

REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



INFORME BREVE

Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos

Eliana Abrahamovich, Ana C. López y Adriana M. Alippi*

Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Recibido el 16 de diciembre de 2013; aceptado el 3 de junio de 2014

PALABRAS CLAVE

Agrobacterium rubi;
Agallas;
Arándanos;
Diversidad;
rep-PCR

Resumen

Se estudió la diversidad de una colección de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos provenientes de distintas regiones de la República Argentina estableciendo su grado de heterogeneidad mediante pruebas microbiológicas clásicas y técnicas de biología molecular. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y fisiológicas, así como mediante rep-PCR y RFLP del gen 23S ADN, demostraron una alta variabilidad intraespecífica, tanto fenotípica como genotípica.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Agrobacterium rubi;
Galls;
Blueberries;
Diversity;
rep-PCR

Agrobacterium rubi strains from blueberry plants are highly diverse

Abstract

The diversity of a collection of *Agrobacterium rubi* strains isolated from blueberries from different regions of Argentina was studied by conventional microbiological tests and molecular techniques. Results from biochemical and physiological reactions, as well as from rep-PCR and RFLP analysis of PCR-amplified 23S rDNA showed high phenotypic and genotypic intraspecific variation.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: alippi@biol.unlp.edu.ar (A.M. Alippi).

Introducción

La agalla de la corona, ocasionada por cepas patógenas del género *Agrobacterium*, es una enfermedad que tiene difusión mundial y afecta a más de 600 especies ubicadas dentro de 90 familias de dicotiledóneas, incluyendo cultivos de importancia económica como frutales, hortícolas, industriales, ornamentales y forestales^{2,9,11}. La enfermedad es particularmente grave en viveros, donde las pérdidas económicas son considerables dado que las plantas infectadas deben descartarse¹¹.

Las agrobacterias son habitantes naturales del suelo y el grupo incluye especies fitopatógenas y saprobias, según su capacidad de inducir en el hospedante la formación de agallas en la zona del cuello o la corona, de agallas aéreas en la parte inferior del tallo, o bien la proliferación de raíces en cabellera, mediante la transferencia de los plásmidos Ti (*tumor-inducing*) o Ri (*root-inducing*) a células vegetales^{2,3}. Las especies de *Agrobacterium* almacenan un considerable nivel de diversidad debido a la transferencia horizontal de ADN que ocurre naturalmente en los suelos^{6,7}, por lo que las especies patógenas se pueden transformar en saprobias y viceversa, y también pueden coexistir cepas que contienen el plásmido Ti o Ri.

Dentro de las especies frutales cultivadas en la Argentina, el arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) ha tenido una fuerte difusión a principios de la década de los 90 como una nueva alternativa de producción frutícola intensiva no tradicional orientada a los mercados del exterior, principalmente EE.UU., como oferta en contraestación¹³. Coincidentemente con la introducción de este cultivo comenzaron a observarse síntomas de agalla de corona en plantas provenientes de viveros y zonas de producción, y se identificaron como agentes causales de dichos síntomas cepas tumorigénicas de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rubi* y *Rhizobium rhizogenes*, y en ocasiones, cepas rizogénicas^{1,3}.

La especie *A. rubi* ha sido citada tradicionalmente como patógena de frambuesos (*Rubus occidentalis*, *Rubus idaeus*, otras especies y sus híbridos), no obstante, existen publicaciones que la asocian como productora de agallas en *Rosa* spp., *Vitis vinifera*, *Daphne mezereum*⁵ y, recientemente, en *Vaccinium* spp.^{1,3}.

Para completar estudios previos³ y debido a la escasa información bibliográfica disponible, nos propusimos estudiar la diversidad de 14 cepas patógenas de *A. rubi* aisladas de diferentes cultivares de arándanos provenientes de distintas regiones geográficas de la Argentina y de una cepa aislada de suelo. Los análisis se realizaron utilizando pruebas bioquímicas y fisiológicas y estudios de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción [*restriction fragment length polymorphism* (RFLP)] del gen 23S del ADN, amplificado por PCR y rep-PCR empleando los cebadores BOX, ERIC y REP.

Todas las cepas estudiadas pertenecen a la colección de la UB-CIDEFI (Unidad de Bacteriología - Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata). Las cepas F210, F266, F304 y F305 se aislaron de arándanos con síntomas de agalla de corona cultivados en la provincia de Buenos Aires; las cepas F253, F254, F315, F335, F337 y F338, de arándanos cultivados en Tucumán; las cepas F270, F272 y F273, de

arándanos cultivados en Entre Ríos; la cepa F359 fue aislada de suelo de cultivo de frutales de La Rioja y la F271 es una cepa proveniente de una muestra de arándano de cultivo *in vitro*.

Las cepas se mantuvieron en caldo extracto de levadura manitol (YEM) adicionado con glicerol a una concentración final de 10 % v/v a -70 °C. Para los stocks de trabajo, se mantuvieron a 4 °C en agar extracto de levadura manitol adicionado con rojo Congo³ (YEM-CR).

Para la caracterización fenotípica se seleccionaron las siguientes pruebas: producción de 3-cetolactosa, crecimiento en presencia de 2 % de cloruro de sodio; reacción en leche tornasolada; utilización de citrato amónico férrico; utilización de: malonato de sodio, eritritol y D(+) melezitosa; producción de ácido en el medio extracto de levadura con dextrosa-CaCO₃ (YDC) y determinación de la temperatura máxima de crecimiento de acuerdo con la metodología detallada por Moore *et al.*⁸ y Alippi *et al.*³. Para la construcción del dendrograma de similitud, se incluyeron los resultados de las reacciones obtenidas en la galería API 20 E (bioMérieux®, Marcy-L'Etoile, Francia) sembradas e incubadas como se describió previamente³. Como grupo externo se incluyó la cepa de *Pantoea ananatis* (F327) de la colección de la UB-CIDEFI. Los resultados de las pruebas fueron clasificados como 0 (-) y 1 (+), y se construyó una matriz simétrica con el programa *Multi-variate Statistical Package* (v. 3.1) utilizando el coeficiente de asociación simple SM (*simple-matching*) y el agrupamiento UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (fig. 1).

Los resultados obtenidos para la caracterización fenotípica coincidieron, en términos generales, con los descritos en la bibliografía^{1,5,8} para la especie *A. rubi*, con excepción de la cepa F270, que resultó positiva para la producción de 3-cetolactosa (el resto de las cepas -93 %- resultaron negativas). El 100 % de las cepas desarrollaron en presencia de 2 % de cloruro de sodio y a la temperatura máxima de 35 °C. El 73 % resultaron negativas para la utilización de citrato amónico férrico, y con respecto a la alcalinización en leche tornasolada, solo el 27 % de las cepas resultaron positivas. Los resultados para la utilización de malonato de sodio fueron variables (60 % positivas y 40 % negativas), lo mismo que para eritritol (53 % negativas y 47 % positivas), y en el caso de D(+) melezitosa, el 87 % dieron reacción positiva. Con relación a la utilización de citrato amónico férrico y de eritritol, la bibliografía cita estas reacciones como negativas⁵,

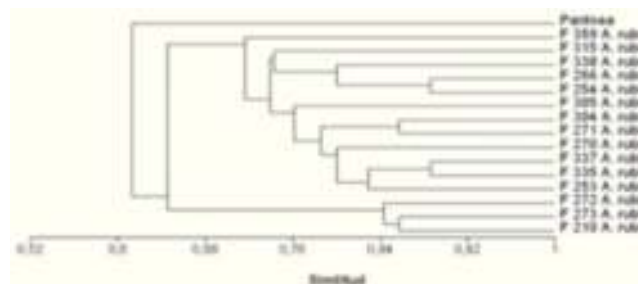


Figura 1 Dendrograma de similitud fenotípica entre 15 cepas de *Agrobacterium rubi* a partir de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y fisiológicas. Se empleó el coeficiente de asociación simple (SM) y el agrupamiento UPGMA.

no obstante, dichos estudios (tomados aquí como referencia) se basaron en un número limitado de cepas del patógeno ($n = 6$) aisladas de diversos hospedantes, pero ninguna aislada de arándano ni tampoco proveniente de Argentina, por lo que dichas discrepancias podrían estar dentro de la variabilidad propia de la especie, ya que por PCR múltiple, las cepas que resultaron positivas ($n = 4$ para citrato y $n = 7$ para eritritol) sí se identificaron como *A. rubi*.

El dendrograma obtenido (fig. 1) permitió detectar dos grandes agrupamientos de las cepas, el primero conformado por 3 cepas agrupadas a un nivel de similitud de 84 %, aproximadamente, y el segundo conformado por las 12 cepas restantes, que se agruparon a un nivel de similitud del 72 %. Estos dos grupos mostraron 65 % de similitud entre sí. No se encontraron correlaciones entre grupos y orígenes geográficos de las cepas.

Para la generación de huellas genómicas de ADN se empleó la técnica de rep-PCR empleando los cebadores BOXA1R (subunidad del elemento BOX), REP (REP1R-I y REP2-I) (*repetitive extragenic palindromic*) y ERIC (ERIC1R y ERIC2) (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*), de acuerdo con la metodología detallada por Versalovic *et al.*¹² y empleando como molde ADN genómico total obtenido mediante el kit comercial Wizard® (Promega), según las especificaciones del fabricante. Los perfiles de huellas genómicas se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,2 % en buffer TBE 0,5X previamente teñidos con Gelred® (Biotium Inc.) y 45 minutos de corrida a 80 V. Los perfiles se observaron mediante un transiluminador UV. Las imágenes de los geles se digitalizaron y fotografiaron empleando un sistema de captura digital de geles. Para efectuar el análisis de los perfiles complejos de bandas se utilizó

el programa Gelcompar II (v. 5.1. Applied Maths) combinando los patrones de huellas genómicas generados por los cebadores ERIC, BOX y REP en un único dendrograma de similitud empleando el coeficiente SM y el agrupamiento UPGMA con una tolerancia de identidad de banda del 3 %.

El análisis de los resultados obtenidos por rep-PCR mostró una alta diversidad de las cepas, ya que cada una generó un perfil único y diferente ($n = 15$) con cada uno de los cebadores, diferenciándose en el número y tamaño de las bandas. Con los cebadores ERIC, las cepas presentaron entre 2 y 17 bandas de un tamaño de 200 a 2500 pb, con los cebadores BOX se observaron entre 2 y 16 bandas de un tamaño de 50 y 1500 pb, y con los cebadores REP las cepas mostraron entre 3 y 19 bandas de un tamaño de entre 100 y 2200 pb (fig. 2A). La cepa F253 no generó ningún perfil con los cebadores BOX, pese a que se repitió la prueba en 3 oportunidades diferentes, y aun empleando la misma muestra de ADN que sí amplificó con los cebadores ERIC y REP. En términos generales, los perfiles originados por REP y ERIC incluyeron un mayor número de bandas que con los BOX. Si bien el dendrograma combinado obtenido permitió agrupar a todas las cepas a un nivel de similitud del 57 % (fig. 2A), no se visualizaron agrupamientos relacionados con el origen geográfico.

Para la amplificación de la secuencia completa del gen 23S ADNr se utilizó ADN genómico total empleando la reacción de PCR múltiple¹⁰, que permite la diferenciación entre especies de *Agrobacterium*. Como controles de esta PCR se incluyeron cuatro cepas de referencia de colecciones internacionales: *Agrobacterium radiobacter* (K1026), *A. tumefaciens* (ATCC 15955), *A. tumefaciens* (LBA 958) y *Agrobacterium vitis* (K306), como así también una cepa de

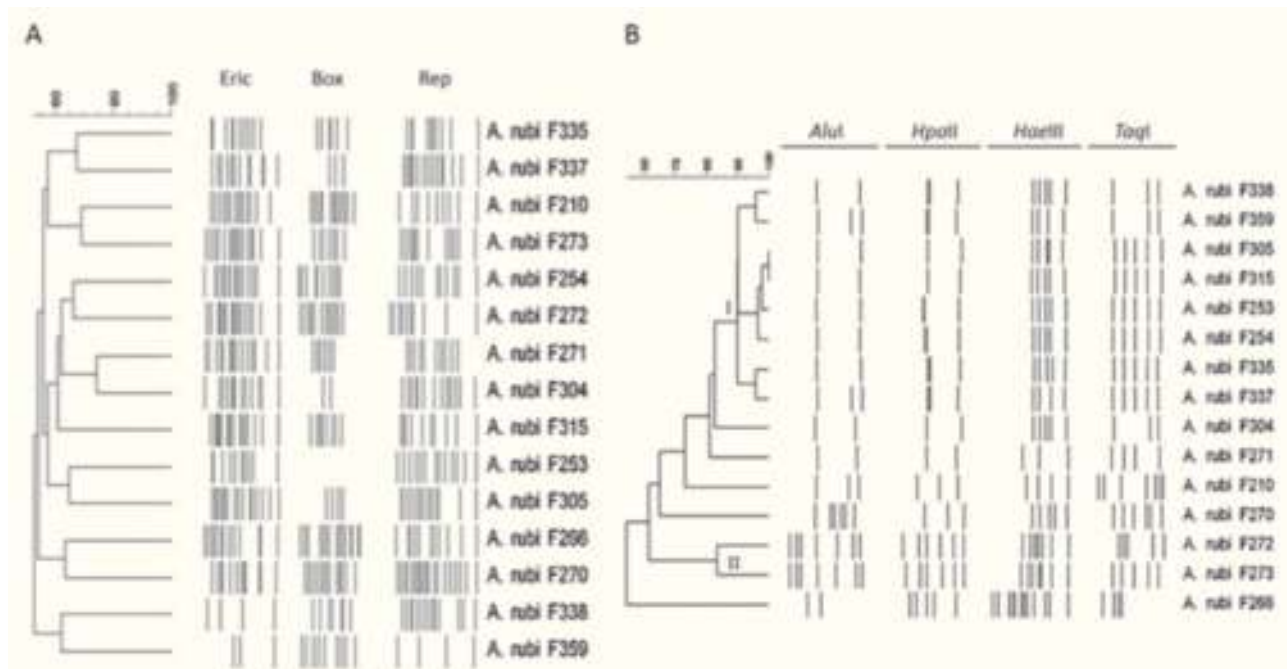


Figura 2 Dendrogramas combinados de similitud genotípica entre 15 cepas de *Agrobacterium rubi* a partir de los resultados obtenidos por: (A) rep-PCR empleando los cebadores ERIC, BOX y REP; y (B) análisis de los sitios de restricción del gen 23S del ARNr utilizando las enzimas *AluI*, *HpaII*, *HaeIII* y *TaqI*. En ambos casos, se empleó el coeficiente de asociación simple (SM) y el agrupamiento UPGMA con una tolerancia de banda del 3 %.

A. tumefaciens (F268) aislada de arándano. Las condiciones de PCR y ciclado fueron las mismas que se detallaron en un trabajo previo³. Con los productos de PCR obtenidos por PCR múltiple se usó una combinación de cuatro enzimas de restricción endonucleasas (*AluI*, *HaeIII*, *HpaI* y *TaqI*) para generar perfiles específicos. La mezcla de digestión se preparó a un volumen final de 10 µl, el cual contenía 2 µl del producto de la PCR múltiple, 0,3 µl de cada enzima de restricción (Promega, Madison, EE.UU.), 0,47 µl de buffer de cada enzima y 7,23 µl de H₂O bidestilada, según cada reacción. Las mezclas de digestión se incubaron durante toda la noche a 37 °C, exceptuando la enzima *TaqI* cuya temperatura de incubación fue de 65 °C. Los patrones de restricción se resolvieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,2 % en buffer TBE 0,5X previamente teñidos con Gelred® y 30 minutos de corrida a 80 V. Los patrones obtenidos se visualizaron mediante un transiluminador UV y las imágenes de los geles se digitalizaron y fotografiaron empleando un sistema de captura digital de geles. Las imágenes se analizaron con el programa Gelcompar II a través de un dendrograma de similitud de bandas combinando los patrones de restricción generados por las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *HpaI* y *TaqI*. Se utilizó el algoritmo de comparación de bandas empleando el coeficiente SM y la matriz de similitud UPGMA con una tolerancia de identidad de banda del 3 % y un valor de optimización del 3 %.

Mediante el análisis de los patrones de restricción del gen 23S ADN^r con las distintas enzimas ensayadas se diferenciaron 5 patrones de restricción con *AluI*; 7 con *HaeIII*; 7 con *HpaI* y 8 con *TaqI*, lo que demuestra una variabilidad muy alta dentro de esta especie. Si se comparan los patrones de restricción de esta misma colección de cepas de *A. rubi* obtenidos por la amplificación de la secuencia completa del gen 16S ADN^r³ se observa que todas las cepas generan 7 patrones diferentes con las enzimas *TaqI* y *HaeIII*, y que estos patrones son compartidos también por otras especies de *Agrobacterium*. A partir del análisis del dendrograma combinado empleando las 4 enzimas de restricción se observó la separación de un grupo de 8 cepas (fig. 2B, grupo I) a un nivel de similitud del 90 %; a su vez, dentro de este grupo se ubican 3 subgrupos a niveles de similitud del 96 %, aproximadamente. Dentro de uno de estos subgrupos hay dos cepas (F305 y F315) que comparten el 100 % de similitud para la combinación de todas las enzimas. El segundo grupo (fig. 2B, grupo II) está conformado por 2 cepas (F272 y F273) con un nivel de similitud del 84 %. Los dos grupos junto con 4 cepas más se agrupan a un nivel de similitud del 63 %. Por otra parte, hay una única cepa, la F266, que se une con las restantes a un nivel de similitud menor del 60 %. Es interesante destacar que esta cepa F266 también resultó atípica en cuanto a su secuencia del gen 16S ADN^r, ya que filogenéticamente estaba mucho más relacionada con *Rhizobium rhizogenes* que con *A. rubi*³. Un caso similar fue descrito por Young *et al.*¹⁵.

Por lo tanto, la evaluación conjunta de los dendrogramas obtenidos (figs. 1, 2A y 2B) mostró la existencia de una alta variabilidad genética dentro de la especie. Tanto a nivel fenotípico como genotípico, las cepas se agruparon con un grado de similitud de aproximadamente 60 %. Solo dos cepas (F335 y F337) de las 15 estudiadas tuvieron una correlación positiva entre las pruebas bioquímicas y fisiológicas, los perfiles de huellas genómicas y los patrones de RFLP.

Asimismo, se corroboró que por PCR múltiple se logró la adecuada caracterización de la especie como *A. rubi*, ya que los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas así como de rep-PCR y RFLP fueron muy variables, incluso entre cepas aisladas de la misma región geográfica.

La presencia de la especie *A. rubi* como patógena de arándanos en la Argentina podría deberse a una introducción inadvertida junto con cultivares de *Vaccinium* spp. en la década de los 90, o bien a que haya estado presente en los suelos como patógeno habitual del género *Rubus*, y que al comenzar a cultivarse el arándano de manera intensiva, esta ocupó ese nuevo nicho ecológico. Si bien se ha citado que las cepas de *A. rubi* son específicas del género *Rubus*^{4,10,14}, nosotros aislamos 14 cepas de esta especie a partir de plantas de arándanos con síntomas de agalla de corona cultivadas en la Argentina³, por lo que podría considerarse al arándano como un hospedante natural de la especie *A. rubi*. Otros autores han observado que las cepas de *A. rubi* son capaces de infectar otros hospedantes como *Rosa* spp., *Vitis vinifera*, *Daphne mezereum* e *Inga* spp. en la naturaleza⁵, y cerezo, duraznero, peral, crisantemo, tomate y girasol en pruebas de inoculación artificial¹¹.

El presente estudio aporta información adicional sobre la especie *A. rubi*, que se suma a la escasa bibliografía existente, dado que hay muy pocos representantes de dicha especie en las colecciones internacionales.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Agradecimientos

Eliana Abrahamovich es becaria de posgrado tipo I de CONICET (CCT- La Plata); Ana Claudia López es miembro de la Carrera del Investigador Científico de CONICET (CCT-La Plata) y Adriana Mónica Alippi es miembro de la Carrera del Investigador Científico de la CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires). Esta investigación fue parcialmente subsidiada por la CIC.

Bibliografía

- Alippi AM, López AC, Balatti PA. First report of *Agrobacterium rubi* and *Agrobacterium rhizogenes*, causing crown and root gall and hairy root on blueberry in Argentina. *Plant Dis.* 2010;94:1064.
- Alippi AM, López AC, Balatti PA. Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43:278-86.

3. Alippi AM, López AC, Balatti PA. Diversity among agrobacteria isolated from diseased plants of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Argentina. *Eur J Plant Pathol*. 2012;134:415-30.
4. De Castro C, Gargiulo V, Lanzetta R, Parrilli M. *Agrobacterium rubi* DSM 6772 produces a lipophilic polysaccharide capsule whose degree of acetylation is growth modulated. *Biomacromolecules*. 2007;8:1047-51.
5. Holmes B, Roberts P. The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. *J Appl Bacteriol*. 1981;50:443-67.
6. Kechris KJ, Lin JC, Bickel PJ, Glazer AN. Quantitative exploration of the occurrence of lateral gene transfer by using nitrogen fixation genes as a case study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:9584-9.
7. Martínez E, Palacios R, Sánchez F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J Bacteriol*. 1987;169:2828-34.
8. Moore LW, Bouzard H, Burr T. *Agrobacterium*. En: Schaad NW, Jones JB, Chun W, editores. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. Minnesota, APS Press, 2001, p. 17-35.
9. Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, de Lajudie P, Lindström. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.12.007>.
10. Pulawska J, Willems A, Sobiczewski P. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Syst Appl Microbiol*. 2006;29:470-9.
11. Pulawska J. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. *J Plant Pathol*. 2010;92 (Supl 1):S1.87-S1.98.
12. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol*. 1994;5: 25-40.
13. Vilella F, Fiszman L. Resumen de la producción de arándanos en Argentina y justificación del 2° Simposio Internacional del Arándano. *Infoberry* 2004;3:14.
14. Weller SA, Stead DE, Mazzucchi U. Crown and cane gall of a blackberry-raspberry hybrid caused by *Agrobacterium rhizogenes* in northern Italy. *J Plant Pathol*. 2004;86:161-5.
15. Young JM, Park D, Weir BS. Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;238:125-31.