



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA**  
Educar para Trascender



Universidad Nacional de Asunción  
CEMIT-DIGIT-UNA

## Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos

### Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) para la producción de inoculantes biológicos

Richard Ferreira

Tutor: Dr. Sergio de los Santos Villalobos

San Lorenzo – Paraguay  
2018





# Instituto de destino



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA**  
Educar para Trascender



México  
Obregón/Estado de Sonora



# Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano



# Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano



# COLMENA



- ▶ COLMENA (Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos, [www.itson.mx/COLMENA](http://www.itson.mx/COLMENA)) es una colección microbiana enfocada en la preservación, clasificación, caracterización y transferencia de microorganismos nativos aislados de diferentes agro-sistemas y otros hábitats en México.

- ▶ Objetivo

Disminuir la pérdida de la diversidad microbiana, mediante el aislamiento, resguardo y tipificación del recurso microbiano edáfico cultivable, cuantificando los potenciales beneficios ambientales y económicos de su reincorporación a los ecosistemas.

# Bases de datos COLMENA



<http://apps2.itson.edu.mx/colmena/>

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA  
Educar para Trascender

## Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos

Filtrar búsqueda de Cepas

CEPA: TRQ | GÉNERO: Bacillus | ESPECIE: megaterium | CULTIVO: Trigo

Iniciar búsqueda

- BACILLUS MEGATERIUM
- BACILLUS MEGATERIUM
- BACILLUS MEGATERIUM
- BACILLUS MEGATERIUM

- Seleccione
- /
  - Achromobacter
  - Acinetobacter
  - Arthrobacter
  - Bacillus
  - Bordetella
  - Cupriavidus
  - Delftia
  - Echerichia
  - Enterobacter
  - Kosakonia
  - Lysobacter
  - Methylobacterium
  - Microbacterium
  - Ochrobacterum
  - Paenarthrobacter
  - Paenibacillus
  - Penicillium
  - Pseudomona
  - Pseudomonas
  - Rhizobium
  - Rhodococcus
  - Shinella
  - Staphylococcus
  - Stenotrophomonas
  - Streptomyces

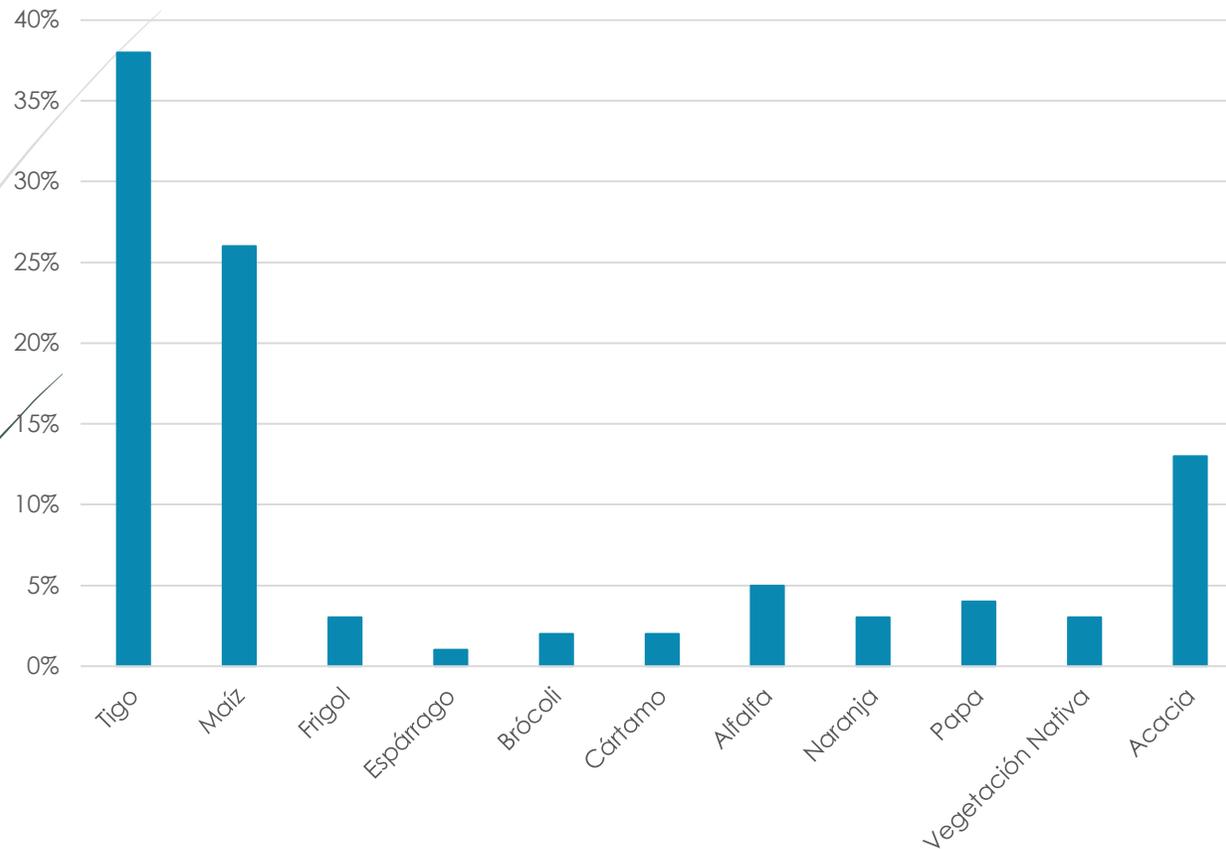
### Información básica CEPA



**CÓDIGO:** COLMENA\_0051  
**GÉNERO:** Bacillus  
**ESPECIE:** megaterium  
**CULTIVO:** Trigo  
**POTENCIAL USO AGRO-BIOTECNOLÓGICO:**

**Mayor información:**  
**Dr. Sergio de los Santos Villalobos**  
Catedrático CONACYT  
Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano  
Instituto Tecnológico de Sonora  
5 De Febrero 818 Sur, Col. Centro, C.P. 85000  
Ciudad Obregón, Sonora, México

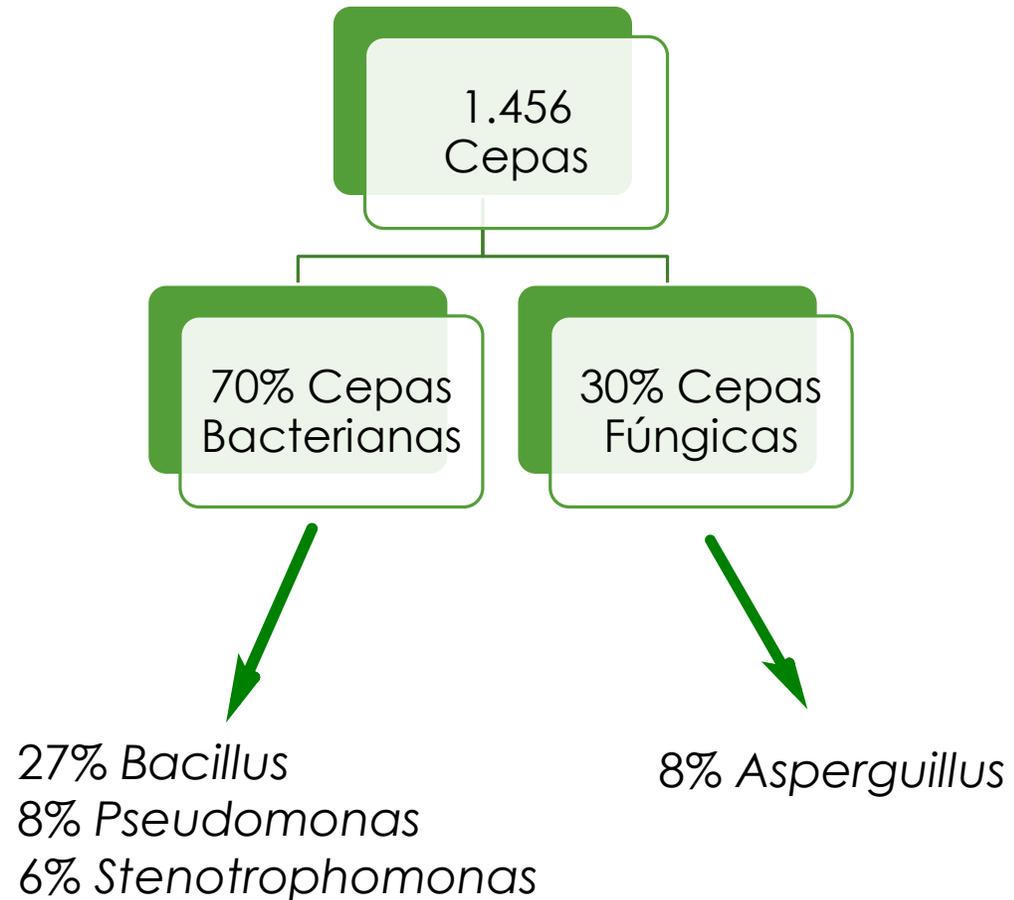
# Cepas preservadas



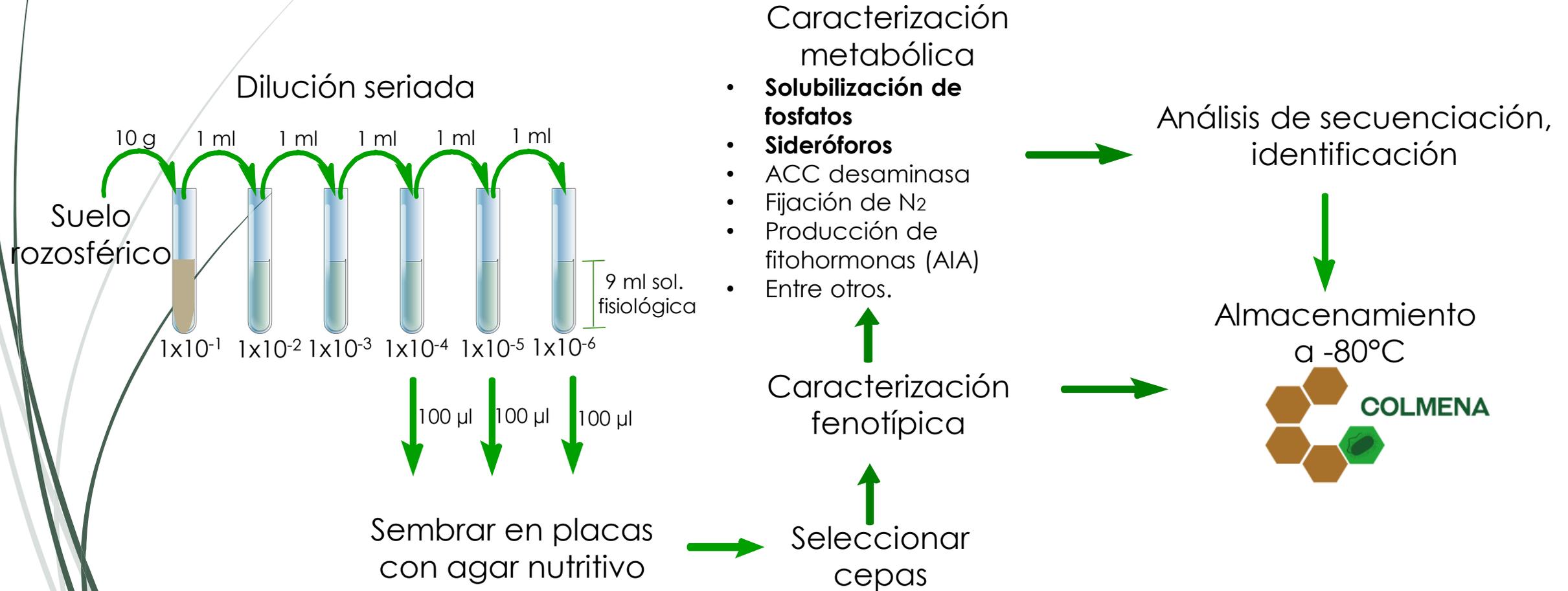
1.465 Cepas

Referencia porcentual del número de cepas microbianas preservadas en COLMENA asociadas a los cultivos agrícolas en estudio, localizados en el Valle del Yaqui, Sonora y el Valle del Fuerte, Sinaloa.

Diversidad bacteriana y fúngica presentada en COLMENA asociada a los cultivos agrícolas en estudio, localizados en el Valle del Yaqui, Sonora y el Valle del Fuerte, Sinaloa.



# Aislamiento, identificación y almacenamiento



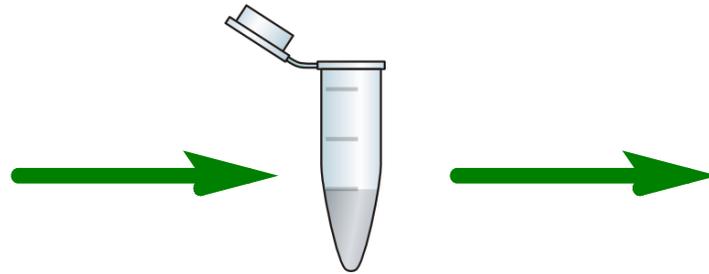
# Aislamiento, identificación y almacenamiento



# Aislamiento, identificación y almacenamiento



Cepas aisladas



Medio de cultivo  
con glicerol



Almacenar a -80°C

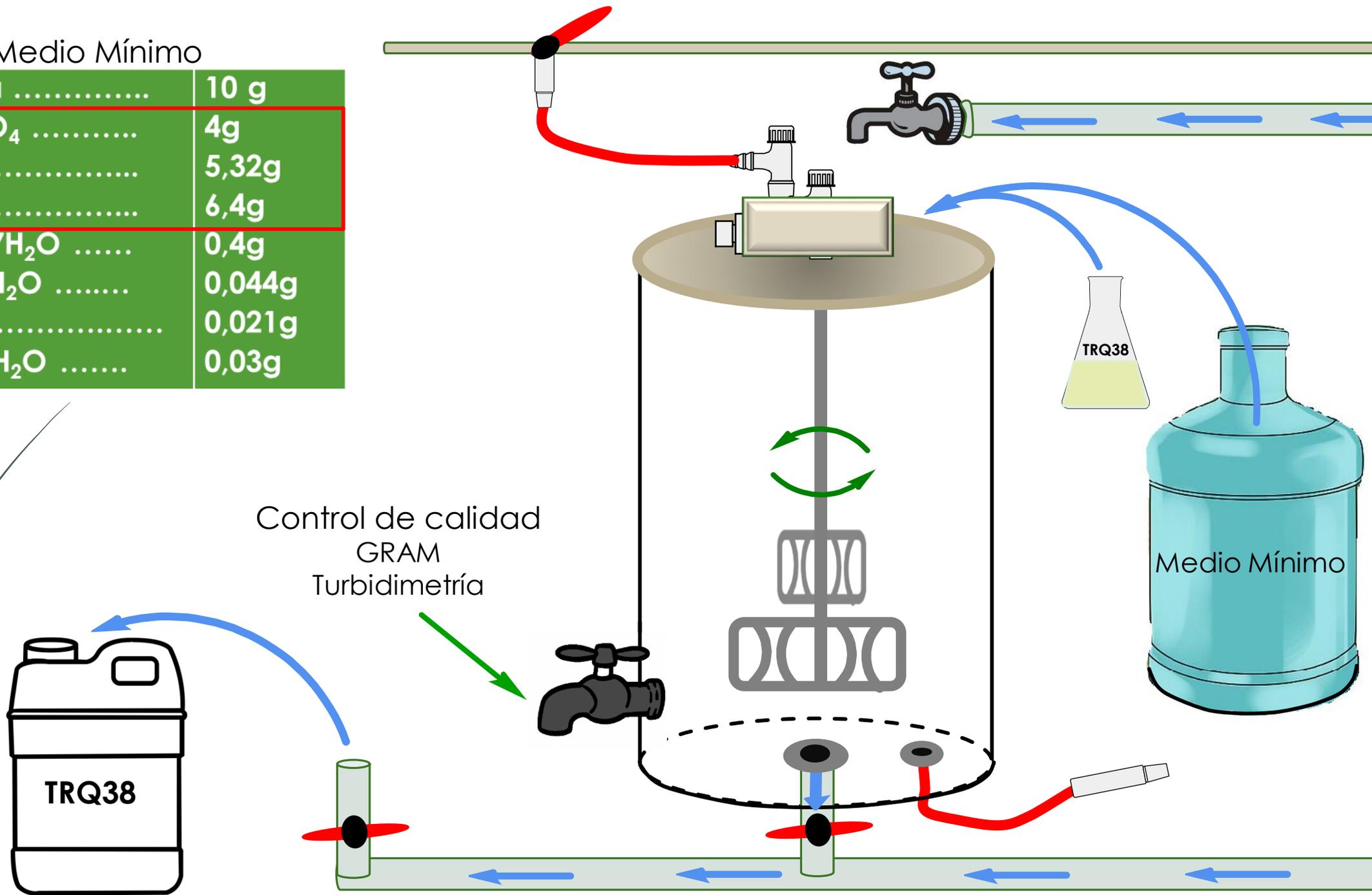


# Preparación de medio de cultivo (CM) para la producción de bioinoculantes (Bioproceso)

### Medio Mínimo

Glucosa .....	10 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	4g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	5,32g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	6,4g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,4g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	0,044g
$\text{CaCl}_2$ .....	0,021g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,03g

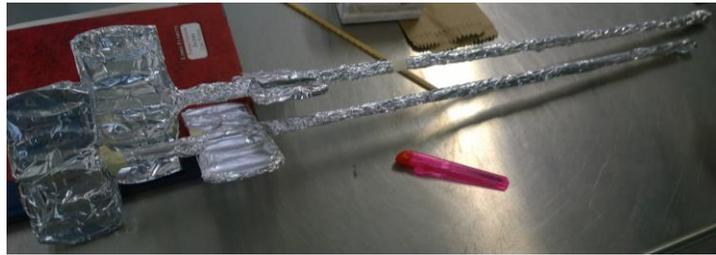
Control de calidad  
GRAM  
Turbidimetría







Cepas	Característica como PGPR
TRQ8 ( <i>Bacillus megaterium</i> )	↑ S.F. ↓ P.S.
TRQ65 ( <i>Bacillus sonorensis</i> )	Biocontrol, ↓ S.F. y P.S.
TE3 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	↑ S.F. y P.S.







Inoculantes a base de consorcios microbianos

TRQ8 + TE3  
TRQ8 + TRQ65 } Consorcios óptimos





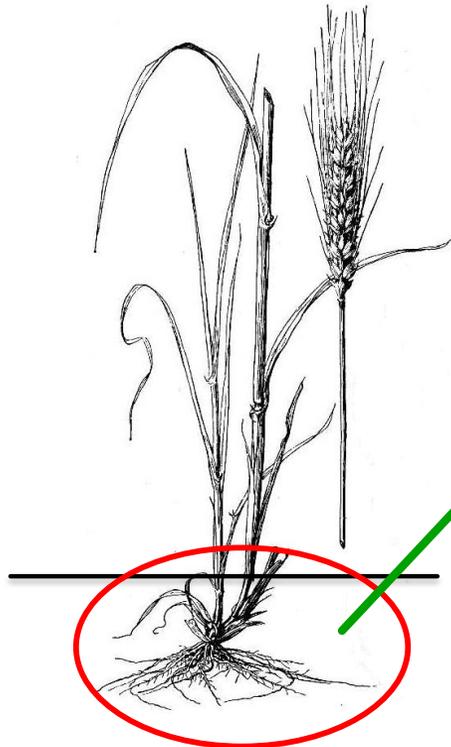
Producción en menor volumen

# Aplicación de los inoculantes microbianos en el campo de experimentación del Valle del Yaquí



# Estudio de las interacciones transcriptómicas

Estudio de las interacciones transcriptómicas entre trigo (*Triticum* spp.) y microorganismos edáficos nativos del valle del Yaqui.



Los mecanismos de **interacción planta-microbiota** esconden rutas metabólicas, respuestas moleculares e intercambio de sustancias que pueden potenciar la práctica de la agricultura sustentable y promover la recuperación de los organismos nativos de la región

# Estudio de las interacciones transcriptómicas

## Cepas en estudio

TRQ8

TRQ65

Control

¿En condiciones de estrés de temperatura (+2°C)?

T °C Valle del Yaqui

Inoculación

26°C 14 horas luz/10 horas oscuridad diarias.

15 días

Plántula  
Lavado

Maceración  
N2 líquido

Almacenarán  
a -80°C

Extracción de  
ARN total  
Método Trizol

Rizosfera

Almacenarán  
a -80°C

Extracción de  
ARN total  
Método Trizol

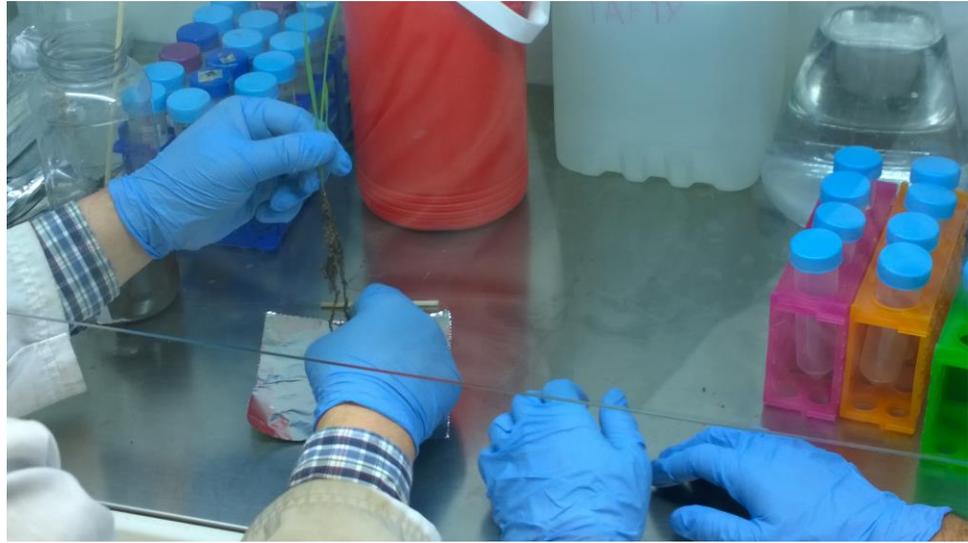
ARN total

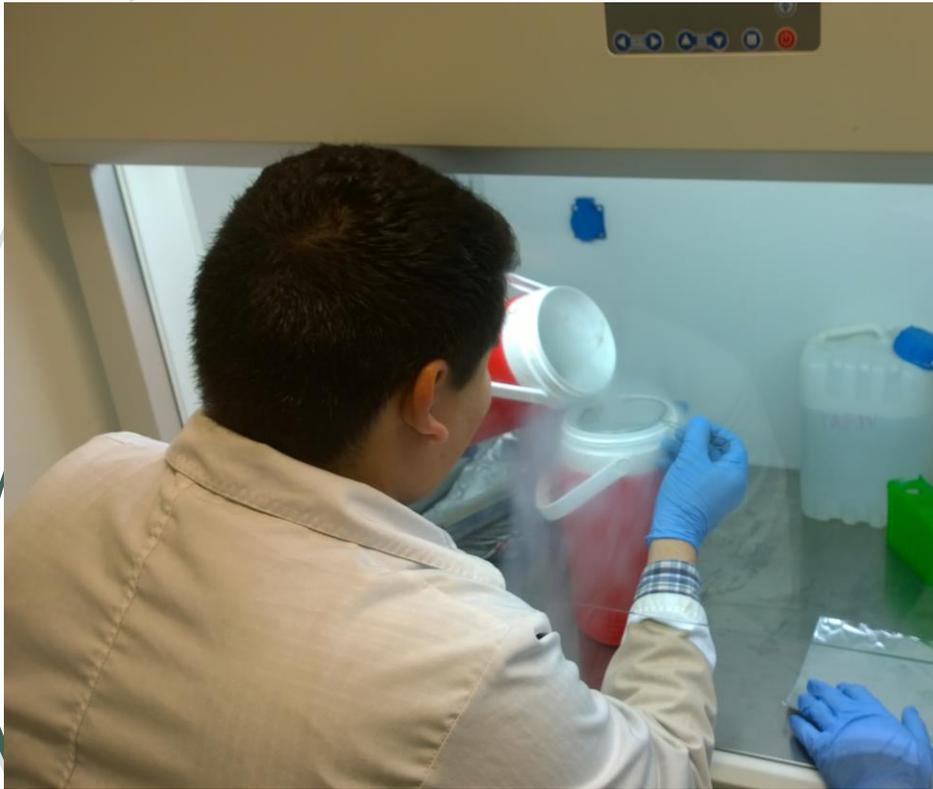
ADNc

Amplicones

NGS

Análisis In silico

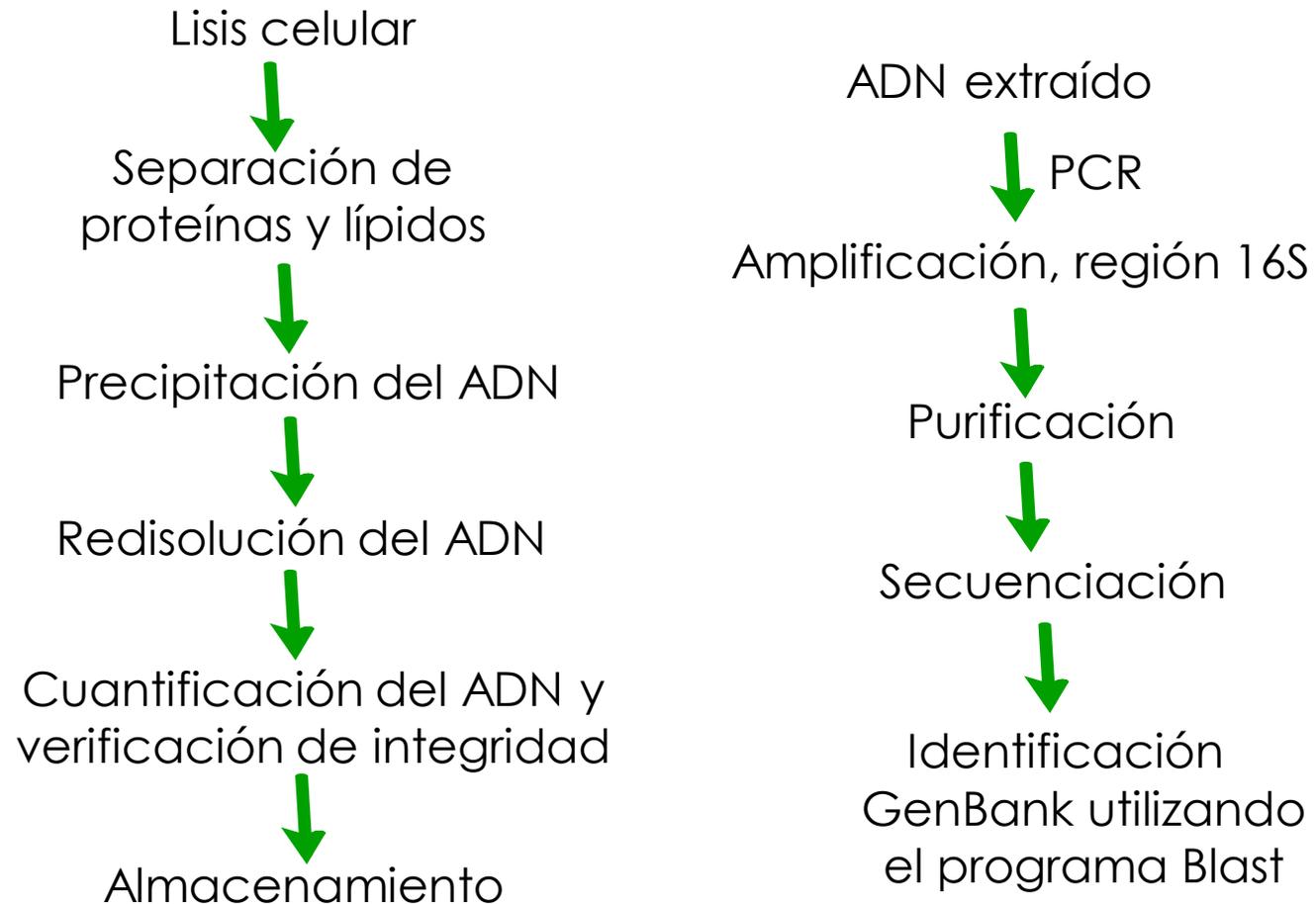


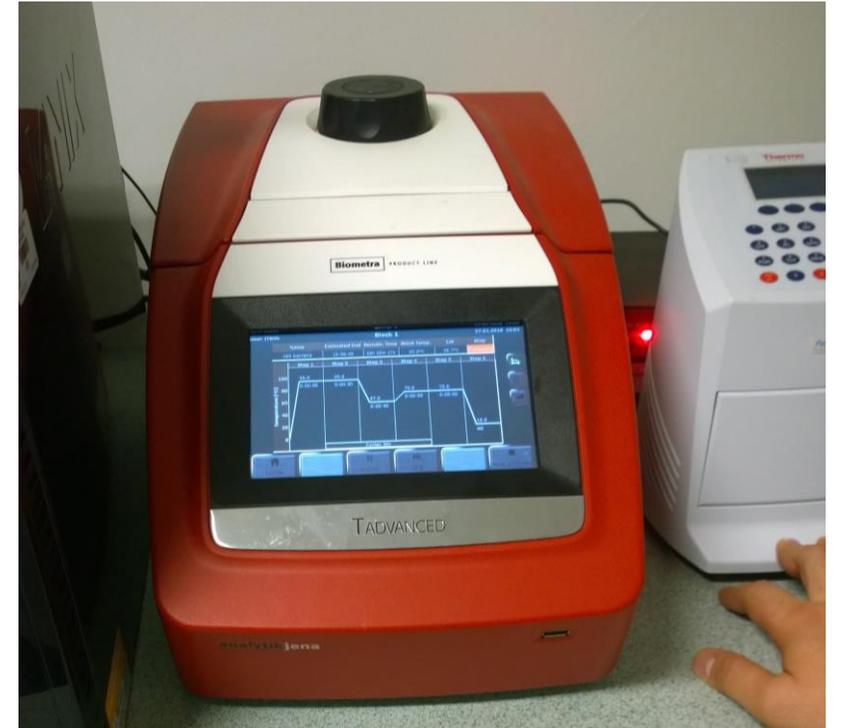
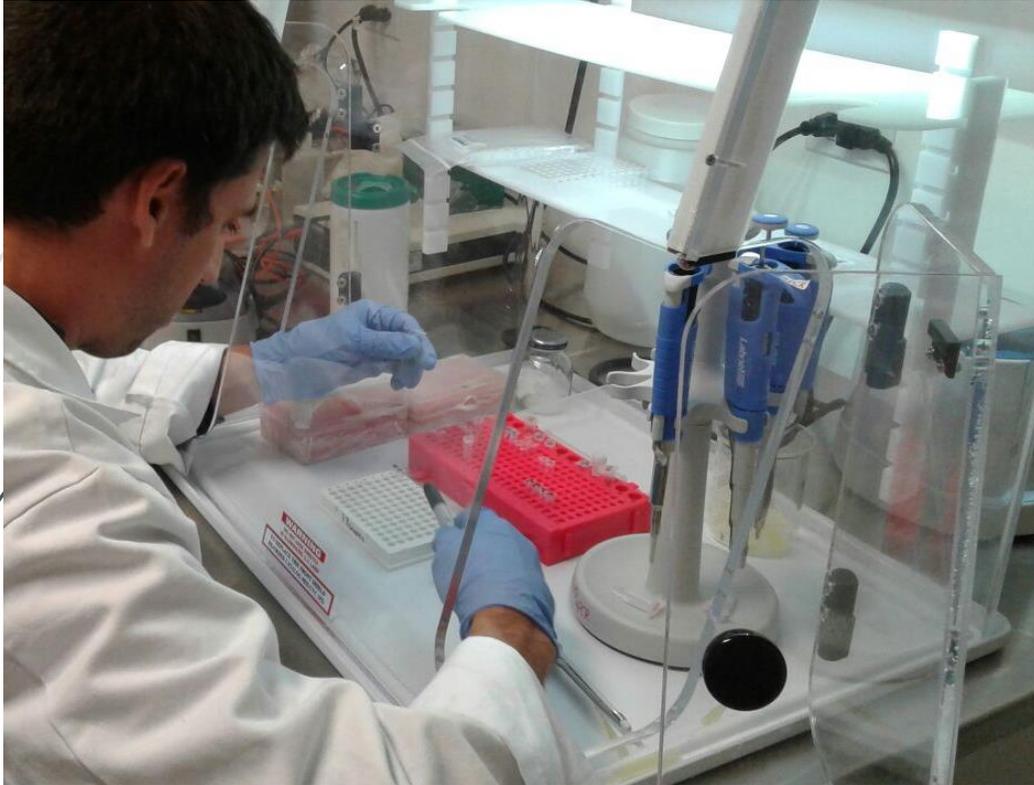


# Evaluación de características morfométricas



# Identificación molecular de microorganismos

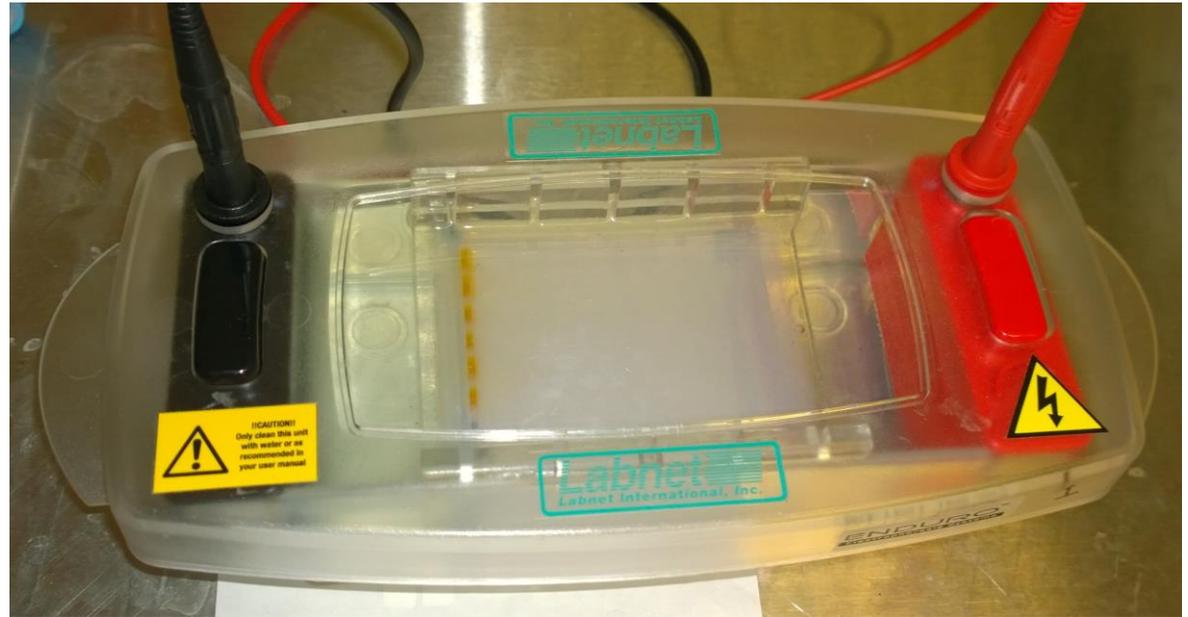




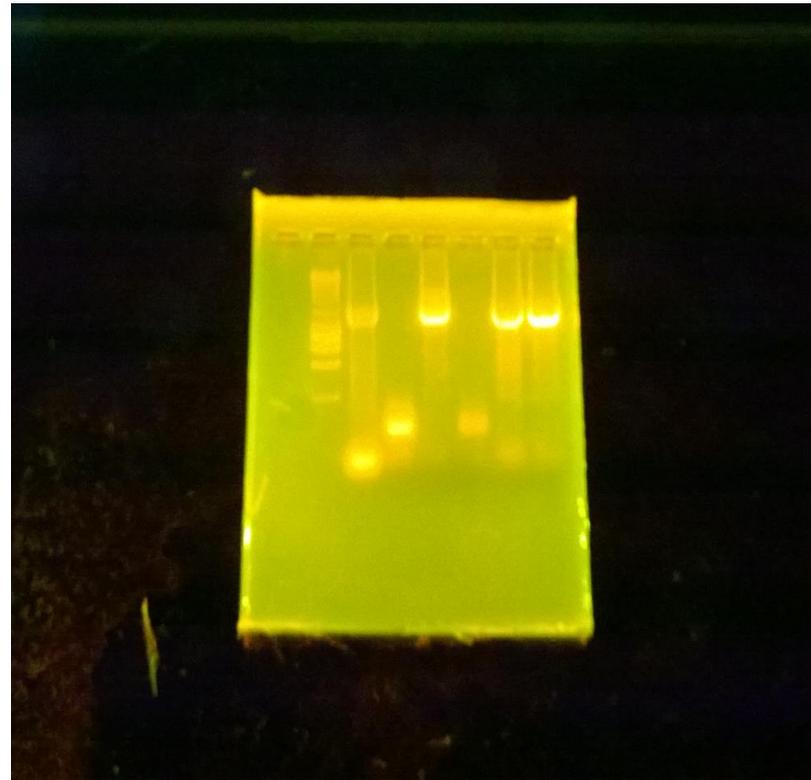


Concentración y pureza

260/280 }  
260/230 } 1,8 – 2,2



Integridad del material genético



FinchTV - A.ab1

File Edit View Finch Help

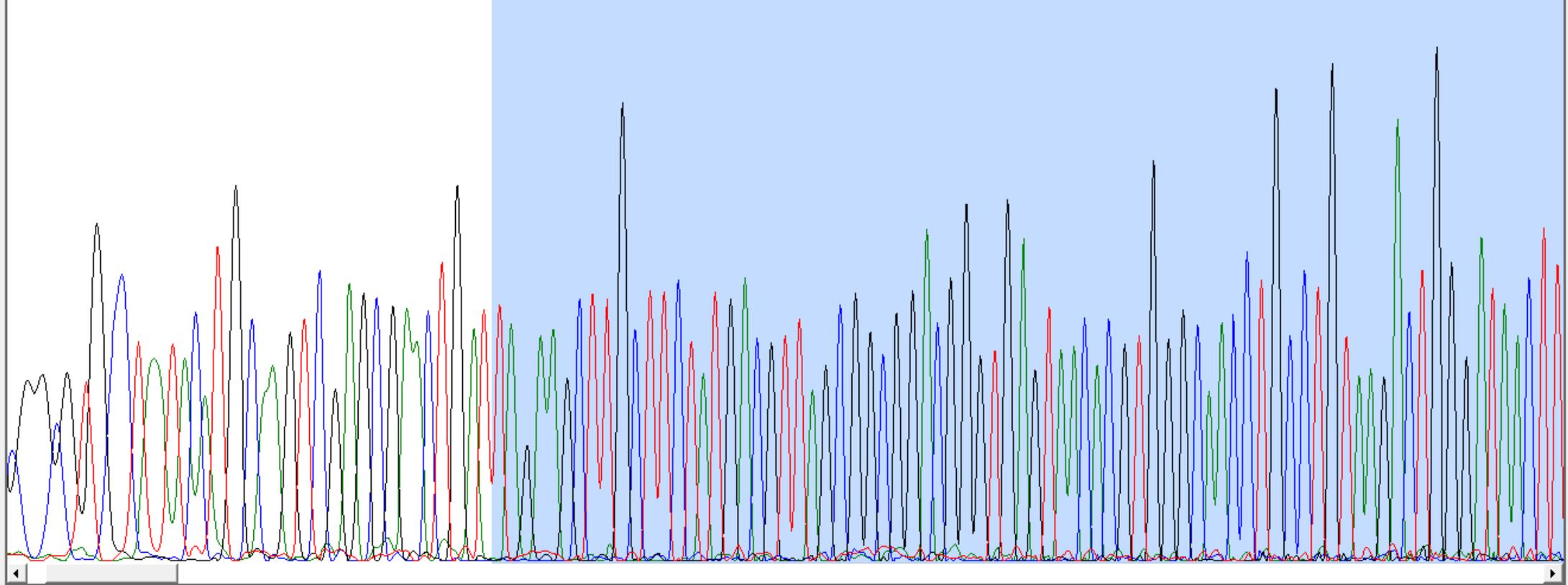


Go to Base No.  Find Sequence

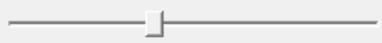
A C G T

C G G C G T G C C T A A T A C A T G C A A G T C G A G C G A A C T G A T T A G A A G C T T G C T T C T A T G A C G T T A G C G G C G G A C G G G T G A G T A A C A C G T G G G C A A C C T G C C T G T A A G A C T G G G A T A A C T T

Vertical Scale



Reset Scales

Horizontal Scale 

Selected Bases T:52 - A:141 (Length:90)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

```
GGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTGTAGGGAAGAACAAGTACAA
GAGTAACTGCT
```

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file

Examinar... [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

### Choose Search Set

Database

Human genomic + transcript  Mouse genomic + transcript  Others (nr etc.):

◆ 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) [?](#)

Organism

Optional

Enter organism name or id—completions will be suggested  Exclude [+](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Limit to

Optional

Sequences from type material

Entrez Query

Optional

[YouTube](#) [Create custom database](#)

Enter an Entrez query to limit search [?](#)

### Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

**BLAST**

Search database 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)



# Filogenética molecular



Elección de los marcadores moleculares



Alineamiento múltiple de secuencias



Elección de un modelo de evolución



Determinación de un método de construcción de árboles

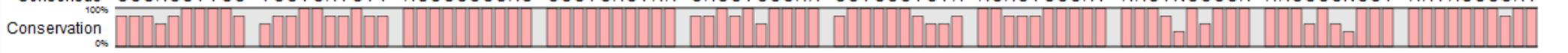


Verificación de la fiabilidad del árbol construido

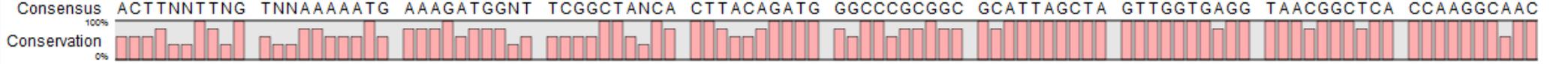


RCR E X E alignment X E alignment X RCR ATP8a1 mRNA X RCR ATP8a1 genomic sequence X

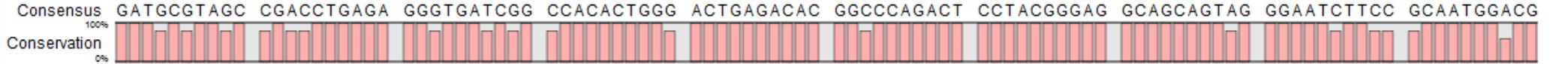
	20	40	60	80	100
E	GGGAGCTTGC	TCCTGATGTT	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGAA
D	GGGAGCTTGC	TCCTGATGTT	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGAA
A	AGAAAGCTTGC	TTCTGATGTT	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGAA
C	GAGTGCCTTGC	ACTTGATGTT	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGAA
B	GGGTACTTGT	ACCTGGTGC	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	TCCGTAGGAA
Consensus	GGGAGCTTGC	TCCTGATGTT	AGCGGCGGAC	GGGTGAGTAA	CACGTGGGAA



	120	140	160	180	200
E	GCTTGTTTGG	TTCAAACATA	AAAAGGTGGCT	TCGGCTACCA	CTTACAGATG
D	GCTTGTTTGG	TTCAAACATA	AAAAGGTGGCT	TCGGCTACCA	CTTACAGATG
A	AGGATCTTGC	GAGATGATTG	AAAAGATGGTT	TCGGCTATCA	CTTACAGATG
C	AATTTATTTG	TGGAATAATG	AAAAGATGGAT	CAATCTGTCA	CTTGGGGATG
B	AGTCTCTACG	GGAGAAAAGT	GGGATCTTTC	GCACCTGACG	CTATTAGATG
Consensus	ACTTNNTTNG	TNNAAAAATG	AAAGATGGNT	TCGGCTANCA	CTTACAGATG

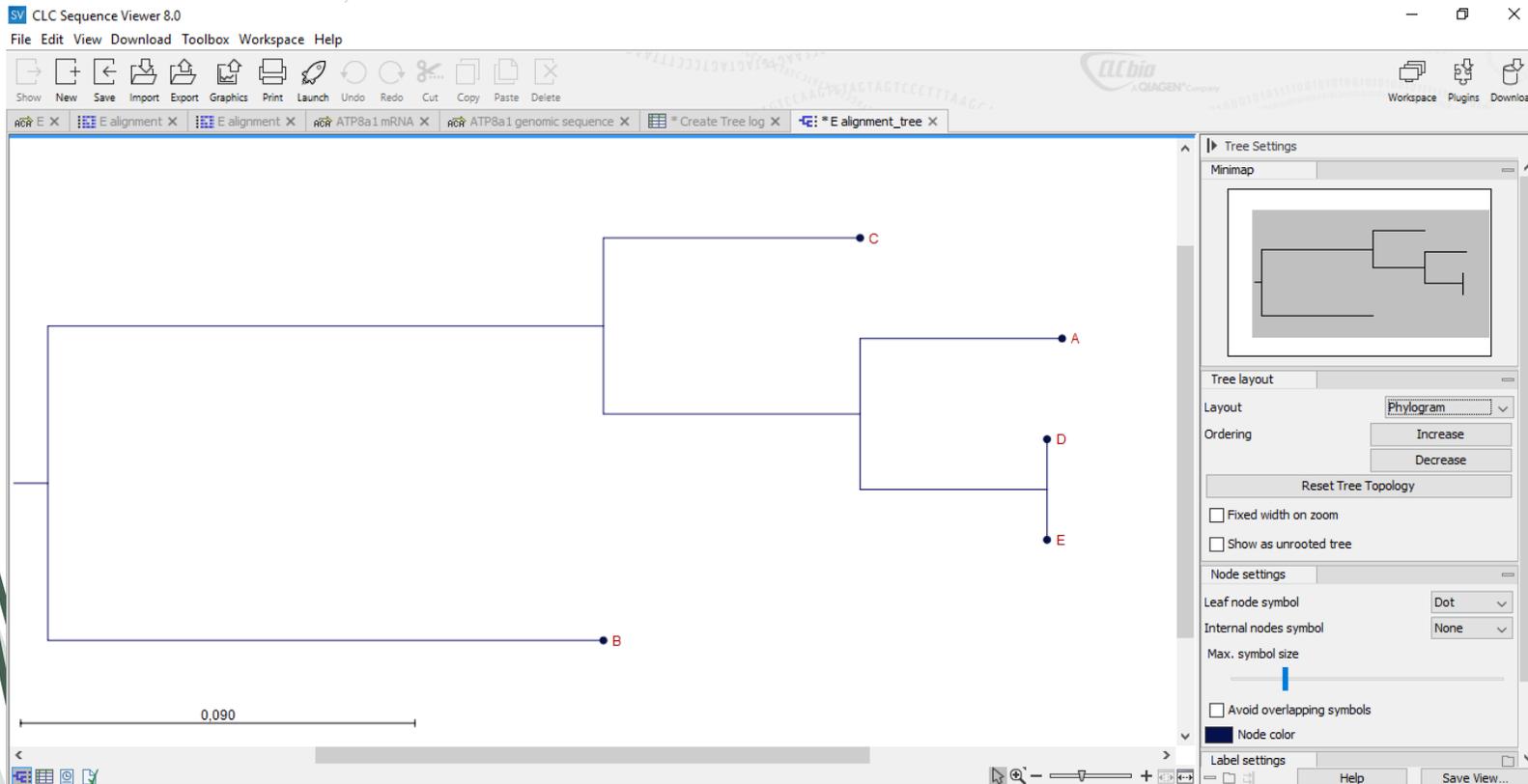


	220	240	260	280	300
E	GATGCGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC
D	GATGCGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC
A	GATGCGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC
C	GATGCGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC
B	GATGCGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC
Consensus	GATGCGTAGC	CGACCTGAGA	GGGTGATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC



	320	340	360	380	400
E	AAAAGTCTGAC	GGAGCAAACGC	GGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT	TCGGATCGTA
D	AAAAGTCTGAC	GGAGCAAACGC	GGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT	TCGGATCGTA
A	AAAAGTCTGAC	GGAGCAAACGC	GGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT	TCGGATCGTA
C	AAAAGTCTGAC	GGAGCAAACGC	GGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT	TCGGATCGTA
B	AAAAGTCTGAC	GGAGCAAACGC	GGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT	TCGGATCGTA
Consensus	AAAAGTCTGAC	GGAGCAAACGC	GGCGTGAGTG	ATGAAGGTTT	TCGGATCGTA





- A. *B. megaterium*
- B. *P. protegens*
- C. *P. lautus*
- D. *B. subtilis*
- E. *B. subtilis*

A photograph of a cactus garden. In the foreground, there are several large, green, columnar cacti of different species, some with spines and some without. They are planted in sandy soil with some rocks. In the background, there is a modern building with a tan or light brown facade and a blue section. The sky is blue with some light clouds. The word "Gracias" is written in white, sans-serif font across the middle of the image, followed by a series of white dots.

Gracias.....