2 y la combinación de ellos (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, de 124-127 pb, Versalovic *et al.* 1991). La secuencia del iniciador ERIC 1R: (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3) y del iniciador ERIC 2 fue (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG GTG AGC G-3'). Los componentes de la PCR por cada 25 µl fueron: 2.5 µl de bovine serum albumin (BSA), 2.5 µl de buffer Tris (pH 8.3), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl de deoxirribonucleótidos (dNTPs), 2.5 µl iniciador, 0.2 µl de la enzima *Taq* polimerasa (Promega), 10 µl del DNA del aislamiento y 1.8 µl de agua bidestilada estéril. Las condiciones de los ciclos fueron: 94° C por 7 minutos acompañado de 30 ciclos a 94° C-10 segundos, 52° C-10 segundos y 72° C-2 minutos, finalizando con 72° C- 4 minutos. Los componentes de la PCR utilizando la combinación de los iniciadores ERIC1 y ERIC2 por cada 25 µl fueron: 2.5 µl de bovine serum albumin (BSA), 2.5 µl de buffer Tris (pH 8.3), 3 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl de deoxirribonucleótidos (dNTPs), 2.5 µl primer ERIC1, 2.5 µl primer ERIC2, 0.2 µl de la enzima *Taq* polimerasa (Promega) y 9.3 µl del DNA del aislamiento. Todas las amplificaciones se realizaron en tubos capilares en un termociclador Idaho 1605. Luego de cada una de las reacciones 10 µl de cada producto PCR fue separado en geles de agarosa al 1.5 % conteniendo 1 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. La observación y fotografía de los geles se realizó bajo luz ultravioleta utilizando una Polaroid tipo 667 film.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las características químicas y el NMP de *S. meliloti* obtenidos a través de los perfiles de suelo en los 12 sitios estudiados se presentan en la Tabla 1.

En todos los sitios estudiados fueron detectadas poblaciones de *S. meliloti* (Tabla 1). Valores de *S. meliloti* g<sup>-1</sup> de suelo seco menores que 100, se detectaron solamente en el sitio 1. En los sitios 7 y 9 los valores máximos alcanzados fueron del orden de 10<sup>2</sup>. De acuerdo con Thies *et al.* (1991) poblaciones de este

orden son suficientes para establecer un adecuado número de nódulos. Los restantes sitios presentaron estratos con poblaciones de *S. meliloti* g<sup>-1</sup> de suelo seco del orden de 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup>. En este relevamiento los valores de pH aumentaron en profundidad para el total de los sitios superando el valor de 7. No obstante cuando se realizó la regresión log del NMP de las poblaciones de *S. meliloti* y el pH de los perfiles estudiados, con las 49 determinaciones obtenidas, se obtuvo un R<sup>2</sup> de 0.1523 (log NMP = -2,8565 + 0,7916 pH, p|T| 0.051, para H<sub>0</sub> = β<sub>1</sub> = 0; n = 50), valor no significativo como para atribuir al pH la variabilidad del tamaño de las poblaciones. Este resultado no coincide con el determinado por Sagardoy (1981) quien registró una correlación lineal altamente significativa, entre el tamaño de *S. meliloti* y el pH del suelo. Los aislamientos para la caracterización de *S. meliloti* fueron obtenidos de los nódulos de las plantas utilizadas en la técnica del NMP, las cuales presentaron en su mayoría, nódulos pequeños y blanquecinos, encontrándose solamente nódulos con características de eficientes en las plantas inoculadas con suelos provenientes de los horizontes subsuperficiales de los sitios 4, 10, 11 y 12, por lo que de acuerdo al criterio utilizado se obtuvieron solamente 13 aislamientos de *S. meliloti*. Estos fueron identificados alfabéticamente y con el número del sitio del cual fueron aislados. Los aislamientos fueron: 4A, 4B, 4C, 4D, 10E, 10F, 11G, 11H, 11I, 11J, 12K, 12L y 12M. Dichos aislamientos y las cepas patrón presentaron la secuencia génica *nod* de *S. meliloti*. La utilización de la técnica PCR-fingerprinting con el iniciador ERIC2 y la combinación de los iniciadores ERIC1 y ERIC2 permitió observar que los productos de la amplificación de los genomas de las cepas patrón B401, B58 y B399 eran distinguibles entre sí.

Con la utilización del iniciador ERIC2 se determinaron 10 patrones de bandas diferentes entre los 13 aislamientos caracterizados. De acuerdo con Niemann *et al.* (1997) el iniciador ERIC2 favorece un número mayor de fragmentos permitiendo una mejor caracterización de los genomas. En el sitio 4 se observaron a distintas profundidades patrones de bandas diferentes. Los aislamientos 11I y 11J y los aislamientos 12L y 12M que fueron obtenidos de un mismo nódulo, no presentaron similitudes en los patrones de sus bandas, demostrando

una doble infección nodular. No se halló similitud entre los patrones genéticos de los aislamientos y los de las cepas de referencia.

#### AGRADECIMIENTOS

La caracterización molecular fue realizada por CC Castellari en usufructo de una pasantía FOMEC bajo la dirección del Dr. Antonio Lagares en el Instituto de Biología y Bioquímica Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

#### REFERENCIAS

- Brockwell J. 1980. *In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Ed. FJ Bergersen. Section III. Chap. 1 Wiley & Sons. New York, Brisbane, Toronto.
- Del Papa MF, Balague LJ, Castro Sowinski S, Wegener C, Segundo E, Martínez Abarca F, Toro N, Niehaus K, Puhler A, Aguilar OM, Martínez Drets G, Lagares A. 1999. Isolation and Characterization of Alfalfa-Nodulating Rhizobia Present in Acidic Soils of Central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4: 1420-1427.
- Gonzalez N, Laich F, Quadrelli AM. 1997. Nodulación en profundidad en alfalfares de la región Pampeana. Reunión de Biología del suelo del NOA. Actas del 1er Encuentro de Fijación Biológica del Nitrógeno. 1, 2 y 3 de julio. San Miguel de Tucumán.
- Niemann S, Pühler A, Tichy HV, Simon S, Selbitschka W. 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Sinorhizobium meliloti* population. *J. Appl. Microbiol.* 82: 477-484.
- Sagardoy MA. 1981. Number and distribution of *Rhizobium meliloti* and other microbial populations in soil. *An. Edafol. Agrobiol.*, XL: 879-895.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor, New York.
- Thies JE, Singleton PW, Ben Bohloul B. 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 19-28.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JS. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 24: 6823-6831.
- Vincent JM. 1970. *A Manual for the Practical Study of the root nodule bacteria*. IBP 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 164 pp.