

Comparación de regiones hipervariables del gen rRNA 16S para el estudio de la microbiota intestinal en acuicultura



B. Delgado-Martín^{1,2}, I. M. Cerezo^{1,2}, R. Bautista¹, S. T. Tapia-Paniagua²

¹Unidad de Bioinformática, Universidad de Málaga, Málaga, 29590 España

²Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Málaga, 29072 España

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Email: belendm@uma.es



I. Introducción y objetivo

La microbiota intestinal tiene un papel esencial en la fisiología de los peces y puede verse afectada por distintos factores como las dietas, el ambiente y su propia filogenia. Uno de los métodos más utilizados en los últimos años para el estudio de la diversidad de la microbiota es la secuenciación por amplicón de regiones hipervariables del gen de rRNA 16S, una técnica conocida como *metabarcoding*. El mantenimiento de la biodiversidad es crucial para que los animales se encuentren en un estado saludable y sean resistentes a la invasión e infección por parte de patógenos. Por ello, es importante poner a punto métodos para su estudio.

En este trabajo, se ha realizado un análisis bioinformático comparativo a partir de datos de secuenciación del gen rRNA 16S utilizando tres amplicones diferentes empleados habitualmente en metabarcoding (V1V3, V3V4 y V4V5), con el fin de determinar cuál es el protocolo más adecuado para el estudio de la microbiota intestinal usando como modelo dos especies de interés en acuicultura: *Solea senegalensis* (lenguado) y *Sparus aurata* (dorada).

II. Material y métodos

Las muestras intestinales proceden de cuatro ejemplares de dorada y cuatro de lenguado en estadio adulto. La secuenciación de DNA se llevó a cabo utilizando un equipo Illumina MiSeq™ (2x300 pb). Se utilizaron tres parejas de primers específicos para las distintas regiones hipervariables del gen de rRNA 16S estudiadas. El flujo de trabajo seguido se detalla en la figura 1. Para la asignación de las ASV, se utilizó la base de datos SILVA 138 NR 99.

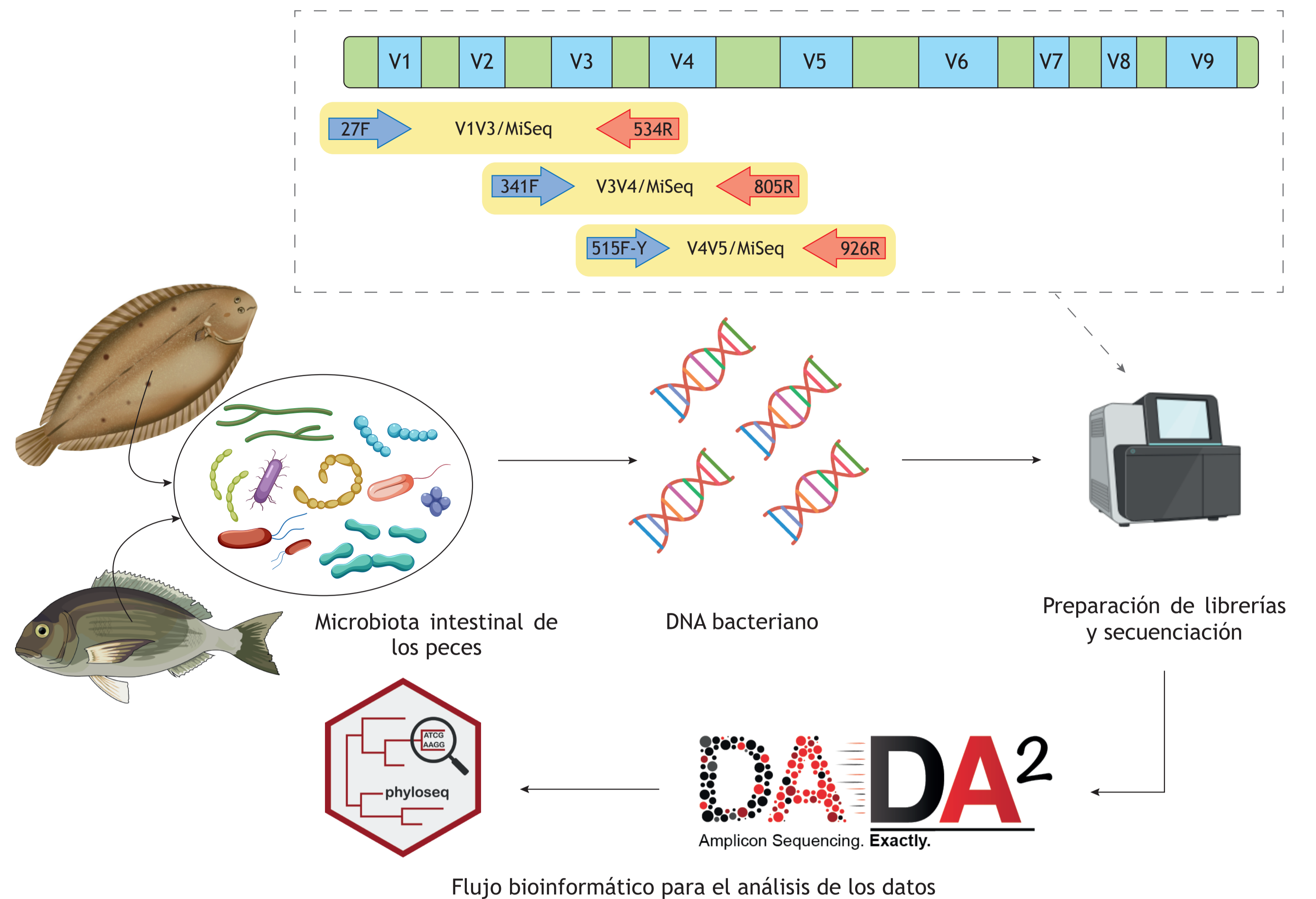


Figura 1. Metodología de trabajo. Se ha utilizado el mismo flujo bioinformático para el estudio de los tres amplicones.

III. Resultados

1. Diversidad alfa según índice de Shannon

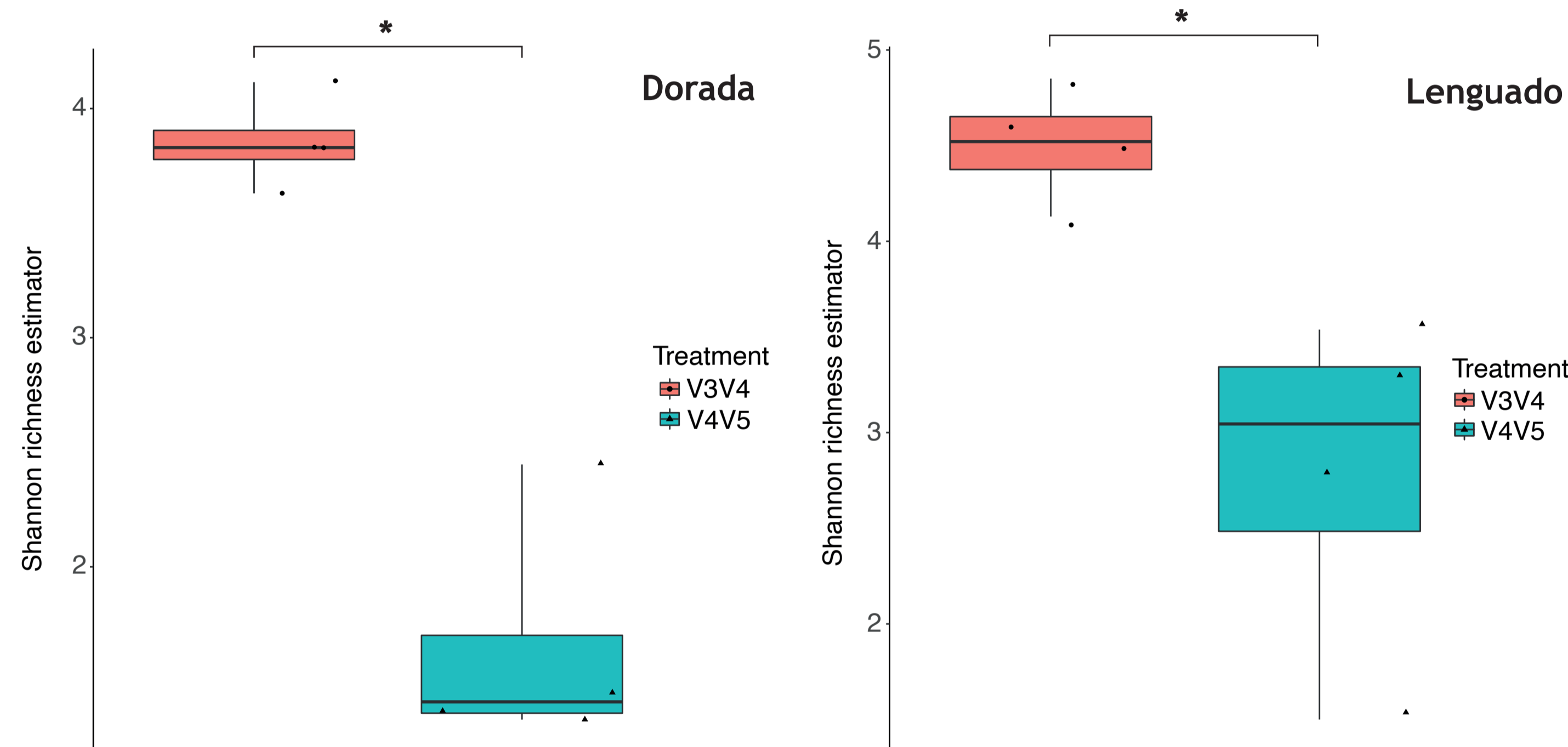


Figura 2. Índices de Shannon obtenidos por cada pez y amplicón. * indica diferencias significativas.

2. Identificación taxonómica según el amplicón

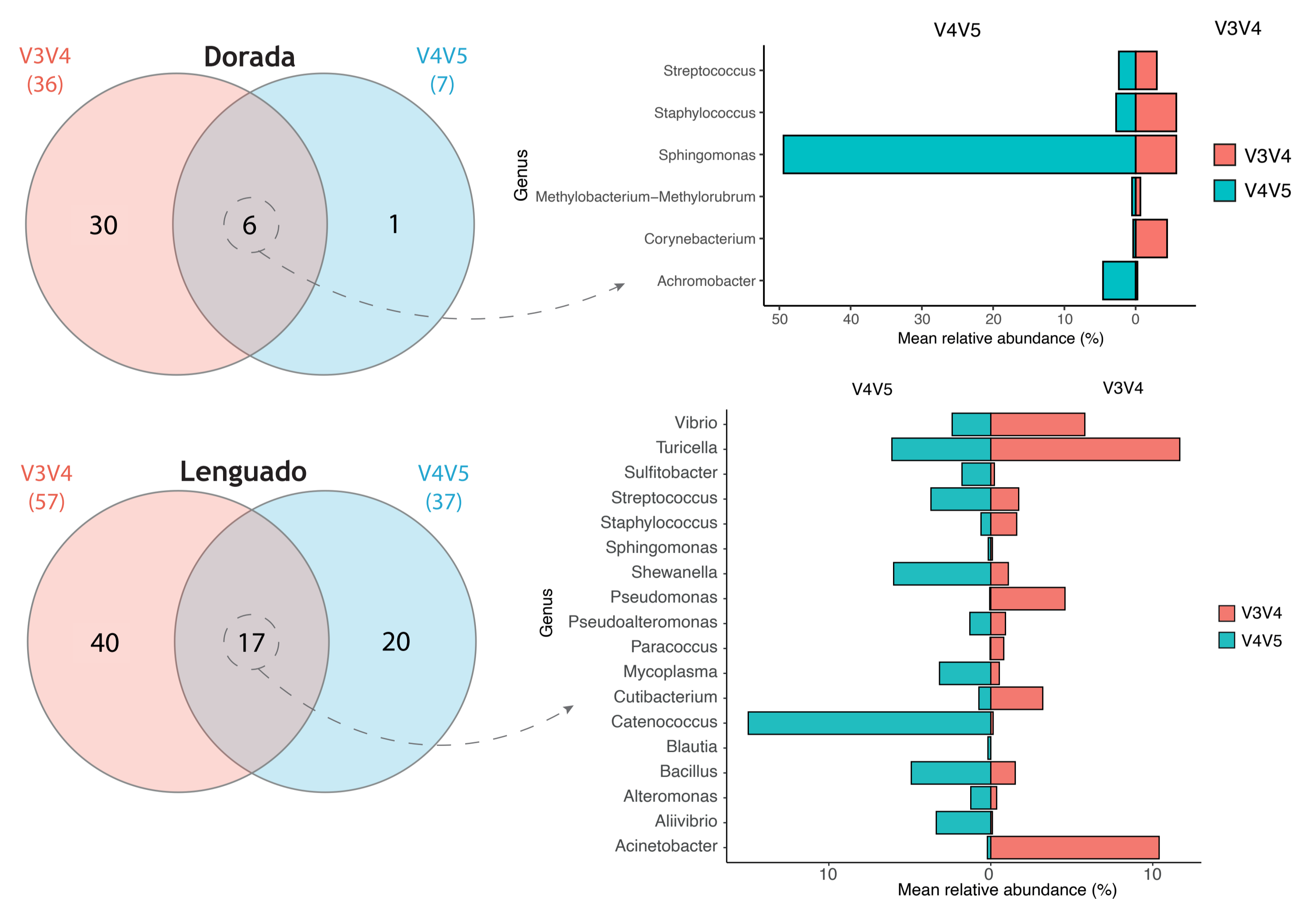


Figura 3. Diagramas de Venn del número de géneros identificados por pez y amplicón. Los diagramas de barras representan la abundancia relativa de los géneros comunes a los dos amplicones.

3. Abundancias relativas de los géneros identificados

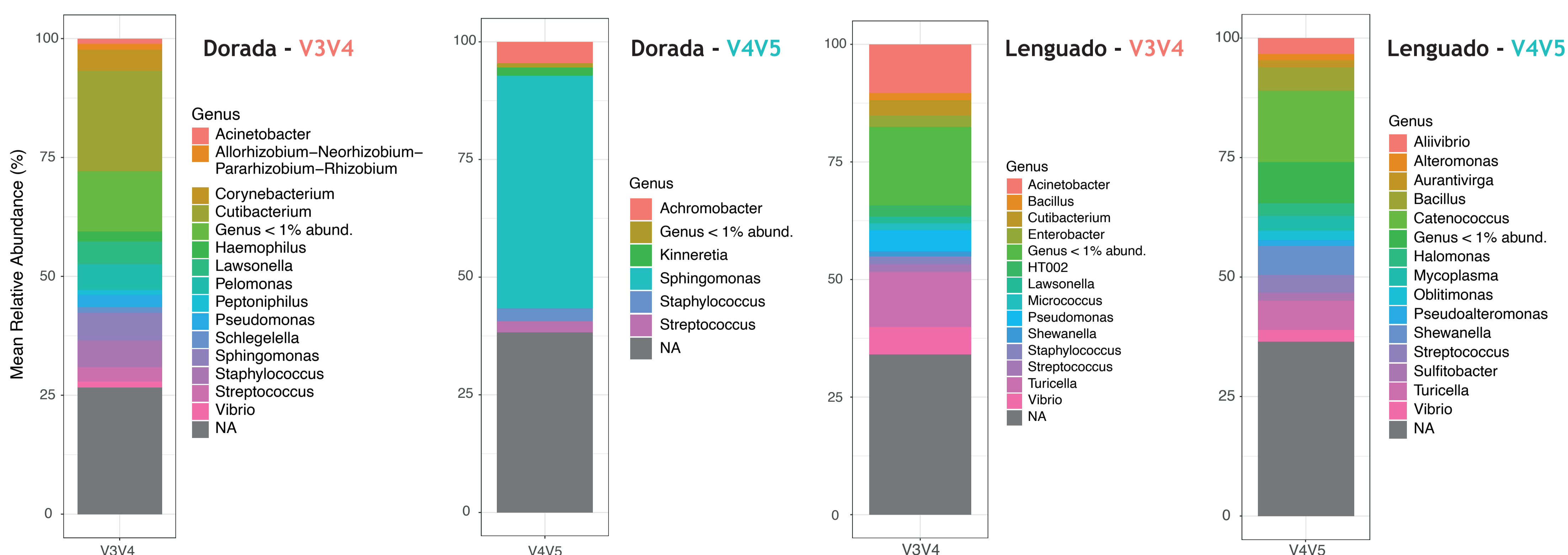


Figura 4. Abundancias relativas medias de los géneros identificados por pez y amplicón. "NA" representa los ASV no identificados. Los géneros con una abundancia menor al 1% se agrupan en la categoría "Genus < 1%".

El amplicón V1V3 no pudo reconstruirse en ninguna de las dos especies tras el filtrado de las lecturas por calidad debido a su elevado tamaño. La diversidad alfa obtenida fue significativamente mayor ($p < 0,05$; t-Student) con el amplicón V3V4 en las dos especies (figura 2). Los análisis taxonómicos muestran que el amplicón V3V4 identifica un mayor número de géneros únicos que el V4V5 y, además, la proporción en la que se identifican los géneros comunes difiere de un amplicón a otro (figura 3). La proporción de ASV sin identificar ("NA") es menor al usar V3V4 en el caso de la dorada y parecida en el caso del lenguado (figura 4). Además, el amplicón V3V4 identifica más géneros minoritarios ("Genus < 1%").

IV. Conclusiones

Los resultados de diversidad alfa y del estudio taxonómico muestran que el uso de V3V4 es más adecuado para el estudio de la microbiota intestinal de los peces que el de V1V3 o V4V5. Por tanto, es la región que debería emplearse para llevar a cabo estudios de biodiversidad intestinal mediante *metabarcoding* del gen rRNA 16S en peces cultivables.

Agradecimientos

Este proyecto se ha llevado a cabo gracias a la financiación obtenida a través de la convocatoria de ayudas a Proyectos de Investigación de Jóvenes Investigadores, CEIMAR 2019: "Evaluación de hidrolizados de *Nannochloropsis gaditana* para su uso en piensos de acabado de alto valor añadido en dorada de crianza (*Sparus aurata*) (NANZBREAM)". La secuenciación se ha realizado en el Servicio de Ultrasecuenciación de la Universidad de Málaga. Los recursos computacionales utilizados se encuentran alojados en el Centro de Supercomputación y Bioinnovación de la Universidad de Málaga.