

Caracterización de la funga de suelo mediante secuenciación en plataformas de Next Generation Sequencing

Sebastián Zambrano-Rojas¹, Roberto Uribe-Paredes^{1,2}, Laura Sánchez-Jardón^{3,4}, Marcelo A. Navarrete^{1,2}

¹Programa de Magister en Bioinformática, Departamento de Ingeniería en Computación. Universidad de Magallanes, Avenida Manuel Bulnes 01855, Punta Arenas, Región de Magallanes y Antártica Chilena, Chile

²Centro Asistencial Docente e Investigación (CADI-UMAG). Universidad de Magallanes, Avenida Los Flamencos 1364, Punta Arenas, Región de Magallanes y Antártica Chilena, Chile

³Centro de Investigación GAIA Antártica (CIGA), Universidad de Magallanes, Avenida Manuel Bulnes 01855, Punta Arenas, Región de Magallanes y Antártica Chilena, Chile. Email: laura.sanchez@umag.cl

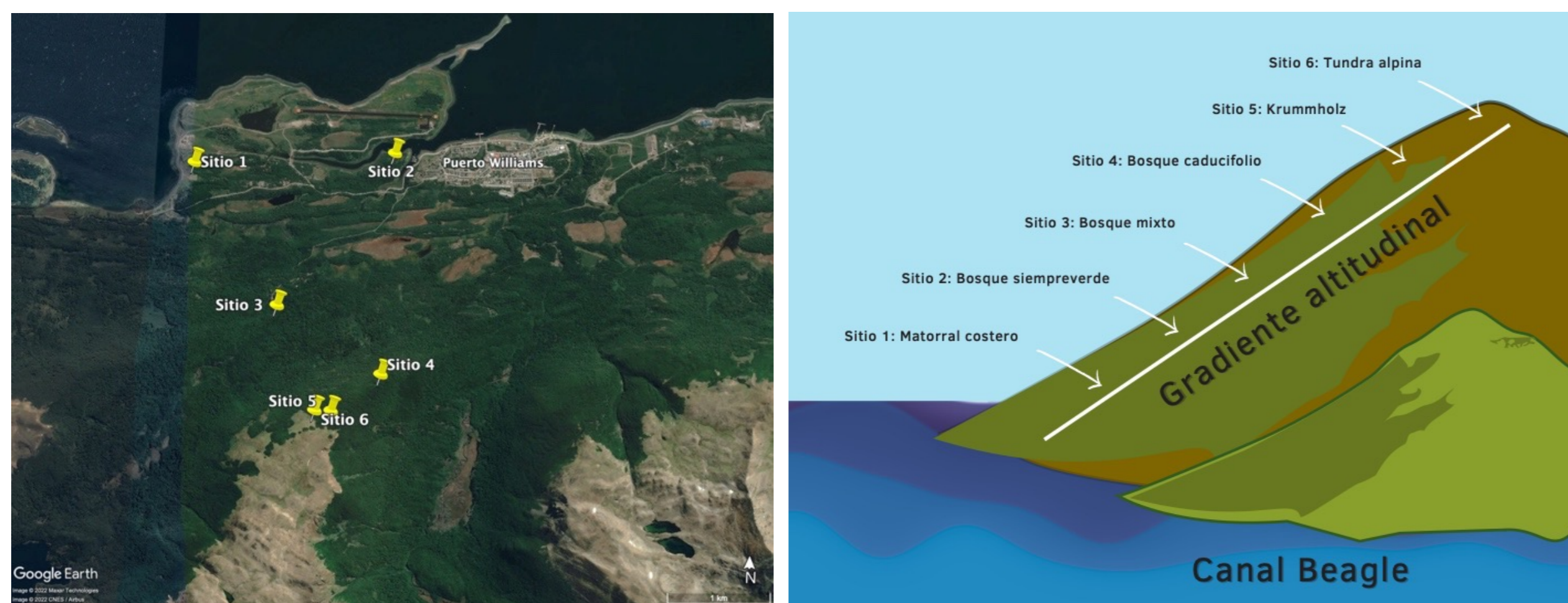
⁴Cape Horn International Center (CHIC), O'Higgins 310, Puerto Williams, Región de Magallanes y de la Antártica Chilena, Chile

RESUMEN

La ecorregión subantártica de Magallanes representa una de las áreas geográficas más prístinas de la tierra y alberga una amplia diversidad de ecosistemas únicos. Isla Navarino, ubicada en la Reserva de la Biosfera Cabo de Hornos, es parte de los ecosistemas terrestres más australes del planeta, con particularidades climáticas y geológicas que propiciaron una enorme heterogeneidad ambiental dentro de un área limitada. Estas características se ven reflejadas, a su vez, en la distribución y diversidad de las comunidades vegetales que se aprecian en esta zona. Esto se traduce a su vez en un muy marcado gradiente altitudinal, el cual genera una marcada transición de las especies de la comunidad vegetal. Además, Isla Navarino destaca por su enorme diversidad de especies de líquenes y briofitos, los cuales superan la diversidad de las plantas vasculares. Sin embargo, la comunidad de hongos no se ha descrito en suficiente detalle, por lo que su diversidad en Isla Navarino se encuentra completamente subestimada. Con la finalidad de abordar este problema, se propone investigar de la diversidad de hongos de suelo mediante técnicas de biología molecular y bioinformática, en este caso, metabarcoding y secuenciación de nueva generación en la plataforma minION de Oxford Nanopore Technologies (ONT). En primera instancia, se realizó un muestreo donde se colectaron 30 muestras de suelo de 6 sitios distintos a lo largo de un gradiente altitudinal en Cerro Bandera. Posteriormente, se realizó la extracción del DNA total presente en cada muestra y se amplificó la región ITS completa y parte de la región 28S del operón ribosomal mediante PCR, utilizando partidores específicos para su hibridación en secuencias conservadas de hongos. Paralelamente, se envió una alícuota del DNA extraído de las muestras al centro Scripps (California, EE.UU) con el fin de secuenciarlas mediante la tecnología Illumina, la cual es considerada el "gold standard" para metabarcoding. Una vez obtenidos los resultados de ambas secuenciaciones, se realizarán análisis bioinformáticos con las secuencias obtenidas. Además, se realizará una comparación entre ambas tecnologías para determinar si Nanopore (de un costo inicial mucho menor que Illumina) se puede emplear de manera efectiva para análisis de muestras ambientales complejas. Finalmente, se propone un nuevo pipeline bioinformático para el análisis de la diversidad por metabarcoding, mediante Oxford Nanopore Technologies.

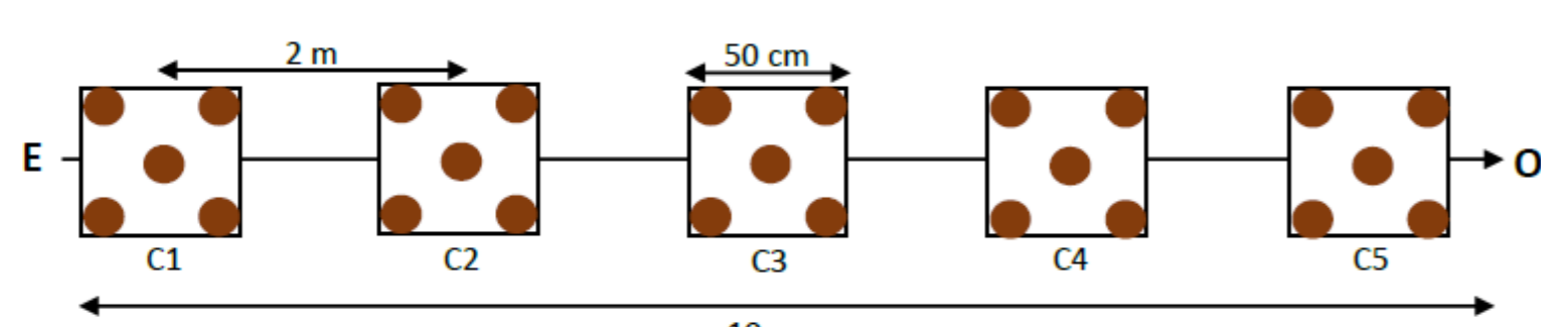
METODOLOGÍA

1. Zona de muestreo:



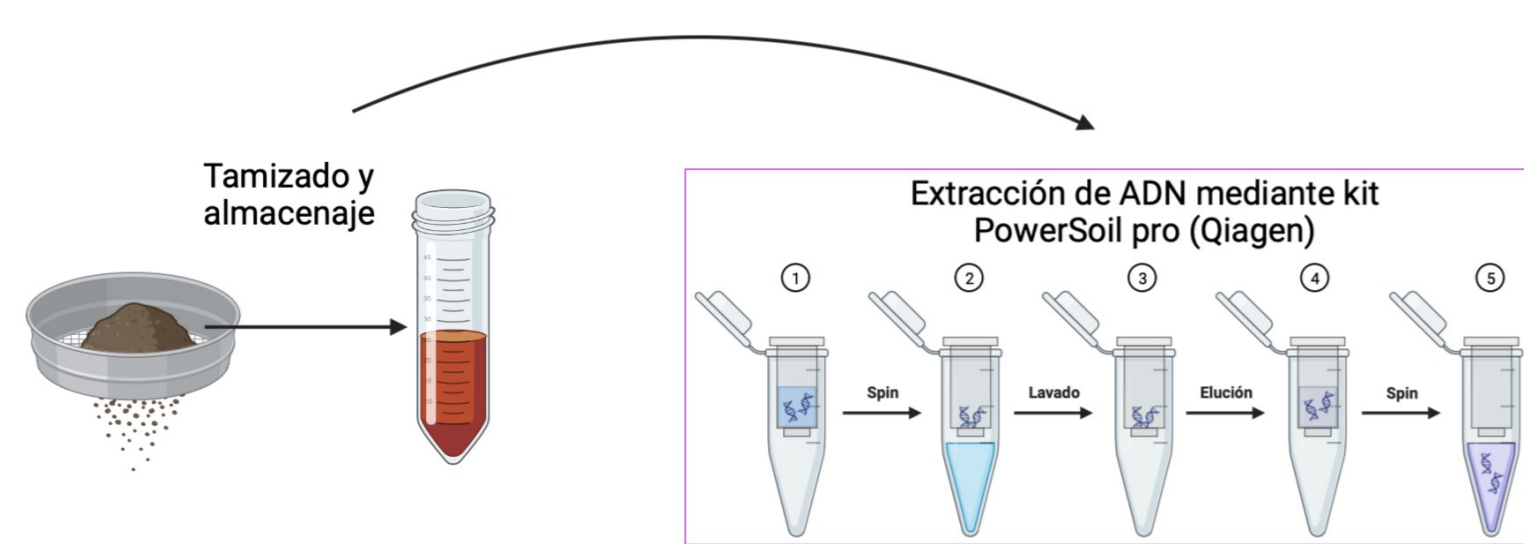
Se definieron 6 puntos de muestreo a lo largo del gradiente altitudinal

2. Toma de muestras:

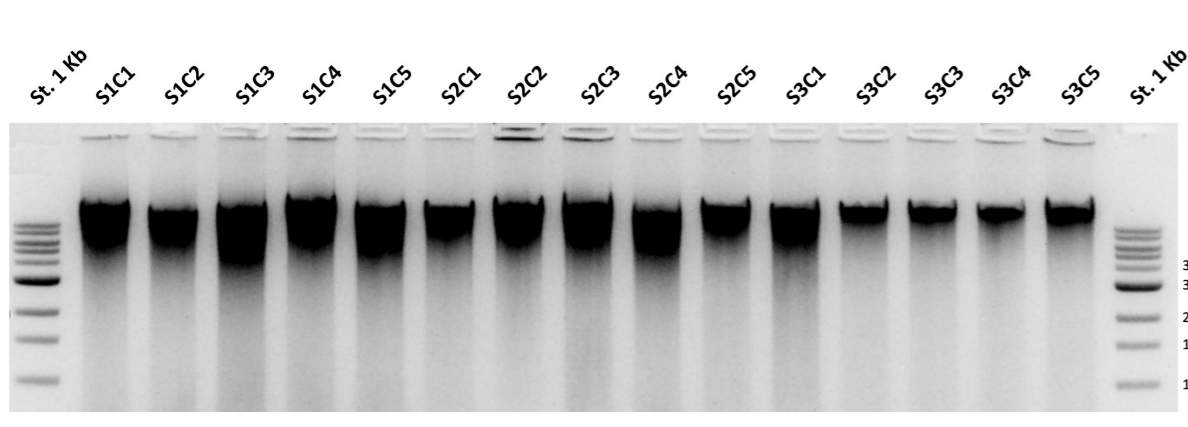
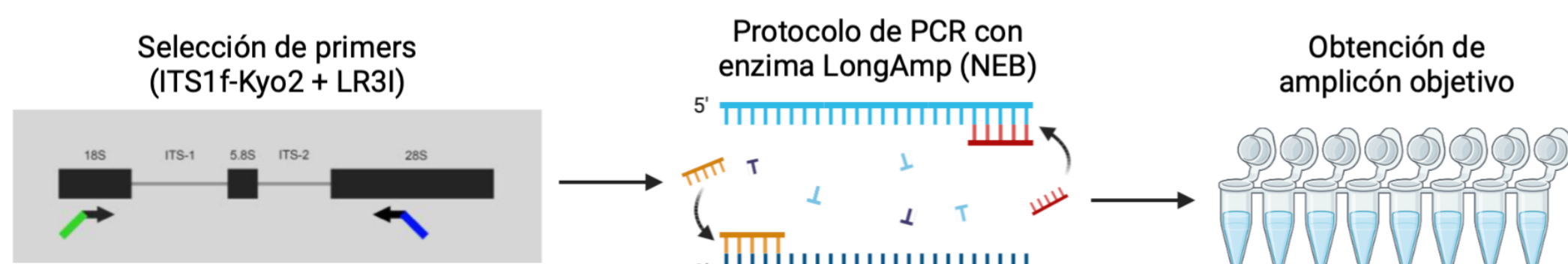


Se proyectó un transecto para cada sitio (S1-S6) de este a oeste para la recolección de 5 muestras complejas en cuadrantes (C1-C5)

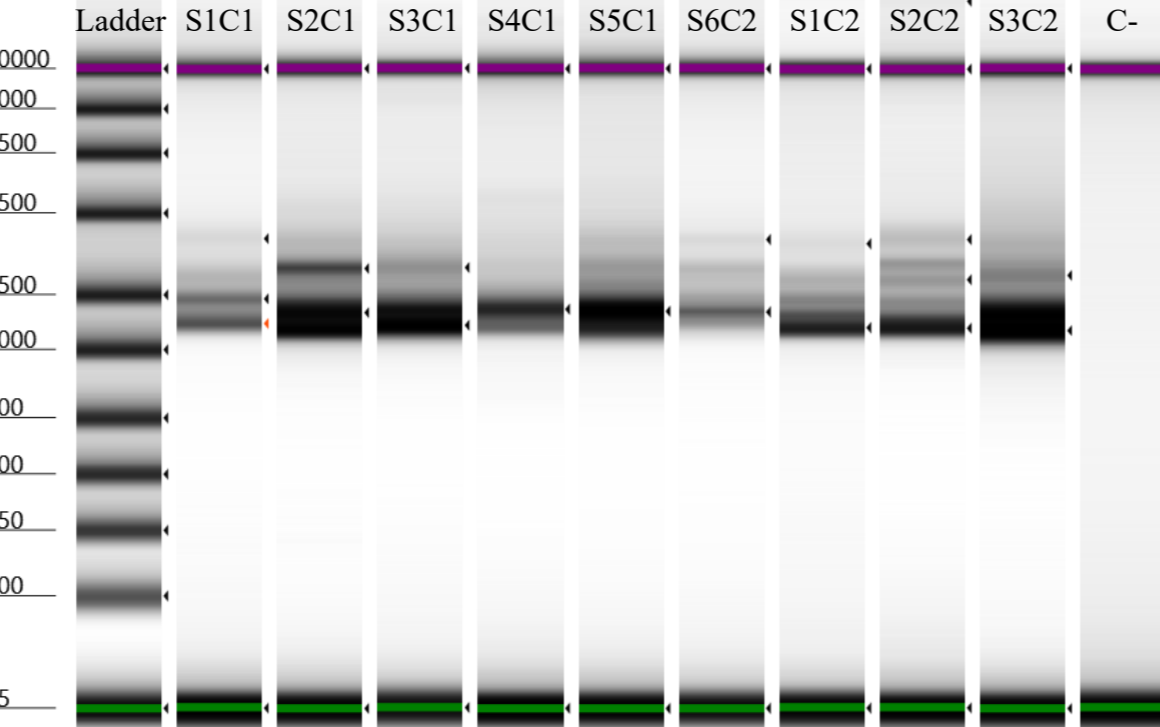
3. Extracción de ADN desde muestras de suelo



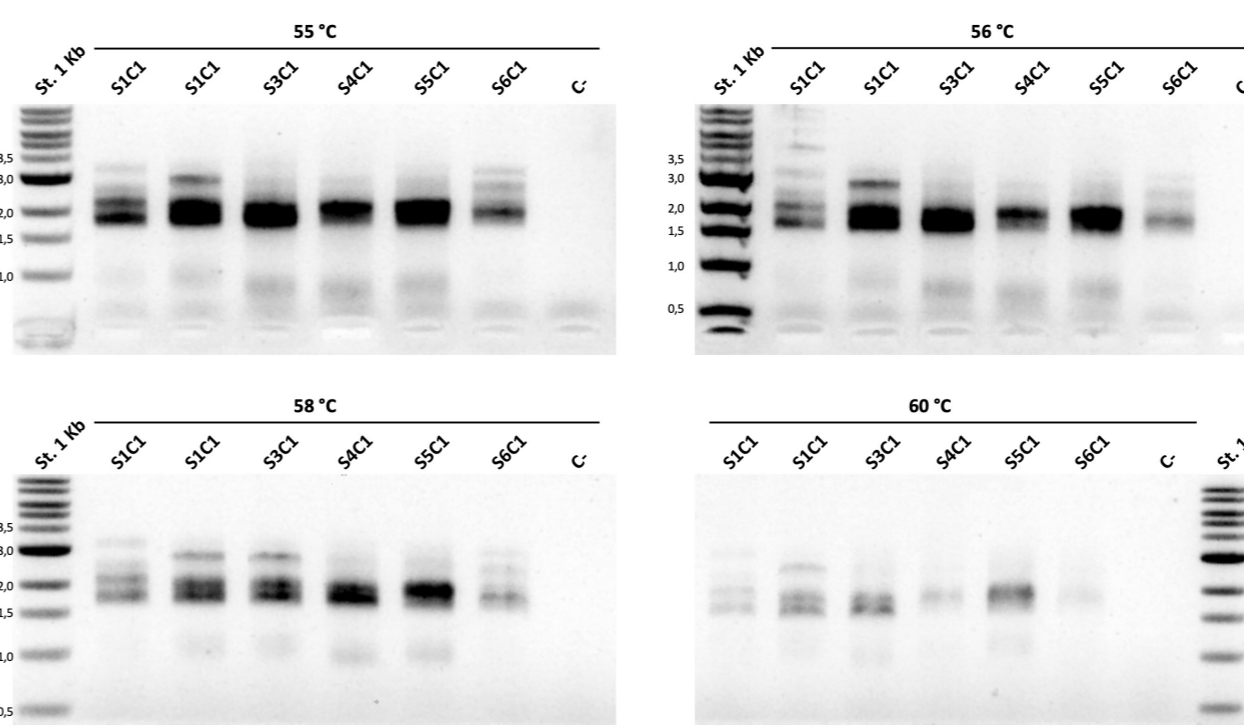
4. Amplificación por PCR de la región ITS + 28S parcial



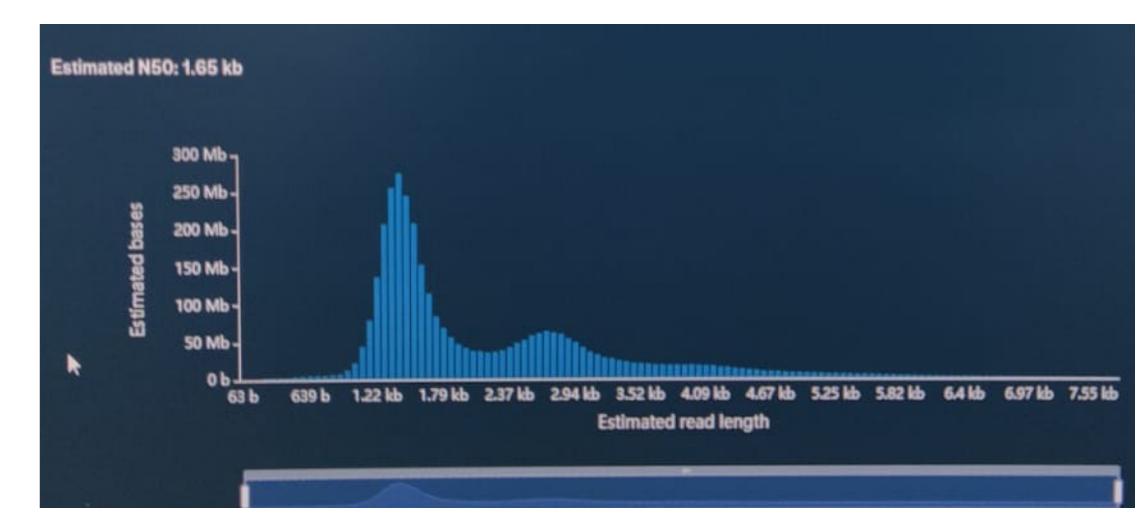
Productos de extracción de DNA genómico total de las muestras obtenidas. Gel de agarosa 0,7%



Resultado de la medición de integridad y concentración de ácidos nucleicos en equipo TapeStation

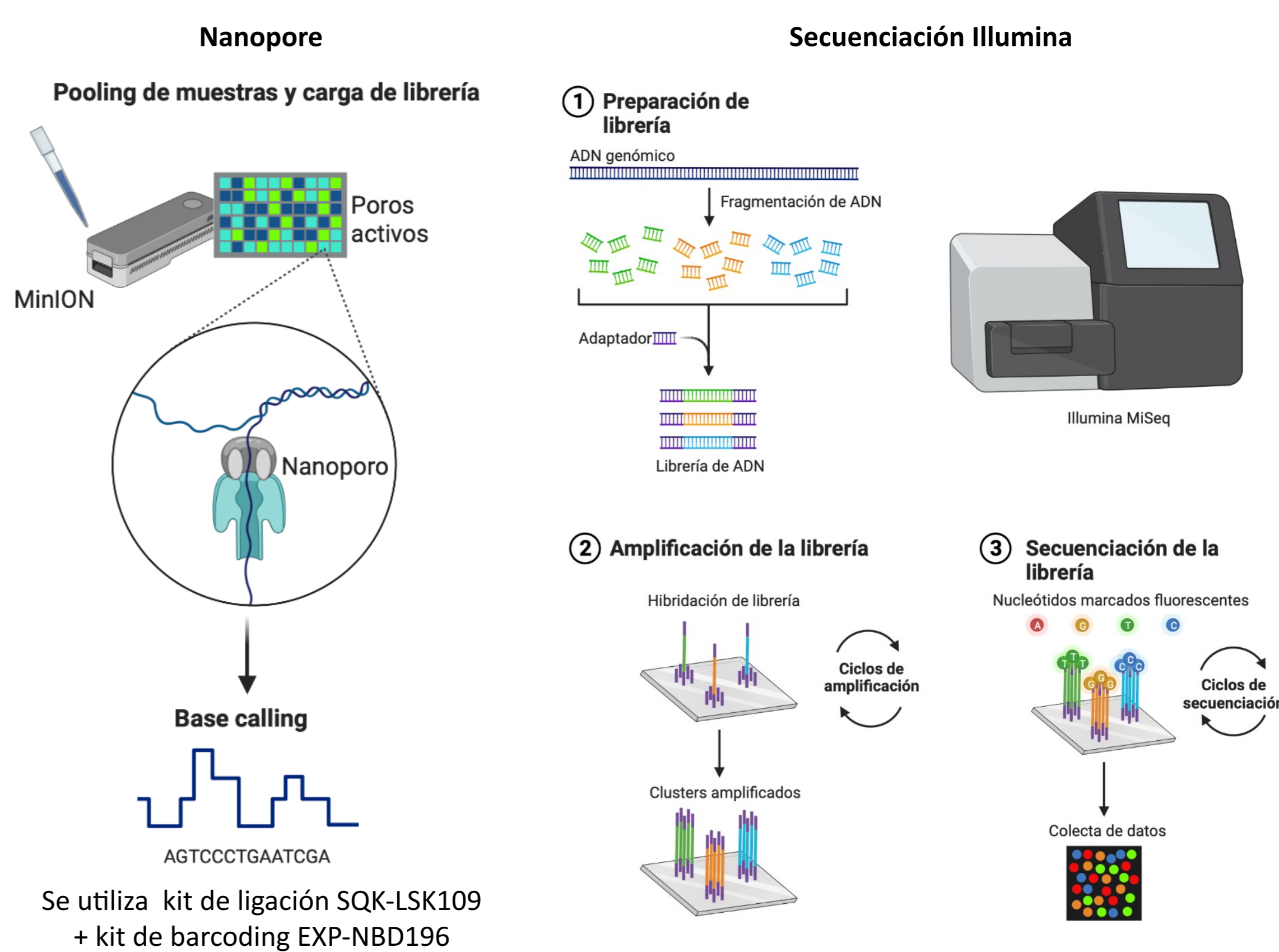


Ensayo de PCR con gradiente de temperaturas. Productos de PCR de la amplificación de la región ITS utilizando los partidores del trabajo de Mafune, et al. 2019. Gel de agarosa 1%.

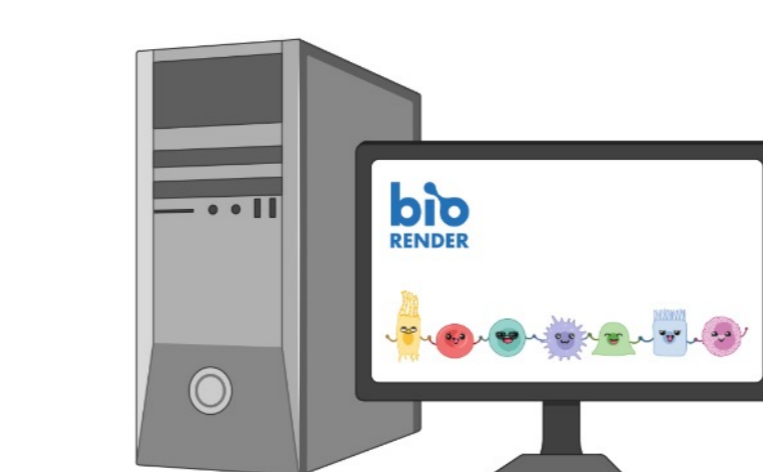


Primer ensayo de secuenciación. Se muestra el histograma de cantidad de secuencias por tamaño, luego de 19 horas de iniciado el experimento

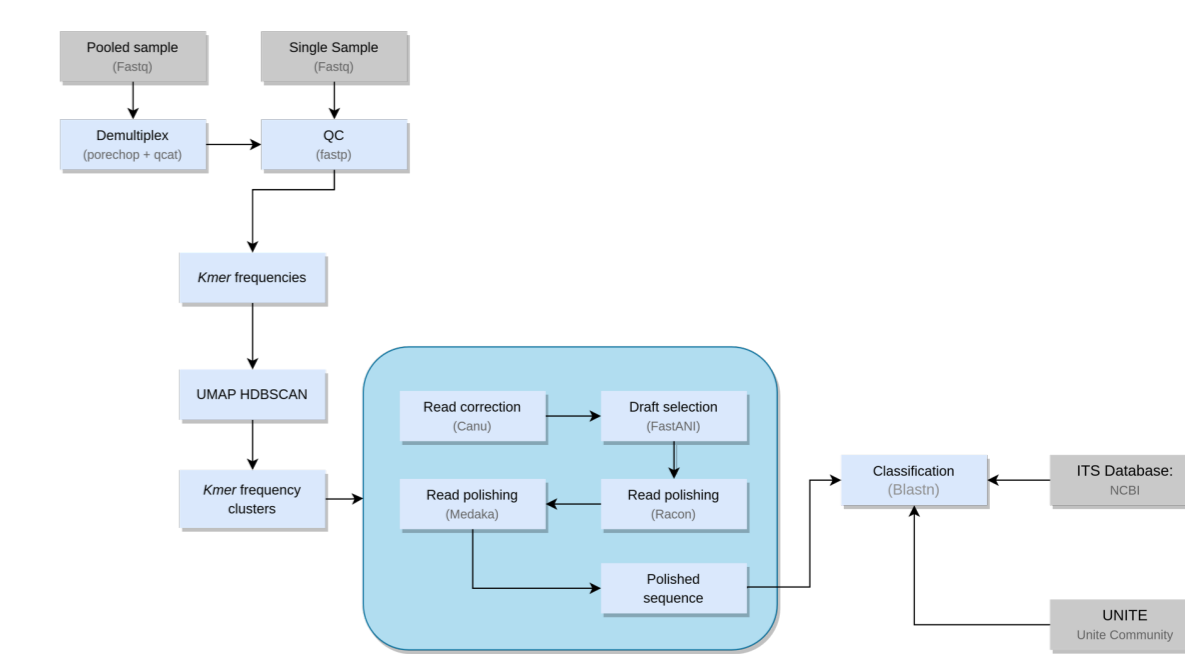
5. Secuenciación mediante Illumina y Nanopore:



6. Análisis bioinformáticos



Procesamiento de datos crudos obtenidos de los experimentos de secuenciación



Diseño y aplicación de pipeline bioinformático para datos de Nanopore

RESULTADOS

PROYECCIONES

Los principales resultados esperados en esta investigación incluyen:

- Obtener de un set de datos de secuencias del amplicón ITS + 28S (parcial), los cuales serán subidos a la plataforma UNITE, entre otras, aportando así muy valiosa información a las distintas bases de datos de secuencias de hongos, de acceso público y gratuito, correspondiendo a las muestras secuenciadas más australes de Sudamérica continental.
- Realizar una caracterización de la diversidad de la comunidad fúngica de las muestras de suelo analizadas, y analizar su variación a lo largo del gradiente altitudinal.
- Desarrollar un nuevo pipeline bioinformático específico para procesar datos de secuenciación en Oxford Nanopore, de la comunidad de hongos de una muestra compleja, el cual será comparado y validado con los resultados de la secuenciación con la tecnología Illumina.
- Extender este protocolo para el análisis de muestras individuales de colectas fúngicas en terreno, pudiendo realizarse la caracterización genética de forma eficiente y a bajo costo.