



Sociedad
Española
de **Ciencias**
Hortícolas

97

Septiembre
2024

ACTA DE HORTICULTURA

Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas

XI Congreso Nacional de
Mejora Genética de Plantas

Editores:
Margarita López Corrales
M^a Engracia Guerra Velo
María Ramos García
Antonio Jesús Galán Jiménez

Cáceres, 24-26 de septiembre de 2024

Metagenoma de plantas de melón y sandía cultivadas bajo diferentes manejos y condiciones geográficas. Efecto sobre la estructura y composición de las comunidades microbianas asociadas.

Ana Garcés-Claver^{1,2}, Jérôme Grimplet^{1,2}, Oreto Fayos^{1,2}, Carmen Julián^{1,2} y Vicente González^{1,2*}

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930. 5059, Zaragoza. ² Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2. CITA-Universidad de Zaragoza, Zaragoza.

***Autor para correspondencia:** vgonzalezg@cita-aragon.es

Palabras clave: Microbioma, Cucurbitáceas, Rizosfera, Hongos, Bacterias

Resumen

En los últimos años, los estudios metagenómicos llevados a cabo en diferentes agroecosistemas sugieren que los patógenos, las especies simbiotes, antagonistas, y demás diversidad microbiana asociada puede evolucionar y ser diferente según diversas condiciones de manejo, en gran parte debido a la interacción y los procesos de reclutamiento de microorganismos impulsados por la planta huésped. En el caso de las cucurbitáceas, se han publicado algunos estudios con datos metagenómicos que dan cuenta de los cambios del microbioma asociado al suelo o la rizosfera tras una variación en ciertos parámetros y/o tipos de manejo en los cultivos. Utilizando esta estrategia, se han analizado la composición taxonómica y estructura del microbioma asociado a muestras de suelos (incluyendo rizosferas) de plantas de melón y sandía prospectadas en campos con diferentes modalidades y condiciones de manejo. Los resultados mostraron diferencias entre las comunidades microbianas asociadas a los diferentes manejos y localizaciones, reflejando el efecto de algunas de estas prácticas sobre la riqueza y diversidad de especies, las similitudes existentes entre tipos de manejo, o la caracterización del estado fitosanitario de las diferentes parcelas.

INTRODUCCIÓN

Las comunidades microbianas (procariotas y eucariotas) de los diferentes agroecosistemas soportan y modulan servicios básicos y esenciales para el funcionamiento de éstos. La abundancia y estructura poblacional de estas comunidades de microorganismos nos informa de aspectos como el estado fitosanitario de los diferentes cultivos, la capacidad de resiliencia frente a perturbaciones o la presencia/ausencia de diversidad microbiana de interés en procesos de movilización y fijación de nutrientes (Richardson and Simpson, 2011) o de la capacidad del componente vegetal del ecosistema para hacer frente a estreses bióticos o abióticos (Gaiero et al., 2013). La composición del microbioma del suelo en términos de diversidad y funcionalidad genética está siendo investigada masivamente desde que las técnicas metagenómicas son más asequibles. Se están poniendo grandes esfuerzos en describir la comunidad microbiana de los suelos agrícolas en función de su localización geográfica, las propiedades fisicoquímicas de éstos y las prácticas de cultivo y manejo (Berlanas et al., 2019; Coller et al., 2019). En relación a esto último, se asume que las prácticas de cultivo convencionales y orgánicas tienen efectos distintivos en la fertilidad y salud del suelo, modulando y condicionando la composición y funcionalidad de las comunidades microbianas (Colautti et al., 2023), que resultan sensibles a los cambios de manejo que producen efectos diversos como la alteración de los flujos de agua y nutrientes en el suelo, el desplazamiento de especies en favor de táxones patógenos, la reducción de la cubierta vegetal y sus hábitats microbianos asociados, etc. (Gomiero et al., 2011). Para el caso de las cucurbitáceas no contamos aún con muchos estudios que describan y analicen la composición y estructura del componente microbiano de los suelos de cultivo (y sus rizosferas asociadas) en función del tipo de manejo de cultivo practicado. El cultivo de melón, sandía y otras

cucurbitáceas se desarrolla bajo una amplia variedad de modalidades, desde orgánico, convencional, intensivo bajo plástico, en secano, regadío, etc., lo que justifica el interés de este tipo de estudios a la hora de determinar e inferir aspectos básicos de la dinámica de los suelos en los que estos cultivos se desarrollan, como pueden ser las actividades metabólicas del componente microbiano, incluyendo la movilización de nutrientes y la existencia de relaciones simbióticas, el estado fitosanitario de los agroecosistemas o su potencial para la supresión natural de enfermedades de suelo que afectan estas especies vegetales. Hasta la fecha, los estudios que relacionan la composición del microbioma de zonas de cultivo de cucurbitáceas se han limitado a la diferenciación en su composición en relación con parámetros como la localización geográfica de las parcelas (Adhikari et al., 2021), el co-cultivo con otras especies vegetales (Cuartero et al., 2022), o el uso de distintos regímenes de fertilización (Zhang et al., 2022). El presente trabajo analiza la composición taxonómica y funcional del metagenoma (procariota y eucariota) asociado a muestras de suelo y rizosferas de plantas de melón y sandía prospectadas en campos con diferentes manejos culturales, condiciones epidemiológicas o edafológicas en áreas productoras de la Comunidad Valenciana y Aragón, comparando la composición diferencial de los diferentes microbiomas entre localizaciones, para establecer asociaciones de diversidad entre manejos, definir el componente microbiano basal común a las dos especies vegetales estudiadas, o predecir el estado fitosanitario y/o grado de agotamiento microbiológico de los suelos analizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se prospectaron muestras de suelo desnudo y rizosferas (porción de suelo en contacto directo con el sistema radicular) de plantas de melón y sandía en 4 zonas de cultivo con distintas condiciones agroecológicas y de manejo (Tabla 1). En promedio, se recogieron entre 5 y 30 muestras de suelo y rizosferas de melón y sandía por parcela, mezcladas después en 5 muestras compuestas (pool) por especie vegetal en cada parcela (10 muestras totales por parcela). De cada pool se conservaron alícuotas (50 mL aproximadamente) a -80°C hasta su procesado para realizar la posterior extracción de ADN. Tras esto, las submuestras fueron tamizadas y deshidratadas en horno seco, seleccionando finalmente 3 tubos eppendorf de 1,5 microlitros con 400 microgramos de suelo y/o rizosfera cada uno. Para la extracción del ADN genómico total de cada muestra se empleó el kit de extracción DNeasy Power Soil PRO-kit® de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante con ligeras modificaciones, cuantificando la concentración de ADN presente en cada muestra con espectrofotómetro de microvolumen (Nanodrop®). Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo por StabVida Lda. (Caparica, Portugal) empleando la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA), caracterizando la diversidad microbiana en cada muestra mediante la amplificación selectiva de la región ITS ribosomal (fragmento ITS2) y las regiones variables V3 y V4 del fragmento 16S ribosómico para los casos de la diversidad fúngica y bacteriana, respectivamente. Los datos de secuencia generados se procesaron a través de un flujo de trabajo del software Galaxy usando DADA2 (Galaxy Versión 1.20+galaxy0) (581-583, doi:10.1038/nmeth.3869). Para la taxonomía de hongos, se utilizó la versión 8.3 de la versión fasta general de la base de datos UNITE [10.15156/BIO/1280089]. En el caso de las bacterias se utilizó Silva NR99 v138.1 (Yilmaz et al., 2013). El análisis estadístico de los datos se realizó en Rstudio utilizando el paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). La diversidad α se cuantificó utilizando cuatro índices métricos (Chao, Shannon, ACE y Simpson). Para el estudio entre parcelas (diversidad β), se construyeron análisis de coordenadas principales (PCoA) y gráficos de ordenación de datos OTUs utilizando el programa Phyloseq para R. Se utilizó el paquete DESeq2 para detectar OTUs con abundancia diferencial entre filas y parcelas con parámetros predeterminados (prueba de Wald).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que la combinación de los factores geográficos y de manejo modelaron la estructura y composición de las poblaciones microbianas de los agroecosistemas analizados,

resultando en general (como cabía esperar) más diversas y complejas las comunidades bacterianas frente a las fúngicas, y obteniéndose asimismo valores superiores de α -diversidad en el microbioma asociado a suelos desnudos frente a los obtenidos para el interior radicular tanto en bacterias como en hongos (Figura 1). Además, los análisis de diversidad comparativa (β -diversidad) mostraron que la composición y distribución de táxones (procariotas y eucariotas) resultó claramente diferenciada según el tipo de condición o manejo cultural considerado. El tipo de compartimento analizado (suelo/rizosfera) modeló la composición taxonómica de las comunidades microbianas, observándose por ejemplo para el caso de los hongos (Figura 2), una distribución diferencial de familias taxonómicas más abundantes, en donde las muestras de suelo resultaron más diversas que aquellas provenientes de las rizosferas, las cuales estaban dominadas en muchas de las muestras por determinadas especies, generalmente patógenas, informando acerca del estado fitosanitario de las plantas de cada parcela. En este sentido, los patógenos de suelo más frecuentes fueron diferentes según la localización analizada, en donde especies termófilas como *Monosporascus cannonballus* dominaron casi exclusivamente las lecturas en las rizosferas de las muestras de Carrizales (V), un área de cultivo orgánico de melón en condiciones de alta salinidad y temperatura, mientras que en las parcelas de Museros (V) y Torres de Berrellén (Z) los patógenos más abundantes pertenecían en ambos casos a táxones de la familia *Plectosphaerellaceae*, diferenciándose del resto claramente los suelos en ecológico de Alagón (Z) por la abundancia de táxones de la familia *Nectriaceae* (géneros tipo *Fusarium*). Al comparar la composición del metagenoma fúngico rizosférico entre localidades (datos no mostrados), se observó un cierto grado de solapamiento entre las comunidades de las parcelas cultivadas en ecológico (Carrizales y Alagón) pese a las diferencias edafológicas y bioclimáticas existentes entre ambas. En el caso de las comunidades bacterianas, estas resultaron muy diversas en términos de su composición taxonómica en las muestras de suelo desnudo, sin detectarse una clara dominancia de ningún grupo taxonómico en especial, frente a lo observado en los análisis de las muestras rizosféricas, donde se observó una mayor frecuencia de aparición de OTUs pertenecientes a grupos específicamente asociados a fenómenos de simbiosis como los Rhizobiales, aunque de forma desigual, resultando este tipo de bacterias más abundantes en la parcela en régimen de cultivo ecológico (Alagón). En conclusión, la diversidad microbiana difería significativamente entre localidades, aunque a resultas del tipo de manejo algunas de ellas contenían un alto porcentaje de elementos comunes (como en el caso de las poblaciones rizosféricas de hongos de las dos parcelas manejadas en orgánico). A consecuencia probablemente de lo anterior, la diversidad encontrada en explotaciones bajo manejo convencional resultó ligeramente inferior en comparación con el resto. Finalmente, las condiciones edafoclimáticas, los genotipos vegetales empleados o la modalidad de cultivo modelaron claramente el estado fitosanitario de los suelos analizados.

REFERENCIAS

- Adhikari, M. et al. 2021. Bacterial Community and Diversity from the Watermelon Cultivated Soils through Next Generation Sequencing Approach. *Plant Pathol. J.*
- Berlanas, C. et al. 2019. The Fungal and Bacterial Rhizosphere Microbiome Associated with Grapevine Rootstock Genotypes in Mature and Young Vineyards. *Front. Microbiol.* 10. 10.3389/fmicb.2019.01142.
- Colautti, A., Civilini, M., Contin, M., Celotti, E., Iacumin, L. 2023. Organic vs. conventional: impact of cultivation treatments on the soil microbiota in the vineyard. *Front. Microbiol.* 14. 10.3389/fmicb.2023.1242267.
- Coller, E. et al., 2019. Microbiome of vineyard soils is shaped by geography and management. *Microbiome* 71(1), 140.
- Cuartero, J. et al. 2022. A first-year melon/cowpea intercropping system improves soil nutrients and changes the soil microbial community. *Agric. Ecosyst. Environ.* 328. 107856. 10.1016/j.agee.2022.107856.

- Gaiero, J.R. et al., 2013. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am. J. Bot.* 100(9), 1738-1750.
- Gomiero, T., Pimentel, D., Paoletti, M. 2011. Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. *Crit. Rev. Plant Sci.* 30. 95-124. 10.1080/07352689.2011.554355.
- McMurdie, P.J. & Holmes S. 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* 2013 Apr 22;8(4): e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant Physiol.* 156(3), 989-996; doi: 10.1104/pp.111.175448
- Yilmaz, P., Wegener-Parfrey, L., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F. 2013. The SILVA and “All-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 42. 10.1093/nar/gkt1209.
- Zhang, H., Zheng, X., Wang, X., Xiang, W., Xiao, M., Wei, L., Zhang, Y., Song, S., Zhao, Z., Lv, W., Chen, J., Ge, T. 2022. Effect of fertilization regimes on continuous cropping growth constraints in watermelon is associated with abundance of key ecological clusters in the rhizosphere. *Agric. Ecosyst. Environ.* 339. 108135. 10.1016/j.agee.2022.108135.

AGRADECIMIENTOS: Proyecto PID2020-116055RB-C22 I+D+I financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011003 y al A11-20R financiado por el Gobierno de Aragón.

Tabla 1.- Muestras empleadas en el análisis metagenómico. Se indican los códigos de muestra, la procedencia y especificidades de manejo junto con el tipo de material.

CODIGO MUESTRA	PROCENDENCIA MUESTRA	TIPO MUESTRA
S-1 - S-10	Museros (Valencia) (suelo en área hortícola periurbana) (Parcela con cultivo previo convencional de cucurbitáceas / sin cubierta vegetal / no rotación previa/ fertilización inorgánica)	Suelo desnudo
S-11 - S-20	Torres Berrellén (Zaragoza) (suelo en llanura aluvial) (Parcela sin cultivo previo de cucurbitáceas / barbecho / aporte de materia orgánica)	Suelo desnudo
S-21 - S-30	Alagón (Zaragoza) (suelo en llanura aluvial) (Parcela con cultivo ecológico / aporte de materia orgánica / sin rotación previa / cubierta vegetal)	Suelo desnudo
S-31 - S-40	Carrizales (Valencia) (suelo en humedal salino) (Parcela en suelo salino y cultivo ecológico / cultivo anterior de alfalfa / no cubierta vegetal / aporte materia orgánica)	Suelo desnudo
R-1 - R-10	Museros (Valencia) (suelo en área hortícola periurbana) (Parcela con cultivo previo convencional de cucurbitáceas / sin cubierta vegetal /no rotación previa/ fertilización inorgánica)	Rizosfera
R-11 - R-20	Torres Berrellén (Zaragoza) (suelo en llanura aluvial) (Parcela sin cultivo previo de cucurbitáceas / barbecho / aporte de materia orgánica)	Rizosfera
R-21 - R-30	Alagón (Zaragoza) (suelo en llanura aluvial) (Parcela con cultivo ecológico / aporte de materia orgánica / sin rotación previa / cubierta vegetal)	Rizosfera
R-31 - R-40	Carrizales (Valencia) (suelo en humedal salino) (Parcela en suelo salino y cultivo ecológico / cultivo anterior de alfalfa / no cubierta vegetal / aporte materia orgánica)	Rizosfera

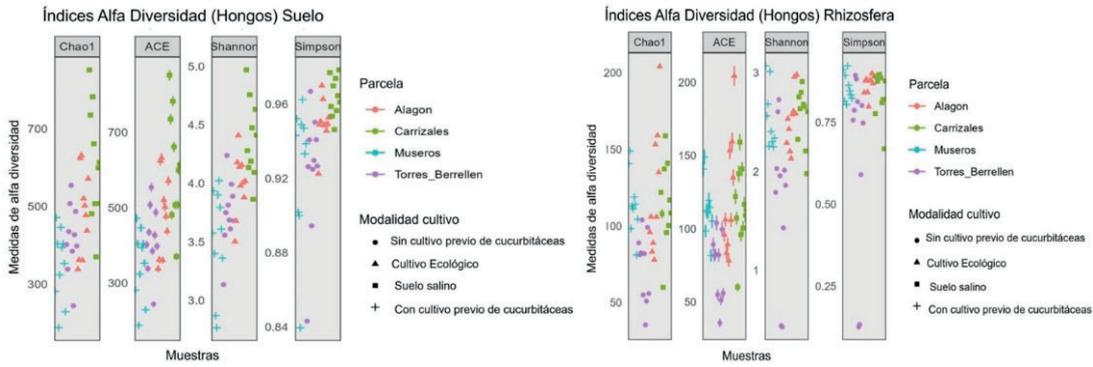


Figura 1.- Índices de diversidad de comunidades fúngicas asociadas a suelo desnudo (izda.) y rizosferas (dcha.) en diferentes localizaciones y tipos de manejo

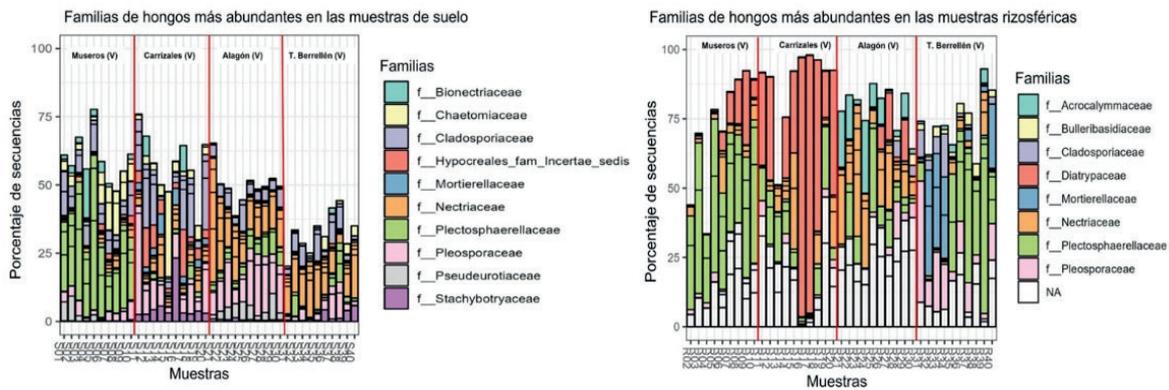


Figura 2.- Histograma de barras compuestas mostrando las familias de hongos más abundantes presentes en las parcelas muestreadas agrupadas por localización geográfica.