



VIII Congreso Ibérico de las **Ciencias del Suelo**

VIII Congresso Ibérico de **Ciências do Solo**

DONOSTIA-SAN SEBASTIÁN
20 - 22 JUNIO 2018



CICS2018

SESIÓN 5: "Suelos y sociedad"

ORALES

- 530 Efecto de la colonia de gaviota patiamarilla sobre los suelos de dos hábitats de interés comunitario en el Parque Nacional de las Calanques (SE Francia). XOSÉ LOIS OTERO PÉREZ
- 534 Obtención de un Bioestimulante edafológico a partir de OKARA mediante un proceso enzimático: Caracterización química y funcional. ANGEL ORTS
- 538 Influencia del tipo de suelo en la composición en antocianos de la uva. JOSÉ M^a MARTÍNEZ-VIDAURRE
- 542 Efecto de las proteasas sobre el suelo: Bioestimulación y biodiversidad microbiana. PABLO CABALLERO JIMÉNEZ
- 546 Aplicación de tres ácidos orgánicos en suelos: Efectos sobre la comunidad bacteriana. SANDRA DEL ROCÍO MACÍAS BENÍTEZ

POSTERS

- 551 Estudio de los suelos de la Comarca de Molina de Segura (Murcia) para un sistema agropolitano sostenible y resiliente. PURA MARÍN SANLEANDRO

SESIÓN 6: "Función hidrológica de los suelos"

ORALES

- 556 Evaluación de la influencia de los parámetros del suelo en la modelización hidrológica. MAITE MEAURIO
- 560 Evaluación hidrológica de la influencia de factores antrópicos y de cambios climáticos en procesos de degradación de tierras. ILDEFONS PLA SENTÍS
- 564 Variación de las características fractales de la macroporosidad de un suelo bajo diferente laboreo. DIEGO SOTO GÓMEZ
- 568 Cambios hidrológicos causados por un incendio forestal: Efectos sobre la componente superficial y basal. JAVIER CANELO GONZÁLEZ
- 572 Caracterización de las propiedades hídricas de los suelos para el manejo del riego y la modelización de los retornos en el Barranco del Reguero (Huesca). ASUNCIÓN USÓN MURILLO
- 576 Efectos del desembosque de madera en las propiedades hidrológicas del suelo en una clara en el Norte de España. NAHIA GARTZIA BENGOTXEA

POSTERS

- 581 Presencia de pesticidas y algunos de sus productos de degradación en aguas naturales de la zona vinícola incluida en la D.O. Jumilla. M. SOLEDAD ANDRADES
- 585 Incendios forestales. Uso de herramientas quimiométricas. JOSÉ A. GONZÁLEZ-PÉREZ

SESIÓN 7: "Servicios ecosistémicos proporcionados por los suelos"

ORALES

- 590 Relaciones entre las fracciones de fósforo edáfico, las propiedades del suelo y la productividad forestal en plantaciones de pinar del norte de España. TERESA BUEIS
- 594 Evaluación de la calidad del suelo de tres unidades de vegetación utilizando parámetros del ciclo vital de la especie *Eisenia andrei* como bioindicadores. MERCEDES ORTEGA HIDALGO
- 598 Impacto da substituição de espécies florestais no armazenamento de carbono em áreas de montanha da região mediterrânea. FELICIA FONSECA
- 602 Impacto de la diversificación en cultivos leñosos sobre propiedades edáficas y la producción en clima mediterráneo: un meta-análisis de estudios de campo. RAÚL ZORNOZA
- 606 **Microbioma del Txakoli; el suelo, desde una perspectiva ómica. IGOR BAROJA**
- 610 Impacto del pastoreo de ganado vacuno en las comunidades microbianas del suelo en un sistema silvopastoral adhesionado. PILAR GARCÍA-GONZALO

POSTERS

- 615 Propiedades químicas del suelo en pastos de puerto en el Pirineo Central: Nardion versus Bromion. DAVID BADÍA-VILLAS

El microbioma del suelo de Txakolí desde una perspectiva ómica

The Txakolí soil microbiome from an omic prespective

Baroja-Careaga, Igor*, Zarrainindia, Iratxe, Estonba, Andone

Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology - University of the Basque Country (UPV/EHU) Leioa, Spain – *igor.baroja@ehu.eus

Resumen

La gran demanda del vino está generando la necesidad de adoptar nuevas tecnologías en viticultura, para así mejorar nuestra comprensión acerca de la productividad y calidad de la vid. Así, en el grupo Genomic Resources de la UPV/EHU estamos utilizando la metagenómica, basada en técnicas de secuenciación de última generación, para identificar la gran variedad de microorganismos existentes en los suelos de viñedos de Txakoli asociadas a tres denominaciones de origen en el País Vasco: Bizkaiko, Getariako y Arabako Txakoliña. Así, analizamos la riqueza microbiana de cada parcela, y su grado de distinción en cuanto a su composición bacteriana. Por lo tanto, determinaremos la huella microbiológica de cada parcela/bodega y/o región. Esta información nos informará del estado de salud de las parcelas y ayudará al viticultor en la toma de decisiones en cuanto al manejo del suelo de su parcela.

Palabras clave: microbioma, bacteria, secuenciación masiva, Txakoli, viñedo.

Abstract

The great demand for wine is generating the need to adopt new technologies in viticulture, in order to improve our understanding of the productivity and quality of vines. Thus, in the Genomic Resources group of the UPV/EHU, we are using metagenomics, based on next generation sequencing techniques, to identify the communities of microorganisms existing in the soils of Txakoli vineyards associated with three denominations of origin in the Basque Country: Bizkaiko, Getariako and Arabako Txakoliña. Thus, we analyze the microbial richness of each parcel, and its degree of distinction in terms of its bacterial composition. Therefore, we determine the microbiological footprint of each parcel/winery and region. This information will inform us of the health status of the parcels and will help vine growers in making decisions regarding the management of their soils.

Keywords: microbiome, bacteria, next generation sequencing, Txakoli, vineyard.

Introducción

La industria española está especializada en vinos de bajo coste y en exportaciones a granel. Además, los datos de la competitividad del sector la sitúan entre las más bajas de los países especializados [1]. Una manera de impulsar la competitividad es la creación y exportación de vinos con denominación de origen, ya que éstos gozan de una mayor aceptación por parte del consumidor y por lo tanto, suponen una repercusión socio-económica más elevada.

Son varios los factores que se considera que influyen en la composición química de la uva y el vino. Entre ellos, el tipo de suelo, las prácticas agrícolas, las condiciones climáticas, la variedad de uva, y el modo de elaboración. La distinción de las propiedades sensoriales de vinos con identidad regional mediante análisis químicos ha sido evidenciada por diferentes autores. Por ejemplo, López-Rituerto et al. [2] por medio de la metabolómica ¹H-NMR, determinaron los

componentes químicos discriminativos en el mosto y vino de tres sub-áreas de Rioja. Roullier-Gall et al. [3] por su parte, discriminaron las uvas y vinos derivados de dos viñedos muy cercanos en Côte de Nuits (Burgundy) utilizando la espectrometría de masas y la cromatografía líquida de alta resolución. Sin embargo, no se conocen aún las variables que originan estas diferencias, si bien artículos recientes evidencian la posible implicación de la comunidad microbiana del suelo y del mosto en esta diferenciación.

Las metodologías de secuenciación masiva (NGS), técnicas de gran capacidad resolutive, están empezando a usarse en la viticultura, y los resultados están poniendo de manifiesto una diversidad y regionalidad de los microorganismos mayor que la esperada. Por ejemplo, el trabajo realizado por Zarrainindia et al [4], puso de relieve la migración de microorganismos del suelo a la uva. Está aún por estudiar si estos microorganismos nativos de la viña tienen influencia en el fenotipo del vino y/o si se mantienen activos durante la fermentación,

pero los resultados sugieren que los microorganismos del suelo también podrían jugar un papel importante en la regionalidad del vino [5].

Por lo tanto, parece fundamental conocer la comunidad microbiana nativa del suelo. Si llegamos a determinar la influencia de la comunidad microbiana en la productividad de la planta y la fermentación, esta información abriría puertas hacia actuaciones específicas para aumentar la productividad de la viña y la manipulación de la fermentación para potenciar la personalidad de los vinos, dando valor añadido al producto.

Para poder ver lo que sucede, pretendemos estudiar la microbiota asociada al Txakoli, la cual es totalmente desconocida. El Txakoli, es un vino blanco originario del País Vasco que está implantado en las tres provincias, con una denominación de origen (D.O.) en cada una de ellas: Getaria, de Bizkaia y de Álava. Estas tres regiones muestran diferencias en el clima e incluso en el sistema de conducción de las vides, entre otros factores, que se podrían traducir en diferencias específicas de región a nivel de la comunidad microbiana. Con el objetivo de corroborar esta hipótesis, en el presente proyecto. Crearemos un inventario exhaustivo de la comunidad microbiana en suelo asociada a la variedad de uva *Hondarrabi Zuri* en las tres D.O.s mediante la caracterización de su perfil taxonómico, para determinar su salud e identificar su huella microbiana, terroir.

En esta comunicación se muestran distintos análisis comúnmente utilizados para analizar la diversidad y composición de las comunidades microbianas de los suelos. Para ello se muestran como ejemplo los resultados obtenidos en las bodegas de Álava.

Material y métodos

Muestreo y extracción de ADN

Se han recogido muestras de suelo de 23 bodegas del País Vasco, en las que se han elegido parcelas con viñedos de la variedad *Hondarrabi Zuri*. Finalmente se seleccionaron 41 parcelas, adquiriendo muestras en las 3 provincias y D.O.s.

En cada parcela, se tomaron muestras de suelo mediante un soil corer en diferentes puntos del viñedo para obtener muestras representativas de cada parcela. Se tomaron dos replicas por parcela, por lo que se obtuvieron un total de 82 muestras en la vendimia 2016, en octubre. Las muestras se

transportaron en frío y fueron congeladas a -20 °C al llegar al laboratorio.

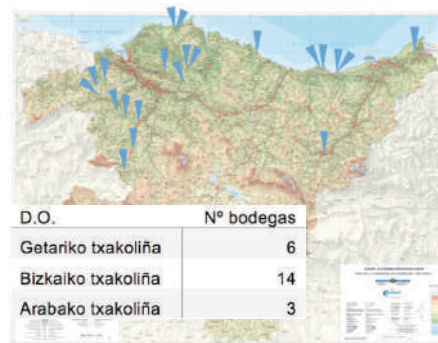


Figura 1: Mapa de los puntos de muestreo

En cuanto a la extracción de ADN, se utilizó el kit Power Lyzer Power Soil de la casa comercial MoBio, siguiendo el protocolo establecido.

Librería y Secuenciación

Se ha amplificado la región V4 del 16S rRNA para la caracterización bacteriana, utilizando los cebadores 515FB (5'-NNNNNNNNNNNGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'), el cual lleva una cadena de 12 pares de bases (los primeros 12 pares de bases con la letra N) como un código de barras para identificar nuestra muestra y un linker (en negrita) y el cebador 926RB (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3').

La PCR incluyó 12,5 mL de KappaHiFi (la cual lleva su buffer y polimerasa) 1 mL de cada cebador y otro mL de ADN por cada muestra. Los rangos de temperatura para la amplificación en el termociclador del fragmento de 16S rRNA indicado fueron, 4 min a 95 °C para activar la proteinasa, seguidos de 35 ciclos de 15 seg a 95 °C, 30 seg a 50 °C y 30 seg 72 °C.

Utilizando 10 mL de cada producto de PCR se realizó un pool, el cual se purificó con el Kit CleanPCR. Este producto purificado se ha secuenciado en el secuenciador masivo de illumina MiSeq (300bp x 2 pair end) en el Servicio de Secuenciación y Genotipado de Sgiker, de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU.

Análisis de datos

Los archivos fastq obtenidos de la secuenciación se filtran por calidad con el programa Sickle 1.33 para quedarnos con las secuencias de una calidad mínima de Q20. Una vez filtradas, las secuencias se ensamblan con Pear v0.9.10. Se demultiplexean las secuencias con Qiime v1.9 y utilizando el mismo programa se

generan las tablas de OTUs (Operational Taxonomic Units) con la base de datos Greengenes (version 13_5). Se eliminan los OTUs con menos de 5 secuencias y los cloroplastos y mitocondrias que puedan alterar los resultados de nuestros análisis.

Se han realizado pruebas de diversidad alfa, para ver la riqueza en especies de cada muestra. También pruebas de diversidad beta, para visualizar la diferenciación microbiana entre parcelas/bodegas y regiones. En este último caso se han calculado las distancias con el método Bray-Curtis. Desde estos resultados se han creado gráficos de Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y árboles de agrupación de secuencias por menor distancia genética UPGMA para visualizar estas diferencias e identificar aquellos microorganismos responsables de estas diferencias.

Resultados y discusión

Diversidad bacteriana

Los resultados indican la existencia de una gran riqueza microbiana en el suelo de las parcelas de las distintas bodegas (una media 6000 otus en 50000 secuencias).

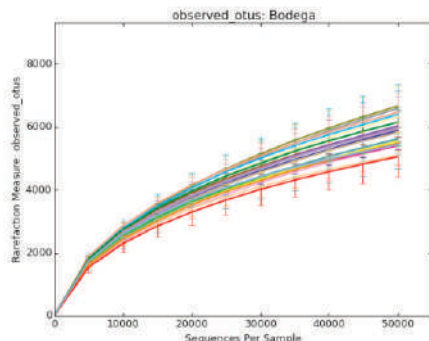


Figura 2: Diversidad alfa en bodegas, para ver como cambia la diversidad bacteriana de cada bodega.

Como se aprecia en la figura 2, no todas las bodegas tienen la misma cantidad de OTUs. Podemos decir que la riqueza microbiana de algunas bodegas es mayor que en otras, indicativo de su salud y calidad.

Gráficos de barras

Se han creado gráficos de barras para poder visualizar la estructura y composición microbiana de los suelos. La figura 3 es un ejemplo en donde se representan la distribución y abundancia de los microorganismos de 3 bodegas de Álava, con dos parcelas por cada bodega. Cada barra representa una muestra y cada color en la barra representa un microorganismo y su abundancia relativa

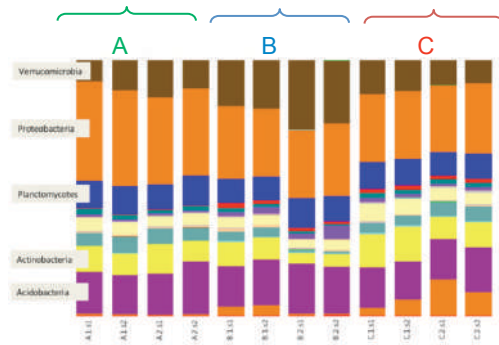


Figura 3: Gráfico de barras, en el que vemos la abundancia relativa de las bacterias en cada muestra a nivel de filo. A, B y C, son 3 bodegas de Álava, cada una con 2 parcelas.

En el gráfico podemos ver, por ejemplo, que las proteobacterias son los filos mas abundantes en nuestros suelos. Este análisis se puede realizar a cualquier nivel taxonómico, por ejemplo, género y/o especie.

Diversidad beta

Para poder visualizar si existen diferencias en la composición microbiana entre parcelas y definir la huella microbiológica de parcelas/bodegas o regiones, estudiamos la diversidad beta, que visualizamos mediante gráficos de PCoA y árboles de UPGMA. La figura 4 y 5 son ejemplos en los que se han representado la diversidad beta de las 3 bodegas de Alava.

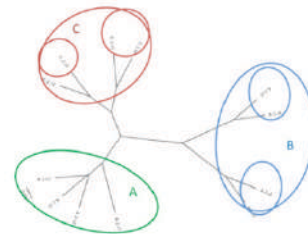


Figura 4: UPGMA de las muestras de suelo de 6 parcelas de 3 bodegas (A, B y C). La distancia de las ramas desde una parcela a otra representa lo diferenciados que están en cuanto a su composición microbiana.

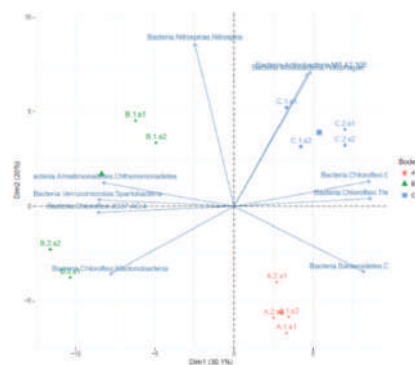


Figura 5: PCoA de las muestras de suelo de 6 parcelas de 3 bodegas (A, B y C). La distancia entre los puntos es indicativa de su diferenciación en composición microbiana. Las flechas y su dirección muestran las bacterias que más promueven la diferenciación entre las 3 bodegas seleccionadas para el ejemplo.

Tanto en la Figura 4 como en la 5 observamos que existen diferencias microbianas entre las 3 bodegas, es decir, cada bodega tiene su huella microbiana que la distingue del resto. Es interesante observar como en algunos casos se llegan incluso a diferenciar las parcelas dentro de una misma bodega (como es el caso de las parcelas de la bodega B y C). Además, podemos llegar a conocer cuales son las familias de microorganismos que más aportan a la diferenciación de estas parcelas y bodegas, como por ejemplo vemos que la bodega C tiene mayor numero de acidobacterias que el resto de bodegas (Figura 5).

Diagramas de Venn

Estos diagramas sirven para identificar aquellos microorganismos que resultan esenciales para la vid (microorganismos “core”, comunes a todas las parcelas, bodegas y/o regiones), y aquellos microorganismos que podrían ser usados como identificativos de parcela/bodega/región, y por tanto para trazabilidad (microorganismos específicos de parcela, bodega y/o región).

Volviendo al ejemplo de las tres bodegas seleccionadas, en la Figura 6 vemos que éstas tienen 57 familias en común, pero cada bodega tiene sus microorganismos específicos. Así por ejemplo, la bodega A tendría 9 bacterias que no aparecen en el resto de bodegas, mientras que las bodegas B y C, tendrían 6 microorganismos específicos respectivamente.



Figura 6: Diagrama de Venn, en el que vemos que familias de bacterias comunes y específicas de bodegas.

Mapa de calor a partir de bacterias beneficiosas

Una parcela con mayor número de bacterias beneficiosas, es decir aquellas con mayor diversidad y abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno, productoras de sideróforos o fitohormonas, entre otras funciones, goza de mejor salud.

Para poder visualizar y determinar el estado de salud de las parcelas muestreadas, podríamos comparar la presencia/abundancia de estas

bacterias entre las parcelas /bodegas y/o regiones muestreadas mediante mapas de calor.

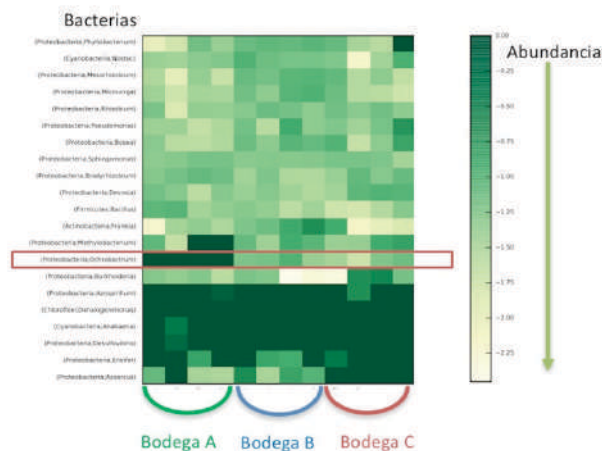


Figura 7: Mapa de calor, en el que se encuentra marcada la familia Ochrobactrum por su abundancia diferencial en la bodega A.

En esta imagen vemos que existe una diferencia de abundancia relativa de la familia Ochrobactrum entre las 3 bodegas seleccionadas, en la que la bodega A muestra un mayor número. Esta bacteria se considera beneficiosa por su función fijadora de nitrógeno [7], lo que podría tener implicaciones positivas para la productividad de la vid.

Conclusiones

Gracias a la secuenciación masiva de ADN podemos obtener mucha información sobre la biodiversidad en suelo. Con ella podemos crear un inventario de la comunidad bacteriana, para así estudiar si existen diferencias en la riqueza microbiana entre parcelas, su grado de diferenciación y determinar el estado de salud de la viña. Esta información será de utilidad para los vitivinicultores, para poder adelantarse a futuras infecciones o para mejorar sus sustratos para elaborar un vino de mejor calidad.

Referencias bibliográficas

- [1] Albaladejo and Martínez Carrión (2010) *Journal of Wine Research*. 21,1: 77-95;
- [2] López-Rituerto et al. (2012) *J AGR FOOD CHEM*, 60, 13: 3452-3461;
- [3] Roullier-Gall et al. (2014) *Plos one*, 9
- [4] Bokulich et al. (2014) *PNAS* 111, 1: E139-E148;
- [5] Zarraonaindia et al. (2015) *mBio* 6, 2: e02527-14;
- [6] Bokulich et al. (2015) *Am J Enol Vitic* 66,1: 73-79;
- [7] Ngom A. Nakagawa Y., 2004, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 17-27.