

Study of soil microbiota through 'omics' techniques and its bioinformatics and biostatistical analysis in samples of horticultural crop diversification

Estudio de la microbiota del suelo mediante técnicas "ómicas" y su análisis bioinformático y bioestadístico en muestras de diversificación de cultivos hortícolas

J. Cuartero^{1*}, M. Ros¹, J.A. Pascual¹, J.M. Vivo²

¹Centro de Edafología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España.

²Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30100, Murcia, España.

*jessica.cuartero@um.es

Abstract

The increasing implementation of intensive agriculture has resulted in soil degradation, which has provoked the diversity reduction and growing economic risks for farmers. As a consequence, we need a more sustainable system that would allow us to keep our current lifestyle without damaging the environment. Crop diversification is an alternative. It is based on growing two or more crops in proximity or using crop rotation technique. Its main benefits are greater diversity and soil stability, greater environmental sustainability and economic benefit. Soil is formed by abiotic and biotic natural elements (which are) closely related, where microorganisms contribute to biochemical cycles, mineralization-stabilization of organic matter, soil structure and growth and development of plants. This thesis proposes a study of soil microorganisms through genomic and metabolomic techniques, which will provide us with a great amount of information on their impact on a complex ecosystem as it is the soil. The application of bioinformatics tools to generate and analyse such huge data will allow us to get outcomes to understand their ecosystem in depth, as well as their relationship with both the abiotic properties and the type of crop, as a way to achieve a more profitable, economic and ecological production.

Keywords: metagenomic; diversity; data.

Resumen

La utilización de la agricultura intensiva ha dado lugar a la degradación del suelo, que ha provocado la reducción de la diversidad y el aumento de riesgos económicos para los granjeros. Por ello, necesitamos un sistema que nos permita mantener nuestro estilo de vida sin dañar el ambiente, como la diversificación de cultivos, basada en el crecimiento de dos o más cultivos en proximidad o la rotación de los cultivos. Su principal beneficio es un aumento de la diversidad y estabilidad del suelo, de la sostenibilidad del ambiente y beneficio económico. El suelo está formado por elementos naturales abióticos y bióticos estrechamente relacionados, donde los microorganismos contribuyen a los ciclos bioquímicos, la mineralización-estabilización de materia orgánica, la estructura del suelo y al crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta tesis propone un estudio de los microorganismos del suelo mediante técnicas genómicas y metabolómicas, que nos

aportaran gran cantidad de información en el impacto de su complejo ecosistema, como es el suelo. La aplicación de técnicas bioinformáticas nos permitirá obtener resultados para entender su ecosistema en profundidad, también la relación entre las propiedades abióticas y el tipo de cultivo, con el objetivo de alcanzar una producción más productiva, económica y ecológica.

Palabras clave: metagenómica; diversidad; datos.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la agricultura dio lugar a una transición fundamental en la historia de la humanidad, este cambio hizo que una sociedad nómada de cazadores-recolectores se transformara en una sociedad establecida en un punto concreto de modo que no fuera necesario desplazarse para buscar comida y agua [7] lo que dio lugar a un crecimiento de la población hace unos 12.000 años debido a la permanente posibilidad de alimentos disponibles gracias a los cultivos. Este cambio de la sociedad y su estilo de vida se ha denominado “Revolución neolítica” [9].

Con el tiempo, la realización de prácticas no adecuadas ha provocado que exista un amplio consenso científico en torno a la idea de que nuestro planeta, actualmente, está sufriendo una alteración climática global provocado por el modo de producción y consumo de energía llevado a cabo por los humanos [8] y esto ha provocado un auge en la búsqueda de unas prácticas agrarias sostenibles y ecológicas alternativas al tradicional monocultivo y que permitan alimentar y mantener a la población mundial actual sin repercutir negativamente en las generaciones posteriores. Diverfarming, un proyecto a nivel europeo [10], tiene como objetivo evaluar la diversificación de los cultivos y difundirlo con el objetivo de incrementar la sostenibilidad a largo plazo.

Los objetivos de este trabajo serán realizar un estudio detallado sobre el efecto de la diversidad de los cultivos en las poblaciones microbianas presentes en el suelo, ya que los microorganismos influyen notablemente en prácticamente todas las propiedades del suelo, desde los parámetros fisicoquímicos hasta en los propios cultivos. En un gramo de suelo, existen miles de especies microbianas diferentes [2] lo que da una idea de la importancia que tienen los microorganismos en la formación y calidad del suelo y su importancia para conocerlos y estudiarlos. Actualmente, se estima que un 99% de los microorganismos no son cultivables en el laboratorio [5] por lo que para resolver esta cuestión acudimos a técnicas de secuenciación de genomas (Next Generation Sequencing, NGS), que nos permite estudiar los microorganismos sin necesidad de cultivarlos [3] así como técnicas de metabolómica para estudiar los metabolitos y la funcionalidad de los microorganismos en el suelo.

Para obtener datos ómicos a partir de los resultados experimentales, se emplearán distintas herramientas bioinformáticas, que permitirán depurarlos hasta conseguir la base de datos final. En particular, para obtener conclusiones significativas se aplicarán distintas metodologías estadísticas, tales como el análisis de similitudes (ANOSIM), análisis de la varianza (ANOVA), análisis molecular de la varianza (AMOVA) o el análisis multivariante de la varianza (MANOVA) [6]. Se estudiará además la diversidad (alfa y beta), término introducido por Whittaker en 1960 [1], que ha sido estudiado y valorado por la mayoría de los grupos de investigación dedicados a metagenómica mediante distintos índices de diversidad, como el índice Shannon [4] o chao1 .

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la consecución de los objetivos expuestos anteriormente, se utilizarán dos parcelas experimentales ubicadas en Murcia y con unas dimensiones de aproximadamente 0,2-0,3

hectáreas. En una parcela se utilizará un sistema de cultivo múltiple y de rotaciones, comparando distintos tipos de manejo: convencional, orgánico y biodinámico. En la otra parcela se hará un intercalado de hortalizas con el objetivo de comparar el efecto del monocultivo (hortícolas y leguminosas) frente al intercalado entre cultivos hortícolas y leguminosas con un 30% de disminución en la tasa de fertilización nitrogenada en comparación con el monocultivo.

Se recogerán muestras de suelo en ambas parcelas experimentales, a diferentes tiempos y diferentes lugares. Esta recogida es uno de los puntos clave dentro de este proyecto, ya que hay muchos factores que pueden afectar a la diversidad microbiana. A partir de la muestra, se utilizarán técnicas de biología molecular para identificar los microorganismos y se realizará un análisis bioinformático y bioestadístico exhaustivo para conocer a fondo la diversidad presente en los distintos tratamientos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se espera obtener como resultados la comparación bioinformática entre las distintas herramientas disponibles (como los programas en QIIME), con el objetivo de ser capaz de mejorar y estandarizar el preprocesamiento bioinformático de los resultados obtenidos por el secuenciador Ion Torrent en muestras de suelo. Además, se realizarán modificaciones de los argumentos usualmente aceptados en las herramientas de clasificación no supervisada (por ejemplo, en las distancias o en las matrices del cluster) con el fin de mejorar la precisión en la clasificación taxonómica.

Se obtendrá un análisis estadístico exhaustivo de cada uno de los casos de estudio, principalmente a través del entorno de R, pero también se realizará en algunos casos mediante otro tipo de programas, como por ejemplo un análisis de componentes principales utilizando R o QIIME, con el objeto de encontrar también las mejores herramientas bioestadísticas que, aplicadas en muestras de suelo, nos permitan extraer la máxima información posible y relacionar diversidad con: parámetros fisicoquímicos, condiciones de recogida de muestra, características del terreno, etc.

Por otro lado, se espera obtener una base de datos que contenga los distintos metabolitos presentes en las muestras de suelo, los cuales habrán sido determinados experimentalmente a través de diferentes técnicas metabolómicas “non-target”, con el objetivo de realizar un análisis bioinformático y bioestadístico comparativo entre los resultados obtenidos, tanto a nivel genético como a nivel metabolómico. Para ello se combinarán diferentes técnicas, comenzando por estadística básica y finalizando con la utilización de técnicas de aprendizaje tales como redes neuronales (machine learning) ampliamente utilizadas en datos derivados tanto de sistemas biológicos como ambientales, que proporcionarán sistemas de clasificación.

Finalmente, se realizará una agrupación y comparación de los datos y los distintos análisis realizados previamente con el fin de clasificar tanto: a nivel de diversidad, parámetros fisicoquímicos y metabolitos cada uno de los tratamientos empleados, logrando así diferenciar de manera clara y precisa los distintos tratamientos utilizados y poder compararlos de un modo preciso entre ellos.

4. CONCLUSIONES

El desarrollo de esta Tesis Doctoral permitirá seleccionar de un modo eficaz el tipo de cultivo, más sostenible y económico, para ponerlo en práctica a nivel industrial en la Región de Murcia y además permitirá clasificar y conocer detalladamente el ecosistema creado entre un cultivo y los microorganismos presentes en el suelo permitiendo al agricultor potenciar de

manera natural y sostenible dicho ecosistema y que le permita obtener mejores cosechas y mayor producción.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecer al proyecto Diverfarming del programa H2020 perteneciente a la unión europea (Grant Agreement (728003)) la financiación necesaria para poder realizar esta tesis. También quiero agradecerle al grupo de investigación E079-06 “Estadística: Modelos, Métodos y Aplicaciones” de la Universidad de Murcia el asesoramiento estadístico de todo el proyecto.

6. REFERENCIAS

- [1] Calderón-Patrón J.M., Moreno C.E., Zuria I. 2012. La diversidad beta: medio siglo de avances. *Rev. Mex. Biodivers.* 83: 879-891.
- [2] Delmont T. O., Prestat E., Keegan K.P., Faubladier M., Robe P., Clark, I.M., Le Paslier D. 2012. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME journal.* 6: 1677.
- [3] Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: R245-R249.
- [4] McPherson M.R., Wang P., Marsh E.L., Mitchell R.B., Schachtman D.P. 2018. Isolation and Analysis of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere, and Roots in Perennial Grass Experiments. *JoVE Journal.* 1:137.
- [5] Schloss P.D., Handelsman J. 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol.* 6: 229.
- [6] Schloss P.D., Handelsman J. 2008. A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *BMC Bioinformatics* 9: 34.
- [7] Thrall P.H., Bever J.D., Burdon J.J. 2010. Evolutionary change in agriculture: the past, present and future. *Evol. Appl.* 3:405.
- [8] Veroz O., Carbonell R. 2011. La agricultura y el cambio climático. 1st ed, E.J. González, J.A. Gil, R. Ordóñez, eds. (Asociación Española Agricultura de Conservación. Suelos Vivos). Pp 19.
- [9] Weisdorf J.L. 2005. From foraging to farming: explaining the Neolithic Revolution. *J. Econ. Surv.* 19: 561-586.
- [10] Zornoza R. 2017. Diverfarming. Recuperado de: <http://www.diverfarming.eu/index.php/es/>