

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE HÁBITAT, INFRAESTRUCTURA Y CREATIVIDAD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

**Análisis computacional del microbioma del suelo en maní (*Arachis hypogaea L.*) en
respuesta a la inoculación de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636**

Autora: Alba Nepas, Jessica Maribel

Sergio Alan Cervantes Perez, PhD.

Director del Trabajo de Titulación

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, en primer lugar, a **Dios** por brindarme la fortaleza y resiliencia necesaria para alcanzar cada una de mis metas. Extiendo también mi gratitud a todas las personas que, de una u otra forma, han contribuido al desarrollo de esta tesis. A mi **familia**, por su amor incondicional, por su confianza y por estar siempre a mi lado en cada etapa. Sin su apoyo, nada de esto hubiera sido posible.

A mi tutor el **Dr. Sergio Alan Cervantes Pérez**, por su apoyo constante, orientación y valiosos comentarios durante todo el proceso. Gracias por su paciencia y por guiarme a través de este reto académico.

Al **M.Sc. Paul López**, cuyo entusiasmo y pasión por la ciencia despertaron en mí el interés por la investigación. Le agradezco profundamente por haber sembrado en mí la curiosidad científica, por motivarme a retomar un tema en el que colaboré tiempo atrás y que se convirtió en el eje de mi maestría.

A mis **compañeros** y **amigos** maestrantes, por sus palabras de aliento y por compartir su conocimiento, a pesar de que también se encontraban extremadamente estresados por realizar sus proyectos. Todas estas experiencias enriquecieron significativamente este camino.

Finalmente, a todas aquellas personas que, aunque no los he mencionado directamente, fueron apoyo. A todos, ¡gracias por hacer posible este logro!

“I hope that you get everything you want in this biutyful life.”

Coldplay

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I: Introducción	3
1.1 Antecedentes	3
Justificación del Problema	6
Objetivos de la Investigación	8
Objetivos Específicos	8
Alcance	9
Capítulo II: Revisión de la literatura	10
2.1 Maní.....	10
Origen e importancia.....	10
2.2 Microorganismos Benéficos	10
<i>Trichoderma harzianum</i>	11
2.3 Estructura de Nichos y Diversidad Funcional en cuanto a salud del suelo.....	12
2.3.1 Teoría de la Estructura de Nichos	12
2.3.2 Prácticas Agrícolas y Diversidad Microbiana.....	12
2.3.3 Diversidad Microbiana y Funcionalidad del Suelo.....	12
2.4 Técnicas de Análisis del Microbioma	12
2.4.1 Métodos Basados en Cultivo	12
2.4.2 Técnicas Moleculares Basadas en ADN	13
2.4.3. Técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS)	13
2.4.4 Técnicas Basadas en Espectrometría y Microscopía	15
2.4.5 Software y Herramientas Computacionales para el Análisis	15
Capítulo III: Metodología	16
3.1 Obtención de datos y metadatos.....	16

3.2 Procesamiento de secuencias crudas en línea de comandos para obtener forward y reverse	20
3.3 Procesamiento de secuencias en R	20
3.3.1 Instalación de librerías y carga de datos	20
3.3.2 Control de calidad y rasurado de secuencias	20
3.3.3 Inferencia de secuencias (ASVs)	21
3.3.4 Unión de pares (merge) y Construcción de tabla de secuencias	21
3.3.5 Eliminación de quimeras.....	21
3.4 Asignación taxonómica	21
3.5 Curva de rarefacción.....	22
3.6 Análisis descriptivo de abundancia.....	22
3.7 Análisis estadísticos	23
3.7.1 Análisis de diversidad beta mediante ordenación no métrica por escalamiento multidimensional (NMDS)	23
3.7.2 Análisis de diversidad beta mediante ordenación canónica redundante (RDA)	24
3.7.3 Predicción funcional	24
3.7.4 Flujo de trabajo	24
Capítulo IV: Resultados	25
4.1 Control de calidad y procesamiento de secuencias en R, de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, para los periodos de noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.....	25
4.1.1 Resultados del control de calidad: obtención de secuencias confiables para el análisis de diversidad microbiana.	25
4.2 Curva de rarefacción, de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, para los periodos de noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016. 29	29
4.2.1 Análisis de la riqueza y profundidad de las secuencias en los en los períodos de estudio.	29

4.3 Abundancia relativa de las secuencias de metagenómica de amplicón 16S, para los periodos de noviembre 2014 a abril 2015 y noviembre 2015 a abril 2016.....	30
4.4 Análisis del perfil funcional del microbioma del suelo según el tratamiento, a partir de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, correspondientes a los periodos noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.	34
4.5 Índices de diversidad del microbioma del suelo según el tratamiento, a partir de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, correspondientes a los periodos noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.	36
4.5.1 Impacto de los tratamientos en la diversidad alfa del microbioma del suelo durante 2014–2016.....	36
4.5.2 Impacto de los tratamientos en la diversidad beta del microbioma del suelo durante 2014–2016.....	38
Capítulo V: Discusión.....	42
5.1 Calidad de Datos y Profundidad de Secuenciación.....	42
5.2 Caracterización Taxonómica y Estructura de la Comunidad Bacteriana.....	43
5.3 Diversidad Alfa y Beta: Efectos del Tiempo y Tratamiento.....	45
5.4 Perfil Funcional Inferido y Potencial Impacto de <i>Trichoderma</i>.....	46
Capítulo VI: Conclusiones.....	48
Capítulo VII Recomendaciones.....	49
Capítulo VIII: Referencias.....	50
Capítulo IX: Anexos.....	60

Índice de Figuras

Figura 1. Script en líneas de comando.....	20
Figura 2. Mapa de calor de comprobaciones del estado de las secuencias.....	26
Figura 3. Curva de rarefacción que muestran la riqueza de ASVs por muestra.	30
Figura 4. Mapa de calor de la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más abundantes por muestra.	32
Figura 5. Abundancia relativa de familias bacterianas por muestra representada en gráficos de barras apiladas.....	33
Figura 6 . Efecto de los Tratamientos sobre la Abundancia Relativa de Potenciales Funciones Metabólicas Microbianas del Suelo.....	35
Figura 7 . Índices de diversidad alfa por tratamiento.	37
Figura 8 . Visualización de la diversidad beta bacteriana mediante NMDS (distancia Bray-Curtis).	40
Figura 9. Análisis de Redundancia (RDA) de la composición bacteriana explicada por pretratamiento y Año.	41

Índice de Tablas

Tabla 1	<i>Características de la biblioteca</i>	17
Tabla 2	<i>Datos metagenómicos de Muestras de suelo de campos de producción de maní Lecturas de secuencia en bruto 2014-2015.</i>	18
Tabla 3	<i>Datos metagenómicos de Muestras de suelo de campos de producción de maní Lecturas de secuencia en bruto 2014-2015.</i>	19
Tabla 4	<i>Reporte numérico y resumido de MultiQC.</i>	27
Tabla 5	<i>Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los índices de diversidad alfa.</i>	37
Tabla 6	<i>Resultados del Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) para la diversidad beta bacteriana.</i>	39
Tabla 7	<i>Resumen de las pruebas de permutación para el Análisis de Redundancia (RDA).</i>	40

Índice de Anexos

Anexos 1 <i>Archivos resultantes del procesamiento realizado a través de la línea de comandos.</i>	60
Anexos 2 <i>Visualización de los análisis de control de calidad A) el entorno R, y B) la plataforma Galaxy</i>	60
Anexos 3 <i>Archivo phyloseq en formato RD pipeline. Enlace:</i>	61
Anexos 4 <i>Pipeline de trabajo bioinformático para el análisis de datos de amplicón.....</i>	61

Resumen

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) es crucial económica y nutricionalmente, pero su producción enfrenta desafíos. La inoculación con microorganismos beneficiosos como *Trichoderma harzianum* es una estrategia sostenible prometedora. Este estudio tuvo como objetivo evaluar, mediante análisis computacional, el impacto de la inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 en la composición y funcionalidad del microbioma bacteriano del suelo en cultivos de maní, utilizando datos públicos de secuenciación del amplicón 16S rRNA (Proyecto SRA: PRJNA471338) correspondientes a dos periodos (2014-15 y 2015-16) y tres condiciones: suelo inicial (CondicionIni), suelo con maní sin inocular (TratamientoControl) y suelo con maní inoculado (InoculacionTricho). Se aplicó un pipeline bioinformático en R (DADA2, phyloseq, vegan, microeco) para control de calidad, inferencia de ASVs, asignación taxonómica (SILVA), análisis de diversidad alfa/beta y predicción funcional (FAPROTAX). Los resultados mostraron datos de alta calidad y profundidad de secuenciación adecuada. Se identificó un núcleo bacteriano estable (*Gemmatimonas*, *Acidiferrimicrobium*, *Candidatus Solibacter*, *Sphingomonas*) y una alta proporción de taxones raros. La diversidad alfa fue menor en la condición inicial, pero similar entre los tratamientos control e inoculación. La diversidad beta reveló diferencias significativas globales (PERMANOVA), pero el análisis RDA indicó que la variación temporal (Año) fue un factor más influyente que el tratamiento *per se* en la estructura comunitaria. Sin embargo, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 se asoció significativamente con un mayor potencial funcional inferido para ciclos clave de nitrógeno (oxidación de amonio, nitrificación) y azufre (respiración de sulfato/compuestos de azufre). Se concluye que, si bien *T. harzianum* ITEM 3636 no alteró drásticamente la estructura bacteriana dominante, sí moduló selectivamente el potencial funcional del microbioma, particularmente en vías relevantes para la disponibilidad de nutrientes.

Palabras Clave: *Arachis hypogaea*, *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, microbioma del suelo, metagenómica de amplicón, 16S rRNA, diversidad bacteriana, potencial funcional, bioinformática.

Abstract

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) crop is economically and nutritionally crucial, however, it is very challenging in terms of production. The inoculation with beneficial microorganisms like *Trichoderma harzianum* offers a promising sustainable strategy. This study aimed to computationally evaluate the impact of *T. harzianum* ITEM 3636 inoculation on the composition and functionality of the soil bacterial microbiome in peanut crops, using public 16S rRNA amplicon sequencing data (SRA Project: PRJNA471338) from two periods (2014-15 and 2015-16) and three conditions: initial soil (CondicionIni), soil with uninoculated peanut (TratamientoControl), and soil with inoculated peanut (InoculacionTricho). A bioinformatics pipeline in R (DADA2, phyloseq, vegan, microeco) was applied for quality control, ASV inference, taxonomic assignment (SILVA), alpha/beta diversity analysis, and functional prediction (FAPROTAX). Results showed high-quality data and adequate sequencing depth. A stable core bacteriome (*Gemmatimonas*, *Acidiferrimicrobium*, *Candidatus Solibacter*, *Sphingomonas*) and a large proportion of rare taxa were identified. Alpha diversity was lower in the initial condition but similar between Control and Inoculation treatments. Beta diversity revealed significant overall differences (PERMANOVA), but RDA indicated that temporal variation (Year) was a more influential factor than the treatment *per se* on community structure. However, *T. harzianum* ITEM 3636 inoculation was significantly associated with a higher inferred functional potential for key nitrogen (ammonia oxidation, nitrification) and sulfur cycles (sulfate/sulfur compound respiration). It is concluded that while *T. harzianum* ITEM 3636 did not drastically alter the dominant bacterial structure, it selectively modulated the microbiome's functional potential, particularly in pathways relevant to nutrient availability.

Keywords: *Arachis hypogaea*, *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, soil microbiome, amplicon metagenomics, 16S rRNA, bacterial diversity, functional potential, bioinformatics

Capítulo I: Introducción

1.1 Antecedentes

De acuerdo con la organización para los alimentos y agricultura (FAO por sus siglas en inglés), el sector agrícola ha experimentado un crecimiento significativo para la economía global (Knežević, 2024). De hecho, el valor de la agricultura global ha aumentado en un 89% en los últimos dos décadas, llegando a los 3.8 billones de USD en 2022. A pesar de este aumento, la aportación de la agricultura a la producción económica global ha sido relativamente constante, mientras que el porcentaje de trabajadores globales empleados en la agricultura ha descendido del 40% en 2020 al 26% en 2022.

Además, la producción alimentaria ha continuado en aumento, el hambre continúa siendo un desafío constante. En 2023, la cantidad de individuos que carecían de alimentación oscilaba entre 713 y 757 millones. Más del 25 % de los adultos de las Américas, Europa y Oceanía es obeso, lo que refleja el reto mundial que implica garantizar el acceso a alimentos saludables y nutritivos (Knežević, 2024).

El crecimiento de la producción agrícola ha estado acompañado de un aumento en el uso de insumos químicos que contaminan los mantos acuíferos y suelos. En 2022, la producción mundial de cultivos primarios alcanzó los 9 600 millones de toneladas, un incremento del 56 % en comparación con el año 2000. Entre 2000 y 2022, el uso de plaguicidas se incrementó en un 70%; mientras que, en 2022, en las Américas se elevó a la mitad del uso mundial total. En 2022, los abonos inorgánicos empleados en la agricultura llegaron a 185 millones de toneladas de nutrientes; el 58% de este total corresponde al nitrógeno. Esto implica un aumento del 37% respecto al año 2000 (Knežević, 2024). Todos estos cambios han generado desafíos ambientales importantes, como es el caso de la erosión en suelos de cultivos comerciales y su contaminación debido a las malas prácticas agrícolas (Cotler et al., 2020).

En este contexto, resulta crucial la necesidad de buscar por soluciones alternativas que sean amigables con el ambiente. En este sentido, comprender de manera más profunda las interacciones entre el microbioma del suelo y cultivos con relevancia agrícola y económica, se vuelve crucial con el fin de promover la sostenibilidad y mejorar la productividad.

Una especie de gran relevancia económica y nutricional a nivel mundial es el maní (*Arachis hypogaea L.*) un ejemplo de sistema agrícola donde la interacción del microbioma del suelo juega un papel fundamental. El maní (*Arachis hypogaea L.*) es una especie vegetal procedente de Sudamérica, que se encuentra en la cuarta posición mundial en términos de importancia para la producción de aceite de origen vegetal apto para el consumo; su semilla alberga antioxidantes, grasas, carbohidratos, fibras naturales, vitaminas, minerales y proteínas (Montero, 2020).

En este escenario, destaca un país latinoamericano; Argentina, que se posiciona como uno de los principales exportadores de maní a nivel mundial, su relevancia resalta también en la nutrición a escala global (Ministerio de Agricultura et al., 2018). En el caso de Ecuador, existe un potencial para aumentar su competitividad en mercados internacionales con estrategias adecuadas de mejora genética, sostenibilidad, y certificaciones. Sin embargo, el país cuenta con normativas relacionadas con la utilización de organismos genéticamente modificados (OGM), lo que ha limitado la aplicación de algunas de estas estrategias de mejora genética. No obstante, el INIAP y otras entidades han colaborado en proyectos de certificación de semillas con el fin de asegurar la calidad y el acceso a los agricultores (Velásquez et al., 2008). Las principales zonas productoras de maní en Ecuador incluyen Manabí, Guayas, y Esmeraldas. El maní ecuatoriano tiene potencial para mercados como Estados Unidos, Europa y Asia, donde hay alta demanda de productos saludables y sostenibles. A pesar de que ha aumentado su rendimiento por hectárea, las ventas en dólares han disminuido (Cáceres et al., 2021).

El uso de microorganismos beneficiosos ha demostrado ser una estrategia prometedora para mejorar la salud del suelo y aumentar la productividad agrícola, al tiempo que reduce la dependencia de insumos químicos como fertilizantes y pesticidas (Cuadras et al., 2021). Un ejemplo destacado es *Trichoderma*, ampliamente utilizado por sus efectos positivos en el crecimiento vegetal y la protección contra patógenos (Meyer et al., 2022). Sin embargo, debido a la complejidad del microbioma del suelo y su interacción con las plantas, es necesario un análisis minucioso para identificar los efectos específicos de la inoculación de estos microorganismos, es por esta razón que el análisis metagenómico proporciona una visión integral y detallada de las dinámicas microbianas en el suelo.

El análisis metagenómico ha surgido como una herramienta potente para estudiar la composición y el funcionamiento del microbioma del suelo, en respuesta a la inoculación de microorganismos

ventajosos. Gracias a la bioinformática, es posible procesar grandes volúmenes de datos genómicos y obtener una visión integral de los cambios en la estructura microbiana del suelo tras la aplicación de *Trichoderma*, facilitando así la toma de decisiones para optimizar su uso en sistemas agrícolas (Oliveira et al., 2023).

Justificación del Problema

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) tiene una gran relevancia económica y agrícola a nivel mundial, siendo un alimento básico en muchas regiones y una fuente de ingresos para pequeños y grandes productores. No obstante, la productividad y la salud de este cultivo se pueden ver afectadas por factores como enfermedades del suelo, la degradación de la calidad del suelo, y la competencia microbiana. Para incrementar la eficiencia y sostenibilidad en la producción de maní, es crucial entender mejor los factores que influyen en la biodiversidad microbiana del suelo, el cual juega un papel fundamental en la nutrición de las plantas y la protección contra patógenos.

La aplicación de inoculantes biológicos, como *Trichoderma harzianum*, ha emergido como una estrategia prometedora para mejorar la salud del suelo y promover el crecimiento de las plantas, al mejorar la disponibilidad de nutrientes y estimular la defensa contra enfermedades (Hernández et al., 2019). *Trichoderma harzianum*, un hongo con propiedades antagonicas contra patógenos del suelo y capacidad de promover el crecimiento vegetal podría modificar la estructura y composición del microbioma del suelo en favor de las plantas, lo cual, en el caso del maní, podría traducirse en una mayor productividad y resistencia a enfermedades.

En este escenario, análisis computacional del microbioma del suelo resulta crucial para entender las relaciones entre las comunidades de microorganismos existentes antes y después de la inoculación con *Trichoderma harzianum*. En base a los datos recabados de bases de datos públicas de metagenómica, combinados con el empleo de instrumentos de biología computacional y bioinformática, se busca generar resultados que faciliten el análisis y entendimiento de los cambios en la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo. Lo que facilitaría la comprensión de los efectos y ventajas resultantes de la inoculación de microorganismos, contribuyendo a una mejor comprensión de su influencia en el ecosistema del suelo (Hernández et al., 2019).

La integración de enfoques computacionales no solo permite analizar grandes volúmenes de datos genómicos, sino también identificar patrones que podrían pasar desapercibidos con métodos tradicionales. Es así como, este tema adquiere relevancia no solo desde una perspectiva académica, sino también por sus implicaciones prácticas en la agricultura moderna. Frente a la creciente

demanda por prácticas agrícolas más sostenibles, los resultados de este análisis podrían ofrecer soluciones efectivas para mejorar la productividad de los cultivos, reducir el uso de agroquímicos y promover un manejo más eficiente de los recursos naturales (Etchevers, Cotler, & Hidalgo, 2020).

Objetivos de la Investigación

Evaluar composición y funcionalidad del microbioma del suelo en cultivo de maní (*Arachis hypogaea L.*) inoculado con *T. harzianum* ITEM 3636.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la diversidad taxonómica y funcional de los microbiomas en el suelo de cultivo de maní (*Arachis hypogaea L.*), utilizando métodos computacionales.
- Determinar la diversidad y estructura de las comunidades de bacterias, entre las diferentes condiciones experimentales en cultivo de maní (*Arachis hypogaea L.*).
- Comparar las diferencias y similitudes en las comunidades bacterianas de las distintas muestras de suelo, bajo tres condiciones: suelo sin intervención, suelo con maní sembrado sin inocular, y suelo con maní inoculado con *T. harzianum* ITEM 3636.

Alcance

El alcance de este estudio se enfoca en el análisis computacional de datos provenientes de investigaciones sobre la inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 en el microbioma del suelo de cultivos de maní (*Arachis hypogaea* L.). El objetivo es evaluar el impacto de dicha inoculación en la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo. Con el uso de herramientas bioinformáticas y secuenciación metagenómica, se analizarán los cambios en la diversidad microbiana y su posible relación con la productividad del cultivo, la disponibilidad de nutrientes y la supresión que enfrenta ante los patógenos (Cambero et al., 2023). Además, este enfoque permitirá proporcionar soluciones prácticas para la agricultura moderna, fomentando prácticas mucho más sostenibles, reduciendo el uso de agroquímicos y optimizando el manejo de recursos naturales (Matailo et al., 2023).

Capítulo II: Revisión de la literatura

2.1 Maní

Origen e importancia

El maní (*Arachis hypogaea L.*) es la tercera especie leguminosa de relevancia global, procedente de Sudamérica. Esta especie fue extensamente cultivada por los indígenas del nuevo mundo durante la expansión europea del siglo XVI y se distribuyó en Europa, África, Asia y las Islas del Pacífico. Es posible que la especie *Arachis hypogaea L.*, tuviera orígenes en el sur de Bolivia y el noreste de Argentina, a lo largo de los 25° S. Las condiciones meteorológicas y geográficas de esta zona son de las más fluctuantes a nivel global. Se considera al maní como el prototipo y biosistemáticamente se considera una variante silvestre de *Arachis hypogaea L.*, (Rimachi et al., 2012). La semilla es una fuente rica en antioxidantes, grasas, proteínas, carbohidratos, fibras crudas, vitaminas y minerales esenciales. Con cerca del 26% de proteína, el 48% de aceite y el 3% de fibra, así como un elevado contenido de calcio, tiamina y niacina, posee todo el potencial para ser empleado como un suplemento dietético económico para luchar contra la desnutrición. Su relevancia radica no solo en su valor nutricional, sino también en su contribución a la seguridad alimentaria y la cadena alimenticia (Montero, 2020). De acuerdo con el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (2004), se plantan entre 15.000 y 20.000 hectáreas anuales en el país, siendo las provincias que mayormente producen: Loja, Manabí, El Oro y Guayas, se han transformado en un cultivo estratégico para la intensificación sostenible gracias a su alta fijación de nitrógeno.

2.2 Microorganismos Benéficos

Los microorganismos benéficos comprenden diversos grupos con funciones clave en los ecosistemas, especialmente en la agricultura sostenible. Entre ellos se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), como *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*, que favorecen la nutrición y salud de las plantas mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas). Indirectamente, las PGPR pueden inducir resistencia sistémica (ISR) en la planta contra patógenos, ejercer antagonismo directo contra estos mediante la producción de antibióticos o la competencia por

espacio y nutrientes, y estimular la proliferación de otros microorganismos beneficiosos en el entorno radicular (Mujica et al., 2017). También destacan los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), como *Glomus* y *Rhizophagus*, que mejoran la absorción de nutrientes y fortalecen la resistencia al estrés. Las actinobacterias, como *Streptomyces*, participan en la descomposición de materia orgánica y en la producción de compuestos antimicrobianos. Las cianobacterias, como *Nostoc* y *Anabaena*, fijan nitrógeno en ambientes acuáticos y suelos, incrementando la fertilidad. Asimismo, hongos filamentosos como *Trichoderma* y levaduras como *Saccharomyces* actúan como biocontroladores y estimulan la respuesta inmune de las plantas.

Trichoderma harzianum

Descripción y su papel crucial en el suelo y crecimiento de las plantas

Trichoderma es un hongo filamentosamente conocido y utilizado en la agricultura debido a sus propiedades como agente de biocontrol y promotor del crecimiento vegetal. Perteneció al género *Trichoderma*, y se caracteriza por su capacidad para colonizar raíces y actuar contra patógenos de plantas (López et al., 2011; Cano, 2011). Además, posee características antagónicas frente a hongos del suelo, en particular de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Oidium* y *Fusarium*, entre otros. *Trichoderma* posee varios mecanismos de acción como la antibiosis, micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio.

Además, González et al., (2022) mencionan que *Trichoderma* actúa como un hiperparásito competitivo, mediante la producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas y compuestos antimicrobianos que degradan o inhiben a hongos patógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia* o *Pythium*.

Adicionalmente, se ha demostrado que *Trichoderma* contiene metabolitos que inducen mecanismos de resistencia en las plantas, y produce toxinas y antibióticos (Alvarado et al., 2019). Asimismo, este hongo contribuye a la formación de agregados estables en el suelo gracias a la estimulación de exudados radiculares y a la producción de polisacáridos y a su interacción con raíces y partículas minerales (Mesa et al., 2019).

2.3 Estructura de Nichos y Diversidad Funcional en cuanto a salud del suelo

2.3.1 Teoría de la Estructura de Nichos

Barahona et al., (2021) señalan que, los organismos no solamente son seleccionados por el ambiente, sino que también tienen la capacidad de influir activamente en él, transformando al medio y sesgando a las poblaciones y otras que se encuentren bajo su zona de influencia. En el contexto de los sistemas agrícolas, esta interacción recíproca se manifiesta, por ejemplo, en la diversidad microbiana, la cual puede estar influenciada por la diversidad de nichos ecológicos disponibles, como diferentes tipos de materia orgánica y variaciones en el pH del suelo (Hanson et al., 2008).

2.3.2 Prácticas Agrícolas y Diversidad Microbiana

La relación esperada es que las prácticas agroecológicas aumentan la diversidad microbiana en comparación con sistemas agrícolas convencionales. Esto se basa en la idea de que estas prácticas promueven una mayor heterogeneidad en el suelo, lo que facilita la presencia de una gama más amplia de especies microbianas (Reganold et al., 1993).

2.3.3 Diversidad Microbiana y Funcionalidad del Suelo

Se espera que una mayor diversidad microbiana conduzca a una mayor funcionalidad del suelo, ya que diferentes especies microbianas contribuyen a una variedad de procesos biogeoquímicos (Tilman, 1999; Cruz et al., 2023).

2.4 Técnicas de Análisis del Microbioma

2.4.1 Métodos Basados en Cultivo

Técnicas como el empleo de placas de cultivo en medios selectivos para aislar microorganismos particulares, el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para una estimación aproximada de bacterias y hongos viables, y métodos de enriquecimiento que promueven el desarrollo de los más complicados de cultivar; no obstante, estos procedimientos poseen la significativa restricción de identificar solo microorganismos cultivables, que constituyen menos del 1% del microbioma total del suelo (Escalante et al., 2004).

2.4.2 Técnicas Moleculares Basadas en ADN

El estudio del microbioma terrestre inicia con la extracción del ADN completo, empleando técnicas comerciales como kits (MoBio, Qiagen) o procedimientos caseros (fenol-cloroformo). Su cantidad y pureza se determinan a través de espectrofotometría (Nanodrop) o fluorometría (Qubit), y su integridad se confirma a través de electroforesis en gel de agarosa. Después, se utilizan la PCR tradicional para amplificar genes de interés (tales como 16S rRNA, ITS, o genes funcionales como *nifH* y *amoA*), y qPCR (PCR en tiempo real) para medir la abundancia de especies particulares o genes funcionales (Donaire et al., 2017).

2.4.3. Técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

Estas técnicas posibilitan el análisis masivo y simultáneo de millones de secuencias, revolucionando la microbiología agrícola y ambiental. Tal es el caso de la secuenciación de amplicones, enfocada en genes señalizadores taxonómicos como el 16S rRNA (bacterias/arqueas), ITS (hongos) o 18S rRNA (protistas) (Xu et al., 2020). Esta técnica es frecuentemente ejecutada en plataformas como Illumina MiSeq o PacBio, que posibilitan un estudio minucioso de la diversidad y composición de los microorganismos, manipulando los datos con instrumentos bioinformáticos como QIIME2, DADA2 o Mothur (Arteaga, 2016; Valdés, 2022).

2.4.3.1 Metagenómica

Es el análisis de genomas presentes en una muestra ambiental, posee la habilidad de establecer conexiones entre microorganismos cultivables y no cultivables de la comunidad microbiana, de un anfitrión y el fenotipo de este anfitrión (Martínez et al., 2022). Como herramienta ha propiciado un significativo progreso para la ciencia, al permitir la obtención de nuevos genes y entender la interrelación entre comunidades de microorganismo. Lo que ha facilitado en conjunto con otras áreas como la genética y la bioinformática, el análisis de los genomas de toda una comunidad ambiental sin la necesidad de un cultivo previo o del aislamiento de los microorganismos. Lo que ha proporcionado más datos acerca de la composición microbiana de un nicho ecológico, su historia evolutiva, las interacciones entre microorganismos y el potencial metabólico de toda la información que se podría obtener de las poblaciones cultivables (Rivera et al., 2021).

Como señala el Comité de Investigación del National Research Council (US) sobre Metagenomics; la metagenómica nunca estará determinada por una definición, sin embargo, algo similar a su definición sería "*la ciencia de investigar, modelar, entender y finalmente administrar a nivel molecular las interacciones dinámicas entre las moléculas que constituyen micro-comunidades y la biosfera*" (National Research Council, 2007; Rivera et al., 2021).

2.4.3.2 Metagenómica shotgun

Se considera la más integral y completa para la evaluación microbiana, pues permite conocer la información metabólica y funcional de cada microorganismo mediante alineamiento de *nov*, resulta muy útil cuando se identifican cepas y microorganismos poco abundantes en una comunidad microbiana, ya sea de muestras ambientales o biológicas (Cortés et al., 2020).

2.4.3.3 Metagenómica de amplicón

Se enfoca en el análisis de la diversidad microbiana mediante la secuenciación de genes marcadores conservados, tal es el caso del gen 16S rRNA (bacterias y arqueas), 18S rRNA (eucariotas) o ITS (hongos) (Cortés et al., 2020).

2.4.3.4 Metatranscriptómica

Permite la evaluación de toda la actividad funcional del microbioma y la realización de estimaciones del fenotipo basándose en los transcritos expresados. Es una disciplina que requiere un estudio comparativo de transcriptomas y contribuye a entender la reacción de las comunidades de microorganismos ante un ambiente en constante cambio. El transcriptoma comprende todas las moléculas de ARN que se encuentran en una célula o grupos de células en un momento específico, constituyendo la parte activa de un microbioma. El RNA cambia con el paso del tiempo y de una célula a otra, en contraposición al DNA que permanece estable y en todas las células de un organismo. La metatranscriptómica ofrece datos sobre los microorganismos activos y documenta las transcripciones expresadas de una comunidad microbiana en un momento específico y bajo condiciones ambientales determinadas, lo cual es de gran importancia, dado que las transcripciones expresadas constituyen una representación aproximada del fenotipo auténtico. Por otro lado, la metagenómica simplemente identifica a los componentes presentes, sin determinar si realmente estos están aportando al funcionamiento del ecosistema (Martínez et al., 2022).

2.4.3.5 Metatranscriptómica shotgun

Se fundamenta en el método de secuenciación RNA-Seq, que usualmente emplea bibliotecas de cDNA para su realización. Usualmente se lleva a cabo mediante Pirosecuenciación 454, o más recientemente a través de Illumina. A pesar de que la tecnología RNA-Seq sigue incorporando avances, en la actualidad ofrece grandes beneficios en comparación con otros métodos de análisis de RNA. Esto se debe a que no se restringe al análisis de secuencias previamente identificadas, sino que posibilita la identificación de nuevas y así descubrir genes de particular relevancia para diversas áreas de la biotecnología (Martínez et al., 2022).

2.4.4 Técnicas Basadas en Espectrometría y Microscopía

Incluyen el análisis de Ácidos Grasos de Fosfolípidos (PLFA), que determina la estructura de la comunidad microbiana a partir de los componentes lipídicos de sus membranas celulares. Así también la Hibridación Fluorescente in situ (FISH), que emplea sondas fluorescentes para identificar y localizar microorganismos específicos directamente en las muestras de suelo, complementándose con la microscopía de fluorescencia y confocal para visualizar la distribución espacial de estas comunidades en estructuras como biofilms o agregados del suelo (Escalante et al., 2004).

2.4.5 Software y Herramientas Computacionales para el Análisis

Para el análisis de los datos generados, se utilizan diversas herramientas bioinformáticas como: QIIME2 y DADA2, los cuales son fundamentales para el procesamiento de secuencias de amplicones como 16S e ITS, mientras que Mothur también se emplea para el análisis de diversidad microbiana en estos datos (Cortés et al., 2020). En estudios de metagenómica, Kraken2 y MetaPhlAn se usan para la asignación taxonómica de las secuencias, y bases de datos como KEGG, EggNOG y CAZy permiten el análisis funcional de los genes identificados (Kremer, 2021). Finalmente, el entorno R, con paquetes específicos como phyloseq y vegan, es ampliamente utilizado para realizar análisis estadísticos avanzados y generar visualizaciones de los resultados del microbioma (Cortés et al., 2020; Schmidt, H., et al., 2018).

Capítulo III: Metodología

3.1 Obtención de datos y metadatos

Las secuencias crudas en formato FastQ fueron obtenidas de la base de datos SRA, alojada en la plataforma NCBI; la descripción de la librería se presenta en la **Tabla 1**. Estas secuencias se descargaron utilizando los identificadores (ID) proporcionados por una publicación revisada sobre un estudio de metagenómica realizado en Argentina. El primer paso fue descargar las secuencias metagenómicas correspondientes a bacterias utilizando el ID correspondiente (NCBI, 2018).

Esta elección de enfocarse exclusivamente en la comunidad bacteriana se sustentó en la importancia de las bacterias en los procesos de inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636, las cuales juegan un papel crucial en la salud de las plantas y en la dinámica del microbioma del suelo (Wang et al., 2023; Wei et al., 2023). El estudio de la interacción entre *T. harzianum* ITEM 3636 y bacterias permite comprender con mayor detalle los mecanismos subyacentes que afectan la productividad de las plantas. Además, el microbioma bacteriano es altamente dinámico y sensible a los cambios inducidos por la inoculación de microorganismos como *T. harzianum* ITEM 3636, lo que justifica la exclusión de los hongos en este análisis inicial (Ganuza et al., 2018). Aunque los hongos pueden tener una función importante en el microbioma del suelo, el enfoque en las bacterias permite obtener resultados más claros y específicos sobre las reacciones bacterianas a la inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636. La elección de analizar únicamente las bacterias también facilita la simplificación del análisis, permitiendo una mejor comprensión de las interacciones bacterianas sin la complejidad adicional que podrían aportar otras especies fúngicas. A futuro, si se considera pertinente, los hongos podrían ser incorporados en un análisis complementario para proporcionar una visión más integral de la interacción entre *T. harzianum* ITEM 3636 y el microbioma del suelo.

Posterior a la descarga, se organizó la información en una hoja de cálculo de Excel, misma que contenía los ID de las secuencias y los tipos de tratamientos asignados a cada una de las muestras de secuencias metagenómicas presentadas en la **Tabla 2** y **Tabla 3**. Esta acción de ordenar los datos en una tabla resultó esencial para simplificar los análisis subsiguientes, dado que la modificación del nombre en los archivos comprimidos (.zip) puede obstaculizar que ciertas plataformas identifiquen adecuadamente los datos.

Tabla 1*Características de la biblioteca*

<i>Accesión del Bioproyecto</i>	PRJNA471338
<i>SRA</i>	SRS3301452
<i>Tipo de dato</i>	Lecturas de secuencia sin procesar
<i>Alcance</i>	Medio ambiente
<i>Organismo</i>	Metagenoma del suelo
<i>Muestra</i>	Suelos agrícolas en Argentina
<i>Instrumento</i>	Illumina HiSeq 2500
<i>Estrategia</i>	Amplicon
<i>Fuente</i>	Metagenomica
<i>Selección</i>	PCR
<i>Diseño de la biblioteca</i>	Emparejado (Paired-end) por CD Genomics (USA)

Tabla 2

Datos metagenómicos de Muestras de suelo de campos de producción de maní Lecturas de secuencia en bruto 2014-2015.

Repetición	Tratamientos	Muestra	Código acceso SRA	Formato	Tipo Secuenciación	Plataforma	Gen Marcador
1	Datos metagenómicos de Bacterias en Pre-siembra (Inicial)	Suelo	SRR7166475	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
1	Datos metagenómicos de Bacterias Tratamiento Control	Suelo	SRR7166477	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
1	Datos metagenómicos de Bacterias con Inoculación <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3 636	Suelo	SRR7166479	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
2	Datos metagenómicos de Bacterias en Pre-siembra (Inicial)	Suelo	SRR7166474	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
2	Datos metagenómicos de Bacterias Tratamiento Control	Suelo	SRR7166476	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
2	Datos metagenómicos de Bacterias con Inoculación <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3 636	Suelo	SRR7166478	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S

Nota. Enlace al proyecto en NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP146071>

Tabla 3

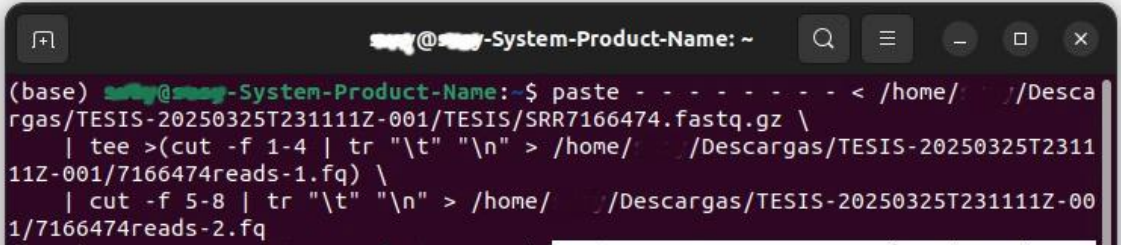
Datos metagenómicos de Muestras de suelo de campos de producción de maní Lecturas de secuencia en bruto 2015-2016

Repetición	Tratamientos	Muestra	Código acceso	Formato	Tipo Secuenciación	Plataforma	Gen Marcador
1	Datos metagenómicos de Bacterias en Pre-siembra (Inicial)	Suelo	SRR716648 1	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
1	Datos metagenómicos de Bacterias Tratamiento Control	Suelo	SRR716648 3	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
1	Datos metagenómicos de Bacterias con Inoculación <i>Trichoderma harzianum ITEM 363</i>	Suelo	SRR716649 3	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
	6						
2	Datos metagenómicos de Bacterias en Pre-siembra (Inicial)	Suelo	SRR716648 0	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
2	Datos metagenómicos de Bacterias Tratamiento Control	Suelo	SRR716648 2	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
2	Datos metagenómicos de Bacterias con Inoculación <i>Trichoderma harzianum ITEM 363</i>	Suelo	SRR716649 2	.fastq	Amplicón	Illumina	ARNr 16S
	6						

Nota. Enlace al proyecto en NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP146071>

3.2 Procesamiento de secuencias crudas en línea de comandos para obtener forward y reverse

El análisis se desarrolló sobre archivos crudos en formato *.fastq* provenientes de secuenciación paired-end (lecturas forward y reverse), estas secuencias fueron divididas en dos archivos FASTQ separados: uno para los reads "forward" (reads-1.fq) y otro para los reads "reverse" (reads-2.fq) (**Figura 1**) y guardadas en una carpeta específica del equipo (**Anexo 1**) (Vinuesa, 2018).



```
(base) [redacted]@[redacted]-System-Product-Name: ~$ paste - - - - - < /home/[redacted]/Descargas/TESES-20250325T231111Z-001/TESES/SRR7166474.fastq.gz \
| tee >(cut -f 1-4 | tr "\t" "\n" > /home/[redacted]/Descargas/TESES-20250325T231111Z-001/7166474reads-1.fq) \
| cut -f 5-8 | tr "\t" "\n" > /home/[redacted]/Descargas/TESES-20250325T231111Z-001/7166474reads-2.fq
```

Figura 1. Script en líneas de comando. El gráfico ilustra el script usado en línea de comandos para separar las secuencias en "forward" y "reverse", esta es una forma de "desintercalar" (deinterleave) un archivo FASTQ. El proceso intermedio de usar paste para linealizar los registros en una sola línea por par de reads simplifica la separación mediante cut.

3.3 Procesamiento de secuencias en R

3.3.1 Instalación de librerías y carga de datos

Para el procesamiento de los datos de secuenciación de amplicón 16S se empleó el entorno de programación R (versión 4.4.3), utilizando principalmente el paquete DADA2, complementado con ShortRead y Biostrings, todos administrados mediante BiocManager (Callahan, 2020).

3.3.2 Control de calidad y rasurado de secuencias

Inicialmente, se inspeccionó la calidad de las lecturas en formato *.fastq*, utilizando la herramienta MultiQC a través de la plataforma Galaxy, la cual permite integrar y resumir resultados de herramientas como FastQC de forma eficiente y visualmente más dinámica por su entorno gráfico (Babraham Bioinformatics, 2018; Galaxy Training Network, 2025). Esta herramienta fue elegida por su facilidad de uso y la capacidad de generar informes robustos que permiten una revisión

rápida de múltiples archivos de secuencias (**Anexo 2**). Aunque el paquete DADA2 en R incluye la visualización de la calidad de las lecturas mediante *plotQualityProfile* (Callahan, 2020; Callahan, 2016), los perfiles generados en el entorno de R no se miraban muy explicativos para el análisis. Por este motivo, se optó por utilizar la herramienta en la plataforma de Galaxy, para establecer parámetros adecuados de recorte (*trimming*) antes de aplicar el pipeline de DADA2. Como siguiente paso, las secuencias fueron filtradas y recortadas empleando la función *filterAndTrim*, en R (por calidad, longitud, presencia de N, etc.), eliminando además posibles contaminaciones por *phiX* (Dharumadurai & Sankara, 2025).

3.3.3 Inferencia de secuencias (ASVs)

Una vez obtenidas las secuencias filtradas, se procedió a aprender las tasas de error específicas de las muestras (*learnErrors*) (Dharumadurai & Sankara, 2025) y, con ello, se infirió la secuencia representativa de cada variante exacta de secuencia (ASV, por sus siglas en inglés) mediante el algoritmo DADA, utilizando la opción de agrupamiento por pooling para mayor sensibilidad (Callahan, 2016).

3.3.4 Unión de pares (merge) y Construcción de tabla de secuencias

A continuación, se realizó la unión (*merge*) de las lecturas forward y reverse para obtener secuencias completas utilizando *mergePairs*. Estas secuencias empalmadas fueron utilizadas para construir una tabla de abundancia de ASVs por muestra a través de *makeSequenceTable* (Dharumadurai & Sankara, 2025).

3.3.5 Eliminación de quimeras

La eliminación de secuencias quiméricas se efectuó con el método por consenso con la herramienta *removeBimeraDenovo* (Dharumadurai & Sankara, 2025). Los resultados intermedios fueron evaluados mediante una tabla de seguimiento de calidad que muestra la cantidad de lecturas retenidas en cada etapa del pipeline (entrada, filtrado, eliminación de quimeras, empalmado y no quimérico).

3.4 Asignación taxonómica

Para la asignación taxonómica, se utilizó la base de datos SILVA (versión *silva_nr99_v138.2_toSpecies_trainset.fa.gz*), accesible en el siguiente enlace: <https://zenodo.org/records/4587955> (McLaren & Callahan, 2021). La clasificación de cada ASVs se realizó mediante la función *assignTaxonomy* (Callahan et al., 2016), que permite asignar la

taxonomía hasta el nivel más específico disponible, garantizando una identificación precisa de los taxones presentes en las muestras.

Los resultados obtenidos, tanto la tabla de abundancia sin quimeras como la tabla de asignación taxonómica, fueron guardados en archivos *.rds* para su uso posterior (**Anexo 3**).

3.5 Curva de rarefacción

Inicialmente, se cargaron las librerías necesarias: *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) para la manipulación de datos de microbioma, *vegan* (Oksanen et al., 2022) para análisis ecológicos incluyendo la rarefacción, *ggplot2* (Wickham, 2016) para la visualización de datos. El objeto *phyloseq*, que contenía la tabla de conteos de ASVs, la taxonomía y los metadatos de las muestras, fue cargado desde un archivo *.rds*. Se verificó la orientación de la tabla de ASVs dentro del objeto *phyloseq*. Dado que la función *rarecurve* del paquete *vegan* requiere que las muestras estén en filas y las ASVs en columnas, la tabla de conteos fue extraída con la función *otu_table()* y transpuesta con *t()*, asegurando el formato correcto.

La tabla de conteos de ASVs orientada correctamente fue convertida a un formato de matriz estándar de R utilizando *as(asv, "matrix")*. Se definió una paleta de colores utilizando la función *brewer.pal()* del paquete RColorBrewer para asignar un color único a cada muestra en el gráfico, facilitando su diferenciación visual (Oksanen et al., 2022).

Finalmente, se generaron las curvas de rarefacción mediante la función *rarecurve* del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2022). Esta función submuestra iterativamente el número de secuencias por muestra (con un intervalo (step) de 100 secuencias) y calcula el número esperado de ASVs observadas para cada tamaño de submuestra.

3.6 Análisis descriptivo de abundancia

Para el análisis de abundancias taxonómicas, se utilizó el paquete *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) para importar y manipular un objeto previamente procesado que contenía datos de abundancia, taxonomía y metadatos de las muestras. A partir de este objeto, se generó un subconjunto correspondiente a muestras de suelo, lo cual permitió enfocar los análisis en dicho tipo de muestra. Posteriormente, se utilizó el paquete *microeco*, convirtiendo el objeto *phyloseq* a formato compatible mediante la función *phyloseq2mecca* (Liu et al., 2021). Esto facilitó la visualización de los 20 taxones más abundantes a nivel de familia y género, mediante mapas de calor y gráficos de barras, agrupados por tratamiento experimental. Estas visualizaciones

permitieron identificar variaciones en la composición microbiana entre tratamientos y proporcionaron una visión detallada de los principales grupos microbianos presentes en las muestras analizadas.

En R, se realizó un análisis de abundancia y posteriormente se calcularon los índices de diversidad alfa y beta para evaluar la diversidad microbiana en las muestras. Para este estudio, se centró exclusivamente en las bacterias, ya que se consideró más relevante medir la comunidad bacteriana debido a su interacción con *T. harzianum* ITEM 3636 en el suelo.

3.7 Análisis estadísticos

Para este análisis se utilizó el paquete *microeco* (Liu et al., 2021) para convertir el objeto *phyloseq* en un objeto *meeco* (microeco) mediante la función *phyloseq2meeco()* (McMurdie & Holmes, 2013), permitiendo el uso de funciones específicas de análisis ecológico.

Se calcularon cinco métricas de diversidad alfa: Observed, Shannon, Simpson, Inverse Simpson y Chao1, utilizando la función *estimate_richness()* de *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013). Estos índices fueron integrados con la metadata correspondiente al tratamiento experimental (*Treatment*) para su análisis comparativo.

Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para cada métrica, a fin de determinar la adecuación de los datos a pruebas paramétricas. Posteriormente, se generaron representaciones gráficas mediante *trans_alpha\$new()* y *plot_alpha()* del paquete *microeco* (Liu et al., 2021), las cuales permitieron visualizar la variación en diversidad alfa entre los tratamientos evaluados.

3.7.1 Análisis de diversidad beta mediante ordenación no métrica por escalamiento multidimensional (NMDS)

Tras la evaluación de la curva de rarefacción, para verificar la adecuación del esfuerzo de muestreo, se procedió con el análisis estadístico. Como primer paso, se transformaron los conteos a proporciones relativas utilizando la función *transform_sample_counts* (McMurdie & Holmes, 2013), con el fin de normalizar las diferencias en profundidad de secuenciación entre muestras. A continuación, se realizó un análisis de ordenación no métrica por escalamiento multidimensional (NMDS) (Kruskal, 1964) basado en la distancia de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957), lo cual permitió visualizar la disimilitud en la composición microbiana entre tratamientos. Finalmente, se generó un gráfico de dispersión con la función *plot_ordination* (McMurdie & Holmes, 2013), coloreando las muestras según la variable experimental “Tratamiento”, con el objetivo de

identificar posibles agrupamientos o patrones asociados a las condiciones evaluadas (Dharumadurai & Sankara, 2025).

3.7.2 Análisis de diversidad beta mediante ordenación canónica redundante (RDA)

El procedimiento inicia con la carga de bibliotecas necesarias (*phyloseq*, *vegan*, *ggplot2*, *dplyr*, *tibble*, *ggrepel*) (Dharumadurai & Sankara, 2025) y del objeto *.rds* que contiene la información de la comunidad. Luego se verifica la presencia de las variables de interés en los metadatos y se filtran las muestras sin lecturas o con valores faltantes, asegurando una alineación correcta entre las matrices de abundancia y metadatos. Se transforma la matriz de abundancia usando la transformación de Hellinger y se ejecuta el RDA mediante la función *rda()* del paquete *vegan*. Posteriormente, se evalúa la significancia global, marginal y por eje del modelo usando *anova.cca*. Finalmente, se genera una visualización del RDA con *ggplot2*, que incluye la distribución de las muestras, elipses por tratamiento y flechas representando las variables ambientales, además de mostrar el porcentaje de varianza explicada y el R^2 ajustado del modelo.

3.7.3 Predicción funcional

Para este paso en R, se utilizó el paquete *microeco* (Liu et al., 2021) para realizar un análisis funcional predictivo del microbioma mediante la base de datos FAPROTAX (Functional Annotation of Prokaryotic Taxa), la cual permite inferir funciones ecológicas microbianas a partir de la información taxonómica obtenida en los datos de secuenciación 16S rRNA. Para ello, se transformó el objeto *phyloseq* al formato compatible con *microeco*, y se aplicó la función *trans_func* para asignar funciones microbianas según la base de datos FAPROTAX, calculando la abundancia relativa de cada función en las muestras.

Como siguiente paso, se generó un análisis diferencial utilizando ANOVA para comparar las funciones microbianas entre tratamientos, con el objetivo de identificar aquellas funciones que presentan diferencias significativas. Finalmente, se visualizaron los resultados mediante un gráfico boxplot que muestra la abundancia relativa, para esto se agregó una capa para mostrar las funciones con diferencias significativas, y destaca aquellas con cambios significativos entre tratamientos.

3.7.4 Flujo de trabajo

Para una representación visual del flujo de trabajo completo descrito en esta metodología, consulte el diagrama presentado en el **Anexo 4**.

Capítulo IV: Resultados

4.1 Control de calidad y procesamiento de secuencias en R, de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, para los periodos de noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.

4.1.1 Resultados del control de calidad: obtención de secuencias confiables para el análisis de diversidad microbiana.

La calidad de las secuencias crudas de las 12 muestras fue evaluada utilizando FastQC y los resultados fueron agregados mediante MultiQC en la plataforma Galaxy (**Figura 2**). El análisis confirmó una alta calidad general de las bases nucleotídicas ("Per Base Sequence Quality"), un contenido estable de GC entre 56-57% (**Tabla 4**) y ausencia de contaminación significativa por adaptadores ("Adapter Content"), reflejado en calificaciones de "Pass" (verde) para estos y otros módulos fundamentales en todas las muestras.

Se observaron advertencias en color naranja, asociadas a la distribución de longitud de secuencias ("Sequence Length Distribution"), si bien la longitud promedio se mantuvo consistentemente alrededor de 250 pb (**Tabla 4**); este tipo de advertencia es común en datos de amplicones. Además, se detectaron ligeros sesgos en la composición de bases ("Per Base Sequence Content") en dos muestras específicas: SRR7166476 (tratamiento control 2014–2015) y SRR7166483 (tratamiento control 2015–2016). De manera consistente, los módulos relativos a la distribución de puntuaciones de calidad por secuencia ("Per Sequence Quality Scores"), niveles de duplicación ("Sequence Duplication Levels") y secuencias sobrerrepresentadas ("Overrepresented Sequences") presentaron fallos, los cuales se destacan en la **Figura 2** en color rojo. Cuantitativamente, los niveles de duplicación fueron consistentemente altos entre muestras aproximadamente 89-90%, (**Tabla 4**), lo cual es característico de datos de secuenciación de amplicones, indicando alta redundancia inherente al método y posibles artefactos de PCR.

En conjunto, a pesar de las advertencias y fallos esperables para este tipo de datos, la calidad general de las secuencias se consideró suficiente y adecuada para el procesamiento bioinformático subsiguiente, incluyendo el filtrado y la generación de Variantes de Secuencia de Amplicones

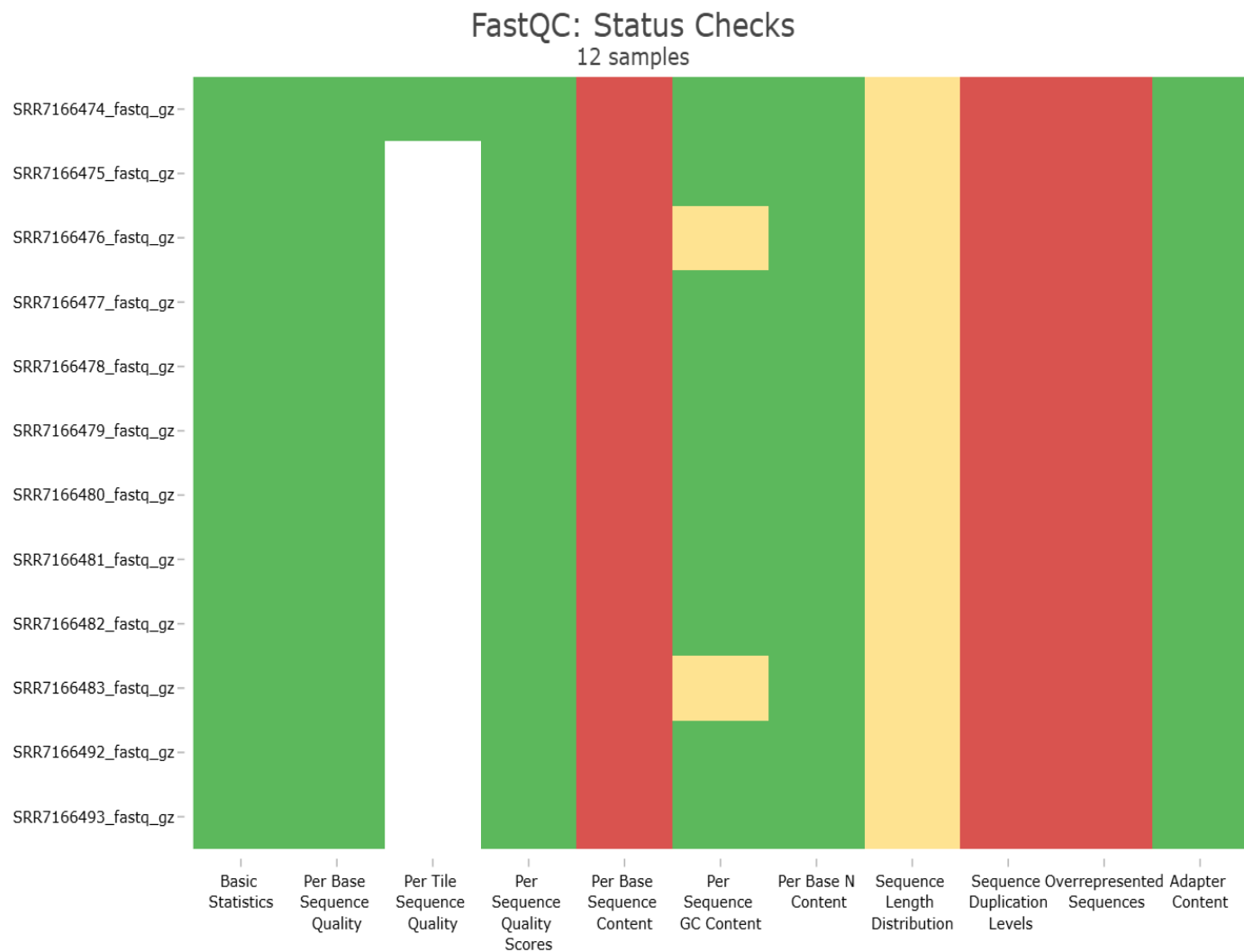


Figura 2. Mapa de calor de comprobaciones del estado de las secuencias. Estado de cada módulo de análisis de FastQC, en el cual se muestra si los resultados son completamente normales (verde), presentan ligeras desviaciones (naranja) o muestran patrones inusuales o problemáticos (rojo).

Tabla 4*Reporte numérico y resumido de MultiQC*

Sample	fastqc- percent_duplica tes	fastqc- percent_ gc	fastqc- avg_sequence_len gth	fastqc- median_sequence_len gth	fastqc- percent_fai ls	fastqc- total_sequenc es
SRR7166474_fastq _gz	89.81283289	57	249.9995	250	27.27273	0.160712
SRR7166475_fastq _gz	89.95505534	57	249.9979	250	30	0.159752
SRR7166476_fastq _gz	89.73470229	56	250.4984	250	30	0.160122
SRR7166477_fastq _gz	89.2158946	57	249.9985	250	30	0.160004
SRR7166478_fastq _gz	89.08449387	56	250.4974	250	30	0.160414
SRR7166479_fastq _gz	89.00710108	56	250.498	250	30	0.159694
SRR7166480_fastq _gz	90.08381463	57	249.9993	250	30	0.159638
SRR7166481_fastq _gz	90.01683607	57	249.9993	250	30	0.16037

SRR7166482_fastq	89.43528117	57	250.497	250	30	0.159938
_gz						
SRR7166483_fastq	89.93991556	57	249.9993	250	30	0.160108
_gz						
SRR7166492_fastq	89.4569764	57	249.9995	250	30	0.160656
_gz						
SRR7166493_fastq	89.51811753	57	249.9986	250	30	0.15979
_gz						

4.2 Curva de rarefacción, de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, para los periodos de noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.

4.2.1 Análisis de la riqueza y profundidad de las secuencias en los en los períodos de estudio.

Para determinar si la profundidad de secuenciación fue suficiente para capturar adecuadamente la riqueza de Variantes de Secuencia de Amplicones (ASVs) en cada muestra, se generaron curvas de rarefacción (**Figura 3**). Estas curvas ilustran la relación entre el número de ASVs únicas observadas (riqueza) y el número de secuencias analizadas por muestra.

Como se observa en la **Figura 3**, la mayoría de las curvas de rarefacción para las diferentes muestras, exponen una tendencia clara hacia la saturación. A medida que aumenta el número de secuencias submuestreadas (eje X), las curvas se elevan rápidamente al principio y luego comienzan a aplanarse, aproximándose a una asíntota. Este comportamiento indica que, para la mayoría de las muestras, el esfuerzo de secuenciación se aproximó a capturar la totalidad de la diversidad de ASVs presente, ya que un aumento adicional en el número de secuencias probablemente resultaría en la detección de pocas ASVs nuevas. La mayoría de las muestras alcanzaron una meseta cercana o superior a las 6,000 ASVs observadas con la profundidad de secuenciación obtenida de aproximadamente 35,000-40,000 secuencias.

Se destaca la muestra SRR7166474, cuya curva de rarefacción se estabiliza a un nivel de riqueza significativamente más bajo, alrededor de 1,500 ASVs, en comparación con las demás muestras. Aunque la curva también alcanza una meseta, sugiriendo que la diversidad *presente* en esa muestra fue adecuadamente muestreada, su nivel de riqueza intrínseca es considerablemente inferior al del resto del conjunto experimental.

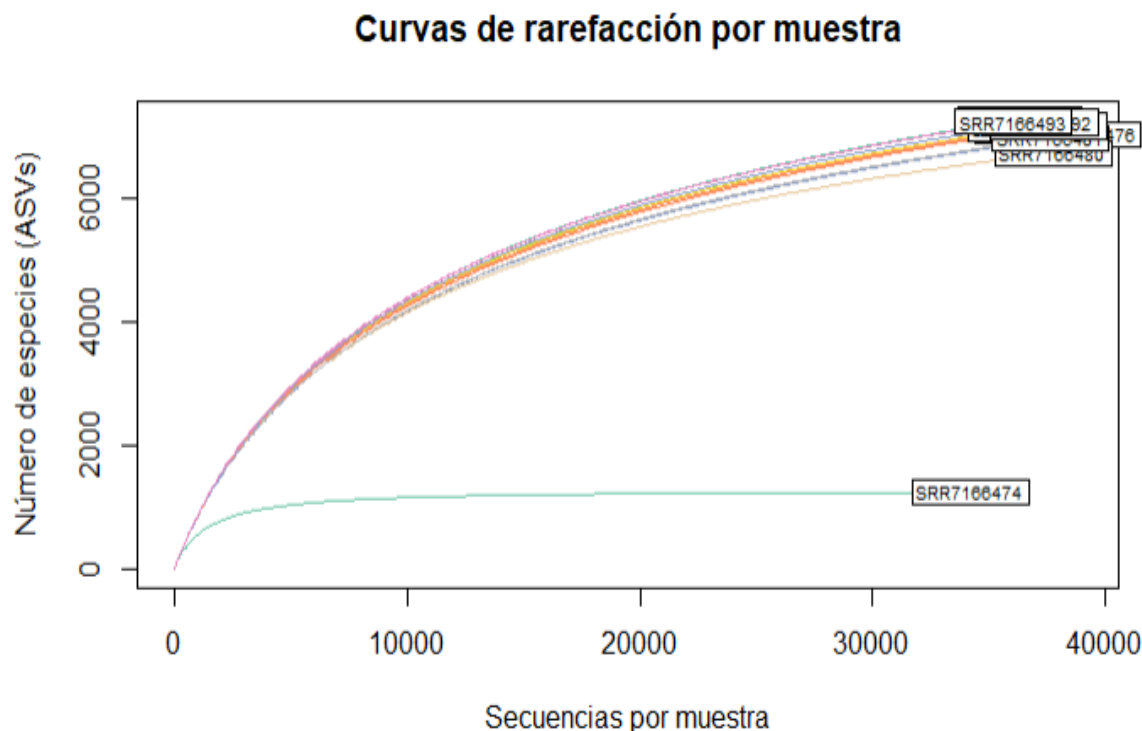


Figura 3. Curva de rarefacción que muestran la riqueza de ASVs por muestra. El gráfico ilustra el número de Variantes de Secuencia de Amplicones (ASVs) observadas (eje Y) en relación con el número de secuencias analizadas (eje X) para cada muestra (representada por una línea de color e identificada por su código SRR). Las curvas permiten evaluar si la profundidad de secuenciación fue suficiente para capturar la diversidad microbiana de cada muestra.

4.3 Abundancia relativa de las secuencias de metagenómica de amplicón 16S, para los periodos de noviembre 2014 a abril 2015 y noviembre 2015 a abril 2016.

El análisis de la composición bacteriana mediante el mapa de calor (**Figura 4**) revela la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más predominantes en las muestras estudiadas, agrupadas por condición experimental (CondicionIni, InoculacionTricho, TratamientoControl) y año de muestreo (Y2014-15, Y2015-16).

Se observa un patrón general donde un grupo selecto de géneros domina la comunidad bacteriana en la mayoría de las muestras. Específicamente, géneros como *Gemmatimonas*, *Acidiferrimicrobium*, *Candidatus Solibacter* y *Sphingomonas* presentan consistentemente altas

abundancias relativas representadas por colores cálidos, cercanos al rojo en la escala (**Figura 4**) a través de las diferentes condiciones y años. Esto sugiere que estos géneros forman parte del núcleo estable de la comunidad bacteriana en este sistema.

En contraste, otros géneros listados, particularmente aquellos en la parte inferior del mapa como *Phenylobacterium*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*, muestran consistentemente bajas abundancias relativas con colores más fríos, representado por un amarillo pálido a azul claro, cercanas al límite inferior de la escala (0.01%), indicando su menor representatividad dentro de los 20 géneros más abundantes.

Al comparar entre las condiciones experimentales, no se aprecian diferencias drásticas y consistentes que separen claramente los perfiles de condición inicial (CondicionIni), inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho) y tratamiento control (TratamientoControl) basados únicamente en estos 20 géneros principales. La estructura general de la comunidad dominante parece relativamente similar entre los grupos. Sin embargo, se pueden notar variaciones puntuales en la abundancia de géneros específicos; por ejemplo, *Pseudonocardia* muestra una abundancia relativa notablemente mayor en una de las réplicas en el tratamiento control (TratamientoControl) del año 2014-15 cuyo identificador es SRR7166476.

Comparando los dos años de muestreo, se observan algunas fluctuaciones. Por ejemplo, en la condición inicial (CondicionIni), la abundancia relativa de *Sphingomonas* es menor en los periodos 2014–2015 y 2015–2016 en la repetición 1, correspondientes a los identificadores SRR7166474 y SRR7166480. En el tratamiento control, *Pseudonocardia* y *Krasilnikovia* presentan una menor representación en el periodo 2015–2016 en comparación con el periodo 2014–2015. Estas variaciones interanuales podrían reflejar fluctuaciones ambientales o dinámicas temporales de la comunidad.

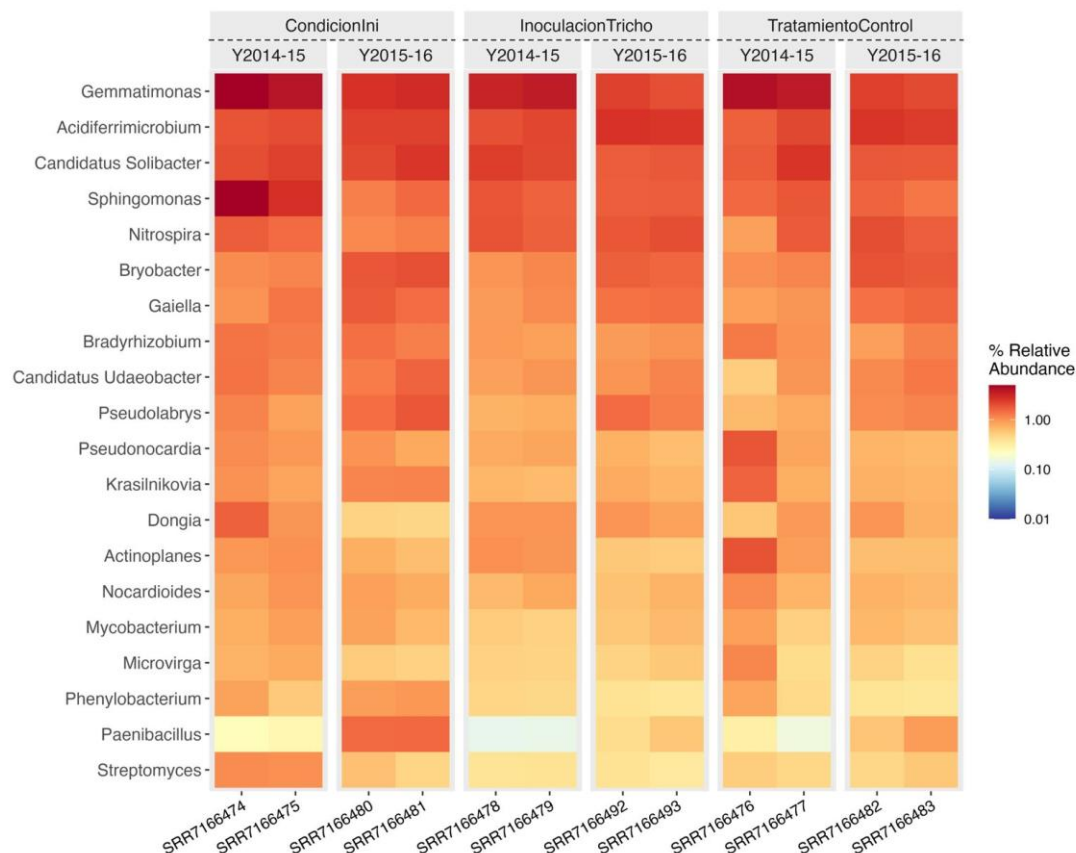


Figura 4. Mapa de calor de la abundancia relativa de los 20 géneros bacterianos más abundantes por muestra. El mapa de calor ilustra la abundancia relativa porcentual (indicada por la escala de color) de los 20 géneros bacterianos más abundantes (filas) en cada muestra analizada. Las muestras están agrupadas por condición experimental (CondicionIni, InoculacionTricho, TratamientoControl) y por año de muestreo (Y2014-15, Y2015-16). Los colores más cálidos (rojo) indican mayor abundancia relativa, mientras que los colores más fríos (amarillo pálido/azul claro) indican menor abundancia relativa, según la leyenda.

La **Figura 5** presenta una visión general de la composición de las familias bacterianas en cada muestra. Lo primero que salta a la vista es la gran estabilidad en la estructura de estas comunidades. A pesar de las diferentes condiciones experimentales (CondicionIni, InoculacionTricho, TratamientoControl) y los dos años de muestreo (Y2014-15, Y2015-16). En general, las familias bacterianas se mantuvieron relativamente constantes en todas las muestras.

Un hallazgo consistente es que una parte importante de la comunidad de alrededor del 50% está compuesta por una diversidad de familias menos comunes, agrupadas aquí como "Others". Esto

sugiere la presencia de un ecosistema microbiano diverso, compuesto por numerosos taxones de baja abundancia que no pudieron ser clasificados.

A pesar de esta diversidad, un grupo central de familias más abundantes forma la columna vertebral de la comunidad en todas las muestras. Familias como *Gemmatimonadaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Micromonosporaceae* y *Sphingomonadaceae*, están consistentemente presentes y representan una proporción significativa de la comunidad identificada. La comunidad bacteriana, a nivel de familia, presentó una estructura central sólida y bien conservada, que se mantuvo estable independientemente de los tratamientos aplicados o de las variaciones temporales entre los años analizados.

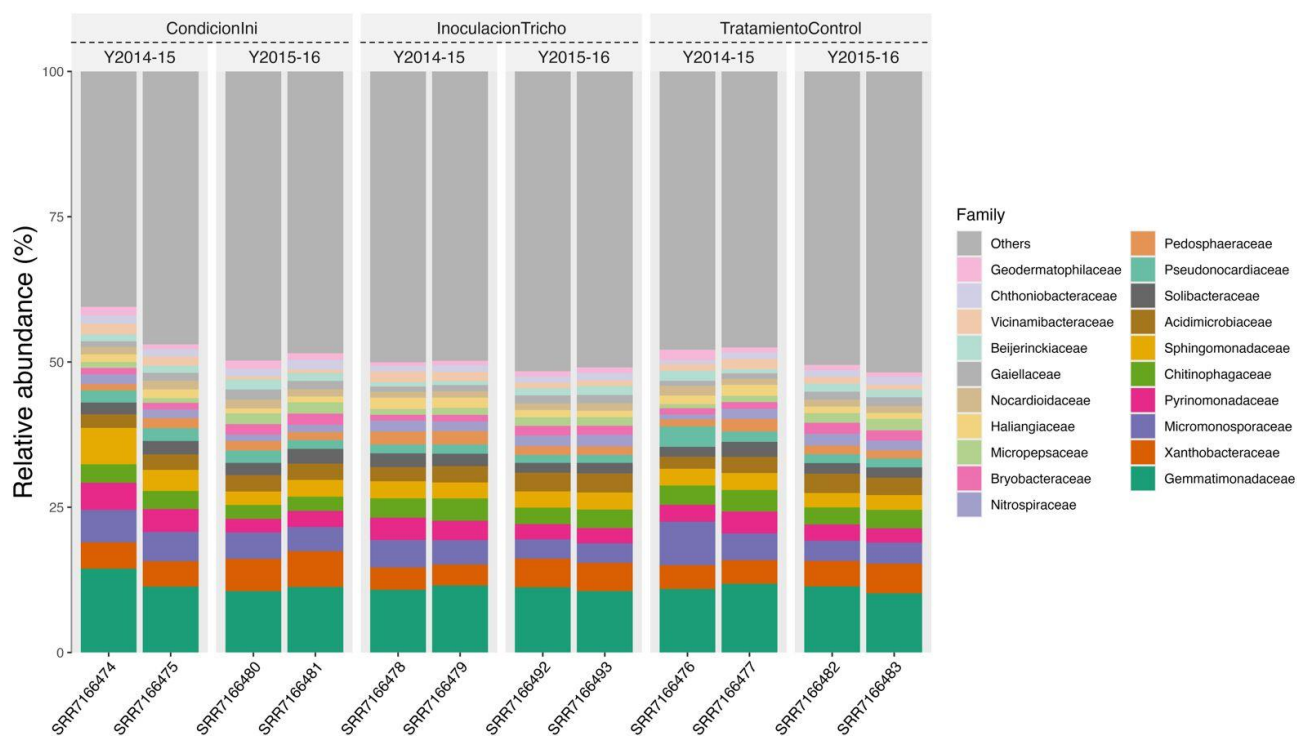


Figura 5. Abundancia relativa de familias bacterianas por muestra representada en gráficos de barras apiladas. Barras apiladas (eje X: muestra SRR, agrupadas por tratamiento/año) muestran la composición por familia (colores según leyenda). "Others" agrupa familias menos abundantes.

4.4 Análisis del perfil funcional del microbioma del suelo según el tratamiento, a partir de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, correspondientes a los periodos noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.

En la **Figura 6** para las funciones de metanotrofia (methanotrophy), metilotrofia (methylotrophy), quitinolisis (chitinolysis), denitrificación a partir de nitrato (nitrate_denitrification), denitrificación a partir de nitrito (nitrite_denitrification) y denitrificación total (denitrification), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia relativa entre los tres tratamientos (CondicionIni, TratamientoControl, InoculacionTricho), como lo indica la asignación de la misma letra “a” para todos los grupos para estas funciones específicas. Esto sugiere que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, estos procesos particulares del ciclo del carbono y nitrógeno no fueron alterados significativamente por el tratamiento control ni por la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 en comparación con la condición inicial.

Se encontraron diferencias significativas inducidas por los tratamientos en cuatro funciones metabólicas relacionadas principalmente con los ciclos del nitrógeno y del azufre. Tal es el caso de la oxidación aeróbica de amonio (aerobic_ammonia_oxidation), en donde se muestra que la abundancia relativa de esta función fue significativamente mayor en el tratamiento de inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 (“a”) en comparación con la condición inicial (“b”). El tratamiento control (“ab”) presentó una abundancia intermedia, no diferenciándose estadísticamente ni de condición inicial ni de inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636.

En cuanto a nitrificación (nitrification), se observa que se siguió un patrón similar a la oxidación de amonio, la nitrificación mostró una abundancia relativa significativamente superior bajo inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 (“a”) respecto la condición inicial (“b”), con el tratamiento control (“ab”) en una posición intermedia sin diferencias significativas con los otros dos.

Sobre la respiración de sulfato (sulfate_respiration): Nuevamente, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho, “a”) promovió una abundancia relativa significativamente más alta de esta función en comparación con la condición inicial (“b”). El tratamiento control (“ab”) no mostró diferencias significativas con los otros dos grupos.

Sobre la respiración de compuestos de azufre (respiration_of_sulfur_compounds): Este proceso también exhibió una abundancia relativa significativamente elevada en el tratamiento inoculación

de *T. harzianum* ITEM 3636 (“a”) frente a la condición inicial (“b”), mientras que el tratamiento control (“ab”) no difirió significativamente de ninguno de los otros dos tratamientos.

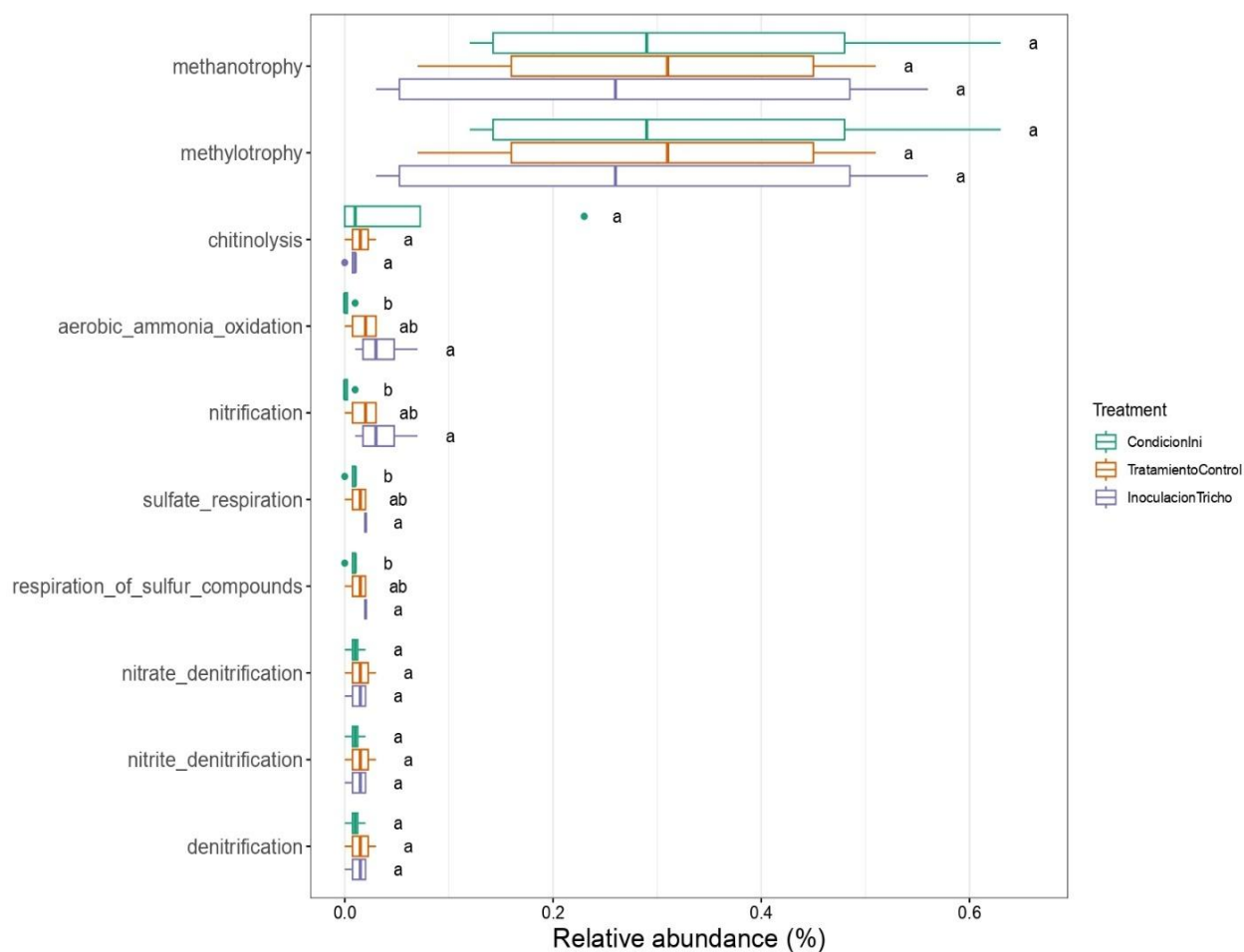


Figura 6 . Efecto de los Tratamientos sobre la Abundancia Relativa de Potenciales Funciones Metabólicas Microbianas del Suelo. Box plots comparan funciones (eje Y) entre condición inicial (CondicionIni), control (TratamientoControl) e inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho) (eje X, colores distintos). Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$, prueba post-hoc) entre tratamientos para cada función.

4.5 Índices de diversidad del microbioma del suelo según el tratamiento, a partir de datos de secuenciación metagenómica de amplicón 16S, correspondientes a los periodos noviembre 2014 - abril 2015 y noviembre 2015 - abril 2016.

4.5.1 Impacto de los tratamientos en la diversidad alfa del microbioma del suelo durante 2014–2016.

Se evaluó la diversidad alfa de las comunidades bacterianas dentro de cada grupo experimental (CondicionIni, InoculacionTricho, TratamientoControl) utilizando cinco métricas distintas: número de ASVs observadas (Observed), estimador de riqueza Chao1, y los índices de Shannon, Simpson e Inverso de Simpson (InvSimpson), los cuales consideran tanto la riqueza como la uniformidad (**Figura 7**).

La inspección visual de los gráficos de cajas reveló diferencias notables, particularmente en los estimadores de riqueza Observados y Chao1. Las muestras correspondientes a la condición inicial (CondicionIni) presentaron consistentemente valores inferiores en estos dos índices en comparación con los tratamientos inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho) y tratamiento control (TratamientoControl). Estos últimos dos grupos mostraron niveles de riqueza estimada y observada considerablemente más altos y muy similares entre sí.

Una tendencia similar se observó para los índices que incorporan la uniformidad. El índice de Shannon fue visiblemente más bajo en el grupo condición inicial (CondicionIni) respecto a los otros dos tratamientos. Los índices de Simpson e InvSimpson, aunque mostraron diferencias más sutiles entre los grupos, también sugirieron una menor diversidad en las muestras de condición inicial (CondicionIni). Nuevamente, los tratamientos inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho) y tratamiento control (TratamientoControl), presentaron valores muy parecidos entre ellos para los índices de Shannon, Simpson e InvSimpson, indicando niveles comparables de diversidad y uniformidad bacteriana.

Previo a las comparaciones estadísticas entre grupos, se evaluó la normalidad de los datos para cada índice mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Como se muestra en la **Tabla 5**, los resultados indicaron que ninguno de los índices de diversidad alfa, se distribuyeron normalmente ($p < 0.0001$ en todos los casos). Por lo tanto, las comparaciones estadísticas entre los tratamientos se realizaron utilizando pruebas no paramétricas adecuadas.

Tabla 5

Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los índices de diversidad alfa.

Índice de Diversidad Alfa	Estadístico W	Valor p
Observed	0.40126	3.608e-06
Chao1	0.37454	2.412e-06
Shannon	0.41404	4.391e-06
Simpson	0.55397	4.549e-05
InvSimpson	0.38756	2.932e-06

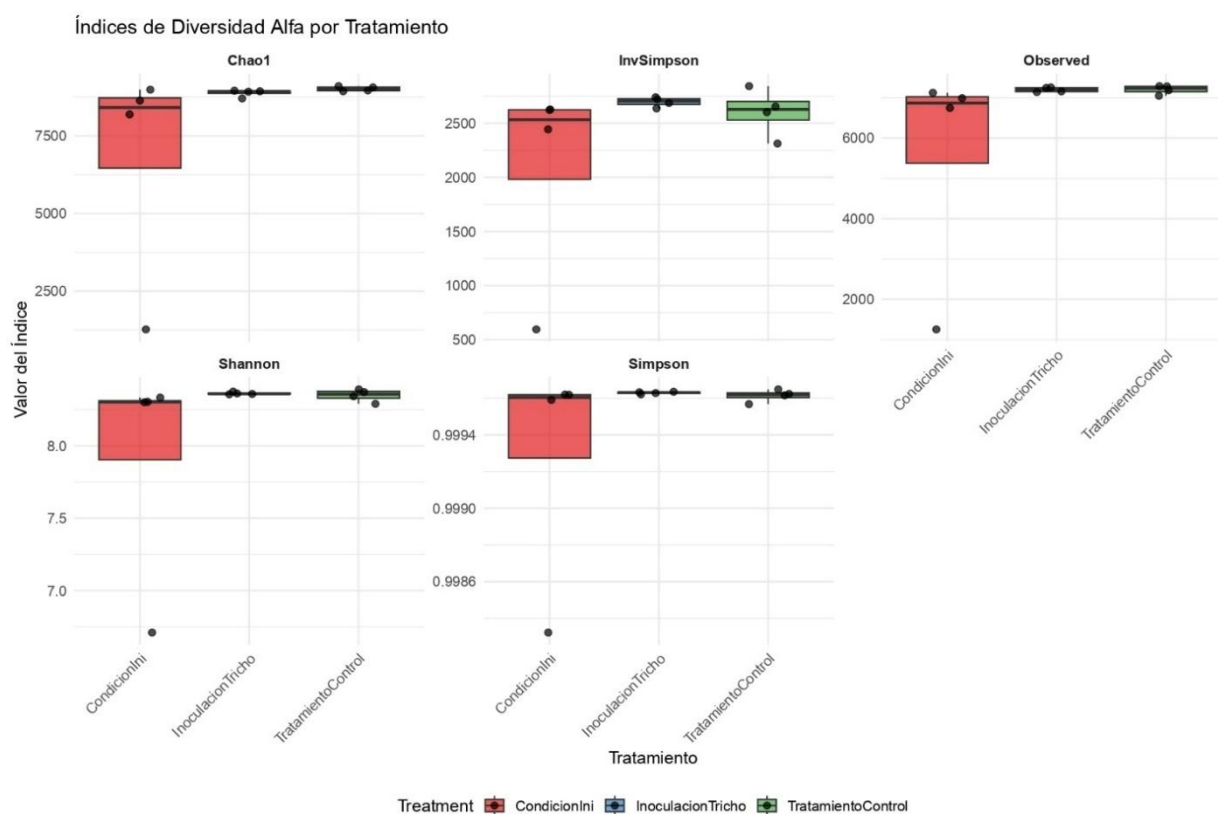


Figura 7 . Índices de diversidad alfa por tratamiento. Box plots comparan los índices Chao1, Observed, Shannon, Simpson e InvSimpson (eje Y) entre los tratamientos CondicionIni, InoculacionTricho y TratamientoControl (eje X).

4.5.2 Impacto de los tratamientos en la diversidad beta del microbioma del suelo durante 2014–2016.

Se evaluaron las diferencias en la composición general de la comunidad bacteriana (diversidad beta) entre los tratamientos utilizando múltiples enfoques complementarios: Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS), Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) y Análisis de Redundancia (RDA).

Primero, se visualizó la estructura general de la comunidad mediante NMDS basado en la métrica de disimilitud de Bray-Curtis (**Figura 8**). La ordenación resultante presentó un excelente ajuste a las distancias originales entre muestras (Estrés NMDS = $9.15e-05$) y mostró una clara separación de la muestra correspondiente a la condición inicial (CondicionIni, punto rojo). Esta muestra (SRR7166474), previamente identificada por su baja riqueza de ASVs (**Figura 3**), se ubicó aislada del resto, principalmente a lo largo del primer eje NMDS. En contraste, las muestras de los tratamientos inoculación de *T. harzianum* ITEM 3636 (puntos verdes) y tratamiento control (puntos azules) se agruparon estrechamente, indicando una alta similitud en su composición comunitaria.

Para confirmar estadísticamente las diferencias observadas, se realizó un PERMANOVA. El análisis del modelo que incluía los factores tratamiento y año resultó altamente significativo ($R^2 = 0.445$, $p = 0.001$, **Tabla 6**), validando que la estructura general de la comunidad bacteriana difería significativamente entre los grupos experimentales definidos por estos factores.

Finalmente, para determinar la contribución específica y lineal de los factores tratamiento y año a la variación observada, se llevó a cabo un RDA sobre los datos transformados con Hellinger (**Figura 9**). El modelo RDA global fue significativo con un $p = 0.001$ (**Tabla 7**) y explicó un 22.8% de la variación ajustada (Adj. R^2) en la composición bacteriana. El análisis detallado de los efectos marginales de los factores dentro de este modelo restringido (**Tabla 7**) reveló que el año tuvo una influencia estadísticamente significativa ($F = 4.0493$, $p = 0.002$), mientras que el factor tratamiento no mostró un efecto marginal significativo ($F = 1.0955$, $p = 0.284$). En consonancia con esto, únicamente el primer eje canónico (RDA1), que separaba principalmente las muestras por año y aislaba la condición inicial, resultó ser estadísticamente significativo ($F = 4.0663$, $p = 0.001$).

En síntesis, los análisis de diversidad beta (NMDS, PERMANOVA, RDA) proporcionan una imagen coherente. Demuestran que la comunidad bacteriana inicial (CondicionIni, SRR7166474)

era composicionalmente distinta de las comunidades al final del experimento. Si bien el modelo PERMANOVA confirmó diferencias significativas generales asociadas a los factores tratamiento y año, el análisis RDA especificó que, dentro de la variación lineal explicada, el factor año fue el principal impulsor significativo detectado, sin evidencia de un efecto marginal significativo del tratamiento *per se* en esta aproximación lineal restringida. El tratamiento, considerado por sí solo, no mostró un efecto estadísticamente significativo.

Tabla 6

Resultados del Análisis de Varianza Multivariante Permutacional (PERMANOVA) para la diversidad beta bacteriana.

Fuente de Variación	Df	Suma de Cuadrados (Sum Sq)	R²	Pseudo-F	p-valor
Modelo (Treatment + Year)	3	0.853	0.445	2.14	0.001
Residuales	8	1.062	0.555		
Total	11	1.915	1.000		

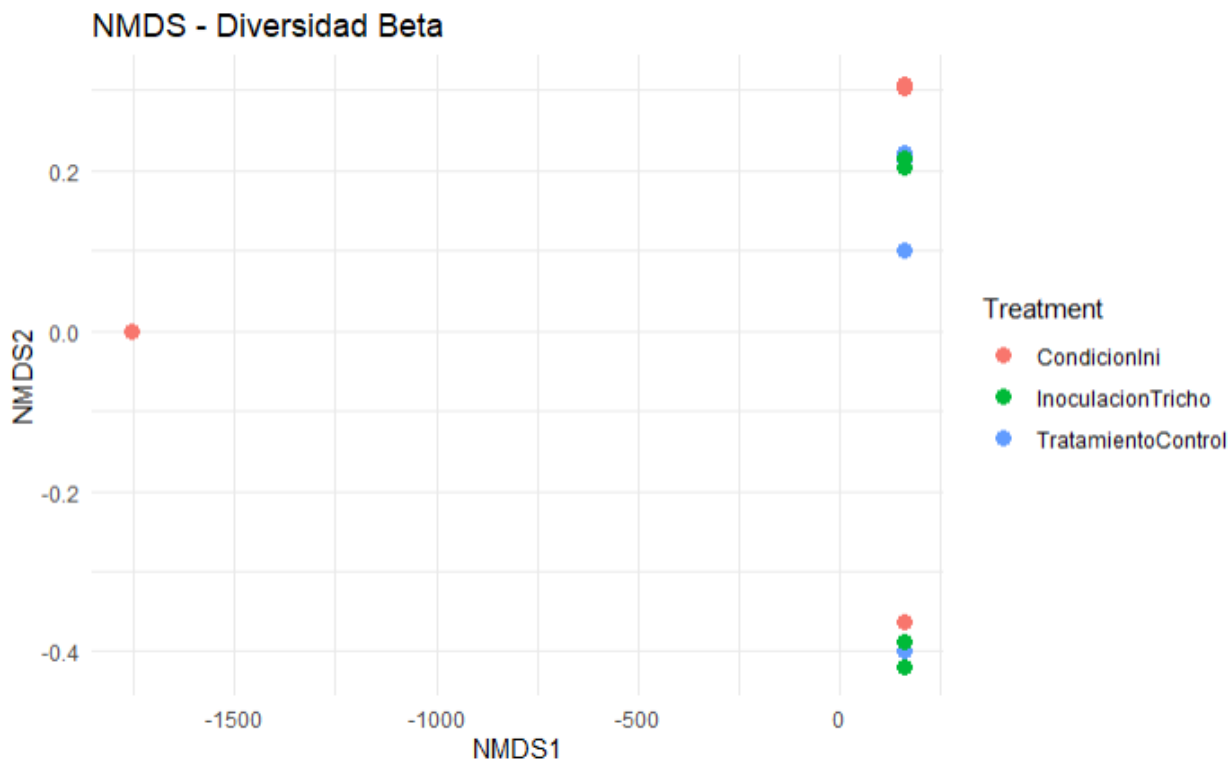


Figura 8 . Visualización de la diversidad beta bacteriana mediante NMDS (distancia Bray-Curtis).

Los puntos representan muestras individuales, coloreadas por tratamiento: Condición Inicial (CondicionIni), Inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho) y Tratamiento Control (TratamientoControl). La proximidad entre puntos indica mayor similitud en la composición comunitaria.

Tabla 7

Resumen de las pruebas de permutación para el Análisis de Redundancia (RDA).

Fuente de Variación	Df	Varianza	Pseudo-F	p-valor
Modelo Global	3	0.1680	2.0801	0.001 ***
Términos Marginales:				
Treatment	2	0.0590	1.0955	0.284
Year	1	0.1090	4.0493	0.002 **

Ejes Canónicos (RDA):

RDA1	1	0.1095	4.0663	0.001 ***
RDA2	1	0.0440	1.6326	0.368
RDA3	1	0.0146	0.5413	0.864
Residuales	8	0.2154		

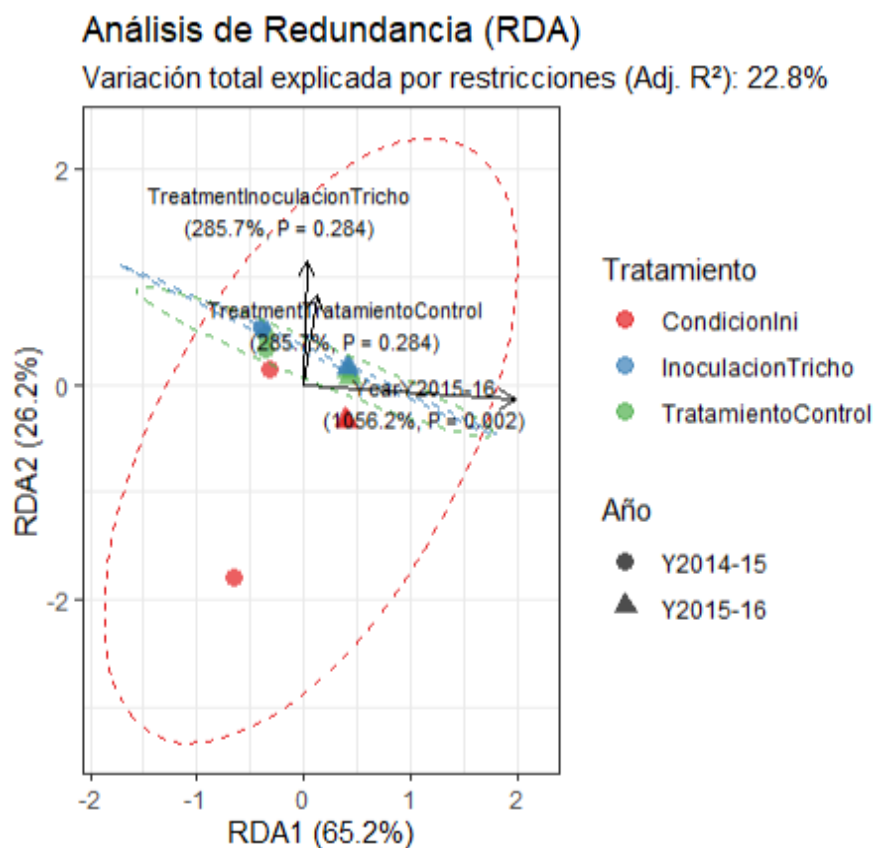


Figura 9. Análisis de Redundancia (RDA) de la composición bacteriana explicada por pretratamiento y Año. El modelo explica 22.8% (Adj. R²) de la variación. Puntos (muestras) coloreados/formados por Tratamiento/Año. Ejes RDA1 (65.2%) y RDA2 (26.2%) indican las principales dimensiones de variación restringida. Las anotaciones indican la significancia marginal de los factores (Año p=0.002, Tratamiento p=0.284).

Capítulo V: Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo general evaluar la composición y funcionalidad del microbioma del suelo en un cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) bajo diferentes condiciones, incluyendo la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636, durante dos ciclos agrícolas (2014-2015 y 2015-2016). Mediante el análisis bioinformático de datos de secuenciación del amplicón 16S rRNA, se buscó caracterizar la diversidad taxonómica y funcional, determinar la estructura comunitaria y comparar las diferencias entre las condiciones experimentales (suelo inicial, control sin inocular, inoculado con *T. harzianum*).

5.1 Calidad de Datos y Profundidad de Secuenciación

La validez de las conclusiones del estudio depende de la calidad de los datos de secuenciación. Los controles (FastQC/MultiQC) confirmaron una alta calidad general de las bases, a pesar de artefactos esperados en amplicones como alta duplicación (~89-90%) y, notablemente, un sesgo en la composición de nucleótidos al inicio de las secuencias, evidenciado en ambos períodos (**Figura 2**). Como menciona Martin et al. (2018), este sesgo inicial puede atribuirse a la preparación de la librería, posiblemente por eficiencias diferenciales en la amplificación o ligación. Sin embargo, estos artefactos técnicos no comprometieron la idoneidad general de los datos para el análisis (**Tabla 4**).

Crucialmente, las curvas de rarefacción (**Figura 3**) indicaron que la profundidad de secuenciación (~35,000-40,000 lecturas) fue suficiente para capturar la mayor parte de la diversidad de ASVs, al alcanzar una meseta. La muestra SRR7166474 (CondicionIni) presentó una riqueza notablemente inferior, con abundancia en pocos grupos dominantes y escasa representación en otros. Este perfil, aunque distinto, podría reflejar una condición biológica real del ecosistema inicial, como han reportado otros estudios donde muestras de baja diversidad son consideradas parte integral del estado basal del suelo (Bell & Bell, 2021). Dado que su curva de rarefacción también alcanzó una meseta, y representa una condición experimental válida, se decidió conservarla para capturar la variabilidad real del sistema y evitar la pérdida de información sobre el estado natural pre-inoculación. Esta validación conjunta de calidad y profundidad asegura que los análisis posteriores

reflejen patrones biológicos robustos, fundamentando las interpretaciones relativas a los objetivos del estudio.

5.2 Caracterización Taxonómica y Estructura de la Comunidad Bacteriana

En línea con el primer objetivo específico, la caracterización taxonómica reveló una comunidad bacteriana muy diversa. El análisis de abundancia relativa a nivel de género (**Figura 4**) mostró la presencia de un núcleo de géneros dominantes y relativamente estables a través de las condiciones y años, incluyendo *Gemmatimonas*, *Acidiferrimicrobium*, *Candidatus Solibacter* y *Sphingomonas* y las familias correspondientes como *Gemmatimonadaceae*, *Xanthobacteraceae* y *Sphingomonadaceae* (**Figura 5**). La persistencia de estos taxones sugiere que constituyen miembros centrales y adaptados del microbioma en este sistema de cultivo de maní, lo que indica que poseen una alta capacidad de adaptación a las características físico-químicas del suelo. En estudios anteriores como el de Xia et al., (2020) explora profundamente cómo la textura, y las propiedades fisicoquímicas asociadas a ella como porosidad, agua, nutrientes, protección física, junto con el pH y la humedad, son factores clave que estructuran y modulan las comunidades bacterianas en el suelo. Probablemente desempeñando funciones clave en la dinámica edáfica del suelo, incluyendo el ciclo de nutrientes, la optimización de la tolerancia al estrés ambiental y la interacción con las raíces de las plantas (Xia et al., 2020). Esta última función se ve reforzada por la capacidad de ciertos hongos, como *Trichoderma*, de promover la formación de agregados estables en el terreno a través de la generación de polisacáridos y la interacción con exudados de raíces y partículas minerales (Mesa et al., 2019), optimizando de esta manera la estructura del hábitat microbiano y de raíces.

Gemmatimonadetes y *Acidobacteria* (a la que pertenece *Candidatus Solibacter*) son filos comúnmente abundantes y diversos en suelos, desempeñando roles ecológicos importantes (Delgado et al., 2019). Un ejemplo de ellos es *Gemmatimonas*, que ha sido descrita como una bacteria oligotrófica común en terrenos agrícolas, que tiene la habilidad de aprovechar diferentes fuentes de carbono e involucrarse en el ciclo del fósforo, lo que indica un rol ecológico en la eficacia de la utilización de nutrientes (Sazykin et al., 2023). *Acidiferrimicrobium* se ha encontrado en suelos ácidos y se relaciona con el metabolismo del hierro y la tolerancia a ambientes con bajos niveles de pH, condiciones comunes en suelos cultivados intensivamente (González et al., 2020). *Sphingomonas* es conocido por su versatilidad metabólica, incluyendo la degradación de

compuestos orgánicos complejos. Según Leys et al. (2004), *Sphingomonas* puede aislarse de diversos ambientes, como suelos terrestres, subsuperficiales y de rizosfera. Esto respalda que su presencia como género dominante en el suelo agrícola sea esperable, dado que son habitantes comunes y bien adaptados a estos ecosistemas. Además, su detección en la rizosfera sugiere una posible interacción con las raíces de las plantas en este caso, maní.

A nivel de familia (**Figura 5**), se observó una notable estabilidad estructural entre tratamientos y años, con familias como Gemmatimonadaceae, Xanthobacteraceae, Micromonosporaceae y Sphingomonadaceae consistentemente presentes. Un hallazgo relevante fue la alta proporción (~50%) de secuencias clasificadas como "Others", representando taxones de baja abundancia. Esto subraya la existencia de una "biosfera rara" significativa en el suelo, que contribuye sustancialmente a la diversidad taxonómica total y puede albergar un reservorio de potencial funcional importante. Como demuestran estudios comparativos entre métodos basados en cultivo y secuenciación directa, la secuenciación de amplicones, si bien potente para caracterizar la comunidad general, puede subestimar la presencia y diversidad de microorganismos de baja abundancia. Es plausible que muchos de estos miembros poco abundantes, que podrían ser detectados mediante cultivo o secuenciación más profunda, desempeñen roles ecológicos cruciales (Shade et al., 2012). En nuestro caso, es posible que la inoculación con *Trichoderma* no haya alterado drásticamente la composición de los taxones bacterianos más abundantes, pero sí haya interactuado o influido selectivamente sobre miembros de la biosfera rara que poseen las funciones clave detectados. Estos organismos raros, aunque poco representados en nuestros perfiles de abundancia relativa, podrían ser responsables de los cambios funcionales observados, actuando como efectores claves de la influencia de *Trichoderma* en la dinámica biogeoquímica del suelo.

Comparando las condiciones experimentales, los análisis taxonómicos a nivel de género y familia no revelaron diferencias drásticas y consistentes atribuibles directamente a la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 o al cultivo de maní per se (TratamientoControl vs CondicionIni) en términos de los taxones dominantes. Si bien se notaron fluctuaciones interanuales y variaciones puntuales, la estructura general de la comunidad dominante pareció resiliente a los tratamientos aplicados en este estudio. Esto podría indicar que los efectos de *Trichoderma* sobre la comunidad bacteriana son sutiles, afectan a taxones menos abundantes no destacados en estos análisis, o se manifiestan más a nivel funcional que estructural. Este hallazgo subraya la importancia de

considerar que los cambios funcionales en el microbioma del suelo no siempre se reflejan en alteraciones masivas de la estructura comunitaria dominante detectable mediante secuenciación estándar de amplicones (Shade et al., 2012).

5.3 Diversidad Alfa y Beta: Efectos del Tiempo y Tratamiento

El análisis de diversidad alfa (**Figura 7, Tabla 5**) cumplió parte del segundo objetivo específico, mostrando diferencias significativas entre las condiciones. Consistentemente, la condición inicial (CondicionIni) presentó una menor riqueza (Observed, Chao1) y diversidad (Shannon, Simpson, InvSimpson) en comparación con los tratamientos posteriores (InoculacionTricho, TratamientoControl). Estos últimos dos no difirieron significativamente entre sí, sugiriendo que el establecimiento del cultivo de maní, independientemente de la inoculación, o simplemente el paso del tiempo y los cambios ambientales asociados entre los periodos de muestreo, promovieron un aumento en la diversidad bacteriana observable (De León Lorenzana, 2018; Ganuza et al., 2018).

La siembra de plantas puede enriquecer la diversidad microbiana del suelo a través de la rizodeposición que se trata del proceso por el cual las raíces exudan azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otras moléculas. Estos exudados actúan como fuentes de carbono y energía para los microorganismos del suelo, promoviendo el crecimiento y enriquecimiento de comunidades microbianas específicas (Mesa et al., 2019). Haichar et al. (2008) demostraron que los exudados de las raíces y el hábitat de la planta moldean significativamente la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. Además, señalaron que la presencia de raíces de plantas no solo aumenta la biomasa microbiana en el suelo, sino que también mejora la diversidad taxonómica y funcional del microbioma.

Es importante destacar que, en nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas en los índices de diversidad alfa entre el tratamiento control (TratamientoControl) y el tratamiento inoculado con *Trichoderma* (InoculacionTricho). Esto sugiere que, si bien la presencia del cultivo de maní ejerció una fuerte influencia positiva sobre la diversidad bacteriana en comparación con el estado inicial, la inoculación específica con *T. harzianum* ITEM 3636 no generó un impacto adicional detectable en estas métricas de diversidad alfa. Esto señala que *T. harzianum* ITEM 3636 tiene la capacidad de ser un biocontrol efectivo sin comprometer la biodiversidad del suelo,

resaltando su potencial para el manejo sostenible de cultivos y la preservación de la salud del ecosistema agrícola (Ganuza et al., 2018).

Los análisis de diversidad beta proporcionaron una visión complementaria. El NMDS (**Figura 8**) visualizó claramente la separación de la muestra inicial (SRR7166474), corroborando su composición distintiva. Las muestras de los tratamientos inoculación de *Trichoderma* (InoculacionTricho) y tratamiento control (TratamientoControl) se agruparon, indicando una mayor similitud composicional entre ellas que con la condición inicial. El análisis PERMANOVA (**Tabla 6**) confirmó que existían diferencias significativas en la estructura comunitaria considerando los factores Tratamiento y Año conjuntamente ($R^2=0.445$, $p=0.001$). Sin embargo, el análisis RDA (**Figura 9, Tabla 7**), que evalúa las relaciones lineales, atribuyó la mayor parte de la varianza explicada significativa al factor Año ($p=0.002$), mientras que el efecto marginal del Tratamiento no fue estadísticamente significativo ($p=0.284$).

A pesar de que el análisis PERMANOVA detectó diferencias significativas en la estructura comunitaria entre tratamientos y años, el RDA mostró que el año explicó de manera más fuerte la varianza composicional, mientras que el tratamiento no fue significativo. Esto podría deberse a que efectos como la inoculación con *Trichoderma* son más sutiles o no lineales, características que RDA, al modelar solo relaciones lineales, podría no capturar completamente (Ramette, 2007; Prober et al., 2015). Además, las fluctuaciones interanuales, asociadas a condiciones ambientales fluctuantes, son un agente conocido de la dinámica microbiana en suelos agrícolas (Prober et al., 2015).

5.4 Perfil Funcional Inferido y Potencial Impacto de *Trichoderma*

La predicción funcional (**Figura 6**), abordando el primer y tercer objetivo específico, reveló diferencias significativas inducidas por los tratamientos en funciones clave, particularmente en los ciclos del nitrógeno y azufre. Wang et al. (2023) demostraron que los biofertilizantes enmendados con *Trichoderma* aumentan la biodiversidad de hongos beneficiosos en el suelo, lo que se traduce en una mayor productividad vegetal. Esta influencia se atribuye, en parte, a la estimulación de microorganismos asociados a la mineralización de nutrientes, incluyendo procesos críticos del ciclo del nitrógeno y del azufre. Consistentemente, en este estudio, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 (InoculacionTricho) se asoció con una mayor abundancia relativa de genes

putativamente involucrados en la oxidación aeróbica de amonio, nitrificación, respiración de sulfato y respiración de compuestos de azufre, en comparación con la condición inicial (CondicionIni). De forma similar, Wei et al. (2023) reportaron que la inoculación con *T. harzianum* ST02 en cultivos de sorgo dulce en suelos salinos incrementó significativamente la abundancia de genes funcionales del ciclo del nitrógeno, incluyendo *nifH* (fijación biológica de nitrógeno) y *amoA* (oxidación de amonio), tanto en la rizósfera como en el suelo circundante.

Estos hallazgos refuerzan la idea de que diferentes cepas de *T. harzianum* pueden estimular selectivamente comunidades microbianas funcionales relacionadas con la mejora de la fertilidad y el reciclaje de nutrientes en distintos tipos de suelos. El tratamiento control a menudo ocupó una posición intermedia. Estos hallazgos son particularmente relevantes, ya que *Trichoderma* spp. son conocidos promotores del crecimiento vegetal, en parte por su capacidad para mejorar la solubilización y disponibilidad de nutrientes (Hernández et al., 2019; Cambero et al., 2023; Mujica et al., 2017). El aumento inferido en la actividad de nitrificación (conversión de amonio a nitrato) y en procesos del ciclo del azufre podría reflejar una estimulación indirecta de grupos bacterianos específicos involucrados en estos ciclos por parte de *T. harzianum*, ya sea a través de la modificación del ambiente rizosférico, la liberación de metabolitos o la mejora de la salud de la planta (Iizuka et al., 2024).

Por otro lado, funciones como la metanotrofía, metilotrofía, quitinolisis y denitrificación no mostraron diferencias significativas, sugiriendo que el impacto de *T. harzianum* ITEM 3636 fue selectivo sobre ciertas vías metabólicas bajo estas condiciones. Shahriar et al. (2022) encontraron que los metabolitos secundarios de *Trichoderma* influyen en la estructura y función de las comunidades microbianas no patógenas del suelo. Sin embargo, ciertos procesos metabólicos, como la metanotrofía y la denitrificación, no se vieron alterados de manera significativa, lo que podría indicar que las interacciones de *Trichoderma* con las comunidades microbianas varían en función del tipo de función microbiana.

Capítulo VI: Conclusiones

- El estudio logró caracterizar de manera efectiva la composición taxonómica y el potencial funcional del microbioma bacteriano del suelo en cultivos de maní, bajo las condiciones evaluadas. La variación en la abundancia relativa de géneros clave como *Candidatus Solibacter* y *Streptomyces* entre los periodos 2014–2015 y 2015–2016, así como entre tratamientos, destaca la influencia de factores temporales y ambientales, además del efecto de la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636, en la estructuración de la comunidad bacteriana. El incremento notable de *Streptomyces* en algunas muestras tratadas sugiere un posible efecto beneficioso inducido, posiblemente vinculado a la mejora de la salud del suelo o al estímulo de mecanismos naturales de control biológico asociados a este género.
- A pesar de no inducir cambios drásticos en la estructura taxonómica dominante ni en la diversidad alfa en comparación con el control, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 se asoció significativamente con un mayor potencial genético inferido para funciones clave del ciclo del nitrógeno y azufre, sugiriendo una modulación funcional selectiva como su principal efecto detectable en este sistema.

Capítulo VII Recomendaciones

- Para el presente estudio, los análisis bioinformáticos se adaptaron para trabajar con las características de los datos de secuenciación obtenidos. No obstante, se reconoce que partir de secuencias con una calidad inherente potenciaría la robustez de los análisis y la resolución de los resultados. Por lo tanto, como recomendación para futuras investigaciones en esta línea, se sugiere explorar la optimización de los protocolos de laboratorio (wet-lab), incluyendo posibles re-extracciones o ajustes en la secuenciación, con el objetivo de maximizar la calidad de los datos iniciales y, consecuentemente, la fiabilidad de las conclusiones.
- El presente estudio solo se centró en bacterias (16S rRNA). Para obtener una visión más completa de la interacción de *T. harzianum* (un hongo) con el microbioma, es crucial incluir el análisis de la comunidad fúngica (mediante secuenciación del espaciador interno transcrito - ITS) en futuros estudios.
- Dado que el principal efecto observado fue sobre el potencial funcional inferido, se recomienda realizar estudios futuros utilizando metatranscriptómica para medir expresión génica o ensayos de actividad enzimática específicos en el suelo para confirmar si este potencial se traduce en una mayor actividad biogeoquímica real.
- Se sugiere que en futuras investigaciones el enfoque que se estudie sea integrado, que considere la integración de la cepa *T. harzianum* con diversas prácticas de manejo del suelo, como estrategias de fertilización optimizadas, rotación de cultivos, el uso de enmiendas orgánicas, y la aplicación conjunta con otros microorganismos beneficiosos, o agentes de control biológico compatibles.

Capítulo VIII: Referencias

- Arteaga, R. I. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agro Productividad*, 9(2). Recuperado de <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/723>
- Alvarado-Aguayo, A., Pilalao-David, W., Torres-Sánchez, S., & Torres-Sánchez, K. (2019). Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*) en pepino. *Agronomía Costarricense*, 43(1). <https://doi.org/10.15517/rac.v43i1.35672>
- Babraham Bioinformatics. (2018). *FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Recuperado de <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Barahona, A., Casanueva López, M., & Vergara Silva, F. (Coords.). (2021). *Biofilosofías para el Antropoceno: La teoría de construcción de nicho desde la filosofía de la biología y la bioética*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Filosofía y Letras. Recuperado de https://www.academia.edu/62288168/Estructura_1%C3%B3gico_conceptual_de_la_teor%C3%ADa_de_la_construcci%C3%B3n_de_nicho_una_reconstrucci%C3%B3n_grafo_modelo
- Bell, T. H., & Bell, T. (2021). Many roads to bacterial generalism. *FEMS Microbiology Ecology*, 97, Article fiae240. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae240>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325-349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Cáceres, E., Castro, R., Marcial, M. S., Gudiño, M. E., Yáñez, J. M., Montes, O., Figueroa, H. F., Juárez, M., Aguirre, A. A., Vásquez, K. E., Cabascang, J. D., Gualotuña, A. P., Chávez, D. A., & Machado, N. G. (2021). *Diseño y optimización de bioinsumos para la producción sostenible de leguminosas de canasta básica y alta calidad nutricional en el Ecuador* [Propuesta de investigación]. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/360512332>

- 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>
- Callahan, B. J. (2020). *DADA2 Pipeline Tutorial (1.16)*. Recuperado de <https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>
- Camero, C. B., Rios, C., Luna, G., López, G. G., Estrada, M. O., & Camero, O. J. (2023). Supresión in vitro de patógenos fúngicos de raíz en *Annona muricata* L. por cepas de *Trichoderma* y fungicidas convencionales: Supresión de patógenos de raíz de guanábana. *Revista de Biología*, 10, e1497. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1497>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma spp.* y *Pseudomonas spp.* Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15–31. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262011000200003
- Cortés, N., Ordóñez, P., & Domínguez, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Cotler, H., Corona, J. A., & Galeana, J. M. (2020). Erosión de suelos y carencia alimentaria en México: una primera aproximación. *Investigaciones geográficas*, (101), e59976. <https://doi.org/10.14350/ig.59976>
- Cuadras, A., Peinado, V., Peinado, H., López, J., & Herrera, J. (2021). Agricultura intensiva y calidad de suelos: retos para el desarrollo sustentable en Sinaloa. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(8), 1401-1414. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i8.2704>
- Cruz, R. K., Piraneque, N. V., & Aguirre, S. (2023). *Introducción a la biología y microbiología de suelos* (Primera ed.). Editorial Unimagdalena. Recuperado de

<https://www.researchgate.net/publication/368321879> Introduccion a la biologia y microbiologia de suelos

Dharumadurai, D., & Sankara, A. (Eds.). (2025). *Plant microbiome engineering*. Springer Nature. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-0716-4180-4>

De León Lorenzana, A. S. (2018). Cambios en la estructura de las comunidades bacterianas en un suelo salino-alkalino extremo ante cambios ambientales (Tesis de doctorado). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Recuperado de <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1376/SSIT0015310.pdf?sequence=1>

Delgado, J. C., Beltrán, M., Cerna, E., Aguirre, L. A., Landero, J., Rodríguez, Y., & Ochoa, Y. M. (2019). *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y control. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 22, e177. Recuperado de <http://tip.zaragoza.unam.mx/index.php/tip/article/view/177/228>

Donaire, K., Pérez, A., Romero, D. X., Cárdenas, O., & Álvarez, M. T. (2017). Establecimiento y evaluación de dos métodos de pretratamiento de muestras de suelo para la extracción de ADN para el estudio de la diversidad bacteriana. *Con-Ciencia*, 5(1), 11-25. Recuperado de http://www.scielo.org/bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652017000100002

Escalante, A., Gosset, G., Martínez, A., & Bolívar, F. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38(6), 583-592. Colegio de Postgraduados. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30238602>

Etchevers B., J. D., Cotler, H., & Hidalgo, Claudia. (2020). Salir de la invisibilidad: nuevos retos para la ciencia del suelo. *Terra Latinoamericana*, 38(4), 931-938. Epub 12 de febrero de 2021. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.867>

- Ganuza, M., Pastor, N., Boccolini, M., Erazo, J., Palacios, S., Oddino, C., Reynoso, M. M., Rovera, M., & Torres, A. M. (2018). Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 608–623. <https://doi.org/10.1111/jam.14147>
- Galaxy Training Network. (2025). *Quality control* [Tutorial]. Galaxy Training Network. Recuperado el 01 de abril de 2025, de <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/sequence-analysis/tutorials/quality-control/tutorial.html>
- González, D., Huber, K. J., Tindall, B., Hedrich, S., Rojas-Villalobos, C., Quatrini, R., Dinamarca, M. A., Ibacache-Quiroga, C., Schwarz, A., Canales, C., & Nancucheo, I. (2020). *Acidiferrimicrobium australe* gen. nov., sp. nov., an acidophilic and obligately heterotrophic member of the Actinobacteria that catalyses dissimilatory oxido-reduction of iron isolated from metal-rich acidic water in Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5). Recuperado de <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004179>
- González, Y., Ortega, J., Anducho, M. A., & Mercado, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25, e520. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Hanson, C. A., Vogel, J. S., & McMahon, K. D. (2008). The role of niche differentiation in the establishment and maintenance of microbial communities. *Microbial Ecology*, 55(1), 121-130. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9254-x>
- Haichar, F. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., & Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2(12), 1221–1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de

interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), Chillán.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>

INIAP. (2004). Maní, guía del cultivo para las zonas de Loja y El Oro. Programa de Modernización de los Servicios Agropecuarios: Vol. Boletín 314. Recuperado de <https://agris.fao.org/search/ru/records/64724208e17b74d2224f16e6>

Knežević, S. (2024, 18 de noviembre). *En el Anuario estadístico de la FAO (2024) se presentan aportaciones cruciales sobre la sostenibilidad de la agricultura y la seguridad alimentaria mundiales*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). <https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-statistical-yearbook-2024-reveals-critical-insights-on-the-sustainability-of-agriculture-food-security-and-the-importance-of-agrifood-in-employment/es>

Kremer, F. S. (2021, julio 7). *Microbioma: Análise de dados de Whole Metagenome Sequencing (WMS) com Kraken2 e Krona*. Omixdata. Recuperado de <https://medium.com/omixdata/microbioma-an%C3%A1lise-de-dados-de-whole-metagenome-sequencing-wms-com-kraken2-e-krona-bc48c26b57fe>

Kruskal, J. B. (1964). Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 29(2), 115-129. <https://doi.org/10.1007/BF02289694>

Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., & Springael, D. (2004). Ocurrencia y diversidad filogenética de cepas de *Sphingomonas* en suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1944–1955. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1944-1955.2004>

Iizuka, R., Hattori, S., Kosaka, Y., Masaki, Y., Kawano, Y., Ohtsu, I., Hibbett, D., Katayama, Y., & Yoshida, M. (2024). Sulfur assimilation using gaseous carbonyl sulfide by the soil fungus *Trichoderma harzianum*. *Mycology*, Advance online publication. <https://doi.org/10.1128/aem.02015-23>

- López, R., Catalán, L., Ortuño, C., & Ros, M. (2011). *Trichoderma harzianum* application for vineyard management: Effects on soil enzymatic activities, grape quality, and production. *Applied Soil Ecology*, 47(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.11.003>
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., & Yao, M. (2021). microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2), fiae255. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae255>
- Matailo, L., Luna, Á. E., Chabla, J. E., & Gálvez, P. A. (2023). Modelización del rendimiento con Aquacrop-FAO en el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.), Ecuador. *Manglar*, 20(1). <http://dx.doi.org/10.57188/manglar.2023.006>
- Martin, T. C., Visconti, A., Spector, T. D., & Falchi, M. (2018). Conducting metagenomic studies in microbiology and clinical research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(20), 8629–8646. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9209-9>
- Martínez, D. S., Rivera, F., Palacios, I., Ramírez, B. A., Molina, C., & Moguel, B. B. (2022). Metagenómica y metatranscriptómica para mitigar las emisiones de metano por animales rumiantes. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25, 1-18. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.430>
- McLaren, M. R., & Callahan, B. J. (2021). *Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2* (Versión v1) [Conjunto de datos]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4587955>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Medina, O. (2023). *Análisis de microbiota parte 2*. RPubs. Recuperado de <https://rpubs.com/omedinac/1107306>

- Mesa, A. M., Marin, A., & Calle, J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 13–28. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Meyer, M. C., Mazaro, S. M., & da Silva, J. C. (Eds.). (2022). *Trichoderma: Su uso en la agricultura* (Y. C. Colmenárez & C. L. Vásquez Freytez, Trans.). Embrapa. Recuperado de <https://core.ac.uk/download/pdf/541488776.pdf#page=328>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. (2018). *Análisis FODA: Maní*. Recuperado de https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/apertura_de_mercados/analisis_foda/archivos/000506_Man%C3%AD%20-%202018.pdf
- Montero, J. (2020). Importancia nutricional y económica del maní (*Arachis hypogaea* L.). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(2), 112-125. Recuperado de http://www.scielo.org.bo/pdf/riiarn/v7n2/v7n2_a14.pdf
- Mujica, Y., Medina, A., & Rodríguez, E. (2017). Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares y bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Cultivos Tropicales*, 38(2), 15–21. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362017000200002&script=sci_arttext
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018). *Sequence Read Archive: SRP146071* [Conjunto de datos]. National Library of Medicine (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=SRP146071>
- National Research Council (US), Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. (2007). The new science of metagenomics: Revealing the secrets of our microbial planet. *National Academies Press*. <https://doi.org/10.17226/11902>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., ... Vieira, M. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.6-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

- Oliveira, L. A. B., Resende, C. L. P., Cintra, P. H. N., Carvalho, D. D. C., & Rodrigues, F. (2023). Growth promotion of *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* seedlings using strains of *Trichoderma* spp. under phosphorus rates. *Revista Floresta*, 53(2), 165-173. <https://doi.org/10.5380/rf.v53i2.82498165>
- Prober, S. M., Leff, J. W., Bates, S. T., Borer, E. T., Firn, J., Harpole, W. S., Lind, E. M., Seabloom, E. W., Adler, P. B., Bakker, J. D., Cleland, E. E., DeCrappeo, N. M., DeLorenze, E., Hagenah, N., Hautier, Y., Hofmockel, K. S., Kirkman, K. P., Knops, J. M. H., La Pierre, K. J., ... Fierer, N. (2015). Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology Letters*, 18(1), 85–95. <https://doi.org/10.1111/ele.12381>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142–160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Reganold, J. P., Palmer, A. S., Lockhart, J. C., & Macgregor, A. N. (1993). Soil quality and financial performance of biodynamic and conventional farms in New Zealand. *Science*, 260(5106), 344-349. <https://doi.org/10.1126/science.260.5106.344>
- Rimachi, L. F., Andrade, D., Milusqui Verástegui, M., Mori, J., Soto, V., & Estrada, R. J. (2012). Variabilidad genética y distribución geográfica del maní (*Arachis hypogaea* L.) en la Región Ucayali, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 19(3), 241–248. <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i3.7584>
- Rivera, A., Vazquez, D., Fernández, J. L., Rosete, M., Cesa, C., Morales, Y. E., Muñoz, J., & Quintero, V. (2021). Aportes y dificultades de la metagenómica de suelos y su impacto en la agricultura. *Acta Biológica Colombiana*, 26(3), 449-461. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.85760>
- Sazykin, I., Khmelevtsova, L., Azhogina, T., & Sazykina, M. (2023). Heavy metals influence on the bacterial community of soils: A review. *Agriculture*, 13(3), 653. <https://doi.org/10.3390/agriculture13030653>
- Schmidt, H., Adams, R. I., & Pine, J. (2018). Advances in microbiome research: How bioinformatics tools are changing the field. *Bioinformatics Reviews*, 34(12), 2097-2112. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty067>

- Shade, A., Hogan, C. S., Klimowicz, A. K., Linske, M., McManus, P. S., & Handelsman, J. (2012). Culturing captures members of the soil rare biosphere. *Environmental Microbiology*, *14*(9), 2247–2252. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02817.x>
- Shahriar, S. A., Islam, M. N., Chun, C. N. W., Kaur, P., Rahim, M. A., Islam, M. M., Uddain, J., & Siddiquee, S. (2022). Microbial metabolomics interaction and ecological challenges of *Trichoderma* species as biocontrol inoculant in crop rhizosphere. *Agronomy*, *12*(4), 900. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040900>
- Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(11), 5995-6000. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5995>
- Valdés, Y. D. (2022). *Metagenómica de suelos Acrisoles háplico de Panamá* [Tesis de licenciatura, Universidad de Panamá]. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Escuela de Biología. Recuperado de https://up-rid.up.ac.pa/6504/1/yureiby_valdes.pdf
- Velásquez, J., Monteros, A., & Tapia B., C. (2008). *Semillas, tecnología de producción y conservación*. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Producción de Semillas. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/56>
- Vinuesa, P. (2018). Ejercicio de parseo de archivos FASTA. Recuperado de https://vinuesa.github.io/intro2phyloinfo/practica2_parseo_fastas/
- Wang, Y., Liu, Z., Hao, X., Wang, Z., Wang, Z., Liu, S., Tao, C., Wang, D., Wang, B., Shen, Z., Shen, Q., & Li, R. (2023). Biodiversity of the beneficial soil-borne fungi steered by *Trichoderma*-amended biofertilizers stimulates plant production. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, *9*, 46. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00416-1>
- Wei, Y., Yang, Y., Hu, Y., Li, Y., Zhao, Y., Wu, X., Li, Y., Zhou, Y., Yang, Y., & Yang, Y. (2023). *Trichoderma harzianum* inoculation promotes sweet sorghum growth in saline soil by modulating rhizosphere available nutrients and bacterial community. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1258131. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1258131>

- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Xia, Q., Rufty, T., & Shi, W. (2020). Diversidad y composición microbiana del suelo: vínculos con la textura del suelo y las propiedades asociadas. *Biología y Bioquímica del Suelo*, 149, 107953. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107953>
- Xu, J., Zhang, Y., Zhang, P., & Tang, Z. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 170(2), 105860. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860>

Capítulo IX: Anexos

Anexos 1

Archivos resultantes del procesamiento realizado a través de la línea de comandos.

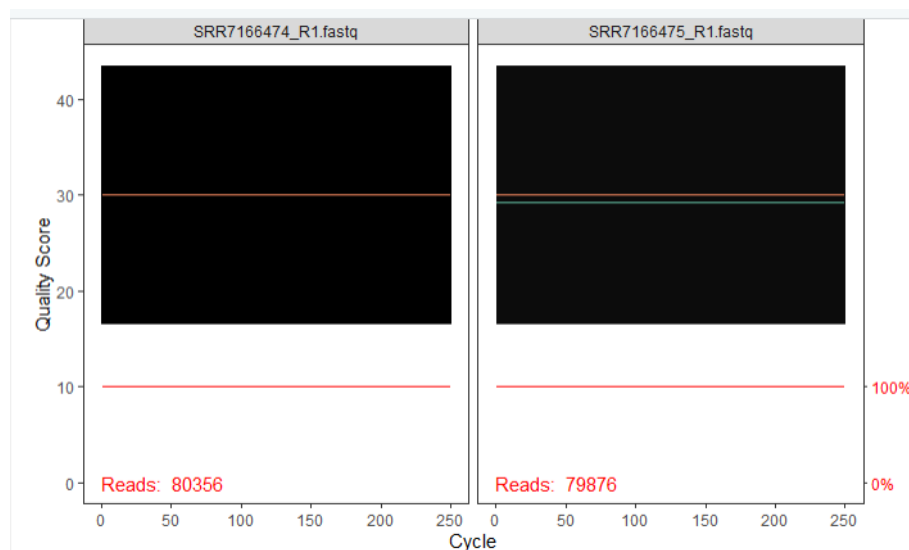
Enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/1EV6s1Ld-E0wjdIL75pM1y0c_kAOky8DS?usp=sharing

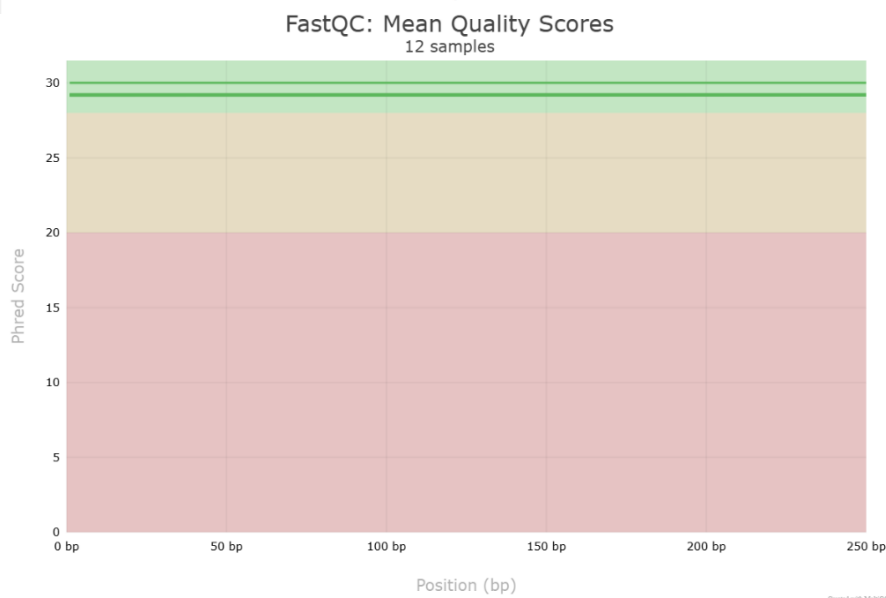
Anexos 2

Visualización de los análisis de control de calidad A) el entorno R, y B) la plataforma Galaxy

A)



B)



Anexos 3

Archivo phyloseq en formato RD pipeline. Enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/1EV6s1Ld-E0wjdIL75pM1y0c_kAOkY8DS?usp=sharing

Anexos 4

Pipeline de trabajo bioinformático para el análisis de datos de amplicón

