Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional
UNIDAD SINALOA

BIOtecsin

CIIDIR IPN Unidad Sinaloa

Desarrollo de una plataforma biocomputacional para la identificación de antagonistas a *Fusarium verticillioides* en un banco de germoplasma de rizosfera de maíz en el Estado de Sinaloa

Mario Alonso Bueno-Ibarra, **Jesús Damián Cordero-Ramírez, Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza.**
Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional. CP. 81101. Guasave, Sin. México
Tel.: (687) 872-9626 Ext. 87657 Fax: (687) 872-9625. mbueno@ipn.mx

Introducción

El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos impactan significativamente la sostenibilidad de la agricultura. En los últimos años, sin embargo, se ha buscado el establecimiento de alternativas biológicas de manejo de plagas y enfermedades. Una etapa muy importante en este proceso es el desarrollo de metodologías que nos permitan la identificación de una manera rápida y segura de agentes de biocontrol. Por lo tanto, en este trabajo se plantea la utilización y desarrollo de una plataforma biocomputacional automática que soporte la búsqueda e identificación de microorganismos en un banco de germoplasma de 10,000 microorganismos aislados de rizosfera de maíz. Así, esta tecnología bioinformática tiene el objetivo de soportar la identificación de agentes de biocontrol contra el fitopatógeno *Fusarium verticillioides* causante de la enfermedad de la pudrición del tallo en maíz. En el año 2005, Bueno-Ibarra et al. propusieron y desarrollaron una plataforma biocomputacional que solucionaba la problemática de adquisición, procesamiento e identificación de partículas biogénicas por medio de técnicas óptico-matemáticas y computacionales (1), actualmente se extienden estas técnicas para desarrollar sistemas automáticos de procesamiento en el área de biología molecular y de bioinformática para soportar multidisciplinariamente las actividades de investigación que ayuden a los agricultores del Estado de Sinaloa a producir cosechas de maíz libres de patógenos.

Figura 1. Infección causada en la producción de maíz por el fitopatógeno Fusarium verticilloides.

Metodología

ADN genómico de 10,000 microorganismos de un banco de germoplasma formado por microorganismos asociados a la rizosfera de maíz fue obtenido con el kit DNeasy® Blood & Tissue Kit empleando la plataforma robótica QIACUBE, Figura 2. El ADN extraído se utilizó como templado para la amplificación de la región 16S del rADN por medio de la técnica de PCR con los primers F2C y C (2).

Figura 2. Equipo de extracción automático de DNA "QIAcube" para analizar los posibles antagonistas a Fusarium verticilloides.

Los productos de PCR fueron purificados y cuantificados para su secuenciación por lo que una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron comparadas con las bases de datos del NCBI (3) por medio del desarrollo de una plataforma biocomputacional que valida y analiza de forma automática cada una de las secuencias extraídas del ADN, así posteriormente es producido un conjunto de productos documentales que corroboran la identificación de los microorganismos que son antagonistas al patógeno *Fusarium verticillioides*. Adicionalmente los microorganismos que no producen un efecto de biocontrol son identificados y reportados. En la Figura 3 se muestra el diagrama de procesos de la plataforma bioinformática desarrollada.

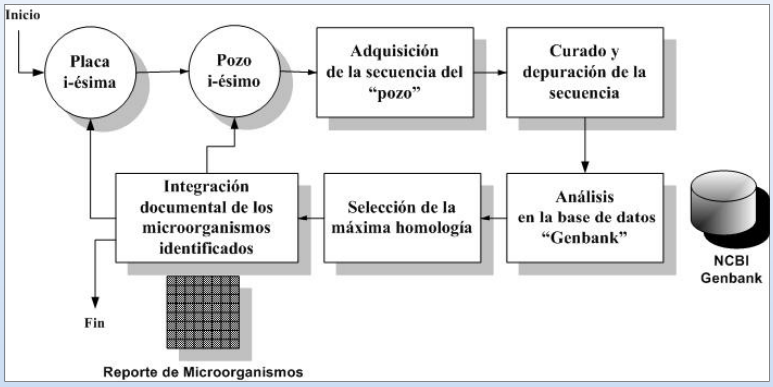

Figura 3.Diagrama principal del proceso de análisis y procesamiento de secuencias genéticas para la identificación de microorganismos para biocontrol.

Resultados y Discusión

Se desarrolló el protocolo molecular para la obtención de los datos de las secuencias en placas con un formato de 96 pozos procediendo al análisis automatizado mediante la plataforma bioinformática desarrollada. Se corrieron cada una de las placas generadas y se obtuvo la identificación de los 10,000 microorganismos aislados del banco de germoplasma. El banco fue construido favoreciendo grupos de microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* los cuales fueron identificados como miembros principales de esta colección, ejemplo de la información generada se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Generación automática de reportes en Excel con la identificación del organismo a partir del análisis obtenido de la base de datos de Genbank.

Conclusiones y perspectivas

El análisis de las secuencias reportadas indica que el grupo de microorganismos más diverso y más representado en el banco de germoplasma analizado mediante la utilización de la plataforma desarrollada fue el del género *Bacillus*. El análisis automático realizado por medio de técnicas biocomputacionales, bioinformáticas y protocolos moleculares ha permitido acelerar la identificación de esta colección masiva de microorganismos lo cual sin duda contribuirá a la formulación de alternativas biológicas de control de manera más rápida y eficiente.

Agradecimientos

Agradecimientos. Fundación Produce Sinaloa 823, 829, 830, 831 y 832. SIP 20091542; SIP20101342; SIP20103009**.**

Referencias

1. Álvarez-Borrego, J., Bueno-Ibarra, M. A. & Chávez-Sánchez, M. C. 2008. Sistema de adquisición de partículas biogénicas. pp. 177-192. En: Josué Álvarez-Borrego y María Cristina Chávez-Sánchez, Editores, **"Introducción a la identificación automática de organismos y estructuras microscópicas y macroscópicas"**. ISBN: 978-97027-1396-8. Editorial de la Universidad de Guadalajara. CICESE, CIAD, México.
2. Shi T., Reeves, Robert. H., Gilichinsky, D. A. & Friedmann, E. Imre. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology.* Vol. 33:169-179.
3. Wheeler, D, L., Chappey, C., Lash, A. E., Leipe, D. D., Madden, T. L., Schuler, G. D., Tatusova, T. A. & Rapp, B. A. 2000. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acid Research.* Vol. 28:10-14.