



ORIGINAL

Desarrollo de marcadores moleculares del tipo SCAR para la identificación de *Azospirillum brasilense* Az39

Anahí Coniglio^a, Gastón López^a, José Gualpa^a, Romina Molina^a,
Susana Rosas^a, Mariana Puente^b, Verónica Mora^a y Fabricio Cassán^{a,*}

^a Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta-Microorganismo, Departamento de Ciencias Naturales, FCEFQyN, Universidad Nacional de Río Cuarto

^b Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), Castelar, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 1 de octubre de 2018; aceptado el 28 de febrero de 2019

PALABRAS CLAVE

Azospirillum brasilense;
Marcadores moleculares;
SCAR;
Bioinsumos;
Inoculantes;
Control de calidad

Resumen *Azospirillum brasilense* Az39 es utilizada por empresas productoras de inoculantes para la formulación de bioinsumos en América del Sur desde hace más de 30 años. Esta cepa puede promover el crecimiento, desarrollo, así como la capacidad de tolerar diferentes tipos de estrés en las plantas inoculadas, lo que determina un aumento de la productividad de cultivos de interés agronómico. En la actualidad, no existen protocolos en Argentina que permitan confirmar la identidad de Az39 en productos comerciales a nivel de laboratorios de control de calidad de inoculantes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología en base molecular que permita la identificación certera de *A. brasilense* Az39. Con la secuencia completa del genoma y mediante herramientas bioinformáticas, se pudieron reconocer fragmentos de ADN presentes únicamente en el genoma de Az39. Se diseñaron cebadores dirigidos a amplificar por PCR dichas secuencias. Como resultado se observaron los productos específicos únicamente en la presencia de la cepa de interés. La reacción pudo detectar un título mínimo de 10^5 UFC/ml (4,5 ng/ μ l ADN) o de 10^2 UFC/ml (0,88 ng/ μ l ADN) o una concentración mínima de 0,098 ng/ μ l ADN, dependiendo del método de extracción utilizado. Los cebadores fueron evaluados en el análisis de productos comerciales obtenidos del mercado nacional, arrojando resultados positivos, tanto en muestras directas como así también en pruebas confirmatorias a partir de colonias aisladas de tales productos. La metodología desarrollada en este trabajo, permite la detección certera de *A. brasilense* Az39 en cultivos puros o mezclas complejas de microorganismos.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: fcassan@exa.unrc.edu.ar (F. Cassán).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.004>

0325-7541/© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

36 **KEYWORDS**

37 *Azospirillum*
38 *brasilense*;
39 Molecular markers;
40 SCAR;
41 Biofertilizers;
42 Inoculants;
43 Quality control

Development of sequence characterized amplified region markers for identification of *Azospirillum brasilense* Az39

Abstract *Azospirillum brasilense* Az39 has been used since more than 30 years by several companies in South America for biofertilizers production. This strain may promote plants growth and development, as well as the ability of inoculated plants to tolerate environmental stresses, which determines an increase in the productivity under field conditions. At present, there are no protocols in Argentina to confirm the identity of Az39 in commercial products; however, such biofertilizers are formulated almost exclusively with this strain. Therefore, the objective of this paper was to develop a molecular methodology that allows the accurate identification of *A. brasilense* Az39. Using the complete genome sequence and several bioinformatics tools, fragments of DNA present only in the Az39 genome were recognized. A set of PCR primers to amplify these sequences were designed, and the specific products were observed only in the strain of our interest. The sensitivity of the methodology was evaluated, where the strain could be detected up to a titer of 10^5 CFU/ml (4.5 ng/ μ l ADN) or 10^2 CFU/ml (0.88 ng/ μ l DNA) or in a minimal concentration of 0.098 ng/ μ l DNA, depending on the DNA extraction methodology used. Primers were tested against direct samples of commercial inoculants and cultures, in both cases there were specific products, both in direct samples and in confirmatory tests from isolated colonies from those products. The procedure presented in this paper allows the accurate identification of *A. brasilense* Az39 in pure cultures, mixtures of microorganisms, and commercial biofertilizers.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

59 **Introducción**

60 Q5 La necesidad de la aplicación de prácticas agrícolas sus-
61 tentables ha llevado al desarrollo de bioinsumos en base a
62 microorganismos capaces de promover el crecimiento de las
63 plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) con el fin
64 de aumentar el rendimiento en los cultivos²⁰. En los últi-
65 mos años el mercado mundial de bioinsumos ha crecido
66 con una tasa sostenida cercana al 10% y con una expecta-
67 Q6 tiva de alcanzar los u\$s 4,092 millones en el 2025¹⁸.
68 Dentro de las Plant Growth Promoting Rhizobacteria uno de
69 los géneros mejor caracterizados es *Azospirillum*, siendo
70 *Azospirillum brasilense* una de las especies más estudia-
71 das y ampliamente utilizada en la producción de formulados
72 biológicos^{11,26}. A lo largo de los años, el género *Azospirillum*
73 ha demostrado ser capaz de promover el crecimiento y des-
74 arrollo de numerosas especies vegetales de interés agrícola a
75 través de numerosos mecanismos fisiológicos o bioquímicos⁴.
76 Entre dichos mecanismos se incluyen, la fijación biológica
77 de nitrógeno, que tuvo menos relevancia agronómica de la
78 inicialmente esperada, o la producción de fitohormonas y
79 otros reguladores del crecimiento de plantas, que ha tenido
80 mayor importancia en los últimos años^{4,5}. En Sudamérica,
81 existen alrededor de 106 productos comerciales formula-
82 dos en base a *A. brasilense* y aproximadamente el 90% de
83 estos productos son desarrollados en nuestro país, siendo
84 la cepa Az39 de *A. brasilense* el principio activo más fre-
85 cuentemente utilizado en América de Sur, con un 75% de
86 prevalencia en el mercado nacional y brasilero¹¹. La cepa
87 Az39, fue aislada en el Instituto Nacional de Tecnología
88 Agropecuaria-Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola
89 en la década del 80, mediante un programa de identificación

y selección de cepas de *Azospirillum* spp. de la superficie
de raíces esterilizadas de plantas de trigo en la localidad de
Marcos Juárez en la provincia de Córdoba. Este programa,
además, realizó la evaluación de la capacidad promotora
del crecimiento de Az39 y otras cepas del mismo género en
condiciones agronómicas, siendo la primera la más eficiente.
Como consecuencia, el Servicio Nacional de Sanidad y Cali-
dad Agroalimentaria, junto con las empresas productoras de
inoculantes decidieron recomendarla inicialmente para la
producción de bioinsumos destinados al tratamiento bioló-
gico de semillas de maíz, trigo, sorgo y otras especies de no
leguminosas^{10,33} y a la fecha para más de 16 especies vege-
tales dentro de las que se incluyen las mencionadas y otras
como algodón, tabaco, cebada, arroz y soja en coinoculación
con *Bradyrhizobium japonicum*. Después de más de 30 años
desde su aislamiento y de convertirse en una de las cepas
más estudiadas *in planta* como a campo, el laboratorio de
Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta Microorganismo
de la Universidad Nacional de Río Cuarto en el año 2012 ini-
ció un ambicioso proyecto para secuenciar el genoma de *A.*
brasilense Az39, lo que culminó exitosamente con la obten-
ción de la secuencia completa y cerrada del mismo en el
año 2014³². El genoma de Az39 consiste de 6.311 secuencias
codificantes distribuidas en 6 replicones (un cromosoma, 3
crómidos y 2 plásmidos). La obtención de la secuencia del
genoma fue considerada como la base para el desarrollo
de numerosos estudios posgenómicos dentro de los que se
incluyen la generación de herramientas moleculares para
estudiar con mayor precisión y profundidad la capacidad de
esta bacteria para promover el crecimiento vegetal. Q7

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a pesar
de que el uso de bioinsumos y dentro de ellos aquellos

122 formulados con esta cepa, aumenta año a año, no hay
123 normativas gubernamentales estrictas que regulen la
124 calidad y trazabilidad de los productos en el sistema
125 agroalimentario²². Más aun, en la República Argentina,
126 no existen protocolos que permitan autenticar la identi-
127 dad de la cepa Az39 de *A. brasilense* en formulaciones
128 comercializadas para diferentes tipos de cultivo. Hasta
129 el momento, la identificación de este microorganismo se
130 realiza mediante metodologías de microbiología clásica,
131 pero estas no son suficientes para asegurar con certeza la
132 identidad del microorganismo a nivel de cepa¹⁰. Algunos
133 autores han avanzado en este sentido y han desarrollado
134 metodologías que permiten la identificación a nivel de
135 cepas dentro de una misma especie^{12,13,28}. De este modo,
136 el desarrollo de herramientas moleculares basadas en la
137 secuencia del ADN, permiten establecer la identidad de
138 ciertos microorganismos de manera confiable y precisa. La
139 utilización de marcadores moleculares del tipo *Sequence*
140 *Characterized Amplified Regions* (SCAR) es una de las
141 alternativas con la que se ha conseguido la identificación
142 molecular a nivel de cepa. Los marcadores SCAR represen-
143 tan *loci* únicos, genéticamente definidos, que se identifican
144 mediante amplificación por PCR usando fragmentos de ADN
145 genómico con cebadores específicos. Teniendo en cuenta las
146 consideraciones anteriores, el presente trabajo tuvo como
147 objetivo emplear estas herramientas moleculares para
148 desarrollar una metodología simple, rápida y certera que
149 permita la identificación cepa-específica de *A. brasilense*
150 Az39 en cultivos puros o mezclas de microorganismos.

151 Materiales y métodos

152 Material biológico

153 Los microorganismos utilizados en este trabajo se resumen
154 en la [tabla 1](#). Los cultivos bacterianos pertenecientes al
155 género *Azospirillum* se obtuvieron a partir de colonias puras
156 cultivadas a 30 °C o 37 °C (según la cepa evaluada), durante
157 72 h en el medio de cultivo Luria Bertani (LB) modificado por
158 la adición de solución de rojo Congo (LBRC)²⁴. Las colonias
159 se repicaron en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de caldo
160 LB⁸. Las cepas *Pseudomonas protegens* CHA0 y *Bacillus sub-*
161 *tilis* BH8, cultivadas en caldo LB y aisladas en agar LB, se
162 utilizaron como control negativo. El medio EMA⁴⁰ se utilizó
163 para el crecimiento de *B. japonicum* E109 y se determinó su
164 pureza por ausencia de crecimiento en medio agar tripticasa
165 soya¹.

166 Análisis genotípico *in silico* y desarrollo de 167 marcadores del tipo SCAR

168 Para el análisis *in silico* se utilizó el software
169 <http://insilico.ehu.eus/>⁹. En primer lugar, se cargó la
170 secuencia genómica de la cepa Az39 fraccionada en tres
171 archivos, uno conteniendo el cromosoma, y otros dos con los
172 plásmidos y crómidos, respectivamente. Luego, se simularon
173 múltiples *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP-
174 PCR) utilizando diferentes combinaciones enzimáticas y
175 nucleótidos de selección, ordenados al azar. A continua-
176 ción, se seleccionaron secuencias de ADN con longitudes de
177 entre 200-800 pares de bases (pb). Estas secuencias fueron

Tabla 1 Cepas bacterianas evaluadas en este trabajo

Especie	Cepa
<i>A. brasilense</i> ^a	Az39
<i>A. brasilense</i> ^b	Sp245
<i>A. brasilense</i> ^{3c}	Sp7
<i>A. brasilense</i> ^b	FP2
<i>A. brasilense</i> ^b	Abv5
<i>A. brasilense</i> ^b	Abv6
<i>A. brasilense</i> ^a	Az 19
<i>A. brasilense</i> ^a	Az 36
<i>A. brasilense</i> ^a	Az 45
<i>A. brasilense</i> ^a	Az 48
<i>A. brasilense</i> ^a	Az 63
<i>A. brasilense</i> ^a	Az 65
<i>A. formosense</i> ^c	CC-Nfb-7
<i>A. fermentarium</i> ^c	CC-Ly743
<i>A. halopraeferens</i> ^d	Au4
<i>A. oryzae</i> ^d	COC8
<i>A. palatum</i> ^d	WW10
<i>A. melinis</i> ^d	TMYC 0552
<i>A. lipoferum</i> ^d	Sp59b
<i>A. canadense</i> ^d	DS2
<i>A. rugosum</i> ^d	IMMIB AFH-6
<i>A. agricola</i> ^d	CC-HIH038
<i>A. soli</i> ^d	CC-Ly788
<i>A. zeae</i> ^d	N7
<i>Pseudomonas protegens (ex-fluorescens)</i> ^a	CHA0
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ^a	E109
<i>Bacillus subtilis</i> ^a	BH8

^a IMyZA-INTA Castelar (Buenos Aires, Argentina).

^b Universidad Federal de Paraná (Curitiba, Brasil).

^c Universidad Nacional Chung Hsing (Chung Hsing, Taiwán).

^d Universidad de Lyon (Lyon, Francia).

178 comparadas con las secuencias de nucleótidos no redun-
179 dantes disponibles en la base de datos de *National Center*
180 *for Biotechnology Information*, mediante el uso de la plata-
181 forma BLASTn [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]³ y
182 se seleccionaron las secuencias únicas para la cepa Az39 de
183 *A. brasilense*.

184 Diseño de cebadores específicos para *A. brasilense* 185 Az39

186 El diseño de cebadores se llevó a cabo empleando la
187 plataforma bioinformática Primer3^{19,36} acoplada al sitio
188 web <http://insilico.ehu.eus/primer3/> a partir de las
189 regiones no homólogas identificadas con la plataforma
190 BLASTn. Se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros
191 (i) porcentaje de guanina-citosina (% G+C) entre 40-60%;
192 (ii) temperatura de melting (Tm) entre 55-61 °C; y (iii)
193 longitud del *primer* entre 18-24 pb. Asimismo, los pares
194 de cebadores diseñados fueron analizados con el software
195 OligoAnalyzer 3.1 ofrecido por *Integrated ADN Technolo-*
196 *gies*, para evaluar la formación de estructuras secundarias,
197 como bucles en la misma hebra de ADN²⁷, formación de
198 homodímeros y heterodímeros. Por otro lado, se probó la
199 complementariedad de las secuencias de los oligonucleóti-
200 dos mediante el uso del *National Center for Biotechnology*

Information-BLAST³ y *Prokaryotic Genome DataBase* en <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/search/blast.php>³⁷. Finalmente, se simuló una PCR *in silico*, para evaluar el correcto funcionamiento de los cebadores diseñados. Los cebadores seleccionados fueron sintetizados y evaluados *in vitro*.

Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de colonias aisladas o cultivos puros de Az39 empleando alternativamente dos metodologías: (1) el kit comercial Easy Pure Bacteria Genomic ADN de la firma Transgen Inc. (China), de acuerdo a las especificaciones del fabricante y (2) la resina de intercambio iónico Chelex[®]100, según la metodología propuesta por Alippi et al.². En el caso de las colonias aisladas, la extracción solo se realizó por el método de resina y para ello las colonias fueron resuspendidas en 300 μ l de solución fisiológica estéril (SF) (8,5 mg/ml de NaCl); mientras que en el caso de los cultivos se utilizaron ambos métodos y para ello se partió de un volumen de 1 ml de muestra que se centrifugó durante 10 min a 10 000 rpm y cuyo *pellet* se resuspendió en 300 μ l de SF estéril. En el caso de la extracción con resina, los *pellets* fueron resuspendidos en 150 μ l de una solución de Chelex[®]100 al 6% (p/v) y las muestras se incubaron en un baño termostático a 56 °C durante 10 min seguido de una incubación a 99 °C durante 8 min, sometiendo las muestras a agitación vigorosa entre cada período de incubación. Finalmente, se realizó un último paso de centrifugado durante 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante se utilizó inmediatamente como molde para la realización de las reacciones de PCR o fue fraccionado y conservado a -20 °C hasta su utilización.

Determinación de la temperatura óptima de hibridación de los cebadores

Para conocer la temperatura óptima de hibridación o *annealing* (Ta) para la reacción, se realizó una PCR a tiempo final con gradiente de temperatura, probando diferentes Ta en un rango de 5 °C. Como molde se utilizó el ADN genómico de *A. brasilense* Az39. La mezcla de reacción consistió en un volumen final de 20 μ l conteniendo 1 unidad de EasyTaq ADN polimerasa (TransGen Biotech, China); EasyTaq *buffer* 1X (TransGen Biotech, China); 0,4 mM de dNTPs (Promega, Madison, Wis.); 0,4 μ M de cada *primer* (IDT Technologies) y 1 μ l de ADN molde. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización por 0,5 min a 95 °C; hibridación de 0,5 min desde 55,2 °C hasta 61,4 °C y extensión de 0,5 min a 72 °C, con una extensión final de 5 min a 72 °C. La amplificación se realizó en un termociclador Ivema T21 (Ivema Desarrollos). Los productos de PCR fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y visualizados con un transiluminador UV (Maestrogen, MLB-16 124, Taiwan).

Determinación de la especificidad

Para evaluar la especificidad de los cebadores diseñados previamente, se utilizó como muestra el ADN genómico de diferentes cepas de *A. brasilense*, así como el ADN de otras especies pertenecientes al género y microorganismos distanciados filogenéticamente (tabla 1). Las condiciones de reacción de PCR y los ciclos de amplificación empleados se realizaron según lo descrito anteriormente, variando la Ta de acuerdo a los resultados óptimos obtenidos. Con los microorganismos pertenecientes al género *Azospirillum* descritos en la tabla 1, se realizó la amplificación por PCR con cebadores específicos para el gen 16S rDNA según Lin et al.²¹ a modo de control para confirmar la identidad de las cepas empleadas en el análisis. En el caso de los microorganismos distanciados filogenéticamente, se utilizaron los cebadores BOX-AR1 según Versalovic et al.⁴⁰.

Determinación de la sensibilidad del método

Para evaluar la sensibilidad del método, se utilizó ADN genómico como molde para la amplificación por PCR, el cual fue obtenido alternativamente por extracción con un kit comercial o por resina de intercambio iónico, como se describió previamente. A modo de resumen, 1 ml de un cultivo puro de *A. brasilense* Az39 fue diluido por duplicado en tubos conteniendo 9 ml de solución fisiológica estéril para obtener tubos con una dilución inicial de 10⁻¹ a partir de los que se realizaron diluciones decimales hasta alcanzar un valor de 10⁻⁷. A continuación, se tomaron 20 μ l de cada dilución y se realizó un recuento por la técnica de microgota³¹ para confirmar el número de células viables. Del mismo tubo, se tomó 1 ml para la extracción con resina. El segundo tubo fue utilizado para la extracción de ADN mediante kit y la cuantificación de la concentración de ADN por la utilización de un NanoDrop One de la firma Thermo Fischer Inc.

(EE. UU.). La determinación se realizó sobre el total de células (UFC/ml) obtenidas por centrifugación de cada dilución. Adicionalmente, se midió la concentración de ADN de diluciones en base decimal y centesimal del ADN obtenido a partir de una dilución 10⁻⁷ equivalente a un valor teórico de 1x10² UFC/ml. En todos los casos se utilizó como control negativo agua MiliQ esterilizada.

Determinación de la especificidad en cultivos mixtos con *B. japonicum* E109

Cultivos mixtos de *A. brasilense* Az39 y *B. japonicum* E109, se obtuvieron independientemente en medios LB y EMA, hasta alcanzar una DO₅₉₅ aprox. 1,9. Ambos cultivos se mezclaron en tubos plásticos de 1,5 ml de capacidad en diferentes proporciones de cada microorganismo (p. ej. 100% de E109; 70% E109 + 30% Az39; 50% E109 + 50% Az39; 30% E109 + 70% Az39 y 100% Az39). De cada una de las mezclas, se extrajo el ADN genómico mediante la metodología detallada anteriormente para cultivos en medio líquido. El ADN obtenido se utilizó como molde para reacciones de PCR específicas con los cebadores diseñados en este trabajo (denominados TP5).

Determinación de la especificidad en cultivos mixtos con más de una cepa de *Azospirillum*

Se realizaron tres mezclas diferentes de cultivos bacterianos pertenecientes al género *Azospirillum*, combinados en igual proporción. En el caso de la mezcla 1, se emplearon las cepas de la misma especie *A. brasilense* Az39, Sp7 y Sp245. Por otro lado, en la mezcla 2 se utilizaron las cepas *A. brasilense* Az39, Sp7 y Sp245, *Achatodes zae* N7, *A. melinis* TMYC 0552, *A. halopraeferens* Au4, *A. canadense* DS2 y *A. rugosum* IMMIB AFH-6 pertenecientes a distintas especies del género. Finalmente, en la mezcla 3 se utilizaron *A. brasilense* Az39, *A. formosense* CC-Nfb-7, *A. fermentarium* CC-LY743, *A. oryzae* COC8, *A. palatum* WW10, *A. lipoferum* Sp59b, *A. agricola* CC-HIH038 y *A. soli* CC-Ly788. Todas las cepas empleadas en estos experimentos se cultivaron en medio MMAB³⁸ durante 24 h. Se tomó 1 ml de cada cultivo, se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min y se ajustaron a igual DO₅₉₅, con el objetivo de que todas las cepas tuvieran igual concentración (aprox. 1 x10⁹ UFC/ml). Las mezclas se realizaron en Eppendorf de 1,5 ml a volumen final 1 ml, colocando iguales proporciones de los diferentes cultivos. Luego, a partir de cada mezcla bacteriana se extrajo el ADN con Chelex[®]100 según la metodología descrita anteriormente. Finalmente, el ADN genómico de las mezclas fue utilizado como molde para PCR con los cebadores específicos de Az39. Como control negativo se utilizaron mezclas sin Az39.

Control de calidad de formulaciones comerciales

Se emplearon tres productos comerciales recomendados para el tratamiento de semillas de trigo y maíz, que en su membrete indicaban contener como principio activo *A. brasilense* Az39, a los que denominamos aleatoriamente I1, I2 e I3. En el caso del producto I1 declaraba una fecha de vencimiento tres meses posteriores a la fecha del análisis, en el caso de I2 se encontraba al límite de la fecha de vencimiento y en el caso de I3 había vencido 6 meses antes de realizar este análisis. A modo de aclaración, es necesario mencionar que, en Argentina, el valor de recuento límite a la fecha de vencimiento para productos comerciales conteniendo *Azospirillum* es de 1x10⁷ UFC.ml⁻¹. Para la toma de muestras, se homogenizaron las vejigas con el inoculante durante 10 min, se esterilizaron las superficies y se tomaron 2 ml de cada muestra para la posterior extracción de ADN por el método de Chelex[®]100. Adicionalmente, se tomó 1 ml para el recuento. Previo a la extracción de ADN, se realizó un lavado con solución fisiológica y las células se concentraron en un volumen final de 300 µl. Luego se prosiguió con la metodología descrita previamente con la resina Chelex[®]100. El recuento se realizó por la técnica de microgota³¹ y para ello las muestras fueron colocadas en 9 ml de SF estéril para obtener la dilución 10⁻¹ de la que se realizaron diluciones decimales para alcanzar una dilución de 10⁻⁷. A continuación, se tomaron 20 µl de cada dilución, se sembraron en placas de LBRC y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se realizó el recuento de colonias y se calculó el número de UFC/ml. Adicionalmente, las muestras se sembraron en placas de LBRC en estrias por agotamiento y a partir de las colonias crecidas en este medio, se extrajo ADN con la resina Chelex[®]100 y se utilizó como molde para la amplificación por

PCR con los cebadores TP5 a modo de confirmar la identidad de las colonias obtenidas.

Resultados

Análisis genotípico *in silico* y desarrollo de marcadores moleculares del tipo SCAR

Mediante la simulación de 400 AFLP-PCR *in silico*, se seleccionaron 700 secuencias candidatas con un tamaño entre 200 y 800 pb. Cuando estas secuencias fueron comparadas mediante BLASTn, solo 12 de ellas no presentaron homología con secuencias depositadas en la base de datos o exhibieron fragmentos de al menos 200 pb únicos en el genoma de *A. brasilense* Az39 (fig. S1). Las secuencias únicas en el genoma de Az39 se localizaron en el cromosoma de dicha bacteria, algunas de ellas ubicadas en regiones no codificantes como en el caso de las secuencias 6, 7, 9 y 10 de la figura S2; mientras que otras se encontraron en regiones de secuencias que codifican para proteínas hipotéticas. Específicamente, en el caso de los productos de los cebadores evaluados *in vitro* en este trabajo TP5, TP6, TM 1 y EM1, todos se encontraron dentro de regiones que codifican para proteínas hipotéticas (fig. S2). Un total de 18 pares de cebadores fueron diseñados para la amplificación de las regiones no homólogas. Se observó que todos los cebadores fueron capaces de formar estructuras como homodímeros, heterodímeros y bucles dentro de la misma molécula de ADN, sin embargo, se escogieron 4 pares de cebadores cuyas características termodinámicas demostraron que las posibles estructuras secundarias eran inestables. Adicionalmente, cuando se simularon reacciones de PCR en los genomas de *A. brasilense* Sp45, *A. lipoferum* 4B, *Azospirillum* sp. B510 y *Azospirillum* spp. el resultado fue negativo. Más aún, no se observó amplificación en otras especies de *Azospirillum*, ni en otros géneros bacterianos presentes comúnmente en el suelo, entre ellos *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodospirillum*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* o *Nitrosomonas*. Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizadas y probadas *in vitro* se muestran en la tabla 2 y estas amplifican las regiones número 4, 5 y 8 de la figura S1 y de la figura S3.

Análisis *in vitro* de los cebadores específicos para Az39

Los 4 pares de cebadores diseñados fueron capaces de amplificar en todas las temperaturas evaluadas (fig. S4). En la figura S4A se observa que el par TP5 amplificó un fragmento de 307 pb; mientras que los pares de cebadores denominados TP6 y TM1 originaron amplicones de 401 pb y 306 pb respectivamente (fig. S4B). La amplificación con el par de cebadores denominado EM1 dio como resultado un amplicón esperado de 611 pb y una banda adicional que corresponde a un fragmento entre 100 pb y 200 pb (fig. S4C). Ambas bandas se observaron solo en la cepa Az39, inclusive cuando la Ta fue de 65 °C (datos no mostrados). En función de los resultados obtenidos en esta sección, se seleccionaron las siguientes Ta: 59,1 °C; 55,2 °C y 56,4 °C para cada par de cebadores TP5, TP6 y TM1 respectivamente. Debido a que el par de cebadores EM1 era capaz de amplificar en regiones

Tabla 2 Cebadores diseñados y probados experimentalmente en este trabajo

Par de cebadores	Orientación	Secuencia (5'-3')	Tamaño (nt)	Contenido G+C (%)	Temperatura de <i>melting</i> ^a (°C)	Secuencia blanco (Figura S1')	Tamaño del amplicón (pb)
TP5	F	GGCCGTTGTTCTCGGTCTCTAT	22	54,5	60,6	4	307
	R	GCGATCTCCATTTATTTCGCCCT	23	47,8	59,2		
TP6	F	ATCAAGACGCTCGCCACC	18	61,1	59,7	4	401
	R	CGATCTCCATTTATTTCGCCCTTC	24	45,8	57,7		
EM1	F	GCATGTACAGTGTGATCAGGGAG	23	52,2	58,7	5	611
	R	GCCGCGATTACTTCAACCTCT	21	52,1	59,1		
TM1	F	GGAGGAATCCACGGAATCCC	20	60	60,0	8	306
	R	TTTCCAAGGTCGAGCCTTC	20	55	59,3		

^a Valores de T_m calculados con el software ofrecido por Thermo Fisher Scientific®.

inespecíficas no fue utilizado para los ensayos posteriores de este trabajo.

Determinación de la especificidad y sensibilidad del método

En la **figura 1** se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la especificidad del par de cebadores denominados TP5 en cultivos puros. El ciclo de reacción se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 59,1 °C. Cuando se utilizó como molde el ADN genómico de cepas de *A. brasilense* filogenéticamente relacionadas con Az39, los resultados fueron negativos (**fig. 1A**), lo que demuestra el alto grado de especificidad de los cebadores diseñados. Las cepas evaluadas fueron *A. brasilense* Sp245, FP2, Abv5 y Abv6 (utilizadas en la producción de inoculantes en Brasil); Az 19, Az 36, Az 45, Az 48, Az 63 y Az 65 (pertenecientes a la colección del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Instituto de Microbiología y Zootecnia Agrícola). Tampoco se observaron productos de PCR en otras cepas pertenecientes a diferentes especies del género como *A. formosense* CC-Nfb-7, *A. fermentarium* CC-LY743, *A. halopraeferens* Au4, *A. oryzae* COC8, *A. palatum* WW10, *A. melinis* TMYC 0552, *A. lipoferum* Sp59b, *A. canadense* DS2, *A. rugosum* IMMIB AFH-6, *A. agricola* CC-HIH038, *A. soli* CC-Ly788 y *A. zae* N7 (**fig. 1B**). Otras cepas no relacionadas filogenéticamente con este género, pero frecuentemente utilizadas para la formulación comercial de inoculantes combinados con *A. brasilense* Az39 fueron evaluadas. Estas cepas fueron *P. protegens* (ex-*P. fluorescens*) CHA0, *B. japonicum* E109 y *B. subtilis* BH8 y ninguna presentó resultados positivos para la amplificación con los cebadores TP5. En las **figuras 1C** y **D** se observa la amplificación del gen 16S rDNA con los cebadores específicos para el género *Azospirillum* utilizados como control²¹. Por otro lado, se comprobó la amplificación por PCR con cebadores del tipo BOX-AR1 en las cepas pertenecientes a otros géneros microbianos (datos no mostrados). La evaluación con los cebadores TP6 y TM1 presentó resultados inesperados ya que hubo amplificación inespecífica en algunas cepas del género, por lo que los mismos fueron descartados para ensayos posteriores de este trabajo. Si bien, se analizó el total de las cepas presentadas en la **tabla 1** con los cebadores TP6 y TM1 (datos no mostrados), en la **figura S5** se presentan a modo de

ejemplo algunos de los productos inespecíficos amplificados por dichos cebadores. Algunas cepas amplificaron bandas únicas, definidas y de peso molecular diferente al esperado para el caso de Az39; mientras que en otras se observó más de un producto de PCR. A pesar de que los cebadores TP6 y TM1 amplificaron de manera inespecífica para otros microorganismos, fueron eficientes para diferenciar la cepa Az39 del resto de las cepas evaluadas ya que, aun existiendo amplificación inespecífica, fue posible distinguir *A. brasilense* Az39 de otras cepas.

En cuanto a la sensibilidad, la metodología fue probada con el par de cebadores denominado TP5 ya que resultó ser el más específico para la reacción de PCR. En la **figura 2A** se observan los productos de amplificación de PCR empleando el par de cebadores TP5 para los que se utilizó como molde ADN extraído por la resina Chelex® 100, a partir de diluciones decimales de un cultivo puro de Az39. Nuestros resultados demuestran que el punto de corte con esta metodología se obtiene en la dilución 10⁻⁴ equivalente a un título bacteriano de 2,5x10⁵ UFC/ml o una concentración de ADN equivalente a 4,5 ng/μl ADN. En la **figura 2B** se observan los productos de amplificación de PCR, utilizando como molde ADN extraído por un kit comercial. Nuestros resultados muestran que el punto de corte de esta metodología, teniendo en cuenta el número de células, se obtiene en dilución 10⁻⁷, equivalente a un título de 4,5 x 10² UFC/ml y con un contenido equivalente de ADN de 0,88 ng/μl; sin embargo, el límite de detección en base a la concentración de ADN fue establecido donde la amplificación se alcanzó con 0,098 ng/μl de ADN, a pesar de que la amplificación fue tenuemente observada en una concentración inferior de ADN (0,0092 ng/μl). El recuento inicial del cultivo del cual se realizaron las diluciones fue 2,5x10⁹ UFC/ml. Es importante aclarar que cuando el ADN fue extraído con la metodología de Alippi et al.² se obtuvieron resultados similares para las amplificaciones realizadas con los cebadores TP6 (datos no mostrados). En función de los resultados obtenidos a nivel de la especificidad y sensibilidad del método en cultivos puros, se pudo determinar la especificidad en cultivos mixtos. En la **figura 3A** se observa la amplificación por PCR empleando los cebadores TP5, a partir de mezclas de cultivos puros de *A. brasilense* Az39 y *B. japonicum* E109 en distintas proporciones. Los resultados demostraron que cuando la cepa Az39 está presente, la amplificación por PCR es positiva independientemente de las proporciones de los

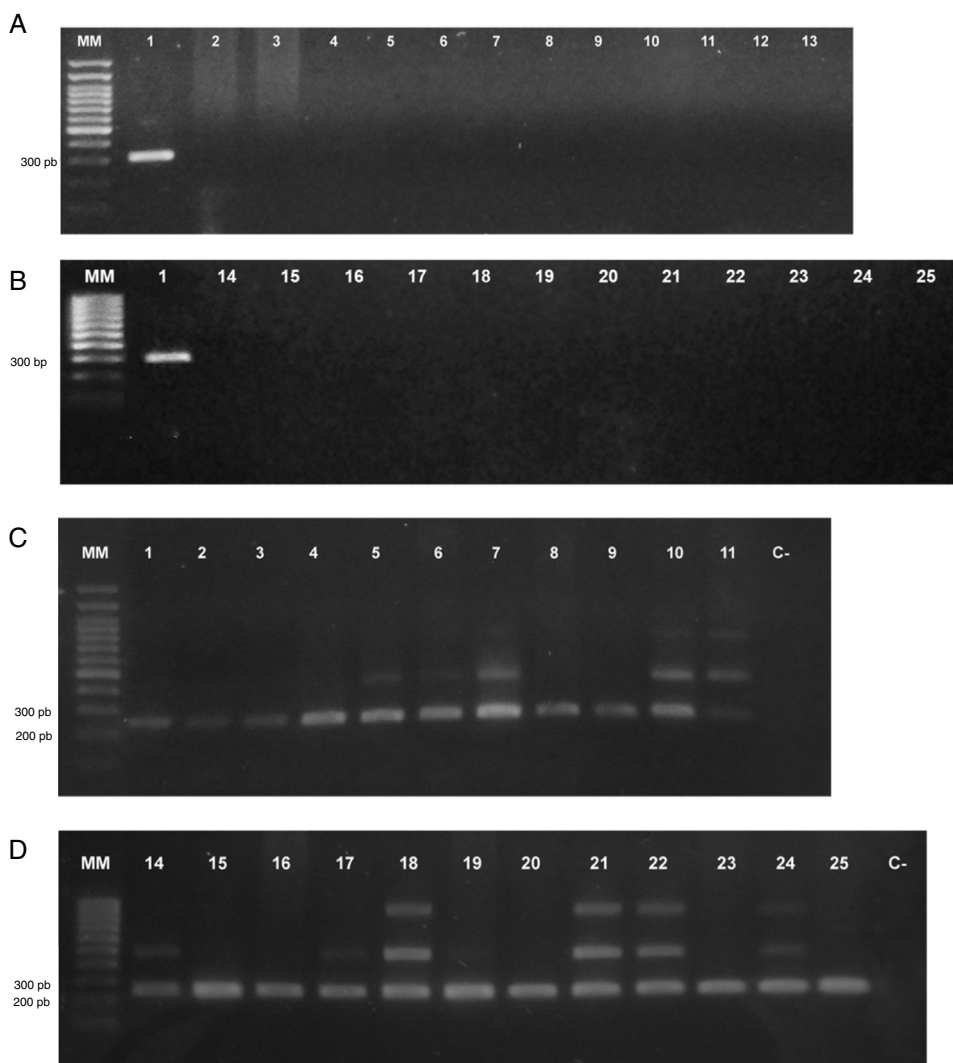


Figura 1 A y B) Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación con los cebadores TP5, específicos para la cepa Az39. C y D) Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación con los cebadores 16S rDNA específicos de género (Lin et al., 2011) utilizados como control positivo para las cepas *Azospirillum* spp. Referencias: (MM) marcador de peso molecular 100 bp Trans Plus ADN Ladder; (1) *A. brasilense* Az39; (2) *A. brasilense* Sp245; (3) *A. brasilense* FP2; (4) *A. brasilense* Abv5; (5) *A. brasilense* Abv6; (6) *A. brasilense* Az 19; (7) *A. brasilense* Az 36; (8) *A. brasilense* Az 45; (9) *A. brasilense* Az 48; (10) *A. brasilense* Az 63; (11) *A. brasilense* Az 65; (12) *Pseudomonas protegens* CHA0; (13) *Bradyrhizobium japonicum* E109; (14) *A. formosense* CC-Nfb-7; (15) *A. fermentarium* CC-LY743; (16) *A. halopraeferens* Au4; (17) *A. oryzae* COC8; (18) *A. palatum* WW10; (19) *A. melinis* TMYC 0552; (20) *A. lipoferum* Sp59b; (21) *A. canadense* DS2; (22) *A. rugosum* IMMIB AFH-6; (23) *A. agrícola* CC-HIH038; (24) *A. soli* CC-Ly788; (25) *A. zea* N7; (C-) control negativo (agua).

microorganismos presentes en la mezcla. La especificidad en mezclas de *Azospirillum* se evaluó mezclando por un lado cepas de la misma especie (mezcla 1) y cepas pertenecientes a distintas especies (mezcla 2 y 3). En la figura 3B se observa el resultado para las tres mezclas de cultivos evaluadas, donde el producto de 307 pb se obtuvo en todos los casos en los que estuvo presente Az39; mientras que los resultados negativos fueron pertenecientes a las mezclas control sin el agregado de esta cepa.

Control de calidad de formulados comerciales

Desde el punto de vista del análisis microbiológico de los productos comerciales empleados en este trabajo, podemos

mencionar que los resultados obtenidos a partir del empleo de la técnica de recuento por microgota arrojaron los siguientes títulos de recuento: $5,8 \times 10^8$ UFC/ml para el formulado I1; $3,38 \times 10^7$ UFC/ml y para el formulado I2 y $< 1 \times 10^5$ UFC/ml para el formulado I3. En el caso de I1 e I2 se observaron colonias color rojo escarlata, con una superficie plana-craquelada, con bordes redondeados y textura seca; morfología típica para este grupo bacteriano. En el caso de I3 solo se observaron estas colonias después de sembrar de manera directa una alícuota del producto en una placa conteniendo medio LBRC agarizado. Cuando el ADN molde utilizado fue obtenido a partir de colonias puras cultivadas de los recuentos (I1 e I2) o de la siembra en directo del producto I3, la electroforesis en gel de agarosa, presentó

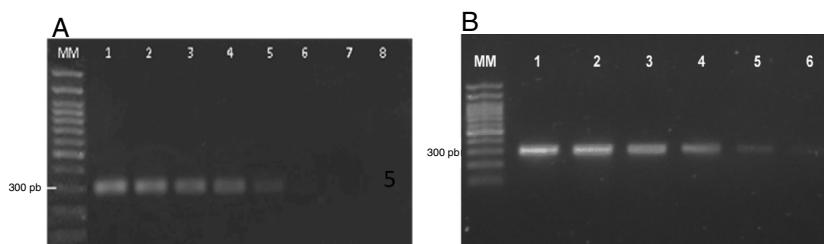


Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación con el par de cebadores TP5 para la determinación de la sensibilidad del método a partir de ADN molde obtenido por A) resina Chelex® 100 y B) kit comercial. *Referencias A):* (MM) marcador molecular 100 bp Trans Plus ADN Ladder; (1). *A. brasilense* Az39 10⁹ UFC/ml; (2) 10⁸ UFC/ml; (3) 10⁷ UFC/ml; (4) 10⁶ UFC/ml; (5) 10⁵ UFC/ml; (6) 10⁴ UFC/ml; (7) 10³ UFC/ml; (8) 10² UFC/ml. *Referencias B):* (MM) marcador molecular 100 bp Trans Plus ADN Ladder; (1) *A. brasilense* Az39 8,5x10⁵ UFC/ml; (2) 5,3x10⁴ UFC/ml; (3) 6,7x10³ UFC/ml; (4) 2,5x10² UFC/ml (equivalente a 0,88 ng/μl ADN); (5)* 0,098 ng/μl ADN y (6)** 0,0092 ng/μl de ADN. Dilución *decimal y ** centesimal de la muestra obtenida de ADN en (4).

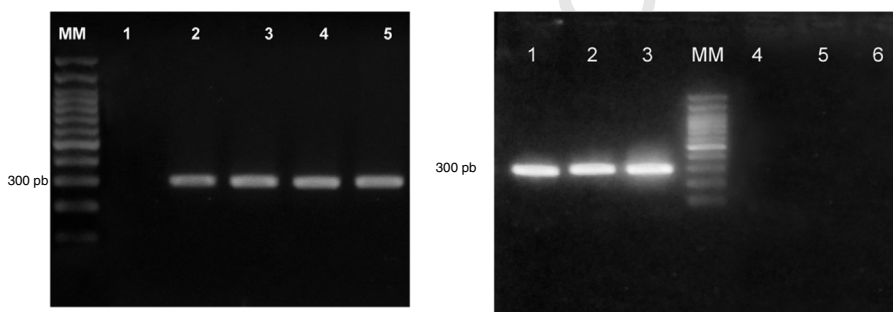


Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación con los cebadores TP5 en la evaluación de la especificidad en cultivos mixtos. *Referencias A):* (MM) marcador de peso molecular 1 kb GeneRuler™; (1) 100% *B. japonicum* E109; (2) 70% *B. japonicum* E109 + 30% *A. brasilense* Az39; (3) 50% *B. japonicum* E109 + 50% *A. brasilense* Az39; (4) 30% *B. japonicum* E109 + 70% *A. brasilense* Az39; (5) 100% *A. brasilense* Az39. *Referencias B):* (1) mezcla 1; (2) mezcla 2; (3) mezcla 3; (MM) marcador de peso molecular 100 bp Trans Plus ADN Ladder; (4) control negativo mezcla 1; (5) control negativo mezcla 2; (6) control negativo mezcla 3.

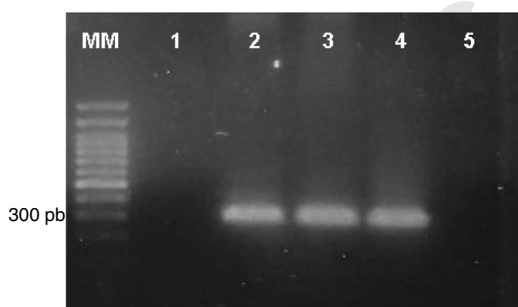


Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación con el par de cebadores TP5 en muestras directas de inoculantes. *Referencias:* (MM) marcador molecular 100 bp Trans Plus ADN Ladder; (1) control negativo (agua); (2) *A. brasilense* Az39; (3) inoculante I1; (4) inoculante I2; (5) inoculante I3.

Discusión

Nuestro trabajo consistió en realizar una identificación certera de *A. brasilense* Az39, a través de una metodología rápida y accesible, que pueda ser utilizada como una estrategia de control de calidad de inoculantes comerciales. Esto se logró mediante el desarrollo de marcadores moleculares del tipo SCAR. Hasta el momento, la identificación cepa-específica se podía realizar mediante el marcado de la misma con genes reporteros, pero esto involucra modificaciones a nivel genético, y solo puede aplicarse con fines de investigación¹⁴. La amplificación por PCR de secuencias específicas de cada cepa es una metodología simple y permite detectar particularidades de la cepa sin necesidad de su modificación genética. El uso de herramientas bioinformáticas y el acceso a la secuencia completa del genoma de Az39 nos permitió hallar fragmentos únicos en la secuencia de ADN de esta cepa. La búsqueda se realizó mediante la simulación de AFLP-PCR *in silico*. La mayoría de los trabajos donde se aborda la problemática de la identificación específica de cepas, se realizan de manera experimental a través de la búsqueda de secuencias únicas utilizando metodologías del tipo fingerprinting^{15,16}. Esta alternativa resulta más costosa, laboriosa e implica una mayor inversión de tiempo, pero es de gran utilidad cuando se desconoce

resultados positivos para los tres productos comerciales (datos no mostrados). Mientras que cuando se utilizó como molde el ADN obtenido directamente de los formulados, resultados positivos se observaron para los inoculantes I1 e I2; sin embargo, en el caso del inoculante I3, no se observó amplificación (fig. 4).

la secuencia genómica de la bacteria de interés. Entre los trabajos publicados donde obtienen marcadores SCAR específicos para otros microorganismos del género *Azospirillum* de manera experimental, se encuentran los realizados por Couillerot et al.^{12,13} y de Priya et al.²⁸. Estos autores lograron desarrollar protocolos de identificación y cuantificación por qPCR con cebadores diseñados para amplificar secuencias específicas de las cepas *A. lipoferum* CRT1¹³, *A. brasilense* UAP-154 y CFN-535¹² y *Azospirillum* sp. Az204 y *A. brasilense* Sp7²⁸, respectivamente. Cabe destacar que no se han encontrado trabajos donde se lleve a cabo de manera *in vitro* la búsqueda de secuencias SCAR a partir de AFLP-PCR; sin embargo, la disponibilidad de secuencias genómicas en diferentes bases de datos, permite el desarrollo de estas novedosas herramientas como alternativa. Tal es así que se ha logrado encontrar secuencias específicas de manera *in silico*, mediante el corte en pequeños fragmentos de 500 pb (simulación de digestión enzimática) del ADN genómico de una cepa de interés. Con el posterior análisis mediante BLAST sobre el genoma de una cepa cercanamente relacionada³⁵ (hibridación y eliminación de los fragmentos compartidos). De este modo, se detectaron fragmentos únicos para la identificación de *A. brasilense* FP2 mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas³⁵. Este abordaje permitió la identificación certera de la cepa de una manera diferente a la planteada en este trabajo, pero igualmente efectiva. La herramienta molecular utilizada en nuestro trabajo ha permitido desarrollar una metodología simple, rápida y económica, comparada con los reportes previos; que permite de igual modo conseguir una gran cantidad de secuencias específicas para la identificación de la cepa.

Los fragmentos de ADN encontrados, distinguidos por estar presentes únicamente en el genoma de Az39, fueron utilizados como molde para el diseño de los cebadores. Cuatro de estos pares de cebadores fueron evaluados *in vitro*. Solo el par denominado TP5 demostró ser específico desde una primera instancia, el mismo fue seleccionado para las evaluaciones posteriores. En el caso de los otros cebadores, el grado de especificidad fue bajo, sin embargo, es posible aumentar la misma variando condiciones como lo son la Ta, el tiempo de elongación o la concentración de cebadores. A pesar de esta diferencia observada entre los ensayos *in vitro* e *in silico*, para los cebadores TP6 y TM1, con respecto a otros microorganismos, siempre se observó el producto esperado en AZ39. Adicionalmente, ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio, demostraron que el aumento de la Ta mejora la especificidad con respecto a la amplificación sobre otras cepas (datos no mostrados); sin embargo, en el caso de los cebadores EM1, no se observó el producto esperado y este tipo de diferencias entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in silico* también han sido observados en otros trabajos^{17,25}. De manera general, los pares de cebadores TP6, TM1 y EM1 fueron descartados a lo largo de los experimentos debido a que el par TP5 presentó el mejor comportamiento.

En cuanto a la prueba de especificidad en una mezcla bacteriana, en el trabajo de Shime-Hattori et al.³⁴ utilizaron una cepa de *Bacillus* en diferentes proporciones. Ensayos similares fueron realizados en nuestro laboratorio, empleando una mezcla de *A. brasilense* Az39 con *B. japonicum* E109.

Existen reportes que demuestran que la coinoculación con ambas cepas en plantas de soja, genera un efecto positivo en la estimulación del crecimiento de este cultivo^{7,29,30}. En base a esta evidencia, y teniendo en cuenta que en la actualidad se comercializan inoculantes formulados con ambas bacterias, probamos que los cebadores diseñados para *A. brasilense* Az39 fueron eficientes. Así como también fueron capaces de distinguir la cepa de interés en mezclas con microorganismos del mismo género y especie.

En los ensayos con mezclas bacterianas, el par TP5 demostró su aptitud de diferenciar Az39 de otras cepas, pero siempre respetando una concentración final de células de Az39 por encima del valor de 10⁵ UFC/ml cuando se emplea el método de extracción con Chelex[®] 100. A pesar de las desventajas observadas en la extracción de ADN con esta resina fue propuesta como un método alternativo debido a que a los fines de control de calidad de inoculantes es más accesible y económico que la utilización de kits comerciales. Otra metodología alternativa para la detección directa desde formulados comerciales consistiría en la utilización de Sephadex G100 al 10%²⁸.

Hasta el momento, el control de calidad de inoculantes a base de *Azospirillum* se realiza según lo expresa el manual de Procedimientos de la REDCAI¹⁰. El mismo consiste en el recuento de células viables mediante la metodología de siembra en placas por extensión en superficie en medio rojo Congo. Para la evaluación de microorganismos contaminantes, el manual de procedimientos sugiere la siembra directa en medio agar tripticasa soya para los microorganismos en general y en agar Sabouraud para hongos saprofitos. Adicionalmente se sugiere una coloración mediante la técnica de Gram y la observación al microscopio de un preparado fresco de la muestra. Por otra parte, debido al dimorfismo de colonias de *Azospirillum* sp., en placas de medio rojo Congo, se realiza una prueba de la capacidad diazotrófica en condiciones de microaerofilia en medio NFB, de las colonias consideradas presuntivas. En nuestro trabajo proponemos complementar la metodología propuesta por la REDCAI con la confirmación molecular de la identidad de la cepa. Los pares de cebadores diseñados en nuestro trabajo cumplieron con los requisitos esperados respecto a la especificidad de la cepa Az39 en muestras comerciales. Nuestros resultados demostraron que la combinación de las metodologías de microbiología clásica y molecular permiten la evaluación eficiente de la calidad de inoculantes con diferente aptitud comercial, ya que se pudo distinguir entre productos dentro y fuera de la fecha de vencimiento y con recuentos por encima y debajo de la garantía de tales productos. En cuanto al límite de detección de la reacción de PCR, el mismo fue dependiente de la metodología de extracción de ADN empleada, siendo en este caso para la resina Chelex[®] 100 del orden de 10⁵ UFC/ml y equivalente a 4,5 ng/ μ l ADN. Si bien, la sensibilidad del método es baja empleando la resina iónica, es necesario destacar que los productos comerciales formulados con *Azospirillum* deben contener no menos de 1x10⁹ UFC/ml a la fecha de elaboración y no menos de 1x10⁷ UFC/ml a la fecha de vencimiento, por lo que el método de extracción con resina, a pesar de su baja eficiencia, todavía sería útil si consideramos la definición de producto apto para uso agrícola con más de 1x10⁷ UFC/ml. Por otro lado, un aumento significativo de la sensibilidad del

método fue obtenido cuando el ADN bacteriano se extrajo con un kit comercial, para el que un título bacteriano de 10^2 UFC/ml o una concentración equivalente de ADN de 0,88 ng/ μ l fue suficiente para su amplificación por PCR. De la misma manera, concentraciones de ADN diez y cien veces inferior a la equivalente en 10^2 UFC/ml (0,098 o 0,0092 ng/ μ l) resultaron positivas para la amplificación, aunque en el último caso, tenuemente. Esto indica claramente que el límite de la metodología de amplificación por PCR está por debajo del límite de detección del método de recuento de bacterias viables disponible en este momento. Finalmente y de manera complementaria, podemos decir que otros investigadores han desarrollado metodologías similares para la identificación de microorganismos a nivel de género, que pueden ser utilizadas de manera complementaria para la evaluación del control de calidad de inoculantes^{6,21,23,34}.

Conclusión

La caracterización fenotípica no es suficiente para la identificación inequívoca de un microorganismo, pero puede brindar conocimientos sobre la pureza de un cultivo y el número de microorganismos presentes en el mismo. Esto reafirma que, en muchos casos, la combinación de técnicas microbiológicas y moleculares es una estrategia clave para establecer un procedimiento efectivo de control de calidad. Muchas técnicas moleculares han sido descritas para la identificación de *Azospirillum* pero ninguna destinada al reconocimiento específico de *A. brasilense* Az39, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes en la República Argentina. Hasta el momento, la identificación de esta cepa empleando herramientas moleculares se puede realizar por genotipado (16S rDNA y *rpoD*) de una manera relativamente rápida; sin embargo, estas metodologías requieren de amplificación y secuenciación, por lo que las hace imprácticas para el análisis cotidiano. En este trabajo, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas accesibles de manera gratuita y la ventaja de contar con la secuencia del genoma de *A. brasilense* Az39, nos permitió realizar el análisis del polimorfismo de ADN en nuestra cepa de interés. Esta estrategia condujo al hallazgo de secuencias únicas en el genoma de Az39. El diseño de cebadores, dirigidos a dichas secuencias, demostró no solo ser específico a nivel *in silico*, sino que también permite determinar la presencia de *A. brasilense* Az39 en un cultivo puro tan solo con amplificación y electroforesis en gel de agarosa. Estas metodologías resultan ser prácticas y accesibles, además hacen posible una identificación de rutina certera. A pesar de la desventaja que presenta la técnica desarrollada en cuanto al bajo poder de detección obtenido, donde la extracción del ADN genómico de las muestras se obtiene por técnicas robustas, sencillas, rápidas y de bajo costo, es exitosa tanto en cultivos puros como en mezclas bacterianas. Así como también, los resultados obtenidos para formulados comerciales permitieron demostrar que los productos evaluados estaban formulados con la cepa Az39 de *A. brasilense* recomendada por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) en la República Argentina para la producción de inoculantes para numerosas especies vegetales de interés agrícola.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigación Científica Tecnológica de Argentina (CONICET) y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONCYT), a través de sus proyectos PICT-2012-1051 y PICT 2015-1599.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores del trabajo quieren mostrar su agradecimiento a la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC); al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). En particular, agradecemos al Dr. Emanuel de Souza de la Universidad Federal de Paraná (Curitiba, Brasil); al Prof. C.C. Young de la Universidad Nacional Chung Hsing University (Chung Hsing, Taiwán) y a la Prof.^a Florence Wisnieski-Dyé del Laboratorio de Ecología de la Rizosfera de la Universidad de Lyon (Lyon, Francia), por facilitarnos diferentes cepas de *Azospirillum* utilizadas en este trabajo.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2019.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.004).

Bibliografía

1. Albanesi A, Benitende S, Bonfiglio C, Cassán F, Gonzalez F, Lett L, Penna C, Peticari A, Rossi A, Torresani S. Inoculantes para leguminosas formulados con Rizobios. En: Albanesi A, Benitende S, Cassán F, Peticari A, editores. Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes. Buenos Aires, Asociación Argentina de Microbiología, 2013, p. 25-32.
2. Alippi A, López A, Balatti P. Métodos para la detección de Agrobacterium a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. Rev Argent Microbiol. 2011;43:278-86.
3. Altschul S. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215:403-10.
4. Bashan Y, de-Bashan L. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. En: Donald Sparks, editor. Advances in Agronomy, Vol. 108. Burlington, Academic Press, 2010, p. 77-136.
5. Bashan Y, Holguin G, de-Bashan L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can J Microbiol. 2004;50:521-77.
6. Baudoin E, Couillerot O, Spaepen S, Moëne-Loccoz Y, Nazaret S. Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phyto-stimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. J Appl Microbiol. 2010;108:25-38.
7. Benitende M, Urich W, Herrera M, Gangge F. Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. Agriscientia. 2010;27:71-7.

- 796 8. Bertani G, Studies on lysogenesis I. The mode of phageliberation
797 by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1951;62:293.
- 798 9. Bikandi J, San Millán R, Aitor R, Garaizar J. In silico analysis of
799 complete bacterial genomes: PCR AFLP–PCR and endonuclease
800 restriction. *Bioinformatics.* 2004;20:798–9.
- 801 10. Cassán F, Penna C, Creus C, Radovancich D, Emilia M, García de
802 Salamone I, di Salvo L, Mentel I, García J, Pasarello Mayans M
803 del C, Lett L, Puente M, Correa O, Punschke Valerio K, Massa
804 R, Catafesta M, Rossi A, Díaz M, Righes S, Carletti S, Rodríguez
805 Cáceres E. Protocol for the quality control of *Azospirillum* spp.
806 inoculants. En: Cassán FD, Creus CM, Okon Y., editors. *Handbook*
807 *for Azospirillum*. Switzerland: Springer, 2015, p. 487–99.
- 808 11. Cassán F, Diaz-Zorita M. *Azospirillum* sp. in current agricul-
809 ture: From the laboratory to the field. *Soil Biol Biochem.*
810 2016;103:117–30.
- 811 12. Couillerot O, Poirier M, Prigent-Combaret C, Mavingui P,
812 Caballero-Mellado J, Moëne-Loccoz Y. Assessment of SCAR
813 markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quanti-
814 fication of *Azospirillum* brasilense phytostimulatory inoculants
815 of maize. *J Appl Microbiol.* 2010;109:528–38.
- 816 13. Couillerot O, Bouffaud M, Baudoin E, Muller D, Caballero-
817 Mellado J, Moëne-Loccoz Y. Development of a real-time PCR
818 method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1
819 on maize seedlings. *Soil Biol Biochem.* 2010;42:2298–305.
- 820 14. Díaz Herrera S, Rossello F, Benavides M, Groppa M, Zawoznik
821 M. *Azospirillum* brasilense Az39 marcado con GFP en raíces de
822 *Arabidopsis thaliana*. *Rev Argent Microbiol.* 2017;49:203–5.
- 823 15. Grover A, Sharma P. Development and use of molecular markers:
824 past and present. *Crit Rev Biotechnol.* 2014;36:290–302.
- 825 16. Hahn D, Amann R, Ludwig W, Akkermans A, Schleifer KH. Detec-
826 tion of micro-organisms in soil after in situ hybridization with
827 rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J Gen*
828 *Microbiol.* 1992;138:879–87.
- 829 17. Henriques A, Cereija T, Machado A, Cerca N. In silico vs in vitro
830 analysis of primer specificity for the detection of *Gardnerella*
831 *vaginalis* *Atopobium vaginae* and *Lactobacillus* spp. *BMC Res*
832 *Notes.* 2012;5:637.
- 833 18. KD Market Research. *Global Biofertilizers Market Research*
834 *Report.* 2017. Albany, NY, USA.
- 835 19. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer
836 design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23:1289–91.
- 837 20. Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Souchère V, Alberola C,
838 Ménassieu J. *Agronomy for sustainable agriculture: A review.*
839 En: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola
840 C., editors. *Sustainable Agriculture.* Dordrecht, Springer, 2009,
841 p. 1–7.
- 842 21. Lin S, Shen F, Young C. Rapid detection and identification of the
843 free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-
844 targeted genus-specific primers. *Antonie van Leeuwenhoek.*
845 2011;99:837–44.
- 846 22. Lupwayi N, Olsen P, Sande E, Keyser H, Collins M, Singleton P,
847 Rice W. Inoculant quality and its evaluation. *Field Crop Res.*
848 2000;65:259–70.
- 849 23. Maroniche G, García J, Salcedo F, Creus C. Molecular identifica-
850 tion of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities
851 of *rpoD* as genetic markers. *Microbiol Res.* 2016;195:1–10.
- 852 24. Molina R, Obando D, Torres D, Rivera D, Cassán F. Utilización de
853 un medio de cultivo para la cuantificación y la diferenciación
854 de bacterias presentes en la misma formulación. XV Jornadas
855 Argentinas de Microbiología, 2014, Resumen p. 249, Córdoba,
856 Argentina.
- 857 25. Morales S, Holben W. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR
858 primer pairs reveals variance in target specificity and effi-
859 cacy not suggested by in silico analysis. *Appl Environ Microbiol.*
860 2009;75:2677–83.
- 861 26. Okon Y, Labandera-Gonzalez C. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem.* 1994;26:1591–601.
- 862 27. Owczarzy R, Tataurov A, Wu Y, Manthey J, McQuisten K, Almbrazi H, Sailor C. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 2008;36. W163–W169.
- 863 28. Priya R, Selastin A, Antony S, Gopalaswamy G. Development of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers as a quality standard of inoculants based on *Azospirillum*. *Arch Microbiol.* 2016;198:257–67.
- 864 29. Puente M, Gualpa J, Lopez G, Molina R, Carletti S, Cassán F. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. *Symbiosis.* 2018;76:41–9.
- 865 30. Puente M, Zawoznik M, de Sabando M, Perez G, Gualpa J, Carletti S, Cassán F. Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. *Symbiosis.* 2018:1–7.
- 866 31. Rivera D, Molina R, Obando D, Torres D, Cassán F. Evaluación de la técnica de recuento por microgota para la cuantificación de formulaciones conteniendo *Azospirillum brasilense*. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Adelantos en el Diagnóstico Microbiológico, 2014, Libro de resúmenes digital p. 229, Córdoba, Argentina.
- 867 32. Rivera D, Revale S, Molina R, Gualpa J, Puente M, Maroniche G, Paris G, Baker D, Clavijo B, McLay K, Spaepen S, Perticari A, Vazquez M, Wisniewski-Dyé F, Watkins C, Martínez-Abarca F, Vanderleyden J, Cassán F. Complete genome sequence of the model rhizosphere strain *Azospirillum brasilense* Az39, successfully applied in agriculture. *Genome Announc.* 2014;2:e00683–714. Disponible en: <https://mra.asm.org/>.
- 868 33. Rodríguez-Cáceres E, di-Ciocco C, Pacheco Basurco J. Influencia de la inoculación con *Azospirillum* brasilense en trigo cultivado en suelos de la provincia de la Pampa. Argentina. *Cienc Suelo.* 1996;14:110–2.
- 869 34. Shime-Hattori A, Kobayashi S, Ikeda S, Asano R, Shime H, Shinano T. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *J Appl Microbiol.* 2011;111:915–24.
- 870 35. Stets M, Campbell M, Souza M, Pedrosa D, Schmid M, Hartmann A, Cruz M. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. *J Appl Environ Microbiol.* 2015;81:6700–9.
- 871 36. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B, Remm M, Rozen S. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e115. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar>.
- 872 37. Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, Lajus A, Rouy Z, Roche D, Salvignol G, Scarpelli C, Médigue C. MicroScope: A platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database.* 2009;2009, bap021. Disponible en: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bap021/358148>.
- 873 38. Vanstockem M, Michiels K, Vanderleyden J, van Gool AP. Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. *J Appl Environ Microbiol.* 1987;53:410–5.
- 874 39. Versalovic J, Schneider M, Bruijn F, de Lupski J. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology.* 1994;5:25–40.
- 875 40. Vincent J. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria* (IBP Handbuch No. 15 des International Biology Program, London). Edinburgh. Blackwell Scientific Publ. 1970:45.