



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA:

**“COMPARACIÓN DE LAS COMUNIDADES DE OOMICETOS Y
MICORRIZAS ARBUSCULARES DE LA RIZÓSFERA DE LOTES DE
CACAO (*Theobroma cacao* L.) CULTIVADO CON MANEJO ORGÁNICO
O CONVENCIONAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA
PARALELA EN LA CIUDAD DE QUEVEDO EN LA PROVINCIA DE LOS
RÍOS”**

AUTOR: HERNÁNDEZ ALDÁS, JOSÉ LUIS

DIRECTORA: DUCHICELA ESCOBAR, JESSICA IVONNE, Ph. D.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, ***“COMPARACIÓN DE LAS COMUNIDADES DE OOMICETOS Y MICORRIZAS ARBUSCULARES DE LA RIZÓSFERA DE LOTES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CULTIVADO CON MANEJO ORGÁNICO O CONVENCIONAL MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA PARALELA EN LA CIUDAD DE QUEVEDO EN LA PROVINCIA DE LOS RÍOS”*** fue realizado por el señor ***Hernández Aldás, José Luis*** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de junio de 2019

Firma:

Jessica Ivonne Duchicela Escobar, Ph. D.

C. C. 1710463835



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Hernández Aldás José Luis*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Comparación de las comunidades de oomicetos y micorrizas arbusculares de la rizósfera de lotes de cacao (Theobroma cacao L.) cultivado con manejo orgánico o convencional mediante secuenciación masiva paralela en la ciudad de Quevedo en la provincia de Los Ríos”* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí 19 de junio de 2019

Firma:



José Luis Hernández Aldás

C.C. 1717601965



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Hernández Aldás José Luis*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *“Comparación de las comunidades de oomicetos y micorrizas arbusculares de la rizósfera de lotes de cacao (Theobroma cacao L.) cultivado con manejo orgánico o convencional mediante secuenciación masiva paralela en la ciudad de Quevedo en la provincia de Los Ríos”* en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de junio de 2019

Firma:

José Luis Hernández Aldás

C.C. 1717601965

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, juntos han sabido guiarme y darme la mejor herencia que alguien puede dar, un buen ejemplo. Aprendí de ellos que el trabajo duro, la constancia y dedicación siempre generan buenos frutos, ellos siempre han estado junto a mí para ayudarme a cumplir cada una de mis metas, su apoyo incondicional y constante me ha permitido llegar a este momento. El camino es largo y cada vez debo aprender a ser más independiente sin embargo saber que ellos me guían y celebran cada logro es la mejor motivación para seguir adelante, cada meta y peldaño que escale siempre será dedicado a ellos.

A mi hermana, quien también ha sido un ejemplo de perseverancia y madurez, compartimos estos últimos años el paso por la vida universitaria y ha sido muy gratificante poder completarla hombro a hombro y cada uno a su ritmo.

A mis amigas y amigos con quienes pude vivir esta etapa en la universidad, a ellas por acompañarme en las buenas y en las malas, por compartir risas, preocupaciones y todo lo que implica la Ingeniería en Biotecnología.

José Luis

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por todo el apoyo brindado a lo largo de estos años, siempre han estado ahí ayudándome económica como moralmente, siempre con un consejo o con una palabra de ánimo, les agradezco porque con su entrega he podido llegar a este momento.

A la Doctora Jessica Duchicela por permitirme participar en el proyecto del cual se originó mi trabajo de titulación, gracias por toda la ayuda brindada a lo largo de este tiempo y por compartir todo su conocimiento conmigo, gracias por contagiar su pasión y entrega a la ciencia y por despertar de nuevo en mí esa curiosidad y entusiasmo por la investigación.

A Camille Delavaux por haber colaborado con la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y por ser el medio por el cual se financió el proyecto, gracias por ser un ejemplo de compromiso y puntualidad, por estar siempre pendiente de mi trabajo, gracias por compartir su conocimiento y visión para poder usar la investigación a favor de la naturaleza y el medio ambiente.

Al Doctor Francisco Flores, quien a pesar de tener muchas obligaciones y compromisos supo darle al proyecto y a mí las recomendaciones puntuales y el apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, gracias por estar comprometido con el desarrollo de sus estudiantes y por ser un ejemplo de ayuda y colaboración.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) – estación Pichilingue, en especial al Ingeniero Wellington Durango por la ayuda brindada para el reconocimiento de las fincas cacaoteras en la ciudad de Quevedo, de igual manera agradezco a los dueños de las fincas quienes estuvieron dispuestos a colaborar y me permitieron recolectar muestras en sus propiedades.

Al Laboratorio de Microbiología y en especial a Almita Koch por su entregada labor como docente y por ser siempre esa mano amiga que está dispuesta a ayudar a sus estudiantes.

Al Grupo de Investigación en Microbiología y Ambiente, por permitirme usar algunos de sus equipos para la culminación de mi proyecto.

A la Universidad de Kansas, en especial al Departamento de Ecología y Biología Evolutiva, por haberme ayudado con la parte crucial de mi trabajo y por el soporte técnico brindado.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en especial a la Doctora Karina Proaño por la ayuda brindada en cuanto a préstamo de ciertos equipos que me permitieron completar procesos durante el desarrollo de la parte práctica de mi proyecto.

A mi compañera María José Llamuca, por haber estado junto a mi luchando hombro con hombro durante la realización de este trabajo, gracias por compartir su manera de ver la vida y por enseñarme a ser paciente, gracias por ser un apoyo cuando sentía que todo se iba a desmoronar y sobre todo gracias por todas esas charlas de almuerzo en las que entre risas filosofábamos sobre la vida ... gracias por compartir su luz.

José Luis

INDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
 CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema	2
1.3. Objetivos de la investigación	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
 CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	7
2.1. Historia y generalidades del Cacao	7
2.1.1. Cacao en Ecuador	8
2.2. Sistemas agrícolas de manejo	9
2.2.1. Sistemas agrícolas en el cultivo de cacao	9
2.2.2. Manejo Convencional	10
2.2.3. Manejo Orgánico	10

2.2.4.	Efectos de los sistemas de manejo sobre las comunidades microbianas del suelo..	10
2.2.5.	Efecto de los sistemas de manejo sobre la microbiota del suelo de cultivos de cacao	11
2.3.	Microorganismos asociados a la rizósfera del cacao	11
2.3.1.	Oomicetos	12
2.3.2.	Micorrizas	12
2.4.	Hipótesis	12

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS..... 14

3.1.	Zona de estudio	14
3.1.1.	Obtención de las muestras de suelo:	14
3.1.2.	Trabajo de laboratorio:.....	15
3.2.	Procedimientos.....	15
3.2.1.	Muestreo de rizósfera.....	15
3.2.2.	Identificación de oomicetos y micorrizas por técnicas moleculares.....	16
3.2.2.1.	Extracción de ADN de suelo.	17
3.2.2.2.	Extracción de ADN de raíces	17
3.2.3.	Amplificación de ADN y secuenciación.....	17
3.2.4.	Procesamiento Bioinformático.....	18
3.2.4.1.	Preprocesamiento y control de calidad.....	19
3.2.4.2.	Agrupamiento en unidades taxonómicas operacionales.....	19
3.2.4.3.	Asignación taxonómica	20
3.2.4.4.	Filtrado de secuencias y normalización.....	21
3.2.5.	Estimación de medidas de diversidad basados en secuencias	21
3.2.6.	Análisis estadístico.....	22
3.2.6.1.	Diseño experimental.....	22

3.2.6.2. Análisis	22
-------------------------	----

CAPÍTULO IV

RESULTADOS.....	24
------------------------	-----------

4.1. Muestras y organismos amplificados.....	24
--	----

4.2. Análisis de diversidad y abundancia para oomicetos.	25
---	----

4.2.1. Asignación taxonómica de OTUs	25
--	----

4.2.2. Riqueza e índices de diversidad alfa basados en secuencias.	27
---	----

4.2.3. Comparación de los indicadores de diversidad para los dos tipos de manejo	28
--	----

4.2.4. Análisis permutacional multivariado de varianza.....	30
---	----

4.2.5. Abundancia diferencial	32
-------------------------------------	----

4.3. Análisis de diversidad y abundancia para micorrizas arbusculares.	35
---	----

4.3.1. Asignación taxonómica de OTUs	35
--	----

4.3.2. Riqueza e índices de diversidad alfa basados en secuencias.....	37
--	----

4.3.3. Comparación de los indicadores de diversidad para los tipos de manejo.....	38
---	----

4.3.4. Análisis permutacional multivariado de varianza.....	40
---	----

4.3.5. Abundancia diferencial	43
-------------------------------------	----

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN.....	46
-----------------------	-----------

5.1. Muestras y organismos	46
----------------------------------	----

5.2. Análisis de diversidad y abundancia de oomicetos.....	47
--	----

5.2.1. Asignación taxonómica.....	47
-----------------------------------	----

5.2.2. Riqueza e índices de diversidad.....	47
---	----

5.2.3. Análisis permutacional multivariado de varianza.....	48
---	----

5.2.4. Abundancia diferencial	49
-------------------------------------	----

5.3. Diversidad y abundancia de micorrizas	50
--	----

5.3.1. Asignación taxonómica	50
------------------------------------	----

5.3.2. Riqueza e índices de diversidad.....	51
---	----

5.3.3. Análisis permutacional multivariado de varianza	52
--	----

5.3.4. Abundancia diferencial 53

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES 54

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES 56

CAPÍTULO VIII
BIBLIOGRAFÍA 57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Descripción general de las Fincas/Lotes de Cacao estudiados</i>	14
Tabla 2 <i>Datos del análisis de suelo para cada sitio</i>	16
Tabla 3 <i>Resultados de la prueba t de student para características físico química del suelo</i>	24
Tabla 4 <i>Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de Oomicetos presentes en suelo</i>	27
Tabla 5 <i>Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de Oomicetos presentes en raíz</i>	28
Tabla 6 <i>Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de oomicetos en suelo</i>	29
Tabla 7 <i>Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad</i>	29
Tabla 8 <i>PERMANOVA para la composición de la comunidad de oomicetos de suelo</i>	31
Tabla 9 <i>Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de micorrizas arbusculares presentes en suelo</i>	37
Tabla 10 <i>Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de Micorrizas arbusculares presentes en raíz</i>	37
Tabla 11 <i>Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de micorrizas arbusculares en suelo</i>	38
Tabla 12 <i>Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de micorrizas arbusculares en raíz</i>	38
Tabla 13 <i>Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad - suelo</i>	39

Tabla 14 <i>Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad - raíz.....</i>	39
Tabla 15 <i>PERMANOVA para la composición de la comunidad de micorrizas en suelo</i>	40
Tabla 16 <i>PERMANOVA para la composición de la comunidad de micorrizas en raíz</i>	42

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> Diagrama de cajas para la concentración de Potasio.	25
<i>Figura 2</i> Diagramas de Venn para OTUs de oomicetos presentes en muestras de suelo.	26
<i>Figura 3</i> Gráfico de medias de los parámetros de diversidad para oomicetos en suelo.	30
<i>Figura 4</i> Abundancia diferencial de OTUs de oomicetos en suelo – BLAST.	32
<i>Figura 5</i> Abundancia diferencial significativa de OTUs de oomicetos en suelo - BLAST.	33
<i>Figura 6</i> Abundancia diferencial de OTUs de oomicetos en suelo - Árbol filogenético.	34
<i>Figura 7</i> Abundancia diferencial significativa de OTUs de oomicetos en suelo – Árbol filogenético.	35
<i>Figura 8</i> Diagrama de Venn para OTUS de micorrizas presentes en muestras de suelo.	36
<i>Figura 9</i> Diagrama de Venn para OTUS de micorrizas presentes en muestras de raíz.	36
<i>Figura 10</i> Gráfico de medias para los parámetros de diversidad de micorrizas en suelo.	39
<i>Figura 11</i> Gráfico de medias para los parámetros de diversidad de micorrizas en raíz.	40
<i>Figura 12</i> Abundancia diferencial de OTUs de micorrizas en suelo.	43
<i>Figura 13</i> Abundancia diferencial significativa de OTUs de micorrizas en muestras de suelo.	44
<i>Figura 14</i> Abundancia diferencial de OTUs de micorrizas en raíz.	44
<i>Figura 15</i> Abundancia diferencial significativa de OTUS de micorrizas en muestras de raíz.	45

RESUMEN

La seguridad alimentaria se ve amenazada debido al crecimiento poblacional, disponibilidad de suelos de cultivo y el uso indiscriminado de sustancias químicas en los sistemas agrícolas de manejo convencional, por lo que existe una creciente necesidad de implementar sistemas más sustentables, entre estos el sistema de manejo orgánico se perfila como un sistema que puede mejorar la productividad agrícola sin afectar al medioambiente. Muchas investigaciones han mejorado el entendimiento de la diversidad y dinámica de las comunidades microbianas en suelos de cultivo y avances como la extracción y cuantificación del ADN del suelo y la secuenciación masiva paralela han permitido obtener una imagen más completa de estas comunidades las cuales poseen distintos patrones de diversidad que han sido poco estudiados por lo que es necesario expandir la teoría sobre la diversidad en estos ecosistemas. El presente estudio plantea la posibilidad de utilizar este enfoque molecular para entender la diversidad de microorganismos presentes en el suelo de cultivos de cacao y a su vez compararla en los sistemas de manejo orgánico y convencional. La secuenciación masiva paralela de amplicones permitió obtener unidades taxonómicas operacionales para oomicetos y micorrizas, se diseñó un proceso de pipeline para cada grupo taxonómico de interés lo cual permitió la visualización y comparación de la estructura de las comunidades de oomicetos y micorrizas, se estimaron los índices de Simpson y Shannon, aun cuando no se reportaron diferencias significativas con estos indicadores fue posible evidenciar distintos patrones de diversidad y riqueza para cada grupo taxonómico estudiado.

PALABRAS CLAVE:

- **OOMICETOS**
- **MICORRIZAS**
- **DIVERSIDAD**
- **CACAO**
- **SECUENCIACIÓN**

ABSTRACT

Food security is threatened due to population growth, availability of cultivation soils and the indiscriminate use of chemical substances in conventionally managed agricultural systems, there is a growing need to implement more sustainable systems, among them, organic management is emerging as a system that can improve agricultural productivity without affecting the environment. Research has enhanced our understanding of the diversity and dynamics of the microbial communities in agricultural soil and advances like the extraction and quantification of DNA isolated from soil and massive parallel sequencing has allowed us to obtain a broad picture of these communities which have different patterns of diversity that have been poorly studied. It is necessary to expand the theory on diversity in these ecosystems. The present study raises the possibility of using this molecular approach to understand the diversity of microorganisms present in the soil of cocoa crops and compare them in organic and conventional management systems. Massive parallel sequencing of amplicons allowed us to obtain operational taxonomic units for oomycetes and mycorrhizae, a pipeline process was designed for each type of taxonomic group and it allowed us to visualize and compare the structure of the communities of oomycetes and mycorrhizae. Simpson and Shannon indexes reported no significant differences, but it was possible to evidence different patterns of diversity and richness for each taxonomic group studied.

KEY WORDS:

- **OOMYCETES**
- **MYCORRHIZAE**
- **DIVERSITY**
- **COCOA**
- **SEQUENCING**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

La seguridad alimentaria se ve amenazada debido al crecimiento poblacional, disponibilidad de suelos de cultivo y el uso indiscriminado de sustancias químicas en los sistemas agrícolas de manejo convencional, por lo que existe una creciente necesidad de implementar sistemas más sustentables (Velivelli et al., 2015). Entre las posibles acciones que se pueden acoger para mejorar la productividad agrícola sin afectar al medioambiente se menciona la adopción de alguno de los siguientes sistemas de manejo: agroecología, biodinámica, manejo orgánico, agricultura de precisión y agricultura de la conservación (Buckwell et al., 2014).

La crisis en los sistemas agrícolas de manejo convencional se originó debido a tres razones principales: el incremento en los costos de producción, la preocupación sobre la calidad de los alimentos y los visibles efectos ambientales (Morgan & Murdoch, 2000). Es por eso que los sistemas agrícolas de manejo orgánico se han vuelto nuevamente una opción ya que son más rentables y amigables con el ambiente, producen alimentos más o igualmente nutritivos que contienen menos o ningún residuo de pesticidas comparados con los sistemas de manejo convencional, además reciente evidencia sugiere que los sistemas con manejo agrícola orgánico proveen grandes beneficios al ecosistema y a la sociedad (Reganold & Wachter, 2016).

Entender el funcionamiento de los ecosistemas agrícolas es la clave para determinar un sistema efectivo. A pesar de que el rendimiento en los cultivos con manejo orgánico suele ser menor, el uso de fertilizantes, pesticidas y la energía que se necesita también son reducidos lo que mejora la

rentabilidad; los cultivos orgánicos se caracterizan por una mejor fertilidad y diversidad en el suelo, de esta manera se puede volver a estos sistemas menos dependientes de agroquímicos y pesticidas (Mäder et al., 2008), los mecanismos que controlan la diversidad de las plantas aún se encuentran en debate sin embargo se sabe que las interacciones microbianas pueden dirigir ciertas funciones de un ecosistema tales como: diversidad, productividad y variabilidad (Van Der Heijden et al., 1998).

Conocer la composición o diversidad de microorganismos presentes en el suelo ha sido un reto enorme debido a limitaciones metodológicas y técnicas (Kirk et al., 2004), el presente trabajo plantea la posibilidad de analizar dicha composición mediante el uso de técnicas moleculares para tener un mejor entendimiento de las comunidades microbianas presentes en la rizósfera del cacao (*Theobroma Cacao L.*) un cultivo de interés agrícola.

Tradicionalmente se pensaba que el cacao (*Theobroma cacao L.*) había sido domesticado por primera vez en Mesoamérica, sin embargo, reciente investigación genómica señala que la mayor diversidad de *Theobroma cacao* se encuentra en la región superior del Amazonas al noroeste de Sudamérica lo que indicaría que esta región es el centro de su origen (Zarrillo et al., 2018). El cacao es cultivado en su mayoría por productores a pequeña escala, sin embargo las enfermedades fúngicas o virales, la pérdida de la fertilidad en el suelo y los problemas socioeconómicos hacen que la producción de cacao se vuelva insostenible (Rice & Greenberg, 2000).

1.2. Justificación del problema

La reducción en el uso de fertilizantes sintéticos y pesticidas busca mejorar la producción agrícola sustentable y la protección del medio ambiente, más allá del rol integral que cumple la

microbiota en la producción agrícola, existe una necesidad para entender la compleja respuesta de la diversidad de microorganismos a los sistemas agrícolas convencionales y orgánicos (Hartmann, et al., 2015).

Las comunidades microbianas son instrumentos fundamentales en procesos que impulsan la estabilidad y productividad de los ecosistemas agrícolas, muchas investigaciones han mejorado el entendimiento de la diversidad y dinámica de estas comunidades, señalando la importancia de estos componentes de la microbiota y sus contribuciones benéficas y roles cooperativos en la productividad agrícola ya que aportan a la nutrición de las plantas, la salud, la estructura y fertilidad del suelo (Kirk et al., 2004; Singh, Pandey, & Singh, 2011).

Las comunidades microbianas de los suelos agrícolas con manejo orgánico son más ricas, más diversas y tienen una estructura diferente si se las compara con suelos bajo un manejo agrícola convencional (Liu et al., 2007), sin embargo existe una necesidad de entender cómo se dan estos cambios estructurales a nivel de microbiota con el afán de mejorar las estrategias de producción y protección de los cultivos (Hartmann et al., 2015).

Es aquí donde la ecología microbiana cumple un papel fundamental ya que nos permite entender todos estos fenómenos y las posibles interacciones entre los microorganismos y su entorno (Hernández et al., 2014); se ha descrito a la metagenómica y específicamente a la metagenómica de amplicones para poder evaluar a toda la comunidad microbiana sin la necesidad de aislar, cultivar y observar dichos organismos, éste análisis permite comprender de una mejor manera la ecología e interacciones de cualquier nicho ambiental y a su vez nos permite desarrollar mejores métodos para detectar enfermedades en cultivos y nuevas prácticas agrícolas que tomen ventaja de las alianzas naturales entre microorganismos y plantas (Jurkowski & Reid, 2007).

La diversidad alfa de las comunidades microbianas se ve afectada por muchos factores bióticos y abióticos, este efecto se ve reflejado en el funcionamiento de los ecosistemas, estos patrones de diversidad en las comunidades microbianas asociadas a distintos cultivos ha sido poco estudiado y el uso de las teorías generales de ecología sobre estos ecosistemas no ha sido completamente probada, es necesario expandir la teoría sobre la diversidad en estos ecosistemas ya que es una medida citada frecuentemente (Reese & Dunn, 2018)

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los más importantes en el Ecuador. Entre el 40 y el 60% de la producción se encuentra en las provincias de Guayas y los Ríos. Según el INEC (2017), existen 573 516 hectáreas plantadas de cacao con una producción de 205 995 toneladas métricas por año.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es cultivado a través de diferentes sistemas que varían en complejidad, los productores deben decidir si obtienen altos rendimientos a mediano plazo en monocultivos o un mayor rendimiento total y sustentable a largo plazo en sistemas agroforestales, además existe la creciente necesidad de crear estrategias para un manejo agrícola adecuado (Schneider et al., 2017).

Algunos de los estudios realizados respecto a microorganismos del suelo de plantaciones de cacao se enfocan en contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por tipo de microorganismo (Freile, et al., 2018) o en el aislamiento e identificación de grupos funcionales de microorganismos (Leiva et al., 2015) pero la resolución y cantidad de organismos identificados suele ser muy reducida debido a dos razones principales: más del 90% de microorganismos no pueden ser cultivados en los medios existentes y el suelo es una matriz heterogénea pero estructurada que obstaculiza el acceso a su componente biótico, por lo que solo es posible tener una visión algo distorsionada de la verdadera biodiversidad del suelo (Lemanceau et al., 2014).

Avances como la extracción y cuantificación del ADN del suelo y el análisis de polimorfismos han permitido superar una de estas dificultades, ahora es posible obtener una imagen más completa de las comunidades microbianas presentes en los suelos (Hart et al., 2015).

Es por eso que el presente estudio plantea la posibilidad de utilizar este enfoque molecular para estudiar la diversidad de dos grupos taxonómicos presentes en el suelo de cultivos de Cacao y a su vez compararla en los sistemas de manejo orgánico y convencional con el objetivo de obtener futuras recomendaciones para el desarrollo de una agricultura sostenible junto con un mejor entendimiento del microbioma presente en este cultivo de interés.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Comparar las comunidades de oomicetos y micorrizas arbusculares de la rizósfera de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivado con manejo orgánico o convencional.

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener datos de secuenciación masiva paralela para las regiones ITS (oomicetos) y LSU (micorrizas) de la rizosfera de lotes de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivados con manejo orgánico o convencional
- Generar un proceso de análisis (*pipeline*) para las secuencias obtenidas mediante el uso de herramientas bioinformáticas

- Visualizar y comparar la estructura de las comunidades microbianas de oomicetos y micorrizas en la rizósfera de cacao cultivado con manejo orgánico o convencional
- Estimar los índices de diversidad de Shannon y Simpson, para determinar diferencias entre las comunidades de oomicetos y micorrizas arbusculares.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Historia y generalidades del Cacao

Para muchas culturas precolombinas las semillas de cacao y sus comestibles eran parte de sus rituales y jugaban un rol central en sus creencias y sus sistemas económicos, siendo componente importante de sus bebidas, comidas, cremas tópicas y un ingrediente en su medicina (McNeil, 2006).

La historia de su domesticación inicial, primeros usos y su eventual distribución en toda América es algo incierta, durante mucho tiempo la investigación arqueológica, etnohistórica e iconográfica sugería que los primeros usos del cacao se originaron en América central y Mesoamérica hace aproximadamente 3900 años calibrados antes del presente (a cal. AP) (Motamayor et al., 2002), la evidencia genómica reciente muestra que la mayor diversidad genética de esta planta ocurre en los bosques húmedos de la región superior del Amazonas sugiriendo que el uso y la domesticación inicial se originó en esta región conocida como Santa Ana -La Florida hace 5300 a cal. AP (Zarrillo et al., 2018).

Theobroma cacao es un árbol pequeño del sotobosque que produce vainas que contienen entre 25 y 40 semillas cada una, la altura promedio del árbol domesticado es de cuatro a siete metros aunque las poblaciones silvestres pueden ser mucho más altas (McNeil, 2006).

Theobroma cacao exhibe una gran variabilidad en la forma de sus frutos y ciertas características florales lo que ha llevado a los botánicos a separarlo en tres subespecies: Criollo, forastero y trinitario (Amores et al., 2009; McNeil, 2006); sin embargo, estudios moleculares confirman la gran diversidad genética de esta especie sugiriendo una clasificación más amplia que

incluye diez grupos principales: Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelanado, Purús, Guiana y Nacional (Motamayor et al., 2008).

2.1.1. Cacao en Ecuador

El cacao es considerado uno de los productos más habituales del Ecuador, la actividad cacaotera en la región Costa se data casi 400 años atrás, en tanto que en la Amazonía empezó a desarrollarse un cuarto de siglo atrás, esto originó que el 90% de la superficie cultivada se encuentre en la Costa, en su mayor parte sembrada con la variedad conocida como Nacional. La variedad Nacional es parte de un complejo llamado Nacional x Trinitario, existen algunos híbridos pero la variedad Nacional completamente pura ahora es casi inexistente (Amores et al., 2009). Entre las condiciones agroecológicas necesarias para el desarrollo del cacao se pueden detallar las siguientes: (INIAP, 2014).

Altitud: 15 a 800 msnm

Temperatura: 24 a 25 ° C

Precipitación: 1500 a 3000 mm

Suelo: Fértiles, profundos y francos

pH: 6.0 a 7.0

Ecuador se caracteriza por producir cacao fino de aroma el cual tiene una alta demanda en los mercados internacionales, los bajos rendimientos de producción de esta variedad orillan a los agricultores a optar por otras variedades más rentables (Sánchez et al., 2014). La producción de Cacao en el país se encuentra distribuida en las Provincias de Guayas, Los Ríos, Esmeraldas, Manabí, El Oro, Santo Domingo, Santa Elena, Bolívar, Cañar, Chimborazo, Azuay, Pichincha,

Loja, Imbabura, Orellana, Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago y Sucumbios (INIAP, 2014)

Existe un creciente interés en el sector cacaotero por el desarrollo de nuevas tecnologías de expansión y cultivo ya que su importancia como generador de ingresos ha aumentado en los últimos años (Amores et al., 2009)

2.2.Sistemas agrícolas de manejo

2.2.1. Sistemas agrícolas en el cultivo de cacao

Theobroma cacao L. es producido en sistemas que varían en su complejidad, desde monocultivo hasta sistemas agroforestales muy diversos, con el uso de agroquímicos los sistemas de monocultivo permiten tener altos rendimientos de producción que decaen luego de 15 a 20 años debido al gran estrés fisiológico, epidemias y enfermedades, así como el desgaste de la fertilidad del suelo. Los sistemas agroforestales tienen un gran potencial ecológico y social debido a que se pueden cultivar una mayor diversidad de productos que aseguran un sustento para el agricultor y contribuyen a una producción estable y sustentable de cacao a largo plazo (Schneider et al., 2017).

La diversificación y el mejoramiento de la diversidad están alineadas con los principios de un manejo orgánico certificado, este enfoque es prometedor para una producción de cacao sustentable a futuro ya que incentiva al mantenimiento de un dosel de sombra parmente y va de la mano con la creciente demanda de chocolate orgánico certificado, sin embargo la producción con estas características solo representa un 2.5% del total de la producción de cacao a nivel mundial (Schneider et al., 2017)

2.2.2. Manejo Convencional

El manejo agrícola convencional se caracteriza por el uso de agroquímicos para la eliminación de plagas y malezas, para proveer de nutrientes a los suelos de los cultivos y por el uso intenso de recursos (Charvet, 2012). La creciente importancia de los herbicidas y pesticidas en la producción de cultivos cambió las prácticas en la agricultura de manera considerable debido a las constantes innovaciones tecnológicas que permiten mejorar la productividad por hectárea. Este beneficio es el que permitió que esta forma de manejo se vuelva la más utilizada (Morgan & Murdoch, 2000)

2.2.3. Manejo Orgánico

Los sistemas agrícolas de manejo orgánico se definen como la visión holística de la agricultura que trata de reflejar la profunda relación entre la microbiota del suelo y la producción con todo el medio ambiente (Pacini, 2003)

Las prácticas orgánicas certificadas son aquellas que coexisten con los sistemas naturales, mejorando la fertilidad del suelo, minimizando la contaminación y daño al ambiente, así como el uso de recursos no renovables. Estas prácticas están enfocadas en proteger y mejorar el ambiente de las granjas y cultivos considerando el impacto social y económico que tienen los sistemas agrícolas (Morgan & Murdoch, 2000)

2.2.4. Efectos de los sistemas de manejo sobre las comunidades microbianas del suelo

Los suelos de cultivo bajo manejo orgánico o convencional albergan distintos microbiomas, el tipo de respuesta a cada manejo es muy complejo a pesar de ello el esquema de fertilización es el mayor determinante en la diversidad microbiana, se puede asumir también que las diferencias entre estos sistemas de manejo pueden ser más sustanciales dependiendo de la intensidad en el

manejo de plagas, el tipo de labranza y el conjunto de prácticas realizadas en un cultivo en particular. Actualmente la habilidad para observar cambios estructurales específicos al nivel unidades taxonómicas operacionales ofrece nuevas perspectivas en el potencial que tiene el manejo del microbioma del suelo para una producción agrícola sustentable y para la protección de los cultivos (Hartmann et al., 2015).

2.2.5. Efecto de los sistemas de manejo sobre la microbiota del suelo de cultivos de cacao

Los sistemas de manejo usados en la mayoría de plantaciones de cacao se enfocan en el uso de fertilizantes inorgánicos ya que de esta manera se busca incrementar la producción de este cultivo, pero se subestima el componente biológico del suelo. Una de las principales desventajas del uso de fertilizantes inorgánicos propios en el manejo convencional es el efecto negativo que tienen sobre la microbiota, reduciendo la biomasa microbiana y por ende la diversidad en este tipo de cultivos (Alfaro et. al, 2015; López et al., 2007).

Sistemas de manejo agroforestales, en los que el uso de fertilizantes inorgánicos es casi nulo, tiene un efecto positivo sobre la microbiota del suelo, incrementando el número de UFC (unidades formadoras de colonias) de bacterias, hongos y actinomicetos y por ende la diversidad (Silva et al., 2017)

2.3. Microorganismos asociados a la rizósfera del cacao

Es bien sabido que la diversidad de microorganismos en el suelo se ve afectada por el tipo de planta que se esté estudiando, la capacidad que tiene el cacao para adaptarse a condiciones adversas se ve afectada por los microorganismos que este tenga asociados con la rizósfera lo que

va a jugar un papel importante en la disponibilidad de nutrientes y a su vez en el desarrollo de la planta (Freile et al., 2018).

Anualmente se producen 3.7 millones de toneladas de Cacao a pesar de que existen enfermedades causadas por virus, hongos y oomicetos que son responsables de al menos un 30% de las pérdidas en los cultivos (Argout et al., 2011)

2.3.1. Oomicetos

Patógenos del género *Phytophthora* causan significantes pérdidas globales en la producción de cacao, *P. capsici* y *P. citrophthora* causan pudrición del fruto en América Central y Sur América, *P. palmivora* ataca a todas las partes del árbol de cacao, tiene un complejo ciclo de evolución de la enfermedad que involucra diferentes vías de inoculación y diseminación lo que resulta en epidemias explosivas en condiciones ambientales que favorezcan a su diseminación (Guest, 2007)

2.3.2. Micorrizas

Las micorrizas arbusculares forman asociaciones simbióticas con muchos de los cultivos económicamente importantes, mejorando su crecimiento en condiciones de baja fertilidad, le pueden dar tolerancia a ciertos patógenos y mejorar el balance de agua de las plantas así como contribuir a la formación y estructura del suelo, los cultivos de cacao no reducen la diversidad de micorrizas arbusculares en suelo luego de muchos años de cultivo constante (Cuenca & Meneses, 1996)

2.4. Hipótesis

Ho1: La riqueza y abundancia de oomicetos en los cultivos de cacao con manejo orgánico o convencional es diferente.

Ho2: La riqueza y abundancia de micorrizas en los cultivos de cacao con manejo orgánico o convencional es la misma

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zona de estudio

El proyecto se realizó en dos fases detalladas a continuación:

3.1.1. Obtención de las muestras de suelo:

Las muestras de suelo fueron obtenidas de fincas de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivado con manejo orgánico y convencional, ubicadas en la ciudad de Quevedo, cabecera cantonal del Cantón Quevedo en la provincia de Los Ríos, situada en la región Costa del Ecuador, se tomaron datos de la variedad cultivada, edad aproximada del cultivo y el historial del sitio; tres de las cuatro fincas tenían la variedad CCN51 y uno tenía la variedad Nacional; se detalla a continuación una descripción de los sitios de muestreo y las muestras utilizadas (Tabla 1).

Tabla 1

Descripción general de las Fincas/Lotes de Cacao estudiados

Manejo	Finca / Lote	Variedad	Edad aprox	Historial del sitio.	Muestra	Ubicación GPS
Orgánico	INIAP - Pichilingue	<i>Theobroma cacao</i> L.	40 años	Monocultivo	A	S 01° 05.427' W 79° 27.891'
					B	S 01° 05.722' W 79° 27.892'
					C	S 01° 05.736' W 79° 27.902'
	Finca Nancy	<i>Theobroma cacao</i> L. (CCN51)	~ 3 años	Monocultivo	D	S 00° 44.986' W 79° 29.793'
					E	S 00° 44.484' W 79° 29.804'
Convencional	Finca La Perlita	<i>Theobroma cacao</i> L. (CCN51)	~ 11 años	Fungicidas : Fosetil, aluminio, Ridomil	A	S 01° 06.711' W 79° 28.382'
					B	S 01° 06.707' W 79° 28.376'
					C	S 01° 06.702' W 79° 28.379'

CONTINUA →

Finca 4	<i>Theobroma cacao</i> L. (CCN51)	~ 4 años	Fertilizantes completos y abonos foliares	D	S 00° 44.855' W 79° 29.990'
				E	S 00° 44.853' W 79° 29.990'

3.1.2. Trabajo de laboratorio:

El proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del campus matriz de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, ubicado en Sangolquí con dirección: Autopista General Rumiñahui, cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, Ecuador y con coordenadas Latitud 0°18'46.9" (Sur) 78°26'42.7" (Oeste), altura Elipsoidal 2518.640 m.

Posteriormente las muestras de ADN fueron enviadas al Departamento de Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Kansas - EEUU para el procesamiento molecular y posterior secuenciación.

3.2. Procedimientos

3.2.1. Muestreo de rizósfera

El proceso de muestreo fue aleatorio simple, se recolectaron cinco muestras de suelo y raíces de 5 individuos por cada finca de cacao, la hojarasca fue removida justo antes de extraer la muestra y se recolectaron 500 g de suelo de los primeros 10-15 cm (Hart et al., 2015), de cada planta de cacao se recolectaron muestras de las raíces superficiales, se utilizó etanol al 70 % sobre los utensilios de muestreo para evitar la contaminación cruzada. Todo fue etiquetado, almacenado y transportado en una nevera portátil, se recolectó además una muestra compuesta en cada sitio, las cuales fueron enviadas al Laboratorio de suelos, foliares y aguas de Agrocalidad para el análisis

de las características físicas y químicas tales como: pH, materia orgánica, contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc (Andrango, Cueva, Viera, & Duchicela, 2016). Los resultados de la caracterización físico química de cada sitio se detallan a continuación (Tabla 2).

Tabla 2
Datos del análisis de suelo para cada sitio

<i>Parámetro</i>	<i>Método</i>	<i>Orgánico</i>		<i>Convencional</i>	
		<i>INIAP – Pichilingue</i>	<i>Finca Nancy</i>	<i>Finca La Perlita</i>	<i>Finca 4</i>
<i>pH</i>	<i>Electrométrico (PEE/SFA/06)</i>	6.91	6.82	6.74	7.28
<i>M.Org [%]</i>	<i>Volumétrico (PEE/SFA/09)</i>	6.06	6.31	6.02	5.55
<i>N [%]</i>	<i>Volumétrico (PEE/SFA/09)</i>	0.3	0.32	0.3	0.28
<i>P [mg/Kg]</i>	<i>Colorimétrico (PEE/SFA/11)</i>	52.5	54.8	65.9	83.4
<i>K [cmol/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/12)</i>	0.95	0.91	0.7	0.74
<i>Ca [cmol/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/12)</i>	17.06	15.82	16.32	20.09
<i>Mg [cmol/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/12)</i>	1.66	1.82	1.47	1.27
<i>Fe [mg/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/13)</i>	162.6	99.4	143.8	70.2
<i>Mn [mg/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/13)</i>	18.36	18.89	16.79	11.98
<i>Cu [mg/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/13)</i>	27.45	4.28	6.57	5.01
<i>Zn [mg/Kg]</i>	<i>Absorción atómica (PEE/SFA/13)</i>	25.07	14.9	17.28	15.69

3.2.2. Identificación de oomicetos y micorrizas por técnicas moleculares

De todas las muestras recolectadas (N = 20) se eligieron al azar un total de 5 muestras por tipo de manejo (n=10). Tres pertenecientes a INIAP- Pichilingue, dos de Finca Nancy; tres de Finca La Perlita y dos de Finca 4.

3.2.2.1.Extracción de ADN de suelo.

Luego del transporte y almacenaje se procedió a extraer ADN del suelo de cinco muestras por cada tipo de manejo, se utilizó el Kit PowerSoil® de QIAGEN siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.2.2.Extracción de ADN de raíces

Se tomaron cinco muestras de raíces por cada tipo de manejo, las cuales fueron procesadas con nitrógeno líquido para la disrupción celular y se utilizó el Kit PowerSoil® de QIAGEN para purificar el ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante; fue necesario realizar una doble extracción y un proceso de concentración para obtener cantidades suficientes de ADN.

3.2.3. Amplificación de ADN y secuenciación

El ADN de suelo y raíces se amplificó y secuenció en el Departamento de Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Kansas, como se describe a continuación:

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para oomicetos y micorrizas, los primers usados para oomicetos fueron ITS300 (Forward, AGTATGYTGTATCAGTG) e ITS4 (Reverse, TCCTCCGCTTATTGATATGC) desarrollados para ser específicos en la región ITS de oomicetos (Riit et al., 2016). La amplificación en PCR para micorrizas se realizó usando los primers LROR (Forward, ACCCGCTGAACTTAAGC) y FLR2 (Reverse, GTCGTTTAAAGCCATTACGTC) específicos de la región LSU de micorrizas arbusculares.

Las dos reacciones se llevaron a cabo usando 0.5 uL de los primers y 1uL de ADN extraído, ambas fueron realizadas en un termociclador Thermo Fisher scientific®.

La amplificación en PCR para oomicetos fue realizada utilizando una mezcla de reacción con 18uL de agua de PCR, 5 uL de HOT FirePol Blend Master mix (10 mMgCl₂) , se usó el programa recomendado por (Riit et al., 2016): 15 min a 95°C, 35 ciclos de (30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C) y un ciclo final de 10 min a 72 °C.

La amplificación en PCR para micorrizas se realizó utilizando una mezcla de reacción con 2uL de 10X PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 0.5uM de cada primer, 1U Taq polimerasa y 1 uL de ADN, se utilizó el programa recomendado por (Li, Li, Zhang, & Zhao, 2010): desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 30 ciclos de desnaturalización al 94°C por 1 min, hibridación de primers a 58°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, seguidos de una extensión final al 72°C por 10 min.

La preparación de librerías, así como la secuenciación de amplicones fueron realizadas usando el kit V3 de la plataforma Illumina Miseq, en la unidad de secuenciamiento de la Universidad de Kansas.

3.2.4. Procesamiento Bioinformático

El proceso de análisis de las secuencias se dividió en los siguientes pasos: Preprocesamiento y control de calidad, agrupamiento en unidades taxonómicas operaciones, asignación taxonómica y análisis; para el procesamiento de las secuencias se utilizó la plataforma QIIME 2 (Bolyen et al., 2018) con algunas modificaciones dependiendo el tipo de organismo. Los *pipelines* utilizados fueron desarrollados para el proyecto de Investigación de National Geographic titulado: Invasión de Plantas en las Galápagos mediada por microorganismos - WWW-036ER-17 y se detallan a continuación.

3.2.4.1.Preprocesamiento y control de calidad

Para oomicetos, se utilizaron las lecturas forward (R1) obtenidas del proceso de secuenciación (Riit et al., 2016). Para la eliminación de primers se utilizó la herramienta **cutadapt** con la secuencia del primer ITS300 (forward, GTATGYTGTATCAGTG); posteriormente se utilizó la herramienta **demux summarize** para decidir el tamaño de las secuencias a recortarse que fue de 260 bases; con la herramienta **dada2 denoise-single** se recortaron y se eliminaron las secuencias quiméricas.

Con respecto a micorrizas, para poder utilizar las lecturas R1(forward) y R2(reverse) fue necesario usar la función **cutadapt** presente para eliminar los primers LROR (*Forward*, ACCCGCTGAACTTAAGC) y FLR2 (*Reverse*, GTCGTTTAAAGCCATTACGTC), luego se utilizó la función **mergePairs** en el paquete **DADA2** (Callahan et al., 2016) en R para emparejar las dos lecturas, se eliminaron las secuencias quiméricas con la función **removeBimeraDenovo**. Finalmente se exportaron los archivos y se convirtieron a formatos compatibles con QIIME2.

3.2.4.2.Agrupamiento en unidades taxonómicas operacionales

Para oomicetos, el proceso de agrupamiento en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) se lo realizó con **vsearch cluster-features-open-reference** utilizando una base de datos de referencia que contiene 25 secuencias de cada familia de oomicetos registrados en la base de datos de NCBI (Clark et al., 2016) para la región ITS2, se utilizó un porcentaje de identidad del 97%, las secuencias que no presentan similitud son agrupadas por el método “*de novo*”.

Para micorrizas, se utilizó la base de datos Kruger para la región LSU (Krüger et al., 2012) y el porcentaje de identidad fue del 97%.

3.2.4.3. Asignación taxonómica

3.2.4.3.1. Mediante BLAST

Luego del agrupamiento en unidades taxonómicas se utilizó la herramienta **quality-control exclude-seqs** con el método BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y la base de nucleótidos de NCBI, con un porcentaje de identidad y alineamiento del 97% para seleccionar las OTUS que pertenecen a la clase Oomycota, y Glomeromycota respectivamente.

3.2.4.3.2. Mediante el uso de árboles filogenéticos

Se utilizó la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004) en Cypres (Miller, Pfeiffer, & Schwartz, 2010), para crear dos alineamientos múltiples de secuencias, el primer alineamiento se lo realizó entre las secuencias representativas obtenidas de oomicetos (688) junto con secuencias representativas de cada familia de oomicetos registrados en la base de datos de NCBI para la región ITS2 y la secuencia del organismo *Phaeodactylum tricornutum* como representante del grupo externo (*outgroup*) (Rujirawat et al., 2018) con un máximo de dos iteraciones debido al gran número de secuencias.

El segundo alineamiento se lo realizó con las secuencias representativas obtenidas de micorrizas (11000) junto con las secuencias de la base de datos Krüger para la región LSU y la secuencia del organismo *Exophiala spinifera* como representante del grupo externo (Krüger et al., 2012) con un máximo de dos iteraciones.

Posteriormente se utilizó la herramienta RAxML (Stamatakis, 2014) para la creación del árbol filogenético de oomicetos; debido a la gran cantidad de secuencias para micorrizas fue necesario utilizar la herramienta FastTreeMP (K. Liu, Linder, & Warnow, 2011; Price, Dehal, & Arkin, 2010); se utilizó la herramienta Archaeopteryx (Han & Zmasek, 2009) para visualizar cada

árbol y seleccionar manualmente las OTUs que si pertenecen a la clase de organismo, Oomycota y Glomeromycota, respectivamente.

3.2.4.4. Filtrado de secuencias y normalización

Se utilizó la herramienta **feature-table filter-features** para eliminar de las tablas las muestras que tengan OTUs que se repitan menos de 5 veces y posteriormente se utilizó la herramienta **feature-table filter-samples** para eliminar las OTUS que tengan menos de 1000 lecturas. Este paso normaliza los datos dadas las diferencias en la profundidad de lectura entre las muestras. Luego de transformar las tablas de OTUs de cada organismo, se utilizó la función **rrarefy** del paquete **vegan** (Oksanen et al., 2019) en R para realizar un proceso de rarefacción lo que permite reducir el número de lecturas de la OTU más abundante conservando la proporción advertida entre muestras evitando así cualquier sesgo debido a la profundidad de la lectura.

3.2.5. Estimación de medidas de diversidad basados en secuencias

Con las tablas de OTUS obtenidas en el procesamiento bioinformático se procedió a estimar índices de diversidad de Shannon (Shannon, 1948) y Simpson (Simpson, 1949) usando el paquete **vegan** (Oksanen et al., 2019) en R; la riqueza se reportó como el conteo total de OTUs presentes en cada muestra.

3.2.6. Análisis estadístico

3.2.6.1. Diseño experimental

Para este trabajo el factor a comparar es el tipo de manejo de cultivo el cual tiene dos niveles orgánico y convencional, esta comparación se realizó a través de las comunidades microbianas (oomicetos y micorrizas) y en cada componente de la rizósfera (suelo y raíz).

3.2.6.2. Análisis

Con los datos obtenidos de la caracterización del suelo (Tabla 2) se realizó una prueba t – de student para determinar si existen nutrientes que diferencien significativamente a cada tipo de manejo, se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Luego de revisar los supuestos de normalidad (Shapiro.test en R) y homogeneidad de varianzas (var.test) en cada medida de diversidad basada en secuencias, se realizó la prueba t – student (t.test) para muestras independientes para determinar si existen diferencias significativas entre los dos tipos de manejo, se utilizó un nivel de significancia del 5%.

Se realizó también un análisis permutacional multivariado de varianza (PERMANOVA) con 5000 permutaciones usando la función adonis2 en vegan (Oksanen et al., 2019), para probar si el tipo de manejo (Orgánico o Convencional) y los datos físico - químicos del suelo explican las diferencias en la composición de la comunidad de oomicetos y micorrizas, se incluyeron como parte del modelo aquellos nutrientes no correlacionados para evitar la multicolinealidad, además para tomar en cuenta la estructura del muestreo se incluyó también una variable de bloqueo (Localidad) usando la opción strata propia de esta función.

El análisis de abundancia diferencial se lo realizó usando DESeq2 (Love et al., 2014), este paquete permite comparar diferentes grupos mientras corrige la variación en el número de secuencias entre muestras y la varianza en el número de secuencias para cada OTU, los grupos a comparar fueron las OTUS presentes en el manejo orgánico y aquellas presentes en el manejo convencional. Se calculó el log₂ fold de cada OTU y se generaron gráficos comparativos totales y con una significancia del 5%.

Todos los análisis estadísticos previamente descritos fueron llevados a cabo en el software estadístico R versión 3.5.1 (R Development Core Team, 2016)

CAPÍTULO IV RESULTADOS

4.1. Muestras y organismos amplificados

Se realizó una prueba t de student con los datos de la caracterización física y química del suelo, una para cada característica. A continuación, se detallan los resultados de la prueba t de student (Tabla 3).

Tabla 3

Resultados de la prueba t de student para características físico química del suelo

Característica	t	Grados de libertad	Valor p	Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
M. Org.	-1.503	2	0.2718	-1.5450	0.745
pH	0.53	2	0.649	-1.033	1.322
N	-1.414	2	0.293	-0.081	0.041
P	2.38	2	0.14	-16.972	58.972
K	-7.425	2	0.018 *	-0.332	-0.088
Ca	0.889	2	0.468	-6.773	10.303
Mg	-2.889	2	0.102	-0.921	0.181
Fe	-0.495	2	0.6698	-232.703	184.703
Mn	-1.752	2	0.222	-14.651	6.171
Cu	-0.868	2	0.477	-60.034	39.884
Zn	-0.68	2	0.567	-25.645	18.645

Solo la concentración de potasio fue estadísticamente significativa ($p=0.018$). (ver Figura 1)

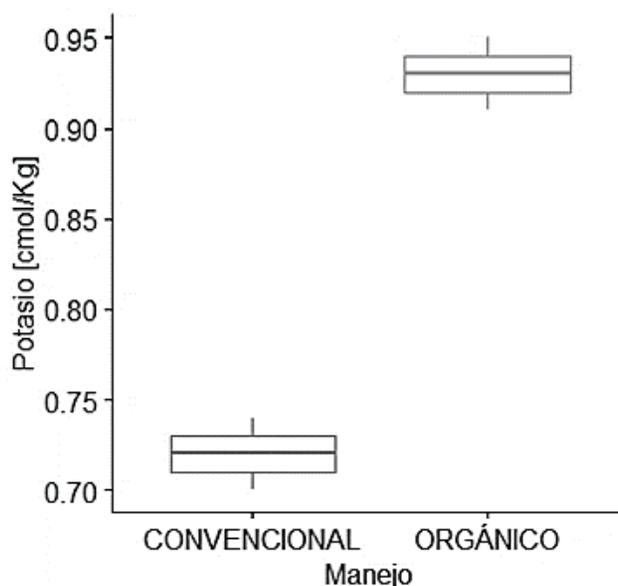


Figura 1. Diagrama de cajas para la concentración de Potasio

Con respecto a las muestras de ADN que fueron enviadas, casi todas pudieron ser amplificadas a través de la reacción en cadena de la polimerasa con los primers respectivos solo el ADN de raíz de cacao con manejo convencional para oomicetos no pudo ser secuenciado.

4.2. Análisis de diversidad y abundancia para oomicetos.

El análisis de riqueza e índices de diversidad, así como también la comparación de indicadores, análisis permutacional multivariado (PERMANOVA) y abundancia diferencial se realizó con la tabla de OTUS obtenida mediante la asignación taxonómica con BLAST y la tabla resultante de la asignación taxonómica a través del árbol filogenético de oomicetos

4.2.1. Asignación taxonómica de OTUs

Para las muestras de suelo, la asignación taxonómica con BLAST permitió identificar 13 OTUs pertenecientes a la clase Oomycota, seis de ellas fueron reportadas con número de accesión

(AF266780.1; AB780634.1; EU334493.1; AB906340.1; EU095017.1; GU993872.1) y las otras siete no habían sido reportadas antes, pero pertenecen a esta clase con un 97 % de similitud; la asignación taxonómica a través del árbol filogenético obtenido en RAxML de Cipres permitió obtener un total de 50 OTUs, cinco de ellas fueron reportadas con número de accesoión (AF266780.1; AB780634.1; EU334493.1; AB906340.1; EU095017.1) y las otras 45 fueron completamente nuevas.

En la (Figura 2) se muestra el diagrama de Venn para: a) Las OTUS de oomicetos obtenidos mediante BLAST, existen cinco OTUS exclusivas del suelo con manejo orgánico, cuatro exclusivas del suelo con manejo convencional y cuatro compartidas por los dos manejos; b) las OTUS de oomicetos obtenidas mediante el árbol filogenético, existen 19 propias del manejo convencional, 20 del manejo orgánico y 11 compartidas por los dos manejos.

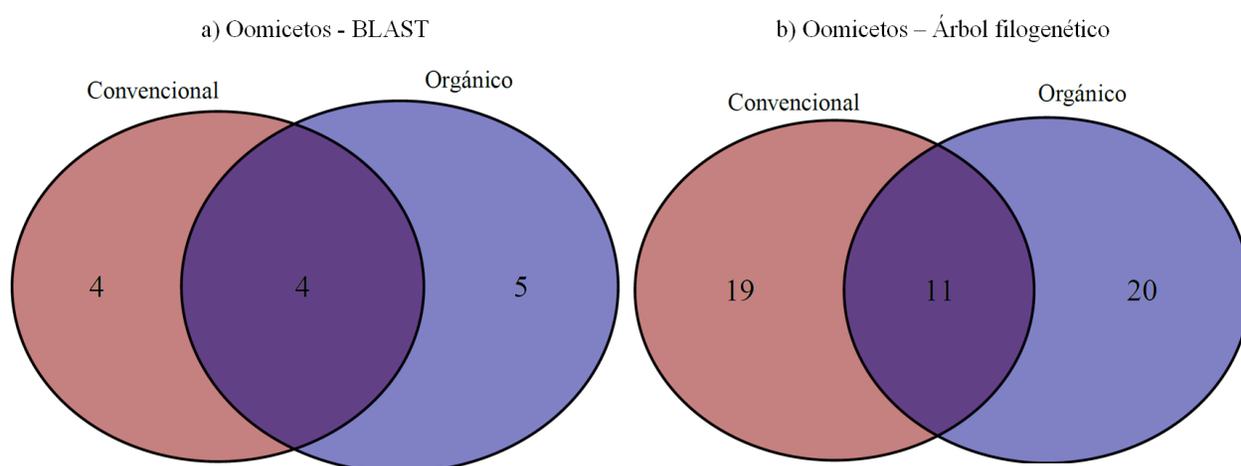


Figura 2. Diagramas de Venn para OTUs de oomicetos presentes en muestras de suelo

Como solo se pudo secuenciar el ADN de oomicetos presentes en la raíz con manejo orgánico en esta sección se detallan los datos obtenidos en cuanto a número de OTUs reportadas más no una comparación por los tipos de manejo.

El uso de BLAST permitió identificar 12 OTUs pertenecientes a la clase Oomycota presentes en las muestras de raíces, seis de ellas fueron reportadas con número de accesión (AF266780.1; AB780634.1; EU334493.1; AB906340.1; EU095017.1; GU993872.1) y las otras seis no habían sido reportadas antes, pero pertenecen a esta clase con un 97 % de similitud. Con una revisión de la topología del árbol filogenético se obtuvo un total de 40 OTUs pertenecientes a la clase Oomycota, seis de ellas fueron reportadas con número de accesión (AF266780.1; AB780634.1; AY840117.1; EU334493.1; AB906340.1; AB727991.1), y 34 OTUs son completamente nuevas.

4.2.2. Riqueza e índices de diversidad alfa basados en secuencias.

A partir de la matriz de abundancias se estimaron los parámetros de diversidad alfa de OTUs de oomicetos presentes en suelo. La riqueza se reportó como el número total de OTUs en cada muestra y los índices de diversidad (Simpson y Shannon) fueron calculados usando el conteo de lecturas. En la Tabla 4 se muestran los parámetros de diversidad alfa obtenidos a partir de la matriz de OTUs con BLAST y con el árbol filogenético para las muestras de suelo.

Tabla 4

Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de Oomicetos presentes en suelo

Manejo	Localidad	Muestra	Riqueza de OTUs		Índice de Simpson		Índice de Shannon	
			BLAST	A. F	BLAST	A. F	BLAST	A. F
Orgánico	INIAP - Pichilingue	A	6	14	0.626	0.729	1.039	1.488
	INIAP - Pichilingue	B	5	15	0.441	0.651	0.643	1.334
	INIAP - Pichilingue	C	4	9	0.151	0.416	0.336	0.877
	Finca Nancy	D	5	10	0.481	0.503	0.937	1.027
	Finca Nancy	E	6	12	0.467	0.533	0.744	1.010

CONTINÚA →

Convencional	Finca La Perlita	A	3	4	0.043	0.086	0.107	0.214
	Finca La Perlita	B	3	10	0.653	0.706	1.077	1.320
	Finca La Perlita	C	4	14	0.040	0.245	0.101	0.519
	Finca 4	D	4	12	0.261	0.654	0.506	1.282
	Finca 4	E	6	15	0.537	0.678	0.880	1.445

En la Tabla 5 se detalla la localidad de la muestra junto con los parámetros de diversidad alfa calculados con BLAST y con el árbol filogenético para las comunidades de Oomicetos presentes en muestras de raíz

Tabla 5

Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de Oomicetos presentes en raíz

Manejo	Localidad	Muestra	Riqueza de OTUs		Índice de Simpson		Índice de Shannon	
			BLAST	A. F.	BLAST	A. F.	BLAST	A. F.
Orgánico	INIAP - Pichilingue	A	2	6	0.222	0.384	0.381	0.772
	INIAP - Pichilingue	B	4	8	0.087	0.254	0.211	0.482
	INIAP - Pichilingue	C	3	24	0.316	0.577	0.497	1.276
	Finca Nancy	D	7	11	0.684	0.689	1.217	1.256
	Finca Nancy	E	4	13	0.375	0.626	0.622	1.138

4.2.3. Comparación de los indicadores de diversidad para los dos tipos de manejo

Tanto para la riqueza como para los índices de diversidad de Simpson y Shannon, se calcularon la media y la desviación estándar, en la (Tabla 6) se detallan los estadísticos descriptivos

para los parámetros de diversidad alfa de las comunidades de Oomicetos en suelo calculados mediante BLAST y el árbol filogenético.

Tabla 6

Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de oomicetos en suelo

Manejo	n	Riqueza de OTUs		Índice de Simpson		Índice de Shannon	
		Media	Sd	Media	S.D.	Media	S.D.
<i>Oomicetos – Blast</i>							
Orgánico	5	5.2	0.837	0.433	0.173	0.740	0.274
Convencional	5	4	1.22	0.307	0.281	0.534	0.443
<i>Oomicetos – Árbol filogenético</i>							
Orgánico	5	12	2.55	0.566	0.124	1.15	0.253
Convencional	5	11	4.36	0.474	0.288	0.956	0.552

En la Tabla 7 se detallan los resultados obtenidos de la prueba t-student con los datos de BLAST y del árbol filogenético, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 7

Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad

Medida de diversidad	t	Grados de libertad	Valor p	Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
<i>Oomicetos – BLAST</i>					
Riqueza	-1.809	8	0.108	-2.73	0.33
Índice de Simpson	-0.857	8	0.416	-0.467	0.214
Índice de Shannon	-0.883	8	0.403	-0.743	0.3
<i>Oomicetos – Árbol filogenético</i>					
Riqueza	-0.443	8	0.67	-6.208	4.208
Índice de Simpson	-0.662	8	0.527	-0.416	0.23
Índice de Shannon	-0.705	8	0.501	-0.818	0.435

A pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas para los índices entre los tratamientos es posible observar una tendencia a favor del grupo orgánico tanto para los datos con

BLAST (ver Figura 3 a:c) así como para los datos obtenidos del árbol filogenético (ver Figura 3 d:f).

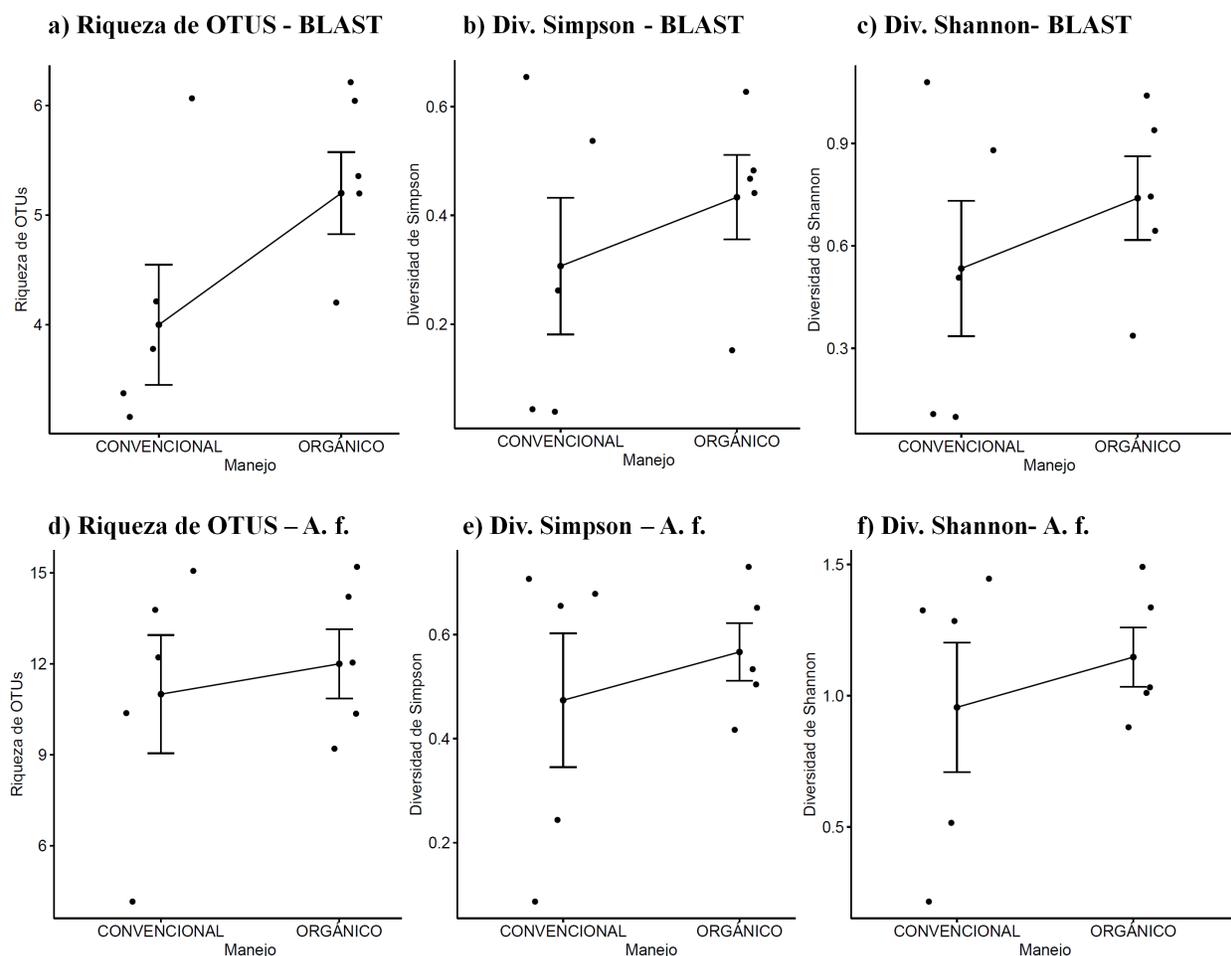


Figura 3. Gráfico de medias de los parámetros de diversidad para oomicetos en suelo

4.2.4. Análisis permutacional multivariado de varianza

El análisis permutacional multivariado de varianza nos permitió entender que factores tienen un efecto sobre la composición de la comunidad de oomicetos en las muestras de suelo de cacao, se añade información sobre el contenido y pseudo réplicas de nutrientes. La significancia de algunos nutrientes fue marginal (Tabla 8). En el modelo que incluye el tipo de manejo y el contenido de nitrógeno, el nitrógeno tiene un efecto significativo sobre la composición de la

comunidad de oomicetos en las muestras de suelo, otros modelos que incluyen al magnesio, cobre y zinc también tienen un efecto significativo.

Tabla 8*PERMANOVA para la composición de la comunidad de oomicetes de suelo*

Modelo	G.L.	Suma de cuadrados		R ²		F		Pr (>F)	
		BLAST	A. f	BLAST	A. f	BLAST	A. f	BLAST	A. f
<i>a)</i>									
Manejo	1	0.154	0.152	0.062	0.058	0.615	0.558	0.592	0.676
pH	1	0.503	0.515	0.203	0.195	2.011	1.896	0.163	0.16
<i>b)</i>									
Manejo	1	0.195	0.207	0.079	0.079	0.841	0.814	0.49	0.511
M. Org.	1	0.63	0.63	0.254	0.239	2.718	2.469	0.086 .	0.086 .
<i>c)</i>									
Manejo	1	0.236	0.247	0.095	0.094	1.084	1.025	0.404	0.397
N	1	0.732	0.724	0.295	0.275	3.368	3	0.044 *	0.045 *
<i>d)</i>									
Manejo	1	0.197	0.218	0.08	0.083	0.752	0.773	0.543	0.547
P	1	0.414	0.437	0.167	0.166	1.578	1.549	0.249	0.24
<i>e)</i>									
Manejo	1	0.125	0.13	0.05	0.05	0.516	0.494	0.646	0.717
Ca	1	0.562	0.567	0.227	0.216	2.325	2.15	0.113	0.12
<i>f)</i>									
Manejo	1	0.425	0.435	0.171	0.165	1.913	1.768	0.187	0.19
Mg	1	0.698	0.693	0.282	0.263	3.143	2.815	0.054 .	0.058 .
<i>g)</i>									
Manejo	1	0.19	0.183	0.076	0.069	0.724	0.651	0.544	0.603
Fe	1	0.419	0.45	0.169	0.171	1.599	1.605	0.224	0.205
<i>h)</i>									
Manejo	1	0.166	0.182	0.067	0.069	0.657	0.664	0.584	0.586
Mn	1	0.483	0.497	0.195	0.189	1.91	1.814	0.176	0.174
<i>i)</i>									
Manejo	1	0.468	0.449	0.189	0.17	2.113	1.841	0.138	0.171
Cu	1	0.701	0.709	0.283	0.269	3.163	2.908	0.044 *	0.042 *
<i>j)</i>									
Manejo	1	0.394	0.376	0.159	0.143	1.744	1.52	0.218	0.258
Zn	1	0.671	0.682	0.271	0.259	2.968	2.754	0.053 .	0.051 .

4.2.5. Abundancia diferencial

El análisis de abundancia diferencial con las OTUs obtenidas mediante BLAST permitió observar el *fold-change*, es decir el cambio en la abundancia entre OTUs por tratamiento (Figura 4), se nota un patrón de abundancia diferencial similar para el manejo orgánico (+) (5) y convencional (-) (4).

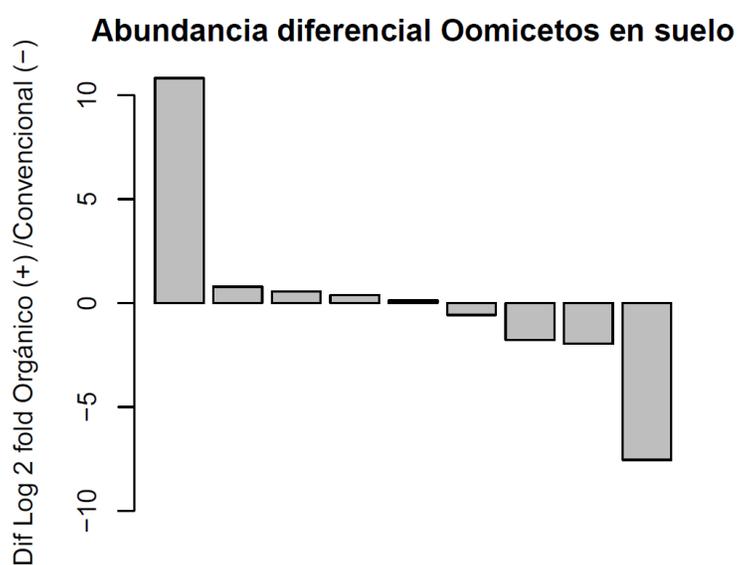


Figura 4. Abundancia diferencial de OTUs de oomicetos en suelo – BLAST

Este patrón es mucho más evidente si solo se toma en cuenta a las OTUS con abundancia diferencial significativa ($p < 0.05$), existe una OTU en cada tipo de manejo (Figura 5).

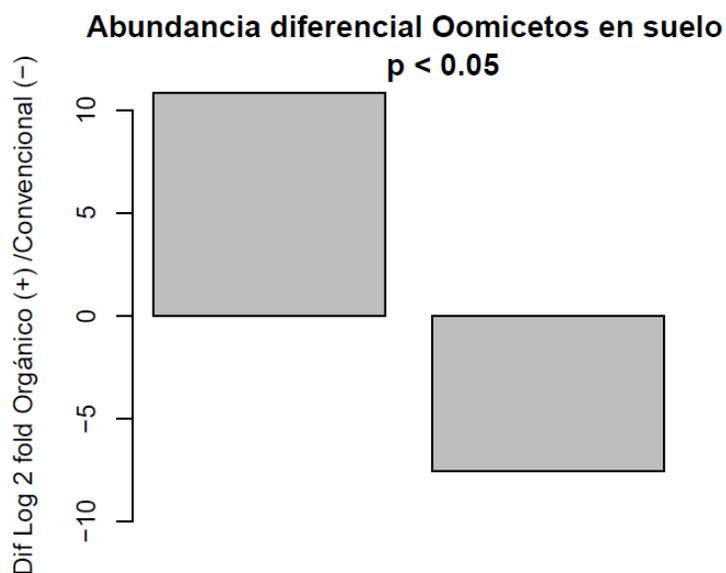


Figura 5. Abundancia diferencial significativa de OTUs de oomicetos en suelo – BLAST

Con los datos obtenidos mediante el árbol filogenético el análisis de abundancia diferencial permitió observar el *fold-change* de un número mayor de OTUs (Figura 6), la cantidad de OTUs diferencialmente abundantes en el manejo orgánico (21) es ligeramente mayor que las OTUs presentes en el manejo convencional (16).

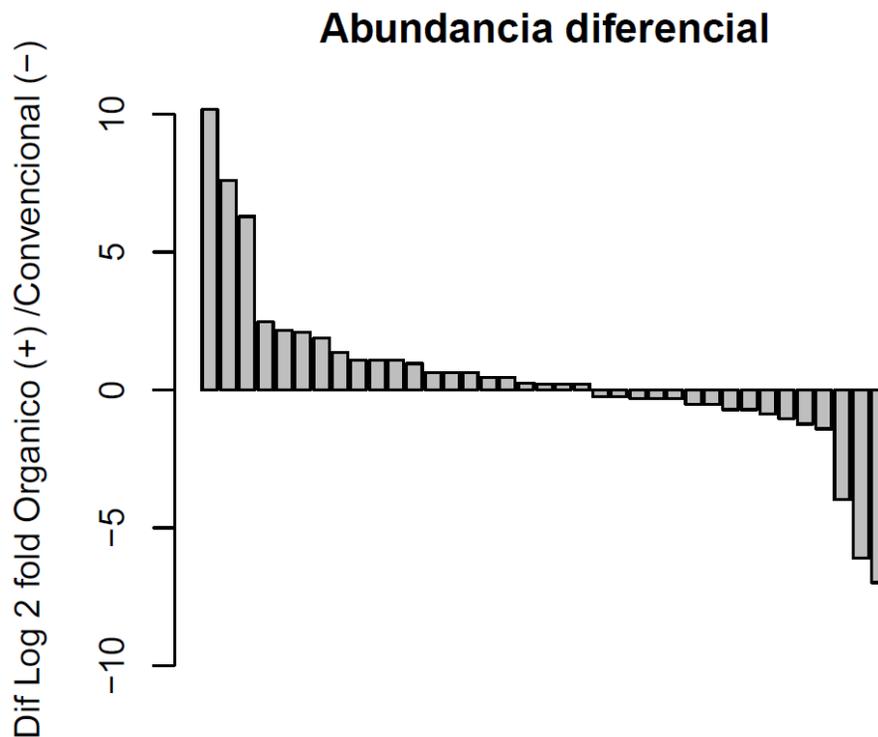


Figura 6. Abundancia diferencial de OTUs de oomicetos en suelo - Árbol filogenético

Esta ligera diferencia se mantiene al tomar en cuenta las OTUs con abundancia diferencial significativa ($p < 0.05$) ya que existen cuatro OTUs significativamente abundantes en el manejo orgánico y tres OTUs en el manejo convencional (Figura 7).

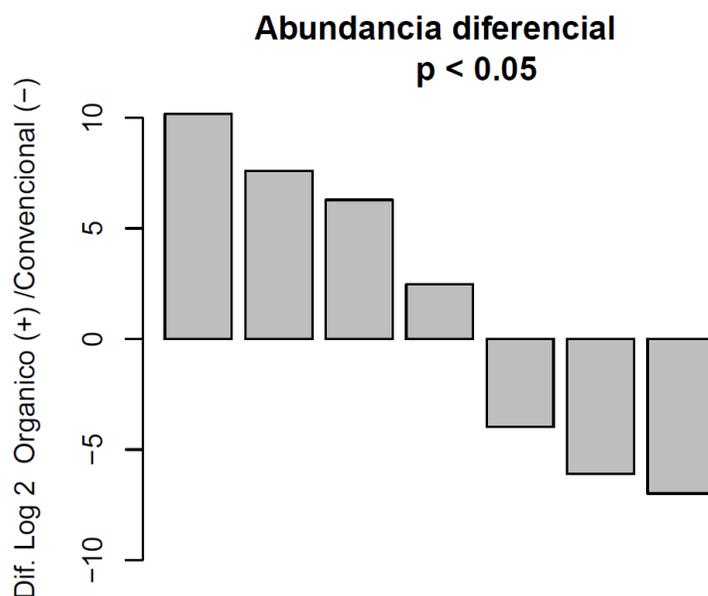


Figura 7. Abundancia diferencial significativa de OTUs de oomicetos en suelo – Árbol filogenético

4.3. Análisis de diversidad y abundancia para micorrizas arbusculares.

El análisis de riqueza e índices de diversidad, así como también la comparación de indicadores, análisis permutacional multivariado (PERMANOVA) y abundancia diferencial se realizó solo con la tabla de OTUs obtenida mediante la revisión de la topología del árbol filogenético de micorrizas generado con FastTree ya que no fue posible obtener una buena inferencia a partir del BLAST con la base de datos de NCBI o de Krüger.

4.3.1. Asignación taxonómica de OTUs

De la revisión de la topología del árbol filogenético de micorrizas obtenido en FastTree de Cipres, 2266 OTUs están presentes en las muestras de suelo, en la (Figura 8) se muestra el diagrama

de Venn para estas OTUs. Existen 1050 OTUs exclusivas del manejo orgánico, 831 solo de manejo convencional y 385 presentes en ambos tipos de manejo.

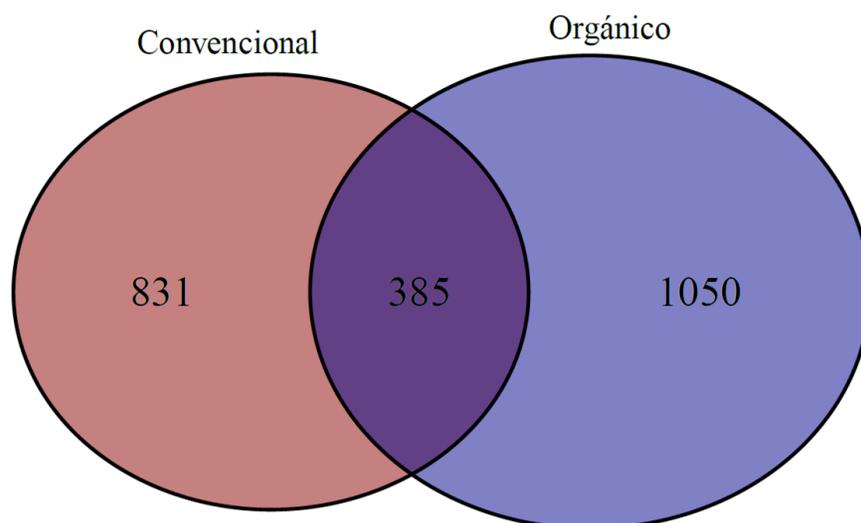


Figura 8. Diagrama de Venn para OTUs de micorrizas presentes en muestras de suelo

Para las muestras de raíz, se reportan 1085 OTUs, existen 772 exclusivas del manejo orgánico, 239 propias del manejo convencional y 74 presentes en los dos tipos de manejo.

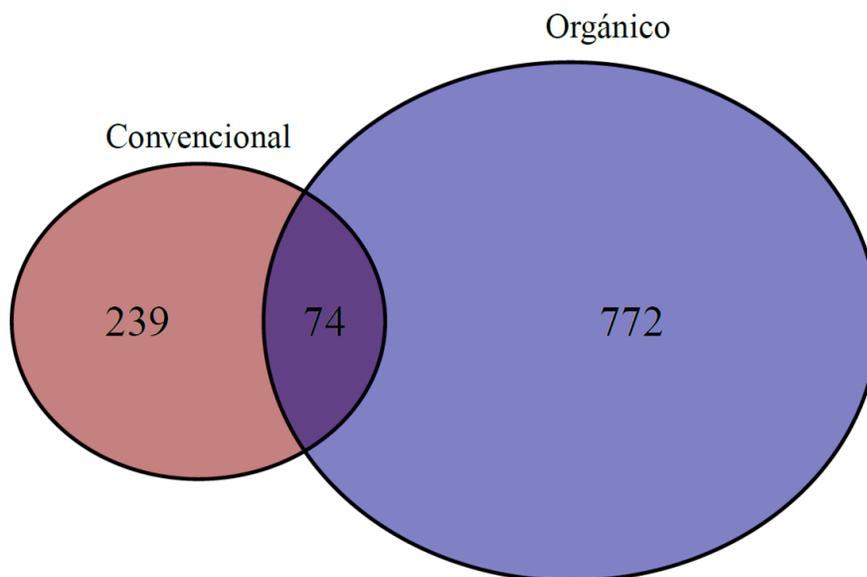


Figura 9. Diagrama de Venn para OTUs de micorrizas presentes en muestras de raíz

4.3.2. Riqueza e índices de diversidad alfa basados en secuencias

A partir de la matriz de abundancias se estimaron los parámetros de diversidad alfa de OTUs de micorrizas arbusculares presentes en las muestras de suelo y raíz en las Tablas 9 y 10 respectivamente.

Tabla 9

Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de micorrizas arbusculares presentes en suelo

Manejo	Localidad	Muestra	Riqueza de OTUs	Índice de Simpson *	Índice de Shannon
Orgánico	INIAP -Pichilingue	A	371	0.383	3.593
	INIAP -Pichilingue	B	410	0.326	3.275
	INIAP -Pichilingue	C	255	0.353	3.483
	Finca Nancy	D	427	0.307	3.449
	Finca Nancy	E	421	0.407	3.747
Convencional	Finca La Perlita	A	313	0.528	3.773
	Finca La Perlita	B	354	0.326	3.396
	Finca La Perlita	C	310	0.078	3.036
	Finca 4	D	354	0.589	3.922
	Finca 4	E	410	0.563	3.945

* Se presentan los índices de Simpson normalizados.

Tabla 10

Parámetros de diversidad alfa para las comunidades de Micorrizas arbusculares presentes en raíz

Manejo	Localidad	Muestra	Riqueza de OTUs	Índice de Simpson	Índice de Shannon
ORGÁNICO	INIAP -Pichilingue	A	146	0.771	2.179
	INIAP -Pichilingue	B	204	0.767	2.431
	INIAP -Pichilingue	C	152	0.723	2.020

CONTINÚA →

	Finca Nancy	D	288	0.685	2.447
	Finca Nancy	E	205	0.677	2.064
	Finca La Perlita	A	100	0.912	3.155
	Finca La Perlita	B	78	0.734	2.073
CONVENCIONAL	Finca La Perlita	C	129	0.463	1.382
	Finca 4	D	44	0.485	1.358
	Finca 4	E	52	0.526	1.521

4.3.3. Comparación de los indicadores de diversidad para los tipos de manejo

Los estadísticos descriptivos para los índices y riqueza calculados con la matriz de OTUS del árbol filogenético de micorrizas presentes en suelo se detallan en la Tabla 11 y en la Tabla 12 se detallan los estadísticos descriptivos para las muestras de raíz.

Tabla 11

Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de micorrizas arbusculares en suelo

Manejo	n	Riqueza de OTUs		Índice de Simpson		Índice de Shannon	
		Media	Sd	Media	S.D.	Media	S.D.
Orgánico	5	377	71.5	0.355	0.041	3.51	0.391
Convencional	5	348	40.6	0.417	0.216	3.61	0.391

Tabla 12

Estadísticos descriptivos para los parámetros de diversidad alfa de micorrizas arbusculares en raíz

Manejo	n	Riqueza de OTUs		Índice de Simpson		Índice de Shannon	
		Media	Sd	Media	S.D.	Media	S.D.
Orgánico	5	199	57	0.725	0.044	2.23	0.201
Convencional	5	80.6	34.9	0.624	0.193	1.90	0.760

En la Tabla 13 se detallan los resultados obtenidos de la prueba t-student con los datos de micorrizas presentes en las muestras de suelo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, pero es posible observar un incremento en la riqueza para el manejo orgánico y una disminución en los índices de diversidad para este manejo (Figura 10).

Tabla 13

Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad - suelo

Medida de diversidad	T	Grados de libertad	Valor p	Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Riqueza	-0.778	8	0.459	-113.374	56.174
Índice de Simpson	0.624	8	0.55	-0.165	0.288
Índice de Shannon	0.549	8	0.598	-0.337	0.547

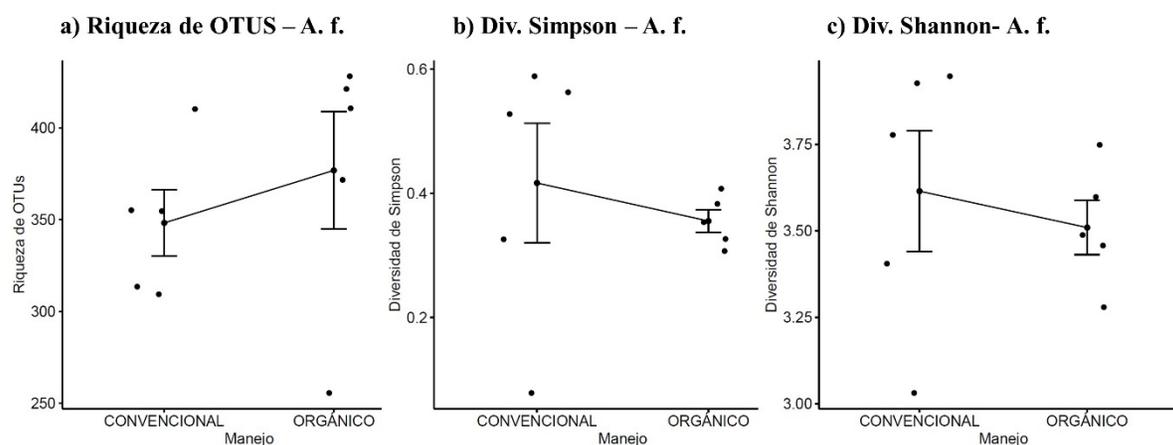


Figura 10. Gráfico de medias para los parámetros de diversidad de micorrizas en suelo

En la Tabla 14 se detallan los resultados obtenidos para la prueba t de student con los datos de micorrizas presentes en raíz, existe una diferencia significativa en la riqueza de OTUs para el manejo orgánico ($p=0.004$), en los índices de diversidad es posible observar una tendencia a favor de este manejo (Figura 11)

Tabla 14

Resultados de la prueba t-student para indicadores de diversidad - raíz

Medida de diversidad	t	Grados de libertad	Valor p	Intervalo de confianza	
				Inferior	Superior
Riqueza	-3.96	8	0.004 **	-187.355	-49.445
Índice de Simpson	-1.133	8	0.29	-0.305	0.104
Índice de Shannon	-0.94	8	0.375	-1.141	0.480

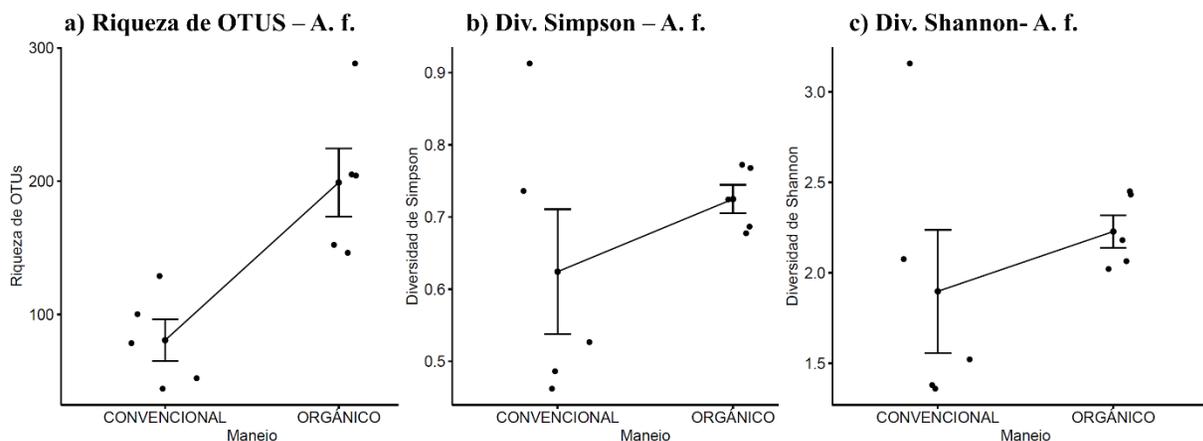


Figura 11. Gráfico de medias para los parámetros de diversidad de micorrizas en raíz

4.3.4. Análisis permutacional multivariado de varianza

La composición de la comunidad de micorrizas presentes en suelo responde a muchos de los modelos propuestos con el tipo de manejo y las variables fisicoquímicas del suelo, la cantidad de materia orgánica, concentración de fósforo, magnesio y manganeso tienen un efecto junto con el tipo de manejo sobre la composición de esta comunidad (Tabla 15 b, d, f y g). Modelos que incluyen al pH, Ca y Fe también tienen un efecto significativo (Tabla 15 a, e y h).

Tabla 15

PERMANOVA para la composición de la comunidad de micorrizas en suelo

Modelo	G.L.	Suma de cuadrados	de R ²	F	Pr (>F)
a)					
Manejo	1	0.389	0.147	1.84	0.163
pH	1	0.947	0.357	4.476	0.004 **
b)					
Manejo	1	0.76	0.286	3.3	0.042 *
M. Org	1	0.816	0.307	3.542	0.026 *
c)					
Manejo	1	0.621	0.234	2.502	0.085 .
N	1	0.691	0.26	2.785	0.057

CONTINÚA →

<i>d)</i>					
Manejo	1	1.087	0.409	5.395	0.001 **
P	1	1.019	0.384	5.058	0.001 **
<i>e)</i>					
Manejo	1	0.571	0.215	2.59	0.077 .
Ca	1	0.89	0.335	4.045	0.016 *
<i>f)</i>					
Manejo	1	0.821	0.309	3.394	0.034 *
Mg	1	0.735	0.277	3.039	0.042 *
<i>g)</i>					
Manejo	1	0.951	0.358	4.547	0.009 **
Mn	1	0.965	0.364	4.617	0.004 **
<i>h)</i>					
Manejo	1	0.462	0.174	2.185	0.1132
Fe	1	0.951	0.358	4.505	0.021 *
<i>i)</i>					
Manejo	1	0.421	0.158	1.643	0.208
Cu	1	0.638	0.24	2.492	0.067 .
<i>j)</i>					
Manejo	1	0.411	0.155	1.63	0.201
Zn	1	0.665	0.25	2.638	0.054 .

Por otro lado, la composición de la comunidad de micorrizas presentes en raíz responde solo al tipo de manejo en los modelos en los que se incluye pH, cobre o zinc (Tabla 16 a, i ó j)

Tabla 16*PERMANOVA para la composición de la comunidad de micorrizas en raíz*

Modelo	G.L.	Suma de cuadrados	R ²	F	Pr (>F)
<i>a)</i>					
Manejo	1	0.825	0.236	2.763	0.044*
pH	1	0.409	0.117	1.369	0.222
<i>b)</i>					
Manejo	1	0.363	0.104	1.182	0.339
M. Org	1	0.352	0.101	1.148	0.286
<i>c)</i>					
Manejo	1	0.409	0.117	1.302	0.289
N	1	0.301	0.086	0.96	0.415
<i>d)</i>					
Manejo	1	0.305	0.087	1.04	0.439
P	1	0.443	0.127	1.509	0.185
<i>e)</i>					
Manejo	1	0.618	0.177	2.046	0.106
Ca	1	0.383	0.11	1.268	0.256
<i>f)</i>					
Manejo	1	0.192	0.055	0.615	0.732
Mg	1	0.319	0.091	1.024	0.351
<i>g)</i>					
Manejo	1	0.327	0.094	1.1	0.41
Mn	1	0.417	0.119	1.402	0.237
<i>h)</i>					
Manejo	1	0.82	0.235	2.769	0.032
Fe	1	0.424	0.121	1.432	0.2
<i>i)</i>					
Manejo	1	0.818	0.234	2.595	0.035 *
Cu	1	0.292	0.084	0.927	0.479
<i>j)</i>					
Manejo	1	0.855	0.244	2.726	0.038 *
Zn	1	0.305	0.087	0.972	0.464

4.3.5. Abundancia diferencial

El análisis de abundancia diferencial para las OTUs de micorrizas presentes en las muestras de suelo permitió observar una cantidad ligeramente mayor de OTUs diferencialmente abundantes en el manejo convencional (-) (142 vs 190) (Figura 12).

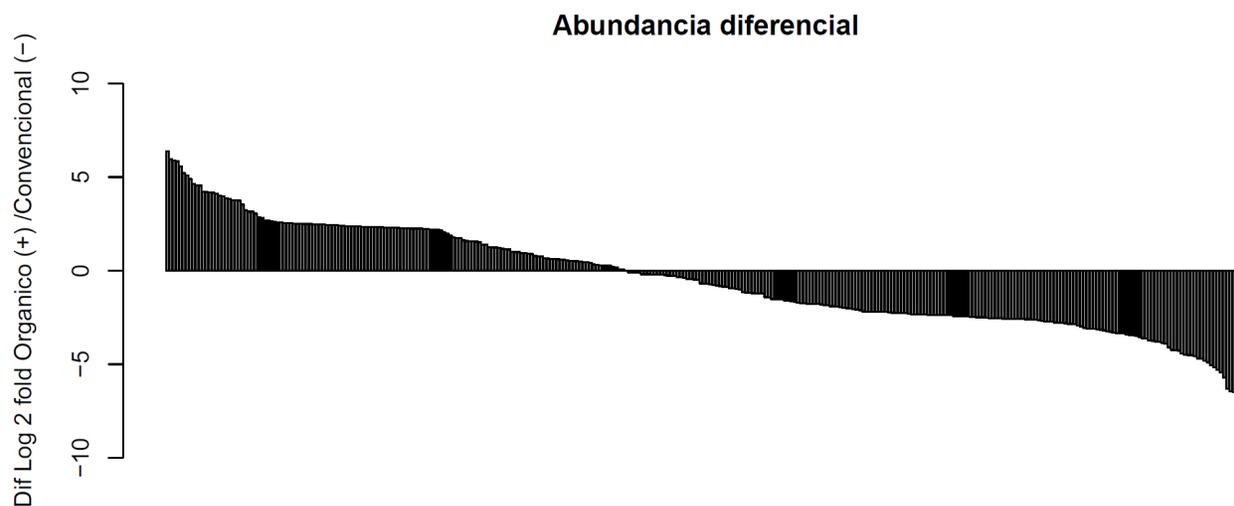


Figura 12. Abundancia diferencial de OTUs de micorrizas en suelo

En la Figura 13 se muestran las OTUs con abundancia diferencial significativa, el manejo orgánico (71) y en el convencional es ligeramente mayor (96).

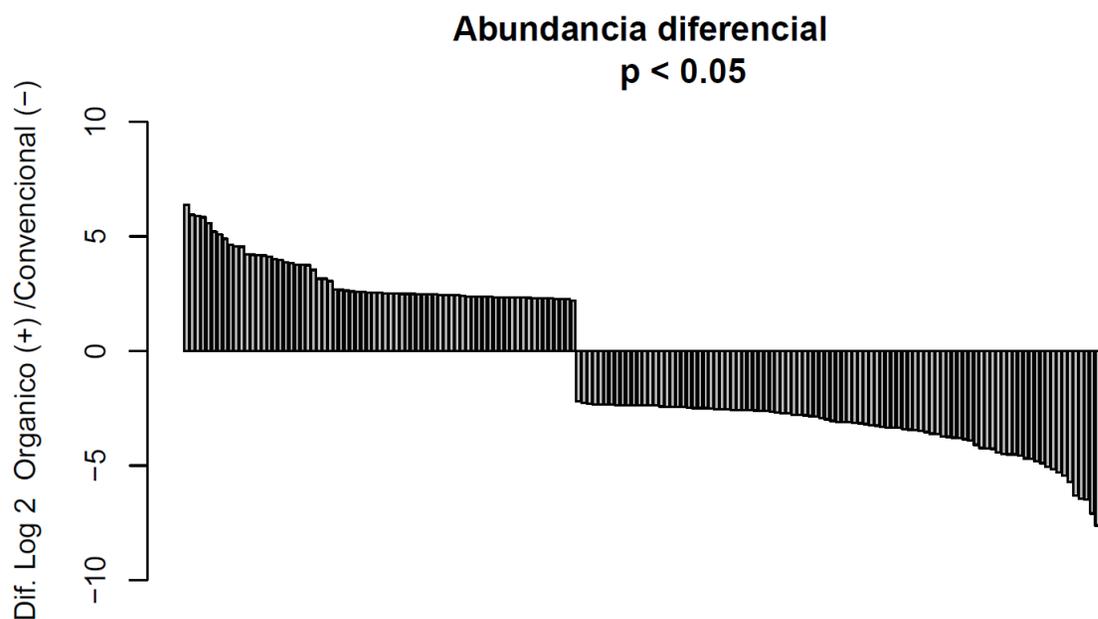


Figura 13. Abundancia diferencial significativa de OTUs de micorrizas en muestras de suelo

Este patrón fue distinto al observar la abundancia diferencial de OTUS de micorrizas presentes en raíz (Figura 14), existe una mayor cantidad de OTUS en el manejo orgánico (133) que en el manejo convencional (61).

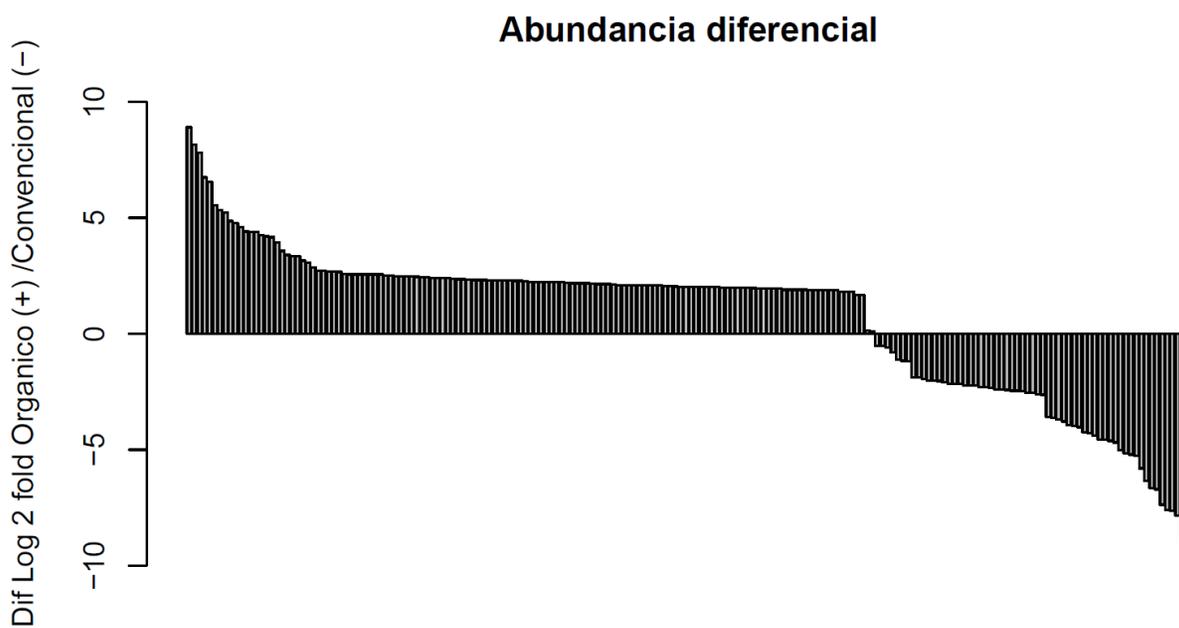


Figura 14. Abundancia diferencial de OTUs de micorrizas en raíz

Existe una mayor cantidad de OTUS diferencialmente abundantes en el manejo orgánico (55) que en el manejo convencional (41) (Figura 15).

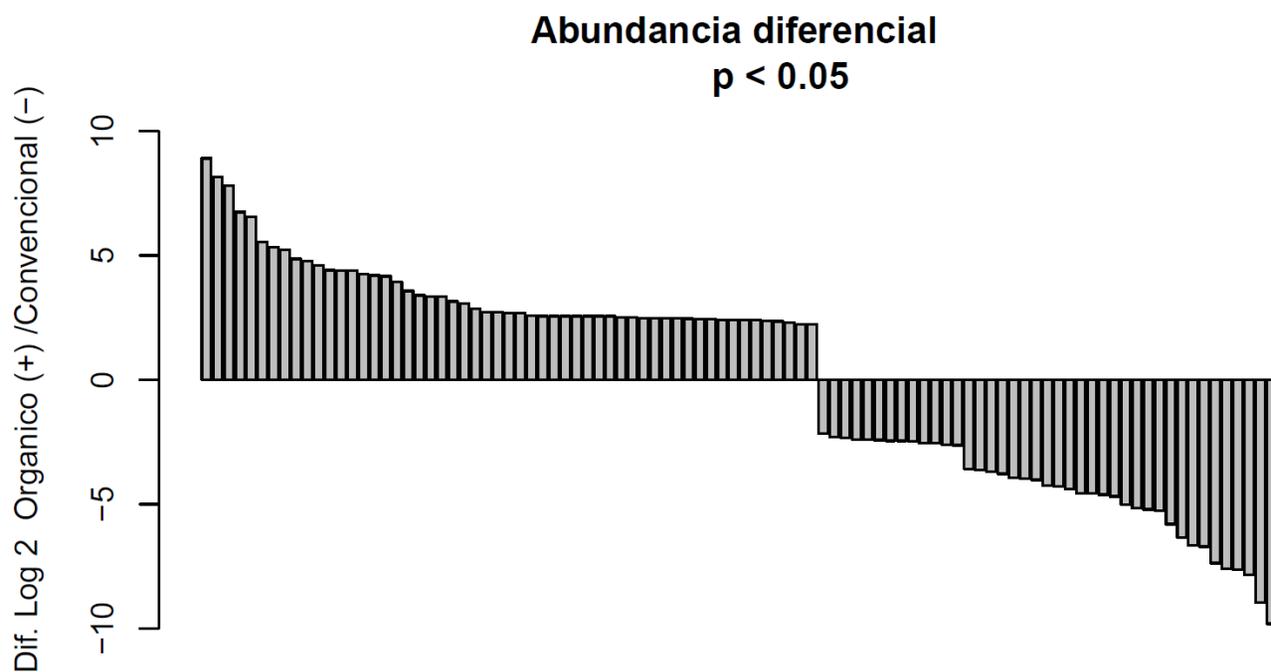


Figura 15. Abundancia diferencial significativa de OTUS de micorrizas en muestras de raíz

CAPÍTULO V DISCUSIÓN

5.1. Muestras y organismos

La caracterización fisicoquímica del suelo mostró que los cultivos con manejo orgánico tienen un mayor contenido de potasio (Tabla 3), esta diferencia es estadísticamente significativa y concuerda con resultados obtenidos por (Triano et. al, 2016) para este tipo de plantaciones naturalmente los suelos de cacao poseen altas concentraciones de este nutriente y el uso de abonos orgánicos aumenta aún más su contenido de potasio, en su estudio Triano (2016) no reportó diferencias significativas para otros nutrientes lo que también concuerda con los datos obtenidos de la caracterización en este estudio (Tabla 3).

Con respecto a las muestras usadas en este estudio, aquellas que no pudieron ser amplificadas en las PCR para Oomicetos pertenecen al ADN extraído de la raíz de cacao, según Oliveira et al. (2015), este tipo de muestras pueden contener una gran cantidad de impurezas que interfieren en la calidad de la PCR además podemos añadir que la secuencia del *primer* forward ITS300 tal como la describió Riit en la Figura 1 de su artículo publicado en el 2016 tenía una errata que fue rectificada en noviembre del 2018, un mes después de que se enviaran las muestras de este estudio a la Universidad de Kansas, a esta secuencia le faltaban 2 nucleótidos en el extremo 3' esto puede reducir la relativa especificidad del *primer* hacia oomicetos lo que resultaría en una menor proporción de este grupo taxonómico en los estudios de metagenómica, esto puede explicar porque no se logró amplificar este grupo taxonómico en las muestras de ADN de raíz (Riit et al., 2018) ya que es posible que no existiera mucho ADN de oomicetes en la muestra.

5.2. Análisis de diversidad y abundancia de oomicetos

5.2.1. Asignación taxonómica

Las diferencias en los dos tipos de asignación taxonómica (13 OTUs vs 50 OTUs) se deben a que BLAST depende mucho de la base de datos que se esté utilizando, es común que un análisis con BLAST contenga copias de secuencias similares o redundantes e incluso están sesgadas de acuerdo al tipo de secuencia y al organismo en cuestión (Brinkman, 2001), el análisis filogenético permite una visión más exacta de las relaciones entre las secuencias consenso provistas y el árbol filogenético del grupo taxonómico, Arcate et. al (2006) concuerdan en que el uso de árboles filogenéticos les permitió reportar taxones adicionales que no pudieron ser identificados usando solamente la base de datos para oomicetos presentes en GeneBank, la base de datos de NCBI contiene alrededor de 9300 secuencias para la región ITS2 lo que le da una buena aproximación sin embargo la cantidad mejora con el árbol filogenético construido (Rujirawat et al., 2018).

5.2.2. Riqueza e índices de diversidad

Existió una riqueza similar promedio de OTUs de oomicetos en las muestras de manejo orgánico (5.2 BLAST y 12 árbol filogenético) y convencional (4 BLAST y 11 árbol filogenético), a pesar de las prácticas de fumigación en cultivos con manejo convencional, la incidencia de ciertas enfermedades causadas por patógenos del género *Phytophthora* spp. es similar en los dos tipos de cultivos (Njoroge et al., 2009).

El gráfico de medias (Figura 1) indica un incremento en los parámetros de diversidad alfa en las muestras con manejo orgánico sin embargo las diferencias no fueron

estadísticamente significativas (Tabla 7), un estudio de meta - transcriptoma a través de muestras de suelo de distinto origen y zonas climáticas, reveló que los oomicetos son miembros ubicuos, abundantes y activos en la mayoría de tipos de suelo lo que explica porque no hay diferencias significativas entre los tratamientos de este estudio, ya que estos microorganismos son un elemento estructural de las comunidades naturales de plantas (Geisen et al., 2015).

Muchos de estos patógenos son muy persistentes y desarrollan varias estrategias para permanecer latentes entre los residuos de las plantas (Koike, 2017), uno de estos residuos es la hojarasca la cual es la principal fuente de materia orgánica tanto para el cultivo de cacao como para estos patógenos.

En general el uso de fertilizantes orgánicos debería reducir la cantidad de patógenos en el suelo ya que aumenta la biomasa microbiana y ésta a su vez promueve la competencia entre microorganismos suprimiendo la actividad de algunos patógenos, contrario a lo esperado , los patrones observados en el gráfico de medias (Figura 1) indican un incremento de la diversidad de patógenos, estos resultados concuerdan con el estudio realizado por (Soonvald et al., 2019) donde la fertilización orgánica aumentó significativamente la abundancia relativa de patógenos (oomicetos y hongos) en cultivos rotativos de papa, trigo y cebada.

5.2.3. Análisis permutacional multivariado de varianza

El análisis permutacional multivariado de varianza (PERMANOVA) permitió identificar dos modelos con un efecto significativo sobre la composición de la comunidad de oomicetos en muestras de suelo, estos modelos incluyen al nitrógeno o al cobre. El efecto

del nitrógeno sobre dicha composición concuerda con el estudio realizado por Counce et al. (2013), donde el radio C:N tenía un efecto significativo sobre la estructura de la comunidad de oomicetes en suelo; Qudisia et al.(2017) demostraron que el nitrógeno por sí mismo puede tener efectos positivos sobre el crecimiento y reproducción de microorganismos patogénicos lo cual explicaría el efecto que puede tener sobre la composición de esta comunidad. El cobre está presente en cultivos con manejo orgánico que usan estiércol y abonos de origen animal (Liu et al., 2007) y suele ser la base de muchas formulaciones de fungicidas y productos fitosanitarios usados en el cultivo de cacao lo cual explica porque tiene un efecto sobre la composición de las comunidades de oomicetos (Addo et al., 2013) alterando su abundancia o riqueza.

5.2.4. Abundancia diferencial

Los resultados significativos de abundancia diferencial de OTUs (Figura 5 y 7) se ven afectados por el tipo de asignación taxonómica (BLAST ó árbol filogenético) lo que corrobora la recomendación de Brinkman (2001), es importante acompañar una revisión de la filogenia a cualquier análisis obtenido por BLAST.

Existe una cantidad ligeramente mayor de OTUS diferencialmente abundantes en el manejo orgánico (Figura 7), este tipo de manejo está caracterizado por el uso de fertilizantes orgánicos (abonos y materia orgánica) que deberían mejorar la calidad del suelo reduciendo así la presencia de patógenos, sin embargo la falta de rotación en este tipo de cultivos permite que ciertos patógenos se vuelvan resistentes ya que se especializan y el ciclo de producción de inóculos entre patógeno y hospedero no se interrumpe (Larkin, 2015).

5.3. Diversidad y abundancia de micorrizas

5.3.1. Asignación taxonómica

La filogenia, evolución y biodiversidad de las micorrizas arbusculares se están volviendo un poco más claras, los datos de secuencias filotaxonómicas y de la región LSU todavía son limitados y es posible que el pequeño número de secuencias (55) de referencia en la base de datos Krüger (Krüger et al., 2012) sea la razón por la cual no existieron hits significantes durante la asignación taxonómica con BLAST.

Las dificultades para obtener un árbol filogenético con las secuencias consenso de micorrizas fueron superadas usando la herramienta, FastTree la cual permite obtener árboles filogenéticos con una topología acertada (K. Liu et al., 2011).

La presencia de una mayor cantidad de OTUs de micorrizas en el suelo (2266) que en raíz (1085) se debe a que en el suelo pueden existir propágulos latentes esperando la asociación simbiótica con la raíz (Smith & Read, 2008).

Tanto en suelo como en raíz fue posible observar una mayor cantidad de OTUs exclusivas en los cultivos con manejo orgánico; en las muestras de suelo la distribución fue de 1050 vs 831 OTUs, este patrón es similar al reportado por (Verbruggen et al., 2012) donde señaló que la riqueza de micorrizas arbusculares en suelo aumenta en cultivos con manejo orgánico y se reduce en cultivos con manejo convencional; en las muestras de raíz existe 3 veces más OTUs en el manejo orgánico que en el convencional (772 vs 239), este patrón de distribución es similar al reportado por Gosling et al. (2010).

5.3.2. Riqueza e índices de diversidad

Los resultados de la prueba t- de student para los parámetros de diversidad alfa en las muestras de suelo (Tabla 13) no fueron estadísticamente significativos, esta falta de significancia en los índices de diversidad (Simpson y Shannon) es consistente con los resultados del estudio realizado por (Galván et al., 2009) donde concluyó que el tipo de manejo no influye en la diversidad de micorrizas arbusculares pero lo que si tiene un efecto son las prácticas de producción y las condiciones ambientales; al observar el gráfico de medias (Figura 10) es posible observar un incremento en la riqueza de micorrizas para el manejo orgánico pero los índices de diversidad disminuyen, la riqueza es solo una parte de la diversidad, los índices consideran el número de unidades taxonómicas y su abundancia relativa, puede que exista una mayor cantidad de OTUS pero su abundancia no es muy grande (Simpson, 1949).

Los resultados de la prueba t-de student para los parámetros de diversidad alfa en las muestras de raíz (Tabla 14) indican una diferencia estadísticamente significativa en la riqueza de micorrizas ($p = 0.004$), existe una mayor riqueza de este grupo taxonómico en los cultivos con manejo orgánico, resultados similares fueron reportados por Verbruggen et al. (2012) tanto para micorrizas en suelo como en raíz de tres cultivos de interés. Los índices de diversidad (Simpson y Shannon) no reportaron diferencias significativas, como se mencionó anteriormente el tipo de manejo puede no afectar la diversidad directamente (Galván et al., 2009) pero el hecho de observar patrones que favorecen al manejo orgánico (Figura 11 b, c) son consistentes con los beneficios de utilizar sistemas de manejo convencional reportados por (Verbruggen et al., 2012).

5.3.3. Análisis permutacional multivariado de varianza

Los resultados del análisis permutacional multivariado de varianza en suelo indican que los modelos que incluyen al tipo de manejo junto con la materia orgánica, el fósforo, el magnesio y el manganeso tienen un efecto significativo sobre la composición de la comunidad de micorrizas, estos son factores que afectan a la riqueza y abundancia de las poblaciones de micorrizas en el suelo; se sabe que la materia orgánica tiene un efecto sobre las micorrizas arbusculares, su crecimiento puede ser aumentado o disminuido por la adición o contenido de materia orgánica en el suelo (Gryndler et al., 2009); el contenido de fósforo tiene un efecto sobre la composición de las comunidades de micorrizas, un incremento en este nutriente reduce la riqueza de micorrizas, así lo demostró Verbruggen et al. (2012); por otro lado el magnesio y el manganeso también están relacionados con el funcionamiento micorrícico (Gryndler et al., 2009), se sabe que suelos con abundante concentración de estos micronutrientes favorecen a la aparición de ciertas clases de esporas micorrícicas.

Los resultados del análisis permutacional multivariado de varianza en raíz indican que la composición de las comunidades de micorrizas solo responde al tipo de manejo en los modelos que incluyen pH, cobre y Zinc, como se mencionó anteriormente existen fungicidas a base de cobre que son usados en los cultivos de cacao (Addo et al., 2013), estos fungicidas pueden afectar al funcionamiento de micorrizas ya que inhiben la mitosis de algunos hongos (Yang et al., 2011). Por otro lado el pH junto con el Zinc pueden afectar a la distribución de las comunidades de micorrizas, así lo comprobó Alguacil et al. (2016), estas características del suelo actúan en conjunto.

5.3.4. Abundancia diferencial

Los resultados de abundancia diferencial en las muestras de suelo (Figura 13) muestran que existe un mayor número de OTUs diferencialmente abundantes en los cultivos con manejo convencional. (96 vs 71) esta diferencia no es muy grande y es un reflejo del porque los índices de diversidad no son significativamente distintos, cómo se mencionó anteriormente el tipo de manejo puede o no tener un efecto sobre la diversidad de micorrizas.

En raíz, los resultados de abundancia diferencial (Figura 15) son consistentes con la riqueza de OTUs (163 vs 61), existe casi el doble de OTUs diferencialmente abundantes en el manejo orgánico, sin embargo, la abundancia diferencial (medida como el log2) en cada grupo es similar, razón por la cual los índices de diversidad no son diferentes a nivel estadístico.

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES

La secuenciación masiva paralela de amplicones permitió obtener unidades taxonómicas operacionales para oomicetos y micorrizas, la cantidad de OTUs identificadas para oomicetos mediante el uso de árboles filogenéticos fue mucho mayor que la obtenida mediante BLAST.; en micorrizas solo se utilizó la asignación taxonómica con árbol filogenético.

Se generó un pipeline para cada grupo taxonómico, cada uno con modificaciones que tuvieron que ser adaptadas de acuerdo al tipo de preprocesamiento, agrupación y asignación taxonómica.

La visualización y comparación de la estructura de las comunidades de oomicetos y micorrizas fue posible gracias a los diagramas de Venn y a los gráficos de abundancia diferencial.

Se estimaron los índices de Simpson y Shannon sin embargo no se reportaron diferencias significativas con estos indicadores.

El tipo de sistema de manejo por sí solo no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la diversidad de OTUs de oomicetos en suelo, pero modelos que incluyen al nitrógeno y al cobre tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la composición de estas comunidades.

El tipo de sistema de manejo por sí solo no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la diversidad de OTUS de micorrizas en suelo, pero al incluir los datos del análisis físico-químico el sistema de manejo afecta directamente a la composición de estas comunidades de microorganismos.

La riqueza de micorrizas en las muestras de raíz si se ven afectadas por el tipo de manejo, siendo mayor en los lotes de cacao orgánico, también se pudo evidenciar que el pH y algunos micronutrientes pueden afectar la composición de las comunidades de micorrizas en la raíz.

CAPÍTULO VII RECOMENDACIONES

La robustez de los datos de este estudio se puede incrementar si se usa a futuro una mayor cantidad de muestras, en este caso el presupuesto fue un factor limitante.

El uso de pseudoréplicas con los datos de nutrientes del suelo está justificado en el diseño de los modelos de PERMANOVA sin embargo sería recomendable realizar el análisis de las características fisicoquímicas en cada muestra recolectada.

Las posibilidades de análisis a partir de datos de secuenciación masiva paralela son muy diversas, se pueden probar diferentes combinaciones de herramientas y enfoques a futuro.

Es posible obtener datos más robustos para micorrizas arbusculares, esto requiere una mayor experticia al momento de manejar la compatibilidad entre bases de datos y herramientas bioinformáticas.

CAPÍTULO VIII BIBLIOGRAFÍA

- Addo, P., Yaw, A., & Fei, B. (2013). Impact of Copper-Based Fungicide Application on Copper Contamination in Cocoa Soils and Plants in the Ahafo Ano North District , Ashant Region. *Ecology, Environment and Conservation*, 12(2), 303–310. Recuperado de http://www.envirobiotechjournals.com/article_abstract.php?aid=4567&iid=158&jid=3
- Alfaro, A., Morales, I., & Schneider, M. (2015). Microbial biomass and cellulase activity in soils under five different cocoa production systems in Alto Beni, Bolivia. *Agroforestry Systems*, 89(5), 789–798. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9812-z>
- Alguacil, M. del M., Torres, M. P., Montesinos-Navarro, A., & Roldán, A. (2016). Soil Characteristics Driving Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Semiarid Mediterranean Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3348–3356. <https://doi.org/10.1128/aem.03982-15>
- Amores, F., Palacios, Á., Jiménez, J., & Zhang, D. (2009). *Entorno ambiental, genética, atributos de calidad y singularización del Cacao en el Nor Oriente de la provincia de Esmeraldas*. (2009 Quevedo, EC: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Ed.) (Boletín Té). Quevedo. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1565>
- Andrango, C., Cueva, M., Viera, W., & Duchicela, J. (2016). Evaluation of methods to estimate mycorrhizal inoculum potential in field soils. *Revista Ciencia*, 18(June), 329–352.
- Arcate, J. M., Karp, M. A., & Nelson, E. B. (2006). Diversity of Peronosporomycete (oomycete) communities associated with the rhizosphere of different plant species. *Microbial Ecology*, 51(1), 36–50. <https://doi.org/10.1007/s00248-005-0187-y>
- Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., ... Lanaud, C. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2), 101–108. <https://doi.org/10.1038/ng.736>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., ... Caporaso, J. G. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>
- Brinkman, F. S. L. (2001). Short Specialist Review Phylogenetic analysis of BLAST results, 1–4.
- Buckwell, A., Uhre, A., Williams, A., Poláková, J., Blum, W., Schiefer, J., ... Haber, W. (2014). *The Sustainable Intensification of European Agriculture*. Viena. Recuperado de http://www.risefoundation.eu/images/files/2014/2014_SI_RISE_FULL_EN.pdf
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature*

Methods, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Charvet, E. B. (2012). *Análisis comparativo de agricultura orgánica con agricultura convencional-Estudio de caso del cultivo de Brócoli*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5180/T-PUCE-5406.pdf;jsessionid=04BFE59F33BBA31848B8C37CE02AE756?sequence=1>
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67-72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>
- Coince, A., Caël, O., Bach, C., Lengellé, J., Cruaud, C., Gavory, F., ... Buée, M. (2013). Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. *Fungal Ecology*, 6(3), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.002>
- Cuenca, G., & Meneses, E. (1996). Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cacao in Venezuela. *Plant and Soil*, 183(2), 315–322. <https://doi.org/10.1007/BF00011447>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Freile, J. A., Morgado, M., Pérez, G. A., Alemán, D., & Domínguez, J. (2018). Soil microorganisms and plant diseases associated to cocoa (*Theobroma cacao* L .) genotypes in the Ecuadorian Amazon. *Acta agronómica*, 67, 23–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.60828> Soil
- Galván, G. A., Parádi, I., Burger, K., Baar, J., Kuyper, T. W., Scholten, O. E., & Kik, C. (2009). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza*, 19, 317–328. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0237-2>
- Geisen, S., Tveit, A. T., Clark, I. M., Richter, A., Svenning, M. M., Bonkowski, M., & Urich, T. (2015). Metatranscriptomic census of active protists in soils. *The ISME Journal*, 9, 2178–2190. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.30>
- Gosling, P., Ozaki, A., Jones, J., Turner, M., Rayns, F., & Bending, G. D. (2010). Organic management of tilled agricultural soils results in a rapid increase in colonisation potential and spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi. “*Agriculture, Ecosystems and Environment*”, 139(1–2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.08.013>
- Gryndler, M., Hr, H., Cajthaml, T., Havránková, M., Veronika, Ř., Gryndlerová, H., & Larsen, J. (2009). Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization, 255–266. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0217-y>

- Guest, D. (2007). Black Pod: Diverse Pathogens with a Global Impact on Cocoa Yield. *Phytopathology*, 97(12), 1650–1653. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1650>
- Han, M. V., & Zmasek, C. M. (2009). phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-356>
- Hart, M. M., Aleklett, K., Chagnon, P., Egan, C., Ghignone, S., Helgason, T., ... Waller, L. (2015). Navigating the labyrinth : a guide to sequence-based , community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi Methods Navigating the labyrinth : a guide to sequence-based , community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 207(1), 235–247. <https://doi.org/10.1111/nph.13340>
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., & Widmer, F. (2015). Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal*, 9(5), 1177–1194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>
- Hernández, I. O., Huber, D., Luévanos, M., Hernández, F., Sáenz, J., & Balagurusamy, N. (2014). Metagenómica: Concepto y Aplicaciones en el Mundo Microbiano. En M. C. Cueto, N. M. De la Fuente, & M. P. Luévanos (Eds.), *Fornteras En Microbiología Aplicada* (pp. 185–207). Universidad Autónoma de Coahuila. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/301890708_Metagenomica_Concepto_y_Aplicaciones_en_el_Mundo_Microbiano
- INEC. (2017). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2017*. Quito. Recuperado de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- INIAP. (2014). Cacao. Recuperado el 6 de agosto de 2018, de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mcafec/rcacao>
- Jurkowski, A., & Reid, A. (2007). Understanding our Microbial Planet-The new science of Metagenomics. *National Academy of Sciences*, 1–24.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 169–188. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>
- Koike, S. T. (2017). Soilborne diseases of vegetable crops. *Crops & Soils*, 49(2), 42. <https://doi.org/10.2134/cs2016-49-2-11>
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., & Schübler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*, 193(4), 970–984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x>
- Larkin, R. P. (2015). Soil Health Paradigms and Implications for Disease Management. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 199–221. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614->

120357

- Leiva, E., Osorio, M., & Ramírez, R. (2015). Microorganismos asociados a la rizósfera del cacao (*Theobroma cacao*) en condiciones de bosque húmedo premontano (Bh-PM). *Suelos Ecuatoriales*, 43(June), 35–45.
- Lemanceau, P., Maron, P. A., Mazurier, S., Mougél, C., Pivato, B., Plassart, P., ... Wipf, D. (2014). Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 67–81. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0247-0>
- Li, L. F., Li, T., Zhang, Y., & Zhao, Z. W. (2010). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(3), 418–427. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00815.x>
- Liu, B., Tu, C., Hu, S., Gumpertz, M., & Ristaino, J. B. (2007). Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight. *Applied Soil Ecology*, 37(3), 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.06.007>
- Liu, K., Linder, C. R., & Warnow, T. (2011). RAxML and FastTree: Comparing two methods for large-scale maximum likelihood phylogeny estimation. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027731>
- López, M., Lopez, I., España, M., Izquierdo, A., & Herrera, L. (2007). Efecto de la fertilización inorgánica sobre la disponibilidad de nutrientes en el suelo, nivel nutricional de la planta y hongos micorrízicos arbusculares en plantaciones de *Theobroma cacao*. *Agronomía Tropical*, 57(1), 31–43. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2007000100005
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mäder, P., Fließbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P., Niggli, U., ... May, N. (2008). Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. *Science*, 296(5573), 1694–1697. <https://doi.org/10.1126/science.1071148>
- McNeil, C. (2006). *Chocolate in Mesoamerica: A Cultural History of Cacao*. (C. McNeil, Ed.). Gainesville: University Press of Florida gainesville. Recuperado de <https://elespejohumeante.files.wordpress.com/2017/03/chocolate-in-mesoamerica.pdf>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. En *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* (pp. 1–8). IEEE. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

- Morgan, K., & Murdoch, J. (2000). Organic vs. conventional agriculture: Knowledge, power and innovation in the food chain. *Geoforum*, 31(2), 159–173. [https://doi.org/10.1016/S0016-7185\(99\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0016-7185(99)00029-9)
- Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380–386. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800156>
- Motamayor, Juan C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- Njoroge, S. M. C., Kabir, Z., Koike, S. T., & Subbarao, K. V. (2009). Comparison of Crop Rotation for Verticillium Wilt Management and Effect on Pythium Species in Conventional and Organic Strawberry Production. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0519>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., ... Maintainer, H. W. (2019a). Package “vegan” *Community Ecology Package - Version 2.5-5*. Recuperado de <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., ... Maintainer, H. W. (2019b). Package “vegan” *Title Community Ecology Package*. Recuperado de <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>
- Oliveira, R., Viana, A., Reátegui, A., & Vincentz, M. (2015). An efficient method for simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from various plant tissues. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 18828–18838. <https://doi.org/10.4238/2015.December.28.32>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Qudsia, H., Javaid, A., Mahmood, R., & Akhtar, N. (2017). *Correlation between soil chemical characteristics and soil-borne mycoflora in cucumber tunnels* (Vol. 49). Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/313875506>
- R Development Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Reese, A. T., & Dunn, R. R. (2018). Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance. *mBio*, 9(4), 1294–1318. <https://doi.org/10.1128/mBio.01294-18>
- Reganold, J. P., & Wachter, J. M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature plants*, 2(February), 15221. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.221>
- Rice, R. A., & Greenberg, R. (2000). Cacao Cultivation and the Conservation of Biological

- Diversity. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 29(3), 167–173. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-29.3.167>
- Riit, T., Tedersoo, L., Drenkhan, R., Runno-Paurson, E., Kokko, H., & Anslan, S. (2016). Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *MycoKeys*, 14, 17–30. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.14.9244>
- Riit, T., Tedersoo, L., Drenkhan, R., Runno-Paurson, E., Kokko, H., & Anslan, S. (2018). Corrigendum for: “Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding” published in *MycoKeys*, doi: 10.3897/mycokeys.14.9244. *MycoKeys*, (41), 119–120. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.41.30558>
- Rujirawat, T., Patumcharoenpol, P., Lohnoo, T., Yingyong, W., Kumsang, Y., Payattikul, P., ... Kittichotirat, Weerayuth Krajaejun, T. (2018). Probing the Phylogenomics and Putative Pathogenicity Genes of *Pythium insidiosum* by Oomycete Genome Analyses. *Scientific Reports*, 8(4135), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22540-1>
- Sánchez, F. M., Montufar, J. Z., Chang, J. V., Ramos Remache, R., Fiallos, F. G., & Montúfar, G. V. (2014). Productividad de clones de cacao tipo nacional en una zona del bosque humedo tropical de la provincia de los Rios, Ecuador. *Ciencia y Tecnologia*, 7(1), 33–41. Recuperado de http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V7 N1 3Morante.pdf
- Schneider, M., Andres, C., Trujillo, G., Alcon, F., Amurrio, P., Perez, E., ... Milz, J. (2017). Cocoa and total systems yields of organic and conventional agroforestry vs. monoculture systems in a long-term field trial in Bolivia. *Experimental Agriculture*, 53(3), 351–374. <https://doi.org/10.1017/S0014479716000417>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Silva, A., Mongollón, Á., & Delgado, H. (2017). Soil microbiota: Influence of different land use patterns and soil management factors at Villavicencio Oxisol, East Colombia. *Biota Colombiana*, 18(2), 10. <https://doi.org/10.21068/c2017.v18n02a1>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140(3–4), 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017>
- Smith, S., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. *Mycorrhizal Symbiosis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Soonvald, L., Loit, K., Runno-Paurson, E., Astover, A., & Tedersoo, L. (2019). The role of long-term mineral and organic fertilisation treatment in changing pathogen and symbiont

- community composition in soil. *Applied Soil Ecology*, 141(November 2018), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.003>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Triano, A., Palma, D., Salgado, S., Lagunes, L., & Córdova, V. (2016). Nutrición orgánica en plantaciones de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) en Tabasco, México). *Agroproductividad*, 9(12), 39–44. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2587-8>
- Van Der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., ... Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), 69–72. <https://doi.org/10.1038/23932>
- Velivelli, S., Kromann, P., Lojan, P., Rojas, M., Franco, J., Suarez, J. P., & Prestwich, B. D. (2015). Identification of mVOCs from Andean Rhizobacteria and Field Evaluation of Bacterial and Mycorrhizal Inoculants on Growth of Potato in its Center of Origin. *Microbial Ecology*, 69(3), 652–667. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0514-2>
- Verbruggen, E., van der Heijden, M. G. A., Weedon, J., Kowalchuk, G., & Rölíng, W. (2012). Community assembly, species richness and nestedness of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Molecular Ecology*, 21, 2341–2353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05534.x>
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., & Gan, Y. (2011). Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms. *ISRN Ecology*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>
- Zarrillo, S., Gaikwad, N., Lanaud, C., Powis, T., Viot, C., Lesur, I., ... Valdez, F. (2018). The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. *Nature Ecology and Evolution*, 2(12), 1879–1888. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0697-x>