



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis del microbioma fúngico presente en diferentes tipos de suelos cacaoteros con cadmio en el municipio de Yacopí - Cundinamarca

Diego Alejandro González Bello

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía
Bogotá, Colombia

2023

Análisis del microbioma fúngico presente en diferentes tipos de suelos cacaoteros con cadmio en el municipio de Yacopí - Cundinamarca

Diego Alejandro González Bello

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Ph.D. Esperanza Torres Rojas

Codirector:

Ph.D. Alejandro Caro Quintero

Línea de Investigación:

Suelos y Aguas

Grupo de Investigación:

Agrobiodiversidad y Biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía

Bogotá, Colombia

2023

“Lo primero es conocerse, y lo segundo, cultivarse. Nuestra individualidad es nuestro huerto, y la personalidad es nuestro fruto. Individualidad es la obra posible que está en cada hombre en forma de instintos, facilidades, habilidades, tendencias; todo ello proviene de la raza, el medio, la sociedad. Individualidad es lo que está encerrado en nosotros y que puede manifestarse o no, así como en la envoltura del capullo está la semilla, el árbol y los frutos. “

Fernando González Ochoa

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Diego Alejandro González Bello

Fecha 24/07/2023

Agradecimientos

Especialmente a mí directora la doctora Esperanza Torres Rojas, por su dirección, guía, tiempo, apoyo, confianza y paciencia en este proceso de enseñanza.

A mi codirector el doctor Alejandro Caro Quintero, por su acompañamiento, instrucción y direccionamiento durante el desarrollo de este trabajo.

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá por el financiamiento del proyecto macro en el que se desarrolló este trabajo (Hermes: 42156).

A los agricultores del municipio de Yacopí Cundinamarca por permitirnos acceder a sus fincas, por su hospitalidad y amabilidad durante el muestreo.

Al Grupo de investigación Agrobiodiversidad y Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y su semillero por su apoyo en la fase experimental, por la retroalimentación, discusión durante todas las fases de este proyecto. En especial al Ingeniero Agrónomo Camilo Bustos Linares y la Ingeniera Agrónoma Daniela Roa Pinilla por el apoyo y esfuerzo brindado durante el desarrollo de la investigación.

A los profesores Michael Ray Gribskov, Martha Henao Toro y Enrique Darghan Contreras por compartir su conocimiento, darnos el apoyo y consejo durante las dudas surgidas de este proyecto.

A mi familia y amigos que me dieron palabras de ánimo y paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

Resumen

Análisis del microbioma fúngico presente en suelos cacaoteros con diferentes concentraciones de cadmio

El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico que altera el crecimiento y desarrollo de todos los organismos presentes en los sistemas agrícolas. Las plantas de cacao acumulan Cd y se han registrado altas concentraciones en los granos de cacao, lo que afecta la seguridad alimentaria y su comercialización. La comunidad microbiana del suelo cumple un papel importante en el ciclaje de nutrientes y en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Dentro de esta comunidad se destacan los hongos, que establecen redes miceliales que colonizan el suelo y exhiben mecanismos de tolerancia que les permiten sobrevivir altas concentraciones del metal. Sin embargo, pocos estudios han evaluado el efecto de las propiedades fisicoquímicas del suelo y del Cd sobre la comunidad fúngica presente en suelos cacaoteros. El objetivo de este estudio fue caracterizar la diversidad estructural de los microbiomas fúngicos presentes en suelos cacaoteros con diferentes propiedades físicas, químicas y concentraciones de Cd del municipio de Yacopí-Cundinamarca. Para ello, se seleccionaron tres fincas cacaoteras con diferentes concentraciones de Cd ($F1 > 5,0 \text{ mg kg}^{-1}$; $F2$ y $F3 < 2 \text{ mg kg}^{-1}$) y dos lotes uno con cultivo de cacao (SCC) y otro sin cultivo de cacao (SWC) en cada finca. Se colectaron muestras de suelo rizosférico (Rz) y no Rz a dos profundidades, D1 (0-30 cm) y D2 (31-100 cm); y muestras de hojarasca (HJ), hojas (HF) y frutos en los lotes SCC. Para los lotes SWC se colectaron únicamente suelo a las profundidades D1 y D2. (i) Se determinaron las propiedades fisicoquímicas del suelo y su relación con el Cd en suelos, hojarasca, hoja y grano de cacao en las tres fincas. Se encontró que la distribución de Cd fue heterogénea y mayor en $F1 > F3 > F2$, y en los suelos de F1 los contenidos de Cd fueron mayores $SCC > SWC$ y en suelos $Rz > D1 = D2$, alcanzado un valor promedio de $10,24 \text{ mg kg}^{-1}$. Las concentraciones de Cd presentes en los suelos de las tres fincas fueron superiores a los niveles establecidos por las entidades regulatorias internacionales para suelos agrícolas no contaminados ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) y el contenido de Cd en granos fue superior a las concentraciones permitidas por la comunidad europea para grano seco ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$). La concentración de Cd en los tejidos vegetales analizados fue mayor en $HJ > HF > G$. También el contenido de Cd en la HJ fue mayor a lo encontrado en el suelo a profundidad de D1, lo que podría contribuir a la recirculación del Cd en sistema suelo-planta. Posteriormente, (ii)

se caracterizó la riqueza y abundancia relativa de la comunidad fúngica presentes en los suelos analizados. Los resultados muestran que la riqueza y la abundancia relativa encontrada en SCC fue mayor que la presente en SWC, indicando que el cultivo de cacao crea ambientes diferentes que favorecen la diversidad. Los ASVs (taxones) encontrados en los suelos de la finca F1 mostraron menor similitud con respecto a los presentes en los suelos de las fincas F2 y F3, mayor número de ASVs únicos en suelos con cultivo (SCC) y en suelos Rz; lo que indica que la estructura de la comunidad fúngica se ve alterada por las propiedades fisicoquímicas, el contenido de Cd en el suelo, el cultivo de cacao y la rizosfera. Los phylum *Ascomycota* (68%) y *Basidiomycota* (25%) fueron los más abundantes, donde los órdenes *Hypocreales*, *Pleosporales* y *Capnodiales* fueron los más representativos. Adicionalmente, los análisis de abundancia diferencial destacan los géneros *Hypoxyton*, *Microdochium*, *Xylaria* y la familia *Nectricaceae*, los cuales han sido reportados como tolerantes a metales pesados. También se encontraron géneros raros y pocos conocidos como *Plectosphaerella*, *Tetracladium*, *Microdihum* y *Cyberlindnera* que podrían tener capacidad de tolerar altas concentraciones de Cd. Finalmente, (iii) se evaluó el efecto de las características fisicoquímicas y concentraciones de Cd presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas. Se encontró que las propiedades fisicoquímicas de los suelos presentaron bajas correlaciones con los índices de diversidad alfa, indicando que la estructura de las comunidades fúngicas está determinada por múltiples factores. La textura, el pH, CO, N, Na y Cdt mostraron tener mayor efecto en la diversidad estructural. Las redes de co-ocurrencia mostraron géneros fúngicos únicos y compartidos por finca. A su vez, se encontró que la finca F1 se presentó una estructura más homogénea debido posiblemente a los altos contenido de Cd y propiedades fisicoquímicas encontradas, en contraste, la finca F2, la estructura cambia de acuerdo a la profundidad del suelo. Esta investigación aporta por primera vez al conocimiento de la diversidad de la comunidad fúngica presente en SCC y SWC enriquecido con concentraciones de Cd natural.

Palabras clave: Comunidad-fúngica, Theobroma-cacao, ecología-microbiana, metataxonomía, metales-pesados

Abstract

Analysis of the fungal microbiome present in cocoa soils with different cadmium concentrations.

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal that alters the growth and development of all organisms present in agricultural systems. Cocoa plants accumulate Cd and high concentrations have been recorded in cacao beans, affecting food safety and marketing. The soil microbial community plays an important role in nutrient cycling and in the bioremediation of soils contaminated with heavy metals. Within this community, fungi stand out, establishing mycelial networks that colonize the soil and exhibit tolerance mechanisms that allow them to survive high concentrations of this metal. However, few studies have evaluated the effect of soil physicochemical properties and Cd on the fungal community present in cocoa soils. The objective of this study was to characterize the structural diversity of fungal microbiomes present in cocoa soils with different physical and chemical properties and Cd concentrations in the municipality of Yacopí-Cundinamarca. For this purpose, three cocoa farms with different Cd concentrations (F1>5,0 mg kg⁻¹; F2 and F3<2,0 mg kg⁻¹) and two lots, one with cacao crop (SCC) and one without cacao crop (SWC) were selected in each farm. Rhizospheric (Rz) and non-Rz soil samples were collected at two depths, D1 (0-30 cm) and D2 (31-100 cm); and leaf litter (HJ), leaf (HF) and pods samples were collected in the SCC plots. For the SWC plots, only soil was collected at depths D1 and D2. (i) The physicochemical properties of the soil and their relationship with Cd in soils, leaf litter, leaves and cacao beans were determined on the three farms. It was found that the distribution of Cd was heterogeneous and higher in F1>F3>F2, and in F1 soils the Cd contents were higher SCC>SWC and in Rz>D1=D2 soils, reaching an average value of 10.24 mg kg⁻¹. The Cd concentrations present in the soils of the three farms were higher than the levels established by international regulatory for non-contaminated agricultural soils (1.0 mg kg⁻¹) and the Cd content in grains was higher than the concentrations allowed by the European community for dry beans (0.6 mg kg⁻¹). The Cd concentration in the plant tissues analyzed was higher in HJ>HF>G. Also, the Cd content in HJ was higher than that found in the soil at the depth of D1, which could contribute to the recirculation of Cd in the soil-plant system. Subsequently, (ii) the richness and relative abundance of the fungal community present in the analyzed soils were characterized. The results show that the richness and relative abundance found in SCC was higher than that present in SWC,

indicating that cacao cultivation creates different environments that favor diversity. The ASVs (taxa) found in F1 farm soils showed lower similarity with respect to those present in F2 and F3 farm soils, higher number of unique ASVs in SCC and in Rz soils; indicating that the fungal community structure is altered by physicochemical properties, soil Cd content, cacao crop and rhizosphere. The phylum *Ascomycota* (68%) and *Basidiomycota* (25%) were the most abundant, where the orders Hypocreales, Pleosporales and *Capnodiales* were the most representative. In addition, differential abundance analyses highlighted the genera *Hypoxylon*, *Microdochium*, *Xylaria* and the family *Nectricaceae*, which have been reported to be tolerant to heavy metals. Rare and little known genera such as *Plectosphaerella*, *Tetracladium*, *Microdihum* and *Cyberlindnera* were also found that could be able to tolerate high Cd concentrations. Finally, (iii) the effect of physicochemical characteristics and Cd concentrations present in cacao soils on the structural diversity of fungal communities was evaluated. It was found that the physicochemical properties of the soils presented low correlations with the alpha diversity indices, indicating that the structure of fungal communities is determined by multiple factors. Texture, pH, organic carbon, N, Na and Cd were shown to have the greatest effect on structural diversity. Co-occurrence networks showed unique and shared fungal genera per farm. At the same time, it was found that the F1 farm presented a more homogeneous structure, possibly due to the high Cd content and physicochemical properties found, in contrast, the F2 farm, the structure changes according to soil depth. This research contributes for the first time to the knowledge of the diversity of the fungal community present in SCC and SWC enriched with natural Cd concentrations.

Keywords: fungal-community, Theobroma-cacao, microbial-ecology, metataxonomy, heavy-metals, Theobroma-cacao.

Contenido

	Pág.
Resumen	9
Lista de figuras	XVIII
Lista de tablas	XXIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XXV
Introducción	1
Marco teórico	5
Cadmio (Cd)	5
Contaminación de suelos por Cd	7
Efectos del Cd en sistemas agrícolas	9
Efecto del Cd en la comunidad fúngica del suelo	13
Mecanismos de tolerancia de los hongos al Cd	14
i. Biosorción.....	15
ii. Bioacumulación y compartimentación.....	16
iii. Quelación.....	17
iv. Transporte de eflujo para exclusión de metales	17
Métodos de estudio de la comunidad fúngica del suelo	18
Estrategias de remediación de suelos contaminados con Cd	21
Cultivo de cacao y Cd	25
Pregunta de Investigación	35
Hipótesis	36
Objetivos	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos	37
1. Capítulo 1: Propiedades físicas, químicas y su relación con el Cd en suelos, hojarasca, hoja y grano de cacao del municipio de Yacopí - Cundinamarca	38
1.1 Resumen.....	38
1.2 Introducción.....	39
1.3 Materiales y Métodos	44
1.3.1 Sitio de la Investigación	44
1.3.2 Diseño del muestreo	46
1.3.3 Análisis físicos y químicos del suelo	48

1.3.4	Determinación de Cdt y Cdd en el suelo y Cd en tejidos vegetales	49
1.3.5	Análisis estadístico	49
1.4	Resultados.....	50
1.4.1	Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo	50
1.4.2	Contenido de Cdt y Cdd en el suelo	55
1.4.3	Correlación del Cd y variables fisicoquímicas del suelo.....	57
1.4.4	Contenido de Cd en tejidos vegetales	59
1.5	Discusión	62
1.5.1	Propiedades fisicoquímicas del suelo.....	62
1.5.2	Contenido de Cdt y Cdd en el suelo	63
1.5.3	Relación del Cd con las propiedades fisicoquímicas del suelo	65
1.5.4	Contenido de Cd en tejidos vegetales	67
1.6	Conclusiones	69
1.7	Bibliografía.....	70
Capítulo 2: Diversidad estructural de la comunidad fúngica presente en suelos rizosféricos y no rizosféricos asociados al cultivo de cacao del municipio de Yacopí – Cund / con diferentes concentraciones de Cd		79
1.8	Resumen	79
1.9	Introducción	80
1.10	Materiales y Métodos.....	86
1.10.1	Sitio de la investigación y muestreo.....	86
1.10.2	Extracción de ADN y secuenciación	86
1.10.3	Procesamiento de secuencias y análisis estadístico	88
1.11	Resultados.....	89
1.11.1	Extracción de ADN, amplificación, preparación de librerías metataxómicas y secuenciamiento.....	89
1.11.2	Estructura de la comunidad fúngica presente en los suelos colectados	92
1.11.3	Asignación taxonómica y abundancia relativa	96
1.11.4	Análisis de abundancia diferencial.....	99
1.12	Discusión	103
1.12.1	Extracción de ADN y secuenciación	103
1.12.2	Estructura de la comunidad fúngica presente en suelos cacaoteros.....	105
1.12.3	Asignación taxonómica.....	108
1.12.4	Abundancia relativa.....	109
1.12.5	Abundancia diferencial	110
1.13	Conclusiones	111
1.14	Bibliografía.....	112
Capítulo 3: Efecto de las características físicas, químicas y concentraciones de Cd presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas.....		123
1.15	Resumen	123
1.16	Introducción	124
1.17	Materiales y Métodos.....	129
1.17.1	Sitio de la investigación y muestreo.....	129
1.17.2	Análisis fisicoquímicos del suelo y determinación del Cdt y Cdd	129
1.17.3	Extracción de ADN y secuenciación	129
1.17.4	Procesamiento de secuencias y análisis estadístico	129
1.18	Resultados.....	130

1.18.1 Efecto de las características fisicoquímicas del suelo y del Cdt y Cdd en los índices de diversidad alfa de los microbiomas fúngicos	130
1.18.2 Asociación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y la diversidad estructural de la comunidad fúngica	131
1.18.3 Co-ocurrencia relativa de géneros fúngicos	133
1.19 Discusión	137
1.19.1 Influencia de las características fisicoquímicas del suelo en los índices de diversidad.....	137
1.19.2 Asociación entre la abundancia relativa de las comunidades fúngicas y las propiedades fisicoquímicas del suelo	139
1.19.3 Redes de Co-ocurrencia de géneros fúngicos	141
1.20 Conclusiones.....	143
1.21 Bibliografía	144
Conclusiones generales	157
Recomendaciones.....	159
Tablas suplementarias.....	161
Bibliografía general.....	166
Anexos	185

Lista de figuras

Fig. 1 Dinámica del Cd en el suelo y toma de la planta. A. Fracciones de Cdt y biodisponibilidad en suelos. Fuente: Meter et al. (2019); B. Cuando la concentración de Cd es baja, se consume ATP para el transporte activo, y cuando la concentración es alta, entra directamente en las células para su absorción pasiva; C. el Cd se transporta entre las células por las vías del apoplasto y del simplasto. Fuente: Yang et al. (2021).....	10
Fig. 2 Respuesta de las plantas a Cd. A. Curva dosis-respuesta de las plantas a Cd B. Mecanismos de respuesta de las plantas bajo estrés por Cd. a. plantas sensibles, b. plantas resistentes - evasivas, c. plantas tolerantes y d. plantas hiperacumuladoras. Fuente: Lin & Aarts (2012). Puntos azules corresponden al Zn y puntos rojos al Cd.....	12
Fig. 3 Aspectos de la biodiversidad fúngica del suelo. Fuente: Franç et al. (2018).	14
Fig. 4 Mecanismo de tolerancia a metales pesados a nivel celular por células fúngicas. Fuente: Priyadarshini et al. (2021)	15
Fig. 5 Representación del gen rARN a. posición relativa de los cebadores comúnmente utilizados para amplificar partes o la totalidad de la región ITS. b. Secuencias de cebadores y posición de la secuencia de cebadores. Fuente: Bellemain et al. (2010). ...	20
Fig. 6. Distribución geográfica del Cd en el suelo de las muestras de las zonas de producción de cacao en Colombia. Tomado de: Bravo et al. (2018).	31

Fig. 1. 1 Mapa litológico de Yacopí (Cundinamarca, Colombia). Fuente Servicio Geológico Colombiano, 2015, editado por Camilo Bustos Linares.	45
Fig. 1. 2 Mapa de suelos Yacopí (Cundinamarca, Colombia). Fuente IGAC, 2000, editado por Camilo Bustos Linares.	45
Fig. 1. 3 Ubicación de los puntos de muestreo. A. Muestreo al interior de las fincas seleccionadas en suelos con cultivo de cacao (SCC) en verde y suelos sin cultivo de cacao (SWC) en marrón. Los puntos Rojos representan las ventanas de observación donde se tomó muestra (Rz, D1, D2, HJ, HF y frutos), los puntos azules representan las ventanas de observación donde se tomó muestra (D1, HJ, HF y frutos), los puntos verdes representan las ventanas de observación donde se tomó muestras (D1, D2). B. Representación de ventana una ventana de muestreo, los puntos grises representan los puntos donde se tomaron muestras de suelo (D1 y D2) y Rz. Los mapas muestran la distribución altitudinal de los cultivos (1060 - 930 msnm).....	47
Fig. 1. 4 Textura del suelo. Triángulo textural de clasificación USDA. Sand: Arenas, Clay: Arcillas, Silt: Limos. Figuras representan fincas (□: F1, ▲: F2, ■: F3), colores representan tipo y profundidad (Rojo: suelo con cultivo de cacao (SCC) + Rizosférico (Rz), Amarillo: SCC + 0-30 cm (D1), Verde: SCC + 31-100 cm (D2), Azul: suelo sin cultivo (SWC) + D1,	

Morado: SWC + D2).F1 y F2:SCC: Rz: n=3, D1: n=6, D2:n=3, SWC: D1:n=3, D2:n=1, F3: D1:n= 3, D2:n=1 50

Fig. 1. 5 Propiedades químicas del suelo. A. pH, B. Carbono Orgánico (CO %), C. Carbono Total (CT %), D. Nitrógeno estimado (N %), E. Fósforo (P (mg g⁻¹)), F. Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICE (meq 100g⁻¹)), G. Calcio (Ca (meq 100g⁻¹)), H. Magnesio (Mg (meq 100g⁻¹)), I. Potasio (K (meq 100g⁻¹)), J. Sodio (Na (meq 100g⁻¹)), K. Hierro (Fe (100g⁻¹)), L. Cobre (Cu (meq 100g⁻¹)), M. Manganeseo (Mn (meq 100g⁻¹)), N. Zinc (Zn (meq 100g⁻¹)), O. Boro (B (meq 100g⁻¹)) Con relación a la finca (F1, F2 y F3), tipo (cultivo de cacao: SCC y sin cultivo de cacao: SWC) y profundidad (Rizosférico: Rz, 0-30 cm: D1 y 31-100 cm: D2). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayada diferentes representan diferencias entre fincas, letras mayúsculas diferentes representan diferencias entre tipo de cultivo, letras minúsculas representan diferencias entre profundidad. F1 y F2:SCC: Rz: n=3, D1: n=6, D2:n=3, SWC: D1:n=3, D2:n=1, F3: D1:n= 3, D2:n=1. 54

Fig. 1. 6 Contenido de Cd total (mg kg⁻¹) con relación a la finca (F1, F2 y F3), lote (cultivo de cacao: SCC y sin cultivo de cacao: SWC) y tipo y profundidad del suelo colectado (Rizosférico: Rz, 0-30 cm: D1 y 31-100 cm: D2). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayada diferentes representan diferencias entre fincas, letras mayúsculas diferentes representan diferencias entre tipo de cultivo, letras minúsculas representan diferencias entre profundidad. F1 y F2:SCC: Rz: n=3, D1: n=6, D2:n=3, SWC: D1:n=3, D2:n=1, F3: D1:n= 3, D2:n=1. 56

Fig. 1. 7 Contenido de Cd disponible (mg kg⁻¹) con relación a la finca (F1, F2 y F3), lote (cultivo de cacao: SCC y sin cultivo de cacao: SWC) y tipo y profundidad del suelo colectado (Rizosférico: Rz, 0-30 cm: D1 y 31-100 cm: D2). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayada diferentes representan diferencias entre fincas, letras mayúsculas diferentes representan diferencias entre tipo de cultivo, letras minúsculas representan diferencias entre profundidad. F1 y F2:SCC: Rz: n=3, D1: n=6, D2:n=3, SWC: D1:n=3, D2:n=1, F3: D1:n= 3, D2:n=1. 57

Fig. 1. 8 Gráfico de correlación de Spearman entre las propiedades fisicoquímicas de los suelos de la profundidad D1 (0 - 30 cm). Número indican coeficiente de correlación, colores rojos indican correlación positiva, color azul indica correlación negativa, intensidad indica correlación cercana a |1|. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fosforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeseo: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. n = 20. 58

Fig. 1. 9 Gráficos biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras de suelo por finca en la profundidad D1 (0-30cm). A. Finca 1 (F1), B. Finca 2 (F2), C. Finca 3 (F3). Flechas indican peso de la contribución al componente que se direcciona, intensidad de color de azul a naranja indica valor del coseno cuadrado (cos²) de la variable. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fosforo: P, Capacidad

de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeseo: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. F1:n=6, F2:n=6; F3:n=6. 59

Fig. 1. 10 Cd en tejidos vegetales. **A.** Contenido de Cd total en tejidos (mg kg⁻¹) con relación a la finca (F1, F2 y F3), y tipo de tejido (Hojarasca, Hoja, Grano). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayadas diferentes representan diferencias entre fincas, letras minúsculas representan diferencias entre tipo de tejido. Línea roja representa el nivel máximo permitido para granos de cacao según la Comisión Europea (0,6 mg kg⁻¹) (E.C, 2021). N=6. **B.** Factor de Transferencia suelo-tejidos con relación a la finca (F1, F2 y F3) y tipo de tejidos (Hojarasca, Hoja y Grano). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayadas diferentes representan diferencias entre fincas, letras minúsculas representan diferencias entre tipo de tejido. N=6. **C.** Gráfico de correlación de Spearman entre el tipo de tejido (grano, hoja y hojarasca) y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Número indican coeficiente de correlación, colores rojos indican correlación positiva, color azul indica correlación negativa, intensidad indica correlación cercana a |1|. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno estimado: N, Fósforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeseo: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. n=18. 61

Fig. 2. 1 Amplificación y construcción de librerías de la región ITS2 del gen rARN en muestras de suelo. A. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de la amplificación de la región ITS2 para las librerías realizadas. Tamaño de la banda esperada: 430-450 pb. B. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de la librería elaborada ITS2 + región adaptadora. Tamaño de la banda esperada: 530-550 pb. F1: finca F1, F2: Finca F2, F3: Finca F3; SCC: suelo con cultivo de cacao, SWC: suelo sin cultivo de cacao; Rz: Rizosférico, D1: suelo profundidad 0-30 cm, D2: suelo profundidad 31-100 cm. número al final representan repetición. 90

Fig. 2. 2 Recuento de las lecturas de secuenciamiento de cada una de las muestras después de la limpieza con Trimmomatic (rojo) y lecturas no químicas (ASVs) después de filtrado con DADA2 (azul). F: finca (F1, F2, F3); SCC: Suelo con Cultivo de Cacao, SWC: Suelo sin Cultivo de Cacao; Rz: Rizosférico, D1: Profundidad 0-30cm, D2: Profundidad de 31-100 cm; R: Repetición (R1, R2, R3). 91

Fig. 2. 3 Curvas de rarefacción de la riqueza de ASVs discriminadas por finca (F1, F2, F3), líneas representan cada muestra, colores indican profundidad (rojo: D1, verde: D2, azul: Rz). F: finca (F1, F2, F3); SCC: Suelo con Cultivo de Cacao, SWC: Suelo sin Cultivo de Cacao; Rz: Rizosférico, D1: Profundidad 0-30cm, D2: Profundidad de 31-100 cm; R: Repetición (R1, R2, R3). 92

Fig. 2. 4 Análisis y diversidad de la comunidad fúngica presente en suelos con y sin cultivo de cacao (SCC y SWC, respectivamente) a diferentes profundidades D1: 0- 30 cm y D2: 31-100 cm) y suelo rizosférico (Rz) de plantas de cacao en las tres fincas seleccionadas. **A.** Índices de diversidad alfa. P. valores de la prueba de Kruskal-Wallis

por índice se muestran, (n=3). **B.** Diversidad Beta, PCoA basado en la matriz de distancia de Bray-Curtis, las varianzas en los ejes de ordenación se muestran en los tres ejes en paréntesis. Las fincas F1, F2 y F3 se muestran en colores rojo, verde, azul respectivamente, las muestras de suelo Rz, D1 y D2 se muestran como triángulos, círculos y cuadrados respectivamente..... 94

Fig. 2. 5 A. Diagramas de venn de los ASVs agrupando por finca (F1, F2, F3). B. Diagramas de venn de los ASVs agrupando por tipo de cultivo (SCC: Suelo cultivo cacao, SWC: Suelo sin cultivo cacao). **C.** Diagramas de venn de los ASVs agrupados por tipo de suelo (Rz: Rizosférico, D1: 0-30 cm, D2: 31-100 cm) en la finca F1. **D.** Diagramas de venn de los ASVs agrupados por tipo de suelo (Rz: Rizosférico, D1: 0-30 cm, D2: 31-100 cm) en la finca F2..... 95

Fig. 2. 6 Porcentaje de lecturas no quiméricas y ASVs asignados en siete niveles taxonómicos usando la base de datos de UNITE (v8.3) (Nilsson et al., 2019). Las barras amarillas indican número de lecturas obtenidas por DADA2, las barras naranjas indican ASVs asignados y los, números colocados en la parte superior, indican el recuento obtenido 96

Fig. 2. 7 Prevalencia de taxones fúngicos a nivel Phylum en todas las muestras de suelo colectadas versus recuento total de la abundancia relativa asignada para cada taxón identificado. 97

Fig. 2. 8 Representación de árbol de calor de la abundancia relativa de los ASV asignados a nivel de orden. Etiqueta del nodo, nombre del taxón; tamaño del nodo, número de ASVs; color del nodo, abundancia del orden indicado (de gris a verde, como se indica en la escala de colores)..... 98

Fig. 2. 9 Comparación de la abundancia relativa presente C. Matriz de representación de comparación de abundancia fúngica a nivel taxonómico de orden en árbol de calor a nivel finca (F1, F2, F3). El árbol de color gris representa el árbol base de diversidad. Color marrón representa la rama y el nodo con mayor abundancia en la finca descrita en la parte superior (F2 o F3), color azul representa la rama y el nodo con mayor abundancia en la finca descrita en la parte derecha (F1 o F2). Etiqueta del nodo, nombre del taxón; Relación Log2, número de ASVs..... 99

Fig. 2. 10 Análisis de abundancia diferencial de géneros fúngicos entre fincas con diferentes concentraciones de Cd total (Finca 1: 7.35 mg kg⁻¹) y Finca 2 (1.62 mg kg⁻¹) **A.** Volcano plot de edgeR basado en un conteo de transformación log2 y un p. valor < 0.001. **B.** Log Fold Change de los géneros encontrados diferencialmente abundantes **C.** Volcano plot de Aldex2 basado en un conteo de transformación log2 y un p valor < 0.05. **D.** Log Fold Change de los géneros encontrados diferencialmente abundantes con Aldex2. 101

Fig. 2. 11 Análisis discriminante lineal - Tamaño del efecto (LefSe) a nivel género. La escala de color representa la abundancia relativa de cada género por muestra. F1: Finca 1, F2: Finca 2, F3: Finca 3; SCC: Suelo con cultivo de cacao, SWC: suelo sin cultivo de cacao; Rz: suelo Rizosférico; D1: suelo 0-30 cm, D2: suelo 31-100 cm. 103

Fig. 3. 1 Gráfico de correlación de Spearman entre las propiedades fisicoquímicas de los suelos y los índices de diversidad (Observed features: riqueza, Shannon: abundancia

relativa, Gini-simpson: 1 – Dominancia (inverso de la dominancia). Correlación discriminada por finca: F1 y F2. Los números indican el coeficiente de correlación donde el color azul indica correlación positiva y color rojo indica correlación negativa; la intensidad del azul indica correlación cercana a 1. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fosforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeso: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. n=9..... 131

Fig. 3. 2 Análisis de redundancia (RDA) de la diversidad beta de las comunidades fúngicas encontradas a nivel taxonómico de género usando la matriz de Bray-curtis y las propiedades fisicoquímicas del suelo. A. RDA usando las variables Arcillas, Arenas y Limos. B. RDA usando las variables pH, N, P, CO, CT y CICE. C. RDA usando las variables Ca, Mg, K, Na. D. RDA usando las variables Cu, Fe, Zn, Mn, B, Cdt, Cd. Círculos verdes representan matriz de Bray-curtis por muestra de la finca F1, círculos naranja representan matriz de Bray-curtis por muestra la finca F2. Líneas rojas representan los taxones (género) fúngico y líneas negras las variables fisicoquímicas. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fosforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeso: Mn, Zinc: Zn, Boro: B, Cdt: Cadmio total, Cdd: Cadmio disponible. n=18..... 132

Fig. 3. 3 Red de co-ocurrencia de la comunidad fúngica presente en las fincas F1 y F2 a nivel género. Las líneas rojas representan correlaciones positivas ($R^2 > 0,7$). Gráfico de tortas representa porcentaje de abundancia relativa por finca, Verde: finca F1 (F1), Naranja: Finca F2 (F2). Los ovoides representan los conglomerados. Azul: Conglomerado 1 (C1), Verde: conglomerado 2 (C2), Rojo: conglomerado 3 (C3). n=18. 134

Fig. 3. 4 Red de co-ocurrencia de la comunidad fúngica presentes en las fincas F1, F2 discriminadas por tipo de muestra (Rz: Rizosférico, D1: 0-30 cm, D2: 31-100 cm) a nivel género. **A.** Red de co-ocurrencia para la finca F1, **B.** Red de co-ocurrencia para la finca F2. Las líneas rojas representan correlaciones positivas ($R^2 > 0,7$). Gráfico de tortas representa porcentaje de abundancia relativa por tipo de suelo, Verde: Rz, Naranja: D1, Púrpura: D2. Los ovoides representan los conglomerados. en F1: Azul: Conglomerado 1 (C1), Rojo: conglomerado 2 (C2), Verde: conglomerado 3 (C3), en la F2. Los ovoides representan los conglomerados. Amarillo: Conglomerado 1 (C1), Verde: conglomerado 2 (C2), Azul: conglomerado 3 (C3). n=9..... 136

Lista de tablas

Tabla 1. Lista de valores de referencia actuales de metales pesados en la dieta humana. Fuente: Wong et al. (2022).....	6
Tabla 2. Impacto de la toxicidad del Cd en el rendimiento de algunos cultivos representativos. Fuente: Zulfiqar et al. (2022).	11
Tabla 3 Estudios de la comunidad fúngica asociada a especies de interés agrícola usando tecnologías de secuenciación masiva.....	20
Tabla 4 Límite de tolerancia de aislamientos fúngicos a Cd. Fuente: Priyadarshini et al. (2021) y Guerra Sierra et al. (2022).....	24
Tabla 5 Principales países productores de granos de cacao y producción mundial de grano de cacao a nivel mundial para el año 2021. Fuente: FAO (2022) y FEDECACAO (2022).....	25
Tabla 6 Principales departamentos colombianos productores de granos de cacao para el año 2021. Fuente: FEDECACAO (2022).	26
Tabla 7 Concentraciones medias de Cd en granos de cacao (mg kg^{-1}), procedentes de diversos estudios realizados en todo el mundo. La información incompleta sobre la calidad de los datos analíticos se indica mediante superíndices con el origen de la muestra. La variación se indica mediante la desviación estándar o el intervalo mín-máx; P = pelado; UP= sin pelar; F = fermentado; UF= sin fermentar; R = tostado. Fuente: Vanderschueren et al. (2021)	27
Tabla 1. 1 Distribución de las muestras obtenidas de suelo y tejido vegetal. F1: Finca F1, F2: Finca F2, F3: Finca F3. SCC: Suelo con Cultivo de cacao, SWC: Suelo sin Cultivo de Cacao. Rz: Suelo Rizosférico, D1: Suelo 0-30 cm, D2: Suelo 31-100 cm, HJ: Hojarasca, HF: Hoja.....	48
Tabla Suplementaria 1 Requerimiento nutricional para cultivo de cacao	161
Tabla Suplementaria 2 Cebadores utilizados para la amplificación y preparación de librerías metagenómicas.	161
Tabla Suplementaria 3 Extracciones de ADN.....	162
Tabla Suplementaria 4 Análisis de fragmentos de las librerías previa a secuenciación	162
Tabla Suplementaria 5 Número de lecturas obtenidas de secuenciación antes y después de la limpieza con trimmomatic	164
Tabla Suplementaria 6 Filtración con DADA2 y reconstrucción de ASVs	165

Tabla Anexo 1 Estadística descriptiva de las variables fisicoquímicas determinadas...	185
Tabla Anexo 2 Resultados prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de Wilcoxon de las propiedades fisicoquímicas del suelo	186
Tabla Anexo 3 P. valores de correlación de las propiedades fisicoquímicas del suelo.	195
Tabla Anexo 4 Dimensiones Análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímicas del suelo discriminado por finca.	195
Tabla Anexo 5 Contenido de Cd en tejidos	195
Tabla Anexo 6 P. valores de correlación de Spearman de los tejidos vegetales con las propiedades fisicoquímicas.	196
Tabla Anexo 7 Valores índices de diversidad alfa.....	196
Tabla Anexo 8 Resultados prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de Wilcoxon de los índices de diversidad.	197
Tabla Anexo 9 Dimensiones de PCoA de las muestras usando matriz de distancias de Bray Curtis.	198
Tabla Anexo 10 Resultados de análisis de abundancia diferencial usando edgeR	198
Tabla Anexo 11 Resultados de análisis de abundancia diferencial usando Aldex2.....	202
Tabla Anexo 12 P. valores de correlación de Spearman de los índices de diversidad alfa con las propiedades fisicoquímicas, discriminado por finca.....	202
Tabla Anexo 13 Resultados de prueba de mantel, usado para análisis de redundancia	204

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
Cd	Cadmio
g cm^{-3}	Gramos por centímetro cúbico
mg kg^{-1}	Miligramos por kilogramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
NGS	Next-Generation Sequencing (Secuenciación de nueva generación)
ITS	Internal transcribed spacer (Espaciador transcrito interno)
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
Hg	Mercurio
Ar	Arsénico
Pb	Plomo
Zn	Zinc
Fe	Hierro
Cu	Cobre
Mo	Molibdeno
Mn	Manganeso
$\mu\text{g/kg/día}$	Microgramos por kilogramo por día
CdS	Greenockita
CdCO_3	Otavita
CdO	Monteponita
ZnS	Esfalerita
CdSe	Cadmoselita
CdCl_2	Cloruro de cadmio
CdSO_4	Sulfato de cadmio
pH	Potencial de hidrógeno
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
Mg	Magnesio
K	Potasio
Ca	Calcio

Abreviatura	Término
Cdt	Cadmio Total
Cdd	Cadmio Disponible
ATP	Adenosín trifosfato
μM	Micromolar
C:N	Relación carbono nitrógeno
mg g^{-1}	Miligramo por gramo
S	Azufre
-SH	Grupo tiol
GSH	Glutation
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
SSU	Small subunit (Subunidad corta)
LSU	Large subunit (Subunidad larga)
pb	Pares de bases
CaCO_3	Carbonato de calcio
CaO	Óxido de calcio
Ca(OH)_2	Hidróxido de calcio
$\text{CaMg(CO}_3)_2$	Dolomita
cm	Centímetro
mg L^{-1}	Miligramos por litro
sp	Especie
CCN-51	Colección Castro Naranjal 51
F1	Finca uno, niveles de Cd mayores a $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$
F2	Finca dos, niveles de Cd menores a $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$
F3	Finca tres, niveles de Cd menores a $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$
SCC	Suelos con cultivo de cacao
SWC	Suelos sin cultivo de cacao
D1	Muestras de suelo tomadas a una profundidad entre 0-30 cm
D2	Muestras de suelo tomadas a una profundidad entre 31-100 cm
Rz	Muestras tomadas de suelo rizosférico
Hj	Hojarasca
Hf	Hojas
G	Granos
PCA	Análisis de componentes principales
CO	Carbono orgánico
CT	Carbono total

Abreviatura	Término
Ha	Hectárea
N	Nitrógeno
P	Fósforo
MO	Materia orgánica
kg ha ⁻¹	Kilogramos por hectarea
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mm año ⁻¹	Milímetros por año
°C	Grados centígrados
LS	factor (Slope Length and Steepness factor)
mm	Milímetros
p/v	Relación peso volúmen
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
HCl	Cloruro de hidrógeno
HNO ₃	Ácido nítrico
M	Molar
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
FT	Factor de transferencia
meq 100g ⁻¹	Miliequivalentes por 100 gramos
n	Tamaño de la muestra
ASV	Amplicon Sequence Variant (Variante de secuencia del amplicón)
g	gramos
ml	Mililitros
mg	Miligramos
V	Voltios
μl	Microlitros
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
mM	Milimolar
SPRI	Solid-phase reversible immobilization (perlas de inmovilización reversible en fase sólida)
LOG ₂	Logaritmo en base 2
PcoA	Principal Coordinate Analysis (Análisis de coordenadas principales)
LEfSe	Linear discriminant analysis Effect Size (Análisis discriminante lineal - tamaño del efecto)
LDA	Análisis Discriminante Lineal
ng μL ⁻¹	Nanogramos por microlitro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Na	Sodio
RDA	Redundancy analysis (Análisis de redundancia)

Introducción

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial, con una densidad superior a 5 g cm^{-3} , clasificado como elemento tóxico por tener efectos adversos en los seres vivos y en el medio ambiente a bajas concentraciones (Chávez et al., 2015). Este metal se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y su presencia en los suelos agrícolas y en las plantas puede causar afectaciones sobre la inocuidad y el suministro de alimentos, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria (Wang et al., 2021). El origen del Cd puede deberse a factores geogénicos o antropogénicos. La presencia de Cd en el suelo se atribuye principalmente a la meteorización natural del material parental rico en Cd, a la actividad volcánica y a las actividades antropogénicas, como las deposiciones industriales, mineras y agrícolas (Rizvi et al., 2020). La disponibilidad de este metal está sujeta a las propiedades físicas, químicas y biológicas de cada suelo (Florida et al., 2018). Su presencia ha sido reportada en productos cosechados de numerosos tipos de cultivos, como los cereales, tubérculos y frutas (Haider et al., 2021) y, recientemente, en granos de cacao (Bertoldi et al., 2016).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie importante a nivel mundial como materia prima para la elaboración de productos derivados, como el chocolate (Gutiérrez-Macías et al., 2021). En los últimos años Colombia ha venido incrementando las áreas de producción del cultivo y exportación de grano de cacao, debido a su reconocimiento en los mercados internacionales por su alta calidad organoléptica (Chaves-López et al., 2014; Barrientos et al., 2019). Sin embargo, el potencial de exportación se ha visto amenazado debido a la presencia de Cd disponible en los granos y productos derivados, en niveles superiores a los máximos permisibles por la comunidad europea ($0.1 - 0.8 \text{ mg kg}^{-1}$) (Meter et al., 2019). La presencia de Cd en el grano se debe a la facilidad que tiene la planta de cacao de absorber, translocar y acumular este metal (Wade et al., 2022). Existen reportes de la presencia de Cd natural en suelos cacaoteros en Colombia (Rodríguez et al., 2019) y otros países productores de cacao de América Central y del Sur, como Honduras, Ecuador, Perú y Brasil (Oliveira et al., 2022). Por lo tanto, esta contaminación representa uno de los

mayores desafíos para Colombia y otros países latinoamericanos productores de cacao (Arévalo-Gardini et al. 2017; Gramlich et al. 2018; Argüello et al. 2019; Oliveira et al., 2022).

Entre las estrategias reportadas para mitigar la toma de Cd por parte de la planta se encuentra el uso de microorganismos tolerantes a Cd (Bravo et al., 2018; Córdoba-Novoa et al., 2022), sin embargo, es importante primero realizar una identificación y caracterización de estas comunidades. La mayoría de los estudios reportados se enfocan en las comunidades bacterianas, principalmente, en el aislamiento y cultivo de bacterias tolerantes al metal en diferentes agroecosistemas (Guo et al., 2022) o al estudio de los microbiomas bacterianos presentes en suelos con Cd (Liu et al 2020), dejando de lado la comunidad fúngica. La comunidad fúngica, al igual que bacterias, cumplen un papel importante en el ciclaje de nutrientes, en los procesos de biocontrol (Wachira et al., 2014), biorremediación (Chugh et al., 2022) y en la respuesta rápida a cambios ambientales. Los hongos también proporcionan un apoyo esencial a la vida vegetal en forma de endófitos y formadores de micorrizas arbusculares (Domka et al., 2019). Por lo tanto, los cambios que alteren la composición de la comunidad fúngica pueden afectar de manera positiva, negativa o neutral al funcionamiento de todo el ecosistema del suelo (Yang et al., 2017).

La presencia del Cd y otros metales pesados en el suelo no solo afecta a las plantas sino también a la comunidad microbiana, causando reducción en su crecimiento y ejerciendo una presión selectiva sobre los microbiomas (Guo et al., 2022). La acumulación excesiva de Cd en los hongos induce daño a las proteínas y los ácidos nucleicos, lo que da como resultado la inhibición de la división celular, así como la transcripción (Ayangbenro & Babalola, 2017). Adicionalmente, el Cd en el suelo, altera las asociaciones hongo-planta, los procesos de mineralización, humificación y biometeorización (Priyadarshini et al., 2021). Sin embargo, las comunidades fúngicas presentes en ambientes contaminados con Cd han desarrollado estrategias de desintoxicación que les permite tolerar condiciones de estrés por metales pesados (Fomina et al., 2005; Mohammadian Fazli et al., 2015). Estas estrategias abarcan mecanismos que incluyen el secuestro y la precipitación de metales extracelulares, la supresión de la entrada y el aumento del eflujo de metales, la producción de enzimas intracelulares/extracelulares, la unión de metales a las paredes celulares, secuestro intracelular y la complejación del metal (Malik, 2004; Gadd, 2007). Debido a estos mecanismos de tolerancia, los hongos son un atractivo potencial para desarrollar estrategias de micorremediación que logren mitigar la toma de Cd por las plantas (Sun et al., 2005).

La caracterización de la comunidad fúngica se puede realizar mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo (Tedersoo et al., 2014; Cazabonne et al., 2022). Las dependientes de cultivo requieren de la preparación de medios de cultivo para el aislamiento y crecimiento del microorganismo con el fin de hacer una identificación morfológica y funcional (Yasanthika et al., 2022); sin embargo, solo el 0,1% de los microorganismos pueden ser aislados por este medio (Cazabonne et al., 2022). Por tanto, técnicas no dependientes de cultivo, basados en la extracción de ADN (metagenómica) o ARN (metatranscriptómica) comunitario y en el uso de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) se han convertido en herramientas útiles para la detección e identificación de las comunidades microbianas (Nilsson et al., 2019). La secuenciación del ADN fúngico puede ser total (metagenómica) o restringirse a la secuenciación de los amplicones obtenidos con la región espaciadora interna transcrita (ITS, por sus siglas en inglés) o 18S del gen rARN (metataxonómica) (Feng et al., 2018; Salam et al., 2020).

En Colombia, existen reportes que presentan información sobre la estructura de la comunidad bacteriana asociada a los agroecosistemas de cacao mediante el aislamiento y cultivo de bacterias tolerantes a Cd (Bravo et al., 2018; Córdoba-Novoa et al., 2022) o más recientemente, por métodos metataxonómicos (Cáceres et al., 2021). Sin embargo, las comunidades fúngicas presentes en suelos cacaoteros con Cd han sido poco caracterizadas y se han basado solamente en métodos cultivables como los realizados por Sandoval Pineda et al. (2020) con hongos formadores de micorrizas arbusculares y Guerra Sierra et al. (2022) con hongos tolerantes cultivables, de suelos cacaoteros contaminados con Cd. A la fecha no se han empleado técnicas de secuenciación masiva de nueva generación que puedan brindar más información de las comunidades fúngicas que habitan estos agroecosistemas de cacao.

El presente estudio busca caracterizar la diversidad estructural de los microbiomas fúngicos presentes en suelos cacaoteros con diferentes propiedades físicas, químicas y concentraciones de Cd del municipio de Yacopí-Cundinamarca. Para ello, (i) se determinaron las propiedades fisicoquímicas del suelo y su relación con el Cd en suelos, hojarasca, hoja y grano de cacao en tres fincas del municipio de Yacopí – Cundinamarca (capítulo I). En el primer capítulo se decidió incluir los análisis de la concentración de Cd encontrado en hojarasca, hoja y grano para presentar un panorama general de la dinámica del Cd-suelo-planta. Es importante aclarar que las mediciones de Cd en las diferentes

partes de la planta fueron parte del trabajo de grado de Cristian Camilo Bustos. (ii) Se caracterizó la riqueza y abundancia relativa de la comunidad fúngica presentes en suelos rizosféricos y no rizosféricos asociados al cultivo de cacao a dos profundidades mediante métodos metataxonómicos (capítulo II) y (iii) Se evaluó el efecto de las características fisicoquímicas y concentraciones de Cd presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas (Capítulo III).

Marco teórico

Cadmio (Cd)

El cadmio (Cd) (número atómico 48, peso atómico 112,41 amu, densidad relativa 8,65 g cm⁻³) es un elemento que se encuentra clasificado como tóxico según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) (Singh et al., 2011), con una vida media de acumulación en animales y plantas que oscila entre los 25 y 30 años (Genchi et al., 2020). El Cd es considerado como un metal pesado ya que su densidad específica es superior a 5 g cm⁻³, y al igual que otros metales pesados como el mercurio (Hg), el arsénico (As) y el plomo (Pb) no tienen ninguna función esencial en el ciclo vital de los organismos vivos. Esto lo diferencia de otros metales pesados como el zinc (Zn), el hierro (Fe), el cobre (Cu), el molibdeno (Mo) y el manganeso (Mn) que son considerados elementos esenciales para algunas funciones celulares, pero que a partir de una determinada concentración se consideran nocivos. Estos metales causan daños a las membranas celulares, en la estructura del ADN y de las proteínas y pueden sustituir la entrada de elementos esenciales a la célula, alterando las funciones enzimáticas y celulares (Abdu et al., 2017).

La presencia del Cd al igual que otros metales pesados en el ambiente se atribuye principalmente a actividades geogénicas como la meteorización natural de materiales geológicos ricos en metales y la actividad volcánica; y a actividades antropogénicas como la industria, la minería y prácticas agrícolas como la aplicación de pesticidas y fertilizantes fosfatados (Ali et al., 2019). El Cd se encuentra en el suelo, aire y agua, y el grado de contaminación en un ecosistema depende de la disponibilidad y concentración del metal y de la interacción con los factores abióticos y bióticos (Ehis-Eriakha & Akemu, 2022). A diferencia de los contaminantes orgánicos, el Cd y, en general los metales pesados, no sufren descomposición microbiana (Kirpichtchikova et al., 2006) y su presencia en el suelo y agua es persistente en el tiempo después de la deposición (Adriano, 2002). Esto

constituye una amenaza, ya que las plantas lo pueden absorber, translocar y acumular en sus tejidos, lo que puede afectar la inocuidad del alimento poniendo en riesgo la seguridad alimentaria (Arora et al., 2008; Anani et al., 2020) y la salud humana. Debido al riesgo que implica ingerir alimentos y aguas contaminadas por metales pesados, se han establecido los límites de concentración de Cd que una persona podría ingerir a través de su dieta alimenticia. En la determinación de estos límites se tienen en cuenta varios aspectos como el peso, la dieta y periodicidad del alimento contaminado, entre otros (Tabla 1) (Wong et al., 2022).

La exposición prolongada a niveles bajos de Cd en el aire, los alimentos y el agua causa acumulación en los riñones y provoca enfermedades renales (Genchi et al., 2020). También se ha demostrado que la exposición al Cd durante el embarazo afecta la formación y la función de la placenta, cambios en la expresión de genes limitando el crecimiento y el desarrollo fetal y generando efectos nocivos a largo plazo sobre la función de determinados órganos y tejidos en la descendencia (Geng & Wang, 2019). El Cd y sus compuestos están clasificados como carcinógenos del grupo uno para los seres humanos, siendo asociado con diversos tipos de cáncer, como el de mama, pulmón, próstata, nasofaringe, páncreas y riñón, también puede ser un factor de riesgo de osteoporosis, junto con alteraciones en el metabolismo del calcio, siendo este uno de los efectos críticos de la exposición al Cd (Suhani et al., 2021).

Tabla 1. Lista de valores de referencia actuales de metales pesados en la dieta humana. Fuente: Wong et al. (2022).

Metal/ Metaloide	Valor de referencia	Agencia y año
Arsénico inorgánico	2.14 µg/kg/día	JECFA 1988 EPA 1991 ATSDR 2007
	0.3 µg/kg/día	
	0.3 µg/kg/día	
Cadmio	1 µg/kg/día	EPA 1989 JECFA 2010 EFSA 2011 ATSDR, 2012c, ATSDR, 2012b, ATSDR, 2012a
	0.83 µg/kg/día	
	0.36 µg/kg/día	
	0.1 µg/kg/día	

Plomo	Niños: 0.26 µg/kg/día*	FDA, 2018a, FDA, 2018b
	Adultos: 0.16 µg/kg/día**	
Metilmercurio	0.3 µg/kg/día	ATSDR, 1999
	0.1 µg/kg/día	EPA (2001)
	0.23 µg/kg/día	JECFA 2007
	0.19 µg/kg/día	EFSA, 2012b, EFSA, 2012a
Chromium (III)	1500 µg/kg/día	EPA (1999)
	300 µg/kg/día	EFSA (2014)
Chromium (VI)	3 µg/kg/día	EPA (1998)
	0.9 µg/kg/día	ATSDR, 2012a, ATSDR, 2012b, ATSDR, 2012c
	2.2 µg/kg/día	Health Canada (2018)
*Asumiendo un peso de 11.4 kg		
**Asumiendo un peso de 80 kg.		

Contaminación de suelos por Cd

Un contaminante del suelo se define como: “cualquier sustancia presente en el suelo que supere los niveles naturales y suponga un riesgo para la salud humana” (Rodríguez Eugenio et al., 2018). La contaminación del suelo con Cd plantea enormes problemas ecológicos, puesto que altas concentraciones de este elemento en las tierras agrícolas dificultan el normal crecimiento de los organismos que interactúan, afectando así la producción de cultivos y poniendo en peligro la salud humana debido a la presencia del Cd en los productos cosechados (Nagajyoti et al., 2010; Bravo Realpe et al., 2014). En un sistema natural las concentraciones de Cd llegan a fluctuar entre 0,01 y 7 mg kg⁻¹ (Bohn et al., 1993); y se ha llegado a considerar un suelo no contaminado por Cd cuando la concentración suele ser menor a 1,1 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias, 2010; Argüello et al., 2019).

La presencia de Cd en el suelo se atribuye principalmente a la meteorización natural del material parental rico en minerales como Greenockita, Hawleyita, Cadmoselita, Monteponita (Dana et al., 1997), emisiones volcánicas, incendios forestales, contaminación de cuerpos de agua (Cullen & Maldonado, 2013) y a las actividades antropogénicas, como actividades industriales, mineras y agrícolas, de esta última por la fertilización con fertilizantes fosfatados contaminados (Rizvi et al., 2020). La disponibilidad de Cd en los suelos está sujeta a las propiedades físicas, químicas y biológicas y por lo tanto, es particular para cada suelo estudiado (Mahar et al., 2016). Los procesos naturales suelen contribuir a la contaminación del suelo de 3 a 10 veces menos que las fuentes antropogénicas, registrando un valor promedio de Cd de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ en el suelo (He et al., 2015). Las concentraciones de Cd pueden variar de acuerdo el tipo de mineral que contiene el material parental y las condiciones locales de meteorización (Alloway, 2013). Al comparar diferentes tipos de suelos, los derivados de rocas ígneas suelen contener cantidades bajas de Cd, los suelos derivados de rocas metamórficas son intermedios, y los suelos derivados de rocas sedimentarias (especialmente lutitas) reportan altas cantidades de Cd (He et al. 2015).

En el suelo el contenido de Cd se puede encontrar en tres fracciones, en función de la biodisponibilidad: no intercambiable, intercambiable y en la solución del suelo (Meter et al., 2019) (Fig. 1.A). La fracción total comprende las tres fracciones. Quezada-Hinojosa et al. (2015) y Bravo et al. (2021) han reportado que la mayor parte de este metal en el suelo se encuentra en la fracción no disponible y es usual encontrarlos en formas como Greenockita (CdS), Otavita (CdCO_3), Monteponita (CdO), Esfalerita (ZnS) y Cadmoselita (CdSe) y por lo tanto no pueden ser absorbidos por las plantas a través de sus sistemas de raíces (Welch & Norvell, 1999). La fracción intercambiable consiste en los iones de Cd que son adsorbidos por las superficies de carga de las arcillas del suelo, la materia orgánica, óxidos metálicos hidratados, y que son potencialmente disponibles para la absorción por las plantas y microorganismos (Meter et al., 2019). Mientras que la fracción en la solución de suelo está compuesta por los iones de Cd libres (Cd^{2+}), en complejos inorgánicos (CdCl^+ , CdCl_2 , CdSO_4) o complejos orgánicos solubles que están completamente listos para ser absorbidos por la planta (Shahid et al. 2016; Meter et al., 2019). El Cd^{2+} en la solución del suelo es la fracción que suele absorberse más rápidamente, lo que podría entenderse como la más biodisponible (Helmke, 1999). La solubilidad en los suelos y la acumulación en la planta se ve afectada por varios factores como la textura del suelo, el pH, el contenido

de materia orgánica del suelo, la capacidad de intercambio catiónico, la disponibilidad de otros elementos, el genotipo de la planta y el contenido de Cd en el agroecosistema (Alloway, 2013; Yi et al. 2020).

El contenido de arcillas influye en la disponibilidad del Cd en el suelo ya que la capacidad de adsorción que depende de la estructura del mineral de arcilla dominante: los tipos de arcilla 2:1 tienen mayores capacidades de adsorción que los tipos de arcilla 1:1, lo cual influye en la disponibilidad del Cd (Meter et al., 2019). El pH puede ser uno de los factores más importantes que influyen en la especiación, la movilidad, la solubilidad del Cd (Adriano, 2002), El aumento del pH del suelo de los suelos ácidos puede conducir a una menor absorción de Cd por las plantas (Shahid et al. 2016). Factores como la capacidad de intercambio catiónico (CIC) que se ve afectado por el contenido y tipo de arcillas y pH, tiene implicaciones en la biodisponibilidad de Cd, puesto que existe una mayor competencia entre los cationes y el Cd en solución (Cd^{2+}) por los sitios de intercambio presentes en las arcillas (Meter et al., 2019). Adicionalmente, la materia orgánica del suelo que tienen una alta CIC, dependiendo su naturaleza, puede reducir la biodisponibilidad de Cd al formar complejos organometálicos no solubles y afectar otras propiedades del suelo (Shahid et al. 2016) y aumentar el pH del suelo. Sin embargo, en algunas ocasiones las sustancias orgánicas pueden formar complejos solubles con Cd y aumentan su movilidad (Khan et al., 2017). También la presencia de iones influye en la absorción de Cd directamente a través de la competencia por los sitios de intercambio del suelo (competencia iónica), y la quelación o complejación con compuestos de Cd. Por ejemplo, el zinc (Zn), el magnesio (Mg) y el potasio (K) por competencia iónica pueden tener influencia negativa en la absorción de Cd en las plantas (Meter et al., 2019), es decir altas concentraciones de estos elementos pueden exhibir una baja acumulación de Cd en la planta. Otros elementos como el manganeso (Mn) también pueden tener efectos negativos en la disponibilidad de Cd al formar hidróxidos de Mn adsorbente del Cd (complejación), disminuyendo la fracción soluble de Cd en el suelo (Gramlich et al., 2018).

Efectos del Cd en sistemas agrícolas

La absorción de Cd por parte de animales y humanos es el resultado de la acumulación sucesiva de estos elementos a través de la cadena alimentaria, siendo el punto de partida la presencia de este metal en suelos de uso agrícola, convirtiéndose en un asunto de

interés en la salud pública (Liang et al., 2019; Mengistu, 2021). La absorción y efecto del Cd en las plantas varía entre especies, genotipos y etapa fenológica (Shanmugaraj et al., 2019). Las plantas absorben el Cd a través proteínas transportadoras y canales iónicos de Zn^{2+} principalmente y de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} de las células epidérmicas de la raíz (Lux et al., 2011; Song et al., 2017), posteriormente es transportado por vía simplástica o apoplástica (Page & Feller, 2015) (Fig 1.C). El Cd puede causar alteraciones en la homeóstasis celular, daño de la integridad de proteínas membranales y estrés oxidativo alterando los procesos fisiológicos y metabólicos de la planta (He et al., 2017; Hussain et al., 2019). El Cd como catión divalente, compite por los transportadores simplásticos causando deficiencias nutricionales de elementos como el Mg y el Ca (Marchetti, 2013; Osmolovskaya et al., 2018) afectando la permeabilidad de las membranas, reduciendo la actividad del fotosistema II, causando menor biomasa (Qadir et al., 2014; Sharma & Pant, 2018; Haider et al., 2021) y en muchos casos bioacumulándolos (Sterckeman & Thomine, 2020). Para la agricultura, esto causa preocupación debido a que este metal pesado puede afectar negativamente el rendimiento y la inocuidad de los productos cosechados (Tabla. 2) (Chunhabundit, 2016; Huybrechts et al., 2020).

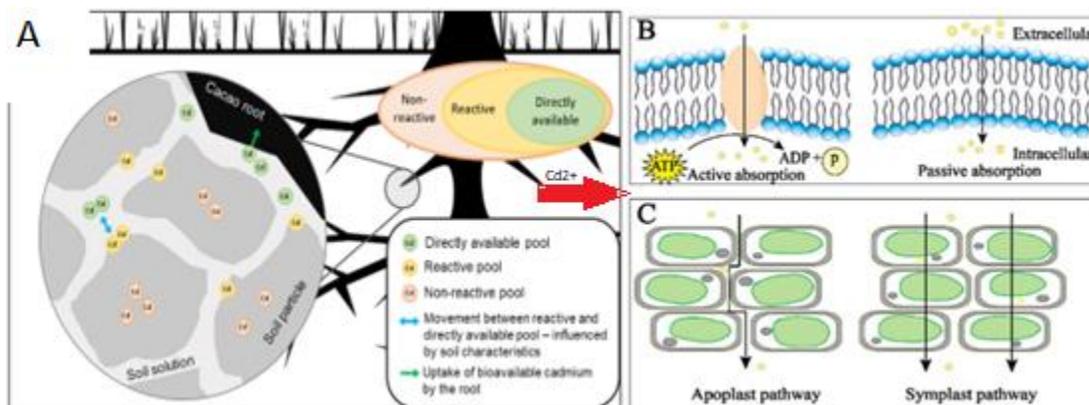


Fig. 1 Dinámica del Cd en el suelo y toma de la planta. A. Fracciones de Cd y biodisponibilidad en suelos. Fuente: Meter et al. (2019); B. Cuando la concentración de Cd es baja, se consume ATP para el transporte activo, y cuando la concentración es alta, entra directamente en las células para su absorción pasiva; C. el Cd se transporta entre las células por las vías del apoplasto y del simplasto. Fuente: Yang et al. (2021).

Tabla 2. Impacto de la toxicidad del Cd en el rendimiento de algunos cultivos representativos. Fuente: Zulfiqar et al. (2022).

Especie	Nivel de Cd	Reducción rendimiento (%)	Referencia
Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	200 mg kg ⁻¹	29,55 – 53,48	Varalakshmi and Ganeshamurthy, 2013
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	100 mg kg ⁻¹	26 - 53	Khan et al., 2007
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	150 mg kg ⁻¹	38,3 – 47,1	Huang et al., 2008
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	600 µM	60,6	Li et al., 2012
Mostaza (<i>Brassica juncea</i> L.)	150 mg kg ⁻¹	33 – 79 - 60	Gill et al., 2011
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	12 mg kg ⁻¹	65,39	Ghani, 2011
Frijol Mungo (<i>Vigna radiata</i> L.)	25 mg kg ⁻¹	26 - 37	Wahid and Ghani, 2008
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	50 µM	10,31 – 25,50	Xie et al., 2021

Las especies vegetales, se pueden clasificar en tolerantes y no tolerantes (sensibles) con base en la curva dosis respuesta al metal, si la concentración supera el límite de tolerancia de la planta, esta presenta síntomas de toxicidad. Esta dosis de respuesta depende del tipo de planta, genotipo, estado fenológico del cultivo, y concentración de Cd, entre otras (Fig. 2.A) (Ismael et al., 2019). Según los mecanismos de respuesta a la exposición al metal, las plantas se pueden clasificar en sensibles, resistentes evasivas, tolerantes e hiperacumuladoras (Lin & Aarts, 2012) (Fig. 2B). Sensibles, cuando la planta no cuenta con mecanismos efectivos para expulsar el metal de las células de la raíz y tampoco previene su transporte a los tejidos superiores, causando toxicidad. Resistentes evasivas, cuando la planta evita la entrada del metal, limitando la biodisponibilidad de los metales en el suelo o reduciendo la expresión de las proteínas transportadoras. Tolerantes cuando la planta posee mecanismos que se basan en el confinamiento (compartimentalización) y la detoxificación al metal de forma controlada, este tipo de plantas restringen la acumulación

del metal en las raíces (Küpper & Leitenmaier, 2013); y plantas hiperacumuladoras cuando el metal absorbido se transloca y acumula en las hojas sin causar toxicidad (Verbruggen et al., 2013; He et al., 2017; Luo & Zhang, 2021). Las plantas hiperacumuladoras de Cd se caracterizan porque pueden tolerar y acumular Cd en niveles superiores a 100 mg kg^{-1} (peso seco) en los brotes (He et al., 2017; Meter et al., 2019; Peng et al., 2019). Las plantas tolerantes e hiperacumuladoras quelan los metales en el citosol, los secuestran en las vacuolas o los confinan en el apoplasto (Lin & Aarts, 2012).

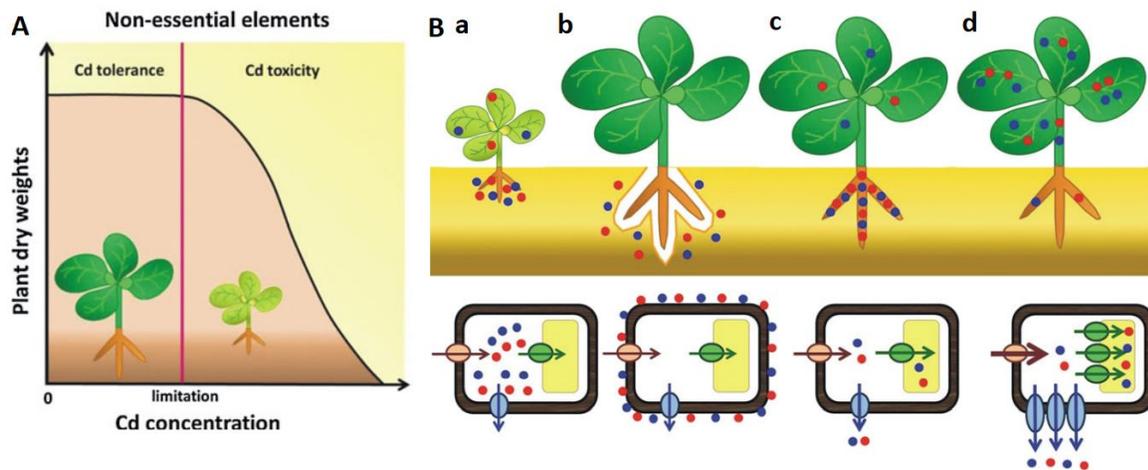


Fig. 2 Respuesta de las plantas a Cd. A. Curva dosis-respuesta de las plantas a Cd B. Mecanismos de respuesta de las plantas bajo estrés por Cd. a. plantas sensibles, b. plantas resistentes - evasivas, c. plantas tolerantes y d. plantas hiperacumuladoras. Fuente: Lin & Aarts (2012). Puntos azules corresponden al Zn y puntos rojos al Cd.

La dinámica del Cd en los suelos no solo afecta a las plantas, también tienen implicaciones en otros organismos que interactúan en el agroecosistema como las bacterias, arqueas, hongos y protistas que tienen funciones ecosistémicas, ya que son responsables de la mayoría de las transformaciones biológicas que contribuyen a los procesos de ciclos biogeoquímicos (Guggenberger, 2005). La estructura de estas comunidades que habitan el suelo es el resultado de la interacción de las condiciones geográficas, ambientales y de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Santoyo et al., 2017; Kumar et al., 2022). Se ha demostrado que la presencia del Cd en el suelo afecta la estructura de la comunidad microbiana, seleccionando las especies que pueden tolerar la condición de estrés (Liao et al., 2005; Sun et al., 2022); lo que causa una disminución en la acumulación de biomasa microbiana (Renella et al., 2002). También puede afectar la relación C:N del suelo (Chen et al., 2014) debido a la disminución de la actividad enzimática asociada a estos ciclos geoquímicos (Jaworska & Lemanowicz, 2019).

Efecto del Cd en la comunidad fúngica del suelo

Los hongos desempeñan importantes funciones en el suelo debido a su alta plasticidad, rápida respuesta a condiciones adversas y capacidad para descomponer la materia orgánica regulando el balance del carbono, nutrientes y contaminantes del suelo (Frąc et al., 2018). En el suelo cumplen roles importantes que se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su función: (i) controladores biológicos, cuando regulan el crecimiento de otros organismos, controlando el desarrollo de plagas y enfermedades o induciendo los mecanismos de defensa de la planta (Wachira et al., 2014); (ii) reguladores del ecosistema, porque son partícipes de la formación de la estructura del suelo y la modificación de los hábitats de otros organismos y (iii) descomponedores de la materia orgánica y transformadoras de compuestos (Frąc et al., 2018) regulando la disponibilidad de nutrientes el equilibrio de carbono y elementos como el nitrógeno, el fósforo, entre otros (Žifčáková et al., 2016). También proporcionan un apoyo esencial a la vida vegetal en forma de endófitos y de formadores de micorrizas arbusculares (Domka et al., 2019). La diversidad estructural y funcional de los hongos depende de factores bióticos (plantas y otros microorganismos) y abióticos (aspectos físicos, químicos y ambientales) y los cambios que alteren la diversidad la comunidad fúngica pueden afectar al funcionamiento de todo el ecosistema del suelo en diferentes aspectos como se muestra en la Fig. 3.

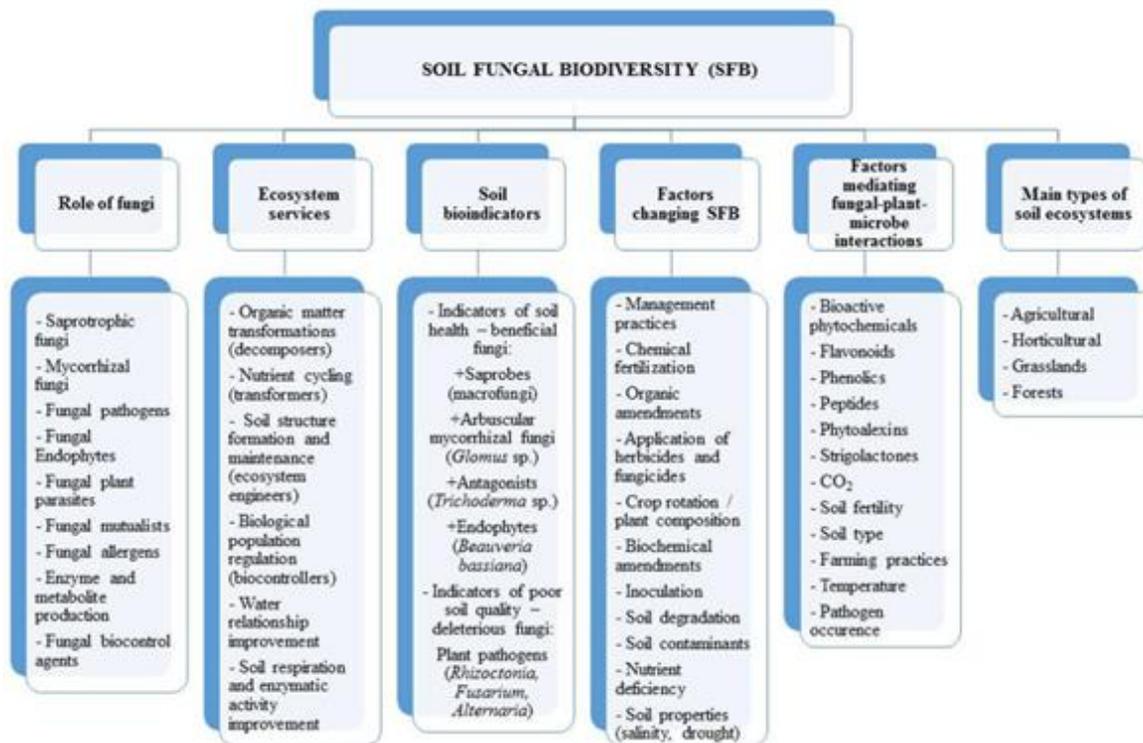


Fig. 3 Aspectos de la biodiversidad fúngica del suelo. Fuente: Fraç et al. (2018).

El Cd y otros metales pesados inducen condiciones de estrés que conducen a la reducción del crecimiento microbiano, ejerciendo así una presión selectiva sobre el microbioma (Guo et al., 2022). La presencia de Cd a concentraciones elevadas puede causar daños en las membranas, peroxidación de lípidos y apoptosis celular propiciando la generación de especies reactivas de oxígeno (Igiri et al., 2018). También induce daño a las proteínas y los ácidos nucleicos, lo que da como resultado la inhibición de la división celular, así como la transcripción (Ayangbenro & Babalola, 2017). El Cd en el suelo conduce un efecto adverso sobre la comunidad fúngica, reduciendo las asociaciones simbióticas entre los hongos y plantas y la disponibilidad de nutrientes al verse afectadas las relaciones ecológicas de los procesos de mineralización y humificación (Priyadarshini et al., 2021).

Mecanismos de tolerancia de los hongos al Cd

Las comunidades fúngicas presentes en ambientes contaminados con Cd han desarrollado estrategias de desintoxicación, gracias a la plasticidad y capacidad de adaptación a

diferentes condiciones ambientales (Sun et al., 2005). La tolerancia se define como la capacidad de los organismos para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales pesados (Boyd & Rajakaruna, 2013). La interacción entre el Cd y los hongos depende de la concentración y tipo del metal pesado, de la especie y la naturaleza del medio ambiente contaminado. Los hongos han desarrollado diferentes estrategias extracelulares e intracelulares para resistir el efecto tóxico reportadas por Priyadarshini et al., (2021) son: (i) biosorción, (ii) bioacumulación y biotransformación, (iii) quelación del metal y (iv) transporte de eflujo para exportar el metal. Estas estrategias se presentan en la Fig. 4 y se describen a continuación:

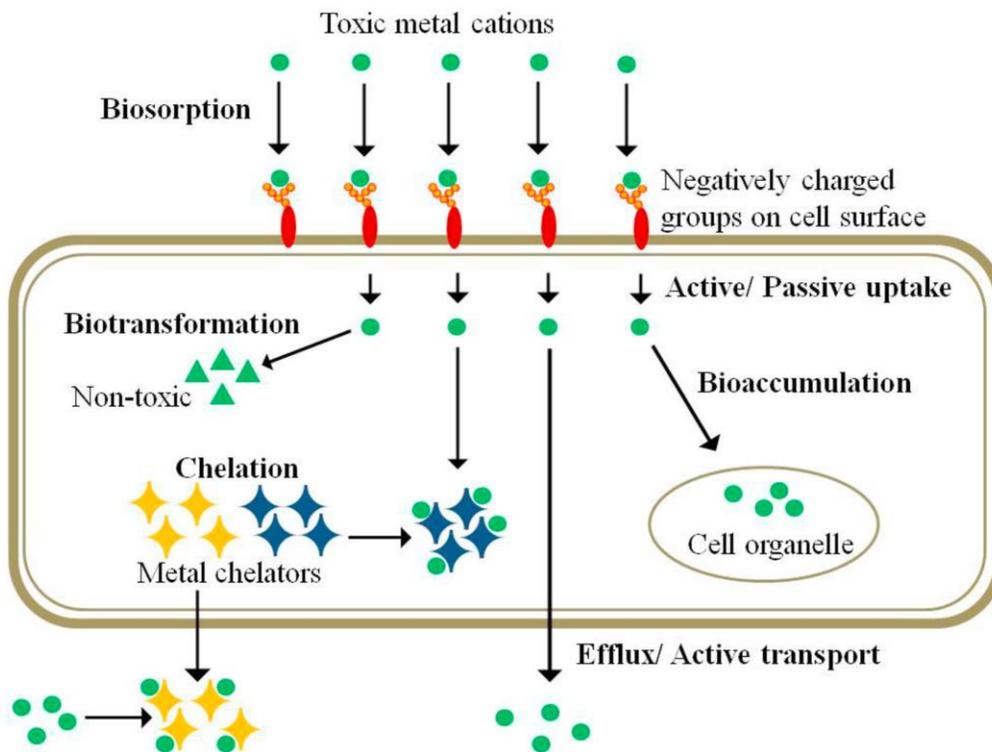


Fig. 4 Mecanismo de tolerancia a metales pesados a nivel celular por células fúngicas.

Fuente: Priyadarshini et al. (2021)

i. Biosorción

La biosorción consiste en la adsorción de iones metálicos a través de la interacción fisicoquímica con los compuestos celulares ubicados en la superficie celular, evitando la entrada de iones metálicos en la célula. Por ejemplo, los iones Cd^{+2} quedan retenidos

sobre la superficie de la pared celular a través de interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals y enlaces covalentes. La pared celular de los hongos está cargada negativamente debido a la presencia de polisacáridos, proteínas y ácidos fenólicos, que tienen grupos funcionales como grupos hidroxilo, carbonilo, amina y fosforilo, lo que favorece las interacciones con los iones catiónicos de los metales pesados (Choi & Yun, 2006). Los hongos se consideran organismos biosorbentes más eficientes que las bacterias, ya que la pared celular está compuesta de un 80 - 90% de polisacáridos, principalmente de quitina, celulosa, betaglucano y representa cerca del 30% de la biomasa de los hongos (Dhankhar & Hooda, 2011). Las especies fúngicas pueden ser específicas a los iones metálicos debido a la variación en las composiciones celulares y los sitios funcionales responsables de la unión de metales (Das et al., 2008). Polisacáridos como el quitosano han sido reportados como principales responsables de la adsorción de Cd en el hongo *Penicillium chrysogenum* (Din et al., 2022). El mecanismo de biosorción ha sido reportado como el principal mecanismo de tolerancia al Cd en hongos filamentosos como *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Rhodotorula* sp., *Drechslera* sp., *Curvularia* sp. *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma viride* (Manguilimotan & Bitacura, 2018).

ii. Bioacumulación y compartimentación

En la bioacumulación y compartimentación los iones metálicos se precipitan en diferentes organelos (compartimentación), protegiendo a la célula de la toxicidad del metal. A diferencia de la biosorción, la absorción es un proceso dependiente del metabolismo celular que implica la entrada del metal a la célula y por lo tanto tienen un costo energético (Priyadarshini et al., 2021). Se ha sugerido que la acumulación de Cd se presenta en la pared celular (50%), el citoplasma (30%) y la vacuola del hongo (20%) (Ott et al., 2002). Hongos como *Aspergillus versicolor*, *Paecilomyces* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum* sp, *Trichoderma* sp, *Paecilomyces* sp. y *Cladosporium* sp han mostrado capacidades de bioacumulación superiores a 2 mg g⁻¹ de Cd (Mohammadian Fazli et al., 2015). Adicionalmente, se ha demostrado que la acumulación del Cd en la célula puede estar mediada por otros elementos como Ca, S, Zn, además de la temperatura y el pH (Anahid et al., 2011). En *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* se observó una disminución de la acumulación de Cd con un aumento en la concentración de metales debido a la falta de disponibilidad de sitios de unión y la competencia con los iones Zn (Doku & Belford, 2015).

Por otro lado, especies fúngicas tolerantes al metal, como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* tienen por estrategias acumular y quelatar metales pesados en el suelo contaminado, disminuyendo la disponibilidad de metales pesados (Luo et al., 2010). La bioacumulación también se ha observado en hongos endófitos como *Trichoderma atroviride* (Cao et al., 2008), ya que los endófitos fúngicos poseen sistemas adecuados de quelación o biosorción y pueden remediar la toxicidad del metal a través del secuestro de metales y la unión de metales a las paredes celulares fúngicas (Fomina et al., 2005).

iii. Quelación

La quelación se puede presentar tanto a nivel intracelular como extracelular. A nivel intracelular mediante proteínas que contienen el grupo tiol (-SH), como las metalotioneínas (Sácký et al., 2021), peroxidasas y ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico) que se combinan con los iones de metales tóxicos formando complejos metálicos que quedan secuestrados en diferentes organelos celulares (Giller et al., 2009). Los ácidos orgánicos como oxálico y cítrico ayudan a solubilizar los iones metálicos y formar oxalatos metálicos (Priyadarshini et al., 2021). Se ha visto que el ácido oxálico secretado por *Beauveria caledónica* (Fomina et al., 2005) y en *Phanerochaete chrysosporium* (Xu et al., 2015) reduce el efecto tóxico de Cd en las funciones enzimáticas. Adicionalmente, las moléculas orgánicas como la melanina y las formas reducidas del glutatión (GSH) también actúan como agentes quelantes fúngicos, al unirse a los iones metálicos para formar un complejo que se acumula en forma de gránulos (Priyadarshini et al., 2021). Las enzimas como las lacasas también han sido reportadas como importantes en los mecanismos de quelación del Cd por parte de los hongos (Chen et al., 2018).

iv. Transporte de eflujo para exclusión de metales

Existen diferentes sistemas de transporte no específicos en microorganismos que absorben metales esenciales y no esenciales. Sin embargo, cuando los iones metálicos están en una concentración que resulta ser potencialmente tóxica para los microorganismos, los sistemas de eflujo activo específicos ayudan a excluir los metales (Priyadarshini et al., 2021). Este es un mecanismo ampliamente utilizado por las bacterias donde los iones metálicos acumulados en el citoplasma se expulsan al exterior de la célula. En hongos, este mecanismo se reporta en hongos tolerantes al arsénico (Cánovas et al., 2004) pero son pocos los estudios para Cd, uno de ellos, es el uso de transportadores de

eflujo de la familia ABC para detoxificar la vacuola y el citoplasma de iones de Cd, en *Saccharomyces cerevisiae* (Nagy et al., 2006). Sin embargo, la baja capacidad de eflujo de los hongos es un indicador del potencial uso para aproximaciones biotecnológicas al tener mayor capacidad de acumulación y biosorción que de eflujo (Gadd, 2007).

Métodos de estudio de la comunidad fúngica del suelo

Los métodos para identificar la diversidad taxonómica fúngica presente en un ecosistema se basan principalmente en características morfológicas y en el uso de marcadores moleculares (Gautam et al., 2022). El método de identificación basado en la observación directa de los hongos en condiciones naturales o tras su cultivo en medios de crecimiento, es el método más utilizado, ya que algunos hongos producen estructuras visibles útiles para su identificación (Peršoh, 2015; Gautam et al., 2022). Sin embargo, los métodos basados en cultivos no reflejan la diversidad real de hongos, ya que solo el 0.1% se pueden cultivar en condiciones de laboratorio (dos Reis et al., 2022). Las técnicas moleculares y de secuenciación han demostrado ser muy útiles para explorar la identidad taxonómica de estos hongos hasta un 99% (Gautam et al., 2022). La metagenómica y la metatranscriptómica es el estudio de los genomas/transcriptomas colectivos de los organismos en su entorno natural a través de la extracción y secuenciación de los ácidos nucleicos (ADN y ARN, respectivamente) de la comunidad (Nilsson et al., 2019). El uso de ADN ambiental en estudios de biodiversidad ha permitido obtener nuevos conocimientos sobre la diversidad fúngica hasta ahora oculta dentro de diferentes ecosistemas, por lo cual el descubrimiento de comunidades fúngicas presentes en diferentes ecosistemas se puede realizar gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés) y el desarrollo de la bioinformática (Tedersoo et al., 2014; Cazabonne et al., 2022). Para identificar las especies fúngicas de un microbioma se suelen utilizar dos métodos basados en secuencias. El más común es la amplificación por PCR la región espaciadora transcrito interno ribosómico nuclear (ITS) del gen rARN, debido a sus múltiples números de copia, resolución adecuada a nivel de género en la mayoría de los grupos (Tedersoo et al., 2022). Adicionalmente, el procesamiento bioinformático y el análisis de los datos de amplicon es relativamente más sencillo que en comparación con los datos metagenómicos totales (Donovan et al., 2018). El otro método se basa en la secuenciación de genomas completos o *Shotgun*, la cual también permite hacer predicciones funcionales a partir de los datos de abundancia de genes (Walsh et al., 2017).

La región ITS está constituida por las regiones ITS1 e ITS2 que se encuentran separadas por el gen 5.8S, y está situada entre los genes 18S (SSU) y 28S (LSU) del gen rARN. Su longitud oscila entre 450 y 800 pb y se utilizan diferentes cebadores de acuerdo con la región que se quiere estudiar (Fig. 5) (Bellemain et al., 2010). Debido a su alta variabilidad interespecífica, sitios conservados y múltiples copias presentes en la célula hacen de esta región un objeto atractivo para secuenciación (Raja et al., 2017). La región ITS1 e ITS2 se ha enfocado en estudios recientes de secuenciación de alto rendimiento debido a las restricciones de las tecnologías de NGS en la longitud de las secuencias (Jiang et al., 2022). El uso de los ITS permite tener una aproximación taxonómica basada en el alineamiento de secuencias en bases de datos como Genbank y UNITE que permite analizar miles de secuencias a partir de una sola muestra ambiental (Nilsson et al., 2019). Se ha demostrado que el marcador ITS1 es en promedio 64% más variable que ITS2 en la mayoría de los linajes fúngicos y en la resolución a nivel especie (Blaalid et al., 2013), por lo cual se reportan mejores resultados con el marcador ITS2 (Hoggard et al., 2018).

El uso de estas metodologías también representan retos, desde la obtención de la muestra inicial (extracción de ADN de calidad), los protocolos de almacenamiento y conservación deben ser precisos y debe aplicarse de forma similar en todas las muestras (Wallenius et al., 2010). El proceso de extracción del ADN, puede ejercer un sesgo en los resultados, ya que las técnicas utilizadas para la lisis celular puede afectar a la composición de las librerías de ADN medioambientales (Prifti & Zucker, 2015). En los estudios de metataxonómica la amplificación del marcador molecular puede tener amplificaciones variables, según el grado de degeneración y la especificidad del cebador hasta la presencia de inhibidores enzimáticos que no permiten la amplificación (Hu et al., 2022). En particular para el uso de ITS ha sido reportado que las variaciones en la longitud del gen rARN son la principal fuente de sesgo en el análisis de la comunidad fúngica (Silverman et al., 2021). El procesamiento bioinformático también puede verse afectado por la longitud de las lecturas de la secuenciación y el alineamiento puede verse incompleto o truncado por algunas regiones repetitivas o afectado por la calidad de la secuencia (Zhang et al., 2021). La sobrerrepresentación de un organismo sea por preferencia del cebador o mayor concentración de ADN puede afectar la abundancia de secuencias de diferentes organismos presentes. Otra limitación es el bajo número y calidad de bases de datos reportadas para hongos que se utilizan para realizar la asignación taxonómica (Edwards et al., 2017).

En general el uso de marcadores ITS ha servido para la descripción de microbiomas fúngicos presentes en suelos agrícolas (Tabla 3).

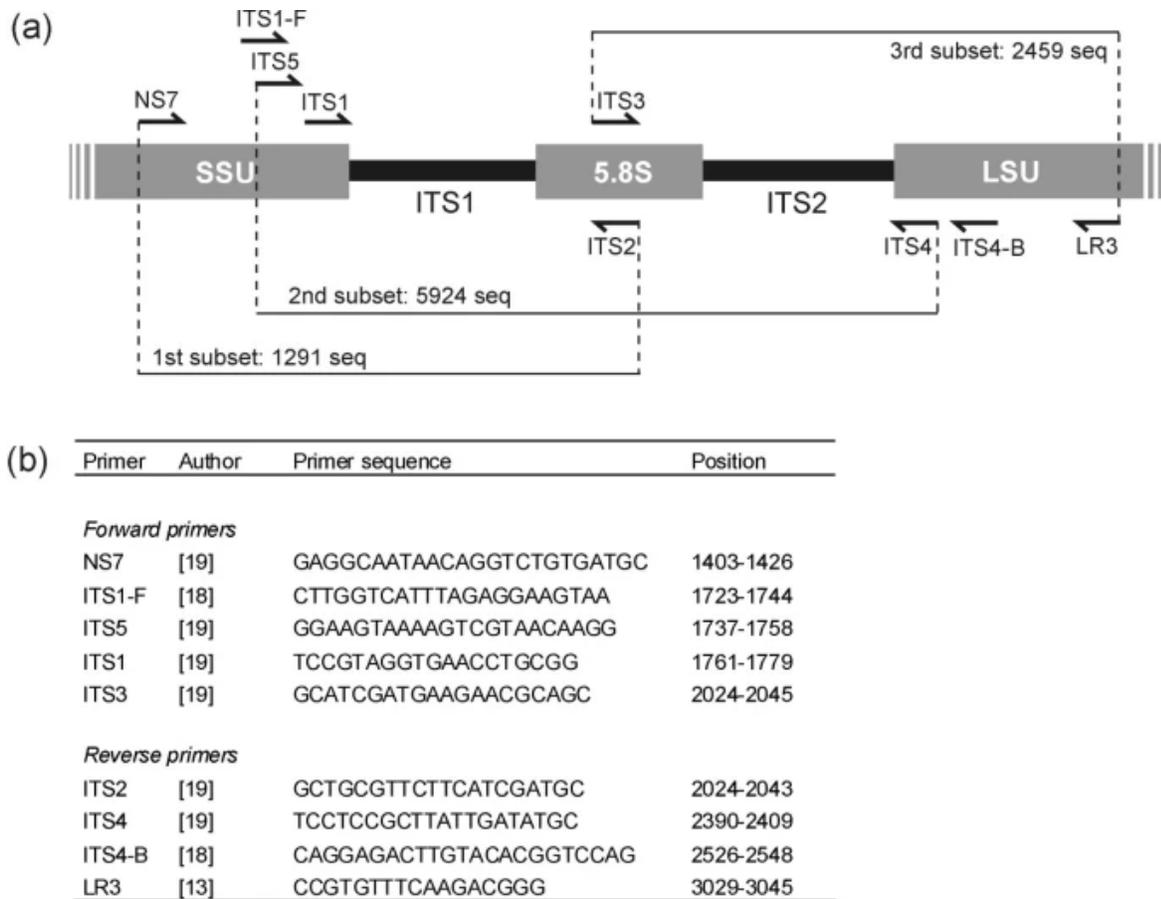


Fig. 5 Representación del gen rARN a. posición relativa de los cebadores comúnmente utilizados para amplificar partes o la totalidad de la región ITS. b. Secuencias de cebadores y posición de la secuencia de cebadores. Fuente: Bellemain et al. (2010).

Tabla 3 Estudios de la comunidad fúngica asociada a especies de interés agrícola usando tecnologías de secuenciación masiva.

Especie vegetal	Marcador molecular	Referencia
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	ITS2	(Pambuka et al., 2022)
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	ITS1	(Chang et al., 2021)
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	ITS2	(Wang et al., 2016)
Cannabis	ITS2	(Ahmed et al., 2021)

(<i>Cannabis sativa</i> L.)		
Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	ITS2	Zhang et al., (2016)
Arveja (<i>Pisum sativum</i>)	ITS1	(Xu et al., 2012)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	ITS2	(Jenkins et al., 2017)
Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	ITS1	(Manzotti et al., 2020)

Estrategias de remediación de suelos contaminados con Cd

Las estrategias de remediación de suelos contaminados con Cd se pueden dividir por métodos físicos, químicos y biológicos (Praveen & Nagalakshmi, 2022). Los métodos físicos y químicos están principalmente basados en las enmiendas del suelo, como el encalado, la aplicación de yeso y biocarbón (Vanderschueren et al., 2021). La aplicación de materiales calcáreos [CaCO_3 , CaO , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$], se ha recomendado como práctica agronómica para reducir la absorción y acumulación de Cd, ya que al aumentar el pH del suelo se disminuye la solubilidad del Cd en el suelo y se disminuye la absorción de Cd por parte de la raíz debido a la competencia Cd^{2+} con Ca^{2+} . Sin embargo, el aumento de la concentración de la solución de Ca^{2+} también puede conducir a una desorción competitiva del Cd^{2+} unido a los sitios de intercambio de las arcillas (Bolan et al., 2003). Por otro lado, la aplicación del material calcáreo se realiza de manera superficial (<5cm), limitando su acción a mayores profundidades, y por lo tanto no afectando la biodisponibilidad del Cd en el suelo (Chen et al., 2018). En contraste, las enmiendas con yeso han mostrado llegar a capas más profundas y se ha demostrado que la adición de yeso como enmienda del suelo reduce la absorción de Cd en arroz (Zhang et al., 2019) y trigo (Rehman et al., 2015) hasta 3 veces. El biocarbón, un material rico en carbono, cuyas propiedades de sorción están relacionadas con su alta área superficial específica, alta CIC, pH alcalino y la presencia de grupos funcionales superficiales (carboxílico, hidroxilo, fenólico) (Li et al., 2017), también ha mostrado una reducción de la absorción en un 80–85 % en plántulas de cacao (Ramtahal et al., 2019), sin embargo, la aplicación de biocarbón se ve favorecida en condiciones de pH ácido, textura gruesa y contenido intermedio de

carbono orgánico y también su incorporación al suelo puede resultar difícil y poco efectiva en cultivos en producción (Chen et al., 2018).

Las estrategias biológicas basadas principalmente en la fitorremediación y la biorremediación consisten en el uso de plantas y microorganismos (Gouma et al., 2014). La fitorremediación consiste en el uso de plantas con la capacidad de acumular altas cantidades de metales pesados (Praveen & Nagalakshmi, 2022), la cual se basa en la transferencia de metales pesados del suelo a los distintos órganos de la planta a través de su sistema radicular. Para Cd se han reportado plantas hiperacumuladoras, capaces de tolerar concentraciones $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ (Muszyńska & Hanus-Fajerska, 2015), entre las que se encuentran los géneros *Noccaea* y *Sedum* (Rajput et al., 2021; Reeves et al., 2018). Sin embargo, se han reportado limitaciones en el establecimiento de plantas hiperacumuladoras en los sistemas agrícolas debido a la competencia que puede ocurrir entre la planta hiperacumuladora con la especie de cultivo y la eliminación segura de la biomasa de la planta hiperacumuladora (Praveen & Nagalakshmi, 2022; Adeoye et al., 2022).

El uso microorganismos como potencial de biorremediación ha tomado relevancia, sin embargo, es necesaria la identificación y caracterización de los microorganismos tolerantes, para ello el estudio de los microbiomas en ambientes contaminados es una estrategia que facilita la identificación de microorganismos con potencial de biorremediación puesto que estos ambientes causan que haya una presión selectiva por microorganismos que han desarrollado mecanismos de tolerancia a las condiciones de estrés causadas por el metal pesado, que al identificarlos permite enfocar el estudio de grupos taxonómicos que exhiben mecanismos útiles para la remediación de suelos contaminados. Se ha reportado el uso de bacterias para la biorremediación a Cd debido a la relativa facilidad de determinación de los mecanismos de tolerancia (biosorción, biolixiviación, biotransformación, biodegradación, de meteorización, quimisorción y bioacumulación) y a la capacidad de bioestimulación a las plantas (Bravo & Braissant, 2022). La inoculación de bacterias tolerantes a Cd en el suelo, podrían incluirse en una estrategia dirigida a minimizar la acumulación de la fracción soluble de Cd en los suelos, aunque, la formulación, aplicación y efectividad de bioproductos derivados de este tipo de bacterias puede ser de difícil implementación debido a la sensibilidad de las bacterias a las condiciones ambientales de los sitios de aplicación (Bravo & Braissant, 2022). Mientras los

hongos por su parte han demostrado efectividad en estrategias de biorremediación al tener mayor capacidad de adaptación y formación de redes micelares extensas, las cuales permiten que los hongos crezcan y se extiendan a través de superficies sólidas, adicional a la capacidad de sorción y acumulación de metales pesados (Priyadarshini et al., 2021). Algunos hongos han sido reportados como tolerantes a Cd y han tenido aproximaciones a la bioremediación (Tabla 4).

Tabla 4 Límite de tolerancia de aislamientos fúngicos a Cd. Fuente: Priyadarshini et al. (2021) y Guerra Sierra et al. (2022).

Organismo	Límite de tolerancia a Cd (mg L⁻¹)	Referencia
<i>Aspergillus sp.</i>	9218	Akhtar et al. (2013)
<i>Curvularia sp. (GF-6)</i>	5732	Akhtar et al. (2013)
<i>Aspergillus sp.</i>	1600	Akhtar et al. (2013)
<i>Talaromyces santanderensis</i>	1000	Guerra Sierra et al. (2022)
<i>Talaromyces helices</i>	600	Romero et al. (2006)
<i>Trichoderma brevicompactum</i> QYCD-6	250	Zhang et al. (2020)
<i>Curvularia sp. (GF-6)</i>	293	Akhtar et al. (2013)
Organismo	Eficiencia de toma de Cd (mg L⁻¹)	Referencia
<i>Funalia trogii</i>	191	Arica et al. (2004)
<i>Funalia trogii</i>	164	Arica et al. (2004)
<i>Trametes versicolor</i>	153	Yalcinkaya et al. (2002)
<i>Penicillium chrysogenum</i> XJ-1	100,41	Xu et al. (2012)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	52,50	Fan et al. (2008)
<i>Rhizopus cohnii</i>	40,5	Luo et al. (2010)
<i>Mucor rouxii</i>	35,69	Yan &Viraraghavam (2003)
<i>Aspergillus sp.</i>	9,5	Ahmad (2005)
<i>Rhizopus sp.</i>	8,21	Ahmad (2005)
Organismo	Capacidad de bioacumulación	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	0,01-0,303 mg g ⁻¹	Kumar et al. (2010)
<i>T. brevicompactum</i> QYCD-6	8,45 - 20,13%	Zhang et al. (2020)

Cultivo de cacao y Cd

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie agrícola importante, ya que para el 2021, se reportó a nivel mundial un área sembrada de 11,53 millones de hectáreas de cacao y un total de 5,58 millones de toneladas de granos de cacao cosechados, de los cuales cerca del 70% de los granos fueron producidos en países del este de África, entre ellos, Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Nigeria y el 30% restante en países de Asia y América como Indonesia, Brasil, Ecuador, Perú, República Dominicana y Colombia (Tabla 5.) (FAO,2022).

Tabla 5 Principales países productores de granos de cacao y producción mundial de grano de cacao a nivel mundial para el año 2021. Fuente: FAO (2022) y FEDECACAO (2022).

País productor	Toneladas
Costa de Marfil	2,200,000.00
Ghana	822,000.00
Indonesia	728,046.00
Brasil	302,157.00
Ecuador	302,093.00
Camerún	290,000.00
Nigeria	280,000.00
Perú	160,222.00
República Dominicana	70,631.00
Colombia	69.040.00
Producción mundial	5,580,432.00

En Colombia, el cultivo de cacao es una de las principales apuestas productivas, debido a su potencial no solo comercial sino también social (Pabón & Pabón, 2016). En los últimos años, Colombia ha venido incrementando las áreas de producción del cultivo en 422

municipios de 27 departamentos del país, siendo Santander el principal productor, con una participación del 40,6%, seguido por Arauca con 11,4%, Antioquia con 9,6%, Tolima con 5,8%, Huila 5,1%, Nariño con un 5% y Cundinamarca con 3% de la participación nacional (Tabla 6.) (FEDECACAO, 2022). También se ha incrementado la exportación debido a que el cacao es reconocido en los mercados internacionales por su alta calidad organoléptica; esto debido a que las condiciones agroecológicas son favorables para el desarrollo del cultivo (Chaves-López et al., 2014; Barrientos et al., 2019). Por estas razones, el cacao se ha posicionado como el segundo cultivo perenne más importante luego del café para el país alcanzando una producción de 69.040 toneladas en el 2021 (FEDECACAO, 2022).

Tabla 6 Principales departamentos colombianos productores de granos de cacao para el año 2021. Fuente: FEDECACAO (2022).

País productor	Toneladas	Contribución
Santander	28,037.00	40,6%
Arauca	7,894.00	11,4%
Antioquia	6,661.00	9,6%
Tolima	4,027.00	5,8%
Huila	3,510.00	5,1%
Nariño	3,480.00	5,0%
Cundinamarca	2.607.08	3,0%

A pesar de la importancia del cultivo de cacao, uno de los desafíos que enfrenta la cadena productiva a nivel mundial es la presencia del Cd en los granos y en los productos derivados del chocolate porque puede afectar la salud del hombre y del medio ambiente. En el 2019 la Comisión Europea estableció los umbrales admisibles de Cd en materia seca de productos derivados del chocolate que van de 0,10 a 0,80 mg kg⁻¹ dependiendo del porcentaje de cacao presente (European Commission, 2021). Vanderschueren et al., (2021) presenta una revisión sobre el contenido de Cd en granos reportado para varios países cacaoteros, encontrado que algunos de ellos superan los límites permitidos por la Comunidad Europea (Tabla 7). Los valores de Cd en granos reportados para Sur América (1,388 ± 1,089 mg kg⁻¹) son cerca de tres veces mayor a los reportados en América Central

($0,544 \pm 0,302 \text{ mg kg}^{-1}$) y África Oriental ($0,508 \pm 0,587 \text{ mg kg}^{-1}$) y diez veces mayor que en África Occidental ($0,092.6 \pm 0,041 \text{ mg kg}^{-1}$) (Bertoldi et al., 2016). En Ecuador se reportaron contenidos de Cd en los granos de cacao entre 0,02 y 3,00 mg kg^{-1} , con un promedio de 0,94 mg kg^{-1} (Chávez et al., 2015); sin embargo, existen múltiples estudios cuyas medias van desde 0,35 hasta 2,68 mg kg^{-1} (Vanderschueren et al., 2021); en Perú se reportaron contenidos de Cd en granos de cacao de 0,91 mg kg^{-1} (Florida Rofner, 2021) y para Colombia se reportaron los valores más altos con un promedio de 6,12 mg kg^{-1} (Rodríguez Albarracín et al., 2019).

Tabla 7 Concentraciones medias de Cd en granos de cacao (mg kg^{-1}), procedentes de diversos estudios realizados en todo el mundo. La información incompleta sobre la calidad de los datos analíticos se indica mediante superíndices con el origen de la muestra. La variación se indica mediante la desviación estándar o el intervalo mín-máx; P = pelado; UP= sin pelar; F = fermentado; UF= sin fermentar; R = tostado. Fuente: Vanderschueren et al. (2021)

Origen de la muestra	Cd en granos (mg kg^{-1})		N	Procesamiento del Cacao	Referencia
	Media	Variación			
Camerún ^{a,c}	0,05	0,01	3	P,F	(Vītola & Ciproviča,2016)
África del Este	0,51	0,59	8	UP,F	(Bertoldi et al.,2016)
Ghana ^{a,c}	0,02	0,003	3	P,F	(Vītola & Ciproviča,2016)
Ghana ^{a,c}	0,05	0,045–0,058	30	UP,F	(Nnuro et al.,2020)
Ghana ^{a,c}	0,05	0,005–0,095	20	UP,F	(Amankwaah et al.,2015)
Ghana ^{a,c}	0,3	0,248–0,336	67	P,F	(Takrama et al.,2015)
Costa de Marfil ^{a,c}	0,05	0,04	9	P,F	(Yapo et al.,2014)

Nigeria ^{a,c}	0,02	0,003	3	P,F	(Vītola & Ciproviča,2016)
África del Oeste	0,09	0,04	21	UP,F	(Bertoldi et al.,2016)
Asia	0,33	0,18	8	UP,F	(Bertoldi et al.,2016)
Malasia ^a	0,25	0,01–1,27	86	/	(Mohamed et al.,2020)
Malasia ^a	0,55	0,26	10	/	(Fauziah et al.,2001)
Malasia ^a	0,67	0,20–1,68	5	/	(Zarcinas et al.,2004)
Bolivia ^a	0,21	0,02	64	P,F	(Gramlich et al.,2017)
Brazil	0,55	0,10–1,50	36	P,F	(DeAraujo et al.,2017)
Colombia ^a	12	6,94	57	UP,F	(Rodríguez Albarracín et al.,2019)
Costa Rica ^{a,c}	2,2	0,56–8,7	24	UP,UF	(Furcal-Beriguete & Torres-Morales,2020)
República Dominicana	0,13	0,031	–	UP,F	(Kruszewskietal.,2018)
Ecuador	0,35	0,24	50	UP,UF	(Acosta & Pozo,2013)
Ecuador	0,63	0,067	–	UP,F	(Kruszewski et al.,2018)
Ecuador	0,75	0,27–1,72	81	UP,F	(Romero-Estévez et al.,2019)
Ecuador	0,78	0,12–1,52	4	UP,UF	(Barraza et al.,2018)
Ecuador	0,9	0,09–3,51	31	UP,UF	(Barraza et al.,2017)
Ecuador	0,9	0,03–10,4	560	P,UF	(Argüello et al.,2019)

Ecuador ^{a,c}	0,2	0,04	3	UP,F	(Vītola & Ciproviča,2016)
Ecuador ^c	0,94	0,02–3,00	19	P,UF	(Chavez et al.,2015)
Ecuador ^d	2,68	1,26–3,92	5	UP,UF	(Barraza et al.,2019)
Honduras	1,1	0,1	110	P,UF	(Gramlich et al.,2018)
Honduras	2,56	0,81–10,6	60	UP,UF	(Engbersen et al.,2019)
Peru ^{a,d}	1,13	0,11–6,30	70	UP,UF	(Arévalo-Gardini et al.,2017)
Peru ^a	0,96	0,34	72	UP,UF	(Rosales-Huamani et al.,2020)
Trinidad & Tobago	0,98	0,50–2,34	45	P,F	(Ramtahal et al.,2015)
Trinidad & Tobago	2,27	1,78	402	P,UF	(Ramtahal et al.,2016)
Trinidad & Tobago ^a	0,68	/	1	P,F	(Knezevic,1979)
Trinidad & Tobago ^b	1	0,17–2,31	100	UP,UF	(Lewis et al.,2018)
<p>a. No se encontró información sobre si se incluyeron o no Materiales de Referencia Certificados (CRM). b. CRM incluidos con concentraciones de Cd certificadas por encima del rango razonable de concentraciones de Cd. c. Concentraciones de Cd de muestra notificadas inferiores al límite de detección del equipo utilizado para el análisis de Cd. d. Los valores medios y de variación se calcularon a partir de los datos brutos que amablemente facilitaron los autores de estos estudios</p>					

En Colombia se han reportado niveles de Cd en suelos superiores a los considerados como contaminados por Cd, cuya concentración suele ser menor a 1 mg kg^{-1} (Argüello et al., 2019), en Boyacá se reportó el nivel más alto de Cd total en suelo con 374 mg kg^{-1} , seguido por Santander y Arauca con 276 y 116 mg kg^{-1} , respectivamente (Fig. 6) (Bravo et al.,

2018). Existen evidencias que demuestran que la concentración encontrada en los granos se correlaciona con la concentración de Cd presente en el suelo (Chavez et al., 2015; Meter et al., 2019). Se ha reportado la presencia de Cd disponible en suelos agrícolas dedicados al cultivo de cacao en países productores de América Central y del Sur, como Honduras, Ecuador, Perú, Brasil (Arévalo-Gardini et al. 2017; Gramlich et al. 2018; Argüello et al. 2019; Oliveira et al., 2022) y en Colombia (Bravo et al 2021, Rodríguez Albarracín et al 2019). En Santander se reportó un contenido promedio de Cd en granos de $4,17 \pm 0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ (Bravo et al., 2021). En el departamento de Magdalena se reportaron contenidos medios de Cd en los granos de $0,51 \text{ mg kg}^{-1}$ y de $0,66 \text{ mg kg}^{-1}$ en dos zonas evaluadas respectivamente (Aguirre-Forero et al., 2020). en este mismo departamento reportó que el contenido de Cd en los granos de cacao osciló entre $0,07$ y $1,44 \text{ mg kg}^{-1}$, con un valor medio de $0,40 \text{ mg kg}^{-1}$ (Gil et al., 2022). Finalmente, en el municipio de Yacopí, en el Departamento de Cundinamarca se reportó una media de contenido de Cd en granos de 12 mg kg^{-1} (Tabla 5) (Rodríguez Albarracín et al.,2019).

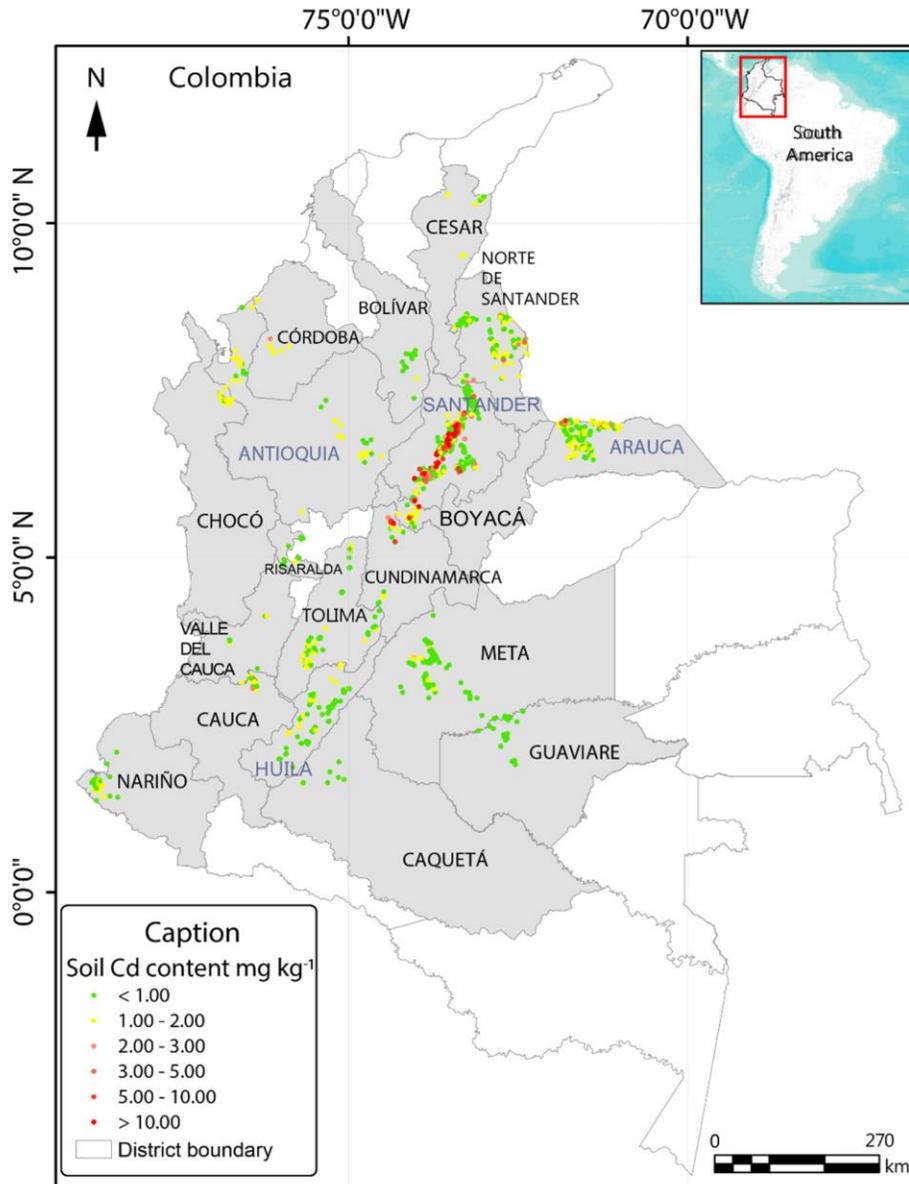


Fig. 6. Distribución geográfica del Cd en el suelo de las muestras de las zonas de producción de cacao en Colombia. Tomado de: Bravo et al. (2018).

La presencia de Cd en el suelo es desafío para la cadena productiva del cacao porque el cacao puede acumular el elemento en sus tejidos vegetales aéreos, debido a la facilidad que tiene la planta de absorber, translocar y acumular este metal (Engbersen et al., 2019; Wade et al., 2022). En cacao, se ha reportado que una planta es acumuladora, cuando transloca el Cd a los tejidos aéreos y se evidencia algunos daños estructurales y fotosintéticos severos durante el desarrollo del cultivo bajo estas condiciones (Pereira de Araújo et al., 2017). Sin embargo, esta condición dependerá del genotipo y de las prácticas

agrícolas utilizadas. Arévalo-Hernández et al. (2021) evaluó plántulas de 53 genotipos de cacao silvestre y 4 comerciales que contenían 25 mg kg^{-1} de Cd, encontrando acumulación en tejidos foliares desde los $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ y $25,9 \text{ mg kg}^{-1}$, donde la acumulación depende de las respuestas intra-genotípicas de las plántulas de cacao al estrés por Cd, 11 mostraron acumular concentraciones menores a 2 mg kg^{-1} dentro de los cuales se encontraban los genotipos comerciales (CCN-51, ICS-39, TSH-565, ICS-1, IMC-67 e ICS-6), sin embargo, también debe resaltarse que la capacidad de acumulación depende también de la edad fisiológica de la planta y de la biodisponibilidad del Cd en el suelo. También se ha reportado que prácticas como el mantenimiento permanente de la hojarasca sobre la superficie del suelo dentro del cultivo contribuye con la recirculación del Cd en el agroecosistema (Gil et al., 2022); mientras que el encalado, la incorporación de Zn y biochar edáfico (Vanderschueren et al., 2021), la combinación de patrón-injerto (Arévalo-Hernández et al., 2021) puede afectar la disponibilidad del Cd.

La presencia de Cd en los agroecosistemas de cacao, no solamente afectan la planta de cacao, sino también a la comunidad microbiana (Jiao et al., 2018), lo que tiene efecto en la dinámica del Cd-suelo-microorganismo-planta. La diversidad microbiana presente en los suelos es sensible a las perturbaciones y a las condiciones adversas que afectan directamente los procesos de descomposición de la materia orgánica, de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, entre otros, la estructura del suelo, asociándose directamente con fertilidad del suelo (Zeilinger et al., 2016). Si bien se ha demostrado que la comunidad microbiana se ve afectada por la presencia de Cd en escala de diversidad (Guo et al., 2017; Guo et al., 2022; Passarini et al., 2022), funcional y metabólica (Zheng et al., 2019). El efecto que puede tener el Cd en la estructura de la comunidad microbiana asociada a los agroecosistemas de cacao está poco estudiado, y se centra en el aislamiento y cultivo de microorganismos tolerantes a Cd. Principalmente basados en el aislamiento de bacterias Cd tolerantes (Bravo et al., 2018; Quiroga-Mateus et al., 2022; Córdoba-Novoa et al., 2022) y algunos pocos en la caracterización de microbiomas bacterianos (Cáceres et al., 2021). Las comunidades fúngicas presentes en suelos cacaoteros en condiciones de Cd natural han sido caracterizadas sólo a través del uso de métodos cultivables, como los realizados por Sandoval Pineda et al. (2020) con hongos formadores de micorrizas arbusculares y Guerra Sierra et al. (2022) con hongos tolerantes cultivables de suelos cacaoteros contaminados con Cd. A la fecha, existen reportes sobre la caracterización de la comunidad fúngica asociada a otros cultivos de

interés agronómico utilizando herramientas de secuenciación ambiental (Tabla 3) pero no hay investigaciones en cacao publicadas.

Pregunta de Investigación

Pregunta de investigación general

¿Cuál es la composición de la comunidad fúngica presente en diferentes tipos de suelos de cacao (rizosférico y suelo asociado al cultivo a dos profundidades) con diferentes propiedades fisicoquímicas y niveles de Cd total?

Preguntas de investigación específicas

¿Cómo es la concentración de cadmio en suelos y tejidos vegetales de cacao en tres fincas cacaoteras en el municipio de Yacopí-Cundinamarca y qué propiedades fisicoquímicas del suelo se relacionan con el Cd en suelo y tejidos?

¿Cuál es la comunidad fúngica presente en suelos cacaoteros en tres fincas del municipio de Yacopí-Cundinamarca con distintas concentraciones de Cd?

¿Cuál es el efecto de las propiedades fisicoquímicas del suelo en la comunidad fúngica presente en suelos cacaoteros en tres fincas del municipio de Yacopí-Cundinamarca con distintas concentraciones de Cd?

Hipótesis

Hipótesis general

La presencia de Cd y las propiedades físicas y químicas de los suelos de cacao afectan a la diversidad fúngica y seleccionan especies de hongos tolerantes al Cd.

Hipótesis específicas

Las concentraciones de Cd en suelo y tejidos vegetales son distintas en las tres fincas cacaoteras y las propiedades fisicoquímicas del suelo influyen en la presencia de Cd en tejidos vegetales

La presencia de distintas concentraciones de Cd natural en los suelos cacaoteros afecta la estructura de la comunidad fúngica y seleccionan taxones únicos

Las propiedades fisicoquímicas y concentraciones de Cd del suelo influyen en la estructura de la comunidad fúngica presente en suelos cacaoteros del municipio de Yacopí-Cundinamarca

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la diversidad estructural de los microbiomas fúngicos presentes en suelos cacaoteros con diferentes propiedades físicas, químicas y concentraciones de cadmio del municipio de Yacopí-Cundinamarca.

Objetivos específicos

1. Determinar las propiedades fisicoquímicas del suelo y su relación con el cadmio en suelos, hojarasca, hoja y grano de cacao en tres fincas del municipio de Yacopí - Cundinamarca.
2. Caracterizar la riqueza y abundancia relativa de la comunidad fúngica presentes en suelos asociados al cultivo de cacao a dos profundidades y rizosférico en tres fincas con diferentes concentraciones de cadmio del municipio de Yacopí - Cundinamarca.
3. Evaluar el efecto de las características fisicoquímicas y concentraciones de cadmio presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas.

1. Capítulo 1: Propiedades físicas, químicas y su relación con el Cd en suelos, hojarasca, hoja y grano de cacao del municipio de Yacopí - Cundinamarca

1.1 Resumen

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial, presente en el suelo de manera natural o como consecuencia de la actividad humana. La presencia de Cd en el suelo presenta un riesgo potencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos que habitan un agroecosistema, debido a su toxicidad y su continua biodisponibilidad. Este metal pesado no cumple ninguna función biológica en las plantas; sin embargo, estas llegan a absorber fácilmente, translocar y acumular Cd en diferentes tejidos. Son pocos los reportes que brindan información de cómo es la interacción entre las propiedades fisicoquímicas y el contenido de cadmio total y disponible en suelos cacaoteros y en la hojarasca, hoja y grano de cacao. Este capítulo tuvo como objetivo determinar las propiedades fisicoquímicas del suelo y su relación con el Cd en suelos, hojarasca, hoja y grano de cacao en fincas del municipio de Yacopí - Cundinamarca. Para ello, se seleccionaron 3 fincas cacaoteras (F1, F2 y F3) con diferentes concentraciones de Cd total, Cdt, (F1 > 5,0 mg kg⁻¹; F2 y F3: <2 mg kg⁻¹). En cada finca se definieron dos lotes uno con cultivo de cacao (SCC) y otro sin cultivo de cacao (SWC). En cada lote SCC se seleccionaron seis ventanas de observación y en cada una se tomaron tres árboles productivos del mismo clon (CCN-51) y se colectaron muestras de suelo rizosférico (Rz) y no Rz a dos profundidades (D1:0-30 cm, D2:31-100 cm) y muestras de hojarasca (HJ), hojas (HF) y frutos. Para los lotes SWC, se seleccionaron únicamente tres ventanas y se colectó solamente suelo no Rz a las profundidades D1 y D2. Para cada muestra de suelo se determinaron variables fisicoquímicas y el contenido de Cd total y disponible. A las muestras de HJ, HF y granos (G) también se determinó el contenido de Cd. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la significancia por cada variable fisicoquímica y contenido de Cd en suelos y tejidos vegetales y se realizó la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon como prueba post hoc. Se determinó el Coeficiente de Correlación de Spearman para evaluar la relación entre las variables fisicoquímicas y con el contenido de Cd en los tejidos. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar las variables fisicoquímicas por finca. Los resultados muestran que la distribución del Cdt y Cd disponible, Cdd fue heterogénea en las fincas estudiadas, siendo mayor en los suelos de la F1 con cultivo de cacao (SCC) e independiente de las profundidades (D1 y D2) analizadas. Se determinó que las concentraciones de Cdt presentes en los suelos de las tres fincas fueron superiores a los niveles establecidos por las entidades regulatorias internacionales para suelos agrícolas no contaminados (1,0 mg kg⁻¹) y el contenido de Cd en granos fue superior a las concentraciones permitidas por la comunidad europea para grano seco (0,6 mg kg⁻¹). En general, los parámetros químicos pH, Ca, Zn, Cu, CICE, Mg presentes en los suelos SCC

D1 de las tres fincas analizadas, presentaron una correlación positiva con el Cdt y Cdd. Sin embargo, estas correlaciones pueden cambiar para suelos Rz y entre SWC. Por otro lado, el suelo rizosférico de la finca F1, presentó el mayor contenido de Cdt y Cdd, con pH ligeramente más ácido y un contenido mayor de materia orgánica y mayor CICE con respecto a todos los suelos evaluados. Por último, la concentración de Cd en los tejidos analizados fue $HJ > HF > G$, en donde el contenido de Cd en la hojarasca fue mayor a lo encontrado en el suelo a una profundidad de D1, lo que podría contribuir a la recirculación del Cd en sistema suelo-planta.

1.2 Introducción

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial, con una densidad superior a 5 g cm^{-3} y tóxico para los seres vivos a bajas concentraciones (Adriano, 2002). La presencia de Cd plantea un riesgo potencial para el crecimiento y desarrollo de los organismos que habitan un agroecosistema y puede alterar las interacciones que se presentan entre ellos, debido a su severa toxicidad, no biodegradabilidad y continua disponibilidad (Nagajyoti et al., 2010; Bravo Realpe et al., 2014). Esto podría afectar seriamente el sistema de producción de cultivos y la cadena alimentaria poniendo en peligro la salud humana, la seguridad alimentaria y la economía agrícola (McLaughlin et al., 2021).

El Cd puede estar presente de manera natural en el suelo o como consecuencia de la actividad humana (Li et al., 2013). La presencia natural de Cd en el suelo se atribuye principalmente a la meteorización del material parental rico en minerales como greenockita, hawleyita, cadmoselita, monteponita (Gong et al., 1977; Schwartz, 2000), emisiones volcánicas, incendios forestales, descargas a los ríos (Cullen & Maldonado, 2013) y a las actividades antropogénicas, como las industriales, mineras y agrícolas (Rizvi et al., 2020). La disponibilidad de Cd en el suelo está sujeta a las propiedades físicas, químicas y biológicas de cada suelo (Mahar et al., 2016). Se ha llegado a considerar un suelo no contaminado por Cd cuando la concentración suele ser menor a 1 mg kg^{-1} (Argüello et al., 2019); y a $2,6 \text{ mg kg}^{-1}$ en suelos derivados de rocas sedimentarias como caliza, areniscas, lutitas, en donde se reportan altas cantidades de Cd (McLaughlin & Singh, 1999; He et al. 2015). A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados no sufren descomposición microbiana (Kirpichtchikova et al. 2006) y sus concentraciones totales en el suelo persisten durante mucho tiempo después de la deposición (Adriano, 2002). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) declaró que $0,43 \text{ mg kg}^{-1}$ se considera un nivel crítico de Cd total en suelos agrícolas para Estados Unidos (USEPA,

2002); mientras que la Unión Europea, indicó que los valores típicos en suelos agrícolas no contaminados con Cd son menores a $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (Kabata-Pendias, 2010; Argüello et al., 2019) y ha establecido niveles máximos permitidos en suelos agrícolas ($< 1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) (Ding et al., 2018). Para Colombia aún no se ha reportado cuáles son los valores críticos para considerar un suelo contaminado por Cd (Arias España et al., 2018).

El Cd no cumple ninguna función biológica para las plantas; sin embargo, algunas lo absorben, translocan y acumulan en diferentes tejidos (Shahid et al., 2016) produciendo cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas, afectando negativamente sus funciones fisiológicas y por lo tanto, el rendimiento del cultivo. Esto puede generar pérdidas económicas y afectar la inocuidad de los productos cosechados (Bari et al., 2019; Huybrechts et al., 2020). La disponibilidad del Cd está en función de las formas como se encuentra el elemento en el suelo, desde no soluble (fracción no intercambiable), formado complejos precipitados con componentes del suelo, como con carbonatos, sulfuros, sulfatos, óxidos de Fe-Mn, y minerales, a estados que fácilmente pueden ser solubles (fracción intercambiable), como óxidos metálicos hidratados, iones de Cd adsorbidos a la superficie de la materia orgánica del suelo y a las partículas de arcilla, o estar completamente disponible en la solución del suelo (fracción en solución), como catión divalente (Cd^{2+}), sulfato de Cd (CdSO_4), cloruro de Cd (CdCl_2) (Hao et al., 2021). El Cd^{2+} en la solución del suelo es la fracción que suele absorberse más rápidamente por los seres vivos, lo que podría entenderse como la más biodisponible (Helmke, 1999). La solubilidad en la fracción en solución de los suelos y la acumulación en la planta se ve afectada por varios factores como el pH, el contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico, la disponibilidad de otros elementos, el genotipo de la planta y la comunidad microbiana presente en el agroecosistema (Alloway, 2013; Yi et al., 2020). En especies como el arroz, el trigo y la papa, el Cd puede acumularse en tejidos vegetales en concentraciones que superan los niveles que suponen un riesgo para la salud humana (Jan & Parry, 2016).

El nivel máximo permitido de Cd en productos alimenticios establecidos por la Comisión Europea es de $0,020 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas frescas; $0,10 - 0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ para semillas; y $0,10 - 0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ para el grano de cereales (European Commission, 2021; Hou et al., 2020). La presencia de Cd en los tejidos de la planta es causal de preocupación para la producción de alimentos y también para la cadena de producción de materias primas. Para el cacao,

la Comisión Europea, desde 2019, ha establecido umbrales de 0,10 - 0,80 mg kg⁻¹ de Cd en materia seca, dependiendo del porcentaje de cacao presente en el producto final (European Commission, 2021). Esta regulación se ha vuelto de gran importancia para los países productores de cacao en Sudamérica y el Caribe puesto que en los últimos años se han reportado en el grano concentraciones de Cd superiores a las permitidas por las entidades regulatorias (Chavez *et al.*, 2015; Gramlich *et al.*, 2018; Bravo *et al.*, 2018; Florida Rofner, 2021), las cuales son tres veces mayores a lo reportado en América Central y África Oriental y diez veces mayores que en África Occidental (Bertoldi *et al.*, 2016).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta que ha sido considerada como acumuladora de Cd (Engbersen *et al.*, 2019; Wade *et al.*, 2022) y se ha demostrado que la concentración de Cd en la semilla aumenta conforme haya mayor contenido de Cd disponible en el suelo (Arguello *et al.* 2019; Gil *et al.* 2022). Por lo tanto, la presencia de Cd en suelos cultivados con cacao podría afectar la comercialización del grano y de sus productos derivados debido al impacto que pueda tener el Cd en la salud humana y en los ecosistemas (suelo, plantas, macro y microorganismos) (Hou *et al.*, 2020). Para el 2021, a nivel mundial, se reportó un área sembrada de 11,53 millones de hectáreas de cacao y un total de 5,58 millones de toneladas de granos de cacao cosechados, de los cuales cerca del 70% de los granos fueron producidos en países del este de África (FAO, 2022). Los principales países productores son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Brasil, Ecuador, Camerún, Nigeria, Perú, República Dominicana y Colombia. (FAO, 2022). Sin embargo, las estimaciones para la producción de cacao en el periodo de cosecha 2021/22, mencionan un déficit de oferta de 306.000 toneladas, a causa de la disminución de la producción mundial, estimada en un 8,0%. En África, la producción descendió un 11,3%, mientras que, en las Américas, así como en Asia y Oceanía, aumentó en 3,2% y 4,7% respectivamente. Por el contrario, las actividades de procesamiento se han expandido en un 2,3% en Europa, mientras en América cayeron un 4,7% (ICCO, 2022). La expansión de las actividades de procesamiento y el déficit de granos de cacao en el mercado, pueden representar una oportunidad para los productores de cacao de Colombia, siempre y cuando se logre cumplir con los estándares requeridos.

En Colombia, el cultivo de cacao es una de las principales apuestas productivas, debido a su potencial no solo comercial sino también social (Pabón & Pabón, 2016). Para el año 2021, se registró una producción de cacao de 69.040 toneladas en 422 municipios de 27

departamentos (FEDECACAO, 2022), siendo Santander el principal productor, con una participación nacional del 41%, seguido por Antioquia (9%), Arauca y Huila (8% cada uno), Tolima (7%), Nariño (5%) y Cundinamarca con (3%) (MINAGRICULTURA, 2021). En Cundinamarca, en el periodo correspondiente al año 2021, se estimó una producción de 2.607 toneladas que contribuyeron al mejoramiento de la economía regional y al sustento de más de 4.400 familias que se dedican a la siembra de este fruto (FEDECACAO, 2022). Los mayores productores de cacao del departamento de Cundinamarca fueron Caparrapí (1.311 toneladas), Yacopí (1.148 toneladas) y Sasaima (673 toneladas) (Gobernación de Cundinamarca, 2020).

El sistema productivo de cacao en Colombia usualmente presenta bajas densidades de siembra, de alrededor de 600 - 700 plantas Ha^{-1} (FEDECACAO 2015) puesto que el cacao suele estar vinculado a sistemas agroforestales con especies arboreas que le proporcionan sombrío (Suárez Salazar et al., 2018). El cacao es una especie que suele cultivarse por método de injertación usando patrones provenientes de semillas de un genotipo vigoroso y con tolerancia a enfermedades radiculares y se injerta clones con cualidades de interés comercial del fruto (FHIA, 2005). Una de las principales limitantes del cultivo de cacao se da por problemas fitosanitarios, como el causado por *Moniliophthora roreri* que puede causar pérdidas hasta del 40 % de la producción (Correa Álvarez et al., 2014). A nivel nutricional las prácticas de fertilización son poco adoptadas y los arreglos agroforestales los cacaocultores los han diseñado en respuesta a las necesidades ecofisiológicas de la planta, como el asocio con otras especies y el mantenimiento de una cobertura vegetal con la hojarasca (Hernández-Núñez et al., 2020) para generar procesos de ciclaje de nutrientes (Álvarez-Carrillo et al., 2015). Ogunlade et al. (2009) ha reportado que por cada 1.000 kg de grano seco de cacao se requiere de 20 kg N, 4 kg P y 10 kg K. Thong & NG, citado por Moráis (1988) ha informado que el requerimiento nutricional de cacao en etapa de reproducción en kg ha^{-1} es de N: 438, P: 48, K: 633, Ca: 373, Mg: 129, Mn: 6,1 y Zn: 1,5.

Debido a la preocupación de la presencia de Cd en los granos de cacao, se han realizado estudios para entender el rol del metal pesado en la planta de cacao, Oliva et al. (2020) encontraron que la mayor concentración de Cd se da en hojas y no en la raíz de la planta, también asegurando que el contenido de Cd en granos se correlacionó con la concentración de Cd en el suelo. A su vez Chávez et al. (2015), determinaron la distribución del Cd en los órganos aéreos de la planta, encontrando que la acumulación es mayor en

hojas > vaina > testa > almendra. Es posible que adicional a la concentración de Cd en el suelo, prácticas como el mantenimiento de la hojarasca causa una recirculación del Cd en el suelo. También se ha reportado que la acumulación de Cd por la planta de cacao se ve relacionado con el genotipo, Arévalo-Hernández et al. (2021) evaluó plántulas de 53 genotipos de cacao silvestre y 4 comerciales que contenían 25 mg kg^{-1} de Cd, encontrando acumulación en tejidos foliares desde los $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ y $25,9 \text{ mg kg}^{-1}$, donde la acumulación depende del genotipo. Otros factores como las propiedades fisicoquímicas del suelo como el pH, CIC, MO pueden afectar positivamente la bioacumulación de Cd (Bravo et al., 2014; Florida et al., 2019).

El municipio de Yacopí se ubica en el flanco noroccidente de Cundinamarca, una región que ha sido reportada como una zona de anomalía geoquímica que contienen minerales ricos para algunos metales como el Cd, Zn y Mn (Mendoza et al., 2020). Con respecto a Cd en suelo Rodríguez Albarracín et al., (2019) encontró en la zona concentraciones que oscilan entre $0,45$ y $53,77 \text{ mg kg}^{-1}$, mostrando una gran heterogeneidad en la distribución del Cd en el suelo y factores como el pH, el contenido de Cd total y disponible, el contenido de Cd en hojas y hojarasca mostraron ser variables que afectan positivamente el contenido de Cd en granos de cacao. Las concentraciones de Cd encontradas en este estudio fueron mayores en hojarasca > hoja > almendra. Sin embargo, no hay estudios reportados sobre la distribución de Cd en suelos rizosféricos y no rizosféricos tomados a diferentes profundidades.

Esta investigación tiene como objetivos determinar las propiedades físicas y químicas en suelos rizosféricos y no rizosféricos colectados a diferentes profundidades (D1: 0-30 cm y D2: 31-100 cm) y determinar el contenido de Cd en hojarasca, hoja y granos de cacao en tres fincas cacaoteras con distintos niveles de Cd. Esta investigación contribuye en el conocimiento de la distribución del Cd en la zona y determinar los factores fisicoquímicos podrían estar afectando el contenido de Cd presentes en los suelos estudiados y en diferentes partes de la planta (hojarasca, hoja y grano).

1.3 Materiales y Métodos

1.3.1 Sitio de la Investigación

Esta investigación se llevó a cabo en el municipio de Yacopí en Cundinamarca, Colombia. Esta región se caracteriza por encontrarse entre los 200 y 2.000 msnm, y de acuerdo con las zonas de vida de Holdridge corresponde a un bosque húmedo premontano (precipitaciones entre 1.000 y 2.000 mm año⁻¹ y evapotranspiración potencial entre 1,0 y 0,5 mm) y un bosque muy húmedo premontano (precipitaciones entre 2.000 y 4.000 mm año⁻¹ y evapotranspiración potencial entre 0,5 y 0,25 mm), con temperaturas entre 18°C y 24°C, respectivamente. Los paisajes geomorfológicos se constituyen por terrazas, laderas coluviales, laderas estructurales, ladera montaña y vegas (Consejo Municipal Yacopí, 2000). Esta región está conformada por la unidad litológica b6k6-St que comprende material del tipo shales, cherts, calizas, arenitas y fosforitas del Albiano-Maastrichtiano y b2b6-Sm compuesta por shales con depósitos de yeso, cherts, calizas y arenitas de la era Valanginiano-Albiano (Mendoza et al., 2020) (Fig. 1.1); y asociaciones de suelo Typic Udorthents – Typic Dystrudepts que se caracterizan por provenir de rocas clásticas limoarcillosas, y Humic Dystrudepts – Typic Hapludands formados de rocas clásticas limoarcillosas con intercalaciones carbonatadas y depósitos de ceniza volcánica, correspondientes a las unidades MVVe y MPKd respectivamente IGAC (2000) (Fig. 1.2). Con base en la caracterización realizada por Rodríguez Albarrcín et al. (2019) en fincas cacaoteras del municipio de Yacopí, Cundinamarca, se seleccionó una finca cacaotera con suelos con niveles de Cd mayores a 5,0 mg kg⁻¹ (F1), y dos fincas con concentraciones menores a 2,0 mg kg⁻¹ de Cd total (F2 y F3). Las fincas seleccionadas debían presentar características similares en el cultivo en cuanto al genotipo de la copa (CCN51) utilizada y al estado fenológico reproductivo similar y también a que la pendiente del terreno fuera inferior al 30% para reducir el efecto que pueda tener la pendiente en la lixiviación de los elementos químicos presentes en los suelos por acción de la lluvia.

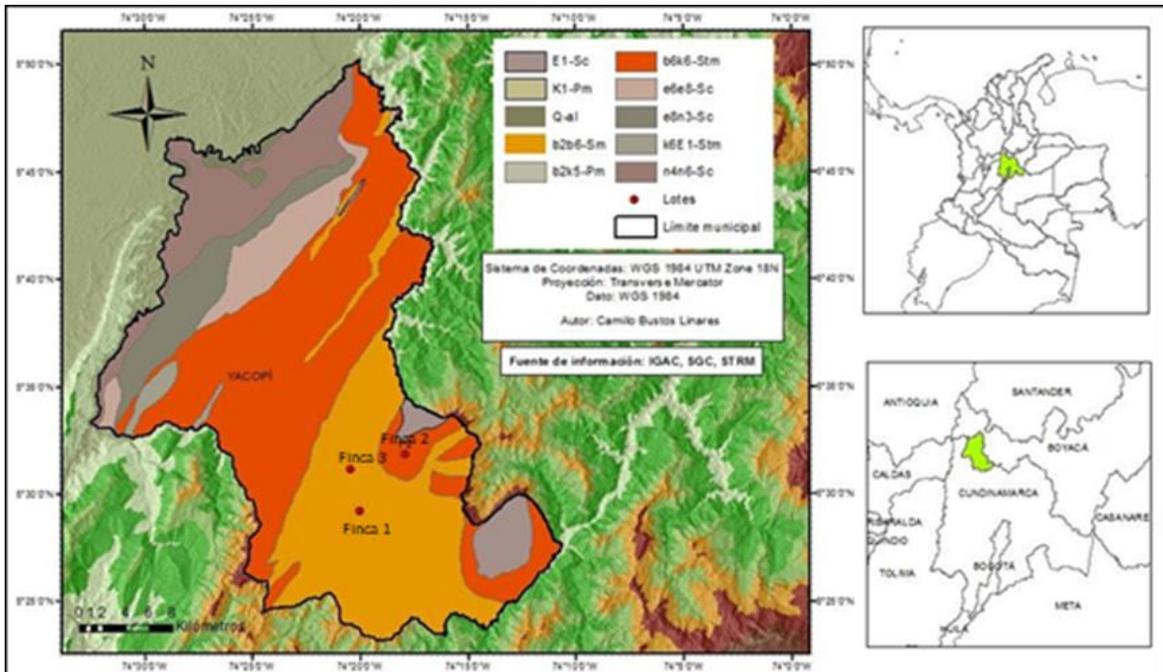


Fig. 1. 1 Mapa litológico de Yacopí (Cundinamarca, Colombia). Fuente Servicio Geológico Colombiano, 2015, editado por Camilo Bustos Linares.

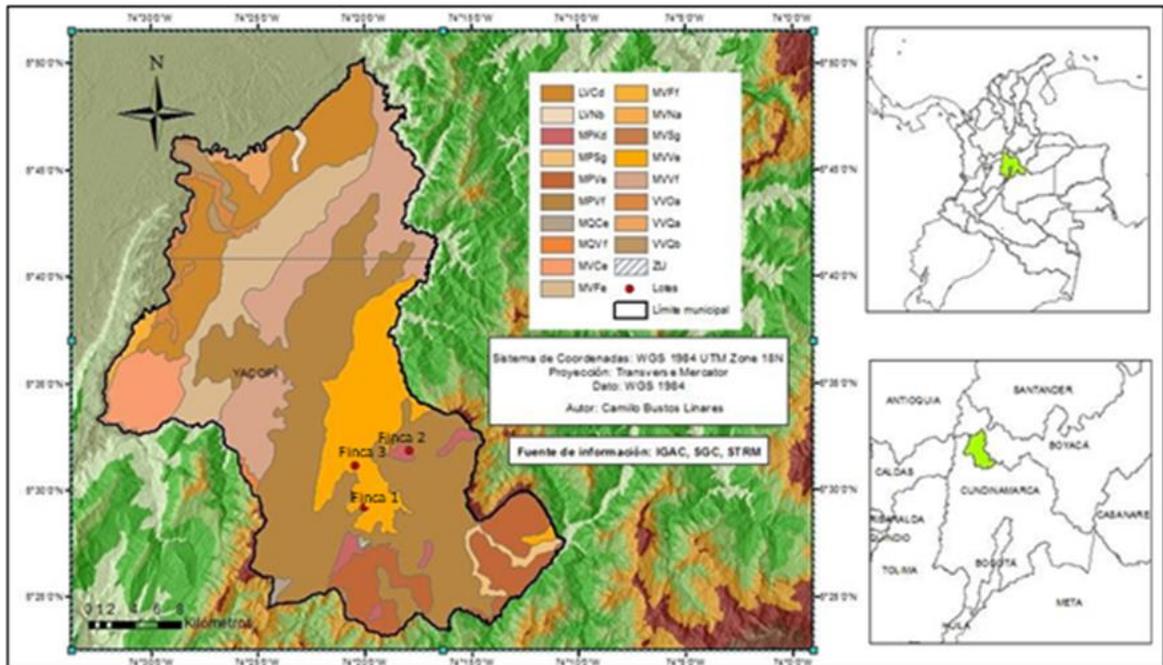


Fig. 1. 2 Mapa de suelos Yacopí (Cundinamarca, Colombia). Fuente IGAC, 2000, editado por Camilo Bustos Linares.

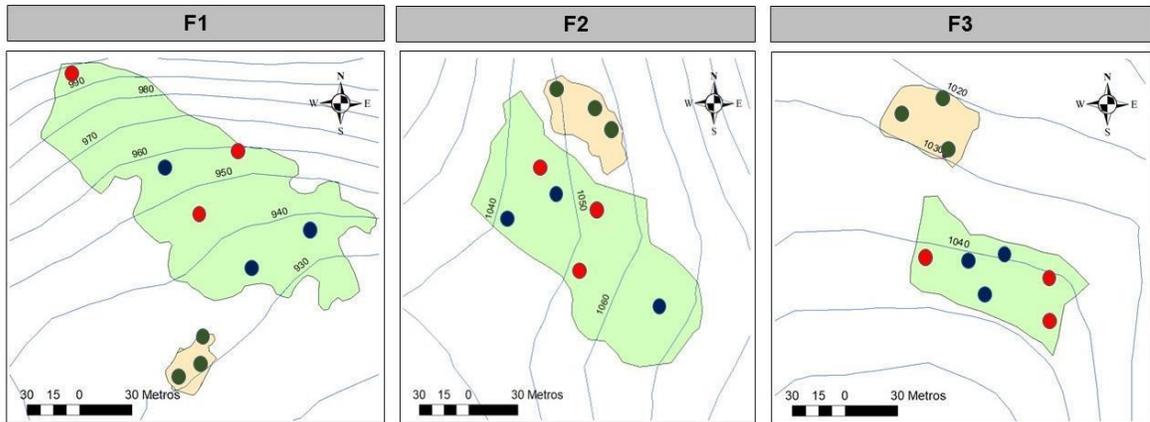
1.3.2 Diseño del muestreo

En cada finca, a partir del Modelo de Elevación Digital (DEM) Alos Palsar, se analizó el terreno empleando el software SAGA-GIS y se obtuvieron las siguientes covariables topográficas: elevación, pendiente, aspecto, perfil de curvatura, índice de convergencia, índice topográfico de humedad y factor LS (combinación entre la longitud de la pendiente y factor de inclinación, LS-factor, por sus siglas en inglés, Slope Length and Steepness factor) que pueden afectar de forma directa o indirecta la distribución de Cd en una zona (Qiu et al., 2020). Dichas variables topográficas, fueron el insumo para seleccionar dos lotes, uno con cacao (SCC) y el otro sin cultivo de cacao (SWC) para determinar el efecto del cultivo de cacao en las propiedades fisicoquímicas y distribución del Cd total y disponible. La vegetación presente en los suelos SWC de la F1, correspondió a relictos de bosque secundario y en la finca F2 y F3 a pastizales. Una vez seleccionados los lotes, se identificaron 6 y 3 ventanas de observación para SCC y SWC, respectivamente, mediante la metodología de muestreo hipercubo latino condicionado con corrección en campo (Minasny & McBratney., 2006).

En las tres ventanas de observación del lote SCC de las seis ventanas identificadas se tomaron 3 árboles productivos por ventana (Fig. 1.3). En cada árbol a una distancia de 30 cm del tronco siguiendo los cuatro puntos cardinales se realizó la toma de submuestras de suelo a una profundidad de 0-30 cm (D1) y de 31-100 cm (D2) para obtener una muestra compuesta de aproximadamente 0.5 kg por profundidad en cada ventana de observación. Para las muestras de suelos rizosférico (Rz), se colectó el suelo adherido a las raíces superficiales del cultivo de cacao solamente en las fincas F1 y F2. En las tres ventanas de observación restantes, siguiendo los mismos parámetros de colecta, se tomaron las muestras de suelo solamente a la profundidad D1. Esta misma estrategia se realizó en SWC, con la diferencia que solo se tomaron tres muestras a la profundidad D1 y una muestra a profundidad D2 por ventana de observación en cada finca. Para un total de muestras de suelo por finca (F1 y F2) de 16 correspondientes a 3 Rz, 9 D1 y 4 D2 (Tabla 1.1). Para la toma de hojarasca (HJ), hoja (HF) y fruto, en cada una de las seis ventanas de SCC por finca se recolectó una muestra compuesta de HJ ubicada debajo del dosel de los tres árboles y otra de HF obtenidas de las ramas del tercio medio de la planta. Adicionalmente, se colectó un fruto por árbol en dos de los tres árboles ubicados en cada ventana de observación. Para un total de 24 muestras por finca correspondiente a 6 HJ, 6HF, 12 frutos (Tabla 1.1). Las muestras de suelo fueron empacadas en doble bolsa de

cierre hermético, mientras que las de HJ y HF se colocaron en bolsas de papel con sílica gel. Todas las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de suelos y aguas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia – Bogotá para realizar los análisis fisicoquímicos y determinación de Cd total y disponible en suelos y Cd en los tejidos de las plantas (HJ, HF y frutos).

A



B

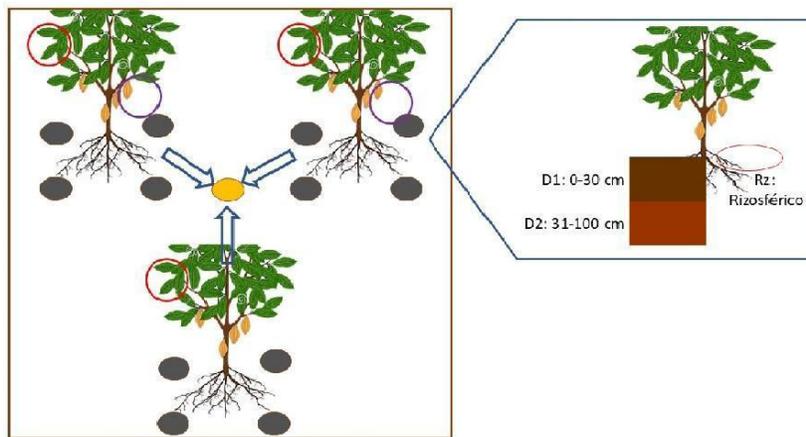


Fig. 1. 3 Ubicación de los puntos de muestreo. A. Muestreo al interior de las fincas seleccionadas en suelos con cultivo de cacao (SCC) en verde y suelos sin cultivo de cacao (SWC) en marrón. Los puntos Rojos representan las ventanas de observación donde se tomó muestra (Rz, D1, D2, HJ, HF y frutos), los puntos azules representan las ventanas de observación donde se tomó muestra (D1, HJ, HF y frutos), los puntos verdes representan las ventanas de observación donde se tomó muestras (D1, D2). B. Representación de ventana una ventana de muestreo, los puntos grises representan los puntos donde se tomaron muestras de suelo (D1 y D2) y Rz. Los mapas muestran la distribución altitudinal de los cultivos (1060 - 930 msnm).

Tabla 1. 1 Distribución de las muestras obtenidas de suelo y tejido vegetal. F1: Finca F1, F2: Finca F2, F3: Finca F3. SCC: Suelo con Cultivo de cacao, SWC: Suelo sin Cultivo de Cacao. Rz: Suelo Rizosférico, D1: Suelo 0-30 cm, D2: Suelo 31-100 cm, HJ: Hojarasca, HF: Hoja.

	F1		F2		F3		Total
	SUELOS						
	SCC	SWC	SCC	SCW	SCC	SWC	
Rizosférico (Rz)	3		3				6
0-30 cm (D1)	6	3	6	3	6	3	27
31-100 cm (D2)	3	1	3	1	3	1	12
Subtotal	12	4	12	4	9	4	45
	TEJIDOS						
Hojarasca (HJ)	6		6		6		18
Hoja (HF)	6		6		6		18
Fruto / Grano	12 / 6		12 / 6		12 / 6		36/18
Subtotal	24/18		24/18		24/18		72/54

1.3.3 Análisis físicos y químicos del suelo

Se utilizó suelo seco a temperatura ambiente pasado por un tamiz de 2 mm. La textura del suelo se determinó por el método de Bouyoucos previa dispersión con Hexametáfosfato de Sodio, el pH en suspensión suelo:agua (1:1 p/v), carbono orgánico método Walkley & Black (IGAC, 2006); el calcio, magnesio, potasio, y sodio intercambiables por el método acetato de amonio 1 M pH 7.0, manganeso, hierro, zinc y cobre disponibles por extracción con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 1:2 (p/v) usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK) para su cuantificación y el fósforo con el método de Bray-II (IGAC, 2006). Según el protocolo del laboratorio de Suelos y Aguas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

1.3.4 Determinación de Cdt y Cdd en el suelo y Cd en tejidos vegetales

La determinación de Cd total (Cdt) en el suelo se realizó por extracción con agua regia (HCl:HNO₃ –3:1) (Amacher, 2018), y el Cd potencialmente disponible (Cdd) se determinó usando la solución extractora: 0,1 M HCl, 0,05 M DTPA usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin–Elmer AAnalyst 300 AAS (Perkin–Elmer, DK) para su cuantificación.

Para la determinación de Cd en granos, se tomaron los dos frutos por ventana de observación y se extrajeron los granos, estos fueron colocados en cajas de madera y fueron fermentadas durante 8 días a 45°C, realizando un volteo cada dos días.

Las muestras de hojarasca (HJ), hojas (HF) y granos (G) de cacao el Cd se determinó mediante calcinación de 3 g de la muestra previamente pulverizada a 450°C por 6 h y posterior la ceniza se disolvió en HCl (1:1) y HNO₃ de acuerdo con el método 999.11 de la AOAC.

Todos los análisis físicos y químicos se realizaron en el Laboratorio de Aguas y de Suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá

1.3.5 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis por pares para evaluar la significación estadística por cada variable fisicoquímica y tejidos vegetales (P. valor <0,05) y se realizó la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon con corrección del P. valor de Benjamini & Hochberg (1995) como prueba post hoc. Estos análisis se realizaron entre Fincas (F1, F2, F3), y en cada finca se contemplaron los factores: tipo de lote (SCC, SWC) y tipo de suelo (RZ, D1 y D2), cuando se aplican.

Se determinó el Coeficiente de Correlación de Spearman para evaluar la relación entre las variables fisicoquímicas de las muestras D1 con el Cd total y disponible del suelo y las concentraciones de Cd en tejidos, usando la librería de R corrplot (Taiyun & Viliam. 2021). Con la finalidad de determinar el nivel de acumulación de Cd en los tejidos con base en el contenido de Cdd en el suelo se calcularon los factores de transferencia (FT) para hoja-suelo y grano-suelo como lo reporta Zhang et al. (2014) ($TF = Cd_{\text{tejido}} / Cdd_{\text{suelo}}$). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con las librerías ade4 (Dray & Dufour, 2007) y factoextra (Kassambara & Mundt, 2020) con las muestras SCC separadas por finca (F1, F2,

F3). Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el software R Studio 2022.07.1 (R versión 4.1.3).

1.4 Resultados

1.4.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo

Los análisis físicos mostraron que los suelos estudiados presentan texturas predominantemente francas (Fig. 1.4). La textura del suelo en la finca F1 fue franco-arcillosa en todas las muestras, presentando mayor homogeneidad que los suelos de las fincas F2 y F3. En contraste, los suelos de la finca F2 fueron los más heterogéneos; la RZ y D1 fueron franco-arcillosa y D2 franco-arcillo-arenosa y en suelos SWC D1 franca y D2 franco limosa. En la finca F3 los suelos SCC fueron franco-arcillo-arenosa y SWC areno limosa (Fig. 1.4).

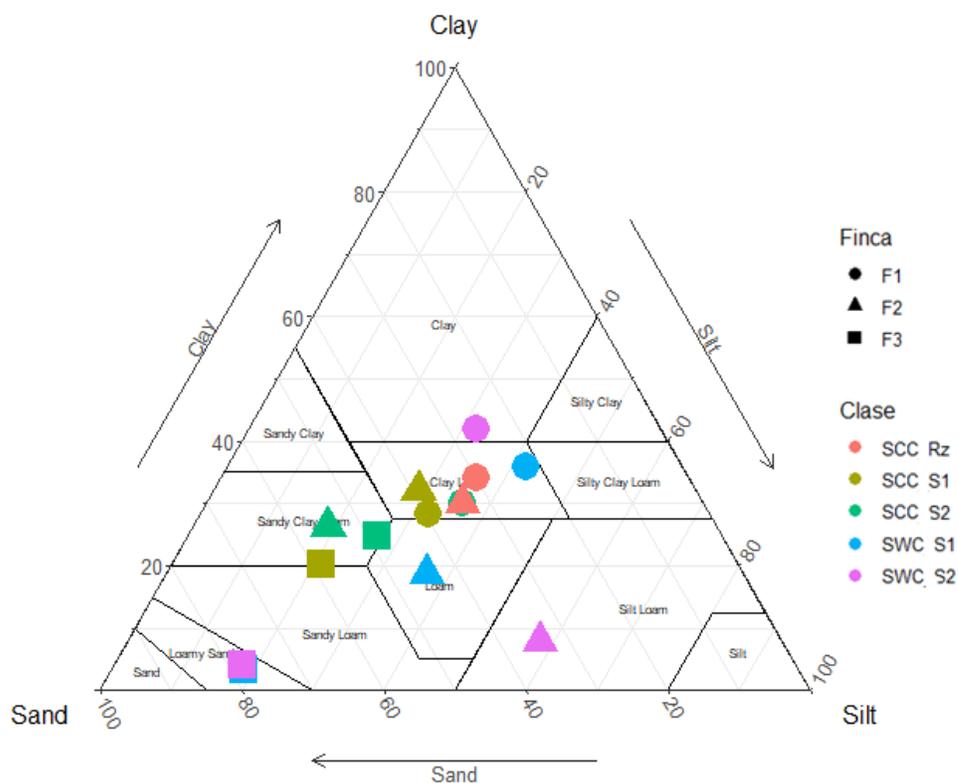
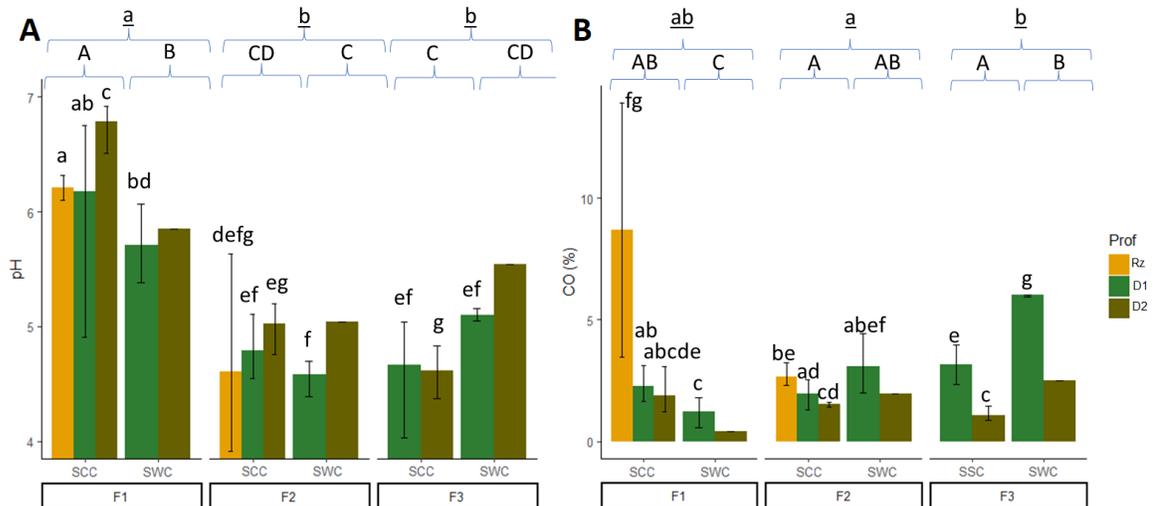


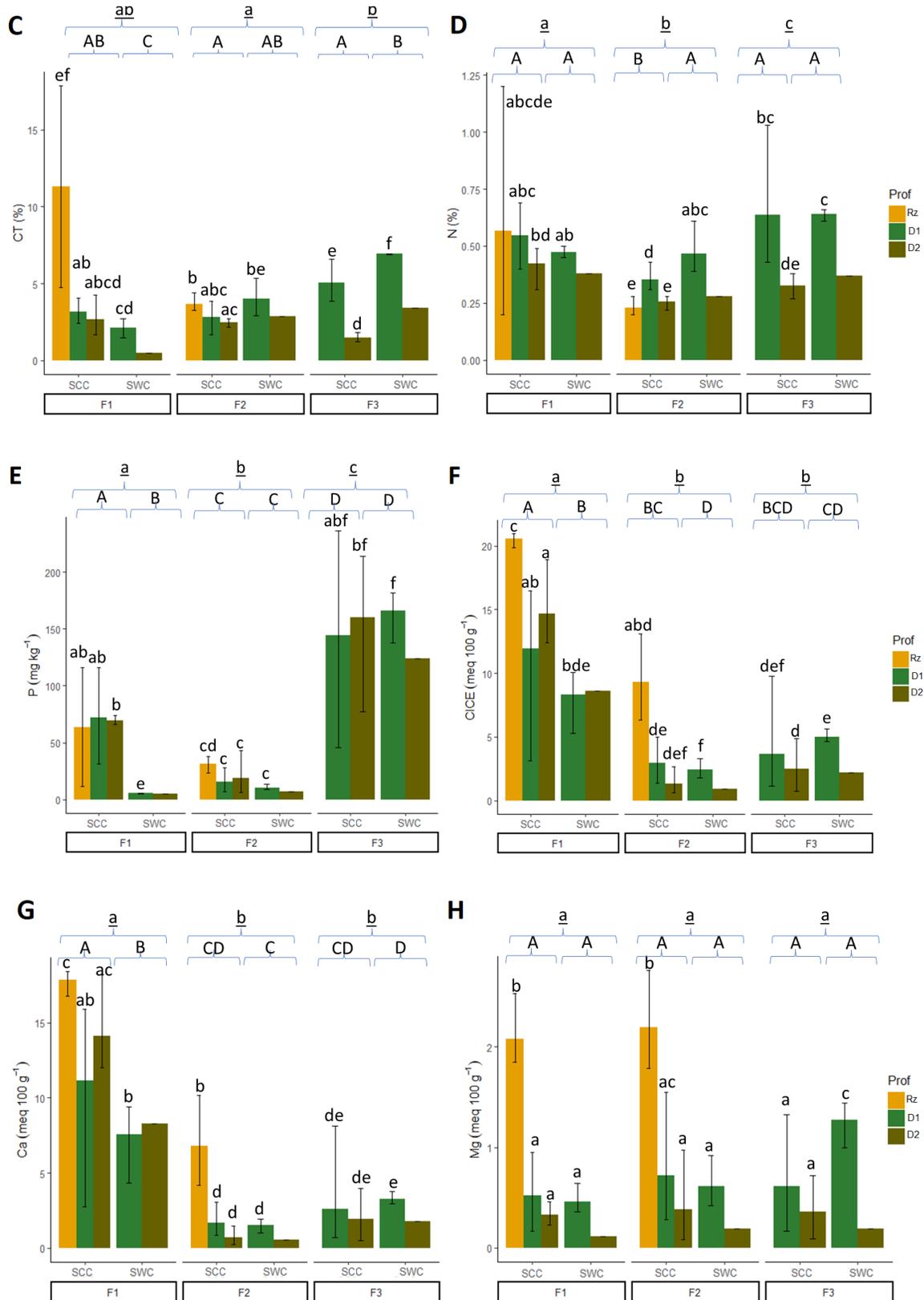
Fig. 1. 4 Textura del suelo. Triángulo textural de clasificación USDA. Sand: Arenas, Clay: Arcillas, Silt: Limos. Figuras representan fincas (□: F1, ▲: F2, ■: F3), colores representan tipo y profundidad (Rojo: suelo con cultivo de cacao (SCC) + Rizosférico (Rz), Amarillo: SCC + 0-30 cm (D1), Verde: SCC + 31-100 cm (D2), Azul: suelo sin cultivo (SWC) + D1,

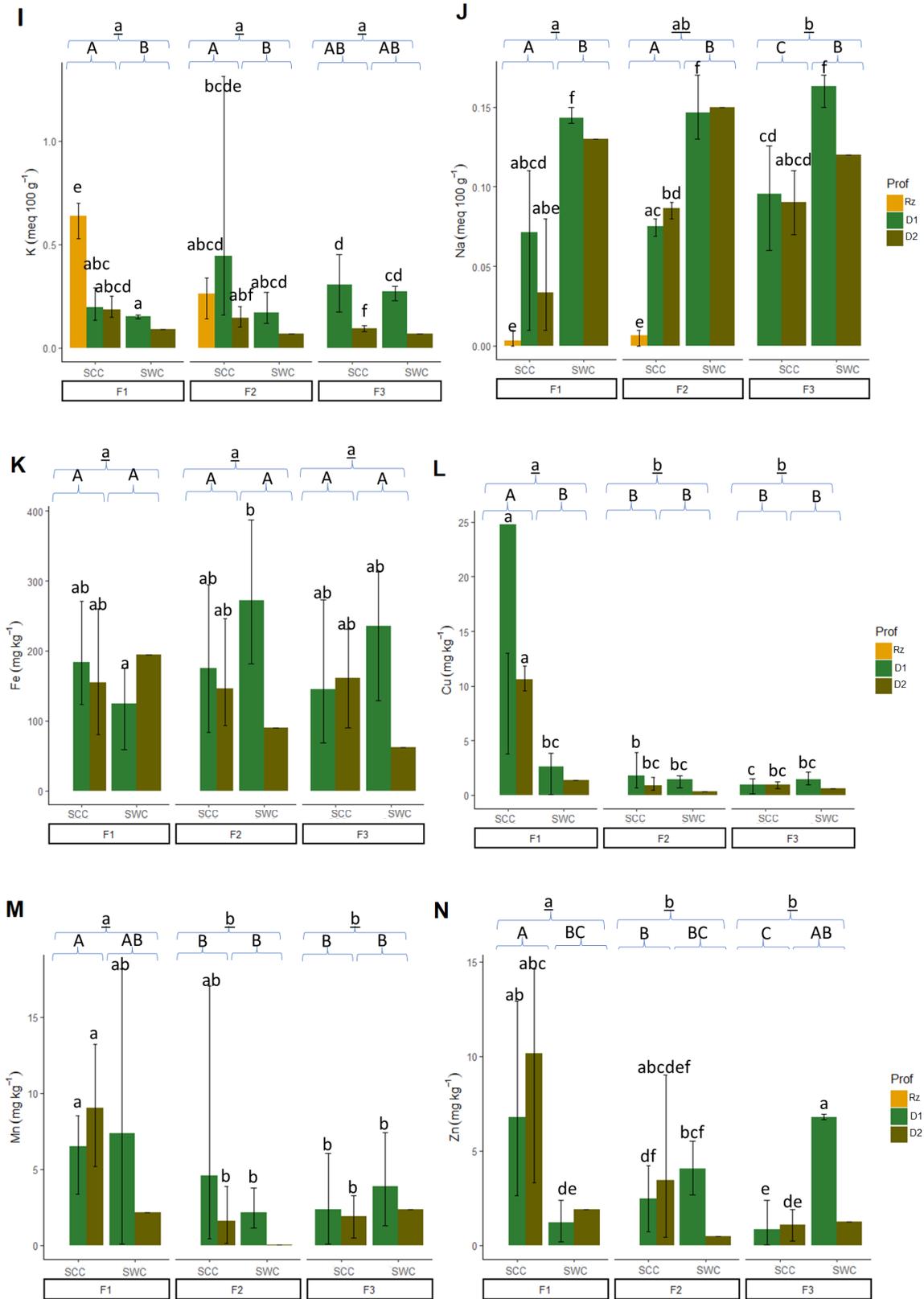
Morado: SWC + D2).F1 y F2:SCC: Rz: n=3, D1: n=6, D2:n=3, SWC: D1:n=3, D2:n=1, F3: D1:n= 3, D2:n=1

Los resultados de las propiedades químicas de los suelos por finca, por lote y tipo de suelo se presentan en la figura 1.5. Los suelos presentaron, en términos generales, pH de extremadamente ácidos a neutros (3,91 - 6,92), contenido de CO de pobre a extremadamente rico (0,4 - 13,9 %), CICE entre 0,91 y 20,95 meq 100g⁻¹ (Fig. 1.6). Se observó un alto coeficiente de variación independientemente de los factores analizados. Sin embargo, se observó que los suelos de la finca F1 fueron significativamente diferentes a los suelos de las fincas F2 y F3 en cuanto a las variables pH, CICE, Ca, Cu, Mn, Zn y B, que presentaron valores superiores en F1 (P. valor <0,05) (Fig. 1.6.A, F, G, L, M, N).

Para los suelos SCC y SWC analizados en cada finca, se encontró que los suelos en SCC presentaban niveles significativamente mayores en pH, CO, Ct, P, CICE, Ca, Mg, K, Cu que los SWC (P. valor <0,05) (Fig. 1.6.A, B, C, E, F, G, H, I, L). Por otro lado, en cuanto al tipo de suelo (Rz, D1 y D2) de las fincas F1 y F2, los resultados muestran que los suelos Rz presentaron mayores contenidos de CO, Ca y Mg y mayor CICE con respecto a D1 y D2 (Fig. 1.5:B,F,G,H). En contraste, no se observaron diferencias significativas en las variables químicas estudiadas en los suelos D1 y D2. Sin embargo, los niveles de CO, N, Ca, Mg y K fueron mayores en D1 con respecto a D2 (Fig. 1.5:B,D,G,H,I).







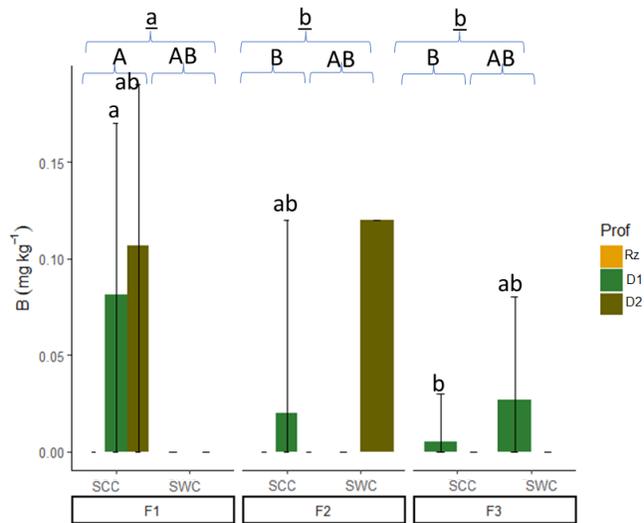


Fig. 1. 5 Propiedades químicas del suelo. A. pH, B. Carbono Orgánico (CO %), C. Carbono Total (CT %), D. Nitrógeno estimado (N %), E. Fósforo (P (mg g⁻¹)), F. Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva (CICE (meq 100g⁻¹)), G. Calcio (Ca (meq 100g⁻¹)), H. Magnesio (Mg (meq 100g⁻¹)), I. Potasio (K (meq 100g⁻¹)), J. Sodio (Na (meq 100g⁻¹)), K. Hierro (Fe (100g⁻¹)), L. Cobre (Cu (meq 100g⁻¹)), M. Manganeso (Mn (meq 100g⁻¹)), N. Zinc (Zn (meq 100g⁻¹)), O. Boro (B (meq 100g⁻¹)) Con relación a la finca (F1, F2 y F3), tipo (cultivo de cacao: SCC y sin cultivo de cacao: SWC) y profundidad (Rizosférico: Rz, 0-30 cm: D1 y 31-100 cm: D2). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayada diferentes representan diferencias entre fincas, letras mayúsculas diferentes representan diferencias entre tipo de cultivo, letras minúsculas representan diferencias entre profundidad. F1 y F2:SCC: Rz: n=3, D1: n=6, D2:n=3, SWC: D1:n=3, D2:n=1, F3: D1:n= 3, D2:n=1.

Con la finalidad de determinar si los contenidos de los elementos químicos encontrados en los suelos analizados cumplen con los requerimientos nutricionales del cultivo se realizó una aproximación en kg ha⁻¹ de los elementos nutricionales por finca usando la profundidad D1 (tabla S1). Se observó que para el caso del N estimado se calculó un contenido de 465, 324 y 616 kg ha⁻¹ para las fincas F1, F2 y F3 respectivamente, en cuanto al P se observó un contenido de 150, 30 y 280 kg ha⁻¹ y de K 140, 281 y 211 kg ha⁻¹ en las fincas F1, F2 y F3, respectivamente. El contenido de Ca, presentó valores de 4328, 721 y 1082 kg ha⁻¹ en F1, F2 y F3 respectivamente, siendo el elemento más abundante en los suelos muestreados; el Mg, presentó valores aproximados de 87,5, 109,4 y 87,5 kg ha⁻¹, para las fincas F1, F2 y F3, mientras que los microelementos como Mn y el Zn presentaron valores aproximados de 13, 9 y 5 kg ha⁻¹ y de 13, 15 y 2 kg ha⁻¹ para las fincas F1, F2 y F3 respectivamente.

1.4.2 Contenido de Cdt y Cdd en el suelo

La determinación de Cdt en todas las muestras de suelos analizadas del municipio de Yacopí, Cundinamarca fueron mayores a los niveles máximos permitido en suelos agrícolas ($>1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) (Ding et al., 2018) (Fig. 1.6). La prueba de rangos medios de Wilcoxon arrojó que la concentración de Cdt fue significativamente diferente entre los suelos de las tres fincas (F1, F2, F3) evaluadas, siendo mayor (P. valor <0.05) en los suelos de la finca F1 respecto a F3 y F2 (Fig. 1.6). Adicionalmente, para F1 el contenido de Cdt fue significativamente mayor en SCC ($9,19 \pm 5,05 \text{ mg kg}^{-1}$) que SWC ($2,25 \pm 0,16 \text{ mg kg}^{-1}$). En contraste, los suelos en la finca F2 no mostraron diferencias entre SCC y SWC, y en la finca F3, se determinó mayor contenido de Cd ($5,16 \pm 0,96 \text{ mg kg}^{-1}$) en los suelos SWC. Por otro lado, en cuanto al tipo de suelo muestreado, los suelos Rz en la finca F1 mostraron la más alta concentración de Cdt de las muestras analizadas ($14,97 \pm 5,08 \text{ mg kg}^{-1}$). Para los suelos en la F1, el Cdt presente en suelos Rz fue dos veces mayor a los suelos D1 ($5,66 \pm 2,39 \text{ mg kg}^{-1}$) y D2 ($6,94 \pm 3,02 \text{ mg kg}^{-1}$), y no se encontraron diferencias significativas en los suelos D1 y D2 en todas las fincas analizadas con (D1: $3,31 \pm 2,50 \text{ mg kg}^{-1}$; D2: $3,39 \pm 3,07 \text{ mg kg}^{-1}$) y sin cultivo de cacao (D1: $2,83 \pm 1,26 \text{ mg kg}^{-1}$; $3,32 \pm 2,19 \text{ mg kg}^{-1}$). En los suelos Rz, D1, y D2 de la finca F2 y D1 y D2 de la finca F3 el nivel de Cdt no fue estadísticamente diferente (Fig. 1.6).

El contenido de Cdd fue significativamente mayor en suelos en la finca F1 que en los suelos de F2 y F3 (Fig. 1.7). Al igual que lo reportado para el Cdt, también se encontraron mayores contenidos de Cdd en los suelos SCC en la finca F1 ($>2 \text{ mg kg}^{-1}$) y a los reportados para los suelos SWC ($<1 \text{ mg kg}^{-1}$). Adicionalmente, el suelo Rz en la finca F1 presentó el mayor contenido de Cdd encontrado en todas las muestras analizadas ($10,24 \pm 5,80 \text{ mg kg}^{-1}$) siendo hasta cinco veces mayor que el suelo asociado al cultivo colectado a diferentes profundidades (D1 y D2, en SCC). En Cdd tampoco presentó diferencias significativas entre los suelos colectados a diferentes profundidades (D1=D2) (Fig. 1.7).

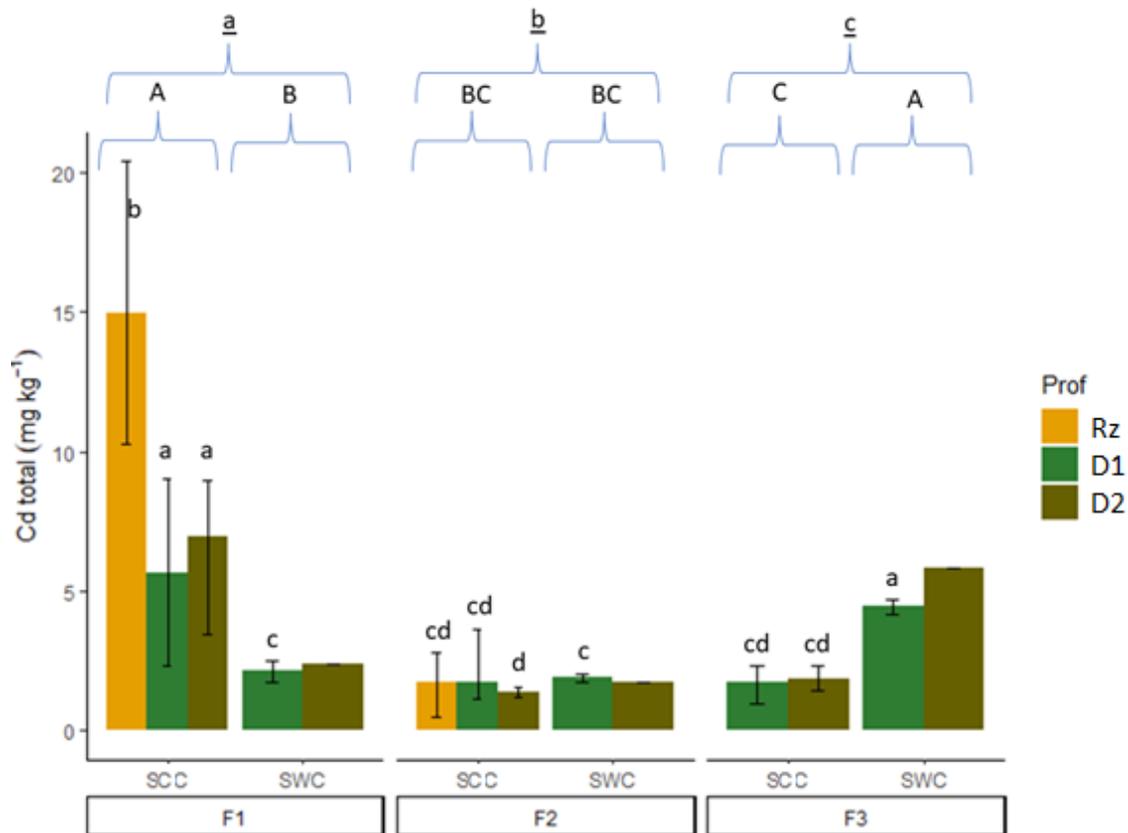


Fig. 1. 6 Contenido de Cd total (mg kg^{-1}) con relación a la finca (F1, F2 y F3), lote (cultivo de cacao: SCC y sin cultivo de cacao: SWC) y tipo y profundidad del suelo colectado (Rizosférico: Rz, 0-30 cm: D1 y 31-100 cm: D2). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P . ajustado <0.05), letras minúsculas subrayada diferentes representan diferencias entre fincas, letras mayúsculas diferentes representan diferencias entre tipo de cultivo, letras minúsculas representan diferencias entre profundidad. F1 y F2: SCC: Rz: $n=3$, D1: $n=6$, D2: $n=3$, SWC: D1: $n=3$, D2: $n=1$, F3: D1: $n=3$, D2: $n=1$.

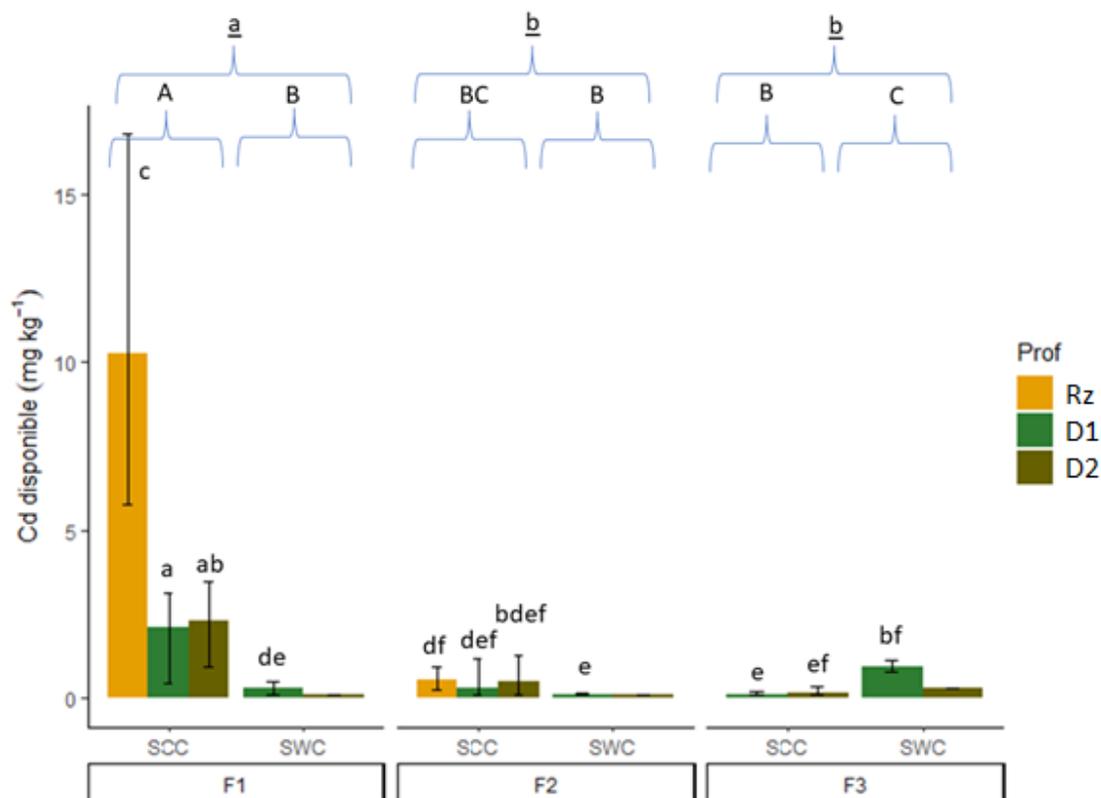


Fig. 1. 7 Contenido de Cd disponible (mg kg^{-1}) con relación a la finca (F1, F2 y F3), lote (cultivo de cacao: SCC y sin cultivo de cacao: SWC) y tipo y profundidad del suelo colectado (Rizosférico: Rz, 0-30 cm: D1 y 31-100 cm: D2). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P . ajustado <0.05), letras minúsculas subrayada diferentes representan diferencias entre fincas, letras mayúsculas diferentes representan diferencias entre tipo de cultivo, letras minúsculas representan diferencias entre profundidad. F1 y F2:SCC: Rz: $n=3$, D1: $n=6$, D2: $n=3$, SWC: D1: $n=3$, D2: $n=1$, F3: D1: $n= 3$, D2: $n=1$.

1.4.3 Correlación del Cd y variables fisicoquímicas del suelo

Con la finalidad de tener una visión global de cómo se correlaciona el Cd con respecto a las demás propiedades fisicoquímicas del suelo D1 (0-30 cm) se realizó un análisis de correlación de Spearman (Fig. 1.8). Se evidenció que el Cdt se correlacionó positivamente con el Cdd, pH, Ca, Zn, Cu (P . valor $<0,01$) y con CICE, Mn y B (P . valor $<0,05$). El pH también mostró correlación con Ca, CICE, Cu, Mn y Zn (P . valor $< 0,01$). En contraste, el Na se correlacionó negativamente con variables como arcillas, CICE, K y B, (P . valor $<0,05$). Por otro lado, las arcillas del suelo de las fincas se correlacionaron negativamente con CO, CT (P . valor $<0,01$) y con P, N, Na (P . valor $<0,05$) (Fig. 1.8). El Ca se correlacionó

con CICE, Cu, Mn (P. valor <0,01), Zn, B y N (P. valor <0,05). El P se correlacionó con N, CO y CT (P. valor <0,01).

Para obtener un análisis exploratorio de los datos que permita determinar cuál es el comportamiento del Cd con respecto a las propiedades fisicoquímicas del suelo D1, se realizó un análisis de componentes principales, PCA, por finca (Fig. 1.9). Se evidenció que en los suelos de la finca F1, el Cdt y el Cdd se agruparon con las variables pH, CICE, P, arenas, CO, CT, Zn y B (los dos componentes representaron el 62,3%) (Fig. 1.9.A). En cuanto a los suelos colectados en la finca F2, el Cdt se agrupó con el Ca, CICE, P y Mg, mientras que el CO, CT, N, Na y arenas se agruparon en el otro eje (se representó el 59,6% en dos componentes) (Fig 1.9.B). En los suelos de la finca F3, el Cdt se agrupó con el Cdd, Zn, CO, Na, arenas, Fe, CT, P, Cu, B; mientras que la CICE se agrupó con el Ca, Mg, N (63.9% de los componentes) (Fig. 1.9.C).

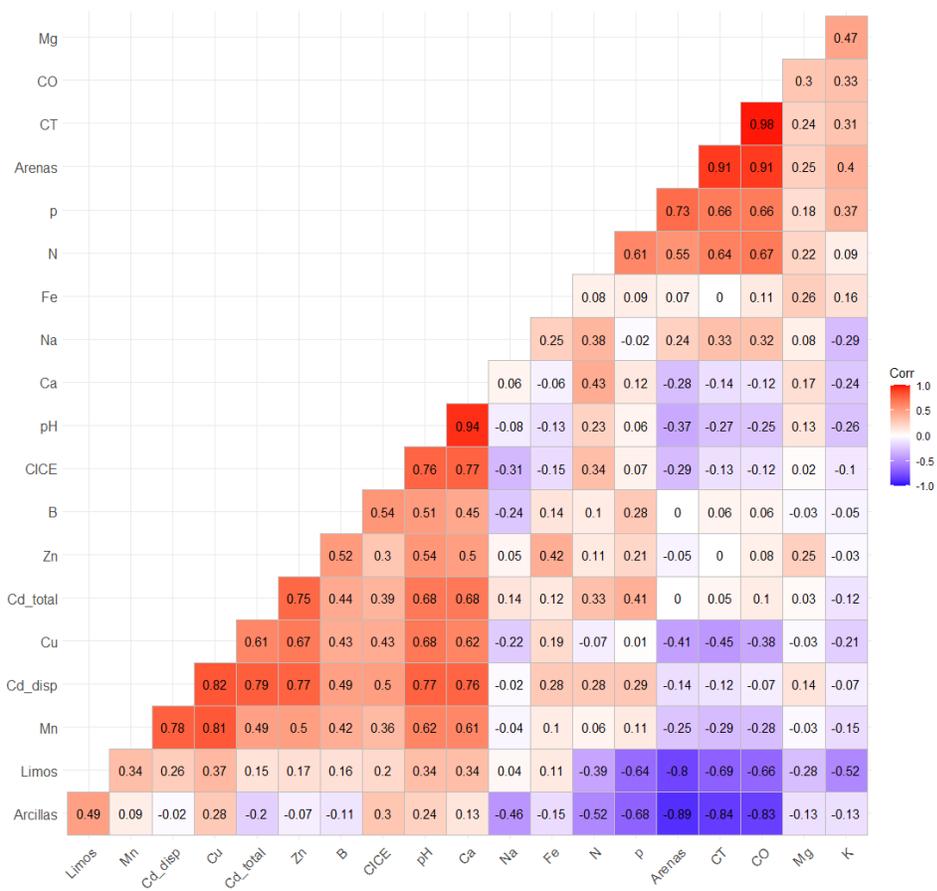


Fig. 1. 8 Gráfico de correlación de Spearman entre las propiedades fisicoquímicas de los suelos de la profundidad D1 (0 - 30 cm). Número indican coeficiente de correlación, colores rojos indican correlación positiva, color azul indica correlación negativa, intensidad indica

correlación cercana a |1|. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fósforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeseo: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. n = 20.

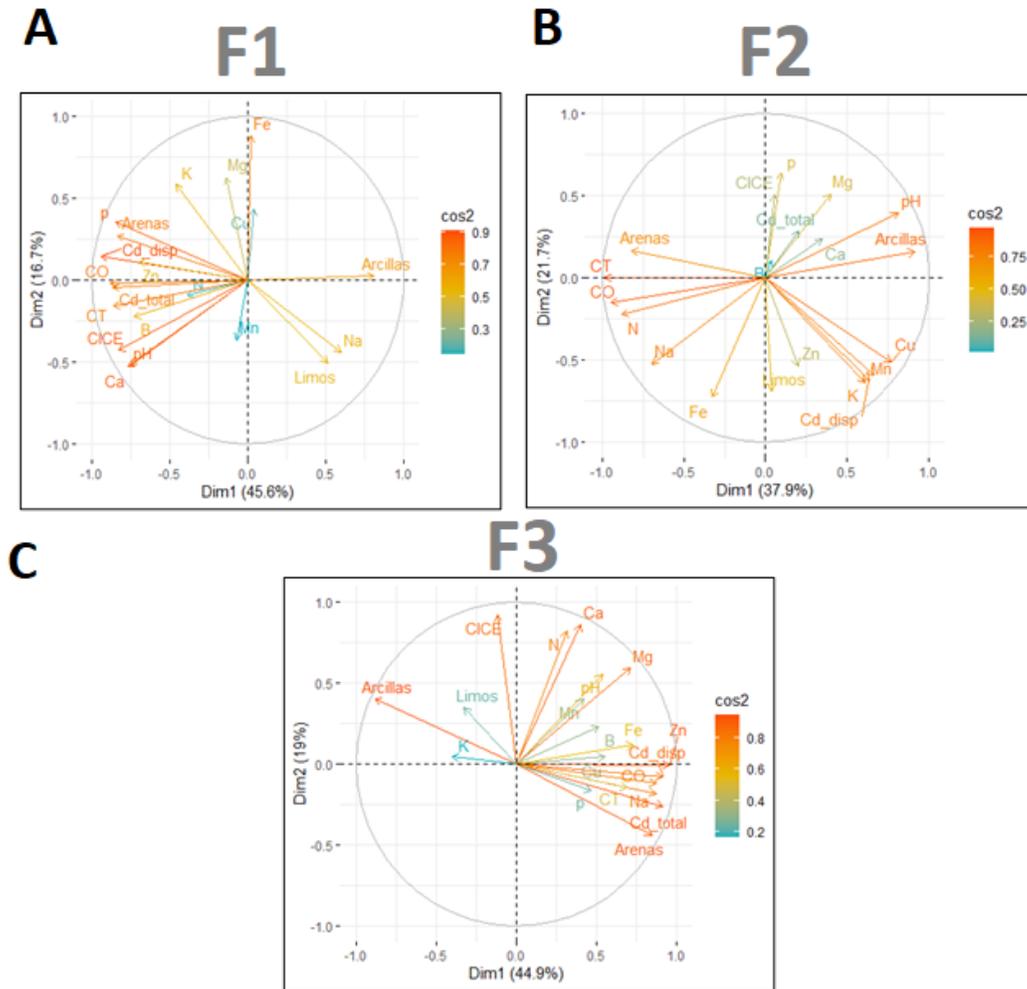
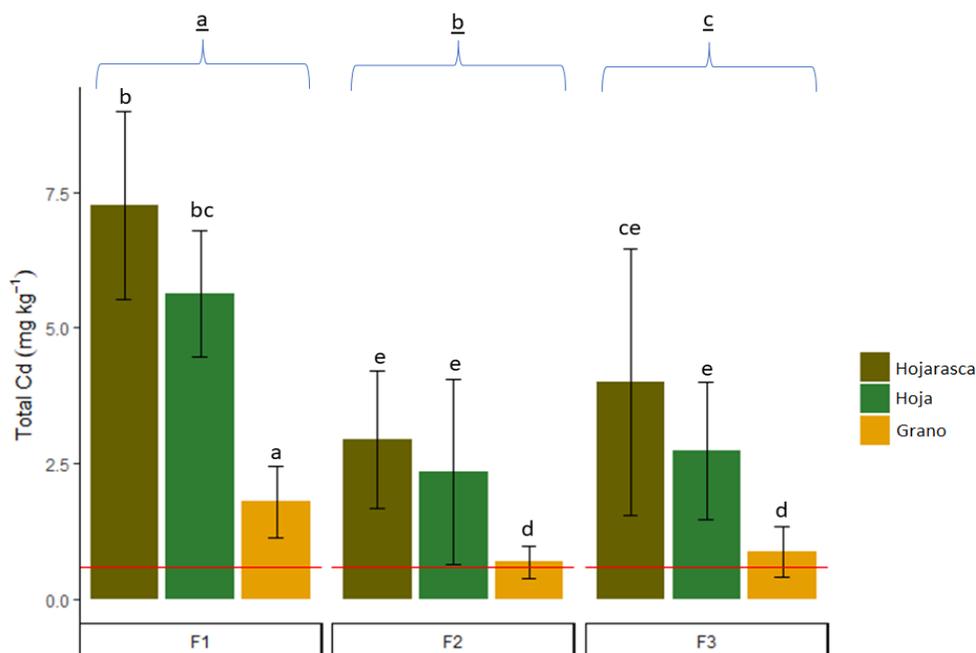


Fig. 1. 9 Gráficos biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras de suelo por finca en la profundidad D1 (0-30cm). A. Finca 1 (F1), B. Finca 2 (F2), C. Finca 3 (F3). Flechas indican peso de la contribución al componente que se direcciona, intensidad de color de azul a naranja indica valor del coseno cuadrado (\cos^2) de la variable. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fósforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeseo: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. F1:n=6, F2:n=6; F3:n=6.

1.4.4 Contenido de Cd en tejidos vegetales

Los contenidos de Cd en los tejidos muestreados (Hojarasca (HJ), Hoja fresca (HF) y grano (G)) fueron estadísticamente diferentes (Fig. 1.10.A). La finca F1 en promedio presentó la mayor bioacumulación de Cd en los tejidos vegetales ($4,89 \pm 2,63 \text{ mg kg}^{-1}$), seguido por la

finca F3 ($2,53 \pm 2,01 \text{ mg kg}^{-1}$) y la finca F2 ($1,99 \pm 1,51 \text{ mg kg}^{-1}$). Independientemente de las fincas analizadas, no se presentaron diferencias significativas entre el contenido de Cd encontrado en HJ ($1,18 - 9,86 \text{ mg kg}^{-1}$) y HF ($0,9 - 7,23 \text{ mg kg}^{-1}$); pero si en el contenido de Cd presente en G ($0,4 - 2,61 \text{ mg kg}^{-1}$). El grano presentó un 69% menos de Cd con relación a las hojas en F1, 67% en F2 y 68% en F3 (Fig. 1.10.A). En general, el contenido de Cd detectado fue $\text{HJ} > \text{HF} > \text{G}$ con un factor de transferencia (FT) de suelo a hoja de 2,32 (F1); 0,69 (F2) y 1,27 (F3), los cuales fueron tres veces mayores al FT encontrado en granos [$0,74$ (F1), $0,23$ (F2) y $0,41$ (F3)] (Fig. 1.10.B). Por otro lado, el Cd en los tejidos se correlacionó positivamente con el Cdt, Cdd y, N (P. valor $< 0,01$), pH, CICE, Ca, Na y P (P. valor $< 0,05$) del suelo D1 (Fig. 1.10.C).

A

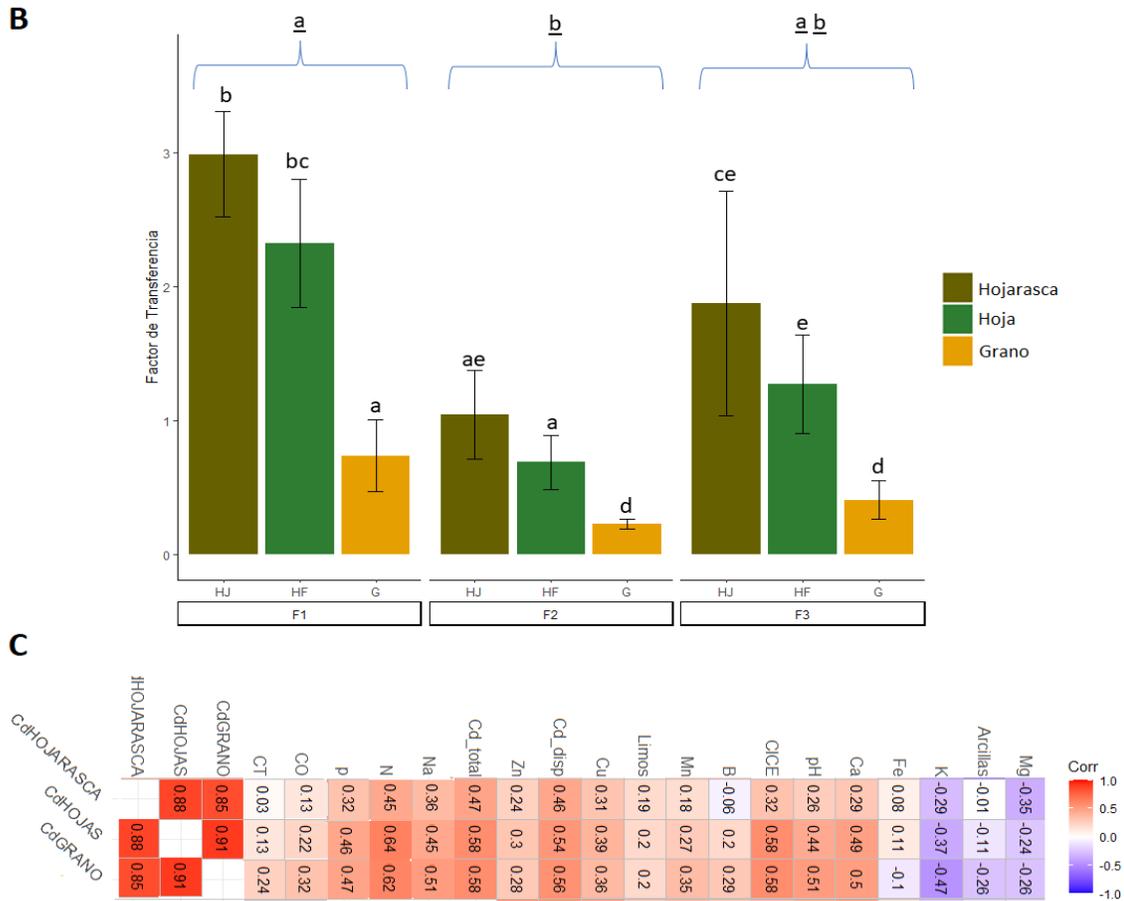


Fig. 1. 10 Cd en tejidos vegetales. A. Contenido de Cd total en tejidos (mg kg⁻¹) con relación a la finca (F1, F2 y F3), y tipo de tejido (Hojarasca, Hoja, Grano). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayadas diferentes representan diferencias entre fincas, letras minúsculas representan diferencias entre tipo de tejido. Línea roja representa el nivel máximo permitido para granos de cacao según la Comisión Europea (0,6 mg kg⁻¹) (E.C, 2021). N=6. **B.** Factor de Transferencia suelo-tejidos con relación a la finca (F1, F2 y F3) y tipo de tejidos (Hojarasca, Hoja y Grano). Las barras indican error, las letras representan los grupos formados por la prueba de Mann–Whitney–Wilcoxon (P. ajustado <0.05), letras minúsculas subrayadas diferentes representan diferencias entre fincas, letras minúsculas representan diferencias entre tipo de tejido. N=6. **C.** Gráfico de correlación de Spearman entre el tipo de tejido (grano, hoja y hojarasca) y las propiedades fisicoquímicas del suelo. Número indican coeficiente de correlación, colores rojos indican correlación positiva, color azul indica correlación negativa, intensidad indica correlación cercana a |1|. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno estimado: N, Fosforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeso: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. n=18.

1.5 Discusión

1.5.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Dentro de las propiedades físicas del suelo, la textura indica el contenido relativo de arenas, limos y arcillas, este cumple un papel importante en la disponibilidad de líquidos y gases presentes en un suelo (Rabot et al., 2018). En este estudio a pesar de que se presentaron suelos con diferentes texturas en donde predominaron los franco-arcillosos, franco-arcillo-arenosos y franco-arenosos (Fig. 1.4) todas se encuentran dentro de las categorías recomendadas para el establecimiento de cultivos de cacao (Vliet et al., 2015). Sin embargo, los suelos con cultivo de cacao (SCC), independientemente de la finca estudiada, presentaron una proporción más equilibrada de arenas, limos y arcillas que los suelos donde había sembrado pastos (SWC, F2, F3) o presencia de un bosque secundario (SWC, F1). El contar con una proporción equilibrada en el contenido relativo de arcillas, limos y arenas facilita la capacidad de retener mayor humedad en la matriz del suelo y presentar una buena proporción de espacios porosos que mejoran la aireación y de esta manera contribuir con el correcto establecimiento y desarrollo del cultivo de cacao en todas sus etapas vegetativas (Vliet et al., 2015).

En cuanto al pH, la finca F1 presentó contenidos de pH más cercanos a la neutralidad que las fincas F2 y F3. El pH es una de las propiedades más importantes que influyen en la disponibilidad de nutrientes en el suelo, a pH cercanos a la neutralidad se reporta mayor disponibilidad de elementos como N, P, K y Ca, entre otros (Fassbender & Bornemisza, 1987). En contraste a lo encontrado en la finca F1, los valores de pH en los suelos de las fincas F2 y F3 fue inferior a 5,5, mostrando pH ligeramente ácidos. De acuerdo a Libohova et al. (2020) el pH ideal para el cultivo del cacao se ubica entre 6 y 7, siendo 6,5 el pH óptimo; sin embargo, el cultivo puede desarrollarse sobre suelos con reacción ácida pH con valores cercanos a 5 e incluso en suelos alcalinos con pH entre 7 y 8. En este estudio se encontró que el 85% de los suelos muestreados tienen un pH inferior a 6,5 clasificándolos como suelos ligeramente ácidos.

En cuanto a las propiedades químicas, independientemente de los factores evaluados (finca, suelos con y sin cultivo de cacao y tipo de suelo), se encontró una alta variabilidad. Sin embargo, las propiedades químicas CO, CICE, Ca, Mg, K, Cu, B y Zn, los suelos SCC

presentaron valores más altos que en los suelos SWC, alcanzando los máximos valores en los suelos SCC de la F1. Comparando estos valores obtenidos con los requerimientos reportados para el cultivo de cacao, en etapa productiva (Thong & NG, citado por Moráis, 1988) se evidenció que el Ca y el Zn superaron los límites recomendados. Por ejemplo, en la F1 el Ca estuvo 11 (4.328 kg Ha^{-1}) y el Zn (13 kg Ha^{-1}) 8,9 veces más alto de lo recomendado para el cultivo, donde los valores corresponden a 373 y $1,5 \text{ kg ha}^{-1}$, respectivamente. Estos valores tan altos encontrados en los suelos estudiados, se podría explicar con base en la formación de los suelos de Yacopí. El Atlas Colombiano reporta que en el flanco occidental de la Cordillera Oriental de Colombia (Santander, Boyacá y Cundinamarca) se encuentran minerales principalmente lodolitas, arcillolitas y calizas de edad Cretácica, que son ricos en Zn y las calizas ricas en Ca (Mendoza et al., 2020). Sin embargo, para determinar los contenidos de manera precisa, se requeriría un estudio detallado de la mineralogía del suelo, aspecto que no hace parte del objetivo de este trabajo.

Por otro lado, con base a los tipos de suelo analizados, el suelo Rz presentó diferencias significativas en CO, CICE, Ca, Mg y fue levemente más ácido que los suelos D1 y D2. Existen reportes en los cuales se afirma que la rizosfera presenta un microambiente diferente al suelo asociado al cultivo debido a la estrecha interacción entre la raíz y los microorganismos, donde las características biológicas y químicas del suelo se ven influidas por las raíces. Donde los exudados radiculares ricos en carbono y por lo general de pH bajos afectan a la comunidad microbiana que puede hacerse más diversa, activa y sinérgica, favoreciendo la biodisponibilidad de elementos para la absorción por parte de la planta (Hakim et al., 2022).

1.5.2 Contenido de Cdt y Cdd en el suelo

Las concentraciones de Cdt encontradas en los suelos no rizosféricos estudiados a una profundidad de 0-30 cm (D1: valor mínimo de $0,96 \text{ mg kg}^{-1}$ y máximo de $9,02 \text{ mg kg}^{-1}$) se encuentran entre el rango reportado para otras regiones cacaoteras de Colombia, a esta misma profundidad (valores mínimos de $0,01$ y máximos de $27,00 \text{ mg kg}^{-1}$ (Bravo et al., 2021). Sin embargo, estos valores son superiores a los promedios de Cdt reportados por países de Latinoamérica y el Caribe, como Perú: $0,53 \text{ mg kg}^{-1}$ (Huamaní-Yupanqui et al., 2012), Ecuador: $0,44 \text{ mg kg}^{-1}$ (Argüello et al., 2019), Honduras: $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ (Gramlich et

al., 2018), $0,63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Engbersen et al., 2019), Trinidad y Tobago: $0,14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Lewis et al., 2018). A la fecha no existen reportes de Cdt a nivel Rz y a una profundidad de 31 a 100 cm para poder comparar las concentraciones obtenidas en esta investigación.

Para la zona de estudio, Yacopí-Cundinamarca, las concentraciones de Cdt reportadas en esta investigación también se encuentran entre los rangos reportado por Rodríguez Albarrcín et al. (2019) en la misma zona de estudio (D1: valor mínimo de $0,45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y máximo de $53,77 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Lo que se evidencia una alta heterogeneidad de la distribución de Cd al interior y entre las fincas muestreadas. Adicionalmente, se encontraron diferencias de valor promedio de Cdt en los suelos muestreados a dos profundidades 0 – 30 ($10,68 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} \pm 11,83$) y 61 – 100 cm ($7,92 \pm 8,09 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). A pesar de que la profundidad reportada en esta investigación es diferente (31 – 100 cm) se encontraron resultados contrastantes a lo reportado por Rodríguez Albarrcín et al. (2019) para suelos de Yacopí, y Chávez et al. (2015) para suelos ecuatorianos, ya que no se encontraron diferencias significativas entre D1 con respecto a D2 en este estudio.

La determinación del contenido de Cd a diferentes profundidades del suelo ha sido utilizada para establecer el posible origen del Cd en los suelos (Meter et al., 2019; Hou et al., 2020). Un origen geogénico implicaría mayor concentración de Cdt a una mayor profundidad, cercana al material parental (subsuelo); por el contrario, concentraciones mayores del metal a nivel superficial indicaría un origen antropogénico. Este estudio no evidenció diferencias significativas en la concentración de Cdt en los suelos D1 y D2 posiblemente a que estos suelos presentan concentración de Cd natural muy alta debido a su material parental. Esto concuerda con lo reportado en el mapa litológico de Colombia (Gómez & Montes, 2020), en donde se describe como una zona compuesta principalmente de *shales* con yeso, cherts, calizas, arenitas y fosforitas. Estas rocas han sido reportadas por tener altos contenidos Cdt mayores a $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (He et al., 2005; He et al., 2015; Kubier et al., 2019), y durante el muestreo se encontró una alta pedregosidad en el suelo incluso a nivel D1. Sin embargo, faltan estudios para determinar la dinámica del Cd a diferentes profundidades del suelo.

También se observó que los suelos Rz de finca F1, presentaron las más altas concentraciones de Cdt y Cdd de todas las muestras de suelo analizadas. Esto evidencia la estrecha interacción que se presenta entre las raíces-microorganismos-suelo que crear su propio microambiente, caracterizado por la presencia de exudados de las raíces (ácidos

orgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, polisacáridos y azúcares) (Qin et al., 2020), que pueden causar un pH más ácido (Msimbira & Smith, 2020). Los exudados de las raíces pueden secuestrar el Cd, minimizando su entrada a la planta y mejorar el transporte de nutrientes (Haider et al., 2021). Sin embargo, la disponibilidad del Cd depende de varios factores como la actividad microbiana, el genotipo de la planta y la interacción de Cd con otros parámetros fisicoquímicos del suelo.

1.5.3 Relación del Cd con las propiedades fisicoquímicas del suelo

En esta investigación para suelos no rizosféricos (D1), se encontró una correlación positiva del Cdt con el Cdd, Cu, Zn, pH, Ca. Estos resultados son similares a los reportados por Cáceres et al. (2021) y Argüello et al. (2019) en suelos cacaoteros de Colombia y Ecuador, respectivamente. La correlación positiva del Cdt y Cdd con el pH encontrada es contrastante con otros estudios donde se ha observado correlaciones negativas como los reportados Gramlich et al. (2018) y Argüello et al. (2019) para suelos cacaoteros en Bolivia y Ecuador. Pero similares a lo reportado en Colombia por Cáceres et al. (2021) en suelos del departamento de Santander. Por otro lado, el pH en suelos Rz de la finca F1 fueron más ácidos y presentaron los mayores contenidos de Cdt y Cdd de todas las muestras analizadas. Estos resultados indican que estas relaciones son dinámicas y dependen del tipo de suelo y de las propiedades fisicoquímicas de cada suelo.

Se ha considerado que el pH es uno de los factores determinantes en la disponibilidad del Cd en el suelo, puesto que este factor tiene gran influencia en la especiación del Cd (He et al., 2015). Se ha establecido que el aumento en el pH de la solución promueve la adsorción de elementos como el Cu, Zn, Co y Cd en minerales arcillosos y de la materia orgánica (Gu et al., 2010), puesto que el aumento del pH mejora la desprotonación de los grupos funcionales de la superficie en estos compuestos (Hao et al., 2018), promoviendo que el Cd^{2+} pueda participar en más sitios de intercambio de las arcillas y la materia orgánica y de esta manera competir contra otros cationes como Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} (Kirkham, 2006), aumentando su posible disponibilidad por parte de la planta y microorganismos (fase intercambiable). Esto es coherente con la correlación positiva encontrada del Cdt y Cdd con la CICE en esta investigación. Adicionalmente, estos resultados concuerdan con lo reportado por Gil et al. (2022) para fincas cacaoteras de Antioquía, Colombia.

Con base en los PCA analizados se observó que la asociatividad del Cdd con las demás propiedades fisicoquímicas evaluadas fue diferente en los suelos cacaoteros (Rz, D1 y D2) colectados en las tres fincas estudiadas (F1, F2 y F3). Los suelos en la F1 el Cdd se agrupó con el pH, CO, CICE, Ca, Mg, K, Cu, Zn al analizar el PCA. Estas variables tuvieron una mejor representación en el componente 1 (45,6% varianza). En contraste los suelos de la F2, solamente las variables K, Mn y Cu tuvieron mejor representatividad en el componente 1 (37,9% de varianza). En los suelos de F3, el Cdd mostró asociación con CO, Zn, Na, Fe, Cu y P en el componente 1 (44,9%). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de Cdd es muy heterogénea y es difícil establecer un patrón de interacción claro con las otras propiedades fisicoquímicas evaluadas. Esto concuerda con lo reportado por Correa et al. (2021), que evidenció en plantas de vivero que las relaciones entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y el Cdd son complejas, sugiriendo que características del suelo como la densidad aparente, la textura, la acidez intercambiable (AI), los contenidos de Ca, K y Fe, deben ser consideradas antes de establecer cultivos de cacao para evitar la acumulación de Cd.

La disponibilidad de Cd en el suelo depende de la interacción de múltiples factores como la variabilidad espacial, la topografía y geología del suelo, el clima, las propiedades fisicoquímicas, la actividad microbiana, el genotipo y edad del cultivo, y las prácticas agronómicas (Violante et al., 2010; Alloway, 2013). La presencia de Cdd en los suelos afecta la toma, el transporte y la utilización por lo general de cationes divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} al competir por los sitios de intercambio en el suelo y con los sistemas de transporte de entrada a la planta (Haider et al. 2021). Por otro lado, en este estudio se observó que el mayor contenido de Ca encontrado fue en suelos de la finca F1 que también presentaron mayor disponibilidad de Cd. La relación Ca y Cd no es clara en la actualidad. Algunos reportes indican que aplicar fuentes Ca pueden disminuir la disponibilidad de Cd en el suelo ya que aumenta el pH favoreciendo el acomplejamiento del Cd (Bolan et al., 2003). No obstante, es importante mencionar que el Ca en la solución también puede causar la desorción del Cd unido a las superficies de intercambio aumentando su disponibilidad en la solución del suelo (Vanderschueren et al., 2021).

1.5.4 Contenido de Cd en tejidos vegetales

Se observó que la acumulación de Cd en todas las muestras de tejido evaluado fue hojarasca (HJ) > hoja (HF) > grano (G), con factor de transferencia (FT) suelo-hoja mayores a los FT encontrados en suelo-grano. Este comportamiento coincide con lo reportado por Gramlich et al. (2017) en Bolivia, Llatance et al. (2018) en Perú, Barraza et al. (2017) en Ecuador, Rodríguez Albarracín et al. (2019) en Colombia. Por otro lado, Ramtahal et al. (2016) encontró que las concentraciones de Cd son mayores en hoja > vaina > testa > almendra. Estos resultados demuestran que las plantas de cacao tienen un enriquecimiento del metal en sus tejidos aéreos absorbiendo desde el suelo Cd incluso en trazas inferiores a $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$ (Kramer, 2010; Kaur & Garg, 2018).

La planta de cacao es considerada como una planta acumuladora de Cd porque presenta una mayor concentración de Cd en sus órganos aéreos que en la raíz, lo que concuerda con valores altos de obtenidos al calcular el factor de transferencia (FT) (suelo-hoja) con respecto a otras plantas no acumuladoras (Valdershueren, 2021). Para cacao se reportan valores FT, dependiendo del genotipo, en el rango de 3,4 a 7,1. En esta investigación, el máximo valor de FT fue 2,9, valor menor a lo reportado para cacao. Sin embargo, este valor fue mayor a lo reportado para plantas no acumuladoras como trigo (0,27), hortalizas de hoja (0,19) y centeno (0,11), entre otras (Valdershueren, 2021). En general, las plantas acumuladoras translocan y acumulan el Cd en los tejidos aéreos para reducir la toxicidad que pueda tener el Cd en los tejidos de la raíz y de esta manera no afectar su metabolismo primario (Kramer, 2010).

La distribución de metales en los tejidos de las plantas se presenta de forma heterogénea y está controlado principalmente por factores genéticos y ambientales (Pichtel et al., 2000). El Cd es absorbido por las raíces a través de los haces vasculares, sea por vía xilema asociado a los mecanismos de movilidad del Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} (Adriano, 2002; Gu et al., 2010), o por la vía floema a través de la formación de ligandos con oxígeno y azufre (Clemens et al., 2013; Qin et al., 2020). La absorción depende de la morfología de la raíz (Quezada-Hinojosa et al., 2015), la corriente de transpiración de la planta (Adriano, 2002; Gu et al., 2010) y de los procesos de asimilación y translocación de Cd (Liu et al., 2016).

El Cd es translocado y acumulado en las hojas y frutos de la planta (Schreck et al., 2014). Al concentrarse el metal en las hojas, el Cd interactúa con las proteínas a través del desplazamiento de metales estructurales como el Mg^{2+} en la Rubisco, Mn^{2+} en el complejo de flujo del oxígeno en el fotosistema II y el Ca^{2+} en la estructura de la calmodulina (Viehweger, 2014), permitiendo que más de 40% del Cd se distribuya en los tallos y hojas como sistema de detoxificación, evitando la muerte de meristemas radicales (Tian et al., 2011). La translocación y acumulación de Cd también depende de las características genéticas del material vegetal (Vanderschueren et al., 2021). Barraza et al. (2019) evaluó el comportamiento del cultivar CCN-51 y un cultivar nativo de Ecuador en suelos contaminados con Cd encontrando que posiblemente existe una relación de las características genéticas del cultivar y la presencia de Cd en los tejidos vegetales (Vanderschueren et al., 2021).

En esta investigación, se observó que el contenido de Cd en granos fue superior a $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ límite máximo permitido de acuerdo con la regulación de la Comisión Europea para granos de cacao (Chavez et al., 2015; Vanderschueren et al., 2021). Valores similares se han reportado en otras regiones productoras de cacao de Colombia como Arauca, Boyacá, Santander y Cundinamarca (Rodríguez Albarrcin et al., 2019; Bravo et al., 2021) y otros países productores de cacao de Latinoamérica y el Caribe (Vanderschueren et al., 2021). Este comportamiento de absorción y acumulación obedece a la dinámica del Cd entre la planta y el suelo que está en función del nivel de contaminación y la especie de planta (Guala et al., 2010). Adicionalmente, se encontró que existe una tendencia positiva entre el Cdt y Cdd presente en el suelo (0,58 y 0,56, respectivamente) con respecto al contenido de Cd presente en HF y en G. El coeficiente de determinación (R^2) no es alto posiblemente a que la presencia de Cd en los tejidos también se puede ver afectada por otras propiedades fisicoquímicas del suelo como N, CICE, pH y Ca, entre otras. Por otro lado, se evidenció una fuerte correlación entre el contenido de Cd en G con el encontrado en HF (0,88) y en HJ (0,85) (Fig. 1.10.C). Estos resultados son similares a los encontrados por Gil et al. (2022) donde el contenido de Cd del grano tuvo una correlación altamente significativa con el contenido de Cd de la hojarasca del suelo (0,91), y otros factores como la altitud de las fincas (-0,82) y la edad de la plantación del cultivo (-0,62).

En el cultivo de cacao la principal fuente de materia orgánica es la descomposición de la hojarasca y los residuos de cosecha (Hartemink, 2005). En esta investigación se encontraron concentraciones de Cd mayores en la hojarasca que el suelo D1 para las tres fincas estudiadas. Adicionalmente, se evidenció una tendencia positiva entre el contenido de Cd en los tejidos con el Cdt y Cdd en el suelo. El contenido de Cd en la hojarasca contribuye a la recirculación del Cd en el sistema suelo-planta, al estar sujeta a los procesos de mineralización por la actividad microbiana (Gramlich et al., 2018). Barraza et al. (2019), en suelos cacaoteros del Ecuador, reportó que el contenido de Cd en la hojarasca vuelve a ser absorbido luego de la descomposición saprófita, incrementando los niveles de Cd en el suelo a nivel superficial de 0 a 5 cm. Sin embargo, en los sistemas de cultivo de cacao la hojarasca es material vegetal de desecho que no suele ser retirada del cultivo debido al volumen de biomasa vegetal que se genera, y a las ventajas que logran con esta práctica como son la reincorporación de otros elementos distintos al Cd al suelo y el mantenimiento de una cobertura que favorece la retención de humedad y temperatura en el suelo (Giweta, 2020; Meunier et al., 2004). Por lo tanto, es indispensable brindar alternativas en las prácticas de manejo del cultivo que impidan la recirculación del metal en el sistema suelo-planta, como retirar la hojarasca del cultivo cada tres meses, realizar análisis de los fertilizantes de síntesis y orgánicos utilizados en el cultivo para verificar que no estén contaminados con Cd (Bravo et al., 2021).

1.6 Conclusiones

- La distribución del Cdt y Cdd fue heterogénea en los suelos de las fincas estudiadas, siendo mayor en los suelos de la F1 con cultivo de cacao (SCC) e independiente de las profundidades (D1 y D2) analizadas.
- Se determinó que las concentraciones de Cdt presentes en los suelos de las tres fincas cacaoteras del municipio de Yacopí, Cundinamarca fueron superiores a los niveles establecidos por las entidades regulatorias internacionales para suelos agrícolas no contaminados ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) y el contenido de Cd en granos fue superior a las concentraciones permitidas por la comunidad europea para grano seco ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$).
- Los parámetros químicos de pH, Ca, Zn, Cu, CICE, Mg del suelo SCC a una profundidad de 0 a 30 cm (D1) presentaron una correlación positiva con el Cdt y

Cdd. Sin embargo, estas correlaciones pueden cambiar en los suelos rizosféricos (Rz), y sin cultivo de cacao (SWC).

- El suelo Rz de la finca F1, presentó el mayor contenido de Cdt y Cdd, con pH ligeramente más ácido y un contenido mayor de materia orgánica y mayor CICE con respecto a todos los suelos evaluados.
- La concentración de Cd en los tejidos analizados fue mayor en la hojarasca, seguida de la hoja fresca y grano. También el contenido de hojarasca fue mayor a lo encontrado en el suelo a una profundidad de D1 (HJ>HF>G), lo que podría contribuir a la recirculación del Cd en sistema suelo-planta

1.7 Bibliografía

Adriano, D. C. (2002). Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals (2nd ed). Springer.

Alloway, B. J. (2013). Sources of heavy metals and metalloids in soils. En B. J. Alloway (Ed.), Heavy Metals in Soils (Vol. 22, pp. 11-50). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_2

Álvarez-Carrillo, F., Rojas-Molina, J., & Suárez-Salazar, J. C. (2015). Effect of organic and conventional fertilization on the growth and production of theobroma cacao l. Under an agroforestry system in rivera(Huila, colombia). Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 16(2), 307-314.

Amacher, M. C. (2018). Nickel, cadmium, and lead. En D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, & M. E. Sumner (Eds.), SSSA Book Series (pp. 739-768). Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c28>

Anyimah-Ackah, E., Ofosu, I. W., Lutterodt, H. E., & Darko, G. (2019). Exposures and risks of arsenic, cadmium, lead, and mercury in cocoa beans and cocoa-based foods: A systematic review. Food Quality and Safety, 3(1), 1-8. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy025>

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (Theobroma cacao L.) in major cacao growing regions in Peru. Science of The Total Environment, 605-606, 792-800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>

Arévalo-Hernández, C. O., Arévalo-Gardini, E., Barraza, F., Farfán, A., He, Z., & Baligar, V. C. (2021). Growth and nutritional responses of wild and domesticated cacao genotypes to soil Cd stress. Science of The Total Environment, 763, 144021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144021>

Arias Espana, V. A., Rodriguez Pinilla, A. R., Bardos, P., & Naidu, R. (2018). Contaminated land in Colombia: A critical review of current status and future approach for the management of contaminated sites. Science of The Total Environment, 618, 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.245>

Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A

nationwide survey in Ecuador. *Science of The Total Environment*, 649, 120-127.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>

Bari, M. A., Akther, M. S., Reza, M. A., & Kabir, A. H. (2019). Cadmium tolerance is associated with the root-driven coordination of cadmium sequestration, iron regulation, and ROS scavenging in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 136, 22-33.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.007>

Barraza, F., Moore, R. E. T., Rehkämper, M., Schreck, E., Lefeuvre, G., Kreissig, K., Coles, B. J., & Maurice, L. (2019). Cadmium isotope fractionation in the soil – cacao systems of Ecuador: A pilot field study. *RSC Advances*, 9(58), 34011-34022. <https://doi.org/10.1039/C9RA05516A>

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>

Bolan, N. S., Adriano, D. C., & Curtin, D. (2003). Soil acidification and liming interactions with nutrient and heavy metal transformation and bioavailability. En *Advances in Agronomy* (Vol. 78, pp. 215-272). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)78006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)78006-1)

Bravo, D., León-Moreno, C., Quiroga, R., Duarte, D., Zamora, A., Gutiérrez, E., Aristizábal, A., Arroyave, C., Cardona, L., Guerra, B., Olarte, H., Cuervo, C., Orozco, M. L., & Moreno, E. (2021). Recomendaciones mínimas para la mitigación de cadmio (Primera). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia). <https://doi.org/10.21930/agrosavia.nbook.7404555>

Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. *Agronomy*, 11(4), 761. <https://doi.org/10.3390/agr11040761>

Bravo Realpe, I. D. S., Arboleda Pardo, C. A., & Martin Peinado, F. J. (2014). Efecto de la calidad de la materia orgánica asociada con el uso y manejo de suelos en la retención de cadmio en sistemas altoandinos de Colombia. *Acta Agronómica*, 63(2), 164-174.
<https://doi.org/10.15446/acag.v63n2.39569>

Cáceres, P. F. F., Vélez, L. P., Junca, H., & Moreno-Herrera, C. X. (2021). *Theobroma cacao* L. agricultural soils with natural low and high cadmium (Cd) in Santander (Colombia), contain a persistent shared bacterial composition shaped by multiple soil variables and bacterial isolates highly resistant to Cd concentrations. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100086.
<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100086>

Chen, X. W., Wu, L., Luo, N., Mo, C. H., Wong, M. H., & Li, H. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi and the associated bacterial community influence the uptake of cadmium in rice. *Geoderma*, 337, 749-757. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.10.029>

Clemens, S., Aarts, M. G. M., Thomine, S., & Verbruggen, N. (2013). Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science*, 18(2), 92-99.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.08.003>

Commission Regulation (EU). (2021) Commission Regulation (EU) 2021/1323 of 10 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in certain foodstuffs (Text with EEA relevance). url: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2021/1323/oj>. Consultado: Diciembre, 2022.

- Consejo Municipal Yacopí - Cundinamarca. (2000). Esquema de Ordenamiento Territorial (EOT) del municipio de Yacopí, Cundinamarca: EOT Yacopí Cundinamarca 2000. url: <https://repositorioocdim.esap.edu.co/handle/123456789/19167>. Consulta: Diciembre, 2022.
- Correa, J. E., Ramírez, R., Ruíz, O., & Leiva, E. I. (2021). Effect of soil characteristics on cadmium absorption and plant growth of *Theobroma cacao* L. seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13), 5437-5445. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11192>
- Correa Alvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 63(4), 388-399. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
- Cullen, J. T., & Maldonado, M. T. (2013). Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. En A. Sigel, H. Sigel, & R. K. Sigel (Eds.), *Cadmium: From Toxicity to Essentiality* (Vol. 11, pp. 31-62). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_2
- Ding, C., Ma, Y., Li, X., Zhang, T., & Wang, X. (2018). Determination and validation of soil thresholds for cadmium based on food quality standard and health risk assessment. *Science of The Total Environment*, 619-620, 700-706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.137>
- Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4). <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of The Total Environment*, 678, 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>
- European Commission , 2021. Commission Regulation (EU) 2021/1323 of 10 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in certain foodstuffs (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union* 138, 75.
- Fassbender, H. W., & Bornemisza, E. (1987). *Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina* (2nd. rev. and enl). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), (2022), *Producción Nacional de Cacao*. url: <https://www.fedecacao.com.co/economianacional>. Consulta: Diciembre, 2022
- Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), (2015). *Guía técnica para el cultivo del Cacao* (Sexta edic, Vol. 6). Bogotá, Colombia
- FHIA. (2005). *Guía práctica. PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE CACAO POR INJERTO / Proyecto Control de la Moniliasis*. Fundación Hondureña De Investigación Agrícola
- Florida Rofner, N. (2021). Cadmium in soil and cacao beans of Peruvian and South American origin. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74(2). <https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n2.91107>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2022). *FAOSTAT statistical database*. [Rome]. Url: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Consulta: Diciembre, 2022
- Furcal Beriguete, P. (2016). Extracción de nutrientes por los frutos de cacao en dos localidades en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 113. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.23236>
- Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., & Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: A case study from Colombia.

International Journal of Environmental Science and Technology, 19(4), 2455-2476.
<https://doi.org/10.1007/s13762-021-03299-x>

Giweta, M. (2020). Role of litter production and its decomposition, and factors affecting the processes in a tropical forest ecosystem: A review. *Journal of Ecology and Environment*, 44(1), 11.
<https://doi.org/10.1186/s41610-020-0151-2>

Gleyzes, C., Tellier, S., & Astruc, M. (2002). Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: A review of sequential extraction procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(6-7), 451-467. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00603-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00603-9)

Gobernación de Cundinamarca. (2020). Plan Departamental de Extensión Agropecuaria 2020. Url: <https://www.adr.gov.co/wp-content/uploads/2021/07/PDEA-Cundinamarca.pdf>. Consulta: Diciembre, 2022

Gómez, J. & Montes, N.E., compiladores. 2020. Atlas Geológico de Colombia 2020. Escala 1:500 000. Servicio Geológico Colombiano, 26 hojas. Bogotá.

Gong, H., Rose, A. W., & Suhr, N. H. (1977). The geochemistry of cadmium in some sedimentary rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41(12), 1687-1692. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(77\)90200-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(77)90200-9)

Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of The Total Environment*, 580, 677-686.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>

Griffioen, J., & Appelo, C. A. J. (1993). Adsorption of calcium and its complexes by two sediments in calcium-hydrogen-chlorine-carbon dioxide systems. *Soil Science Society of America Journal*, 57(3), 716-722. <https://doi.org/10.2136/sssaj1993.03615995005700030015x>

Gu, X., Evans, L. J., & Barabash, S. J. (2010). Modeling the adsorption of cd (li), cu (li), ni (li), pb (li) and zn (li) onto montmorillonite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(20), 5718-5728.
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.07.016>

Guala, S. D., Vega, F. A., & Covelo, E. F. (2010). The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. *Ecological Modelling*, 221(8), 1148-1152.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.01.003>

Guo, B., Liang, Y., & Zhu, Y. (2009). Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? *Journal of Plant Physiology*, 166(1), 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.01.002>

Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>

Hakim, S., Nawaz, M. S., Siddique, M. J., Hayat, M., Gulzar, U., & Imran, A. (2022). Metagenomics for rhizosphere engineering. En *Rhizosphere Engineering* (pp. 395-416). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89973-4.00022-3>

Hartemink, A. E. (2005). Nutrient stocks, nutrient cycling, and soil changes in cocoa ecosystems: A review. En *Advances in Agronomy* (Vol. 86, pp. 227-253). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)86005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86005-5)

- Hao, W., Flynn, S. L., Alessi, D. S., & Konhauser, K. O. (2018). Change of the point of zero net proton charge (P_{hpznpc}) of clay minerals with ionic strength. *Chemical Geology*, 493, 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.06.023>
- Hao, X., Bai, L., Liu, X., Zhu, P., Liu, H., Xiao, Y., Geng, J., Liu, Q., Huang, L., & Jiang, H. (2021). Cadmium speciation distribution responses to soil properties and soil microbes of plow layer and plow pan soils in cadmium-contaminated paddy fields. *Frontiers in Microbiology*, 12, 774301. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774301>
- Hayakawa, N., Tomioka, R., & Takenaka, C. (2011). Effects of calcium on cadmium uptake and transport in the tree species *Gamblea innovans*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57(5), 691-695. <https://doi.org/10.1080/00380768.2011.608196>
- He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., & Baligar, V. C. (2015). Soil biogeochemistry, plant physiology, and phytoremediation of cadmium-contaminated soils. En *Advances in Agronomy* (Vol. 134, pp. 135-225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>
- Hernández-Núñez, H. E., Gutiérrez-Montes, I., Sánchez-Acosta, J. R., Rodríguez-Suárez, L., Gutiérrez-García, G. A., Suárez-Salazar, J. C., & Casanoves, F. (2020). Agronomic conditions of cacao cultivation: Its relationship with the capitals endowment of Colombian rural households. *Agroforestry Systems*, 94(6), 2367-2380. <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00556-9>
- Hou, D., O'Connor, D., Igalavithana, A. D., Alessi, D. S., Luo, J., Tsang, D. C. W., Sparks, D. L., Yamauchi, Y., Rinklebe, J., & Ok, Y. S. (2020). Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1(7), 366-381. <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0061-y>
- Huybrechts, M., Hendrix, S., Bertels, J., Beemster, G. T. S., Vandamme, D., & Cuypers, A. (2020). Spatial analysis of the rice leaf growth zone under controlled and cadmium-exposed conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104120. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104120>
- International Cocoa Organization (ICCO). (2022). COCOA MARKET REPORT NOVEMBER 2022. Url: <https://www.icco.org/wp-content/uploads/ICCO-Monthly-Cocoa-Market-Report-November-2022.pdf>. Consulta: Diciembre, 2022.
- Instituto Colombiano Agustín Codazzi (IGAC). (2000). CATÁLOGO DE REPRESENTACIÓN CARTOGRAFÍA BÁSICA DIGITAL IGAC ESCALA 1:2.000. url: https://www.igac.gov.co/sites/igac.gov.co/files/catalogo_representacion_2k_v1.0.pdf. Consulta: Diciembre, 2022.
- Instituto Colombiano Agustín Codazzi (IGAC). (2006). Métodos analíticos del Laboratorio de Suelos. Instituto Colombiano Agustín Codazzi. 6a edición. Bogotá Colombia.
- Jan, S., & Parray, J. A. (2016). Heavy metal uptake in plants. En S. Jan & J. A. Parray, *Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants* (pp. 1-18). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1693-6_1
- Kabata-Pendias, A. (2010). Trace elements in soils and plants (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10158>
- Kassambara, A & Mundt, F. (2020). factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>
- Kaur, H., & Garg, N. (2018). Recent perspectives on cross talk between cadmium, zinc, and arbuscular mycorrhizal fungi in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 680-693. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9750-2>

- Kirkham, M. B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137(1-2), 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024>
- Kirpichtchikova, T. A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M. A., & Jacquet, T. (2006). Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9), 2163-2190. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.02.006>
- Krämer, U. (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 517-534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
- Lewis, C., Lennon, A. M., Eudoxie, G., & Umaharan, P. (2018). Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of The Total Environment*, 640-641, 696-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
- Li, T., Liang, C., Han, X., & Yang, X. (2013). Mobilization of cadmium by dissolved organic matter in the rhizosphere of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Chemosphere*, 91(7), 970-976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.100>
- Libohova, Z., J.M. Martín-López, M. da Silva, C. Lagoueyte, J. Cruz, P. Drohan, S. Maximova, M. Guiltinan, M.G. Ferruzzi, D. Guarín, P. Reich, C. Kome, Y.P. Zapata, G. Gallego-Sánchez, C. Quintero, C. Botero, N.P. Winters, and M. Robotham. (2020). Soil and cacao genomics survey of Sierra Nevada de Santa Marta Region, Colombia. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service; International Center for Tropical Agriculture (CIAT); and Pennsylvania State University
- Liu, H., Wang, H., Ma, Y., Wang, H., & Shi, Y. (2016). Role of transpiration and metabolism in translocation and accumulation of cadmium in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Chemosphere*, 144, 1960-1965. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.093>
- Liu, Y., Alessi, D. S., Flynn, S. L., Alam, Md. S., Hao, W., Gingras, M., Zhao, H., & Konhauser, K. O. (2018). Acid-base properties of kaolinite, montmorillonite and illite at marine ionic strength. *Chemical Geology*, 483, 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.01.018>
- Liu, Y., Xiao, T., Ning, Z., Li, H., Tang, J., & Zhou, G. (2013). High cadmium concentration in soil in the Three Gorges region: Geogenic source and potential bioavailability. *Applied Geochemistry*, 37, 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2013.07.022>
- Llatance, W. O., Gonza Saavedra, C. J., Guzmán Castillo, W., & Pariente Mondragón, E. (2018). Bioacumulación de cadmio en el cacao (*Theobroma cacao*) en la Comunidad. *Revista Forestal del Perú*, 33(1), 63. <https://doi.org/10.21704/rfp.v33i1.1156>
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., Li, R., & Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>
- Mary Ugwu, I., & Anthony Igbokwe, O. (2019). Sorption of heavy metals on clay minerals and oxides: A review. En S. Edebalí (Ed.), *Advanced Sorption Process Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80989>
- McLaughlin, M. J., Smolders, E., Zhao, F. J., Grant, C., & Montalvo, D. (2021). Managing cadmium in agricultural systems. En *Advances in Agronomy* (Vol. 166, pp. 1-129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.10.004>

- Mendoza, O. H., Portilla, K. A., Pérez, A., Castellanos, F. y Orejuela, C.J., (2020). Cadmio-(Cd) En: Atlas Geoquímico de Colombia, versión 2020, Bogotá: Servicio Geológico Colombiano.
- Meter, A., Atkinson, R. J., & Laliberte, B. (2019). Cadmium in Cacao From Latin America and The Caribbean. A Review of Research and Potential Mitigation Solutions. Caracas: CAF. Retrieved from <http://scioteca.caf.com/handle/123456789/1506>
- Meunier, N., Blais, J.-F., & Tyagi, R. D. (2004). Removal of heavy metals from acid soil leachate using cocoa shells in a batch counter-current sorption process. *Hydrometallurgy*, 73(3-4), 225-235. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2003.10.011>
- Minasny, B., & McBratney, A. B. (2006). A conditioned Latin hypercube method for sampling in the presence of ancillary information. *Computers & Geosciences*, 32(9), 1378-1388. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2005.12.009>
- Ministerio de Agricultura (MINAGRICULTURA). (2021). CADENA DE CACAO Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales Marzo 2021. Url: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>. Consulta: Diciembre, 2022.
- Morais, F. (1985). Sistema de Producao do cacauero na Amazonia brasileira. Belém, Pará, Bra.: CEPLAC.
- Naeem, A., Zafar, M., Khalid, H., Zia-ur-Rehman, M., Ahmad, Z., Ayub, M. A., & Farooq Qayyum, M. (2019). Cadmium-induced imbalance in nutrient and water uptake by plants. En *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 299-326). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00012-7>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Ogunlade, M. O., Oluyole, K. A., & Aikpokpodion, P. O. (2009). An evaluation of the level of fertilizer utilization for cocoa production in nigeria. *Journal of Human Ecology*, 25(3), 175-178. <https://doi.org/10.1080/09709274.2009.11906152>
- Oliva, M., Rubio, K., Epquin, M., Marlo, G., & Leiva, S. (2020). Cadmium uptake in native cacao trees in agricultural lands of bagua, peru. *Agronomy*, 10(10), 1551. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101551>
- Oliveira, B. R. M., de Almeida, A.-A. F., Santos, N. de A., & Pirovani, C. P. (2022). Tolerance strategies and factors that influence the cadmium uptake by cacao tree. *Scientia Horticulturae*, 293, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110733>
- Pabón, M., & Pabón, M. (2016). Caracterizacion socio-económica y productiva del cultivo de cacao en el departamento de santander (Colombia). <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.239289>
- Pichtel, J., Kuroiwa, K., & Sawyerr, H. T. (2000). Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution*, 110(1), 171-178. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00272-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00272-9)
- Qin, S., Liu, H., Nie, Z., Rengel, Z., Gao, W., Li, C., & Zhao, P. (2020). Toxicity of cadmium and its competition with mineral nutrients for uptake by plants: A review. *Pedosphere*, 30(2), 168-180. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60002-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60002-9)
- Qiu, M., Yuan, C., & Yin, G. (2020). Effect of terrain gradient on cadmium accumulation in soils. *Geoderma*, 375, 114501. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114501>

Quezada-Hinojosa, R. P., Föllmi, K. B., Verrecchia, E., Adatte, T., & Matera, V. (2015). Speciation and multivariable analyses of geogenic cadmium in soils at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *CATENA*, 125, 10-32. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.10.003>

Ramtahal, G., Yen, I. C., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., Maharaj, K., & Harrynanan, L. (2016). Relationships between cadmium in tissues of cacao trees and soils in plantations of trinidad and tobago. *Food and Nutrition Sciences*, 07(01), 37-43. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.71005>

Rizvi, A., Zaidi, A., Ameen, F., Ahmed, B., AlKahtani, M. D. F., & Khan, Mohd. S. (2020). Heavy metal induced stress on wheat: Phytotoxicity and microbiological management. *RSC Advances*, 10(63), 38379-38403. <https://doi.org/10.1039/D0RA05610C>

Rodríguez Albarrcín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>

Romero-Estévez, D., Yáñez-Jácome, G. S., Dazzini Langdon, M., Simbaña-Farinango, K., Rebolledo Monsalve, E., Durán Cobo, G., & Navarrete, H. (2020). An overview of cadmium, chromium, and lead content in bivalves consumed by the community of santa rosa island (Ecuador) and its health risk assessment. *Frontiers in Environmental Science*, 8, 134. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00134>

Rosales Huamani, J. A., Centeno Rojas, L., Cajacuri Perez, J. R., Breña Ore, J., & Chávez Chapana, C. (2021). Identificación de Cadmio y Plomo en los cultivos de Cacao ubicados en la zona de Satipo—Junín. *TECNIA*, 21(2). <https://doi.org/10.21754/tecnia.v21i2.1062>

Schreck, E., Dappe, V., Sarret, G., Sobanska, S., Nowak, D., Nowak, J., Stefaniak, E. A., Magnin, V., Ranieri, V., & Dumat, C. (2014). Foliar or root exposures to smelter particles: Consequences for lead compartmentalization and speciation in plant leaves. *Science of The Total Environment*, 476-477, 667-676. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.089>

Schwartz, M. O. (2000). Cadmium in zinc deposits: Economic geology of a polluting element. *International Geology Review*, 42(5), 445-469. <https://doi.org/10.1080/00206810009465091>

Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Antunes, P. M. C. (2016). Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. En P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 241* (Vol. 241, pp. 73-137). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/398_2016_8

Suárez Salazar, J. C., Ngo Bieng, M. A., Melgarejo, L. M., Di Rienzo, J. A., & Casanoves, F. (2018). First typology of cacao (*Theobroma cacao* L.) systems in Colombian Amazonia, based on tree species richness, canopy structure and light availability. *PLOS ONE*, 13(2), e0191003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191003>

Taiyun, W & Viliam, S. (2021). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>

Takamatsu, R., Asakura, K., Chun, W.-J., Miyazaki, T., & Nakano, M. (2006). Exafs studies about the sorption of cadmium ions on montmorillonite. *Chemistry Letters*, 35(2), 224-225. <https://doi.org/10.1246/cl.2006.224>

Tian, S., Lu, L., Labavitch, J., Yang, X., He, Z., Hu, H., Sarangi, R., Newville, M., Comisso, J., & Brown, P. (2011). Cellular sequestration of cadmium in the hyperaccumulator plant species *sedum alfredii*. *Plant Physiology*, 157(4), 1914-1925. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183947>

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2002) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 5th Edition, Washington DC, EPA-821-R-02-012.

Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of The Total Environment*, 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>

Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>

Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A. G., & Pigna, M. (2010). Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100005>

Vliet, J. A. van, Vliet, J. A. van, & Giller, K. (2015). Mineral nutrition of cocoa: A review. Wageningen UR.

Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V. R., Taylor, A. J., Engeseth, N., & Margenot, A. J. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *PLOS ONE*, 17(2), e0261989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261989>

Wang, S., & Mulligan, C. N. (2006). Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater. *Environmental Geochemistry and Health*, 28(3), 197-214. <https://doi.org/10.1007/s10653-005-9032-y>

Welch, R. M., & Norvell, W. A. (1999). Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. En M. J. McLaughlin & B. R. Singh (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants* (pp. 125-150). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_6

Wu, H., Wen, Q., Hu, L., & Gong, M. (2018). Effect of adsorbate concentration to adsorbent dosage ratio on the sorption of heavy metals on soils. *Journal of Environmental Engineering*, 144(2), 04017094. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001306](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001306)

Yi, Z., Lehto, N. J., Robinson, B. H., & Cavanagh, J.-A. E. (2020). Environmental and edaphic factors affecting soil cadmium uptake by spinach, potatoes, onion and wheat. *Science of The Total Environment*, 713, 136694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136694>

Zhang, H., Chen, J., Zhu, L., Yang, G., & Li, D. (2014). Transfer of cadmium from soil to vegetable in the pearl river delta area, south china. *PLoS ONE*, 9(9), e108572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108572>

2. Capítulo 2: Diversidad estructural de la comunidad fúngica presente en suelos rizosféricos y no rizosféricos asociados al cultivo de cacao del municipio de Yacopí – Cund / con diferentes concentraciones de Cd

2.1 Resumen

La presencia de cadmio (Cd) en un agroecosistema altera no solo las plantas sino también el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, afectando los sistemas agrícolas. Los hongos se destacan como microorganismos biorremediadores de suelos debido a los mecanismos de tolerancia que presentan para vivir en suelos contaminados con metales pesados. Sin embargo, a la fecha son muy pocos los reportes asociados al efecto del Cd sobre la comunidad fúngica presente en suelos bajo cultivo de cacao. El objetivo de este capítulo fue caracterizar la riqueza y abundancia relativa de las comunidades fúngicas presentes en suelos rizosférico (Rz) y no Rz en tres fincas con diferentes concentraciones de Cd. Para ello, se seleccionaron tres fincas cacaoteras (F1, F2 y F3) del municipio de Yacopí-Cundinamarca, con diferentes concentraciones de Cd (F1 > 5,0 mg kg⁻¹; F2 y F3 < 2 mg kg⁻¹) y en cada finca se seleccionaron dos lotes, uno con cultivo de cacao (SCC) y otro sin cultivo de cacao (SWC). En el lote SCC, se seleccionaron en tres ventanas de observación, y cada una se colectó suelo Rz y no Rz a dos profundidades (D1:0-30 cm, D2:30-100 cm) y para el lote SWC se colectó suelo no Rz a dos profundidades (D1:0-30 cm, D2:30-100 cm) en tres ventanas de observación. En total se obtuvieron 36 muestras para realizar la extracción de ADN microbiano del suelo mediante el Kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen). El ADN extraído se limpió con perlas de inmovilización reversible en fase sólida y se amplificó el marcador molecular ITS2 del gen rARN. Las librerías obtenidas fueron secuenciadas mediante la plataforma Miseq v3 de Illumina. Se calcularon los

índices de diversidad alfa y beta utilizando el pipeline Qiime2, se asignaron grupos taxonómicos con respecto a la base de datos UNITE-v8.3 y se determinó la abundancia diferencial utilizando EdgeR y Aldex2. Se identificaron un total de 16.589 ASVs. Los resultados muestran que los índices de diversidad alfa no presentaron diferencias significativas en los factores analizados, finca (F1, F2 y F3), tipo de cultivo (SCC y SWC) y tipo de suelo analizado (Rz y no Rz: D1 y D2), lo que indica que todas las muestras presentaron una riqueza, abundancia relativa de ASVs y uniformidad. Sin embargo, se presentó mayor riqueza y abundancia en los suelos SCC que en los SWC. Por otro lado, los índices diversidad beta mostraron que existe una diferenciación de los ASVs presentes en las fincas evaluadas, siendo la finca F1 más distantes a las fincas F2 y F3, mostrando que la estructura de la comunidad fúngica presente en los suelos de la finca F1, que presenta mayor contenido de Cd, es diferente a las encontradas en las fincas F2 y F3 con menor contenido de Cd. Adicionalmente, los ASVs presentes en los suelos SCC de la F1 fueron diferentes a los ASVs presentes en suelos SWC. Adicionalmente, los suelos de la finca F1 se encontró mayor riqueza de ASVs únicos comparados con los suelos de las fincas F2 y F3. Adicionalmente, los ASVs del suelo Rz de la F1 fue mayor que lo encontrado en los suelos no Rz. Por otro lado, el suelo con cultivo presentó mayor ASVs. También se encontró que *Ascomycota* fue el phylum más abundante con el 68% seguido de *Basidiomycota* con 25%, donde se destacan los órdenes Hypocreales, Pleosporales y Capnodiales. Por otro lado, los análisis de abundancia diferencial mostraron 51 (EdgeR) y 16 géneros (Aldex2) que podrían presentar tolerancia al Cd presentes en suelos cacaoteros de los cuales se destacan los géneros *Hypoxylon*, *Microdochium*, *Xylaria* y la familia *Nectricaceae*, taxones que también han sido reportados como tolerantes a metales pesados. Estos resultados contribuyen al estudio y búsqueda de grupos taxonómicos tolerantes a altas concentraciones de Cd que contribuyan a la micorremediación de suelos contaminados por metales pesados.

2.2 Introducción

El Cadmio (Cd) es un metal pesado que tiene efectos adversos en los seres vivos y representa una amenaza tanto para la vida como para el medio ambiente debido a su alta toxicidad (Chávez et al.,2015). Este metal se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, su presencia en suelos agrícolas y las plantas puede causar afectaciones sobre la inocuidad y el suministro de alimentos poniendo en riesgo la seguridad alimentaria

(Wang et al., 2021). El origen del Cd en suelos agrícolas puede deberse a factores geogénicos o antropogénicos. En el suelo la presencia de Cd es el resultado de múltiples factores entre los que se encuentran, la composición del material parental del suelo, y sus propiedades fisicoquímicas, la disponibilidad del Cd en la fracción intercambiable y soluble del suelo, el uso de fertilizantes y la incorporación de enmiendas, así como el genotipo del material vegetal, entre otros (Vanderschueren., 2021). La presencia del Cd ha sido reportada en algunos productos cosechados de cultivos, como los cereales, tubérculos y frutas (Haider et al., 2021), y en granos de cacao y los productos derivados del chocolate (Abt et al., 2018).

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie importante a nivel mundial como fuente de materia prima para la elaboración de productos derivados, como el chocolate (Gutiérrez-Macías et al., 2021). En Colombia, debido a las condiciones agroecológicas que posee el país son favorables para el desarrollo del cultivo en los últimos años, ha venido incrementando las áreas de producción del cultivo en 422 municipios de 27 departamentos del país, siendo Santander el principal productor (40,6%, de la producción nacional), seguido por Arauca (11,4%), Antioquia (9,6%), Tolima (5,8%), Huila (51%), Nariño (5%) y Cundinamarca (3%); y que para el 2021 se reportó una producción de 69.040 toneladas de las cuales 11.040 se exportaron (FEDECACAO, 2022). Adicionalmente, el cacao colombiano es reconocido en los mercados internacionales por su alta calidad organoléptica, lo cual lo ha posicionado en los mercados internacionales (Chaves-López et al., 2014; Barrientos et al., 2019). Sin embargo, el potencial de exportación se ha visto amenazado debido a la presencia de Cd en los granos y productos derivados, en niveles superiores a los máximos permisibles por la comunidad europea (0.1 – 0.8 mg Kg⁻¹) (Meter et al., 2019). La presencia de Cd en el grano se debe a la facilidad que tiene la planta de cacao de absorber, translocar y acumular este metal en sus órganos aéreos (Wade et al., 2022). Existen reportes que demuestran que hay una correlación positiva del Cdt y Cdd que se encuentra en el suelo con la concentración de Cd presente en los granos de cacao (Chávez et al., 2015; Meter et al., 2019); esta correlación depende de múltiples factores como el genotipo de la planta, el origen y propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. De acuerdo con la Unión Europea un suelo se considera contaminado con Cd cuando se reporta niveles de Cd total superiores a 0,5 - 1,5 mg kg⁻¹ dependiendo el pH (Ding et al., 2018). Concentraciones de Cd total naturales mayores a este valor se han reportado para suelos en Colombia (Rodríguez et al., 2019) y otros países productores de

cacao de América Central y del Sur, como Honduras, Ecuador, Perú y Brasil (Oliveira et al., 2022). Por lo tanto, esta contaminación representa uno de los mayores desafíos para Colombia y otros países latinoamericanos productores de cacao de América Central y del Sur (Arévalo-Gardini et al. 2017; Gramlich et al. 2018; Argüello et al. 2019; Oliveira et al., 2022), por lo cual se requiere de estrategias para mitigar la toma de Cd por parte de la planta de cacao.

Entre las estrategias reportadas minimizar la absorción de Cd por la planta se encuentran, el uso de genotipos de baja acumulación (Arévalo-Hernández et al., 2021), la remoción de la hojarasca y residuos vegetales que están contaminados con Cd y recirculan el metal en el sistema suelo-planta (Bravo et al., 2021), la incorporación de enmiendas al suelo que alteran las características del suelo con materiales calcáreos (CaCO_3 , CaO , Ca(OH)_2 , dolomitas [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$], yesos (Vanderschueren et al., 2021) o carbón vegetal (biochar) biocarbones (Ramtahal et al., 2019); y el aumentar la fertilización de la planta (Meter et al., 2019). También se ha planteado hacer uso de microorganismos a través de bioproductos o bioinoculaciones desarrollados a partir de bacterias tolerantes al Cd que aprovechan los mecanismos de tolerancia que tienen (biosorción, biolixiviación, biotransformación, biodegradación, quimisorción y bioacumulación) (Bravo & Braissant, 2022). Sin embargo, la formulación, aplicación y efectividad de estos productos puede ser de difícil implementación debido a la sensibilidad de las bacterias a las condiciones ambientales de los sitios de aplicación (Abatenh et al., 2017).

A pesar de la función relevante que cumplen los microorganismos en el suelo en los procesos de biorremediación del suelo y en el ciclaje de nutrientes, son pocos los reportes que estudian el efecto que podría tener el Cd en la estructura y función de la comunidad microbiana que habita en los suelos cacaoteros y cómo esta comunidad afecta a su vez la disponibilidad del metal (Liu et al., 2020). Los microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa para minimizar los efectos tóxicos de los metales pesados (Mohammadian Fazli et al., 2015; Abbas et al., 2018; Nyika, 2021) de manera diferencial, por lo cual, la presencia del metal pesado afecta la composición y estructura de la comunidad microbiana, donde las más adaptadas son capaces de sobrevivir. Los cambios que ocurren a nivel poblacional pueden determinarse a través de los índices de diversidad (Boros-Lajszner et al., 2021).

Los índices de diversidad permiten estimar la diversidad biológica en cualquiera de sus diferentes niveles (diversidad genética, de especies y de ecosistemas). La diversidad está constituida por el número total de especies diferentes presentes en un ecosistema (riqueza) y la distribución de los individuos entre estas especies (uniformidad) (Willis, 2019). Para el estudio de la diversidad se han propuesto tres enfoques: (i) La diversidad alfa (α) que consiste en determinar la diversidad de especies dentro de un hábitat e involucra la riqueza y la uniformidad. Existen varios índices para su determinación, como el recuento de especies únicas presentes en la muestra (Observed features) (riqueza), o los que contemplan las abundancias que depende de la riqueza y uniformidad, como el índice de Shannon, que consiste en la probabilidad de seleccionar una especie entre la población, este da mayor importancia a la riqueza, altos valores de Shannon significan alta diversidad; y el índice de Simpson que consiste en la probabilidad de seleccionar dos individuos de una misma especie y da mayor importancia a la uniformidad, altos valores del índice significan dominancia de una o unas pocas especies (Kim et al., 2017), a su vez se han propuesto enfoques como el índice de Gini-Simpon (1 - Simpson) para evaluar la uniformidad (Guiasu & Guiasu, 2010). También existen enfoques basados en la extrapolación para medir la diversidad alfa, como la rarefacción, que consiste en aproximar el número de especies en una muestra aleatoria de individuos tomados de una colección de muestras (Kim et al., 2017). (ii) La diversidad beta (β) la cual permite evaluar la diferencia en la composición de especies entre hábitats o comunidades que se encuentran espacialmente distanciadas, esta se puede calcular a través de la diferencia total en la abundancia de especies entre dos sitios, dividido para la abundancia total en cada sitio (Distancia de Bray-Curtis) y (iii) La diversidad gamma (γ) la cual representa la riqueza total de especies a nivel de paisaje y se involucra la diversidad alfa y beta (Ramette, 2007; Walters & Martiny, 2020).

La comprensión y conocimiento de la diversidad biológica de los suelos cacaoteros aún es limitada, a pesar de la gran diversidad de comunidades microbianas presentes y la contribución que tienen en el ciclaje de nutrientes y en la fertilidad del suelo (de Menezes et al., 2015). El estudio de estas comunidades se puede realizar usando un enfoque tradicional que implica el aislamiento y cultivo de microorganismos, que desconoce el 99% de los microorganismos presentes en el ambiente y que no son cultivables (Handelsman et al., 1998), y mediante metodologías no dependientes de cultivo. Esta última ha permitido conocer la diversidad de los microbiomas presentes en distintos ambientes usando

tecnologías de secuenciamiento de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) (Kant et al., 2020). Se ha establecido desde la era de las ómicas que el reino fungí comprende entre 11,7 y 13,2 millones de especies, donde actualmente se cuenta con un número de taxones descritos formalmente de aproximadamente 150.000 especies (Phukhamsakda et al., 2022), esta gran diversidad causa que se deban adoptar estrategias de identificación eficientes conforme se desarrollan tecnologías de investigación (Hu et al., 2022).

Para el análisis de microbiomas es esencial la obtención de ADN de calidad, el ADN debe estar íntegro y libre de contaminantes de proteínas (relación 260/280, entre 1,8 a 2,2) o de carbohidratos u otros compuestos (260/230, entre 1,8 a 2,2) y sea amplificable. La obtención de ADN de calidad de muestras de suelo depende de múltiples factores, como la distribución heterogénea de células microbianas dentro de los agregados del suelo, la interacción de las partículas del suelo, como la arcilla con el ADN (Schneegurt et al., 2003), la alta presencia de cationes divalentes que actúan como puentes de unión entre los grupos fosfato del ADN y con los aniones de silicatos de los minerales (Lorenz & Wackernagel, 1994; Kamble & Singh, 2020) que pueden ocurrir durante los procesos de homogeneización de las muestras de suelo durante la lisis celular (Wang et al., 2009). Adicionalmente, el ADN extraído del suelo puede estar contaminado por ácidos húmicos y fúlvicos que tienen propiedades químicas similares a las del ADN, y que son fuertes inhibidores de las reacciones enzimáticas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Wang et al., 2011).

Para el estudio de ecología y la identificación taxonómica de los hongos presentes en un microbioma usando técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) se han desarrollado metodologías como la metataxonómica que se basa en el secuenciamiento de la amplificación de un marcador molecular como la región espaciadora transcrito interno ribosómico nuclear (ITS, por sus siglas en inglés) del gen rARN. Esta región está constituida por las regiones ITS1 e ITS2 que se encuentran separadas por el gen 5.8S, y está situada entre los genes 18S (SSU) y 28S (LSU) del gen rARN y su longitud oscila entre 450 y 800 pb. Debido a su alto grado de variación en su secuencia, a los múltiples sitios de copia en el genoma y a su pequeño tamaño que facilita su secuenciación (Tedersoo et al., 2022) hace de la región ITS una herramienta de estudio rápida y relativamente sencilla frente a otros procesos bioinformáticos (Donovan et al., 2018). Las aproximaciones taxonómicas se realizan a partir del alineamiento de las secuencias del

amplicón obtenidas con las secuencias presentes en las bases de datos como Genbank y UNITE (Nilsson et al., 2019). El procesamiento bioinformático de los datos de secuenciación de ITS está basado en la reconstrucción de secuencias biológicas exactas presentes en la muestra, llamadas variantes de secuencia del amplicón (ASV, por sus siglas en inglés) (Callahan et al., 2017). Inicialmente se debe hacer un control de calidad de las secuencias y limpieza antes de hacer la reconstrucción de ASVs, para ello, usualmente se utilizan programas como FastQC (Andrews, 2009) o MultiQC (Ewels et al., 2016) para el control de calidad, y Trimmomatic (Bolger et al., 2014) para remover las lecturas de baja calidad y adaptadores de secuenciación. Posteriormente, se utilizan flujos de trabajo o tuberías, como Qiime2 (Bolyen et al., 2018), Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), MicrobiomeAnalys (Chong et al., 2020), Microeco (Liu et al., 2021), que se basan en la construcción de una matriz de frecuencia de ASVs. El uso de estas tuberías permite realizar análisis rápidos y determinar índices de diversidad alfa, beta, realizar la reconstrucción filogenética y el análisis de abundancia diferencial y de coocurrencia, entre otros (Estaki et al., 2020).

Los estudios reportados sobre el efecto del Cd en la comunidad microbiana de suelos cacaoteros son pocos y se han centrado en el aislamiento, cultivo e identificación de cepas bacterianas presentes en suelos cacaoteros tolerantes a Cd. Por ejemplo, se han realizado estudios aislando bacterias con alto Cd natural de los departamentos de Arauca, Boyacá, Santander (Bravo et al., 2018; Feria-Cáceres et al., 2022) y Cundinamarca (Córdoba-Novoa et al., 2022); y unos pocos usando técnicas independientes de cultivo para suelos cacaoteros del departamento de Santander (Cáceres et al., 2021). La comunidad fúngica, ha sido aún menos explorada, a pesar de que ésta al igual que las bacterias cumplen un papel importante en el ciclaje de nutrientes, en los procesos de biorremediación y en la respuesta rápida a cambios ambientales. Los hongos, por ser organismos eucariontes, exhiben mecanismos diferentes de tolerancia y supervivencia a concentraciones más elevadas de Cd (Mohammadian Fazli., 2015). Adicionalmente, tienen mayor área de acción debido a que establecen redes miceliales a través de sus hifas que colonizan el suelo y pueden desencadenar respuestas de defensa en las plantas que les permite tolerar diferentes tipos de estrés (Zeilinger et al., 2015). Para Colombia, se han identificado hongos cultivables tolerantes a Cd en suelos cacaoteros de Santander (Guerra Sierra et al., 2022); también se ha determinado el efecto del Cd en hongos formadores de micorrizas arbusculares presentes en suelos cacaoteros del municipio de Yacopí (Sandoval Pineda

et al., 2020). Sin embargo, a la fecha se desconoce el empleo de técnicas de secuenciación masiva que puedan brindar más información de las comunidades fúngicas que habitan estos ecosistemas cacaoteros contaminados con Cd natural. Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar la diversidad estructural de las comunidades fúngicas presentes en suelos cacaoteros del municipio de Yacopí-Cundinamarca con diferentes concentraciones de Cd natural con la finalidad de conocer el efecto del Cd en la estructura y diversidad de los microbiomas fúngicos presentes en estos suelos.

2.3 Materiales y Métodos

2.3.1 Sitio de la investigación y muestreo

El sitio de investigación se describe en el numeral 1.3.1 del capítulo 1 de este documento. En cada finca se seleccionaron dos lotes, uno con cultivo de cacao (SCC) y el otro sin cultivo de cacao (SWC) (para la finca F1 era una zona de relictos de bosque y en la finca F2 y F3 zonas de pastizales). Luego, se identificaron 3 ventanas de observación para cada lote SCC y SWC de cada finca y se realizó el muestreo como se describe en el numeral 1.3.2 del capítulo 1. En total se colectaron 36 muestras (24 para SCC y 12 para SWC para las fincas F1 y F2, para la finca F3 no se tomaron muestras de suelos Rz). Cada muestra de suelo se tamizó en campo con un tamiz de 2 mm y se almacenó 40 g en tubos Falcon de 50 ml que fueron transportados en neveras con placas de hielo laboratorio de Agrobiodiversidad de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia - Bogotá donde se almacenaron a -80°C hasta su uso

2.3.2 Extracción de ADN y secuenciación

La extracción de ADN se llevó a cabo usando 250 mg de suelo y utilizando el kit Dneasy PowerSoil ProKit (Qiagen., Inc, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó una limpieza con perlas de inmovilización reversible en fase sólida [SPRI beads, por sus siglas en inglés (Sera-Mag magnetic beads (Cytiva, Washington, USA)] a una concentración de 3X, siguiendo la metodología propuesta por Quail et al. (2009). La calidad del ADN total extraído se determinó utilizando NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, EE. UU), la integridad con electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (p/v) a 80 V y la concentración con Qubit 2.0 (Invitrogen, EE. UU). El ADN extraído se usó para amplificar la región ITS2 usando los

cebadores ITS3-KYO2 e ITS4-KYO3 (Toju et al., 2012), en total se elaboraron 36 librerías siguiendo la metodología propuesta por (Faith et al., 2013), en donde se realizan dos ciclos de PCR. La primera PCR se basó en el uso de cebadores ITS3-KYO2 e ITS4-KYO3 que contenían nucleótidos adicionales que sirvieron como sitio de unión (aproximadamente 430 pb) a un segundo grupo de cebadores que se usó para la segunda PCR. Este segundo grupo de cebadores contenían las secuencias de multiplexado y adaptadoras a la placa de secuenciamiento (aproximadamente 530 pb) (Tabla S.2).

La primera PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25 μ l (2,5 μ l de buffer-Mg 10X, 1,5 μ l de $MgSO_4$ 50 mM, 0,2 μ l de dNTPs 25 mM (SMOBIO Techonlogy Inc, Taiwan), 0,5 μ l (10 μ M) de cada uno de los cebadores, 0,1 μ l de Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.), 2 μ l (25 ng) de muestra de ADN y 18,20 μ l de agua destilada ultrapura (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 60 segundos y 72°C durante 90 segundos, terminando con un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR se usó como plantilla para la segunda amplificación (2,5 μ l de buffer 10X, 1,5 μ l de $MgSO_4$ 50 mM, 0,5 μ l de dNTP mix 25 mM (SMOBIO Techonlogy Inc, Taiwan.), 1 μ l (10 μ M) de cada cebador, 0.1 μ l Platinum™ Taq DNA Polimerasa High Fidelity (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.), 5 μ l del producto de PCR y 13,40 μ l de agua destilada ultrapura (Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 12 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 60 segundos y 72°C durante 90 segundos, terminando con un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos obtenidos se limpiaron con perlas de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI beads, por sus siglas en inglés (Sera-Mag magnetic beads (Cytiva, Washington, USA)) a una concentración de 1,5X, posteriormente se cuantificó la concentración usando Qubit 2.0 (Invitrogen) y se realizó un análisis de fragmentos de las librerías usando un analizador de fragmentos de High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent, USA).

Las librerías obtenidas para la secuenciación se mezclaron con una proporción de una librería de ADN phiX v3 (control) de la misma concentración y se secuenció usando la plataforma MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) utilizando una placa MiSeq v3 (600 ciclos, 2 x 300 sentido pareado) siguiendo las indicaciones del fabricante. El proceso de

extracción de ADN y preparación de las librerías se realizaron en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá y la secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana de la Universidad El Bosque (UGRA).

2.3.3 Procesamiento de secuencias y análisis estadístico

Para los datos de secuenciación el control de calidad, y la limpieza de adaptadores se llevaron a cabo utilizando el software FastQC (Andrews, 2010) y Trimmomatic (Bolger et al., 2014) respectivamente. Luego utilizando el pipeline de QIIME2 (v2021.11) (Bolyen et al., 2018) se filtró por calidad, se removieron las secuencias quiméricas y se hizo la determinación de ASV (Secuencia Variante de amplicon, por sus siglas en inglés) con DADA2 (Callahan et al., 2016). Posteriormente se hizo la asignación taxonomía utilizando la base de datos UNITE (v8.3) (Nilsson et al., 2019) con el plugin q2-feature-classifier usando el método de Naive Bayes.

Se determinaron los índices alfa (Observed features, índice de Shannon e Índice inverso de Simpson: Gini-Simpson) y se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (p. valor <0,05) para determinar diferencias a nivel de muestras y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PcoA) a partir de la matriz de disimilitud de Bray-Curtis entre las muestras en QIIME2 (v2021.11). Los análisis de abundancia se realizaron usando las librerías Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) y Metacoder (Foster et al., 2017) usando los artefactos generados por QIIME2. Se construyó un árbol de calor de abundancia basado en la asignación taxonómica a nivel orden usando los algoritmos de Davidson-Harel y Reingold-Tilford. Para la matriz de árboles de calor se usó la abundancia a nivel finca y se realizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon seguido de una corrección de Benjamini-Hochberg (P. valor<0,05) para probar las diferencias entre las abundancias medias de las muestras de los órdenes identificados.

Para determinar la abundancia diferencial de géneros entre la F1 y F2 con los recuentos de abundancias observadas se usó un modelo de distribución binomial negativa, usando la librería edgeR (Robinson et al., 2010) y un modelo multinomial de Dirichlet para inferir abundancia a partir de conteos, usando la librería Aldex2 (Fernandes et al., 2014), usando un valor de cambio de 2 y P. valor<0,01 y P. valor<0,05, respectivamente. El análisis discriminante lineal - tamaño del efecto (LEfSe, por sus siglas en inglés) se realizó a nivel

género entre las fincas (F1, F2, F3), el cultivo y las muestras, SCC (Rz, D1, D2) y SWC (D1) y un P. valor de corte de 0,01 usando la librería de R MicrobiomeAnalyst (Chong et al., 2020).

Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el software R Studio 2022.07.1 (R versión 4.1.3).

2.4 Resultados

2.4.1 Extracción de ADN, amplificación, preparación de librerías metataxómicas y secuenciamiento

La extracción de ADN se realizó a partir de las 36 muestras de suelos obtenidas en este estudio. En promedio la concentración de ADN fue de 122,21 ng μL^{-1} con rangos entre 20,1 - 295,8 ng μL^{-1} y relaciones de absorbancia promedio de 1,86 (260/280) y 1,49 (260/230) (Tabla S.3). 25 de las 36 librerías presentaron relaciones de absorbancia 260/230 inferiores a 1,80, por lo cual se realizó limpieza con perlas de inmovilización reversible en fase sólida a una concentración de 3X, en el que se obtuvo una pérdida promedio del 19% de la concentración de ADN (80,78 ng μL^{-1}), pero con relaciones de absorbancia 260/230 mayores, con un promedio de 2,14 siendo todas las muestras de ADN superiores a 1,8, mientras que la relación 260/280 no cambiaron, con un promedio 1,86.

De 36 muestras de ADN, 32 amplificaron el marcador ITS2 con el tamaño de banda esperado tanto en el PCR1 y PCR2. (Fig.2.1). Las muestras que no amplificaron corresponden a las tres réplicas biológicas de la muestra, F3:SWC:D1 y una muestra F3:SCC:D2. Con la finalidad de verificar el tamaño de los fragmentos esperados, se tomó al azar las muestras F2:SCC:Rz:R2, F3:SCC:D1:R1, F2:SWC:D1:R2, F2:SWC:D2:R1, y se corrieron en un analizador de fragmentos, confirmando el tamaño esperado y calidad de las muestras para realizar las librerías metagenómicas a secuenciar usando la plataforma Illumina (Tabla S.4).



Fig. 2. 1 Amplificación y construcción de librerías de la región ITS2 del gen rARN en muestras de suelo. A. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de la amplificación de la región ITS2 para las librerías realizadas. Tamaño de la banda esperada: 430-450 pb. B. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de la librería elaborada ITS2 + región adaptadora. Tamaño de la banda esperada: 530-550 pb. F1: finca F1, F2: Finca F2, F3: Finca F3; SCC: suelo con cultivo de cacao, SWC: suelo sin cultivo de cacao; Rz: Rizosférico, D1: suelo profundidad 0-30 cm, D2: suelo profundidad 31-100 cm. número al final representan repetición.

Después de la secuenciación se obtuvo un total de 9.951.114 lecturas por sentido (forward y reverse), luego de remover las secuencias adaptadoras y de baja calidad, se obtuvo un total de 5.468.682 lecturas con una media de 165.718 lecturas por muestra (Tabla S.4) y una longitud entre 280 y 300 pb. Para identificar el número de variantes de secuencia del amplicón (ASVs, por sus siglas en inglés) se realizó la filtración con DADA2 y se obtuvo un

total de 2.653.275 lecturas con una media de 80.402 con máximo de 218.792 y mínimo de 28.235 en 60.558 ASVs, observándose un coeficiente de variación del 45% de las lecturas no quiméricas (ASV) (Tabla S.5). En promedio se filtró el 62% de las lecturas de entrada variando entre el 24 y el 80% (Fig. 2.2.A). Las curvas de rarefacción mostraron que la secuenciación fue suficiente para identificar la diversidad fúngica presente en las muestras, a excepción de la muestra F1:SWC:D2 la riqueza de observaciones fue superior a 400 alcanzando un máximo de 1.515 observaciones (Fig. 2.3).

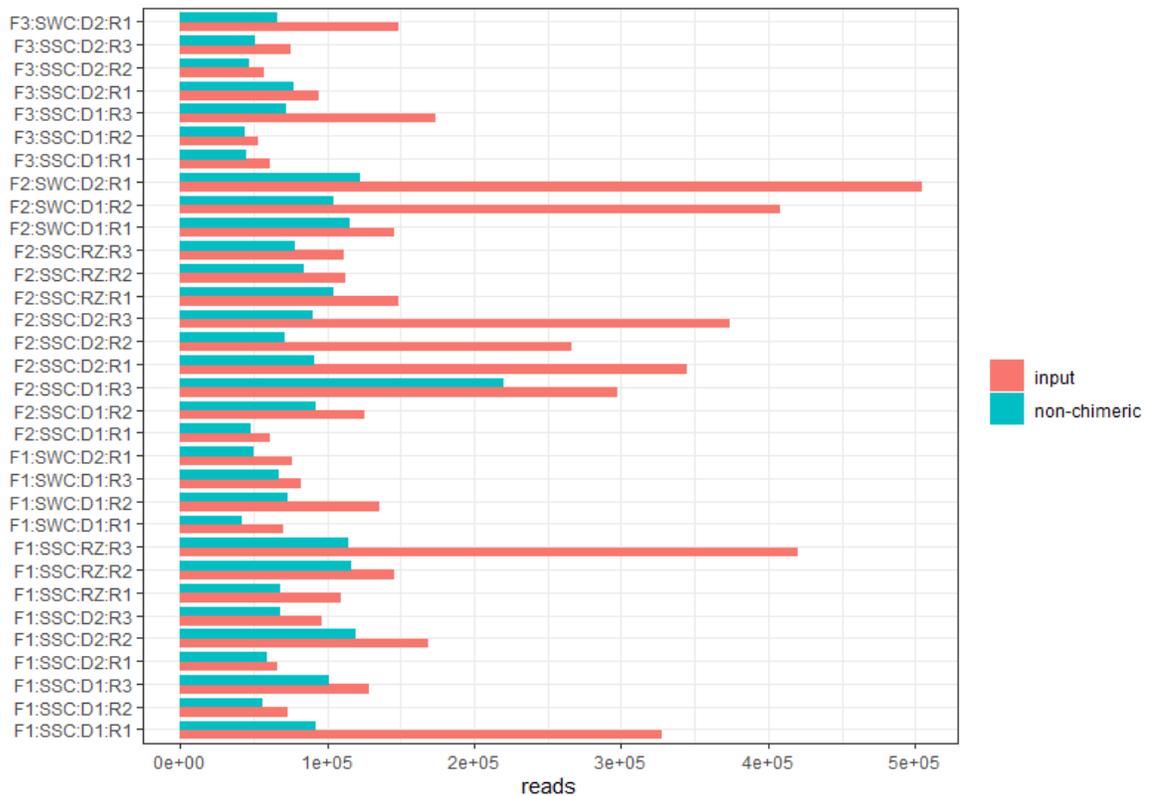


Fig. 2. 2 Recuento de las lecturas de secuenciamiento de cada una de las muestras después de la limpieza con Trimmomatic (rojo) y lecturas no quiméricas (ASVs) después de filtrado con DADA2 (azul). F: finca (F1, F2, F3); SCC: Suelo con Cultivo de Cacao, SWC: Suelo sin Cultivo de Cacao; Rz: Rizosférico, D1: Profundidad 0-30cm, D2: Profundidad de 31-100 cm; R: Repetición (R1, R2, R3).

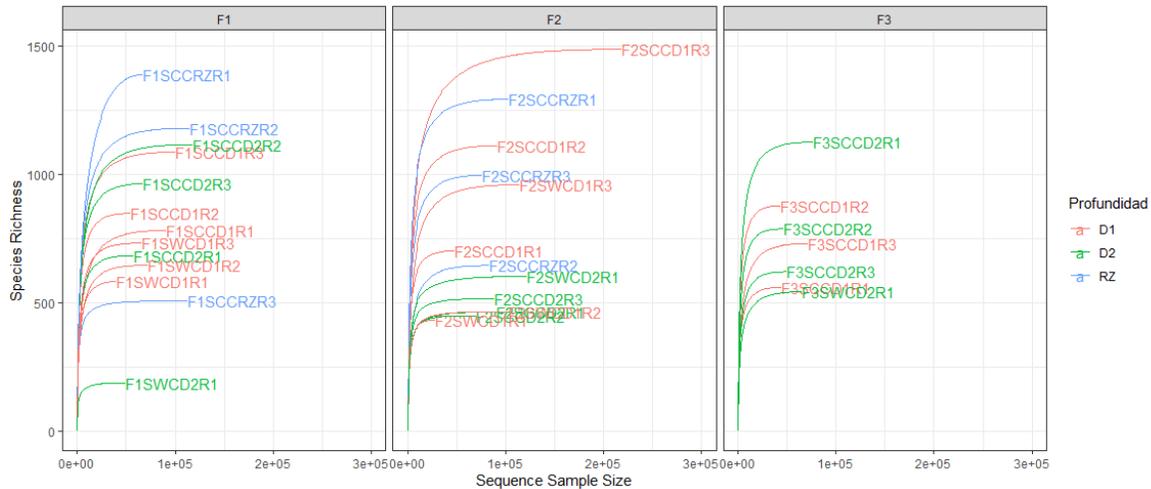


Fig. 2. 3 Curvas de rarefacción de la riqueza de ASVs discriminadas por finca (F1, F2, F3), líneas representan cada muestra, colores indican profundidad (rojo: D1, verde: D2, azul: Rz). F: finca (F1, F2, F3); SCC: Suelo con Cultivo de Cacao, SWC: Suelo sin Cultivo de Cacao; Rz: Rizosférico, D1: Profundidad 0-30cm, D2: Profundidad de 31-100 cm; R: Repetición (R1, R2, R3).

2.4.2 Estructura de la comunidad fúngica presente en los suelos colectados

Para conocer qué tan diversa era la población fúngica presente en cada suelo colectado (diversidad alfa), en términos de riqueza y uniformidad, se determinaron los índices de riqueza (Observed features), abundancia relativa (Shannon) y la uniformidad (Gini-Simpson), para cada uno de los factores evaluados: finca (F), lote con y sin cultivo de cacao (SCC y SWC, respectivamente) y tipo de suelo estudiado (Rz, D1 y D2) (Fig. 2.4).

Los resultados obtenidos después de aplicar la prueba de Kruskal-Wallis para cada uno de los índices evaluados no presentaron diferencias estadísticas a un P. valor $< 0,05$ [p. valor = 0,7385 (riqueza); 0,085 (Shannon); y 0,2429 (Gini-Simpson)] (Fig. 2.4.A). El indicador de riqueza (*Observed features*) varió entre 358 y 1515, mostrando una tendencia a presentar mayores conteos en suelos SCC de las fincas F1 y F2 que en los suelos SWC. En contraste, los suelos SCC en la finca F3 presentaron menores observaciones que en las fincas F1 y F2. El índice de Shannon como estimador de la abundancia varió entre 5,59 y 8,70 y presentó una ligera tendencia a ser mayor en SCC. Estos resultados se corroboraron con la estimación del Gini-Simpson, en cual varió entre 0,92 y 0,98, mostrando que la comunidad presente en cada una de las muestras se encuentra uniformemente distribuida y no hay una dominancia de algunos taxones.

La diversidad beta permite determinar el cambio en composición de especies entre sitios o el grado de diferenciación que se presenta entre comunidades (Ramette, 2007). En esta investigación se calculó la matriz de disimilitud de Bray-Curtis para identificar el agrupamiento diferencial entre los factores estudiados a través de un análisis de coordenadas principales (PcoA). Se observó que entre las muestras se alcanzó una representación del 21,4% en el componente 1, 15,9% en el componente 2 y 8,4% en el componente 3 (Fig. 2.4.B). Los resultados mostraron agrupación por fincas, donde los suelos de las fincas F2 y la F3 son más similares entre sí que los suelos presentes en la finca F1 (PERMANOVA: R2: 0,200 P. valor < 0,001). Adicionalmente, para la finca F1 se observó que las muestras de suelo con cacao (SCC) se separaron de las muestras de suelo sin cultivo de cacao (SWC) formando dos conglomerados, contrario a lo observado en las fincas F2 y F3. En la finca F2 a diferencia de la finca F1, en los suelos SCC Rz y D1 se separaron del D2 (Fig. 2.4.B).

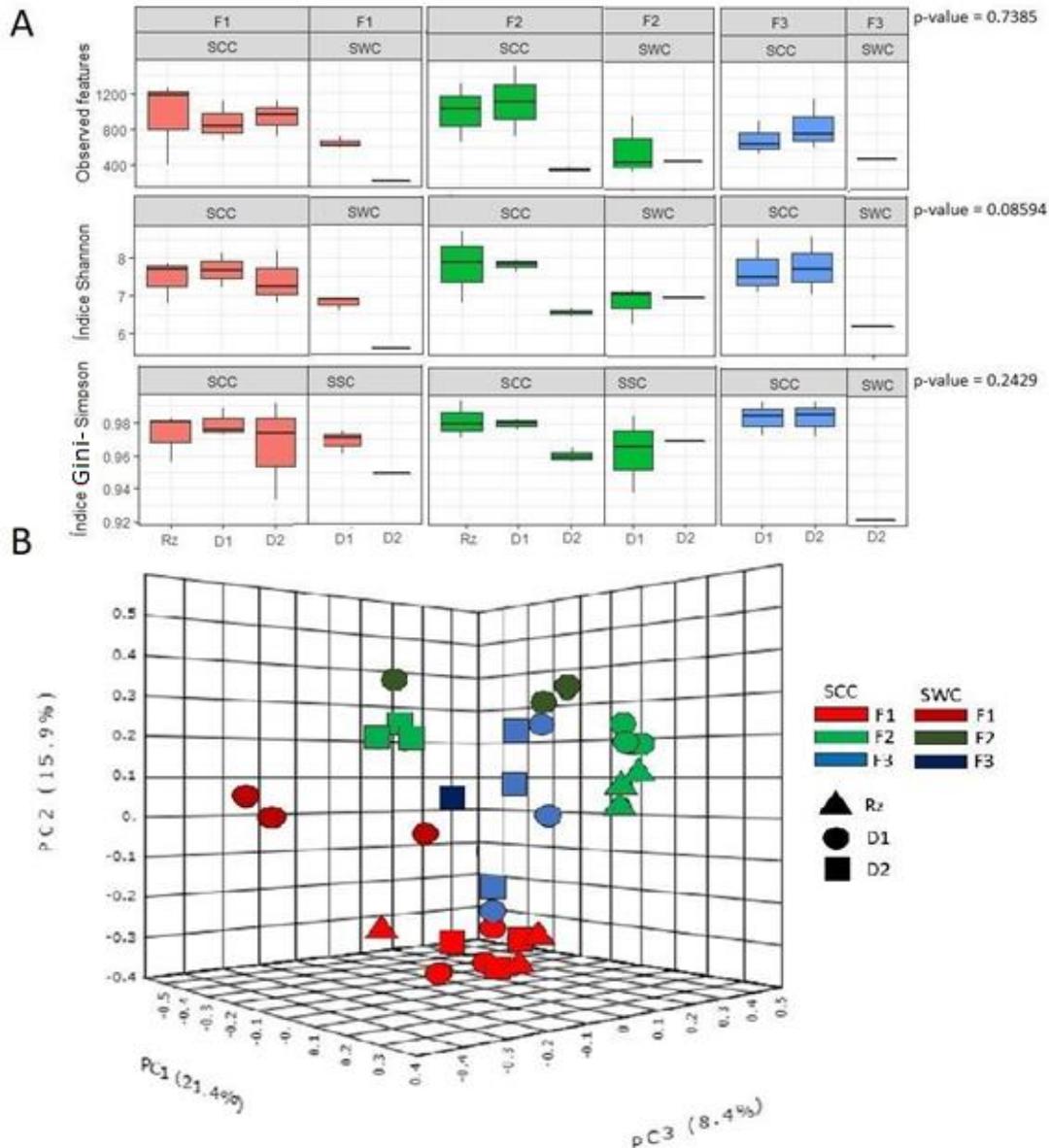


Fig. 2. 4 Análisis y diversidad de la comunidad fúngica presente en suelos con y sin cultivo de cacao (SCC y SWC, respectivamente) a diferentes profundidades D1: 0- 30 cm y D2: 31-100 cm) y suelo rizosférico (Rz) de plantas de cacao en las tres fincas seleccionadas. **A.** Índices de diversidad alfa. P. valores de la prueba de Kruskal-Wallis por índice se muestran, (n=3). **B.** Diversidad Beta, PCoA basado en la matriz de distancia de Bray-Curtis, las varianzas en los ejes de ordenación se muestran en los tres ejes en paréntesis. Las fincas F1, F2 y F3 se muestran en colores rojo, verde, azul respectivamente, las muestras de suelo Rz, D1 y D2 se muestran como triángulos, círculos y cuadrados respectivamente.

Para determinar el grado de disimilitud entre comunidades presentes en los suelos evaluados se elaboraron diagramas de venn usando ASVs identificados en cada factor evaluado (Fig. 2.5). Se observó que de los 16.589 ASVs reconstruidos por DADA2 439 se

comparten entre las tres fincas (Fig. 2.5.A), y 1.438 se comparten en al menos dos de las fincas y 6.097 en la finca F1, presentado el valor más alto. Al realizar la comparación entre muestras SCC y SWC el 8% se comparte entre ambas muestras, encontrando también mayor número de ASVs en SCC (Fig. 2.5.B). También se elaboraron por finca y SCC, diagramas de venn para la Finca F1 (Fig. 2.5.C) y F2 (Fig. 2.5.D), en la finca F1 se observó el mayor número de ASVs se presentó en D1 (3.494) > Rz (2.791) > D2 (2.299), 382 ASVs se compartieron en el suelo Rz, D1 y D2, mientras que 1.467 se compartieron entre D1 y D2, el mayor número de ASVs únicos se presentó en el suelo rizosférico (2.028), seguido de D1 (1.489). En la finca F2, se presentó el mismo comportamiento en ASVs presentados D1 (2.735) > Rz (2.399) > D2 (1.253); 70 ASVs se compartieron entre los tres tipos de suelo, 643 entre D1 y D2, el mayor número de ASVs únicos por tipo de muestra se presentó en D1 (1.997), seguido por Rz (1.656).

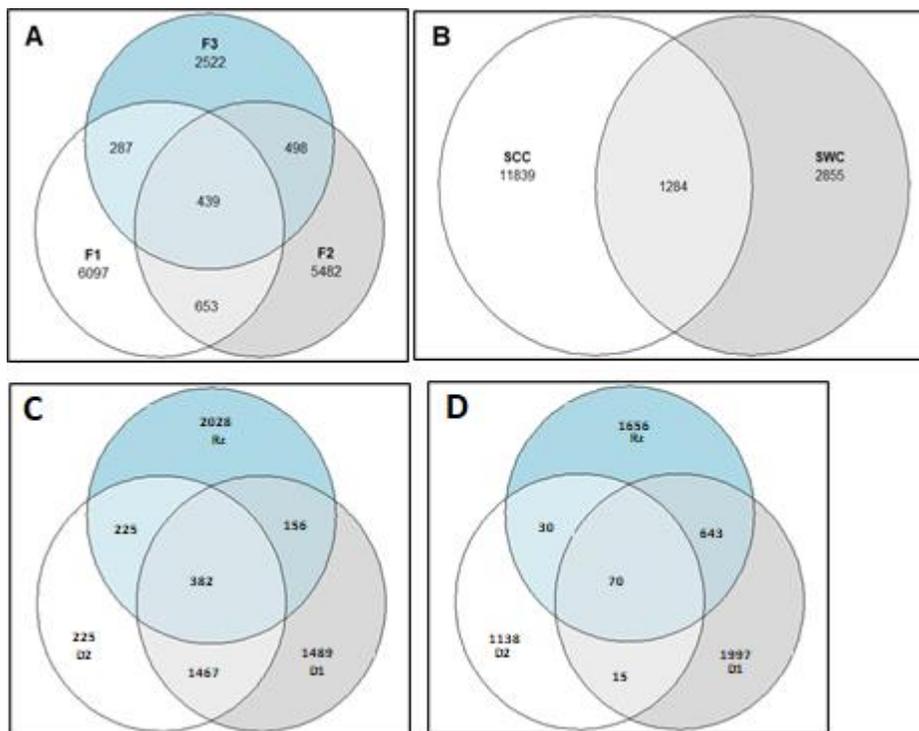


Fig. 2. 5 A. Diagramas de venn de los ASVs agrupando por finca (F1, F2, F3). B. Diagramas de venn de los ASVs agrupando por tipo de cultivo (SCC: Suelo cultivo cacao, SWC: Suelo sin cultivo cacao). C. Diagramas de venn de los ASVs agrupados por tipo de suelo (Rz: Rizosférico, D1: 0-30 cm, D2: 31-100 cm) en la finca F1. D. Diagramas de venn de los ASVs agrupados por tipo de suelo (Rz: Rizosférico, D1: 0-30 cm, D2: 31-100 cm) en la finca F2.

2.4.3 Asignación taxonómica y abundancia relativa

Con la finalidad de realizar la identificación taxonómica a nivel global de las comunidades fúngicas presentes en las muestras de suelo colectadas se usó la base de datos de UNITE ver 8.3 (Abarenkov et al., 2021), donde se asignaron 16.589 ASVs en 2.028.684 lecturas (secuencias no quiméricas) obtenidas. Distribuyéndose 2.123 a nivel especie, 546 género, 541 familia, 876 orden, 619 clase, 973 phylum y el restante, 10.319, se asignó únicamente a nivel reino (Fig. 2.6). Adicionalmente, se realizó un análisis de prevalencia de los taxones identificados a nivel phylum con relación a los conteos obtenidos (abundancia relativa). Se encontró que los phylum de mayor abundancia pertenecen al phylum *Ascomycota* (68%) y, *Basidiomycota* (25%), mientras los phylum *Chytridiomycota*, *Entorrhizomycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota* y *Rozellomycota* presentaron una abundancia menor al 5% (Fig. 2.7.).

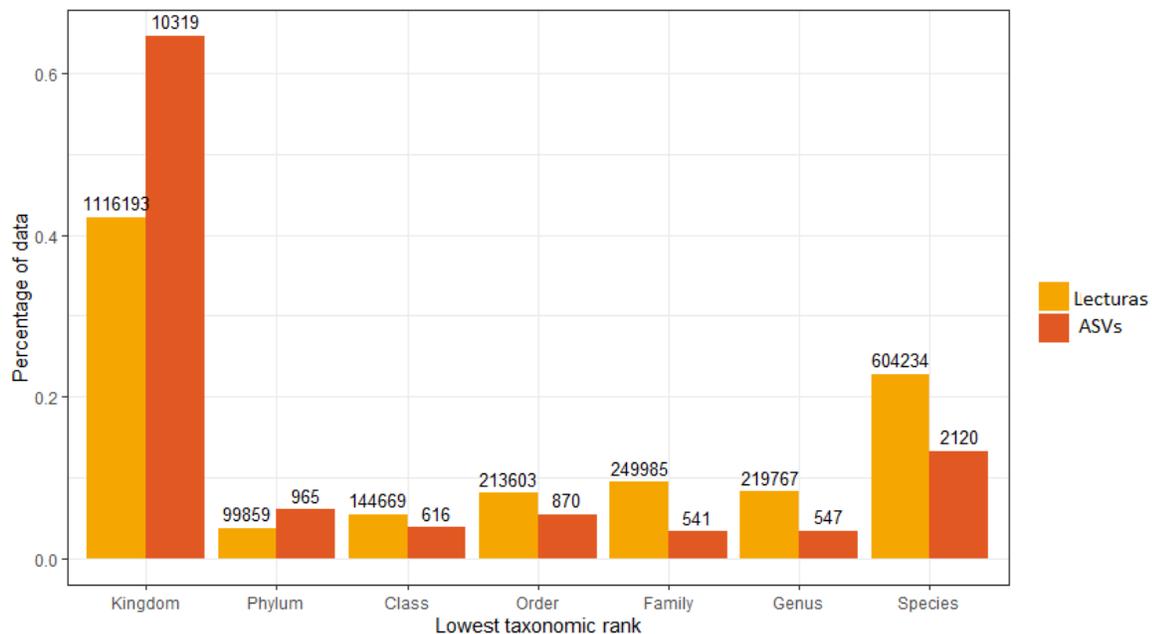


Fig. 2. 6 Porcentaje de lecturas no quiméricas y ASVs asignados en siete niveles taxonómicos usando la base de datos de UNITE (v8.3) (Nilsson et al., 2019). Las barras amarillas indican número de lecturas obtenidas por DADA2, las barras naranjas indican ASVs asignados y los, números colocados en la parte superior, indican el recuento obtenido

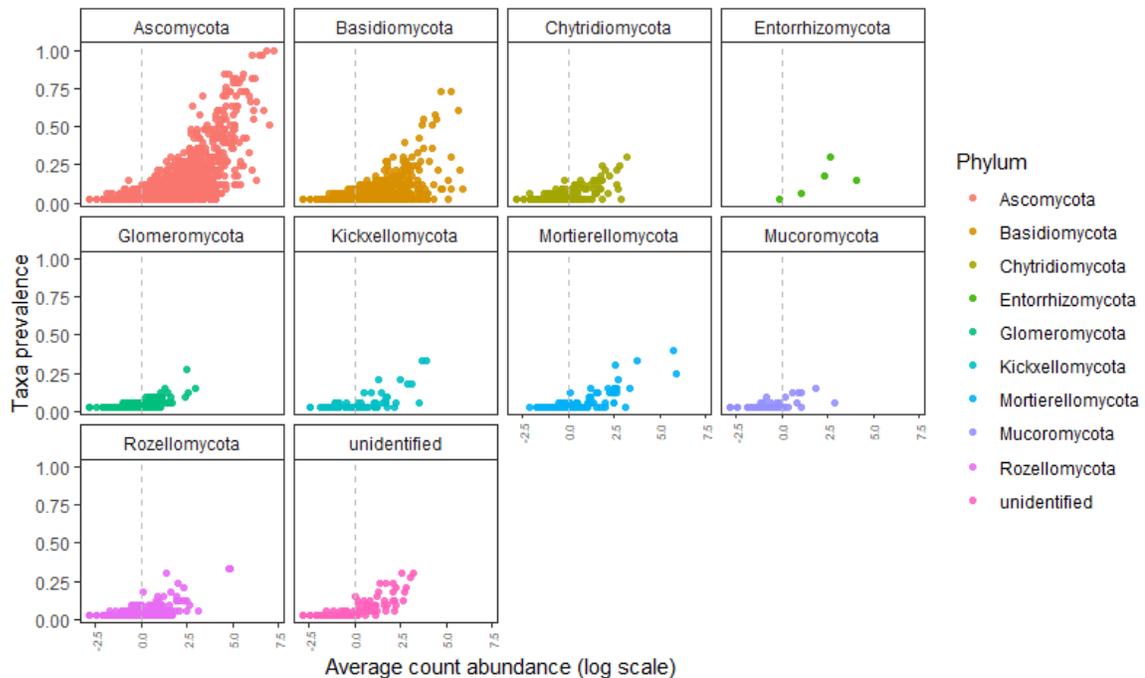


Fig. 2. 7 Prevalencia de taxones fúngicos a nivel Phylum en todas las muestras de suelo colectadas versus recuento total de la abundancia relativa asignada para cada taxón identificado.

Una vez realizada la identificación taxonómica y la prevalencia de los ASVs a nivel phylum se elaboró una representación del árbol de calor con base en las relaciones filogenéticas de los ASVs hasta nivel orden de manera global (Fig. 2.8) y por finca (F1, F2 y F3) (Fig 2.9). Se identificaron en el phylum *Ascomycota* 59 órdenes, donde los más abundantes (>50 conteos) fueron *Hypocreales*, *Xylariales*, *Sordariales* (clase *Sordariomycetes*), *Pleosporales*, *Capnodiales*, *Venturiales* (clase *Dothideomycetes*), *Chaetothyriales*, *Eurotiales*, *Onygenales* (clase *Eurotiomycetes*) y otras clases menos abundantes como *Lecanoromycetes*, *Leotiomycetes*, *Pezizomycetes*, *Saccharomycetes*. En el phylum *Basidiomycota* se encontrarán 38 órdenes donde la clase más abundante fue *Agaricomycetes* con órdenes con conteos mayores a 50 como *Agaricales*, *Polyporales*, *Auriculariales*; se observaron otras clases menos abundantes como *Microbotryomycetes*, *Tremellomycetes*, *Geminibasidiomycetes*, *Dacrymycetes*, *Wallemiomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Atractiellomycetes*. En cuanto a los *Chytridiomycota* se encontraron clases como *Rhizophyidiomycetes*, *Cladochytriomycetes*, *Spizellomycetes*, *Chytridiomycetes*. Del Phylum *Glomeromycota* se encontrarán clases como *Archaeosporomycetes*, *Glomeromycetes*, *Paraglomeromycetes* (Fig. 2.8).

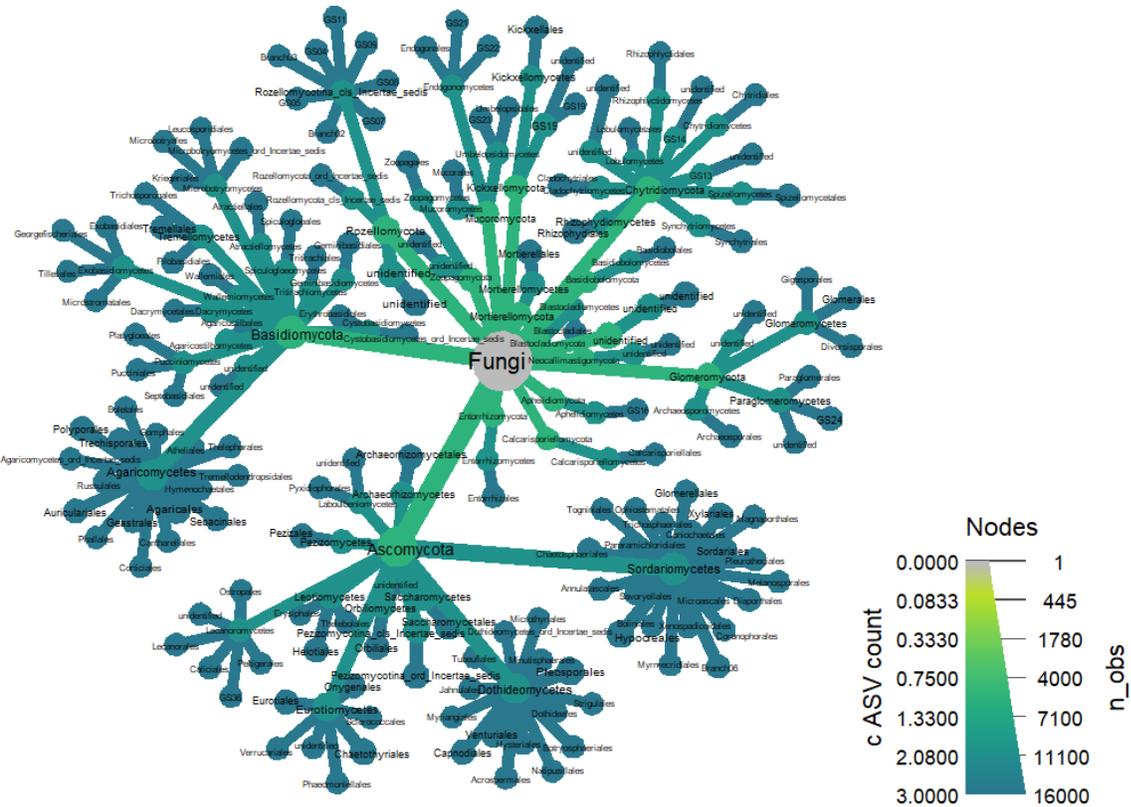


Fig. 2. 8 Representación de árbol de calor de la abundancia relativa de los ASV asignados a nivel de orden. Etiqueta del nodo, nombre del taxón; tamaño del nodo, número de ASVs; color del nodo, abundancia del orden indicado (de gris a verde, como se indica en la escala de colores).

Los resultados del árbol de calor de los ASVs a nivel de orden por finca se analizaron comparando las abundancias encontradas entre las fincas F2 con F1; F3 con F1 y F2 con F3, donde el color gris es la abundancia que se comparte entre las fincas y los colores indican el nivel de abundancia, siendo mayor el azul con respecto al color café (Fig. 2.9).

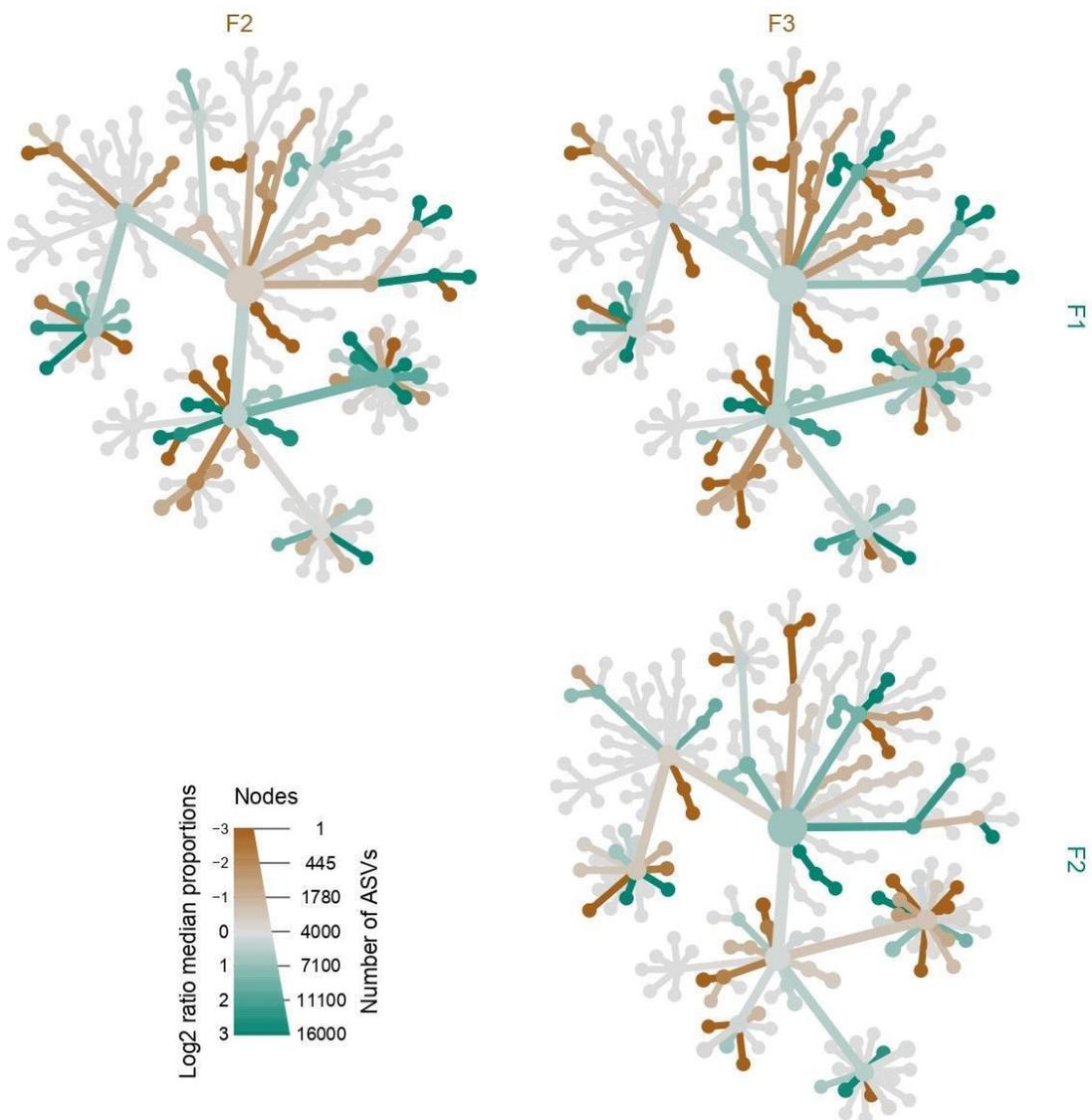


Fig. 2. 9 Comparación de la abundancia relativa presente C. Matriz de representación de comparación de abundancia fúngica a nivel taxonómico de orden en árbol de calor a nivel finca (F1, F2, F3). El árbol de color gris representa el árbol base de diversidad. Color marrón representa la rama y el nodo con mayor abundancia en la finca descrita en la parte superior (F2 o F3), color azul representa la rama y el nodo con mayor abundancia en la finca descrita en la parte derecha (F1 o F2). Etiqueta del nodo, nombre del taxón; Relación Log₂, número de ASVs.

2.4.4 Análisis de abundancia diferencial

Se realizó un análisis de abundancia diferencial usando las librerías edgeR y Aldex2 entre las fincas F1 y F2 de los suelos SCC para identificar a nivel género, los hongos que

presentan mayor abundancia (Fig. 2.10). Con edgeR se presentaron 72 géneros con mayor abundancia diferencial en la finca F2 y 51 para la finca F1 usando un *Fold Change* de 2 y p. valor < 0,001 (Fig 2.10.A). Para F1, se encontraron géneros como *Plectosphaerella*, *Tetracladium* e *Hypoxyton* que mostraron un valor de *Fold Change* > 4; *Microdochium*, *Sarocladium*, *Cylindrocladiella*, *Xylaria*, *Bisifusarium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Cylindrocarpon*, *Clonostachys*, *Scytalidium*, *Myrmecridium*, *Fusarium*, *Pochonía* mostraron un valor de *Fold change* > 2 (Fig 2.10.B). Al usar la librería Aldex2 se encontraron 52 géneros con mayor abundancia diferencial en F2 y 16 para la F1 usando el mismo parámetro de valor de cambio de 2 con la diferencia que en este se usó un P. valor < 0,05 (Fig. 2.10.C), se encontraron 15 géneros con un valor de diferencia mayor a 4, con géneros como *Minutisphaera*, un género de la clase *Plectosphaerellaceae*, tres de la clase *Nectriaceae*, *Cyberlindnera*, *Plectosphaerella*, *Trichoderma*, *Neoidriella*, *Ceratocystis*, *Beauveria*, *Microdochium*, *Porodiplodia* y *Bisifusarium* (Fig. 2.10.D).

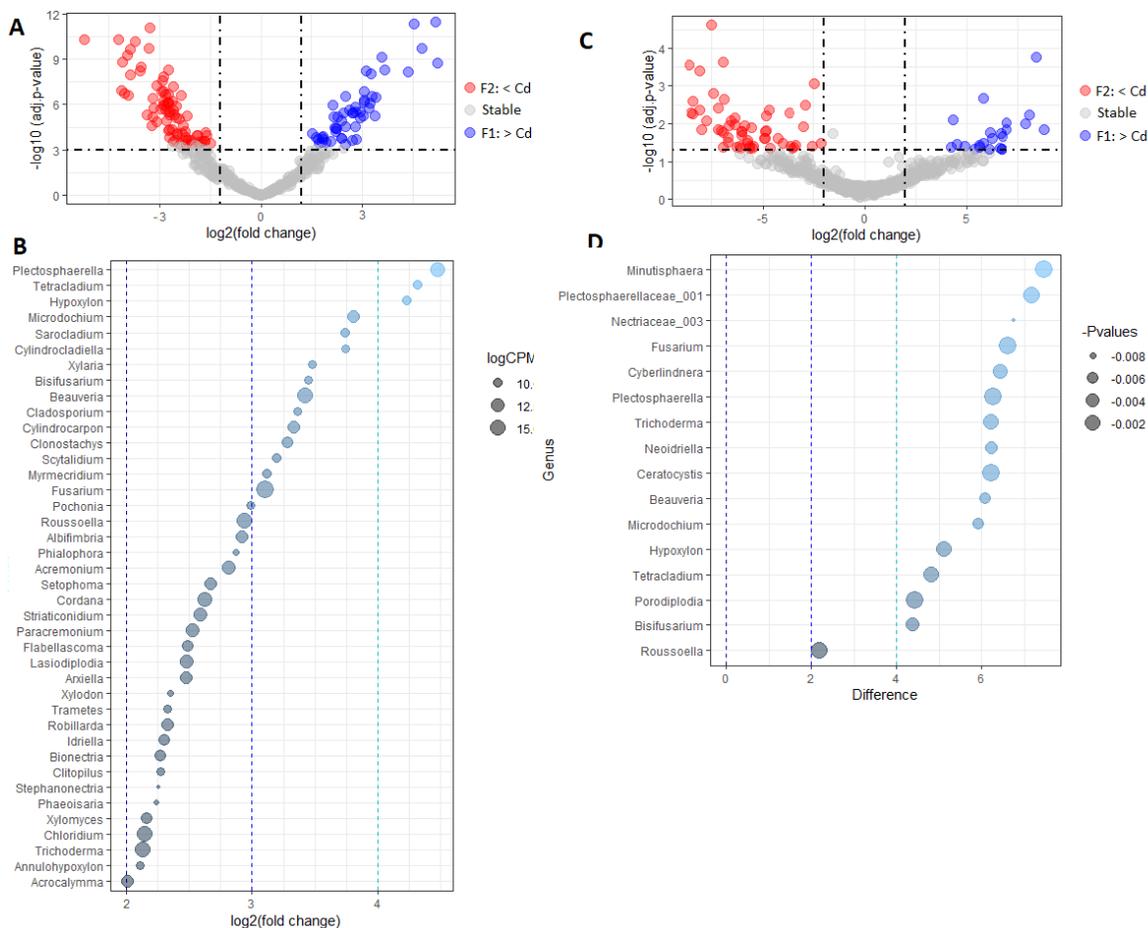


Fig. 2. 10 Análisis de abundancia diferencial de géneros fúngicos entre fincas con diferentes concentraciones de Cd total (Finca 1: 7.35 mg kg⁻¹) y Finca 2 (1.62 mg kg⁻¹) **A.** Volcano plot de edgeR basado en un conteo de transformación log2 y un p. valor < 0.001. **B.** Log Fold Change de los géneros encontrados diferencialmente abundantes **C.** Volcano plot de Aldex2 basado en un conteo de transformación log2 y un p valor < 0.05. **D.** Log Fold Change de los géneros encontrados diferencialmente abundantes con Aldex2.

Con la finalidad de evaluar la abundancia de los géneros en el tipo de cultivo (SCC y SWC) y tipos de suelos (Rz, D1, D2) de las muestras colectadas en cada finca, se realizó un análisis discriminante lineal - tamaño del efecto (LEfSE, por sus siglas en inglés) (Fig. 2.11) que determina las unidades taxonómicas que tienen más probabilidades de explicar las diferencias entre las muestras (Segata et al., 2011). Se observaron 30 géneros que representaban mejor el modelo (LDA score > 2,0). Se observó para la finca F1 que géneros como *Fusarium*, *Rousoella*, *Ceratocystis*, *Clonostachys*, *Myrothecium*, *Bisifusarium*, *Xylodon* fueron más abundantes en las muestras de D1 de SCC que en D1 SWC, mientras que géneros como *Mortierella*, *Cladorrhinum*, *Pestalotiopsis* y *Penicillifer* fueron más

abundantes en SWC de la finca F1. Al contrastar las muestras por tipo de cultivo en SCC de la finca F1 se observó que 10 géneros estuvieron presentes en las muestras de suelos rizosférico y no rizosférico con variaciones en la abundancia, y géneros como *Beauveria*, *Bionectria* y *Xylodon* estaban presentes sólo en suelos no rizosféricos. Para la finca F2 géneros como *Mortierella*, *Pestalotiopsis*, *Bionectria*, *Penicillifer* y *Xylodon* fueron más abundantes en los suelos D1 de SCC, por su parte en los suelos D1 de SWC fueron más abundantes géneros como *Leptodiscella* y *Ochroconis*. A diferencia de la finca F1, se encontraron mayor número de géneros presentes solo en suelos rizosféricos, como *Fusarium*, *Rousoella*, *Striaticonidium*, *Monocillium*, *Minutisphaera*. También se encontraron géneros como *Mortierella*, *Cladorrhinum*, *Penicillium*, *Westerdykella*, *Bionectria*, *Myrothecium*, *Scedosporium*, *Saitozyma*, *Penicillifer* y *Xylodon* que se presentaron en las muestras Rz y D1, pero no en D2 de SCC.

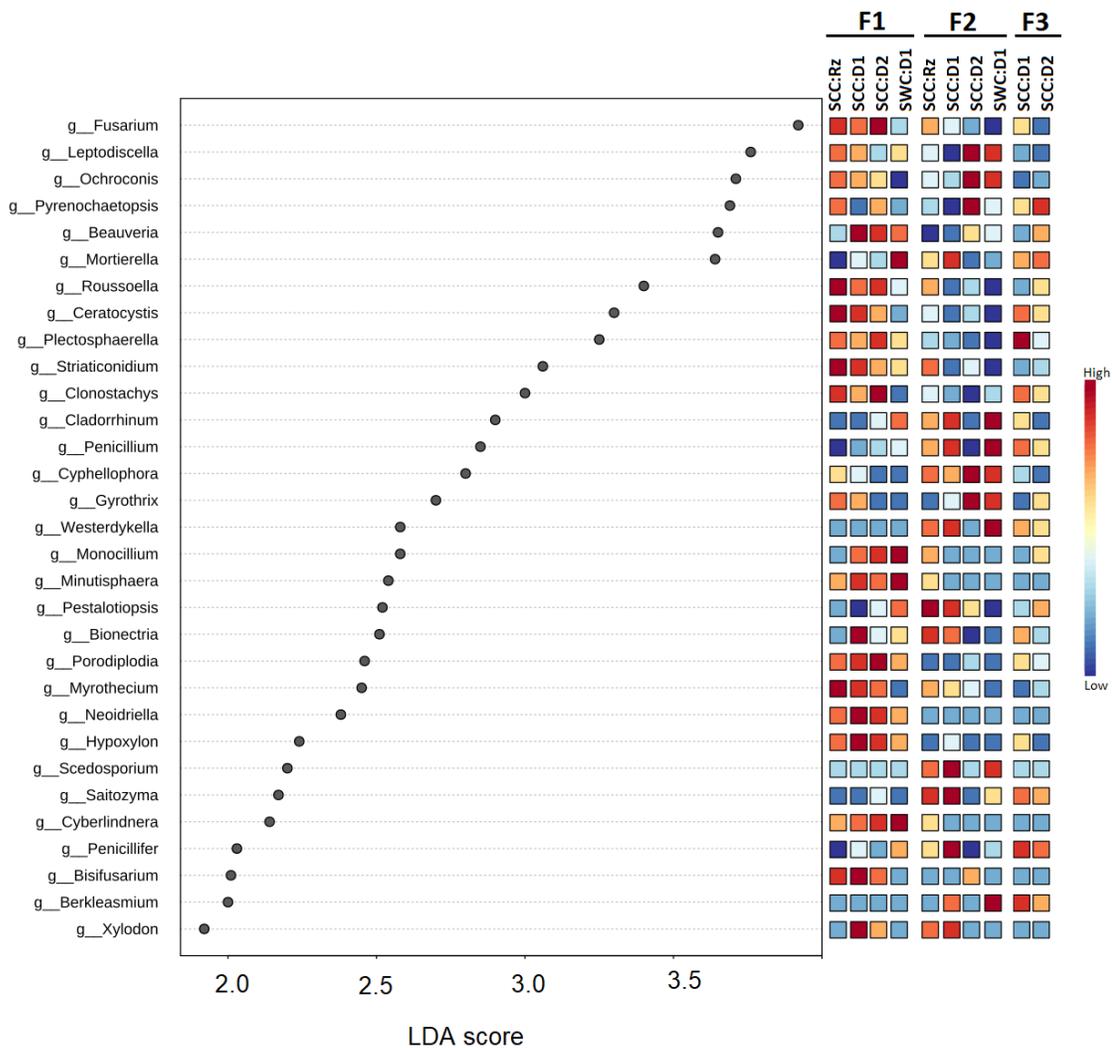


Fig. 2. 11 Análisis discriminante lineal - Tamaño del efecto (LefSe) a nivel género. La escala de color representa la abundancia relativa de cada género por muestra. F1: Finca 1, F2: Finca 2, F3: Finca 3; SCC: Suelo con cultivo de cacao, SWC: suelo sin cultivo de cacao; Rz: suelo Rizosférico; D1: suelo 0-30 cm, D2: suelo 31-100 cm.

2.5 Discusión

2.5.1 Extracción de ADN y secuenciamiento

En este estudio se observó que la calidad del ADN extraído inicialmente presentó relaciones 260/230 inferiores a 1,8 mostrando la presencia de contaminantes provenientes del suelo que pueden afectar los resultados y el análisis. Esto debido a que la integridad y la calidad del ADN son componentes fundamentales para el éxito en los estudios de

metagenómica y metataxonómica (Felczykowska et al., 2015). Durante el proceso de extracción de ADN se realizó un lavado con perlas de inmovilización reversible en fase sólida que permitió obtener mejores relaciones de absorbancia (260/280 y 260/230), lo que indica que el uso de las perlas fue efectivo para mejorar la calidad del ADN. En este proceso los ácidos nucleicos quedan inmovilizados al unirse a las perlas por afinidad, mientras se realizan varios lavados para remover partículas del suelo como arcillas, cationes divalentes, aniones de silicato, ácidos fúlvicos y húmicos que se suelen homogeneizar durante la lisis celular y que durante los procesos de precipitación y limpieza permanecen unidos al ADN (Wang et al., 2009). La presencia de estas partículas en la muestra de ADN llega a ser fuertes inhibidores de las reacciones enzimáticas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Wang et al., 2011). Sin embargo, a pesar del proceso de limpieza realizada en todas las muestras de ADN extraídas, para 4 muestras no fue posible obtener la totalidad de las librerías planteadas, posiblemente causado por la presencia de contaminantes que no pudieron ser removidos de la muestra.

En esta investigación, se utilizó el marcador molecular ITS2 de la región rARN para caracterizar la estructura de la comunidad fúngica presente en los suelos colectados. Los procesos de amplificación de la región ITS2 realizado con los cebadores ITS3-KYO2 e ITS4-KYO3 mostraron un amplicón de aproximadamente 450 pb, que es correspondiente a lo reportado por Toju et al. (2012); a su vez se logró adicionar al amplicón a través de una segunda PCR con las secuencias adaptadoras encontrando un fragmento de secuenciación de 530 pb aproximadamente. Esta metodología puede ser una alternativa de uso frente a propuestas comerciales de construcción de librerías para estudios metataxonómicos que usan la tecnología Illumina para la secuenciación. Se seleccionó el marcador ITS2, porque al igual que el marcador ITS1 han sido utilizados como códigos de barras del reino fungí debido a su alta variabilidad interespecífica, sitios conservados y múltiples copias presentes en la célula (Raja et al., 2017). Por lo tanto, ambos marcadores se han utilizado en la identificación taxonómica de cultivos puros y de muestras ambientales, así como la descripción de la diversidad y las estructuras comunitarias de hongos en distintos ambientes (Nilsson et al., 2019). Sin embargo, la región ITS2 ha presentado ventajas en los estudios metataxonómicos frente a ITS1 ya que se ha demostrado que este puede ser 64% menos variable que la región ITS1 (Blaalid et al., 2013).

Se secuenciaron lecturas de 300 pb en sentido directo (*Forward*) e inverso (*Reverse*), usando la plataforma MiSeq de Illumina (San Diego, CA, USA) de la región ITS2 del gen rARN donde se observó una amplia variación de lecturas (75%), encontrándose conteos menores a 100.000 hasta superiores a 500.000 lecturas. Estas fuentes de variabilidad pueden conducir la sub y sobrerrepresentatividad de la información contenida en las librerías secuenciadas, que pueden sesgar el análisis de abundancia al confrontar los conteos (Cameron et al., 2020). Por otro lado, el 62% de lecturas obtenidas luego de la secuenciación fueron filtradas por DADA2 previo a la reconstrucción de los ASVs. Este alto porcentaje de pérdida pudo deberse al grado de variación del amplicón (De Filippis et al., 2017; Hu et al. 2022), a diferentes especificidades de unión de cebadores producto del grado de degeneración del cebador (Silverman et al., 2021) o a la fragmentación a 300 pb para la secuenciación que pudo causar un alto porcentaje de error en el modelo de DADA2 para la reconstrucción de ASVs.

A pesar de este porcentaje de pérdida, las curvas de rarefacción mostraron que los ASVs reconstruidos representan la comunidad presente en cada una de las muestras. A su vez al comparar el número de especies diferentes (riqueza) encontrada en cada una de las tres repeticiones colectas por sitio de muestreo, se observó que fue variable. Esto puede deberse a que la variación en la diversidad microbiana es más heterogénea cuando las muestras son más pequeñas (repeticiones), por lo cual se debe considerar un mayor número de muestras (repeticiones) (Lombard et al., 2011).

2.5.2 Estructura de la comunidad fúngica presente en suelos cacaoteros

En este estudio se caracterizó la estructura de los microbiomas fúngicos presentes en suelos rizoséricos y no rizoséricos con diferentes niveles de Cd natural y propiedades fisicoquímicas. Esta diversidad estructural se determinó al interior de cada muestra colectada (diversidad alfa) y entre muestras (diversidad Beta), teniendo en cuenta las variables Finca (F1, F2, F3), Tipo de cultivo: con (SCC) o sin cacao (SWS) y tipo de suelo Rz o no Rz a diferentes profundidades D1 y D2. Los resultados obtenidos al realizar la prueba estadística de Kruskal Wallis en los índices de diversidad alfa evaluados (Observed features, Shannon y Gini-Simpson) mostraron que no hay evidencia estadística para determinar cuál de las variables evaluadas (finca, tipo de cultivo o suelo) estaba afectando la riqueza, abundancia y uniformidad de las poblaciones de hongos presentes en las

muestras analizadas. Sin embargo, se encontró que la riqueza era alta especialmente en los suelos con cultivo de cacao (SCC) (Observed Features) y también que la distribución de las poblaciones fúngicas era uniforme (índice de Shannon y Gini-Simpson). El encontrar una gran diversidad de hongos en estos suelos se puede explicar debido a que los hongos son miembros ubicuos de los entornos ambientales y tienen alta capacidad de resiliencia y adaptación especialmente bajo una o varias variables de presión de selección que permanecen de forma continua en el tiempo como la presencia de Cd natural en estos suelos. Se ha reportado que los hongos suelen convertirse en un reino dominante en ambientes ricos en metales pesados o contaminados por los mismos (Mohammadian Fazli et al., 2015) por lo que pueden encontrarse una diversidad equilibrada como la encontrada en este estudio (índice de Shannon > 6, índice de Gini-Simpson > 0,94). Otros reportes como el de Guo et al. (2022), donde caracterizaron las comunidades fúngicas presentes en suelos de arrozales contaminados con Cd y Cu, tampoco encontraron diferencias significativas en los índices de diversidad alfa entre los suelos con y sin contaminación, pero sí encontraron una tendencia en donde la diversidad aumentaba en suelos con mayor concentración de Cd. Por otro lado, Sun et al. (2022) en suelos rizosféricos de *Panax ginseng* contaminados con Cd evidenció que la diversidad de la comunidad fúngica es más estable a diferentes concentraciones de Cd en el suelo que la comunidad bacteriana.

Al observar el análisis de coordenadas principales (PCoA) que usó la matriz de distancias de Bray-Curtis (Fig. 2.3.B), que utiliza la abundancia o recuento de ASVs que se comparten o no entre dos muestras (Ricotta & Podani, 2017), se encontró que las comunidades fúngicas presentes en los suelos de la finca F1 se agruparon de manera diferente a las comunidades fúngicas presentes en los suelos de las fincas F2 y F3. Esto se podría explicar con base a las condiciones particulares de la finca F1, en cuanto a las propiedades fisicoquímicas y mayor concentración de Cdt y Cdd que presentan estos suelos. Se ha reportado que propiedades como la materia orgánica, el pH (Deng et al., 2022) y la presencia de concentraciones variables de Cd en el suelo pueden afectar la estructura de la comunidad microbiana causando presión de selección en los microbiomas que habitan el suelo donde se cultiva Ginseng, y estos cambios son más fuertes en los microbiomas bacterianos que los fúngicos (Sun et al., 2022). Para las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares de suelos cacaoteros del municipio de Yacopí, también se encontró que concentraciones altas de Cd afecta negativamente la diversidad de morfotipos encontrados en estos suelos (Sandoval Pineda et al., 2020) al igual que para

el microbioma bacteriano de suelos cacaoteros de Santander con concentraciones de Cd naturales (Cáceres et al., 2021). En esta investigación, también se observó que existe un distanciamiento entre las muestras SCC y SWC, sugiriendo que el cultivo de cacao también tiene un efecto en la selección de especies fúngicas. Esto se ha discutido por Compant et al. (2019), Song et al. (2020), Trivedi et al. (2022) y otros autores en el que afirman que las plantas de cultivo ejercen cambios químicos en el suelo que han permitido la selección de microorganismos, afectado la estructura de la comunidad microbiana.

Al realizar diagramas de venn para determinar el grado de disimilitud de la comunidad fúngica presente en los suelos evaluados soporta lo encontrado en los análisis de PCoA. De 16.589 ASVs reconstruidos por DADA2, a nivel finca, se encontró que el 88% de los ASVs no se comparten entre las fincas y el 36% solo estaban presentes en la finca F1, lo que podrían indicar que la exposición al Cd induce cambios en las poblaciones microbianas. Boros-Lajszner et al. (2021) ha sugerido que la presencia de Cd en el suelo causa que se encuentren mayor diversidad de microorganismos de crecimiento rápido en comparación a aquellos microorganismos que presentan crecimiento lento. También se determinó el número de ASVs fue mayor en los suelos SCC (11.839) que en SWC (2.855), esto puede estar relacionado a que el cultivo de cacao se establece bajo un sistema agroforestal donde se almacenan grandes cantidades biomasa vegetal de desecho, como la hojarasca y que es una fuente principal en carbono y nitrógeno (Zaia et al., 2012) y, por lo tanto, actúa como fuente de alimentación para los microorganismos presentes en el suelo (Hossain et al., 2011). Esto adicionado a los exudados de las raíces de cacao provocan cambios estructurales en la microbiota del suelo que pueden inducir aumento de la diversidad y la aparición de nuevas especies (Arévalo-Gardini et al., 2020). Estas condiciones son diferentes a las que pueden darse bajo otras coberturas vegetales como los pastos y los relictos de bosques observados en SWC.

Por otro lado, al contrastar los tipos de suelos Rz y no Rz (D1 y D2) de la finca F1 y F2, se observó que hay diferencias entre las comunidades fúngicas presentes en suelos Rz y no Rz. También se evidenció que hay mayor número de ASVs únicos para suelos Rz en la F1 (2.028) y que este valor fue 1,2 veces mayor con lo reportado para suelos Rz en la F2 (1.656). Adicionalmente, se encontró que el número de ASVs únicos en la finca F1 fue mayor en las muestras de suelo rizosférico (2.028) que en no rizosférico (D1: 1489, D2: 225). Con base en lo reportado en la literatura, estos valores pueden cambiar de acuerdo

al tipo de suelo y cultivo analizado. Por ejemplo, en suelos Rz y no Rz de variedades de trigo (*Triticum sativum* L.) se observó mayor riqueza en suelos no Rz frente a suelos Rz (Gqozo et al., 2020), pero estos resultados son contrastantes con los reportados en suelos Rz y no Rz de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) donde se encontró mayor riqueza en suelos rizosféricos (Li et al., 2016). Esto sugiere que la diversidad fúngica del suelo puede verse modificada por el tipo de suelo, la especie que se cultiva y las prácticas agronómicas (Soonvald et al., 2020).

2.5.3 Asignación taxonómica

Después de revisar la calidad de las secuencias del ITS2 obtenidas en esta investigación, éstas se alinearon con las secuencias completas de ITS almacenadas en la base de datos de UNITE. Se identificaron 16.589 ASVs en 2.028.684 lecturas no quiméricas y de estas solo el 26% de los ASVs tuvieron una asignación taxonómica, en las que el 62% de las lecturas asignadas quedaron agrupadas en el nivel de Phylum. La baja asignación taxonómica podría deberse al desconocimiento de los hongos presentes en los suelos cacaoteros de Yacopí, Cundinamarca, ya que si bien la base de datos de UNITE utiliza la clasificación taxonómica de NCBI, Index Fungorum y MycoBank y contiene 8.395.383 de secuencias curadas y ha sido ampliamente utilizada para identificación de microbiomas fúngicos (Phukhamsakda et al., 2022), puede existir una preferencia de las secuencias almacenadas en las bases de datos de hongos estudiados en el continente Europeo. Menolli & Sánchez-García (2020) afirman que las áreas tropicales son particularmente ricas en diversidad de hongos que aún son inexplorados y esto podría corresponder al bajo nivel de asignación taxonómica encontrada en este estudio.

A su vez la alta pérdida de secuencias en la reconstrucción de ASVs y la baja asignación taxonómica obtenida en este estudio sugiere que la longitud del marcador ITS2 podría presentar inconvenientes a la hora de estudiar la comunidad fúngica, por lo que podría abordarse en otros estudios el uso del marcador ITS2 acompañado de otros marcadores moleculares como la subunidad del 18S o 28S del gen del rRNA para favorecer la consistencia del marcador y mejorar la resolución al realizar la asignación taxonómica (Toju et al., 2012).

2.5.4 Abundancia relativa

De los 16.589 ASVs identificados se encontró que *Ascomycota* fue el phylum más abundante (68%) seguido de *Basidiomycota* (25%), proporción que es común en suelos, debido a que los *Ascomycota* pueden tener mayor plasticidad para resistir a múltiples condiciones ambientales y pueden utilizar una mayor cantidad de recursos, lo que lleva a estrategias más generalistas que pueden contribuir a su mayor dominio en los suelos (Egidi et al., 2019). En general estos Phylum juegan un papel importante en la estabilidad del suelo, puesto que tienen gran participación en la descomposición de la biomasa vegetal y las interacciones endófitas con las plantas, siendo impulsores importantes del ciclo del carbono y el nitrógeno (Challacombe et al., 2019). Además, presentan mecanismos de adaptación a condiciones de estrés, como las altas concentraciones de metales pesados debido a su capacidad para desintoxicar estos compuestos mediante varios mecanismos, como la adsorción en la pared celular, inmovilización utilizando compuestos quelantes extracelulares y la bioacumulación y compartimentalización en organelos como la vacuola (Priyadarshini et al., 2021; Gajewska et al., 2022).

También se observaron otros phylum en menor proporción como *Chytridiomycota*, *Entorrhizomycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota* y *Rozellomycota*. Schadt & Rosling (2015) sugieren que estos phylum suelen estar subestimados en este tipo de experimentos puesto que están poco amplificadas con los cebadores ITS universales al tener menor especificidad (Toju et al., 2012).

A nivel de orden se determinaron 59 de los *Ascomycota* de los cuales 9 fueron los que mayor abundancia relativa en la finca F1. Órdenes como *Hypocreales*, *Pleosporales* y *Capnodiales* y han sido reportado por exhibir mecanismos de tolerancia al estrés por metales pesados (Torres-Cruz et al., 2018; Văcar et al., 2021; Passarini et al., 2022). También se observó mayor abundancia en la finca F1 el orden *Glomerales* (*Glomeromycota*) este es uno de los principales órdenes especializados en formar micorrizas arbusculares en las plantas y se ha demostrado que algunas especies de *Glomerales* pueden aumentar la tolerancia de las plantas a los metales pesados al inmovilizar los metales en la pared celular del hongo, en las raíces o directamente en la rizosfera, reduciendo así su disponibilidad (Sánchez-Castro et al., 2017). Sandoval Pineda et al. (2020) encontraron en suelos cacaoteros con altos niveles de Cd y Zn que el orden *Glomerales* la alta presencia de Cd en suelos cacaoteros resultaba en menor diversidad,

pero se observaron algunos tipos de Glomerales como *Rhizoglyphus* sp. y *Claroideoglyphus etunicatum* una alta abundancia a altas concentraciones de Cd

2.5.5 Abundancia diferencial

Con el fin de identificar géneros diferencialmente abundantes entre los suelos SCC de las fincas F1 y F2, partiendo de la diferencia de concentración de Cd ($>5 \text{ mg kg}^{-1}$ y $<2 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente) se usó una estrategia de análisis de abundancia diferencial a través de un modelo de recuento de abundancias observadas utilizando una distribución binomial negativa, usando la librería edgeR (Robinson et al., 2010) y un modelo multinomial de Dirichlet para inferir abundancia a partir de conteos, usando la librería Aldex2 (Fernandes et al., 2014). edgeR encontró mayor número de géneros abundantemente diferentes, 72 géneros para la finca F2 (Fold Change < -2) y 51 para la finca F1 (Fold Change > 2), mientras que Aldex2 encontró 52 géneros con los mismos fold Change para la finca F2 y 16 en F1. El uso de estos modelos contribuye a la identificación de taxones que pueden estar adaptados a estas condiciones con mayor facilidad en comparación con el uso de otras técnicas (Lin & Peddada, 2020).

Ambos resultados son capaces de explicar la observación de géneros que podrían estar adaptados a las condiciones fisicoquímicas del suelo, como las concentraciones contrastantes de Cd, puesto que estas condiciones causan que los microorganismos sensibles a la toxicidad de los metales sean menos abundantes, mientras que las especies que pueden desarrollar mecanismos de tolerancia a altas concentraciones de Cd se vuelven predominantes (Guo et al., 2017).

Entre los géneros que presentaron mayor abundancia diferencial en la finca F1 se encontraron géneros que han sido reportados como tolerantes a Cd en otras investigaciones. Géneros del orden Xylariales como *Hypoxylon* ha sido reportado como un microorganismo que puede quelar metales pesados a través de la secreción de sideroforos (Tamariz-Angeles et al., 2021), *Microdochium* que en condiciones *in vitro* ha mostrado tolerancia a Cd hasta concentraciones de 414 mg L^{-1} . A su vez, la familia más abundante encontrada en este estudio fue la *Nectricaceae*, que es concordante con estudios como el de Mohammadian Fazli et al. (2015) y Abdel-Azeem (2015) realizados en suelos contaminados con metales pesados que a nivel de géneros encontraron la presencia de *Fusarium*, *Bisifusarium*, *Rectifusarium*. Existen reportes en especies de *Fusarium* como *F.*

Solani (Kumar et al., 2019), *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. poae* (Ngu et al., 1998), *F. oxysporum* (Sandoval Cárdenas et al., 2017) *F. graminearum* (Nicaise et al., 2022) que exhiben alta tolerancia y amplia capacidad de adaptación a Cd. Shadmani et al. (2021) reportaron tolerancia de algunos aislamientos de *Fusarium* superiores a 1000 mg L⁻¹ en condiciones *in vitro*, mostrando este género como uno de los de mayor capacidad de adaptación a altas concentraciones de Cd.

Otros géneros diferencialmente abundantes en la finca F1 como *Beauveria*, *Clonostachys*, *Mortierella*, *Acremonium*, *Cladosporium*, han sido encontrados en otros estudios, como el de Solis-Hernández et al., 2022) que evaluaron suelos mineros contaminados con niveles de Cd entre 14 y 64 mg kg⁻¹. Por lo tanto la identificación de estos géneros y otros encontrados en este estudio permite abordar más estrechamente microorganismos que pueden contar con mecanismos de tolerancia a altas concentraciones de Cd en sistemas suelo.

Al realizar el análisis discriminante lineal - tamaño del efecto (LEfSE, por sus siglas en inglés) para observar la abundancia relativa por tipo de cultivo (SCC y SWC, en la profundidad D1) y tipo de suelo (Rz, D1 y D2, en SCC) en los géneros fúngicos. Los resultados indicaron que 14 de 31 géneros determinados estuvieron presentes en todos los tipos de suelos de SCC de la finca F1, mostrando una presencia no dependiente de la profundidad del suelo determinado. Que al observar los géneros diferencialmente abundantes, como *Fusarium*, *Rousoella*, *Ceratocystis*, *Plectosphaerella*, *Clonostachys*, *Minutisphaera*, *Porodiplodia*, *Hypoxylon* y *Bisifusarium* mostraron estar presentes en Rz, D1 y D2 con abundancias relativas similares, esta amplia presencia sugiere la evidencia de una vasta red de hifas, una alta relación área superficial/volumen y tolerancia a Cd de estos géneros encontrados (Akhtar & Mannan, 2020).

2.6 Conclusiones

- Los índices de diversidad alfa no presentaron diferencias significativas en los factores analizados, finca (F1, F2 y F3), tipo de cultivo (SCC y SWC) y tipo de suelo analizado (Rz y no Rz: D1 y D2), lo que indica que todas las muestras presentaron una riqueza, abundancia relativa de ASVs y uniformidad. Sin embargo, presentó mayor riqueza y abundancia en los suelos SCC que en los SWC.

- Los índices diversidad beta mostraron que existe una diferenciación de los ASVs presentes en las fincas evaluadas, siendo la finca F1 más distantes a las fincas F2 y F3, mostrando que la estructura de la comunidad fúngica presente en los suelos de la finca F1, que presenta mayor contenido de Cd, es diferente a las encontradas en las fincas F2 y F3 con menor contenido de Cd. Adicionalmente, los ASVs presentes en los suelos SCC de la F1 fueron diferentes a los ASVs presentes en suelos SWC.
- En los suelos de la F1 se determinaron mayor riqueza de ASVs únicos comparados con los suelos de las fincas F2 y F3. Adicionalmente, los ASVs del suelo Rz de la F1 fue mayor que lo encontrado en los suelos no Rz. Por otro lado, el suelo con cultivo presentó mayor número de ASVs en suelos SCC.
- Se encontró que Ascomycota fue el phylum más abundante con el 68% seguido de Basidiomycota con 25%, donde los órdenes Hypocreales, Pleosporales y Capnodiales fueron los más abundantes. Algunos de los géneros pertenecientes a estos órdenes han sido reportados por tolerar metales pesados.
- Los análisis de abundancia diferencial mostraron 51 (EdgeR) y 16 géneros (Aldex2) que podrían presentar tolerancia al Cd presentes en suelos cacaoteros de los cuales se destacan los géneros Hypoxylon, Microdochium, Xylaria y la familia Nectriaceae, taxones que también han sido reportados como tolerantes a metales pesados.

2.7 Bibliografía

Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M., Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., & Wassie, M. (2017). The role of microorganisms in bioremediation- a review. *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>

Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H. A., & Abdul Khalil, H. P. S. (2018). A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(1), 243-262. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1400-5>

Abdel-Azeem, A. (2015). Occurrence and diversity of mycobiota in heavy metal contaminated sediments of Mediterranean coastal lagoon El-Manzala, Egypt. *Mycosphere*, 6(2), 228-240. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/2/12>

Abt, E., Fong Sam, J., Gray, P., & Robin, L. P. (2018). Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 92-102. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1420700>

- Akhtar, N., & Mannan, M. A. (2020). Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. *Biotechnology Reports*, 26, e00452. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>
- Anahid, S., Yaghmaei, S., & Ghobadinejad, Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*, 18(3), 502-508. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.05.015>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Arévalo-Gardini, E., Canto, M., Alegre, J.,
- Arévalo-Hernández, C. O., Loli, O., Julca, A., & Baligar, V. (2020). Cacao agroforestry management systems effects on soil fungi diversity in the Peruvian Amazon. *Ecological Indicators*, 115, 106404. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106404>
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, 605-606, 792-800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of The Total Environment*, 649, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6506-6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
- Barrientos, L. D. P., Oquendo, J. D. T., Garzón, M. A. G., & Álvarez, O. L. M. (2019). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, 115, 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.084>
- Beattie, R. E., Henke, W., Campa, M. F., Hazen, T. C., McAliley, L. R., & Campbell, J. H. (2018). Variation in microbial community structure correlates with heavy-metal contamination in soils decades after mining ceased. *Soil Biology and Biochemistry*, 126, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.08.011>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science [Preprint]. *PeerJ Preprints*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>
- Boros-Lajszner, E., Wyszowska, J., Borowik, A., & Kucharski, J. (2021). The response of the soil microbiome to contamination with cadmium, cobalt and nickel in soil sown with *brassica napus*. *Minerals*, 11(5), 498. <https://doi.org/10.3390/min11050498>
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., & Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1175-1194. <https://doi.org/10.1111/jam.13698>
- Cáceres, P. F. F., Vélez, L. P., Junca, H., & Moreno-Herrera, C. X. (2021). *Theobroma cacao* L. agricultural soils with natural low and high cadmium (Cd) in Santander (Colombia), contain a persistent shared bacterial composition shaped by multiple soil variables and bacterial isolates

- highly resistant to Cd concentrations. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100086>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- 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>
- Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J.-M., Emelko, M. B., & Müller, K. M. (2020). To rarefy or not to rarefy: Enhancing diversity analysis of microbial communities through next-generation sequencing and rarefying repeatedly [Preprint]. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.09.290049>
- Challacombe, J. F., Hesse, C. N., Bramer, L. M., McCue, L. A., Lipton, M., Purvine, S., Nicora, C., Gallegos-Graves, L. V., Porras-Alfaro, A., & Kuske, C. R. (2019). Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, 20(1), 976. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6358-x>
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The colombian heritage: colombian fermented foods and beverages.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of The Total Environment*, 533, 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, 15(3), 799-821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Cordoba-Novoa, H. A., Cáceres-Zambrano, J., & Torres-Rojas, E. (2022). Assessment of native cadmium-tolerant bacteria in cacao (*Theobroma cacao* L.)—Cultivated soils in Cundinamarca-Colombia [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1726295/v1>
- da Cunha, M. de L. R. de S. (2019). Molecular biology in microbiological analysis. En *Reference Module in Food Science* (p. B9780081005965230000). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22935-1>
- De Filippis, F., Laiola, M., Blaiotta, G., & Ercolini, D. (2017). Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), e00905-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00905-17>
- de Menezes, A. B., Prendergast-Miller, M. T., Richardson, A. E., Toscas, P., Farrell, M., Macdonald, L. M., Baker, G., Wark, T., & Thrall, P. H. (2015). Network analysis reveals that bacteria and fungi form modules that correlate independently with soil parameters: Network analysis of microbial community structure. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2677-2689. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12559>

- Deng, X., Yuan, X., Chen, L., Chen, Y., Rong, X., Zeng, Q., & Yang, Y. (2022). Field-scale remediation of cadmium-contaminated farmland soil by *Cichorium intybus* L.: Planting density, repeated harvests, and safe use of its Cd-enriched biomass for protein feed. *Industrial Crops and Products*, 188, 115604. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115604>
- Ding, C., Ma, Y., Li, X., Zhang, T., & Wang, X. (2018). Determination and validation of soil thresholds for cadmium based on food quality standard and health risk assessment. *Science of The Total Environment*, 619-620, 700-706. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.137>
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, 10(1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of The Total Environment*, 678, 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>
- Estaki, M., Jiang, L., Bokulich, N. A., McDonald, D., González, A., Kosciolk, T., Martino, C., Zhu, Q., Birmingham, A., Vázquez-Baeza, Y., Dillon, M. R., Bolyen, E., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2020). Qiime 2 enables comprehensive end-to-end analysis of diverse microbiome data and comparative studies with publicly available data. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.100>
- Esteves, A. C., Saraiva, M., Correia, A., & Alves, A. (2014). Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(5), 332-342. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0134>
- European Commission, 2021. Commission Regulation (EU) 2021/1323 of 10 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in certain foodstuffs (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union* 138, 75.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141), 1237439. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Felczykowska, A., Krajewska, A., Zielińska, S., & Łoś, J. M. (2015). Sampling, metadata and DNA extraction—Important steps in metagenomic studies. *Acta Biochimica Polonica*, 62(1), 151-160. https://doi.org/10.18388/abp.2014_916
- Feria-Cáceres, P. F., Penagos-Velez, L., & Moreno-Herrera, C. X. (2022). Tolerance and cadmium (Cd) immobilization by native bacteria isolated in cocoa soils with increased metal content. *Microbiology Research*, 13(3), 556-573. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030039>
- Fernandes, A. D., Reid, J. N., Macklaim, J. M., McMurrough, T. A., Edgell, D. R., & Gloor, G. B. (2014). Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: Characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome*, 2(1), 15. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-15>
- Foster, Z. S. L., Sharpton, T. J., & Grünwald, N. J. (2017). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLOS Computational Biology*, 13(2), e1005404. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005404>

- Gajewska, J., Floryszak-Wieczorek, J., Sobieszczuk-Nowicka, E., Mattoo, A., & Arasimowicz-Jelonek, M. (2022). Fungal and oomycete pathogens and heavy metals: An inglorious couple in the environment. *IMA Fungus*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43008-022-00092-4>
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of The Total Environment*, 612, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- Guiasu, R. C., & Guiasu, S. (2010). The Rich-Gini-Simpson quadratic index of biodiversity. *Natural Science*, 2(10), 1130-1137. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.210140>
- Guo, H., Nasir, M., Lv, J., Dai, Y., & Gao, J. (2017). Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.048>
- Guo, Y., Cheng, S., Fang, H., Yang, Y., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Responses of soil fungal taxonomic attributes and enzyme activities to copper and cadmium co-contamination in paddy soils. *Science of The Total Environment*, 844, 157119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157119>
- Gutiérrez-Macías, P., Mirón-Mérida, V. A., Rodríguez-Nava, C. O., & Barragán-Huerta, B. E. (2021). Cocoa: Beyond chocolate, a promising material for potential value-added products. En *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products* (pp. 267-288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824044-1.00038-6>
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245-R249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hannula, S. E., Heinen, R., Huberty, M., Steinauer, K., De Long, J. R., Jongen, R., & Bezemer, T. M. (2021). Persistence of plant-mediated microbial soil legacy effects in soil and inside roots. *Nature Communications*, 12(1), 5686. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25971-z>
- Helmke, P. A. (1999). Chemistry of cadmium in soil solution. En M. J. McLaughlin & B. R. Singh (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants* (pp. 39-64). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_3
- Hossain, M., Siddique, M. R. H., Rahman, Md. S., Hossain, Md. Z., & Hasan, Md. M. (2011). Nutrient dynamics associated with leaf litter decomposition of three agroforestry tree species (*Azadirachta indica*, *Dalbergia sissoo*, and *Melia azedarach*) of Bangladesh. *Journal of Forestry Research*, 22(4), 577-582. <https://doi.org/10.1007/s11676-011-0175-7>
- Hu, Y., Irinyi, L., Hoang, M. T. V., Eenjes, T., Graetz, A., Stone, E. A., Meyer, W., Schwessinger, B., & Rathjen, J. P. (2022). Inferring species compositions of complex fungal communities from long- and short-read sequence data. *MBio*, 13(2), e02444-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.02444-21>
- Jia, T., Wang, R., Fan, X., & Chai, B. (2018). A comparative study of fungal community structure, diversity and richness between the soil and the phyllosphere of native grass species in a copper tailings dam in shanxi province, china. *Applied Sciences*, 8(8), 1297. <https://doi.org/10.3390/app8081297>

Kamble, A., & Singh, H. (2020). Different methods of soil dna extraction. *BIO-PROTOCOL*, 10(2). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3521>

Kant, R., Kumar, A., & Sironen, T. (2020). From microbial genomics to metagenomics. *International Journal of Genomics*, 2020, 1-2. <https://doi.org/10.1155/2020/9357450>

Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>

Krehenwinkel, H., Pomerantz, A., Henderson, J. B., Kennedy, S. R., Lim, J. Y., Swamy, V., Shoobridge, J. D., Graham, N., Patel, N. H., Gillespie, R. G., & Prost, S. (2019). Nanopore sequencing of long ribosomal DNA amplicons enables portable and simple biodiversity assessments with high phylogenetic resolution across broad taxonomic scale. *GigaScience*, 8(5), giz006. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz006>

Kumar, V., Singh, S., Singh, G., & Dwivedi, S. K. (2019). Exploring the cadmium tolerance and removal capability of a filamentous fungus fusarium solani. *Geomicrobiology Journal*, 36(9), 782-791. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1627443>

Liaquat, F., Munis, M. F. H., Haroon, U., Arif, S., Saqib, S., Zaman, W., Khan, A. R., Shi, J., Che, S., & Liu, Q. (2020). Evaluation of metal tolerance of fungal strains isolated from contaminated mining soil of nanjing, china. *Biology*, 9(12), 469. <https://doi.org/10.3390/biology9120469>

Lin, H., & Peddada, S. D. (2020). Analysis of microbial compositions: A review of normalization and differential abundance analysis. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00160-w>

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>

Liu, H., Wang, C., Xie, Y., Luo, Y., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2020). Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an enterprise-intensive region. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122478. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122478>

Lombard, N., Prestat, E., van Elsas, J. D., & Simonet, P. (2011). Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics: Limitations in soil metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(1), 31-49. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01140.x>

Lorenz, M. G., & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58(3), 563-602. <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.563-602.1994>

Lourenço, K. S., Suleiman, A. K. A., Pijl, A., Cantarella, H., & Kuramae, E. E. (2020). Dynamics and resilience of soil mycobiome under multiple organic and inorganic pulse disturbances. *Science of The Total Environment*, 733, 139173. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139173>

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>

Menolli, N., & Sánchez-García, M. (2020). Brazilian fungal diversity represented by DNA markers generated over 20 years. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 729-749. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00206-y>

- Menzies, N. W., Donn, M. J., & Kopittke, P. M. (2007). Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution*, 145(1), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.03.021>
- Minasny, B., & McBratney, A. B. (2006). A conditioned Latin hypercube method for sampling in the presence of ancillary information. *Computers & Geosciences*, 32(9), 1378-1388. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2005.12.009>
- Mohammadian, E., Babai Ahari, A., Arzanlou, M., Oustan, S., & Khazaei, S. H. (2017). Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanzan Province, Iran. *Chemosphere*, 185, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.022>
- Mohammadian Fazli, M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: Their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, 13(1), 342. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Ngu, M., Moya, E., & Magan, N. (1998). Tolerance and uptake of cadmium, arsenic and lead by *Fusarium* pathogens of cereals. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42(1), 55-62. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00047-X)
- Nicaise, V., Chereau, S., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.-N., Ducos, C., Jimenez, M., Coriou, C., Bussière, S., Robert, T., Nguyen, C., Richard-Forget, F., & Cornu, J.-Y. (2022). Interaction between the accumulation of cadmium and deoxynivalenol mycotoxin produced by *Fusarium graminearum* in durum wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(26), 8085-8096. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01673>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: High-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259-D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Nyika, J. M. (2021). Tolerance of microorganisms to heavy metals: En S. Dey & B. Acharya (Eds.), *Advances in Environmental Engineering and Green Technologies* (pp. 19-35). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-4888-2.ch002>
- Oliveira, B. R. M., de Almeida, A.-A. F., Santos, N. de A., & Pirovani, C. P. (2022). Tolerance strategies and factors that influence the cadmium uptake by cacao tree. *Scientia Horticulturae*, 293, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110733>
- Passarini, M. R. Z., Ottoni, J. R., Costa, P. E. dos S., Hissa, D. C., Falcão, R. M., Melo, V. M. M., Balbino, V. Q., Mendonça, L. A. R., Lima, M. G. de S., Coutinho, H. D. M., & Verde, L. C. L. (2022). Fungal community diversity of heavy metal contaminated soils revealed by metagenomics. *Archives of Microbiology*, 204(5), 255. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02860-7>
- Phukhamsakda, C., Nilsson, R. H., Bhunjun, C. S., de Farias, A. R. G., Sun, Y.-R., Wijesinghe, S. N., Raza, M., Bao, D.-F., Lu, L., Tibpromma, S., Dong, W., Tennakoon, D. S., Tian, X.-G., Xiong,

- Y.-R., Karunarathna, S. C., Cai, L., Luo, Z.-L., Wang, Y., Manawasinghe, I. S., ... Hyde, K. D. (2022). The numbers of fungi: Contributions from traditional taxonomic studies and challenges of metabarcoding. *Fungal Diversity*, 114(1), 327-386. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00502-3>
- Quail, M. A., Swerdlow, H., & Turner, D. J. (2009). Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system. *Current Protocols in Human Genetics*, 62(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1802s62>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology: Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142-160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Rangel Mendoza, J. A., & Silva Parra, A. (2020). Agroforestry systems of *Theobroma cacao* L. affects soil and leaf litter quality. *Colombia forestal*, 23(2), 75-88. <https://doi.org/10.14483/2256201X.16123>
- Reese, A. T., & Dunn, R. R. (2018). Drivers of microbiome biodiversity: A review of general rules, feces, and ignorance. *MBio*, 9(4), e01294-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01294-18>
- Ricotta, C., & Podani, J. (2017). On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecological Complexity*, 31, 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2017.07.003>
- Robinson, J. R., Isikhuemhen, O. S., & Anike, F. N. (2021). Fungal-metal interactions: A review of toxicity and homeostasis. *Journal of Fungi*, 7(3), 225. <https://doi.org/10.3390/jof7030225>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010a). Edger: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodríguez Albarracín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>
- Rose, P. K., & Devi, R. (2018). Heavy metal tolerance and adaptability assessment of indigenous filamentous fungi isolated from industrial wastewater and sludge samples. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(4), 688-694. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.08.001>
- Sánchez-Castro, I., Gianinazzi-Pearson, V., Cleyet-Marel, J. C., Baudoin, E., & van Tuinen, D. (2017). Glomeromycota communities survive extreme levels of metal toxicity in an orphan mining site. *Science of The Total Environment*, 598, 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.084>
- Sandoval Cárdenas, D. I., Gomez-Ramirez, M., Rojas-Avelizapa, N. G., & Vidales-Hurtado, M. A. (2017). Synthesis of Cadmium Sulfide Nanoparticles by Biomass of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Journal of Nano Research*, 46, 179-191. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.46.179>
- Sandoval Pineda, J. F., Pérez, U. A., Rodriguez, A., & Rojas, E. T. (2020). Alta presencia de cadmio resulta en baja diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Biológica Colombiana*, 25(3), 333-344. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n3.78746>
- Schadt, C. W., & Rosling, A. (2015). Comment on "Global diversity and geography of soil fungi". *Science*, 348(6242), 1438-1438. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4269>

- Schneegurt, M. A., Dore, S. Y., and Kulpa, C. F. Jr. (2003). Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 1–8.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Senanayake, I. C., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Maharachchikumbura, S. S. N., Jeewon, R., Phillips, A. J. L., Bhat, J. D., Perera, R. H., Li, Q. R., Li, W. J., Tangthirasunun, N., Norphanphoun, C., Karunarathna, S. C., Camporesi, E., Manawasighe, I. S., Al-Sadi, A. M., & Hyde, K. D. (2017). Families of Diaporthales based on morphological and phylogenetic evidence. *Studies in Mycology*, 86(1), 217-296. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.07.003>
- Shadmani, L., Jamali, S., & Fatemi, A. (2021). Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1097-1106. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00493-4>
- Silverman, J. D., Bloom, R. J., Jiang, S., Durand, H. K., Dallow, E., Mukherjee, S., & David, L. A. (2021). Measuring and mitigating PCR bias in microbiota datasets. *PLOS Computational Biology*, 17(7), e1009113. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009113>
- Solis-Hernández, A. P., Chávez-Vergara, B. M., Rodríguez-Tovar, A. V., Beltrán-Paz, O. I., Santillán, J., & Rivera-Becerril, F. (2022). Effect of the natural establishment of two plant species on microbial activity, on the composition of the fungal community, and on the mitigation of potentially toxic elements in an abandoned mine tailing. *Science of The Total Environment*, 802, 149788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149788>
- Song, C., Zhu, F., Carrión, V. J., & Cordovez, V. (2020). Beyond plant microbiome composition: Exploiting microbial functions and plant traits via integrated approaches. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 896. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00896>
- Soonvald, L., Loit, K., Runno-Paurson, E., Astover, A., & Tedersoo, L. (2020). Characterising the effect of crop species and fertilisation treatment on root fungal communities. *Scientific Reports*, 10(1), 18741. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74952-7>
- Sulistyo, B. P., Larsson, K.-H., Haelewaters, D., & Ryberg, M. (2021). Multigene phylogeny and taxonomic revision of Atheliales s.l.: Reinstatement of three families and one new family, Lobuliciaceae fam. nov. *Fungal Biology*, 125(3), 239-255. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.11.007>
- Sun, H., Shao, C., Jin, Q., Li, M., Zhang, Z., Liang, H., Lei, H., Qian, J., & Zhang, Y. (2022). Effects of cadmium contamination on bacterial and fungal communities in *Panax ginseng*-growing soil. *BMC Microbiology*, 22(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02488-z>
- Tamariz-Angeles, C., Huamán, G. D., Palacios-Robles, E., Olivera-Gonzales, P., & Castañeda-Barreto, A. (2021). Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú). *Microbiological Research*, 250, 126811. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126811>

- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Torres-Cruz, T. J., Hesse, C., Kuske, C. R., & Porrás-Alfaro, A. (2018). Presence and distribution of heavy metal tolerant fungi in surface soils of a temperate pine forest. *Applied Soil Ecology*, 131, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.001>
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240-245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E., & Singh, B. K. (2022). Plant–microbiome interactions under a changing world: Responses, consequences and perspectives. *New Phytologist*, 234(6), 1951-1959. <https://doi.org/10.1111/nph.18016>
- Văcar, C. L., Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D. C., Frențiu, T., Pârvu, M., & Podar, D. (2021). Heavy metal-resistant filamentous fungi as potential mercury bioremediators. *Journal of Fungi*, 7(5), 386. <https://doi.org/10.3390/jof7050386>
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of The Total Environment*, 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>
- Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V. R., Taylor, A. J., Engeseth, N., & Margenot, A. J. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *PLOS ONE*, 17(2), e0261989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261989>
- Wagner, B. D., Grunwald, G. K., Zerbe, G. O., Mikulich-Gilbertson, S. K., Robertson, C. E., Zemanick, E. T., & Harris, J. K. (2018). On the use of diversity measures in longitudinal sequencing studies of microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1037. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01037>
- Wang, M., Chen, Z., Song, W., Hong, D., Huang, L., & Li, Y. (2021). A review on cadmium exposure in the population and intervention strategies against cadmium toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106(1), 65-74. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-03088-1>
- Wang, T. Y., Wang, L., Zhang, J. H., & Dong, W. H. (2011). A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and Molecular Research*, 10(1), 519-525. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr1055>
- Wijayawardene, N. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, 11(1), 1060-1456. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/8>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, alpha diversity, and statistics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2407. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Zaia, F. C., Gama-Rodrigues, A. C., Gama-Rodrigues, E. F., Moço, M. K. S., Fontes, A. G., Machado, R. C. R., & Baligar, V. C. (2012). Carbon, nitrogen, organic phosphorus, microbial biomass and N mineralization in soils under cacao agroforestry systems in Bahia, Brazil. *Agroforestry Systems*, 86(2), 197-212. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9550-4>

Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K.-M., & Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182-207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>

Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in metagenomics and its application in environmental microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>

Zhou, Q., An, X., & Wei, S. (2008). [Heavy metal pollution ecology of macro-fungi: Research advances and expectation]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = The Journal of Applied Ecology*, 19(8), 1848-1853.

3. Capítulo 3: Efecto de las características físicas, químicas y concentraciones de Cd presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas

3.1 Resumen

La diversidad y actividad fúngica en el suelo está regulada por varios factores como la biomasa vegetal, la presencia de otros organismos, factores abióticos, las propiedades físicas y químicas del suelo, incluido la presencia de metales pesados. El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de las características fisicoquímicas y concentraciones de cadmio presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas. Se utilizó como objeto de estudio el sistema productivo de cacao en el municipio de Yacopí (Cundinamarca, Colombia). Se seleccionaron dos fincas cacaoteras (F1 y F2) con diferentes concentraciones de Cd ($F1 > 5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ y $F2 < 2 \text{ mg kg}^{-1}$). Se colectaron muestras suelo rizosférico (Rz) y no Rz asociado al cultivo (SCC) a dos profundidades (D1: 0-30 cm, D2: 30-100 cm) con en tres ventanas de observación por finca. Se determinó la clase textural, el pH, carbono orgánico, carbono total, pH, capacidad de intercambio cationico efectiva, contenidos de N, P, Ca, Mg, K, Na, Fe, Cu, Zn, B, Mn, Cd total y disponible. La extracción de ADN microbiano del suelo se realizó mediante el Kit DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN), la amplificación y preparación de librerías se realizó mediante la amplificación del marcador molecular ITS2 del gen rARN y se secuenciaron mediante la plataforma Miseq v3 de Illumina. Se utilizó el pipeline de Qiime2 para determinar índices de diversidad (observed features, Shannon, Gini-Simpson). Se construyó una matriz de correlación de rangos de Spearman entre las variables fisicoquímicas y los índices de diversidad discriminadas por finca. Se realizó un análisis de redundancia (RDA) para determinar los géneros fúngicos mejor representados por las variables fisicoquímicas y se

realizó una red de co-ocurrencia para identificar las posibles relaciones positivas de los géneros fúngicos por finca y por tipo de suelo colectado. Los resultados mostraron que los índices de diversidad se correlacionaron débilmente con las variables fisicoquímicas del suelo indicando que la estructura de la comunidad es el resultado multifactorial; sin embargo, se encontró que la textura, el pH, MO, el N, el Na y Cdt tienen relación con la abundancia de los microbiomas encontrados. El RDA mostró que el orden *Hypocreales* fue el mejor representado con los géneros *Beauveria*, *Clonostachys*, *Fusarium* y *Trichoderma*. Este orden se encuentra ampliamente presente en suelos agrícolas y contaminados con metales pesados debido a sus mecanismos de adaptación. El análisis de la red de co-ocurrencia de la finca F1, donde se presentó la mayor concentración de Cd, mostró que la comunidad fúngica forma menos interacciones y estas se producen con géneros raros y poco estudiados. En contraste, los suelos de la F2 presentaron mayor número de interacciones y una red más compleja. En general, los géneros más representados son reconocidos por tener actividad degradadora de celulosa y lignina; ser endófitos facultativos y saprófitos. Estos resultados contribuyen en el entendimiento de cómo las propiedades fisicoquímicas afectan la estructura de los microbiomas fúngicos presentes en suelos cacaoteros contaminados naturalmente con Cd.

3.2 Introducción

Los hongos son organismos eucariontes, heterótrofos, que se adaptan a diferentes ecosistemas debido a su alta plasticidad y capacidad para responder a condiciones ambientales diversas (Kirchman, 2018). En el suelo, los hongos cumplen un papel importante en la regulación del ciclo de carbono porque son los principales descomponedores de la materia orgánica debido a la amplia actividad lignocelulótica que poseen. Debido a esta característica los hongos intervienen de forma activa no solo en el ciclo de carbono sino también en los ciclos de nitrógeno y fósforo (Liu et al., 2020; Wahsha et al., 2017) afectando el reciclaje y la disponibilidad de nutrientes y por lo tanto, influyendo directamente en la fertilidad del suelo (Žifčáková et al., 2016). Por otro lado, los hongos al igual que las bacterias, son sensibles al estrés abiótico como la contaminación por metales pesados y pueden ser usados como indicadores de la calidad del suelo (Liu et al., 2020; Wahsha et al., 2017).

La diversidad estructural y funcional de las comunidades fúngicas presentes en el ecosistema suelo está regulada por varios factores como la masa vegetal presente, la presencia de otros microorganismos y por factores físicoquímicos entre los que se encuentra el pH, el oxígeno, la temperatura, la textura, la retención de agua, la salinidad y el contenido de compuestos orgánicos e inorgánicos (Liu et al., 2020; Fraç et al., 2018). El pH ha sido catalogado como uno de los principales factores que puede cambiar la composición de las comunidades microbianas (Adamo et al., 2021), ya que el pH afecta la disponibilidad y absorción de nutrientes, así como la actividad enzimática del suelo. El oxígeno también ha sido considerado como un factor determinante en la composición microbiana y está directamente relacionado con la textura del suelo (Garbeva et al., 2004). Se ha demostrado que la riqueza y la diversidad de los microbiomas se correlacionan con la textura del suelo (Naveed et al., 2016), puesto que la textura influye directamente en el espacio poroso que contribuye con el flujo de oxígeno en la matriz del suelo, la capacidad de retención de agua de los suelos arcillosos que permiten mantener mayores concentraciones de nutrientes al tener mayor capacidad de intercambio catiónico (Carney & Matson, 2005; Naylor et al., 2022). Sin embargo, porcentajes altos de arcilla pueden afectar negativamente a los hongos al generar condiciones de hipoxia (Koranda et al., 2014; Malik et al., 2016). También se ha reportado que la distribución de los hongos en el suelo está determinada, además de la disponibilidad de oxígeno, por la materia orgánica, encontrándose mayor diversidad de hongos en las capas superficiales del suelo. Adicionalmente, los hongos filamentosos presentan estructuras llamadas hifas que se ramifican y forman redes micelares a medida que el hongo crece, permitiendo de esta manera expandir su rango de acción en el suelo, en comparación con otros microorganismos como las bacterias (Akhtar & Mannan, 2020). Estas redes también ayudan a mantener la estructura del suelo y crear ambientes únicos, metabólicamente activos, y en la rizosfera de la planta, que favorecen la interacción entre los microorganismos y las raíces.

La comunidad fúngica del suelo también puede ser afectada por la presencia de los metales pesados; que son el resultado de procesos de bioacumulación y no degradación del metal por el microorganismo (Rehman et al., 2018). Metales pesados como el cadmio (Cd), el cobre (Cu), el arsénico (As) han recibido mucha atención debido a su alta toxicidad en la salud humana y en el ambiente (Sheldon & Menzies, 2005). Un suelo se considera contaminado por metales pesados cuando sobrepasa los límites establecidos por las

entidades regulatorias. Esta concentración cambia con base al tipo de metal pesado y tipo de suelo. Para Cd total se ha establecido que un suelo se encuentra contaminado por Cd cuando la concentración suele ser $> 1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (Kabata-Pendias, 2010; Argüello et al., 2019). En un sistema natural las concentraciones de Cd total fluctúan en promedios entre $0,01 - 7 \text{ mg kg}^{-1}$ (Bohn et al., 1993). Sin embargo, con base en la geogénesis del suelo o de las actividades antropogénicas, esta concentración puede ser mayor alcanzando valores superiores a este rango. En cuanto al contenido de Cd disponible, los valores encontrados están sujetos a las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y por lo tanto, es particular para cada suelo estudiado (Mahar et al., 2016).

La mayoría de los estudios sobre la relación entre los metales pesados del suelo, las propiedades fisicoquímicas del suelo y los microorganismos se enfocan principalmente a las comunidades bacterianas (Li et al., 2021; Wu et al., 2022). Sin embargo, los hongos presentan múltiples mecanismos de adaptación que les permite sobrevivir a ambientes contaminados (Sun et al., 2005) y a su vez pueden desencadenar respuestas de defensa en las plantas que les permite tolerar diferentes tipos de estrés (Zeilinger et al., 2016). Se ha reportado que algunas especies de hongos poseen la capacidad de actuar como un biosorbente efectivo de metales tóxicos como Cd, Cu, Hg, Pb y Zn bioacumulándolos en sus paredes celulares y en sus cuerpos fructíferos (Ghosh, 2021) o en diferentes organelos protegiendo a la célula de la toxicidad del metal (Priyadarshini et al., 2021). También pueden quelar el metal a nivel intracelular y extracelular o expulsarlo a través de bombas de eflujo (Cánovas et al., 2004). Por estas características se han empleado en procesos de biorremediación de suelos contaminados (Khatoon et al., 2021).

En el ecosistema suelo existen redes ecológicas de microorganismos que tienen múltiples efectos en la regulación de los procesos biogeoquímicos del suelo y demás funciones (Delgado-Baquerizo et al., 2018). Puesto que estos microbiomas son diversos y dinámicos, y a menudo los organismos que lo componen están estrechamente vinculados metabólicamente entre sí y pueden alterar la funcionalidad ecológica del suelo (Antunes et al., 2016). Por ejemplo, las interacciones que se establecen dentro de algunas redes ecológicas compuestas por arqueas, bacterias y hongos se correlaciona con el ciclaje y el almacenamiento de nutrientes (Creamer et al., 2016). Por lo tanto, establecer las interacciones que ocurren en el ecosistema suelo es importante para entender el rol que puede jugar los microorganismos en el sistema y en los procesos ecológicos (relaciones

que se establecen entre ellos como mutualismo, competencia, depredación, entre otros) (Freilich et al., 2018; Lee et al., 2022). Adicionalmente, el estudio de estas interacciones, son importantes para identificar los cambios que pueden ocurrir en la estructura y función de la comunidad microbiana sometida a un estrés específico (Wang et al., 2019). Por otro lado, Guo et al. (2022), encontró que las concentraciones de metales pesados como el Cd y Cu se correlacionaron positivamente con la diversidad alfa fúngica, evidenciando que la contaminación por Cd y Cu altera la composición de la comunidad de hongos en suelos arroceros del Suroeste de China. Por lo tanto, la construcción y el análisis de redes ecológicas son beneficiosas para determinar los cambios en la comunidad microbiana, identificar los microorganismos resistentes o sensibles que se encuentran bajo un estrés específico, por ejemplo, contaminación por metales pesados.

Los estudios reportados sobre el efecto del Cd en la comunidad microbiana de suelos cacaoteros no son muchos y se han centrado en las comunidades bacterianas aislando e identificando bacterias Cd tolerantes de suelos cacaoteros (Bravo et al., 2018; Feria-Cáceres et al., 2022; Córdoba-Novoa et al., 2022) y unos pocos usando técnicas independientes de cultivo para suelos cacaoteros del departamento de Santander (Cáceres et al., 2021). Los hongos han sido menos explorados a pesar de que exhiben mecanismos diferentes de tolerancia y supervivencia a concentraciones más elevadas de Cd que las bacterias (Mohammadian Fazli., 2015). Se han evaluado hongos cultivables Cd tolerantes como los aislados en suelos de Santander (Guerra Sierra et al., 2022) y hongos formadores de micorrizas arbusculares (Sandoval Pineda et al., 2020). Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios de secuenciación ambiental para suelos cacaoteros con presencia de Cd natural.

Para el estudio del efecto de variables ambientales con la comunidad microbiana se ha propuesto el uso de técnicas basadas en correlación, como la correlación de Pearson o Spearman y sus variaciones (Matchado et al., 2021) que han permitido establecer relaciones de la composición de la comunidad microbiana con los factores ambientales (Oueriaghli et al., 2018). Sin embargo, estas medidas tienen en cuenta la composición global de la comunidad fúngica, donde, el aumento en la abundancia de un solo taxón no puede ser determinado (Gloor et al., 2017). Algunos enfoques multivariados como el análisis de componentes principales, el análisis de conglomerados, el análisis de redundancia (RDA) (Hirano & Takemoto, 2019), han permitido determinar qué factores

ambientales suelen ser más significativos para explicar la variación en la composición de la comunidad microbiana (Ramette, 2007). Por otro lado, también existen enfoques para inferir asociaciones ecológicas entre las poblaciones muestreadas que han demostrado su utilidad para estudiar sistemas con interacciones positivas y negativas (Matchado et al., 2021). Estos enfoques están basados en correlaciones entre los taxones observado; métodos como SparCC, el cual realiza una aproximación iterativa utilizando datos transformados logaritmicamente para inferir correlaciones basadas en pearson ha demostrado ser más adecuado para evitar correlaciones espurias (Weiss et al., 2016) y permitir comprender el agrupamiento de grupos taxonómicos más fácilmente (Friedman & Alm, 2012). Sin embargo, a la fecha, no existen reportes que determinen qué tipo de interacciones ocurren entre las propiedades fisicoquímicas y los contenidos de Cd total y Cd disponible y cómo estos factores están afectando la diversidad de la comunidad fúngica de los suelos cacaoteros contaminados con Cd.

Esta investigación se centró en el sistema productivo de cacao localizado en el municipio de Yacopí (Cundinamarca, Colombia) ubicada el nororiente del departamento de Cundinamarca. Este municipio hace parte de la región que ha sido reportada como una zona de anomalía geoquímica en el patrón de distribución de Cd en el país (Mendoza et al., 2020) y que corresponde al flanco occidental de la cordillera oriental comprendido por los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Santander (Rodríguez Albarrcín et al., 2019; Mendoza et al., 2020). Una vez determinadas la propiedades fisicoquímicas y su relación con el Cd en diferentes tipos de suelos y profundidades (capítulo 1) y de caracterizar la riqueza y abundancia de la comunidad fúngica presente en estos suelos (capítulo 2), este capítulo tiene como objetivo evaluar el efecto de las características fisicoquímicas y concentraciones de Cd total (Cdt) y disponible (Cdd) presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas presentes en suelos rizosféricos y no rizosféricos tomados a dos profundidades de las fincas F1 y F2 únicamente, debido a que en la finca F3 no se colectaron suelos rizosféricos.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Sitio de la investigación y muestreo

Se realizó de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.3.1 del capítulo 2 de esta investigación.

3.3.2 Análisis fisicoquímicos del suelo y determinación del Cdt y Cdd

Se realizó de acuerdo con lo descrito en el numeral 1.3.3 y 1.3.4 del capítulo 1 de esta investigación.

3.3.3 Extracción de ADN y secuenciación

Se realizó de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.4.1 del capítulo 2 de esta investigación.

3.3.4 Procesamiento de secuencias y análisis estadístico

Se utilizaron las muestras de la Finca F1 y F2 de suelos con cultivo de cacao (SCC) descritas en el numeral 2.3.1 del capítulo 2 de esta investigación. Esto debido a que en la Finca 3 no se colectaron suelos rizosféricos.

El procesamiento de control de calidad, limpieza, reconstrucción de ASVs y determinación de índices alfa y asignación taxonómica, se realizó de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.3.3 del capítulo 2 de esta investigación. Se construyó una matriz de correlación de rangos de Spearman entre las variables fisicoquímicas y los índices de diversidad usando las muestras de suelo con cultivo de cacao (SCC) y discriminadas por finca F1 y F2 usando la librería de R corrplot (Taiyun & Viliam. 2021). Los análisis de redundancia se realizaron entre las variables fisicoquímicas del suelo y la matriz de distancia de Bray curtis a nivel género usando la librería de R microeco (Liu et al., 2021). Las redes de co-ocurrencia de los géneros fúngicos se separaron por finca y se construyeron basados en el método de correlación SparCC (Correlaciones dispersas para datos de composición, por sus siglas en inglés), usando un valor de permutación de 100, un P. valor de 0,05 y un

valor de correlación $R^2 > 0,70$ usando la librería de R MicrobiomeAnalyst (Chong et al., 2020). Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el software R Studio 2022.07.1 (R versión 4.1.3).

3.4 Resultados

3.4.1 Efecto de las características fisicoquímicas del suelo y del Cdt y Cdd en los índices de diversidad alfa de los microbiomas fúngicos

Para identificar las características fisicoquímicas que tienen mayor impacto en la diversidad alfa de los microbiomas fúngicos encontrados, se realizaron matrices de correlación de Spearman con las muestras de suelo rizosférico y no rizosférico tomado a diferentes profundidades y que estaban asociadas al cultivo de cacao (SCC) y que fueron colectadas en las fincas F1 y F2 (Fig. 3.1). En cuanto a la textura, los resultados muestran que las arcillas presentes en los suelos de la finca F1 tuvo una correlación negativa ($R^2 < -0,50$) para los índices de riqueza (características observadas) y abundancia relativa (Shannon). En contraste, para los suelos de la finca F2, las arenas presentaron una correlación negativa ($R^2 < -0,38$). Por otro lado, en cuanto a las propiedades químicas, el pH mostró una correlación negativa para la finca F2 ($R^2 < -0,52$) con los índices evaluados, mientras que el CT, CO, N, P y CICE mostraron una correlación levemente positiva no superior a $R^2 > 0,54$. El Na presentó una correlación leve negativa en ambas fincas $R^2 > -0,31$. El K, en la finca F2, presentó correlación positiva en los índices de diversidad Shannon y Gini-Simpson ($R^2 > 0,66$) y las otras bases (Ca, Mg, K) no presentaron correlaciones superiores a 0,40 con las fincas y los índices evaluados. Los cationes del suelo Cu, Zn, B, Cdt, Cdd

presentaron una correlación positiva con las características observadas de la finca F1 ($R^2 > 0,58$).



Fig. 3. 1 Gráfico de correlación de Spearman entre las propiedades fisicoquímicas de los suelos y los índices de diversidad (Observed features: riqueza, Shannon: abundancia relativa, Gini-simpson: 1 – Dominancia (inverso de la dominancia). Correlación discriminada por finca: F1 y F2. Los números indican el coeficiente de correlación donde el color azul indica correlación positiva y color rojo indica correlación negativa; la intensidad del azul indica correlación cercana a 1. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fosforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeso: Mn, Zinc: Zn, Boro: B. n=9.

3.4.2 Asociación entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y la diversidad estructural de la comunidad fúngica

Para determinar la variación de la diversidad beta, a nivel de género, con relación a las propiedades fisicoquímicas, Cdt y Cdd del suelo se realizó un análisis de redundancia (RDA) con la matriz de distancias de Bray Curtis de la comunidad fúngica. Los resultados mostraron los 12 géneros que mayor relación tuvieron con las propiedades fisicoquímicas analizadas (Fig. 3.2).

El RDA con la textura del suelo (arenas, limos, arcillas) (Fig. 3.2.A) mostró que en el primer eje la variación alcanzó el 90,9% y el segundo eje 6,9%; por otro lado, el test de Mantel que se representa a través de la longitud de las flechas mostró que las Arenas y los Limos se correlacionaron mejor con la matriz de Bray-Curtis que las arcillas. Los géneros que mayor correlación presentaron con la textura fueron *Fusarium* y *Beauveria* que se asociaron más con las arcillas. Otros géneros como *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Plectosphaerella*, *Rousoella*, y *Ciliophora*, correspondieron mejor con los limos y arcillas en el eje 1. En cuanto al RDA con el pH, CT, CO, N, P y CICE (Fig. 3.2.B) la varianza se

representó en el primer eje en 92,2% y el segundo con 3,1% y mostró nuevamente que *Fusarium* y *Beauveria* fueron los géneros que se correlacionaron mejor con las variables del suelo evaluadas. Adicionalmente, todos los géneros correspondieron con las variables químicas (pH, CO, N, P y CICE) excepto con el CT. El RDA con las bases intercambiables (Ca, Mg, K, Na) (Fig. 3.2.C) mostró que solo *Mortierella* correspondió mejor con el Na, todos los demás géneros se agruparon con el K, Ca y Mg. Al evaluar con los demás cationes del suelo, el Cdt y Cdd (Fig. 3.2.D) *Beauveria* se correlacionó mejor con estos cationes; a su vez, *Fusarium*, *Rousoella*, *Ciliophora*, *Ceratocystis* correspondieron mejor con el Zn, Cu, Cdt, Cdd, Mn y B, mientras que *Mortierella* correspondió mejor con Fe.

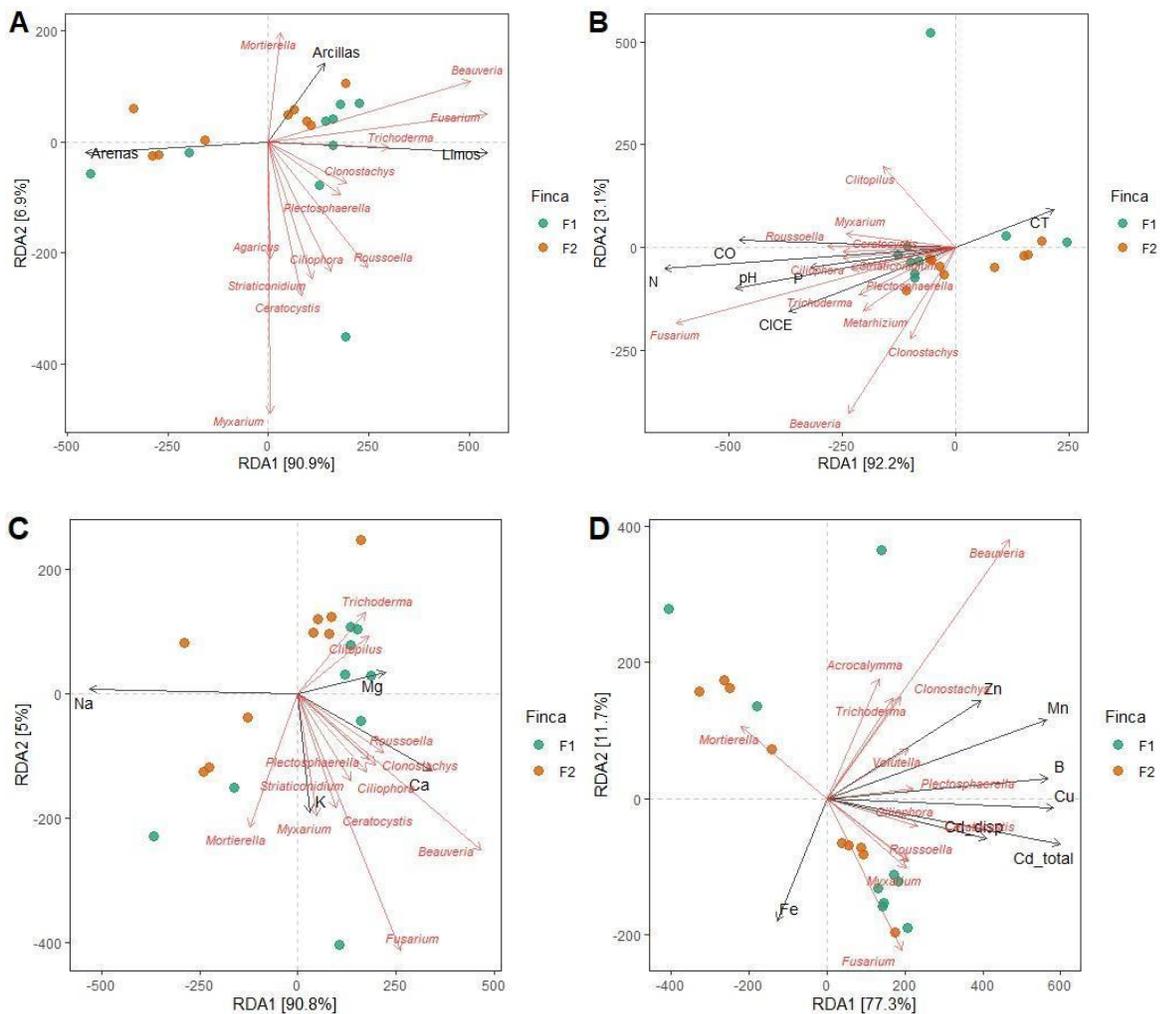


Fig. 3. 2 Análisis de redundancia (RDA) de la diversidad beta de las comunidades fúngicas encontradas a nivel taxonómico de género usando la matriz de Bray-curtis y las propiedades fisicoquímicas del suelo. A. RDA usando las variables Arcillas, Arenas y Limos. B. RDA usando las variables pH, N, P, CO, CT y CICE. C. RDA usando las variables Ca, Mg, K, Na. D. RDA usando las variables Cu, Fe, Zn, Mn, B, Cdt, Cd. Círculos verdes

representan matriz de Bray-curtis por muestra de la finca F1, círculos naranja representan matriz de Bray-curtis por muestra la finca F2. Líneas rojas representan los taxones (género) fúngico y líneas negras las variables fisicoquímicas. Carbono Orgánico: CO, Carbono Total: CT, Nitrógeno: N, Fosforo: P, Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva: CICE, Calcio: Ca, Magnesio: Mg, Potasio: K, Sodio: Na, Hierro: Fe, Cobre: Cu, Manganeso: Mn, Zinc: Zn, Boro: B, Cdt: Cadmio total, Cdd: Cadmio disponible. n=18.

3.4.3 Co-ocurrencia relativa de géneros fúngicos

Para evaluar la co-ocurrencia positiva entre los géneros fúngicos identificados en las fincas F1 y F2 se realizó un análisis de redes de co-ocurrencia representado en la Fig. 3.3. Las relaciones positivas entre los géneros fúngicos presentes se determinaron usando el método de inferencia de correlación SparCC (Correlaciones dispersas para datos de composición, por sus siglas en inglés) (P. valor 0,01, $R^2 > 0,7$). Se encontraron 66 nodos (círculos) y 74 aristas (líneas). Se observaron tres conglomerados o clusters (C1, C2 y C3) que se clasificaron con base en la abundancia de los géneros encontrados en los suelos de las fincas F1 y F2. El primer conglomerado (C1) presenta los géneros con mayor abundancia relativa y en su mayoría únicos que se identificaron en la finca F2; se observaron 18 nodos y 23 aristas, donde géneros como *Westerdykella*, *Veronaeopsis*, *Lipomyces*, *Saitozyma* presentaron relaciones positivas con 7 nodos, y los géneros *Mortierella* y *Talaromyces* fueron los organismos más abundantes. El segundo conglomerado (C2) representa los géneros de mayor abundancia en la finca F1; se identificaron 13 nodos y 21 aristas, donde géneros como *Hypoxyton*, *Neoidriella*, *Porodiplodia*, *Campylospora*, *Bisifusarium* presentaron uniones con otros nodos superiores a 5 aristas, siendo los géneros *Plectosphaerella* y *Ceratocystis* los de mayor abundancia. En el tercer conglomerado (C3) se encontraron géneros presentes y con una abundancia similar en ambas fincas; se observaron dos subdivisiones, en la primera, el género *Pyrenochaetopsis* fue el género centralizador del conglomerado y se observaron los géneros *Striaticonidium*, *Chloridium*, *Gyrophthrix*, *Ochroconis*, *Pheosphaeria*, *Leptodiscella*, *Idriella* y *Fusarium*; en el segundo subgrupo se observaron géneros como *Trichoderma*, *Bionectria*, *Ganoderma*, *Cheatosphaeria*, *Setophoma*, *Gliocladiopsis*, *Purpureocillium* y *Clonostachys*.

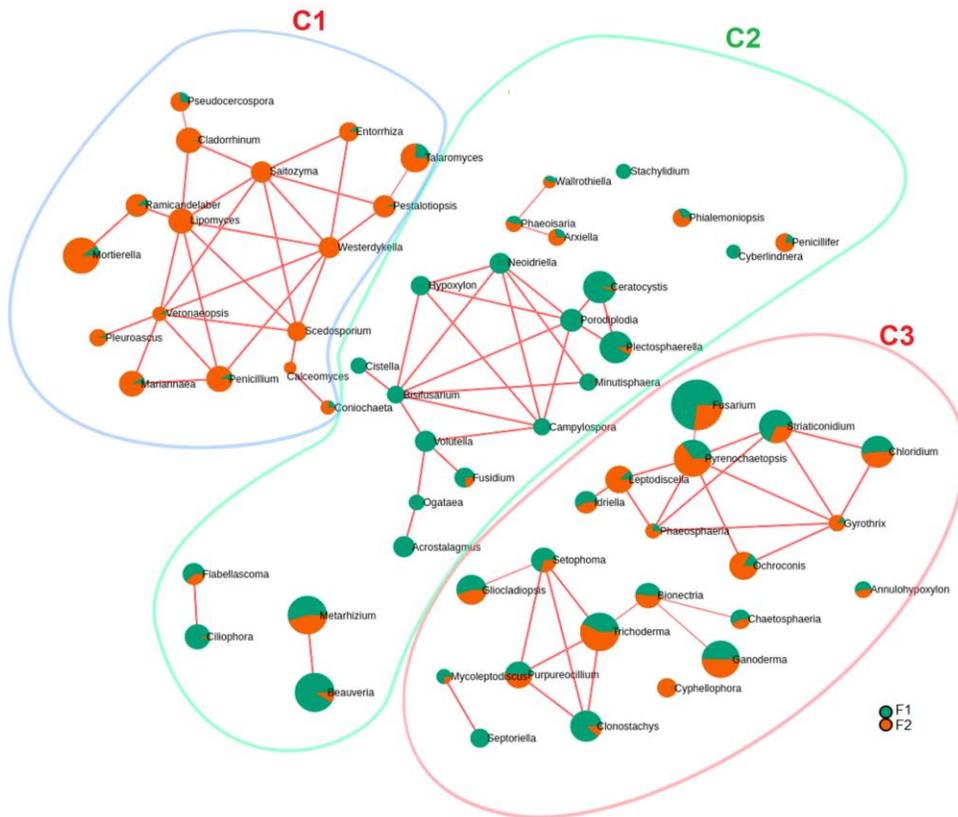
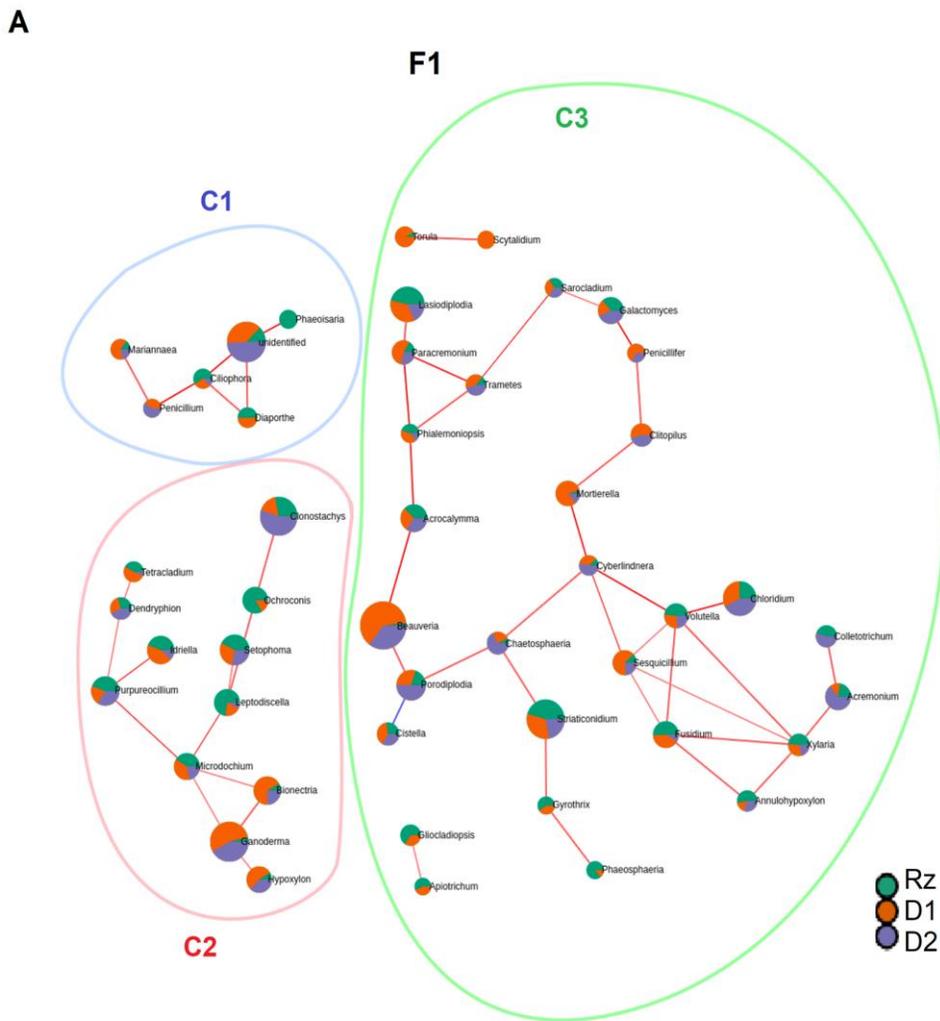


Fig. 3.3 Red de co-ocurrencia de la comunidad fúngica presente en las fincas F1 y F2 a nivel género. Las líneas rojas representan correlaciones positivas ($R^2 > 0,7$). Gráfico de tortas representa porcentaje de abundancia relativa por finca, Verde: finca F1 (F1), Naranja: Finca F2 (F2). Los ovoides representan los conglomerados. Azul: Conglomerado 1 (C1), Verde: conglomerado 2 (C2), Rojo: conglomerado 3 (C3). $n=18$.

Con la finalidad de conocer la co-ocurrencia presente entre los diferentes tipos de suelo colectados: Rz y no Rz (D1 y D2), se realizó una nueva red de co-ocurrencia discriminada por finca, F1 y F2 (Fig. 3.4). En la finca F1, se encontraron 49 nodos, 52 aristas y 3 conglomerados (Fig. 3.4.A). Se observó que no se construyeron agrupaciones de nodos a partir del tipo de muestra y no se observaron aristas mayores a 5 en los nodos. *Xylaria* y *Volutella* presentaron relaciones positivas con 5 nodos. *Fusidium*, *Sesquicillum*, *Cyberlindnera* y *Microdochium* mostraron relación con 4 nodos, estos últimos mostraron tener un patrón de centralidad en sus correspondientes conglomerados. Otros géneros como *Chaetosphaeria*, *Trametes*, *Paracremonium*, *Phialemonopsis*, *Ciliophora*, *Purpureocillium* mostraron tener relación con 3 nodos. El 63% de los géneros solamente tuvo co-ocurrencia con dos o un género. En contraste, en la finca F2 se encontraron 40 nodos, 64 aristas y se formaron tres (3) conglomerados (C1, C2 y C3) a partir de cada tipo

de muestra analizada (Fig. 3.4.B). Los géneros *Penicillium*, *Mariannaea*, *Trichoderma*, *Annulohyphoxylon*, *Bionectria*, *Gliocladiopsis*, *Clonostachys*, *Setophoma* y *Purpureocillium* formaron una red mayor a 8 nodos interconectados (C3), estos géneros se encontraron más abundantes en las muestras de suelo Rz y D1. Por otro lado, *Metarizhium* también se conectó con esta red, que a su vez formó un subconglomerado con otros 5 géneros, siendo este un nodo de centralidad. *Gyrothrix* formó un conglomerado con 6 géneros (*Idriella*, *Phaeosphaeria*, *Ochroconis*, *Leptodiscella*, *Diaporthe* y *Chloridium*) (C2) estos teniendo mayor abundancia en la muestra D2, a excepción del género *Chloridium*. Por otro lado, los géneros *Scytalidium*, *Gliomastix*, *Microdochium*, *Stephanonectria* y *Torula* formaron un tercer conglomerado, estos fueron más abundantes en las muestras Rz y D1.



B

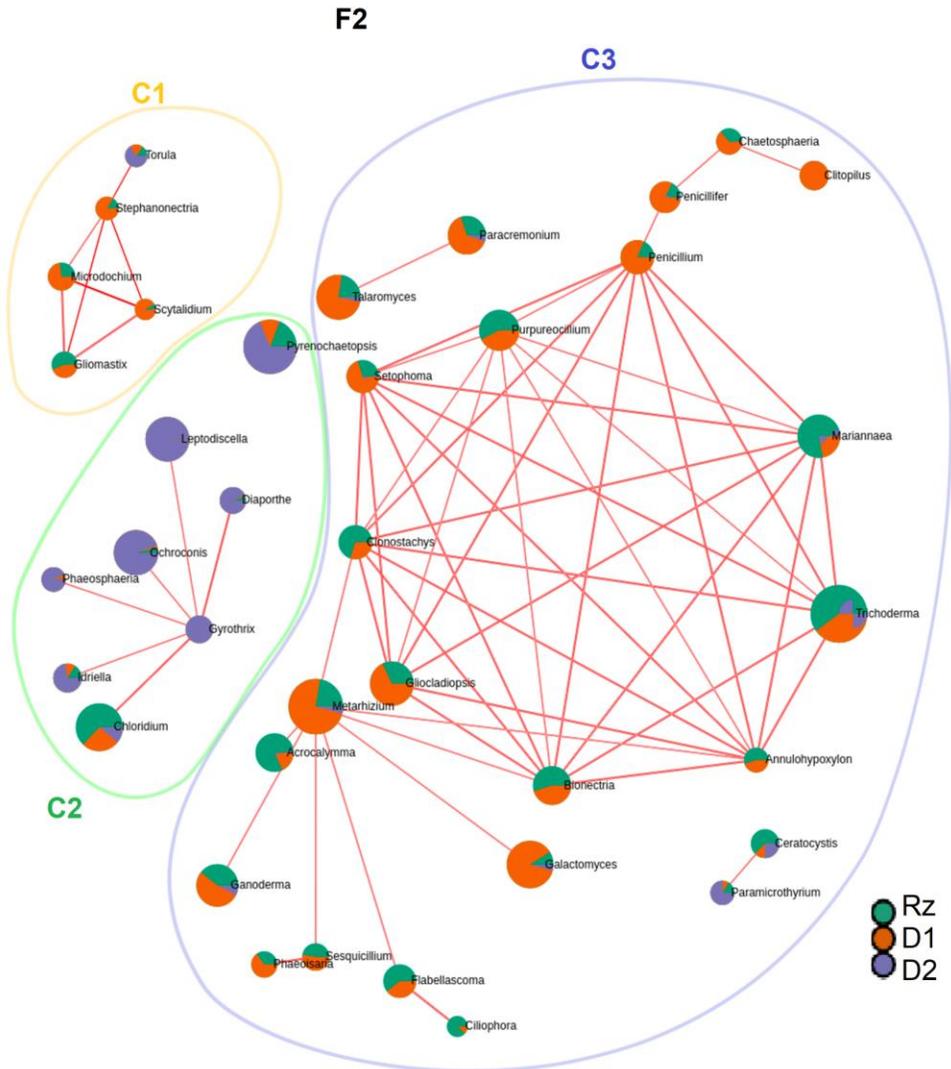


Fig. 3. 4 Red de co-ocurrencia de la comunidad fúngica presentes en las fincas F1, F2 discriminadas por tipo de muestra (Rz: Rizosférico, D1: 0-30 cm, D2: 31-100 cm) a nivel género. **A.** Red de co-ocurrencia para la finca F1, **B.** Red de co-ocurrencia para la finca F2. Las líneas rojas representan correlaciones positivas ($R^2 > 0,7$). Gráfico de tortas representa porcentaje de abundancia relativa por tipo de suelo, Verde: Rz, Naranja: D1, Púrpura: D2. Los ovoides representan los conglomerados. en F1: Azul: Conglomerado 1 (C1), Rojo: conglomerado 2 (C2), Verde: conglomerado 3 (C3), en la F2. Los ovoides representan los conglomerados. Amarillo: Conglomerado 1 (C1), Verde: conglomerado 2 (C2), Azul: conglomerado 3 (C3). n=9.

3.5 Discusión

3.5.1 Influencia de las características fisicoquímicas del suelo en los índices de diversidad

Las bajas correlaciones obtenidas entre los índices de diversidad (Observed features, Shannon, Gini-Simpson) y las propiedades fisicoquímicas evaluadas, a manera global, mostraron que no existe una propiedad físicoquímica del suelo que afecte de manera directa la diversidad alfa de los microbiomas fúngicos presentes en los suelos analizados. Se ha reportado que la diversidad microbiana del suelo está fuertemente influenciada por múltiples factores físicos, químicos y biológicos, (Lamb et al., 2011) y variables como la distribución del tamaño de partículas del suelo (textura), el pH, la capacidad de intercambio catiónico y contenido de materia orgánica del suelo (Obayomi et al., 2021) podrían diversificar las comunidades microbianas del suelo, a través de la creación de microambientes (Tecon & Or, 2017). Por otro lado, los resultados de correlación con las arenas y arcillas mostraron que tienen un impacto en la diversidad y composición de la comunidad fúngica del suelo. Xia et al. (2020) afirma que la diversidad microbiana depende del grado de heterogeneidad y de la proporción de las partículas del suelo (arenas, limos y arcillas), ya que esto afecta la distribución de poros y por lo tanto, la circulación de oxígeno, retención de agua y también la adsorción de cationes y sustancias poliméricas ricas en carbono. Por lo tanto, la textura del suelo promueve la especiación (Carson et al., 2010) y se ha demostrado que los hongos pueden colonizar mejor los poros grandes (> 15 μm) debido a su naturaleza filamentosa y capacidad de construir redes extensas de hifas en busca de recursos (Kravchenko et al., 2011). También, se evidenció una leve correlación negativa de las arenas en la finca F2 que puede estar relacionado con un agotamiento más rápido del agua y privación de recursos, al tener una menor capacidad de intercambio catiónico, generando condiciones subóptimas para el crecimiento fúngico (Seaton et al., 2020) y esto también se podría relacionar con un mayor contenido de arenas en los suelos de la finca F2 (discutido en el capítulo 1 de este estudio). Por otro lado, los resultados en la finca F1 mostraron que el contenido de arcillas puede afectar negativamente la diversidad fúngica, posiblemente porque al aumentar el contenido de

arcillas, aumenta la retención de agua, se reduce el flujo de oxígeno y se aumenta las condiciones anaeróbicas afectando la diversidad fúngica aeróbica (Tedersoo et al., 2020).

Al contrastar los índices de diversidad alfa con las variables químicas del suelo, como el pH, se encontró que éste se correlacionó positivamente con los índices de diversidad de la finca F1 ($R^2 < 0,46$) y negativamente con la finca F2 ($R^2 < -0,52$). Este resultado puede deberse a las condiciones de pH contrastante encontrado en los suelos, en donde la finca F1 presentó un pH ligeramente ácido (6,18 - 6,78) y la finca F2 estaba fuertemente ácido (4,60 - 5,03) (discutidos en el capítulo 1). Se ha reportado que diferencias en pH puede afectar la composición fúngica del suelo (Lladó et al., 2018), donde especies saprótrofas crecen mejor a pH 7 - 8, mientras que especies ectomicorrícicas muestran un crecimiento óptimo a pH 5 - 6 (Yamanaka, 2003). Adicionalmente, el pH regula la actividad enzimática de los microorganismos del suelo (Rousk et al., 2010) y la disponibilidad y absorción de nutrientes (Adamo et al., 2021).

Por otro lado, se observó en ambas fincas que el sodio (Na) mostró una correlación negativa con los índices de diversidad. El Na en el suelo puede causar estrés osmótico en las células microbianas provocando lisis celular (Yan et al., 2015), lo que se evidencia al encontrar una correlación negativa entre la diversidad fúngica y el aumento del contenido de Na en el suelo (Sardinha et al., 2003; Chowdhury et al., 2011). A pesar de que se ha demostrado que algunas especies de hongos tienen mayor capacidad para soportar el estrés por salinidad en comparación con las bacterias (Rath et al., 2016, Rath et al., 2019), debido a la composición de las paredes celulares quitinosas de los hongos, que les brindan protección contra bajos potenciales matriciales y al aumento de ergosterol como mecanismo de tolerancia (Manzoni et al., 2012).

La correlación positiva observada entre abundancia y riqueza con el contenido de Cdt presente en los suelos de la finca F1 (5,66 - 14,97 mg kg⁻¹), podría mostrar que las comunidades que habitan estos suelos se han adaptado a la alta contaminación natural de Cd. Posiblemente, el resultado sería diferente si la contaminación fuera artificial y temporal donde la evaluación de la diversidad de la comunidad se realizará en periodos cortos de tiempo como lo propone Lin et al., (2020). Resultados similares encontrados en esta investigación también fueron reportados por Guo et al. (2022) en suelos contaminados naturalmente con Cd, en donde se encontró que el índice de Shannon se vio positivamente relacionado con el Cdt (Lin et al., 2020). En general, las correlaciones encontradas en este

estudio entre la diversidad fúngica con las variables fisicoquímicas del suelo fueron débiles (no mayores a 0,75) y esto puede mostrar que la estructura de las comunidades fúngicas está determinada de forma multifactorial por las características del suelo (Schmidt et al., 2014). Sin embargo, si se analiza los taxones de manera individual y no de manera global, los resultados serían diferentes y se podría identificar qué características fisicoquímicas del suelo podrían estar afectando los taxones presentes, como lo reporta Leff et al., (2015). No obstante, se requeriría contar con mayor número de muestras.

3.5.2 Asociación entre la abundancia relativa de las comunidades fúngicas y las propiedades fisicoquímicas del suelo

El análisis de RDA con las variables físicas mostraron que los limos y las arcillas correspondieron con los géneros fúngicos de mayor representación pertenecientes en su mayoría al phylum *Ascomycota* y en menor medida al phylum *Basidiomycota*. Este resultado es similar a lo encontrado por Xia et al., (2020) en suelos de pastizales. Los limos y las arcillas proporcionan nutrientes inorgánicos y facilitan la colonización del suelo (Seaton et al., 2020). Adicionalmente, Nishiyama et al. (2012) afirman que la composición mineral en los suelos impacta la asociación microbiana y la abundancia de estos. *Fusarium*, *Beauveria*, y *Trichoderma*, pertenecientes al orden de los *Hypocreales* fueron los géneros con mayor representación en el RDA, encontrados en este estudio. Este resultado también fue reportado por Xia et al., (2020) quienes reportan una fuerte correlación de estos géneros con las arcillas del suelo. Estos géneros se caracterizan por tener hábitos saprófitos facultativos y nectrótrofos (Guarro et al., 2012). Por otro lado, los géneros del phylum *Basidiomycota* como *Agaricus* y *Myxarium* se encontraron más alejados de las arcillas y limos, encontrándose más cercanos a las arenas.

El RDA analizado por características químicas mostró que el N, CO y pH, se relacionó mejor con todos los géneros fúngicos que el CT. El pH del suelo y el contenido de CO, son esenciales para el metabolismo de los hongos y se correlacionan con la diversidad fúngica (Grządziel & Gałązka, 2019). El pH del suelo puede afectar la estructura de la comunidad fúngica cambiando la disponibilidad de nutrientes o imponiendo algunas limitaciones fisiológicas en el crecimiento de los hongos (Marschner et al. 2005). Por otro lado, los hongos son heterótrofos y dependen del suministro exógeno de materia orgánica para su crecimiento (Broeckling et al. 2008), lo que se evidencia en el contenido de CO y N encontrado en estos suelos, lo cual puede ser el resultado de la descomposición de los

residuos vegetales, como la hojarasca. Sin embargo, géneros como *Beauveria* y *Clonostachys* mostraron una menor correspondencia con estas variables fisicoquímicas, posiblemente porque estos géneros tienen un hábitat diferente y son conocidos también como entoparasitarios (Mantzoukas et al., 2021) y micoparasitarios (Krauss et al., 2013) donde la energía es tomada de fuentes diferentes.

En cuanto a las bases intercambiables, el Na fue la variable que no se relacionó con ningún género, esto puede deberse a que los géneros corresponden a patótrofos, saprótrofos, simbiótrofos, se han reportado como microorganismos sensibles a la presencia de Na y Al^{3+} (Li et al., 2020). Mientras que los géneros se agruparon mejor con el Ca, K, Mg; que si bien no se ha demostrado un efecto directo de estos cationes en la comunidad fúngica, estas bases intercambiables influyen el pH del suelo y la capacidad de intercambio catiónico (Muneer et al., 2021). Por otro lado, familias como *Aspergillaceae*, *Mortierellaceae*, *Sordariaceae* se ven relacionadas con al menos un catión del suelo en cultivos de trigo (Yin et al., 2021), mostrando una relación de las familias con las bases intercambiables.

En este estudio los géneros presentes en el RDA se relacionaron con otros cationes del suelo como Zn, Mn, B y Cu. Se ha demostrado que el Zn y Cu, que son metales pesados esenciales, al aumentar pueden afectar la abundancia y diversidad de la comunidad fúngica en el suelo (Wu et al., 2022). Algunos hongos como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Fusarium* y *Aspergillus* han sido evaluados por su capacidad de tolerancia a Zn y Cu (Pečiulytė & Dirginčiūtė-Volodkienė, 2012). Estos resultados sugieren que la interacción de todas estas propiedades fisicoquímicas del suelo tiene efecto sobre la diversidad fúngica y no solamente la condición de estrés y selección que causa los niveles de Cd encontrados.

El orden que más se relacionó con todos los RDA analizados fue *Hypocreales* (*Beauveria*, *Clonostachys*, *Fusarium* y *Trichoderma*). Este orden se ha reportado ampliamente en suelos agrícolas por su capacidad de colonizar rápidamente residuos vegetales que se encuentran sobre la superficie del suelo y por tener hábitos mayoritariamente saprótrofos, necrótrofos y endofitos (Poll et al., 2010; Ma et al., 2013; Egidi et al., 2019). Se ha establecido que los hongos saprótrofos se encuentran más estrechamente asociados con los nutrientes del suelo, lo que podría atribuirse a sus rasgos funcionales asociados con la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes en el suelo (Ceci et al., 2018). Entre los géneros encontrados, *Fusarium* fue el género que mejor se correlacionó

con las variables fisicoquímicas. Challacombe et al. (2019) menciona que este es uno de los géneros más abundantes en los suelos del mundo, por su capacidad para producir esporas de resistencia llamadas clamidosporas e hifas resistentes que les permiten sobrevivir en el suelo a condiciones ambientales adversas (Latiffah et al., 2010). Otros géneros que también se representaron con las variables fisicoquímicas del suelo fueron *Plectosphaerella* (*Glomerellales*), *Rousoella* (*pleosporales*). En contraste, el género *Mortierella* (*Mortierellales*) se relacionó menos con las variables fisicoquímicas, es también saprófito, y está ampliamente distribuido en suelos (Fröhlich-Nowoisky et al., 2015) y ha sido reportado por no mostrar preferencias con variables del suelo como pH y la textura (Grządziel & Gałazka, 2019).

3.5.3 Redes de Co-ocurrencia de géneros fúngicos

La red de co-ocurrencia construida tomando como variables categoricas las fincas F1 y F2 mostró que la estructura de la comunidad fúngica se vio seleccionada por las fincas, mostrando tres conglomerados con redes de géneros únicos para cada finca y géneros compartidos. La construcción de estos conglomerados pueden ser el resultado de las condiciones del microambiente que se presentan en cada finca y afectan la estructura de la comunidad fúngica. De esta manera se identificaron microorganismos que han sido reportados para condiciones ambientales similares (Goberna & Verdú, 2022). En este estudio como se discutió en el capítulo 1, los suelos cacaoteros de la finca F1 presentaron un pH moderadamente ácido (6,21-6,78), mayor CICE, mayores contenidos de P y Ca; a su vez el contenido de Cdt fue 5,6 veces mayor y los suelos presentaron una textura más homogénea, con relación a la finca F2 lo que crea microambientes diferentes que impactan la estructura de la comunidad fúngica. Estos microambientes permitieron identificar géneros únicos para cada finca (conglomerado C1 y C2) y géneros con mayor plasticidad logrando adaptarse a ambas condiciones (conglomerado C3). Goberna et al. (2019) ha planteado que los patrones de co-ocurrencia pueden explicarse en función de las preferencias de nicho abiótico de los microorganismos, como los parámetros fisicoquímicos del suelo. Los patrones de relación observados en este estudio podrían relacionarse con lo reportado por Zhao et al. (2021) quienes encontraron que la textura del suelo y los metales pesados son factores determinantes en la presión de selección de microorganismos.

Al revisar los géneros que comparten más de una arista en el conglomerado C2, nodos con mayor abundancia para la finca F1, solo *Hypoxylon*, un género conocido como lignocelulolítico, ha sido reportado como tolerante a Cd (Tamariz-Angeles et al., 2021) y potencial bioremediador (Memić et al., 2020), mientras que los otros géneros como *Neodriella*, *Porodiplodia*, *Minutisphaera*, *Campyospora*, *Bisifusarium* y *Volutella* son poco estudiados o son conocidos como especies raras. Zhu et al. (2022) han estudiado que el efecto del Cd en las redes de co-ocurrencia en zonas mineras presentan redes con mayores conexiones entre taxones raros y poco estudiados, debido a su limitada abundancia. Por otro lado, géneros como *Fusidium* y *Ceratocystis* han sido reportados por su capacidad de producir ácido fusídico (Fernandes, 2016), y como bioacumulador de Cr (Samuel et al., 2015) y patógeno de cacao (Engelbrecht et al., 2007), respectivamente. Adicionalmente, *Metarhizium* y *Beauveria* también son tolerantes a Cd (Ignatova et al., 2021).

Los géneros presentes en ambas fincas (conglomerado C3), han sido reportados como géneros que exhiben tolerancia a Cd como *Clonostachys* (Wang et al., 2022), *Trichoderma* (Nongmaithem et al., 2016), *Purpureocillium* (Deng et al., 2021). *Pyrenochaetopsis* y *Fusarium* han sido reportados como indicadores de prácticas agrícolas (Li et al., 2022). Por otro lado, el conglomerado C1 que contenían géneros de mayor abundancia en la finca F2 mostraron mayor número de relaciones positivas lo que podría significar que hay mayor interacción entre ellos posiblemente las condiciones fisicoquímicas y Cd encontradas ($<1,75 \text{ mg kg}^{-1}$). Zhao et al. (2021) han reportado que los metales pesados alteran las interacciones de la red entre diferentes poblaciones microbianas, y en las redes se establecen las interacciones positivas que pueden reflejar que los metales pesados provocarían más vínculos entre los microorganismos puesto que podría existir una relación de cooperación entre sí para hacer frente a la condición de estrés.

Al observar la red construida para la finca F1 y discriminada por tipo de muestra (RZ, D1 y D2), se observó que no existen patrones de co-ocurrencia definidos y las relaciones que se establecieron tuvieron aristas menores a cinco por nodo, lo que indica que son muy pocos los géneros únicos que establecen relaciones entre sí, destacándose suelos no Rz (D1 y D2) que no están presentes en los suelos Rz. Esto tiene sentido ya que la rizosfera es un ambiente distinto del suelo no Rz y la interacción con las plantas genera ambientes diferentes (Hakim et al., 2022), Los géneros presentes solo en suelos no rizosféricos tienen

hábitos mayoritariamente saprófitos, lignocelulolíticos y entomoparasitarios. La composición de la red podría sugerir que la alta concentración de Cdt y los parámetros fisicoquímicos encontrados en la finca F1 es causante del bajo número de interacciones entre los nodos. Se observó un conglomerado con mayor número de nodos (C3), donde géneros como *Cyberlindnera* un género lignocelulolítico, ha sido reportado por mostrar tolerancia a Cr (Tkavc et al., 2018). Otros géneros como *Trametes* han mostrado que su biomasa puede absorber altas concentraciones de Cr, Zn y Pb (Bayramoglu, 2003). El segundo conglomerado encontrado (C2), presentó mayor número de géneros presentes en los tres tipos de suelos, el género centralizador fue *Microdochium* que ha sido reportado como un endófito que confiere tolerancia al trigo a condiciones de estrés por Cd (Shadmani et al., 2021). En contraste, la red de co-ocurrencia obtenida para la finca F2 y discriminada por tipo de muestra, presentó un mayor número de conexiones entre los nodos, y los conglomerados se formaron a partir de la separación de abundancias por el tipo de muestra, donde el suelo D2, formó un conglomerado con géneros únicos lo que demuestra que la profundidad del suelo tiene condiciones diferentes a las encontradas en la superficie del suelo (D1). Por otro lado, los géneros encontrados en D1 se comparten en su mayoría con Rz. Los resultados observados en esta red en comparación con la de la finca F1, podría indicar el efecto del contenido de Cd y de las propiedades fisicoquímicas sobre la diversidad de los microbiomas encontrados en los suelos. Esto debido a que el número de conexiones entre nodos fue mayor, indicando una mejor estructuración de la comunidad fúngica, que puede estar más relacionada con la profundidad, la textura y los cambios en los contenidos de carbono, nitrógeno, pH y oxígeno

3.6 Conclusiones

- Las propiedades fisicoquímicas de los suelos cacaoteros estudiados presentaron bajas correlaciones con los índices de diversidad alfa mostrando que la estructura de las comunidades fúngicas está determinada por múltiples factores principalmente por la textura, el pH, CO, N, Na y Cdt.
- La correlación positiva observada entre la riqueza y abundancia relativa con el contenido de Cdt presente en los suelos de la finca F1, podría mostrar que las comunidades fúngicas que habitan estos suelos se han adaptado a concentraciones altas de Cd natural.

- Se encontró que las arcillas, los limos y variables como el pH, N, CO, las bases intercambiables excepto el Na, el Cd, Zn, B y Cu se relacionan positivamente con los géneros fúngicos presentes en suelos cacaoteros.
- El orden Hypocreales (Beauveria, Clonostachys, Fusarium y Trichoderma) correspondieron mejor con las variables físicoquímicas. Este orden se encuentra ampliamente presente en suelos agrícolas y pueden colonizar rápidamente residuos vegetales que se disponen sobre la superficie del suelo. Estos géneros también han sido reportados como tolerantes a Cd.
- Las redes de co-ocurrencia mostraron géneros fúngicos únicos y compartidos por finca. A su vez, se encontró que en la finca F2 el tipo de suelo mostró que los géneros cambian su estructura de acuerdo con la profundidad del suelo, mientras que en la finca F1, presentó una estructura más homogénea posiblemente a los altos contenido de Cd y propiedades físicoquímicas encontradas en estos suelos.

3.7 Bibliografía

- Adamo, I., Castaño, C., Bonet, J. A., Colinas, C., Martínez de Aragón, J., & Alday, J. G. (2021). Soil physico-chemical properties have a greater effect on soil fungi than host species in Mediterranean pure and mixed pine forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 160, 108320. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108320>
- Ainsworth, G. C., & Bisby, G. R. (2011). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi* (P. M. Kirk, Ed.; 10. ed. 2011). CABI.
- Amacher, M. C. (2018). Nickel, cadmium, and lead. En D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, & M. E. Sumner (Eds.), *SSSA Book Series* (pp. 739-768). Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c28>
- Anahid, S., Yaghmaei, S., & Ghobadinejad, Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*, 18(3), 502-508. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.05.015>
- Anderson, C., Beare, M., Buckley, H. L., & Lear, G. (2017). Bacterial and fungal communities respond differently to varying tillage depth in agricultural soils. *PeerJ*, 5, e3930. <https://doi.org/10.7717/peerj.3930>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Akhtar, N., & Mannan, M. A. (2020). Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. *Biotechnology Reports*, 26, e00452. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>
- Antunes, L. P., Martins, L. F., Pereira, R. V., Thomas, A. M., Barbosa, D., Lemos, L. N., Silva, G. M. M., Moura, L. M. S., Epamino, G. W. C., Digiampietri, L. A., Lombardi, K. C., Ramos, P. L., Quaggio, R. B., de Oliveira, J. C. F., Pascon, R. C., Cruz, J. B. da, da Silva, A. M., & Setubal, J. C. (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through

metagenomics and metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 6(1), 38915. <https://doi.org/10.1038/srep38915>

Armitage, D. W., & Jones, S. E. (2019). How sample heterogeneity can obscure the signal of microbial interactions. *The ISME Journal*, 13(11), 2639-2646. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0463-3>

Ashrafi, S., Stadler, M., Dababat, A. A., Richert-Pöggeler, K. R., Finckh, M. R., & Maier, W. (2017). *Monocillium gamsii* sp. nov. and *Monocillium bulbillosum*: Two nematode-associated fungi parasitising the eggs of *Heterodera filipjevi*. *MycKeys*, 27, 21-38. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.27.21254>

Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A. Y., Gattinger, A., Keller, T., Charles, R., & van der Heijden, M. G. A. (2019). Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *The ISME Journal*, 13(7), 1722-1736. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0383-2>

Bauer, R., Garnica, S., Oberwinkler, F., Riess, K., Weiß, M., & Begerow, D. (2015). Entorrhizomycota: A new fungal phylum reveals new perspectives on the evolution of fungi. *PLOS ONE*, 10(7), e0128183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128183>

Bayramoglu, G. (2003). Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 101(3), 285-300. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00178-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00178-X)

Beimforde, C., Feldberg, K., Nylinder, S., Rikkinen, J., Tuovila, H., Dörfelt, H., Gube, M., Jackson, D. J., Reitner, J., Seyfullah, L. J., & Schmidt, A. R. (2014). Estimating the Phanerozoic history of the Ascomycota lineages: Combining fossil and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78, 386-398. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.024>

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science [Preprint]. *PeerJ Preprints*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>

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>

Carney, K. M., & Matson, P. A. (2005). Plant communities, soil microorganisms, and soil carbon cycling: Does altering the world belowground matter to ecosystem functioning? *Ecosystems*, 8(8), 928-940. <https://doi.org/10.1007/s10021-005-0047-0>

Carson, J. K., Gonzalez-Quiñones, V., Murphy, D. V., Hinz, C., Shaw, J. A., & Gleeson, D. B. (2010). Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3936-3942. <https://doi.org/10.1128/AEM.03085-09>

Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F., Persiani, A. M., & Gadd, G. M. (2019). Roles of saprotrophic fungi in biodegradation or transformation of organic and inorganic pollutants in co-contaminated sites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 53-68. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9451-1>

- Challacombe, J. F., Hesse, C. N., Bramer, L. M., McCue, L. A., Lipton, M., Purvine, S., Nicora, C., Gallegos-Graves, L. V., Porrás-Alfaro, A., & Kuske, C. R. (2019). Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, 20(1), 976. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6358-x>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, 15(3), 799-821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Coller, E., Cestaro, A., Zanzotti, R., Bertoldi, D., Pindo, M., Larger, S., Albanese, D., Mescalchin, E., & Donati, C. (2019). Microbiome of vineyard soils is shaped by geography and management. *Microbiome*, 7(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0758-7>
- Creamer, R. E., Hannula, S. E., Leeuwen, J. P. V., Stone, D., Rutgers, M., Schmelz, R. M., Ruiters, P. C. de, Hendriksen, N. B., Bolger, T., Bouffaud, M. L., Buee, M., Carvalho, F., Costa, D., Dirilgen, T., Francisco, R., Griffiths, B. S., Griffiths, R., Martin, F., Silva, P. M. da, ... Lemanceau, P. (2016). Ecological network analysis reveals the inter-connection between soil biodiversity and ecosystem function as affected by land use across Europe. *Applied Soil Ecology*, 97, 112-124. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.006>
- Dai, W., Chen, J., & Xiong, J. (2019). Concept of microbial gatekeepers: Positive guys? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 633-641. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9522-3>
- Dasgupta, D., & Brahma Prakash, G. P. (2021). Soil microbes are shaped by soil physico-chemical properties: A brief review of existing literature. *International Journal of Plant & Soil Science*, 59-71. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2021/v33i130409>
- De Beenhouwer, M., Aerts, R., & Honnay, O. (2013). A global meta-analysis of the biodiversity and ecosystem service benefits of coffee and cacao agroforestry. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 175, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.05.003>
- de Vries, F. T., Griffiths, R. I., Bailey, M., Craig, H., Girlanda, M., Gweon, H. S., Hallin, S., Kaisermann, A., Keith, A. M., Kretschmar, M., Lemanceau, P., Lumini, E., Mason, K. E., Oliver, A., Ostle, N., Prosser, J. I., Thion, C., Thomson, B., & Bardgett, R. D. (2018). Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks. *Nature Communications*, 9(1), 3033. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05516-7>
- Degens, B. (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(2), 189-196. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00141-8)
- Delgado-Baquerizo, M., Reith, F., Dennis, P. G., Hamonts, K., Powell, J. R., Young, A., Singh, B. K., & Bissett, A. (2018). Ecological drivers of soil microbial diversity and soil biological networks in the Southern Hemisphere. *Ecology*, 99(3), 583-596. <https://doi.org/10.1002/ecy.2137>
- Deng, Y., Huang, H., Fu, S., Jiang, L., Liang, Y., Liu, X., Jiang, H., & Liu, H. (2021). Cadmium uptake and growth responses of potted vegetables to the Cd-contaminated soil inoculated with Cd-tolerant *Purpureocillium lilacinum* n1. *Minerals*, 11(6), 622. <https://doi.org/10.3390/min11060622>
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, 10(1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of The Total Environment*, 678, 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>

- Engelbrecht, C. J., Harrington, T. C., & Alfenas, A. (2007). Ceratocystis wilt of cacao—A disease of increasing importance. *Phytopathology*, 97(12), 1648-1649. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-12-1648>
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141), 1237439. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Fenner, N., & Freeman, C. (2011). Drought-induced carbon loss in peatlands. *Nature Geoscience*, 4(12), 895-900. <https://doi.org/10.1038/ngeo1323>
- Fernandes, P. (2016). Fusidic acid: A bacterial elongation factor inhibitor for the oral treatment of acute and chronic staphylococcal infections. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(1), a025437. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025437>
- Fierer, N., Strickland, M. S., Liptzin, D., Bradford, M. A., & Cleveland, C. C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 12(11), 1238-1249. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01360.x>
- Fraç, M., Hannula, S. E., Belka, M., & Jędryczka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in Microbiology*, 9, 707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- Freilich, M. A., Wieters, E., Broitman, B. R., Marquet, P. A., & Navarrete, S. A. (2018). Species co-occurrence networks: Can they reveal trophic and non-trophic interactions in ecological communities? *Ecology*, 99(3), 690-699. <https://doi.org/10.1002/ecy.2142>
- Friedman, J., & Alm, E. J. (2012). Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Computational Biology*, 8(9), e1002687. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002687>
- Fröhlich-Nowoisky, J., Hill, T. C. J., Pummer, B. G., Yordanova, P., Franc, G. D., & Pöschl, U. (2015). Ice nucleation activity in the widespread soil fungus <i>Mortierella alpina</i>. *Biogeosciences*, 12(4), 1057-1071. <https://doi.org/10.5194/bg-12-1057-2015>
- Gadd, G. M. (2021). Fungal biomineralization. *Current Biology*, 31(24), R1557-R1563. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.041>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 243-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Ghosh, S. (2021). Fungi-mediated detoxification of heavy metals: En S. Dey & B. Acharya (Eds.), *Advances in Environmental Engineering and Green Technologies* (pp. 205-219). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-4888-2.ch011>
- Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., & Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: A case study from Colombia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(4), 2455-2476. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03299-x>
- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2224. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>
- Goberna, M., Montesinos-Navarro, A., Valiente-Banuet, A., Colin, Y., Gómez-Fernández, A., Donat, S., Navarro-Cano, J. A., & Verdú, M. (2019). Incorporating phylogenetic metrics to microbial

co-occurrence networks based on amplicon sequences to discern community assembly processes. *Molecular Ecology Resources*, 19(6), 1552-1564. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13079>

Goberna, M., & Verdú, M. (2022). Cautionary notes on the use of co-occurrence networks in soil ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 166, 108534. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108534>

Grządziel, J., & Gałazka, A. (2019). Fungal biodiversity of the most common types of polish soil in a long-term microplot experiment. *Frontiers in Microbiology*, 10, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00006>

Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A.M. and Figueras, M.J. (2012). Atlas of Soil Ascomycetes. Issue 10 of CBS Biodiversity Series, Holland.

Guo, P., Wang, C., Jia, Y., Wang, Q., Han, G., & Tian, X. (2011). Responses of soil microbial biomass and enzymatic activities to fertilizations of mixed inorganic and organic nitrogen at a subtropical forest in East China. *Plant and Soil*, 338(1-2), 355-366. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0550-8>

Guo, Y., Cheng, S., Fang, H., Yang, Y., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Responses of soil fungal taxonomic attributes and enzyme activities to copper and cadmium co-contamination in paddy soils. *Science of The Total Environment*, 844, 157119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157119>

Haj-Amor, Z., Araya, T., Kim, D.-G., Bouri, S., Lee, J., Ghiloufi, W., Yang, Y., Kang, H., Jhariya, M. K., Banerjee, A., & Lal, R. (2022). Soil salinity and its associated effects on soil microorganisms, greenhouse gas emissions, crop yield, biodiversity and desertification: A review. *Science of The Total Environment*, 843, 156946. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156946>

Hakim, S., Nawaz, M. S., Siddique, M. J., Hayat, M., Gulzar, U., & Imran, A. (2022). Metagenomics for rhizosphere engineering. En *Rhizosphere Engineering* (pp. 395-416). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89973-4.00022-3>

Hirano, H., & Takemoto, K. (2019). Difficulty in inferring microbial community structure based on co-occurrence network approaches. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2915-1>

Ignatova, L., Kistaubayeva, A., Brazhnikova, Y., Omirbekova, A., Mukasheva, T., Savitskaya, I., Karpenyuk, T., Goncharova, A., Egamberdieva, D., & Sokolov, A. (2021). Characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from soybean (*Glycine max*) and barley (*Hordeum vulgare*). *Heliyon*, 7(11), e08240. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08240>

Jiao, S., Chen, W., Wang, J., Du, N., Li, Q., & Wei, G. (2018). Soil microbiomes with distinct assemblies through vertical soil profiles drive the cycling of multiple nutrients in reforested ecosystems. *Microbiome*, 6(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0526-0>

Karimi, B., Maron, P. A., Chemidlin-Prevost Boure, N., Bernard, N., Gilbert, D., & Ranjard, L. (2017). Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 265-281. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0614-6>

Kirchman, D. L. (2018). Processes in microbial ecology (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198789406.001.0001>

Koranda, M., Kaiser, C., Fuchslueger, L., Kitzler, B., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S., & Richter, A. (2014). Fungal and bacterial utilization of organic substrates depends on substrate complexity and N availability. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 142-152. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12214>

Krauss, U., Ten Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., Arroyo, C., Corrales, E., & Casanoves, F. (2013). Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. From cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control*, 67(3), 317-327. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.011>

Kravchenko, A., Falconer, R. E., Grinev, D., & Otten, W. (2011). Fungal colonization in soils with different management histories: Modeling growth in three-dimensional pore volumes. *Ecological Applications*, 21(4), 1202-1210. <https://doi.org/10.1890/10-0525.1>

Lamb, E. G., Kennedy, N., & Siciliano, S. D. (2011). Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant and Soil*, 338(1-2), 483-495. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0560-6>

Latiffah, Z., Mah Kok, F., Heng Mei, H., Maziah, Z., & Baharuddin, S. (2010). *Fusarium* species isolated from mangrove soil in kampung pantai aceh, balik pulau, pulau pinang, malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 21(1), 21-29.

Lee, K. K., Kim, H., & Lee, Y.-H. (2022). Cross-kingdom co-occurrence networks in the plant microbiome: Importance and ecological interpretations. *Frontiers in Microbiology*, 13, 953300. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953300>

Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L., Harpole, W. S., Hobbie, S. E., Hofmockel, K. S., Knops, J. M. H., McCulley, R. L., La Pierre, K., Risch, A. C., Seabloom, E. W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C. J., & Fierer, N. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967-10972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508382112>

Lehmann, A., Zheng, W., Ryo, M., Soutschek, K., Roy, J., Rongstock, R., Maaß, S., & Rillig, M. C. (2020). Fungal traits important for soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2904. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02904>

Li, F., Jin, Z., Wang, Z., Liao, Y., Yu, L., & Li, X. (2022). Host plant selection imprints structure and assembly of fungal community along the soil-root continuum. *MSystems*, 7(4), e00361-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00361-22>

Li, B., Xu, R., Sun, X., Han, F., Xiao, E., Chen, L., Qiu, L., & Sun, W. (2021). Microbiome–environment interactions in antimony-contaminated rice paddies and the correlation of core microbiome with arsenic and antimony contamination. *Chemosphere*, 263, 128227. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128227>

Li, Y., Li, Z., Arafat, Y., & Lin, W. (2020). Studies on fungal communities and functional guilds shift in tea continuous cropping soils by high-throughput sequencing. *Annals of Microbiology*, 70(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01555-y>

Lin, Y., Xiao, W., Ye, Y., Wu, C., Hu, Y., & Shi, H. (2020). Adaptation of soil fungi to heavy metal contamination in paddy fields—A case study in eastern China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27819-27830. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09049-9>

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>

Liu, H., Wang, C., Xie, Y., Luo, Y., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2020). Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an

- enterprise-intensive region. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122478. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122478>
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2018). Drivers of microbial community structure in forest soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4331-4338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8950-4>
- Lorena, B.-B., Javiera, O., & Jean Franco, C. (2021). Facultative fungal endophytes and their potential for the development of sustainable agriculture. En *Microbial Management of Plant Stresses* (pp. 1-12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85193-0.00014-0>
- Ma, A., Zhuang, X., Wu, J., Cui, M., Lv, D., Liu, C., & Zhuang, G. (2013). Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in arable soil. *PLoS ONE*, 8(6), e66146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066146>
- Malik, A. A., Chowdhury, S., Schlager, V., Oliver, A., Puissant, J., Vazquez, P. G. M., Jehmlich, N., von Bergen, M., Griffiths, R. I., & Gleixner, G. (2016). Soil fungal:bacterial ratios are linked to altered carbon cycling. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01247>
- Memić, M., Vrtačnik, M., Boh, B., Pohleven, F., & Mahmutović, O. (2020). Biodegradation of pahs by ligninolytic fungi *hypoxylon fragiforme* and *conioophora puteana*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 40(2), 206-213. <https://doi.org/10.1080/10406638.2017.1392326>
- Mendoza, O. H., Portilla, K. A., Pérez, A., Castellanos, F. y Orejuela, C.J., (2020). Cadmio-(Cd) En: Atlas Geoquímico de Colombia, versión 2020, Bogotá: Servicio Geológico Colombiano.
- Mantzoukas, S., Lagogiannis, I., Mpousia, D., Ntoukas, A., Karmakolia, K., Eliopoulos, P. A., & Poulas, K. (2021). *Beauveria bassiana* endophytic strain as plant growth promoter: The case of the grape vine *vitis vinifera*. *Journal of Fungi*, 7(2), 142. <https://doi.org/10.3390/jof7020142>
- Matchado, M. S., Lauber, M., Reitmeier, S., Kacprowski, T., Baumbach, J., Haller, D., & List, M. (2021). Network analysis methods for studying microbial communities: A mini review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2687-2698. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>
- Mhete, M., Eze, P. N., Rahube, T. O., & Akinyemi, F. O. (2020). Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. *Scientific African*, 7, e00246. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00246>
- Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodiatheobromae*(Pat.) Griffon & Maubl [(Syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Muneer, M. A., Huang, X., Hou, W., Zhang, Y., Cai, Y., Munir, M. Z., Wu, L., & Zheng, C. (2021). Response of fungal diversity, community composition, and functions to nutrients management in red soil. *Journal of Fungi*, 7(7), 554. <https://doi.org/10.3390/jof7070554>
- Naveed, M., Herath, L., Moldrup, P., Arthur, E., Nicolaisen, M., Norgaard, T., Ferré, T. P. A., & de Jonge, L. W. (2016). Spatial variability of microbial richness and diversity and relationships with soil organic carbon, texture and structure across an agricultural field. *Applied Soil Ecology*, 103, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.004>
- Naylor, D., McClure, R., & Jansson, J. (2022). Trends in microbial community composition and function by soil depth. *Microorganisms*, 10(3), 540. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030540>

- Nicolitch, O., Feucherolles, M., Churin, J.-L., Fauchery, L., Turpault, M.-P., & Uroz, S. (2019). A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. *Scientific Reports*, 9(1), 14403. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50730-y>
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259-D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Nishiyama, M., Sugita, R., Otsuka, S., & Senoo, K. (2012). Community structure of bacteria on different types of mineral particles in a sandy soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 58(5), 562-567. <https://doi.org/10.1080/00380768.2012.729226>
- Nongmaithem, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2016). Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.008>
- Obayomi, O., Seyoum, M. M., Ghazaryan, L., Tebbe, C. C., Murase, J., Bernstein, N., & Gillor, O. (2021). Soil texture and properties rather than irrigation water type shape the diversity and composition of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 161, 103834. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103834>
- Oueriaghli, N., Castro, D. J., Llamas, I., Béjar, V., & Martínez-Checa, F. (2018). Study of bacterial community composition and correlation of environmental variables in rambla salada, a hypersaline environment in south-eastern Spain. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01377>
- Pečiulytė, D., & Dirginčiūtė-Volodkienė, V. (2012). Effect of zinc and copper on cultivable populations of soil fungi with special reference to entomopathogenic fungi. *Ekologija*, 58(2). <https://doi.org/10.6001/ekologija.v58i2.2524>
- Poll, C., Brune, T., Begerow, D., & Kandeler, E. (2010). Small-scale diversity and succession of fungi in the detritosphere of rye residues. *Microbial Ecology*, 59(1), 130-140. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9541-9>
- Proulx, S., Promislow, D., & Phillips, P. (2005). Network thinking in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(6), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.004>
- Raich, J. W., Clark, D. A., Schwendenmann, L., & Wood, T. E. (2014). Aboveground tree growth varies with belowground carbon allocation in a tropical rainforest environment. *PLoS ONE*, 9(6), e100275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100275>
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology: Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(2), 142-160. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x>
- Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 157-184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>

- Riess, K., Schön, M. E., Ziegler, R., Lutz, M., Shivas, R. G., Piątek, M., & Garnica, S. (2019). The origin and diversification of the Entorrhizales: Deep evolutionary roots but recent speciation with a phylogenetic and phenotypic split between associates of the Cyperaceae and Juncaceae. *Organisms Diversity & Evolution*, 19(1), 13-30. <https://doi.org/10.1007/s13127-018-0384-4>
- Rodríguez Albarracín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>
- Rousk, J., Brookes, P. C., & Bååth, E. (2010). Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(6), 926-934. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.009>
- Samuel, M. S., E.A. Abigail, M., & Ramalingam, C. (2015). Biosorption of Cr(VI) by *Ceratocystis paradoxa* msr2 using isotherm modelling, kinetic study and optimization of batch parameters using response surface methodology. *PLOS ONE*, 10(3), e0118999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118999>
- Schappe, T., Albornoz, F. E., Turner, B. L., & Jones, F. A. (2020). Co-occurring fungal functional groups respond differently to tree neighborhoods and soil properties across three tropical rainforests in Panama. *Microbial Ecology*, 79(3), 675-685. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01446-z>
- Schmidt, S. K., Nemergut, D. R., Darcy, J. L., & Lynch, R. (2014). Do bacterial and fungal communities assemble differently during primary succession? *Molecular Ecology*, 23(2), 254-258. <https://doi.org/10.1111/mec.12589>
- Seaton, F. M., George, P. B. L., Lebron, I., Jones, D. L., Creer, S., & Robinson, D. A. (2020). Soil textural heterogeneity impacts bacterial but not fungal diversity. *Soil Biology and Biochemistry*, 144, 107766. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107766>
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4215-4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001>
- Shadmani, L., Jamali, S., & Fatemi, A. (2021). Effects of root endophytic fungus, *Microdochium bolleyi* on cadmium uptake, translocation and tolerance by *Hordeum vulgare* L. *Biologia*, 76(2), 711-719. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00598-5>
- Sheldon, A. R., & Menzies, N. W. (2005). The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil*, 278(1-2), 341-349. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-8815-3>
- Sui, X., Zhang, R., Frey, B., Yang, L., Liu, Y., Ni, H., & Li, M. (2021). Soil physicochemical properties drive the variation in soil microbial communities along a forest successional series in a degraded wetland in northeastern China. *Ecology and Evolution*, 11(5), 2194-2208. <https://doi.org/10.1002/ece3.7184>
- Sun, J.-M., Irzykowski, W., Jedryczka, M., & Han, F.-X. (2005). Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(4), 385-395. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00077.x>
- Taiyun, W & Viliam, S. (2021). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>

Tamariz-Angeles, C., Huamán, G. D., Palacios-Robles, E., Olivera-Gonzales, P., & Castañeda-Barreto, A. (2021). Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú). *Microbiological Research*, 250, 126811. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126811>

Tecon, R., & Or, D. (2017). Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(5), 599-623. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux039>

Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Drenkhan, R., Pritsch, K., Buegger, F., Padari, A., Hagh-Doust, N., Mikryukov, V., Gohar, D., Amiri, R., Hiiesalu, I., Lutter, R., Rosenthal, R., Rähn, E., Adamson, K., Drenkhan, T., Tullus, H., Jürimaa, K., ... Abarenkov, K. (2020). Regional-scale in-depth analysis of soil fungal diversity reveals strong ph and plant species effects in northern Europe. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1953. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01953>

Tkavc, R., Matrosova, V. Y., Grichenko, O. E., Gostinčar, C., Volpe, R. P., Klimenkova, P., Gaidamakova, E. K., Zhou, C. E., Stewart, B. J., Lyman, M. G., Malfatti, S. A., Rubinfeld, B., Courtot, M., Singh, J., Dalgard, C. L., Hamilton, T., Frey, K. G., Gunde-Cimerman, N., Dugan, L., & Daly, M. J. (2018). Prospects for fungal bioremediation of acidic radioactive waste sites: Characterization and genome sequence of *Rhodotorula taiwanensis* md1149. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2528. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02528>

Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>

Vásquez-Barajas, E. F., García-Torres, N. E., Bastos-Osorio, L. M., & Lázaro-Pacheco, J. M. (2018). Análisis económico del sector cacaotero en Norte de Santander, Colombia y a nivel internacional. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 8(2), 237-250. <https://doi.org/10.19053/20278306.v8.n2.2018.7963>

Větrovský, T., Morais, D., Kohout, P., Lepinay, C., Algora, C., Awokunle Hollá, S., Bahnmann, B. D., Bílohnědá, K., Brabcová, V., D'Alò, F., Human, Z. R., Jomura, M., Kolařík, M., Kvasničková, J., Lladó, S., López-Mondéjar, R., Martinović, T., Mašíňová, T., Meszárošová, L., ... Baldrian, P. (2020). GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. *Scientific Data*, 7(1), 228. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0567-7>

Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V. R., Taylor, A. J., Engeseth, N., & Margenot, A. J. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *PLOS ONE*, 17(2), e0261989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261989>

Wahsha, M., Nadimi-Goki, M., Fornasier, F., Al-Jawasreh, R., Hussein, E. I., & Bini, C. (2017). Microbial enzymes as an early warning management tool for monitoring mining site soils. *CATENA*, 148, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.02.021>

Wang, S., Dai, H., Wei, S., Skuza, L., & Chen, Y. (2022). Effects of Cd-resistant fungi on uptake and translocation of Cd by soybean seedlings. *Chemosphere*, 291, 132908. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132908>

Wang, M., Chen, S., Chen, L., & Wang, D. (2019). Responses of soil microbial communities and their network interactions to saline-alkaline stress in Cd-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 252, 1609-1621. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.082>

Wang, Y., Xu, X., Liu, T., Wang, H., Yang, Y., Chen, X., & Zhu, S. (2020). Analysis of bacterial and fungal communities in continuous-cropping ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) fields in different areas in China. *Scientific Reports*, 10(1), 3264. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58608-0>

- Weiss, S., Van Treuren, W., Lozupone, C., Faust, K., Friedman, J., Deng, Y., Xia, L. C., Xu, Z. Z., Ursell, L., Alm, E. J., Birmingham, A., Cram, J. A., Fuhrman, J. A., Raes, J., Sun, F., Zhou, J., & Knight, R. (2016). Correlation detection strategies in microbial data sets vary widely in sensitivity and precision. *The ISME Journal*, 10(7), 1669-1681. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.235>
- Wu, B., Luo, H., Wang, X., Liu, H., Peng, H., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2022). Effects of environmental factors on soil bacterial community structure and diversity in different contaminated districts of Southwest China mine tailings. *Science of The Total Environment*, 802, 149899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149899>
- Wu, D., Ma, Y., Yang, T., Gao, G., Wang, D., Guo, X., & Chu, H. (2022). Phosphorus and zinc are strongly associated with belowground fungal communities in wheat field under long-term fertilization. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e00110-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00110-22>
- Xia, Q., Ruffly, T., & Shi, W. (2020). Soil microbial diversity and composition: Links to soil texture and associated properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 149, 107953. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107953>
- Yamanaka, T. (2003). The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro. *Mycologia*, 95(4), 584-589. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833062>
- Yelle, D. J., Ralph, J., Lu, F., & Hammel, K. E. (2008). Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1844-1849. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01605.x>
- Yin, C., Schlatter, D. C., Kroese, D. R., Paulitz, T. C., & Hagerty, C. H. (2021). Responses of soil fungal communities to lime application in wheat fields in the pacific northwest. *Frontiers in Microbiology*, 12, 576763. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.576763>
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Gomes, E. V., Tsui, C. K.-M., & Nayak S, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182-207. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zhang, X., Fu, G., Xing, S., Fu, W., Liu, X., Wu, H., Zhou, X., Ma, Y., Zhang, X., & Chen, B. (2022). Structure and diversity of fungal communities in long-term copper-contaminated agricultural soil. *Science of The Total Environment*, 806, 151302. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151302>
- Zhang, Y., Naafs, B. D. A., Huang, X., Song, Q., Xue, J., Wang, R., Zhao, M., Evershed, R. P., Pancost, R. D., & Xie, S. (2022). Variations in wetland hydrology drive rapid changes in the microbial community, carbon metabolic activity, and greenhouse gas fluxes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 317, 269-285. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2021.11.014>
- Zhao, M., Wang, M., Zhao, Y., Hu, N., Qin, L., Ren, Z., Wang, G., & Jiang, M. (2022). Soil microbial abundance was more affected by soil depth than the altitude in peatlands. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1068540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1068540>
- Zhao, Y., Gao, L., Zha, F., Chen, X., Zhou, X., Wang, X., Chen, Y., & Pan, X. (2021). Research on heavy metal level and co-occurrence network in typical ecological fragile area. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(1), 531-540. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00625-w>
- Zhu, P., Li, Y., Gao, Y., Yin, M., Wu, Y., Liu, L., Du, N., Liu, J., Yu, X., Wang, L., & Guo, W. (2021). Insight into the effect of nitrogen-rich substrates on the community structure and the co-occurrence network of thermophiles during lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 319, 124111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124111>

Zhu, Y., Ge, X., Wang, L., You, Y., Cheng, Y., Ma, J., & Chen, F. (2022). Biochar rebuilds the network complexity of rare and abundant microbial taxa in reclaimed soil of mining areas to cooperatively avert cadmium stress. *Frontiers in Microbiology*, 13, 972300. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.972300>

Žifčáková, L., Větrovský, T., Howe, A., & Baldrian, P. (2016). Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter: Seasonal dynamics of a soil microbial community. *Environmental Microbiology*, 18(1), 288-301. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.1302>

Conclusiones generales

- Se determinaron las propiedades fisicoquímicas del suelo y su relación con el cadmio en suelos, hojarasca (HJ), hoja (HF) y grano (G) de cacao en tres fincas del municipio de Yacopí – Cundinamarca encontrando que:
 - Los suelos de la finca F1 fueron significativamente diferentes a los suelos de las fincas F2 y F3 en cuanto a textura, pH, N, Ca, Cu, Mn, CICE, Cd total y Cd disponible.
 - El contenido de Cd total y Cd disponible en los suelos fue heterogénea presentado mayor concentración en la finca F1>F3>F2, siendo la mayor en los suelos rizosféricos de la finca F1, y no se encontraron diferencias entre los suelos no rizosféricos tomadas a diferentes profundidades [D1 (0-30 cm) = D2 (31-100 cm)].
 - Las concentraciones de Cdt presentes en los suelos de las tres fincas fueron superiores a los niveles establecidos por las entidades regulatorias internacionales para suelos agrícolas no contaminados ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$) y el contenido de Cd en granos fue superior a las concentraciones permitidas por la comunidad europea para grano seco ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$).
 - La concentración de Cd en los tejidos vegetales analizados fue mayor en la hojarasca, seguida de la hoja y grano (HJ>HF>G). También el contenido de Cd en la hojarasca fue mayor a lo encontrado en el suelo a profundidad de D1, lo que podría contribuir a la recirculación del Cd en sistema suelo-planta.
- Se caracterizó por primera vez la diversidad estructural de microbiomas fúngicos presentes en suelos rizosféricos (Rz) y no rizosféricos asociados al cultivo de cacao y con diferentes concentraciones naturales de cadmio, encontrando que:
 - Los índices de diversidad alfa mostraron que la riqueza y la abundancia relativa encontrada en suelos con cultivo de cacao (SCC) fue mayor que la

presente en suelos sin cultivo de cacao (SWC), indicando que el cultivo de cacao crea ambientes diferentes que favorecen la diversidad.

- Los ASVs (taxones) encontrados en los suelos de la finca F1 mostraron menor similitud con respecto a los presentes en los suelos de las fincas F2 y F3; mayor número de ASVs únicos en suelos con cultivo (SCC) y en suelos Rz. Lo que indicala estructura de la comunidad fúngica se ve alterada por las propiedades físico-químicas, el contenido de Cd en el suelo, el cultivo de cacao y la rizosfera.
 - Los phylum Ascomycota (68%) y Basidiomycota (25%) fueron los más abundantes, donde los órdenes Hypocreales, Pleosporales y Capnodiales (Ascomycota) fueron los más representativos. Adicionalmente, los análisis de abundancia diferencial destacan los géneros Hypoxylon, Microdochium, Xylaria y la familia Nectricaceae, los cuales han sido reportados como tolerantes a metales pesados. También se encontraron géneros raros y pocos conocidos como Plectosphaerella, Tetracladium, Microdihum que Cyberlindnera que podrían tener capacidad de tolerar altas concentraciones de Cd.
- Se evaluó el efecto de las características fisicoquímicas y concentraciones de Cd presente en suelos cacaoteros sobre la diversidad estructural de las comunidades fúngicas, encontrando que:
 - Las propiedades fisicoquímicas de los suelos cacaoteros estudiados presentaron bajas correlaciones con los índices de diversidad alfa mostrando que la estructura de las comunidades fúngicas está determinada por múltiples factores como la textura, el pH, CO, N, CICE y Cdt.
 - Las redes de co-ocurrencia mostraron géneros fúngicos únicos y compartidos por finca. A su vez, se encontró que la finca F1 se presentó una estructura más homogénea posiblemente a los altos contenido de Cd y propiedades fisicoquímicas encontradas en estos suelos, en contraste, la finca F2 la estructura cambia de acuerdo a la profundidad del suelo.

Recomendaciones

- En este estudio se encontraron concentraciones de Cd superiores a $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ en suelos cacaoteros, donde el origen de este Cd aún no se ha establecido, se sugiere realizar estudios de la mineralogía del suelo para conocer este posible origen del Cd, adicionalmente se encontró correlaciones positivas del Cd con el pH, Ca, Zn, Cu, CICE, Mg, por lo tanto, se sugiere estudiar grado y tipo de acomplejamiento del Cd en estos suelos.
- Se observó un alto contenido de Cd disponible en suelos rizosféricos de la finca F1, futuras investigaciones deberían abordar el estudio de la rizosfera de suelos cacaoteros, y entender el rol de las rizodeposiciones de la planta y el rol de la actividad microbiana en la disponibilidad del Cd.
- Se observó que el contenido de Cd en la hojarasca fue superior al contenido de Cd en el suelo, se sugiere evaluar estrategias de manejo de la hojarasca considerando que es la principal fuente de entrada de materia orgánica y de fertilización de los suelos cacaoteros, pero a su vez está participando en la recirculación del Cd en el cultivo.
- Para futuros estudios es importante tener en cuenta contar un número de réplicas biológicas mayor debido a la gran heterogeneidad de los suelos estudiados.
- El marcador molecular ITS2, permitió identificar parcialmente la comunidad fúngica presente en estos suelos, se sugiere que para futuras investigaciones se haga uso del marcador y una subunidad ribosomal complementaria con el fin de robustecer el marcador. También se sugiere hacer uso de técnicas como shotgun para identificar también los genes y funciones enzimáticas en estos suelos.
- La baja asignación taxonómica alcanzada usando la base de datos de UNITE, sugiere utilizar una base de datos complementaria como el GenBank de NCBI donde el porcentaje de similitud es menor, pero permitiría conocer más ampliamente los taxones presentes.
- Los géneros encontrados diferencialmente abundantes podrían indicarnos mecanismos de tolerancia a este tipo de estrés. Se sugiere enfocar el estudio de estos géneros y optimizar los medios de cultivo para escalar el estudio a nivel in vitro de estos hongos.

- Estos resultados podrían complementarse con el aislamiento y cultivo de hongos presentes en estos suelos contaminados con Cd para determinar los mecanismos de tolerancia a Cd y contribuir con el desarrollo de estrategias que ayuden a mitigar la toma de Cd por parte de la planta.

Tablas suplementarias

Tabla Suplementaria 1 Requerimiento nutricional para cultivo de cacao

	Requerimiento nutricional (kg/ha)	Finca 1 (kg/ha)*	Finca 2 (kg/ha)*	Finca 3 (kg/ha)*
N	438	465	324	616
P	48	150	30	280
K	633	140,8	281,5	211,1
Ca	373	4328	721,2	1082
Mg	129	87,5	109,4	87,5
Mn	6,1	13	9	5
Zn	1,5	13	5	2

* Las transformaciones se realizaron partiendo de una densidad aparente igual a 0,90 g cm⁻³

Tabla Suplementaria 2 Cebadores utilizados para la amplificación y preparación de librerías metagenómicas.

PCR	Sentido	Nombre	Secuencia	Tamaño
Primera	Forward	F ITS3_KYO2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGATGAAGAACYAGYRAA	51
	Reverse	R ITS4_KYO3	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTBTTVCKCTTCACTCG	52
Segunda	Forward	PE1-4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGCGATTAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70
	Forward	PE1-5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACACGTGTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70
	Forward	PE1-6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGTGTACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70
	Forward	PE1-7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGCTTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70
	Reverse	PE1-8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCACCTCAACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	70
	Reverse	PE2-1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGCTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCCAAGGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCCGCTTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTGTGAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGTCTGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGGCTAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTTGCAAGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-8	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGAAGTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
	Reverse	PE2-9	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCTCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66
Reverse	PE2-10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCAAGACGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	66	

Tabla Suplementaria 3 Extracciones de ADN

Finca	Cultivo	Tipo	Repetición	Extracción inicial			Perlas	ADN limpio			Librería ITS2 Concentración
				Concentración ng/uL	260/280	260/230		Concentración ng/uL	260/280	260/230	
F1	SCC	D1	R1	90,3	1,86	2,06	3X	74,3	1,85	2,16	6,3
F1	SCC	D1	R2	93,7	1,85	1,02	3X	69,9	1,8	2,09	31,4
F1	SCC	D1	R3	51,2	1,97	1,49	3X	46,8	1,82	2,15	28,2
F1	SCC	D2	R1	46,9	1,8	1,6	3X	44,1	1,85	2,05	25,8
F1	SCC	D2	R2	62,3	1,83	1,18	3X	47,6	1,79	2,11	17,1
F1	SCC	D2	R3	41,7	1,9	1,42	3X	35,9	1,74	2,05	32,0
F1	SCC	Rz	R1	188,1	1,87	1,99	3X	181,6	1,86	2,15	23,8
F1	SCC	Rz	R2	228,1	1,87	1,69	3X	169,5	1,88	2,15	14,5
F1	SCC	Rz	R3	175,8	1,89	1,59	3X	156,3	1,85	2,15	22,6
F1	SWC	D1	R1	59,7	1,89	2,2	3X	53,6	1,81	2,02	26,2
F1	SWC	D1	R2	32,2	1,83	0,82	3X	29,7	1,8	1,9	10,9
F1	SWC	D1	R3	39	1,81	1,5	3X	33,7	1,81	2,04	33,2
F1	SWC	D2	R1	21,6	1,75	0,35	3X	16,9	2,01	1,96	36,6
F2	SCC	D1	R1	64,9	1,89	1,53	3X	53,2	1,88	2,12	26,6
F2	SCC	D1	R2	120,3	1,88	2,02	3X	103,1	1,86	2,12	21,6
F2	SCC	D1	R3	133,1	1,89	1,66	3X	109,9	1,86	2,14	12,5
F2	SCC	D2	R1	90,55	1,83	0,23	3X	70,32	1,85	2,02	22,6
F2	SCC	D2	R2	214,2	1,88	1,72	3X	100,5	1,79	1,9	32,0
F2	SCC	D2	R3	112,08	1,88	1,45	3X	89,8	1,74	2,04	30,8
F2	SCC	Rz	R1	295,8	1,88	2,03	3X	207,4	1,88	2,2	10,8
F2	SCC	Rz	R2	85	1,89	2,03	3X	68,5	1,84	2,09	35,0
F2	SCC	Rz	R3	250,1	1,87	1,59	3X	182,4	1,87	2,19	20,6
F2	SWC	D1	R1	277,7	1,86	2,03	3X	213,3	1,87	2,18	63,6
F2	SWC	D1	R2	225	1,85	1,41	3X	179,1	1,87	2,17	33,8
F2	SWC	D1	R3	153,2	1,89	1,89	3X	107,7	1,85	2,15	41,8
F2	SWC	D2	R1	126,1	1,86	2,03	3X	100,5	1,87	2,18	36,0
F3	SCC	D1	R1	170	1,86	1,76	3X	158,2	1,89	2,2	27,4
F3	SCC	D1	R2	177	1,88	1,74	3X	153,2	1,89	2,23	16,6
F3	SCC	D1	R3	90,3	1,88	0,43	3X	86,7	1,88	2,23	24,6
F3	SCC	D2	R1	35	1,9	1,86	3X	36,9	1,91	2,14	48,2
F3	SCC	D2	R2	35,9	1,77	1,1	3X	31,6	1,89	2,8	9,9
F3	SCC	D2	R3	20,1	1,83	0,23	3X	13,8	1,94	2,09	27,0
F3	SWC	D1	R1	165,4	1,88	1,72	3X	159	1,87	2,19	
F3	SWC	D1	R2	278,2	1,88	1,45	3X	254,3	1,87	2,23	
F3	SWC	D1	R3	123,2	1,83	1,98	3X	98,6	1,88	2,16	
F3	SWC	D2	R1	25,7	1,83	0,88	3X	16,1	1,89	2,35	21,8
Promedio				122,21	1,86	1,49		98,72	1,86	2,14	26,42

Tabla Suplementaria 4 Análisis de fragmentos de las librerías previa a secuenciación

Gel	Columna	Muestra
	A	F2:SCC:Rz:R2
	B	F3:SCC:D1:R1

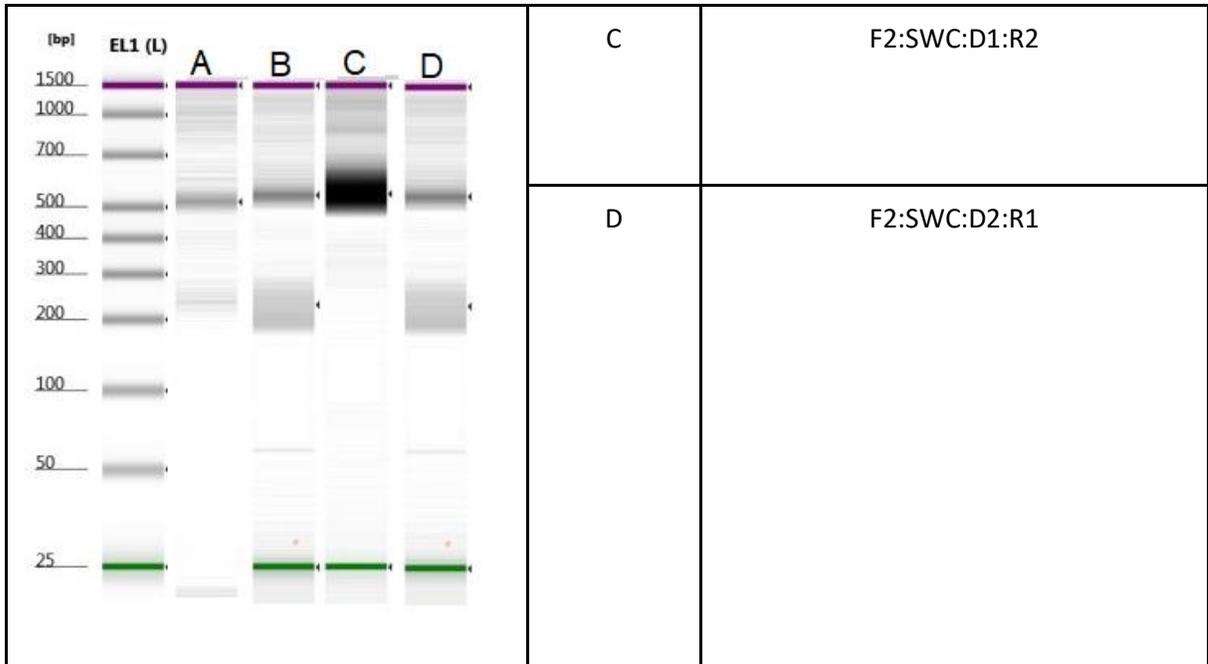


Tabla Suplementaria 5 Número de lecturas obtenidas de secuenciación antes y después de la limpieza con trimmomatic

Finca	Cultivo	Tipo	Repetición	Sentido	Raw data	Clean data	%removido	Sentido	Raw data	Clean data	%removido
F1	SCC	Rz	R1	Forward	156532	108491	30,69	Reverse	156532	108491	30,69
F1	SCC	Rz	R2	Forward	157003	144332	8,07	Reverse	157003	144332	8,07
F1	SCC	Rz	R3	Forward	528038	418914	20,67	Reverse	528038	418914	20,67
F1	SCC	D1	R1	Forward	515994	326434	36,74	Reverse	515994	326434	36,74
F1	SCC	D1	R2	Forward	91153	72624	20,33	Reverse	91153	72624	20,33
F1	SCC	D1	R3	Forward	145069	127772	11,92	Reverse	145069	127772	11,92
F1	SCC	D2	R1	Forward	65879	64916	1,46	Reverse	65879	64916	1,46
F1	SCC	D2	R2	Forward	211787	168033	20,66	Reverse	211787	168033	20,66
F1	SCC	D2	R3	Forward	127678	95333	25,33	Reverse	127678	95333	25,33
F1	SWC	D1	R1	Forward	110006	69277	37,02	Reverse	110006	69277	37,02
F1	SWC	D1	R2	Forward	217898	134533	38,26	Reverse	217898	134533	38,26
F1	SWC	D1	R3	Forward	91274	81800	10,38	Reverse	91274	81800	10,38
F1	SWC	D2	R1	Forward	77658	75123	3,26	Reverse	77658	75123	3,26
F2	SCC	Rz	R1	Forward	194469	147747	24,03	Reverse	194469	147747	24,03
F2	SCC	Rz	R2	Forward	125418	111463	11,13	Reverse	125418	111463	11,13
F2	SCC	Rz	R3	Forward	141656	110191	22,21	Reverse	141656	110191	22,21
F2	SCC	D1	R1	Forward	71564	60732	15,14	Reverse	71564	60732	15,14
F2	SCC	D1	R2	Forward	156322	124199	20,55	Reverse	156322	124199	20,55
F2	SCC	D1	R3	Forward	379114	296572	21,77	Reverse	379114	296572	21,77
F2	SCC	D2	R1	Forward	3373443	343630	89,81	Reverse	3373443	343630	89,81
F2	SCC	D2	R2	Forward	434588	265400	38,93	Reverse	434588	265400	38,93
F2	SCC	D2	R3	Forward	415978	373325	10,25	Reverse	415978	373325	10,25
F2	SWC	D1	R1	Forward	37566	34901	7,09	Reverse	37566	34901	7,09
F2	SWC	D2	R2	Forward	246704	145055	41,20	Reverse	246704	145055	41,20
F2	SWC	D3	R3	Forward	459881	406919	11,52	Reverse	459881	406919	11,52
F2	SWC	D2	R1	Forward	557055	503269	9,66	Reverse	557055	503269	9,66
F3	SCC	D1	R1	Forward	80666	60597	24,88	Reverse	80666	60597	24,88
F3	SCC	D1	R2	Forward	58114	52596	9,50	Reverse	58114	52596	9,50
F3	SCC	D1	R3	Forward	236316	172740	26,90	Reverse	236316	172740	26,90
F3	SCC	D2	R1	Forward	104309	93100	10,75	Reverse	104309	93100	10,75
F3	SCC	D2	R2	Forward	61492	56389	8,30	Reverse	61492	56389	8,30
F3	SCC	D2	R3	Forward	106373	74146	30,30	Reverse	106373	74146	30,30
F3	SWC	D2	R1	Forward	214118	148129	30,82	Reverse	214118	148129	30,82
Total					9951114	5468682	45,04		9951114	5468682	45,04

Tabla Suplementaria 6 Filtración con DADA2 y reconstrucción de ASVs

Finca	Cultivo	Tipo	Rep	input	filtered	percentage of input passed filter	denoised	non-chimeric	percentage of input non-chimeric
F1	SCC	D1	R1	326434	132288	40,53	113912	91428	28,01
F1	SCC	D1	R2	72624	63359	87,24	60806	55348	76,21
F1	SCC	D1	R3	127772	113112	88,53	110228	100721	78,83
F1	SCC	D2	R1	64916	59900	92,27	58769	58164	89,60
F1	SCC	D2	R2	168033	146921	87,44	142673	118089	70,28
F1	SCC	D2	R3	95333	77372	81,16	74302	67070	70,35
F1	SCC	Rz	R1	108491	89719	82,70	78651	67068	61,82
F1	SCC	Rz	R2	144332	129676	89,85	126500	115608	80,10
F1	SCC	Rz	R3	418914	170454	40,69	156261	113527	27,10
F1	SWC	D1	R1	69277	59040	85,22	56311	40792	58,88
F1	SWC	D1	R2	134533	118040	87,74	115441	72577	53,95
F1	SWC	D1	R3	81800	71103	86,92	69156	66085	80,79
F1	SWC	D2	R1	75123	69827	92,95	68832	49131	65,40
F2	SCC	D1	R1	60732	51587	84,94	49558	47507	78,22
F2	SCC	D1	R2	124199	103947	83,69	100155	91877	73,98
F2	SCC	D1	R3	296572	249299	84,06	242995	218792	73,77
F2	SCC	D2	R1	343630	137240	39,94	124062	90405	26,31
F2	SCC	D2	R2	265400	103811	39,11	90497	69878	26,33
F2	SCC	D2	R3	373325	137704	36,89	124039	89388	23,94
F2	SCC	Rz	R1	147747	120257	81,39	114904	103548	70,08
F2	SCC	Rz	R2	111463	98711	88,56	96175	83653	75,05
F2	SCC	Rz	R3	110191	90199	81,86	86033	76986	69,87
F2	SWC	D1	R1	34901	31126	89,18	29328	28235	80,90
F2	SWC	D1	R1	145055	128482	88,57	123974	114403	78,87
F2	SWC	D1	R2	406919	159563	39,21	137712	103009	25,31
F2	SWC	D2	R1	503269	188583	37,47	164451	122055	24,25
F3	SCC	D1	R1	60597	51473	84,94	49392	44366	73,21
F3	SCC	D1	R2	52596	46294	88,02	44044	43247	82,22
F3	SCC	D1	R3	172740	101867	58,97	93316	71689	41,50
F3	SCC	D2	R1	93100	80752	86,74	78489	76848	82,54
F3	SCC	D2	R2	56389	49670	88,08	47492	46542	82,54
F3	SCC	D2	R3	74146	55873	75,36	53996	49899	67,30
F3	SWC	D2	R1	148129	82629	55,78	77493	65340	44,11
Total				5468682	3369878	62,28	3159947	2653275	19,10

Bibliografía general

- Abdu, N., Abdullahi, A. A., & Abdulkadir, A. (2017). Heavy metals and soil microbes. *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 65-84. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x>
- Adamo, I., Castaño, C., Bonet, J. A., Colinas, C., Martínez de Aragón, J., & Alday, J. G. (2021). Soil physico-chemical properties have a greater effect on soil fungi than host species in Mediterranean pure and mixed pine forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 160, 108320. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108320>
- Adeoye, A. O., Adebayo, I. A., Afodun, A. M., & Ajijolakewu, K. A. (2022). Benefits and limitations of phytoremediation: Heavy metal remediation review. En *Phytoremediation* (pp. 227-238). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89874-4.00002-9>
- Adriano, D. C. (2002). Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals (2nd ed). Springer
- Aguirre-Forero, S. E., Piraneque-Gambasica, N. V., & Vásquez-Polo, J. R. (2020). Heavy metals content in soils and cocoa tissues in Magdalena department Colombia: Emphasis in cadmium. *Entramado*, 16(2), 298-310. <https://doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.6753>
- Ahmed, B., Smart, L. B., & Hijri, M. (2021). Microbiome of field grown hemp reveals potential microbial interactions with root and rhizosphere soil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 741597. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741597>
- Ainsworth, G. C., & Bisby, G. R. (2011). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi (P. M. Kirk, Ed.; 10. ed. 2011). CABI.
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Alloway, B. J. (2013). Sources of heavy metals and metalloids in soils. En B. J. Alloway (Ed.), *Heavy Metals in Soils* (Vol. 22, pp. 11-50). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_2
- Amacher, M. C. (2018). Nickel, cadmium, and lead. En D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, & M. E. Sumner (Eds.), *SSSA Book Series* (pp. 739-768). Soil Science Society of America, American Society of Agronomy. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c28>
- Anahid, S., Yaghmaei, S., & Ghobadinejad, Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi. *Scientia Iranica*, 18(3), 502-508. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2011.05.015>
- Anani, O. A., Mishra, R. R., Mishra, P., Olomukoro, J. O., Imoobe, T. O. T., & Adetunji, C. O. (2020). Influence of heavy metal on food security: Recent advances. En P. Mishra, R. R. Mishra, & C. O. Adetunji (Eds.), *Innovations in Food Technology* (pp. 257-267). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6121-4_18
- Anderson, C., Beare, M., Buckley, H. L., & Lear, G. (2017). Bacterial and fungal communities respond differently to varying tillage depth in agricultural soils. *PeerJ*, 5, e3930. <https://doi.org/10.7717/peerj.3930>
- Antunes, L. P., Martins, L. F., Pereira, R. V., Thomas, A. M., Barbosa, D., Lemos, L. N., Silva, G. M. M., Moura, L. M. S., Epamino, G. W. C., Digiampietri, L. A., Lombardi, K. C., Ramos, P. L.,

Quaggio, R. B., de Oliveira, J. C. F., Pascon, R. C., Cruz, J. B. da, da Silva, A. M., & Setubal, J. C. (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 6(1), 38915. <https://doi.org/10.1038/srep38915>

Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of The Total Environment*, 605-606, 792-800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>

Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of The Total Environment*, 649, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>

Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B., & Mittal, N. (2008). Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. *Food Chemistry*, 111(4), 811-815. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.049>

Ashrafi, S., Stadler, M., Dababat, A. A., Richert-Pöggeler, K. R., Finckh, M. R., & Maier, W. (2017). *Monocillium gamsii* sp. nov. and *Monocillium bulbiliosum*: Two nematode-associated fungi parasitising the eggs of *Heterodera filipjevi*. *MycKeys*, 27, 21-38. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.27.21254>

Ayangbenro, A., & Babalola, O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>

Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 78-91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4)

Banerjee, S., Walder, F., Büchi, L., Meyer, M., Held, A. Y., Gattinger, A., Keller, T., Charles, R., & van der Heijden, M. G. A. (2019). Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *The ISME Journal*, 13(7), 1722-1736. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0383-2>

Barrientos, L. D. P., Oquendo, J. D. T., Garzón, M. A. G., & Álvarez, O. L. M. (2019). Effect of the solar drying process on the sensory and chemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivated in Antioquia, Colombia. *Food Research International*, 115, 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.084>

Bauer, R., Garnica, S., Oberwinkler, F., Riess, K., Weiß, M., & Begerow, D. (2015). Entorrhizomycota: A new fungal phylum reveals new perspectives on the evolution of fungi. *PLOS ONE*, 10(7), e0128183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128183>

Beimforde, C., Feldberg, K., Nylinder, S., Rikkinen, J., Tuovila, H., Dörfelt, H., Gube, M., Jackson, D. J., Reitner, J., Seyfullah, L. J., & Schmidt, A. R. (2014). Estimating the Phanerozoic history of the Ascomycota lineages: Combining fossil and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78, 386-398. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.024>

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kausserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10(1), 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>

Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., & Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 173-181. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00044.x>

- Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., & Kauserud, H. (2013). *its 1* versus *its 2* as dna metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 218-224. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>
- Bohn, H. L., McNeal, B. L., O'Connor, G. A., & Sánchez Orozco, M. (1993). *Química del suelo*. Limusa.
- Bolan, N. S., Adriano, D. C., & Curtin, D. (2003). Soil acidification and liming interactions with nutrient and heavy metal transformation and bioavailability. En *Advances in Agronomy* (Vol. 78, pp. 215-272). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)78006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)78006-1)
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science [Preprint]. *PeerJ Preprints*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>
- Boyd, R. S., & Rajakaruna, N. (2013). Heavy metal tolerance (pp. 9780199830060-9780199830137) [Data set]. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/obo/9780199830060-0137>
- Bravo, D., & Braissant, O. (2022). Cadmium-tolerant bacteria: Current trends and applications in agriculture. *Letters in Applied Microbiology*, 74(3), 311-333. <https://doi.org/10.1111/lam.13594>
- Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. *Agronomy*, 11(4), 761. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., & Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1175-1194. <https://doi.org/10.1111/jam.13698>
- Bravo Realpe, I. D. S., Arboleda Pardo, C. A., & Martín Peinado, F. J. (2014). Efecto de la calidad de la materia orgánica asociada con el uso y manejo de suelos en la retención de cadmio en sistemas altoandinos de Colombia. *Acta Agronómica*, 63(2), 164-174. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n2.39569>
- 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>
- Carney, K. M., & Matson, P. A. (2005). Plant communities, soil microorganisms, and soil carbon cycling: Does altering the world belowground matter to ecosystem functioning? *Ecosystems*, 8(8), 928-940. <https://doi.org/10.1007/s10021-005-0047-0>
- Cánovas, D., Vooijs, R., Schat, H., & de Lorenzo, V. (2004). The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P37 to arsenic. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51234-51240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408622200>

- Cazabonne, J., Bartrop, L., Dierickx, G., Gafforov, Y., Hofmann, T. A., Martin, T. E., Piepenbring, M., Rivas-Ferreiro, M., & Haelewaters, D. (2022). Molecular-based diversity studies and field surveys are not mutually exclusive: On the importance of integrated methodologies in mycological research. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, 860777. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.860777>
- Challacombe, J. F., Hesse, C. N., Bramer, L. M., McCue, L. A., Lipton, M., Purvine, S., Nicora, C., Gallegos-Graves, L. V., Porrás-Alfaro, A., & Kuske, C. R. (2019). Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. *BMC Genomics*, 20(1), 976. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6358-x>
- Chang, J., Sun, Y., Tian, L., Ji, L., Luo, S., Nasir, F., Kuramae, E. E., & Tian, C. (2021). The structure of rhizosphere fungal communities of wild and domesticated rice: Changes in diversity and co-occurrence patterns. *Frontiers in Microbiology*, 12, 610823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610823>
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The colombian heritage: colombian fermented foods and beverages.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of The Total Environment*, 533, 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Chen, H., Zhang, W., Yang, X., Wang, P., McGrath, S. P., & Zhao, F.-J. (2018). Effective methods to reduce cadmium accumulation in rice grain. *Chemosphere*, 207, 699-707. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.143>
- Chen, M., Wang, L., Hou, J., Yang, S., Zheng, X., Chen, L., & Li, X. (2018). Mycoextraction: Rapid cadmium removal by macrofungi-based technology from alkaline soil. *Minerals*, 8(12), 589. <https://doi.org/10.3390/min8120589>
- Chen, M., Wang, L., Hou, J., Yang, S., Zheng, X., Chen, L., & Li, X. (2018). Mycoextraction: Rapid cadmium removal by macrofungi-based technology from alkaline soil. *Minerals*, 8(12), 589. <https://doi.org/10.3390/min8120589>
- Chen, Y. P., Liu, Q., Liu, Y. J., Jia, F. A., & He, X. H. (2014). Responses of soil microbial activity to cadmium pollution and elevated CO₂. *Scientific Reports*, 4(1), 4287. <https://doi.org/10.1038/srep04287>
- Choi, S., & Yun, Y. (2006). Biosorption of cadmium by various types of dried sludge: An equilibrium study and investigation of mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 138(2), 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.059>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, 15(3), 799-821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Chunhabundit, R. (2016). Cadmium exposure and potential health risk from foods in contaminated area, thailand. *Toxicological Research*, 32(1), 65-72. <https://doi.org/10.5487/TR.2016.32.1.065>
- Coller, E., Cestaro, A., Zanzotti, R., Bertoldi, D., Pindo, M., Larger, S., Albanese, D., Mescalchin, E., & Donati, C. (2019). Microbiome of vineyard soils is shaped by geography and management. *Microbiome*, 7(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0758-7>

- Creamer, R. E., Hannula, S. E., Leeuwen, J. P. V., Stone, D., Rutgers, M., Schmelz, R. M., Rüter, P. C. de, Hendriksen, N. B., Bolger, T., Bouffaud, M. L., Buee, M., Carvalho, F., Costa, D., Dirilgen, T., Francisco, R., Griffiths, B. S., Griffiths, R., Martin, F., Silva, P. M. da, ... Lemanceau, P. (2016). Ecological network analysis reveals the inter-connection between soil biodiversity and ecosystem function as affected by land use across Europe. *Applied Soil Ecology*, 97, 112-124. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.006>
- Cullen, J. T., & Maldonado, M. T. (2013). Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. En A. Sigel, H. Sigel, & R. K. Sigel (Eds.), *Cadmium: From Toxicity to Essentiality* (Vol. 11, pp. 31-62). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_2
- Dai, W., Chen, J., & Xiong, J. (2019). Concept of microbial gatekeepers: Positive guys? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 633-641. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9522-3>
- Das, N., Vimala, R. and Karthika, P. (2008) Biosorption of Heavy Metals—An Overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 159-169.
- Dasgupta, D., & Brahma Prakash, G. P. (2021). Soil microbes are shaped by soil physico-chemical properties: A brief review of existing literature. *International Journal of Plant & Soil Science*, 59-71. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2021/v33i130409>
- De Beenhouwer, M., Aerts, R., & Honnay, O. (2013). A global meta-analysis of the biodiversity and ecosystem service benefits of coffee and cacao agroforestry. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 175, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.05.003>
- de Vries, F. T., Griffiths, R. I., Bailey, M., Craig, H., Girlanda, M., Gweon, H. S., Hallin, S., Kaisermann, A., Keith, A. M., Kretzschmar, M., Lemanceau, P., Lumini, E., Mason, K. E., Oliver, A., Ostle, N., Prosser, J. I., Thion, C., Thomson, B., & Bardgett, R. D. (2018). Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks. *Nature Communications*, 9(1), 3033. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05516-7>
- Degens, B. (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(2), 189-196. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00141-8)
- Delgado-Baquerizo, M., Reith, F., Dennis, P. G., Hamonts, K., Powell, J. R., Young, A., Singh, B. K., & Bissett, A. (2018). Ecological drivers of soil microbial diversity and soil biological networks in the Southern Hemisphere. *Ecology*, 99(3), 583-596. <https://doi.org/10.1002/ecy.2137>
- Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011). Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, 32(5), 467-491. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>
- Din, G., Hassan, A., Dunlap, J., Ripp, S., & Shah, A. A. (2022). Cadmium tolerance and bioremediation potential of filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* FMS2 isolated from soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(4), 2761-2770. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03211-7>
- Doku, T., & Belford, E. (2015). The potential of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* in bioaccumulation of heavy metals from the Chemu Lagoon, Ghana. *Journal of Applied Biosciences*, 94(1), 8907. <https://doi.org/10.4314/jab.v94i1.12>
- Domka, A. M., Rozpaadek, P., & Turnau, K. (2019). Are fungal endophytes merely mycorrhizal copycats? The role of fungal endophytes in the adaptation of plants to metal toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 10, 371. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00371>

- Donovan, P. D., Gonzalez, G., Higgins, D. G., Butler, G., & Ito, K. (2018). Identification of fungi in shotgun metagenomics datasets. *PLOS ONE*, 13(2), e0192898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192898>
- dos Reis, J. B. A., Lorenzi, A. S., & do Vale, H. M. M. (2022). Methods used for the study of endophytic fungi: A review on methodologies and challenges, and associated tips. *Archives of Microbiology*, 204(11), 675. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03283-0>
- Edwards, J. E., Forster, R. J., Callaghan, T. M., Dollhofer, V., Dagar, S. S., Cheng, Y., Chang, J., Kittelmann, S., Fliegerova, K., Puniya, A. K., Henske, J. K., Gilmore, S. P., O'Malley, M. A., Griffith, G. W., & Smidt, H. (2017). Pcr and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: Insights, challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1657. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01657>
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, 10(1), 2369. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
- Ehis-Eriakha, C. B., & Akemu, S. E. (2022). Impact of heavy metal pollution on the biotic and abiotic components of the environment. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 38-54. <https://doi.org/10.9734/sajrm/2022/v13i330302>
- Engbersen, N., Gramlich, A., Lopez, M., Schwarz, G., Hattendorf, B., Gutierrez, O., & Schulin, R. (2019). Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Science of The Total Environment*, 678, 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.001>
- European Commission , 2021. Commission Regulation (EU) 2021/1323 of 10 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in certain foodstuffs (Text with EEA relevance). *Off. J. Eur. Union* 138, 75.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141), 1237439. <https://doi.org/10.1126/science.1237439>
- Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO), (2022), Producción Nacional de Cacao. url: <https://www.fedecacao.com.co/economianacional>. Consulta: Diciembre, 2022
- Fenner, N., & Freeman, C. (2011). Drought-induced carbon loss in peatlands. *Nature Geoscience*, 4(12), 895-900. <https://doi.org/10.1038/ngeo1323>
- Fierer, N., Strickland, M. S., Liptzin, D., Bradford, M. A., & Cleveland, C. C. (2009). Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 12(11), 1238-1249. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01360.x>
- Florida Rofner, N. (2021). Cadmium in soil and cacao beans of Peruvian and South American origin. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74(2). <https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n2.91107>
- Fomina, M., Hillier, S., Charnock, J. M., Melville, K., Alexander, I. J., & Gadd, G. M. (2005). Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *beauveria caledonica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 371-381. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.371-381.2005>
- Fraç, M., Hannula, S. E., Belka, M., & Jędrzycka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in Microbiology*, 9, 707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>

- Freilich, M. A., Wieters, E., Broitman, B. R., Marquet, P. A., & Navarrete, S. A. (2018). Species co-occurrence networks: Can they reveal trophic and non-trophic interactions in ecological communities? *Ecology*, 99(3), 690-699. <https://doi.org/10.1002/ecy.2142>
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, 111(1), 3-49. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>
- Gadd, G. M. (2021). Fungal biomineralization. *Current Biology*, 31(24), R1557-R1563. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.041>
- Garbeva, P., van Veen, J. A., & van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 243-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455>
- Gautam, A. K., Verma, R. K., Avasthi, S., Sushma, Bohra, Y., Devadatha, B., Niranjana, M., & Suwannarach, N. (2022). Current insight into traditional and modern methods in fungal diversity estimates. *Journal of Fungi*, 8(3), 226. <https://doi.org/10.3390/jof8030226>
- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The effects of cadmium toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Geng, H.-X., & Wang, L. (2019). Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.02.006>
- Ghosh, S. (2021). Fungi-mediated detoxification of heavy metals: En S. Dey & B. Acharya (Eds.), *Advances in Environmental Engineering and Green Technologies* (pp. 205-219). IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-4888-2.ch011>
- Gqozo, M. P., Bill, M., Siyoum, N., Labuschagne, N., & Korsten, L. (2020). Fungal diversity and community composition of wheat rhizosphere and non-rhizosphere soils from three different agricultural production regions of South Africa. *Applied Soil Ecology*, 151, 103543. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103543>
- Gil, J. P., López-Zuleta, S., Quiroga-Mateus, R. Y., Benavides-Erazo, J., Chaali, N., & Bravo, D. (2022). Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: A case study from Colombia. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(4), 2455-2476. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03299-x>
- Giller, K. E., Witter, E., & McGrath, S. P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2031-2037. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.026>
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of The Total Environment*, 612, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- Guerra Sierra, B. E., Arteaga-Figueroa, L. A., Sierra-Pelaéz, S., & Alvarez, J. C. (2022). *Talaromyces santanderensis*: A new cadmium-tolerant fungus from cacao soils in Colombia. *Journal of Fungi*, 8(10), 1042. <https://doi.org/10.3390/jof8101042>
- Guggenberger, G. (2005). Humification and mineralization in soils. En A. Varma & F. Buscot (Eds.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (Vol. 3, pp. 85-106). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_4

- Guo, P., Wang, C., Jia, Y., Wang, Q., Han, G., & Tian, X. (2011). Responses of soil microbial biomass and enzymatic activities to fertilizations of mixed inorganic and organic nitrogen at a subtropical forest in East China. *Plant and Soil*, 338(1-2), 355-366. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0550-8>
- Guo, H., Nasir, M., Lv, J., Dai, Y., & Gao, J. (2017). Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.048>
- Guo, Y., Cheng, S., Fang, H., Yang, Y., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Responses of soil fungal taxonomic attributes and enzyme activities to copper and cadmium co-contamination in paddy soils. *Science of The Total Environment*, 844, 157119. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157119>
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A. C., & Magan, N. (2014). Bacterial and fungal bioremediation strategies. En *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 301-323). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3>
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Haj-Amor, Z., Araya, T., Kim, D.-G., Bouri, S., Lee, J., Ghiloufi, W., Yang, Y., Kang, H., Jhariya, M. K., Banerjee, A., & Lal, R. (2022). Soil salinity and its associated effects on soil microorganisms, greenhouse gas emissions, crop yield, biodiversity and desertification: A review. *Science of The Total Environment*, 843, 156946. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156946>
- He, S., He, Z., Yang, X., Stoffella, P. J., & Baligar, V. C. (2015). Soil biogeochemistry, plant physiology, and phytoremediation of cadmium-contaminated soils. En *Advances in Agronomy* (Vol. 134, pp. 135-225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2015.06.005>
- He, S., Yang, X., He, Z., & Baligar, V. C. (2017). Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: A review. *Pedosphere*, 27(3), 421-438. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60339-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60339-4)
- Hoggard, M., Vesty, A., Wong, G., Montgomery, J. M., Fourie, C., Douglas, R. G., Biswas, K., & Taylor, M. W. (2018). Characterizing the human mycobiota: A comparison of small subunit rna, its1, its2, and large subunit rna genomic targets. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02208>
- Hussain, A., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Yasmeen, T., Hayat, M. T., Hussain, I., Ali, Q., & Hussain, S. M. (2019). Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity. En *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 47-72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00003-6>
- Huybrechts, M., Hendrix, S., Bertels, J., Beemster, G. T. S., Vandamme, D., & Cuypers, A. (2020). Spatial analysis of the rice leaf growth zone under controlled and cadmium-exposed conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104120. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104120>
- Igiri, B. E., Okoduwa, S. I. R., Idoko, G. O., Akabuogu, E. P., Adeyi, A. O., & Ejiogu, I. K. (2018). Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: A review. *Journal of Toxicology*, 2018, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>
- Ismael, M. A., Elyamine, A. M., Moussa, M. G., Cai, M., Zhao, X., & Hu, C. (2019). Cadmium in plants: Uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics*, 11(2), 255-277. <https://doi.org/10.1039/C8MT00247A>

- Jan, S., & Parray, J. A. (2016). Heavy metal uptake in plants. En S. Jan & J. A. Parray, *Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants* (pp. 1-18). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1693-6_1
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68(1), 167-182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Jaworska, H., & Lemanowicz, J. (2019). Heavy metal contents and enzymatic activity in soils exposed to the impact of road traffic. *Scientific Reports*, 9(1), 19981. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56418-7>
- Jenkins, J. R., Viger, M., Arnold, E. C., Harris, Z. M., Ventura, M., Miglietta, F., Girardin, C., Edwards, R. J., Rumpel, C., Fornasier, F., Zavalloni, C., Tonon, G., Alberti, G., & Taylor, G. (2017). Biochar alters the soil microbiome and soil function: Results of next-generation amplicon sequencing across Europe. *GCB Bioenergy*, 9(3), 591-612. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12371>
- Jiao, S., Chen, W., Wang, J., Du, N., Li, Q., & Wei, G. (2018). Soil microbiomes with distinct assemblies through vertical soil profiles drive the cycling of multiple nutrients in reforested ecosystems. *Microbiome*, 6(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0526-0>
- Jiang, S., Chen, Y., Han, S., Lv, L., & Li, L. (2022). Next-generation sequencing applications for the study of fungal pathogens. *Microorganisms*, 10(10), 1882. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101882>
- Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace elements in soils and plants* (0 ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10158>
- Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., & Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of The Total Environment*, 601-602, 1591-1605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>
- Karimi, B., Maron, P. A., Chemidlin-Prevost Boure, N., Bernard, N., Gilbert, D., & Ranjard, L. (2017). Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 265-281. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0614-6>
- Kirchman, D. L. (2018). *Processes in microbial ecology* (Vol. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198789406.001.0001>
- Kirpichtchikova, T. A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M. A., & Jacquet, T. (2006). Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9), 2163-2190. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.02.006>
- Koranda, M., Kaiser, C., Fuchslueger, L., Kitzler, B., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S., & Richter, A. (2014). Fungal and bacterial utilization of organic substrates depends on substrate complexity and N availability. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 142-152. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12214>
- Kumar, U., Saqib, H. S. A., Islam, W., Prashant, P., Patel, N., Chen, W., Yang, F., You, M., & He, W. (2022). Landscape composition and soil physical-chemical properties drive the assemblages of bacteria and fungi in conventional vegetable fields. *Microorganisms*, 10(6), 1202. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061202>
- Küpper, H., & Leitenmaier, B. (2013). Cadmium-accumulating plants. En A. Sigel, H. Sigel, & R. K. Sigel (Eds.), *Cadmium: From Toxicity to Essentiality* (Vol. 11, pp. 373-393). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5179-8_12

- Lamb, E. G., Kennedy, N., & Siciliano, S. D. (2011). Effects of plant species richness and evenness on soil microbial community diversity and function. *Plant and Soil*, 338(1-2), 483-495. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0560-6>
- Latiffah, Z., Mah Kok, F., Heng Mei, H., Maziah, Z., & Baharuddin, S. (2010). *Fusarium* species isolated from mangrove soil in kampung pantai aceh, balik pulau, pulau pinang, malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 21(1), 21-29.
- Lee, K. K., Kim, H., & Lee, Y.-H. (2022). Cross-kingdom co-occurrence networks in the plant microbiome: Importance and ecological interpretations. *Frontiers in Microbiology*, 13, 953300. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953300>
- Leff, J. W., Jones, S. E., Prober, S. M., Barberán, A., Borer, E. T., Firn, J. L., Harpole, W. S., Hobbie, S. E., Hofmockel, K. S., Knops, J. M. H., McCulley, R. L., La Pierre, K., Risch, A. C., Seabloom, E. W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C. J., & Fierer, N. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967-10972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508382112>
- Li, B., Xu, R., Sun, X., Han, F., Xiao, E., Chen, L., Qiu, L., & Sun, W. (2021). Microbiome–environment interactions in antimony-contaminated rice paddies and the correlation of core microbiome with arsenic and antimony contamination. *Chemosphere*, 263, 128227. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128227>
- Li, H., Dong, X., da Silva, E. B., de Oliveira, L. M., Chen, Y., & Ma, L. Q. (2017). Mechanisms of metal sorption by biochars: Biochar characteristics and modifications. *Chemosphere*, 178, 466-478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.072>
- Liang, G., Gong, W., Li, B., Zuo, J., Pan, L., & Liu, X. (2019). Analysis of heavy metals in foodstuffs and an assessment of the health risks to the general public via consumption in Beijing, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(6), 909. <https://doi.org/10.3390/ijerph16060909>
- Liao, M., Luo, Y., Zhao, X., & Huang, C. (2005). Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 6(5), 324-330. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0324>
- Lin, Y.-F., & Aarts, M. G. M. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3187-3206. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1089-z>
- 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>
- Liu, H., Wang, C., Xie, Y., Luo, Y., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2020). Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an enterprise-intensive region. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122478. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122478>
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2018). Drivers of microbial community structure in forest soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4331-4338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8950-4>
- Lorena, B.-B., Javiera, O., & Jean Franco, C. (2021). Facultative fungal endophytes and their potential for the development of sustainable agriculture. In *Microbial Management of Plant Stresses* (pp. 1-12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85193-0.00014-0>

- Luo, J.-S., & Zhang, Z. (2021). Mechanisms of cadmium phytoremediation and detoxification in plants. *The Crop Journal*, 9(3), 521-529. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.02.001>
- Luo, J., Xiao, X., & Luo, sheng-lian. (2010). Biosorption of cadmium(li) from aqueous solutions by industrial fungus *Rhizopus cohnii*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20(6), 1104-1111. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(09\)60264-8](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(09)60264-8)
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M., & White, P. J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: A review. *Journal of Experimental Botany*, 62(1), 21-37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq281>
- Ma, A., Zhuang, X., Wu, J., Cui, M., Lv, D., Liu, C., & Zhuang, G. (2013). Ascomycota members dominate fungal communities during straw residue decomposition in arable soil. *PLoS ONE*, 8(6), e66146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066146>
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., Li, R., & Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30(2), 261-278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
- Malik, A. A., Chowdhury, S., Schlager, V., Oliver, A., Puissant, J., Vazquez, P. G. M., Jehmlich, N., von Bergen, M., Griffiths, R. I., & Gleixner, G. (2016). Soil fungal:bacterial ratios are linked to altered carbon cycling. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01247>
- Manguilimotan, L. C., & Bitacura, J. G. (2018). Biosorption of cadmium by filamentous fungi isolated from coastal water and sediments. *Journal of Toxicology*, 2018, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2018/7170510>
- Manzotti, A., Bergna, A., Burow, M., Jørgensen, H. J. L., Cernava, T., Berg, G., Collinge, D. B., & Jensen, B. (2020). Insights into the community structure and lifestyle of the fungal root endophytes of tomato by combining amplicon sequencing and isolation approaches with phytohormone profiling. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), fiae052. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae052>
- Marchetti, C. (2013). Role of calcium channels in heavy metal toxicity. *ISRN Toxicology*, 2013, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2013/184360>
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Vinothkanna, A., Yin, H., Liu, X., & Meng, D. (2021). Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment – A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112863. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112863>
- Mengistu, D. A. (2021). Public health implications of heavy metals in foods and drinking water in Ethiopia (2016 to 2020): Systematic review. *BMC Public Health*, 21(1), 2114. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-12189-3>
- Meter, A., Atkinson, R. J., & Liberte, B. (2019). Cadmium in cacao from latin america and the caribbean. A review of research and potential mitigation solutions. *CAF*. <https://cafscioteca.azurewebsites.net/handle/123456789/1506>
- Mhete, M., Eze, P. N., Rahube, T. O., & Akinyemi, F. O. (2020). Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. *Scientific African*, 7, e00246. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00246>

- Ministerio de Agricultura (MINAGRICULTURA). (2021). CADENA DE CACAO Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales Marzo 2021. Url: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>. Consulta: Diciembre, 2022
- Mohammadian Fazli, M., Soleimani, N., Mehrasbi, M., Darabian, S., Mohammadi, J., & Ramazani, A. (2015). Highly cadmium tolerant fungi: Their tolerance and removal potential. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>
- Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. V., Canchignia-Martínez, F., & Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodiatheobromae*(Pat.) Griffon & Maubl [(Syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: Symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653-662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Muszyńska, E., & Hanus-Fajerska, E. (2015). Why are heavy metal hyperaccumulating plants so amazing? *BioTechnologia*, 4, 265-271. <https://doi.org/10.5114/bta.2015.57730>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Nagy, Z., Montigny, C., Leverrier, P., Yeh, S., Goffeau, A., Garrigos, M., & Falson, P. (2006). Role of the yeast ABC transporter Yor1p in cadmium detoxification. *Biochimie*, 88(11), 1665-1671. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.014>
- Naveed, M., Herath, L., Moldrup, P., Arthur, E., Nicolaisen, M., Norgaard, T., Ferré, T. P. A., & de Jonge, L. W. (2016). Spatial variability of microbial richness and diversity and relationships with soil organic carbon, texture and structure across an agricultural field. *Applied Soil Ecology*, 103, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.004>
- Naylor, D., McClure, R., & Jansson, J. (2022). Trends in microbial community composition and function by soil depth. *Microorganisms*, 10(3), 540. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030540>
- Nicolitch, O., Feucherolles, M., Churin, J.-L., Fauchery, L., Turpault, M.-P., & Uroz, S. (2019). A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. *Scientific Reports*, 9(1), 14403. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50730-y>
- Nilsson, R. H., Anslan, S., Bahram, M., Wurzbacher, C., Baldrian, P., & Tedersoo, L. (2019). Mycobiome diversity: High-throughput sequencing and identification of fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(2), 95-109. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0116-y>
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259-D264. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>
- Oliva, M., Rubio, K., Epquin, M., Marlo, G., & Leiva, S. (2020). Cadmium uptake in native cacao trees in agricultural lands of bagua, peru. *Agronomy*, 10(10), 1551. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101551>
- Oliveira, B. R. M., de Almeida, A.-A. F., Santos, N. de A., & Pirovani, C. P. (2022). Tolerance strategies and factors that influence the cadmium uptake by cacao tree. *Scientia Horticulturae*, 293, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110733>

- Osmolovskaya, N. G., Dung, V. V., Kudryashova, Z. K., Kuchaeva, L. N., & Popova, N. F. (2018). Effect of cadmium on distribution of potassium, calcium, magnesium, and oxalate accumulation in *Amaranthus cruentus* L. *Plants. Russian Journal of Plant Physiology*, 65(4), 553-562. <https://doi.org/10.1134/S1021443718040076>
- Ott, T., Fritz, E., Polle, A., & Schatzger, A. (2002). Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. And its reaction to cadmium. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(3), 359-366. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01025.x>
- Pabón, M., & Pabón, M. (2016). Caracterización socio-económica y productiva del cultivo de cacao en el departamento de Santander (Colombia). <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.239289>
- Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy metals in crop plants: Transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*, 5(3), 447-463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
- Pambuka, G. T., Kinge, T. R., Ghosh, S., Cason, E. D., Nyaga, M. M., & Gryzenhout, M. (2022). Plant and soil core microbiomes in a two-year sorghum-legume intercropping system of underutilized crops in South Africa. *Microorganisms*, 10(10), 2079. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102079>
- Passarini, M. R. Z., Ottoni, J. R., Costa, P. E. dos S., Hissa, D. C., Falcão, R. M., Melo, V. M. M., Balbino, V. Q., Mendonça, L. A. R., Lima, M. G. de S., Coutinho, H. D. M., & Verde, L. C. L. (2022). Fungal community diversity of heavy metal contaminated soils revealed by metagenomics. *Archives of Microbiology*, 204(5), 255. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02860-7>
- Pereira de Araújo, R., Furtado de Almeida, A.-A., Silva Pereira, L., Mangabeira, P. A. O., Olímpio Souza, J., Pirovani, C. P., Ahnert, D., & Baligar, V. C. (2017). Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 148-157. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.006>
- Peršoh, D. (2015). Plant-associated fungal communities in the light of metagenomics. *Fungal Diversity*, 75(1), 1-25. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0334-9>
- Poll, C., Brune, T., Begerow, D., & Kandler, E. (2010). Small-scale diversity and succession of fungi in the detritosphere of rye residues. *Microbial Ecology*, 59(1), 130-140. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9541-9>
- Praveen, R., & Nagalakshmi, R. (2022). Review on bioremediation and phytoremediation techniques of heavy metals in contaminated soil from dump site. *Materials Today: Proceedings*, 68, 1562-1567. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.190>
- Prifti, E., & Zucker, J.-D. (2015). The new science of metagenomics and the challenges of its use in both developed and developing countries. En S. Morand, J.-P. Dujardin, R. Lefait-Robin, & C. Apiwathnasorn (Eds.), *Socio-Ecological Dimensions of Infectious Diseases in Southeast Asia* (pp. 191-216). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-287-527-3_12
- Proulx, S., Promislow, D., & Phillips, P. (2005). Network thinking in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(6), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.004>
- Priyadarshini, E., Priyadarshini, S. S., Cousins, B. G., & Pradhan, N. (2021). Metal-Fungus interaction: Review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. *Chemosphere*, 274, 129976. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129976>

Qadir, S., Jamshieed, S., Rasool, S., Ashraf, M., Akram, N. A., & Ahmad, P. (2014). Modulation of plant growth and metabolism in cadmium-enriched environments. En D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 229, pp. 51-88). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03777-6_4

Quezada-Hinojosa, R. P., Föllmi, K. B., Verrecchia, E., Adatte, T., & Matera, V. (2015). Speciation and multivariable analyses of geogenic cadmium in soils at Le Gurnigel, Swiss Jura Mountains. *CATENA*, 125, 10-32. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.10.003>

Raich, J. W., Clark, D. A., Schwendenmann, L., & Wood, T. E. (2014). Aboveground tree growth varies with belowground carbon allocation in a tropical rainforest environment. *PLoS ONE*, 9(6), e100275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100275>

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>

Rajput, V., Minkina, T., Semenkov, I., Klink, G., Tarigholizadeh, S., & Sushkova, S. (2021). Phylogenetic analysis of hyperaccumulator plant species for heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(4), 1629-1654. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00527-0>

Ramtahal, G., Umaharan, P., Hanuman, A., Davis, C., & Ali, L. (2019). The effectiveness of soil amendments, biochar and lime, in mitigating cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* L. *Science of The Total Environment*, 693, 133563. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.369>

Reeves, R. D., Baker, A. J. M., Jaffré, T., Erskine, P. D., Echevarria, G., & Ent, A. (2018). A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytologist*, 218(2), 407-411. <https://doi.org/10.1111/nph.14907>

Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., & Akash, M. S. H. (2018). Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 157-184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>

Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>

Renella, G., Chaudri, A. M., & Brookes, P. C. (2002). Fresh additions of heavy metals do not model long-term effects on microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(1), 121-124. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00150-X)

Riess, K., Schön, M. E., Ziegler, R., Lutz, M., Shivas, R. G., Piątek, M., & Garnica, S. (2019). The origin and diversification of the Entorrhizales: Deep evolutionary roots but recent speciation with a phylogenetic and phenotypic split between associates of the Cyperaceae and Juncaceae. *Organisms Diversity & Evolution*, 19(1), 13-30. <https://doi.org/10.1007/s13127-018-0384-4>

Rizvi, A., Zaidi, A., Ameen, F., Ahmed, B., AlKahtani, M. D. F., & Khan, Mohd. S. (2020). Heavy metal induced stress on wheat: Phytotoxicity and microbiological management. *RSC Advances*, 10(63), 38379-38403. <https://doi.org/10.1039/D0RA05610C>

Rodríguez Albarracín, H. S., Darghan Contreras, A. E., & Henao, M. C. (2019). Spatial regression modeling of soils with high cadmium content in a cocoa producing area of Central Colombia. *Geoderma Regional*, 16, e00214. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00214>

Rodríguez Eugenio, N., McLaughlin, M. J., & Pennock, D. J. (2018). Soil pollution: A hidden reality. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- Rousk, J., Brookes, P. C., & Bååth, E. (2010). Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(6), 926-934. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.009>
- Sácký, J., Černý, J., Šantrůček, J., Borovička, J., Leonhardt, T., & Kotrba, P. (2021). Cadmium hyperaccumulating mushroom *Cystoderma carcharias* has two metallothionein isoforms usable for cadmium and copper storage. *Fungal Genetics and Biology*, 153, 103574. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103574>
- Santoyo, G., Hernández-Pacheco, C., Hernández-Salmerón, J., & Hernández-León, R. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), e03R01. <https://doi.org/10.5424/sjar/2017151-9990>
- Schappe, T., Albornoz, F. E., Turner, B. L., & Jones, F. A. (2020). Co-occurring fungal functional groups respond differently to tree neighborhoods and soil properties across three tropical rainforests in panama. *Microbial Ecology*, 79(3), 675-685. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01446-z>
- Schmidt, S. K., Nemergut, D. R., Darcy, J. L., & Lynch, R. (2014). Do bacterial and fungal communities assemble differently during primary succession? *Molecular Ecology*, 23(2), 254-258. <https://doi.org/10.1111/mec.12589>
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4215-4224. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001>
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Antunes, P. M. C. (2016). Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. En P. de Voogt (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 241* (Vol. 241, pp. 73-137). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/398_2016_8
- Shanmugaraj, B. M., Malla, A., & Ramalingam, S. (2019). Cadmium stress and toxicity in plants: An overview. En *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 1-17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00001-2>
- Sharma, V., & Pant, D. (2018). Structural basis for expanding the application of bioligand in metal bioremediation: A review. *Bioresource Technology*, 252, 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.070>
- Sheldon, A. R., & Menzies, N. W. (2005). The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil*, 278(1-2), 341-349. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-8815-3>
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>
- Song, Y., Jin, L., & Wang, X. (2017). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133-141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
- Sterckeman, T., & Thomine, S. (2020). Mechanisms of cadmium accumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(4), 322-359. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1792179>
- Suárez, L. R., Suárez Salazar, J. C., Casanoves, F., & Ngo Bieng, M. A. (2021). Cacao agroforestry systems improve soil fertility: Comparison of soil properties between forest, cacao

agroforestry systems, and pasture in the Colombian Amazon. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 314, 107349. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107349>

Suhani, I., Sahab, S., Srivastava, V., & Singh, R. P. (2021). Impact of cadmium pollution on food safety and human health. *Current Opinion in Toxicology*, 27, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.04.004>

Sui, X., Zhang, R., Frey, B., Yang, L., Liu, Y., Ni, H., & Li, M. (2021). Soil physicochemical properties drive the variation in soil microbial communities along a forest successional series in a degraded wetland in northeastern China. *Ecology and Evolution*, 11(5), 2194-2208. <https://doi.org/10.1002/ece3.7184>

Sun, H., Shao, C., Jin, Q., Li, M., Zhang, Z., Liang, H., Lei, H., Qian, J., & Zhang, Y. (2022). Effects of cadmium contamination on bacterial and fungal communities in *Panax ginseng*-growing soil. *BMC Microbiology*, 22(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02488-z>

Sun, J.-M., Irzykowski, W., Jedryczka, M., & Han, F.-X. (2005). Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic dna markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(4), 385-395. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00077.x>

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., ... Abarenkov, K. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346(6213), 1256688. <https://doi.org/10.1126/science.1256688>

Tedersoo, L., Bahram, M., Zinger, L., Nilsson, R. H., Kennedy, P. G., Yang, T., Anslan, S., & Mikryukov, V. (2022). Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*, 31(10), 2769-2795. <https://doi.org/10.1111/mec.16460>

Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>

Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of The Total Environment*, 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>

Vásquez-Barajas, E. F., García-Torres, N. E., Bastos-Osorio, L. M., & Lázaro-Pacheco, J. M. (2018). Análisis económico del sector cacaotero en Norte de Santander, Colombia y a nivel internacional. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 8(2), 237-250. <https://doi.org/10.19053/20278306.v8.n2.2018.7963>

Verbruggen, N., Juraniec, M., Baliardini, C., & Meyer, C.-L. (2013). Tolerance to cadmium in plants: The special case of hyperaccumulators. *BioMetals*, 26(4), 633-638. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9659-6>

Větrovský, T., Morais, D., Kohout, P., Lepinay, C., Algora, C., Awokunle, Hollá, S., Bahmann, B. D., Bílohnědá, K., Brabcová, V., D'Alò, F., Human, Z. R., Jomura, M., Kolařík, M., Kvasničková, J., Lladó, S., López-Mondéjar, R., Martinović, T., Mašínová, T., Meszárošová, L., ... Baldrian, P. (2020). GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. *Scientific Data*, 7(1), 228. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0567-7>

- Vishwakarma, G. S., Bhattacharjee, G., Gohil, N., & Singh, V. (2020). Current status, challenges and future of bioremediation. En *Bioremediation of Pollutants* (pp. 403-415). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819025-8.00020-X>
- Wachira, P., Kimenju, J., Okoth, S., & Kiarie, J. (2014). Conservation and sustainable management of soil biodiversity for agricultural productivity. En N. Kaneko, S. Yoshiura, & M. Kobayashi (Eds.), *Sustainable Living with Environmental Risks* (pp. 27-34). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54804-1_3
- Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V. R., Taylor, A. J., Engeseth, N., & Margenot, A. J. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *PLOS ONE*, 17(2), e0261989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261989>
- Wahsha, M., Nadimi-Goki, M., Fornasier, F., Al-Jawasreh, R., Hussein, E. I., & Bini, C. (2017). Microbial enzymes as an early warning management tool for monitoring mining site soils. *CATENA*, 148, 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.02.021>
- Wallenius, K., Rita, H., Simpanen, S., Mikkonen, A., & Niemi, R. M. (2010). Sample storage for soil enzyme activity and bacterial community profiles. *Journal of Microbiological Methods*, 81(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.021>
- Walsh, A. M., Crispie, F., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2017). Translating omics to food microbiology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8(1), 113-134. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025729>
- Wang, M., Wang, L., Zhao, S., Li, S., Lei, X., Qin, L., Sun, X., & Chen, S. (2021). Manganese facilitates cadmium stabilization through physicochemical dynamics and amino acid accumulation in rice rhizosphere under flood-associated low pe+pH. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126079. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126079>
- Wang, Y., Xu, X., Liu, T., Wang, H., Yang, Y., Chen, X., & Zhu, S. (2020). Analysis of bacterial and fungal communities in continuous-cropping ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) fields in different areas in China. *Scientific Reports*, 10(1), 3264. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58608-0>
- Wang, M., Chen, S., Chen, L., & Wang, D. (2019). Responses of soil microbial communities and their network interactions to saline-alkaline stress in Cd-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 252, 1609-1621. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.082>
- Welch, R. M., & Norvell, W. A. (1999). Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. En M. J. McLaughlin & B. R. Singh (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants* (pp. 125-150). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_6
- Wang, W., Zhai, Y., Cao, L., Tan, H., & Zhang, R. (2016). Endophytic bacterial and fungal microbiota in sprouts, roots and stems of rice (*Oryza sativa* L.). *Microbiological Research*, 188-189, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.009>
- Wong, C., Roberts, S. M., & Saab, I. N. (2022). Review of regulatory reference values and background levels for heavy metals in the human diet. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 130, 105122. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105122>
- Wu, B., Luo, H., Wang, X., Liu, H., Peng, H., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2022). Effects of environmental factors on soil bacterial community structure and diversity in different contaminated districts of Southwest China mine tailings. *Science of The Total Environment*, 802, 149899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149899>

- Xu, L., Ravnskov, S., Larsen, J., Nilsson, R. H., & Nicolaisen, M. (2012). Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.010>
- Yang, G.-L., Zheng, M.-M., Tan, A.-J., Liu, Y.-T., Feng, D., & Lv, S.-M. (2021). Research on the mechanisms of plant enrichment and detoxification of cadmium. *Biology*, 10(6), 544. <https://doi.org/10.3390/biology10060544>
- Yang, T., Adams, J. M., Shi, Y., He, J., Jing, X., Chen, L., Tedersoo, L., & Chu, H. (2017). Soil fungal diversity in natural grasslands of the Tibetan Plateau: Associations with plant diversity and productivity. *New Phytologist*, 215(2), 756-765. <https://doi.org/10.1111/nph.14606>
- Yasanthika, W., Wanasinghe, D., Mortimer, P., Monkai, J., & Farias, A. (2022). The importance of culture-based techniques in the genomic era for assessing the taxonomy and diversity of soil fungi. *Mycosphere*, 13(1), 724-751. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/8>
- Yelle, D. J., Ralph, J., Lu, F., & Hammel, K. E. (2008). Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1844-1849. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01605.x>
- Yi, Z., Lehto, N. J., Robinson, B. H., & Cavanagh, J.-A. E. (2020). Environmental and edaphic factors affecting soil cadmium uptake by spinach, potatoes, onion and wheat. *Science of The Total Environment*, 713, 136694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136694>
- Zhang, X., Fu, G., Xing, S., Fu, W., Liu, X., Wu, H., Zhou, X., Ma, Y., Zhang, X., & Chen, B. (2022). Structure and diversity of fungal communities in long-term copper-contaminated agricultural soil. *Science of The Total Environment*, 806, 151302. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151302>
- Zhang, Y., Naafs, B. D. A., Huang, X., Song, Q., Xue, J., Wang, R., Zhao, M., Evershed, R. P., Pancost, R. D., & Xie, S. (2022). Variations in wetland hydrology drive rapid changes in the microbial community, carbon metabolic activity, and greenhouse gas fluxes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 317, 269-285. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2021.11.014>
- Zhang, D., Du, G., Chen, D., Shi, G., Rao, W., Li, X., Jiang, Y., Liu, S., & Wang, D. (2019). Effect of elemental sulfur and gypsum application on the bioavailability and redistribution of cadmium during rice growth. *Science of The Total Environment*, 657, 1460-1467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.057>
- Zhao, M., Wang, M., Zhao, Y., Hu, N., Qin, L., Ren, Z., Wang, G., & Jiang, M. (2022). Soil microbial abundance was more affected by soil depth than the altitude in peatlands. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1068540. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1068540>
- Zheng, L., Li, Y., Shang, W., Dong, X., Tang, Q., & Cheng, H. (2019). The inhibitory effect of cadmium and/or mercury on soil enzyme activity, basal respiration, and microbial community structure in coal mine-affected agricultural soil. *Annals of Microbiology*, 69(8), 849-859. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01478-3>
- Zhu, P., Li, Y., Gao, Y., Yin, M., Wu, Y., Liu, L., Du, N., Liu, J., Yu, X., Wang, L., & Guo, W. (2021). Insight into the effect of nitrogen-rich substrates on the community structure and the co-occurrence network of thermophiles during lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 319, 124111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124111>
- Žifčáková, L., Větrovský, T., Howe, A., & Baldrian, P. (2016). Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter: Seasonal dynamics of a soil microbial community. *Environmental Microbiology*, 18(1), 288-301. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13026>

Zulfiqar, U., Jiang, W., Xiukang, W., Hussain, S., Ahmad, M., Maqsood, M. F., Ali, N., Ishfaq, M., Kaleem, M., Haider, F. U., Farooq, N., Naveed, M., Kucerik, J., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2022). Cadmium phytotoxicity, tolerance, and advanced remediation approaches in agricultural soils; a comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 773815.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.773815>

Anexos

Tabla Anexo 1 Estadística descriptiva de las variables fisicoquímicas determinadas

Finca	Tipo	Profundidad	n	Arenillas %		Limos %		pH		Cd _{disp} mg kg ⁻¹		Cd _{total} mg kg ⁻¹		Ca meq 100 g ⁻¹		Mg meq 100 g ⁻¹		K meq 100 g ⁻¹		Na meq 100 g ⁻¹		CIE meq 100 g ⁻¹	
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
F1	SCC	RZ	3	34	0	36	0,00	6,21	0,11	10,24	5,80	14,97	5,09	17,63	0,90	2,08	0,39	0,64	0,09	0,003	0,01	20,55	0,59
F1	SCC	D1	8	28	6,36	32	3,92	6,18	0,61	2,12	0,95	5,65	2,39	11,14	4,34	0,52	0,31	0,20	0,06	0,072	0,04	11,92	4,36
F1	SCC	D2	3	30	6,00	36	6,93	6,78	0,24	2,29	1,28	6,94	3,02	14,10	3,55	0,33	0,12	0,19	0,06	0,033	0,04	14,65	3,70
F1	SWC	D1	3	36	3,46	42	2,00	5,71	0,35	0,32	0,20	2,14	0,38	7,58	2,79	0,46	0,16	0,15	0,01	0,143	0,01	8,33	2,63
F1	SWC	D2	1	42		32		5,85		0,10		2,37		8,26		0,11		0,09		0,130		8,59	
F2	SCC	RZ	3	30	4,00	36	8,72	4,60	0,91	0,53	0,36	1,75	1,19	6,82	3,07	2,20	0,50	0,28	0,11	0,007	0,01	9,29	3,47
F2	SCC	D1	3	32	4,75	49	3,56	5,03	0,21	0,30	0,56	0,75	0,95	1,72	0,75	0,27	0,14	0,05	0,004	0,00	4,94	1,46	
F2	SCC	D2	1	36	6,45	49	3,56	5,03	0,21	0,30	0,56	0,75	0,95	1,72	0,75	0,27	0,14	0,05	0,004	0,00	4,94	1,46	
F2	SWC	D1	3	26	5,45	37	6,43	4,58	0,17	0,12	0,03	1,89	0,14	1,52	0,46	0,61	0,27	0,17	0,09	0,147	0,02	2,45	0,79
F2	SWC	D2	1	8		58		5,04		0,10		1,77		0,53		0,19		0,07		0,150		0,94	
F3	SCC	D1	6	20	8,83	21	3,60	4,67	0,37	0,14	0,06	1,74	0,46	2,61	2,84	0,62	0,46	0,31	0,11	0,095	0,03	3,63	3,24
F3	SCC	D2	3	25	4,93	27	4,04	4,62	0,23	0,19	0,15	1,86	0,45	1,95	1,83	0,36	0,33	0,09	0,02	0,090	0,02	2,49	2,15
F3	SWC	D1	3	3	2,31	19	3,06	5,10	0,06	0,96	0,17	4,49	0,25	3,29	0,42	1,28	0,24	0,27	0,04	0,163	0,01	5,00	0,53
F3	SWC	D2	1	4		18		5,54		0,33		5,84		1,80		0,19		0,07		0,120		2,18	

Finca	Tipo	Profundidad	n	P		Cu		Fe		Mn		Zn		B		N		CO		CT	
				Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
F1	SCC	RZ	3	63,75	52,25	24,76	43,72	164,21	53,83	6,48	1,59	6,77	3,09	0	0	0,57	0,55	8,69	5,21	11,29	6,56
F1	SCC	D1	8	72,30	28,69	9,01	1,14	156,65	85,61	9,92	4,02	10,14	5,99	0,01	0,10	0,55	0,10	2,29	0,48	3,15	0,67
F1	SCC	D2	3	66,43	4,16	4,57	0,37	164,81	59,74	2,13	3,92	1,11	0,47	0,00	0,00	0,47	0,10	1,28	0,06	2,06	0,39
F1	SWC	D1	3	4,86	0,37	1,33	0,21	164,68	59,74	2,13	3,92	1,11	0,47	0,00	0,00	0,38	0,03	1,23	0,01	0,49	0,62
F2	SCC	RZ	3	31,50	7,37	1,77	1,15	174,67	92,69	4,58	6,42	2,46	1,56	0,00	0,00	0,23	0,04	2,65	0,51	3,68	0,64
F2	SCC	D1	6	15,56	6,57	0,89	0,64	146,78	86,70	1,62	1,89	3,44	4,82	0,00	0,00	0,26	0,03	1,52	0,10	2,45	0,28
F2	SCC	D2	3	19,11	20,97	1,39	0,60	271,92	104,93	2,15	1,41	4,03	1,41	0,00	0,00	0,47	0,12	3,09	1,23	4,00	1,24
F2	SWC	D1	3	10,40	2,86	1,39	0,60	189,75	96,07	0,03	0,47	0,90	0,12	0,12	0,00	0,28	0,10	1,95	0,61	2,85	1,10
F2	SWC	D2	1	17,28	76,32	0,86	0,47	164,68	96,07	0,03	0,47	0,90	0,12	0,12	0,00	0,28	0,10	1,95	0,61	2,85	1,10
F3	SCC	D1	3	160,40	73,20	0,96	0,33	161,44	70,65	1,93	1,39	1,69	0,84	0,00	0,00	0,33	0,06	1,08	0,31	1,48	0,30
F3	SCC	D2	3	160,40	73,20	0,96	0,33	161,44	70,65	1,93	1,39	1,69	0,84	0,00	0,00	0,33	0,06	1,08	0,31	1,48	0,30
F3	SWC	D1	3	165,67	24,09	1,40	0,65	235,62	95,16	3,86	3,17	6,77	0,15	0,03	0,05	0,64	0,03	6,01	0,05	6,93	0,05
F3	SWC	D2	1	124,00		0,57		62,63		2,37		1,26		0,00		0,37		2,51		3,41	

Tabla Anexo 2 Resultados prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de Wilcoxon de las propiedades fisicoquímicas del suelo

Arcillas														
Finca	p-value 0,0007121													
F1-F2	0,16150													
F1-F3	0,00024													
F2-F3	0,01235													
Tipo	p-value = 0,0002413													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1,0000	0,037375	0,979423	0,037573	0,016381	0,003378								
F1SWC	0,037375	1,0000	0,101103	0,029401	0,008438	0,02843								
F2SCC	0,979423	0,101103	1,0000	0,051999	0,024945	0,004317								
F2SWC	0,037573	0,029401	0,051999	1,0000	0,486854	0,079594								
F3SCC	0,016381	0,008438	0,024945	0,486854	1,0000	0,006774								
F3SWC	0,003378	0,02843	0,004317	0,079594	0,006774	1,0000								
Profundidad	p-value = 0,01184													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1,0000	0,7584	0,0785	0,1206	0,1716	0,3313	0,6082	0,6057	0,3041	0,1716	0,1047	0,5375	0,0181	0,1716
F1SCCD2	0,7584	1,0000	0,6428	0,1840	0,5000	0,6973	0,7000	1,0000	0,2683	0,5000	0,1667	0,4000	0,0765	0,5000
F1SCCRz	0,0785	0,6428	1,0000	0,6374	0,2482	0,5097	0,6428	0,1967	0,0636	0,2482	0,0256	0,0636	0,0593	0,2482
F1SWCD1	0,1206	0,1840	0,6374	1,0000	0,3458	0,8964	0,1840	0,1840	0,0765	0,3458	0,0372	0,0765	0,0722	0,3458
F1SWCD2	0,1716	0,5000	0,2482	0,3458	1,0000	0,2072	0,5000	0,5000	0,5000	1,0000	0,2857	0,5000	0,3458	1,0000
F2SCCD1	0,3313	0,6973	0,5097	0,8964	0,2072	1,0000	0,3642	0,8969	0,1539	0,2072	0,0303	0,2433	0,0269	0,2072
F2SCCD2	0,6082	0,7000	0,6428	0,1840	0,5000	0,3642	1,0000	0,7000	0,5000	0,2997	1,0000	0,0765	0,0765	0,5000
F2SCCRz	0,6057	1,0000	0,1967	0,1840	0,5000	0,8969	0,7000	1,0000	0,2683	0,5000	0,1667	0,4000	0,0765	0,5000
F2SWCD1	0,3041	0,2683	0,0636	0,0765	0,5000	0,1539	0,7000	0,2683	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1840	0,6374
F2SWCD2	0,1716	0,5000	0,2482	0,3458	1,0000	0,2072	0,5000	0,5000	1,0000	1,0000	0,2857	0,5000	0,3458	1,0000
F3SCCD1	0,1047	0,1667	0,0256	0,0372	0,2857	0,0303	0,2997	0,1667	1,0000	0,2857	1,0000	0,6041	0,0275	0,2857
F3SCCD2	0,5375	0,4000	0,0636	0,0765	0,5000	0,2433	1,0000	0,4000	1,0000	0,5000	0,6041	1,0000	0,0765	0,5000
F3SWCD1	0,0181	0,0765	0,0593	0,0722	0,3458	0,0269	0,0765	0,0765	0,1840	0,3458	0,0275	0,0765	1,0000	1,0000
F3SWCD2	0,1716	0,5000	0,2482	0,3458	1,0000	0,2072	0,5000	0,5000	0,6374	1,0000	0,2857	0,5000	1,0000	1,0000
Limos														
Finca	p-value 3,627e-05													
F1-F2	0,11900													
F1-F3	0,0000073													
F2-F3	0,00422													
Tipo	p-value = 4,413e-05													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1,0000	0,0523	0,0386	0,1791	0,0003	0,0032								
F1SWC	0,0523	1,0000	0,0244	0,8839	0,0062	0,0294								
F2SCC	0,0386	0,0244	1,0000	0,0287	0,1324	0,0334								
F2SWC	0,1791	0,8839	0,0287	1,0000	0,0062	0,0294								
F3SCC	0,0003	0,0062	0,1324	0,0062	1,0000	0,0704								
F3SWC	0,0032	0,0294	0,0334	0,0294	0,0704	1,0000								
Profundidad	p-value = 0,0004655													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1,0000	0,5308	0,1388	0,0228	0,8411	0,1524	0,0173	0,5347	0,1765	0,1661	0,0022	0,1215	0,0176	0,1661
F1SCCD2	0,5308	1,0000	0,6374	0,1642	1,0000	0,2956	0,0722	1,0000	1,0000	0,3458	0,0250	0,1840	0,0765	0,3458
F1SCCRz	0,1388	0,6374	1,0000	0,0636	0,2482	0,0250	0,0593	0,6428	0,6428	0,2482	0,0231	0,0636	0,0636	0,2482
F1SWCD1	0,0228	0,1642	0,0636	1,0000	0,5000	0,0275	0,0765	0,3687	0,5066	0,5000	0,0256	0,1000	0,1000	0,5000
F1SWCD2	0,8411	1,0000	0,2482	0,5000	1,0000	0,4492	0,3458	1,0000	0,6374	1,0000	0,1946	0,5000	0,5000	1,0000
F2SCCD1	0,1524	0,2956	0,0250	0,0275	0,4492	1,0000	0,0269	0,3642	0,0684	0,2072	0,0143	0,5133	0,0275	0,2072
F2SCCD2	0,0173	0,0722	0,0593	0,0765	0,3458	0,0269	1,0000	0,0765	0,0765	0,3458	0,2893	0,0765	1,0000	1,0000
F2SCCRz	0,5347	1,0000	0,6428	0,3687	1,0000	0,3642	0,0765	1,0000	1,0000	0,5000	0,0256	0,2683	0,1000	0,5000
F2SWCD1	0,1765	1,0000	0,6428	0,5066	0,6374	0,0684	0,0765	1,0000	1,0000	0,5000	0,0256	0,1000	0,1000	0,5000
F2SWCD2	0,1661	0,3458	0,2482	0,5000	1,0000	0,2072	0,3458	0,5000	0,5000	1,0000	0,1946	0,5000	0,5000	1,0000
F3SCCD1	0,0022	0,0250	0,0231	0,0256	0,1946	0,0143	0,2893	0,0256	0,0256	0,1946	1,0000	0,1056	0,2914	0,6041
F3SCCD2	0,1215	0,1840	0,0636	0,1000	0,5000	0,5133	0,0765	0,2683	0,1000	0,5000	0,1056	1,0000	0,1000	0,5000
F3SWCD1	0,0176	0,0765	0,0636	0,1000	0,5000	0,0275	1,0000	0,1000	0,1000	0,5000	0,2914	0,1000	1,0000	1,0000
F3SWCD2	0,1661	0,3458	0,2482	0,5000	1,0000	0,2072	1,0000	0,5000	0,5000	1,0000	0,6003	0,5000	1,0000	1,0000

pH														
Finca	p-value 4,445e-07													
F1-F2	0,00000													
F1-F3	0,0000116													
F2-F3	0,00008													
Tipo	p-value = 3,435e-06													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0	5,38E+01	0,004867	0,000137	0,012526								
F1SWC	2,94E+04	1	2,198	0,028571	0	0,057143								
F2SCC	5,38E+01	0,002198	1	1	0,374205	0,132967								
F2SWC	4,87E+03	0,028571	5,99E+05	1	1	0,028571								
F3SCC	1,37E+02	0	3,74E+05	0,756973	1	0,006851								
F3SWC	1,25E+04	0,057143	1,33E+05	0,028571	0,006851	1								
Profundidad	p-value = 0,0006566													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0,0820326	0,6303030	0,1939393	0,6666667	0,0026640	0,0484848	0,0242424	0,0121212	0,4444444	0,0026640	0,0121212	0,0848484	0,4444444
F1SCCD2	0,0820326	1	0,0765225	0,0765225	0,3457786	0,0275318	0,0765225	0,0765225	0,0765225	0,3457786	0,0275318	0,0765225	0,0765225	0,3457786
F1SCCRz	0,6303030	0,0765225	1	0,1000000	0,5000000	0,0238095	0,1000000	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,0238095	0,1000000	0,1000000	0,5000000
F1SWCD1	0,1939393	0,0765225	0,1000000	1	1	0,0238095	0,1000000	0,2000000	0,1000000	0,5000000	0,0238095	0,1000000	0,1000000	0,5000000
F1SWCD2	0,6666666	0,3457786	0,5000000	1	1	0,2857142	0,5000000	0,5000000	0,5000000	1	0,2857142	0,5000000	0,5000000	1
F2SCCD1	0,0026640	0,0275318	0,0238095	0,0238095	0,2857143	1	0,1666666	0,5476190	0,3809523	0,5714286	0,6991341	0,3809523	0,0952381	0,2857143
F2SCCD2	0,0484848	0,0765225	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,1666666	1	0,7000000	0,1000000	1	0,1666666	0,2000000	1	0,5000000
F2SCCRz	0,0242424	0,0765225	0,1000000	0,2000000	0,5000000	0,5476190	0,7000000	1	0,7000000	1	0,7142857	0,7000000	0,7000000	1
F2SWCD1	0,0121212	0,0765225	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,3809523	0,1000000	0,7000000	1	0,5000000	0,7142857	1	0,1000000	0,5000000
F2SWCD2	0,4444444	0,3457786	0,5000000	0,5000000	1	0,5714285	1	1	0,5000000	1	0,3129506	0,5000000	0,5000000	1
F3SCCD1	0,0026640	0,0275318	0,0238095	0,0238095	0,2857143	0,6991341	0,1666666	0,7142857	0,7142857	0,3129507	1	0,7954180	0,0238095	0,2857143
F3SCCD2	0,0121212	0,0765225	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,3809523	0,2000000	0,7000000	1	0,5000000	0,7954180	1	0,1000000	0,5000000
F3SWCD1	0,0848484	0,0765225	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,0952380	1	0,7000000	0,1000000	0,5000000	0,0238095	0,1000000	1	0,5000000
F3SWCD2	0,4444444	0,3457786	0,5000000	1	1	0,2857142	0,5000000	1	0,5000000	1	0,2857142	0,5000000	0,5000000	1
Cd disponible														
Finca	p-value 0,0001034													
F1-F2	0,0002078059													
F1-F3	0,0005977971													
F2-F3	0,9267392522													
Tipo	p-value = 5,982e-06													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0,0048447	5,07E+01	0,0034613	7,11E+01	0,016815920								
F1SWC	4,84E+03	1	849,396	0,6445521	378,188	0,110210183								
F2SCC	5,07E+01	0,8493964	1	0,3751554	1,67E+05	0,123891319								
F2SWC	3,46E+03	0,6445521	3,75E+05	1	1,000,000	0,029401048								
F3SCC	7,11E+01	0,3781882	1,67E+05	1	1,000,000	0,007406122								
F3SWC	1,68E+04	0,1102101	1,24E+05	0,0294010	7,41E+03	1								
Profundidad	p-value = 0,0008189													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0,8378927	0,0121212	0,0242424	0,2222222	0,0035274	0,0316985	0,0242424	0,0121212	0,2222222	0,0021568	0,0186336	0,0848484	0,2222222
F1SCCD2	0,8378927	1	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,0488846	0,1840386	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,0218895	0,0765225	0,4000000	0,5000000
F1SCCRz	0,0121212	0,1000000	1	0,1000000	0,5000000	0,0256011	0,0765225	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,0218895	0,0765225	0,1000000	0,5000000
F1SWCD1	0,0242424	0,1000000	0,1000000	1	0,6373519	0,5896385	1	0,7000000	0,5065551	0,6373519	0,2030917	0,4795001	0,1000000	0,5000000
F1SWCD2	0,2222222	0,5000000	0,5000000	0,6373518	1	0,5811694	1	0,5000000	0,6373518	1	0,7551888	1	0,5000000	0,5000000
F2SCCD1	0,0035274	0,0488846	0,0256011	0,5896385	0,5811695	1	1	0,1486347	1	0,5811695	0,5913701	0,8875370	0,1486347	0,4363852
F2SCCD2	0,0316985	0,1840386	0,0765225	1	1	1	1	0,6579050	1	1	0,8780883	1	0,6579050	0,5000000
F2SCCRz	0,0242424	0,1000000	0,1000000	0,7000000	0,5000000	0,1486347	0,6579050	1	0,1000000	0,5000000	0,0218895	0,1840386	0,2000000	0,5000000
F2SWCD1	0,0121212	0,1000000	0,1000000	0,5065551	0,6373519	1	1	0,1000000	1	0,6373519	0,8875370	1	0,1000000	0,5000000
F2SWCD2	0,2222222	0,5000000	0,5000000	0,6373518	1	0,5811694	1	0,5000000	0,6373518	1	0,7551888	1	0,5000000	0,5000000
F3SCCD1	0,0021568	0,0218895	0,0218895	0,2030917	0,7551889	0,5913701	0,8780883	0,0218895	0,8875370	0,7551889	1	0,8780883	0,0218895	0,1678351
F3SCCD2	0,0186336	0,0765225	0,0765225	0,4795001	1	0,8875370	1	0,1840386	1	1	0,8780883	1	0,0765225	0,5000000
F3SWCD1	0,0848484	0,4000000	0,1000000	0,1000000	0,5000000	0,1486347	0,6579050	0,2000000	0,1000000	0,5000000	0,0218895	0,0765225	1	0,5000000
F3SWCD2	0,2222222	0,5000000	0,5000000	1	1	0,4363852	1	1	0,5000000	1	0,1678351	1	0,5000000	0,5000000

Cd total													
Finca		p-value 1.3e-05											
F1-F2	0,00001												
F1-F3	0.002188538												
F2-F3	0,06229												
Tipo		p-value = 3.733e-06											
F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1 0.0067390; 4.32E+01 0.0034781; 0.0001367; 0.221738854												
F1SWC	6,74E+03 1 103.297 0.1464891; 0.0751768; 0.028571429												
F2SCC	4.32E+01 0.1032967; 1 0.2120879 0.3024752 0.001098901												
F2SWC	3,48E+03 0.1464891; 2,12E+05 1 0.5881274 0.028571429												
F3SCC	1,37E+02 0.0751768; 3,02E+05 0.5881274 1 0.006773944												
F3SWC	2,22E+05 0.0285714; 1,10E+03 0.0285714; 0.0067739; 1												
Profundidad		p-value = 0.0008373											
F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1 0.4739519; 0.0186336 0.0316985; 0.3308985 0.0054578; 0.0186336 0.0316985; 0.0186336 0.1734417 0.0036010; 0.0316985; 0.4739519												
F1SCCD2	0.4739519; 1 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0476190; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0275318; 0.1000000; 0.7000000												
F1SCCRz	0.0186336; 0.1000000; 1 0.1000000; 0.5000000 0.0238095; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0275318; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000												
F1SWCD1	0.0316985; 0.1000000; 0.1000000; 1 0.2619047; 0.1000000; 1 0.4000000; 0.6373519 0.1538544; 0.7000000; 0.1000000; 0.5000000												
F1SWCD2	0.3308985; 0.5000000; 0.5000000; 1 0.5714285 0.5000000; 1 0.5000000; 1 0.2071962; 0.5000000; 0.5000000												
F2SCCD1	0.0054578; 0.0476190; 0.0238095; 0.2619047; 0.5714286 1 0.9047619; 0.9047619; 0.2619047; 0.8571429 0.5745038 0.5476190; 0.0238095; 0.285714												
F2SCCD2	0.0186336; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.9047619; 1 0.7000000; 0.1000000; 0.5000000 0.1538544; 0.2000000; 0.1000000; 0.5000000												
F2SCCRz	0.0316985; 0.1000000; 0.1000000; 1 0.9047619; 0.7000000; 1 1 1 0.8968506; 1 0.1000000; 0.5000000												
F2SWCD1	0.0186336; 0.1000000; 0.1000000; 0.4000000; 0.5000000 0.2619047; 0.1000000; 1 1 1 0.5168531; 1 0.1000000; 0.5000000												
F2SWCD2	0.1734417; 0.5000000; 0.5000000; 0.6373518; 1 0.8571428; 0.5000000; 1 1 1 0.8008381; 1 0.5000000												
F3SCCD1	0.0036010; 0.0275318; 0.0275318; 0.1538544; 0.2071963 0.5745038 0.1538544; 0.8968506 0.5168531; 0.8008382 1 0.7945723; 0.0275318; 0.207196												
F3SCCD2	0.0316985; 0.1000000; 0.1000000; 0.7000000; 0.5000000 0.5476190; 0.2000000; 1 1 1 0.7945723; 1 0.1000000; 0.5000000												
F3SWCD1	0.4739519; 0.7000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0238095; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0275318; 0.1000000; 1 0.5000000												
F3SWCD2	1 1 0.5000000; 0.5000000; 1 0.2857142; 0.5000000; 0.5000000; 0.5000000; 1 0.2071962; 0.5000000; 0.5000000												
Ca													
Finca		p-value 7.341e-07											
F1-F2	0,0000002												
F1-F3	0,0000006												
F2-F3	0,47526												
Tipo		p-value = 1.517e-05											
F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1 0.0464052; 6,21E+00 0.0006535; 2,94E+01 0.004575163												
F1SWC	4,64E+04 1 19.780 0.0285714; 5.594 0.028571429												
F2SCC	6,21E+00 0.0197802; 1 0.6835164; 9,72E+05 0.316483516												
F2SWC	6,54E+02 0.0285714; 6,84E+05 1 825.175 0.057142857												
F3SCC	2,94E+01 0.0055944; 9,72E+05 0.8251748; 1 0.260139860												
F3SWC	4,58E+03 0.0285714; 3,16E+05 0.0571428; 2,60E+05 1												
Profundidad		p-value = 0.0004033											
F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1 0.7757575; 0.0121212 0.3757575; 0.6666667 0.0013320; 0.0121212 0.1939393; 0.0121212 0.2222222 0.0046620; 0.0242424; 0.0848484; 0.222222												
F1SCCD2	0.7757575; 1 0.2000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0238095; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0238095; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000												
F1SCCRz	0.0121212 0.2000000; 1 0.1000000; 0.5000000 0.0238095; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0238095; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000												
F1SWCD1	0.3757575 0.1000000; 0.1000000; 1 0.0238095; 0.1000000; 1 0.1000000; 0.5000000 0.0476190; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000												
F1SWCD2	0.6666666; 0.5000000; 0.5000000; 1 0.2857142; 0.5000000; 1 0.5000000; 1 0.2857142; 0.5000000; 0.5000000												
F2SCCD1	0.0013320; 0.0238095; 0.0238095; 0.0238095; 0.2857143 1 0.1666666 0.0238095; 0.9047619; 0.2857143 0.6991341; 1 0.0476190; 0.857142												
F2SCCD2	0.0121212 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.1666666; 1 0.1000000; 0.2000000; 1 0.2619047; 0.4000000; 0.1000000; 0.5000000												
F2SCCRz	0.1939393; 0.1000000; 0.1000000; 1 0.0238095; 0.1000000; 1 0.1000000; 0.5000000 0.0952380; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000												
F2SWCD1	0.0121212 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.9047619; 0.2000000; 0.1000000; 1 0.5000000 0.9047619; 1 0.1000000												
F2SWCD2	0.2222222; 0.5000000; 0.5000000; 0.5000000; 1 0.2857142; 1 0.5000000; 0.5000000; 1 0.2857142; 1 0.5000000												
F3SCCD1	0.0046620; 0.0238095; 0.0238095; 0.0476190; 0.2857143 0.6991341; 0.2619047; 0.0952381; 0.9047619; 0.2857143 1 0.9047619; 0.2619047; 0.857142												
F3SCCD2	0.0242424; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 1 0.4000000; 0.1000000; 1 1 0.9047619; 1 0.7000000												
F3SWCD1	0.0848484; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.0476190; 0.1000000; 0.1000000; 0.1000000; 0.5000000 0.2619047; 0.7000000; 1 0.5000000												
F3SWCD2	0.2222222; 0.5000000; 0.5000000; 0.5000000; 1 0.8571428; 0.5000000; 0.5000000; 1 0.8571428; 1 0.5000000												

Mg														
Finca	p-value 0.7967													
F1-F2	0.5232397													
F1-F3	1.0000000													
F2-F3	0.64511													
Tipo	p-value = 0.5548													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.4255076	0.6250464	0.7905209	0.3609061	0.5589544								
F1SWC	0.4255076	1	0.3164835	0.4857143	0.6429722	0.2000000								
F2SCC	0.6250464	0.3164835	1	0.3791209	0.2553545	0.8615385								
F2SWC	0.7905209	0.4857143	0.3791209	1	0.9398601	0.2453835								
F3SCC	0.3609061	0.6429722	0.2553545	0.9398601	1	0.1482517								
F3SWC	0.5589544	0.2000000	0.8615385	0.2453835	0.1482517	1								
Profundidad	p-value = 0.01168													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.3757576	0.0186336	0.9212121	0.2222222	0.4908424	0.4969697	0.0121212	0.4969697	0.4444444	0.8518148	0.3757576	0.0121212	0.4444444
F1SCCD2	0.3757576	1	0.0765225	0.4000000	0.5000000	0.1666666	0.7000000	0.1000000	0.2000000	0.5000000	0.7142857	1	0.1000000	0.5000000
F1SCCRz	0.0186336	0.0765225	1	0.0765225	0.3457786	0.0275318	0.0765225	1	0.0765225	0.3457786	0.0275318	0.0765225	0.0765225	0.3457786
F1SWCD1	0.9212121	0.4000000	0.0765225	1	0.5000000	0.7142857	0.7000000	0.1000000	0.4000000	0.5000000	0.7954180	0.7000000	0.1000000	0.5000000
F1SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.3457786	0.5000000	1	0.2857142	1	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	1	0.5000000	1
F2SCCD1	0.4908424	0.1666667	0.0275318	0.7142857	0.2857143	1	0.3809524	0.0238095	0.9047619	0.2857143	0.6991342	0.2619048	0.1666666	0.2857143
F2SCCD2	0.4969697	0.7000000	0.0765225	0.7000000	1	0.3809523	1	0.1000000	0.7000000	1	0.3809523	0.8247781	0.1000000	1
F2SCCRz	0.0121212	0.1000000	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F2SWCD1	0.4969697	0.2000000	0.0765225	0.4000000	0.5000000	0.9047619	0.7000000	0.1000000	1	0.5000000	0.9047619	0.4000000	0.1000000	0.5000000
F2SWCD2	0.4444444	0.5000000	0.3457786	0.5000000	1	0.2857142	1	0.5000000	0.5000000	1	0.5714285	1	0.5000000	1
F3SCCD1	0.8518148	0.7142857	0.0275318	0.7954181	0.2857143	0.6991342	0.3809524	0.0238095	0.9047619	0.5714286	1	0.5476190	0.0476190	0.5714286
F3SCCD2	0.3757576	1	0.0765225	0.7000000	1	0.2619047	0.8247781	0.1000000	0.4000000	1	0.5476190	1	0.1000000	1
F3SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.0765225	0.1000000	0.5000000	0.1666666	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0476190	0.1000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.4444444	0.5000000	0.3457786	0.5000000	1	0.2857142	1	0.5000000	0.5000000	1	0.5714285	1	0.5000000	1
K														
Finca	p-value 0.978													
F1-F2	0.8356351													
F1-F3	0.9041857													
F2-F3	0.9300933													
Tipo	p-value = 0.2612													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0476963	0.9794442	0.0621492	0.6132405	1								
F1SWC	0.0476963	1	0.0883762	0.6611967	0.2787627	0.3094241								
F2SCC	0.9794442	0.0883762	1	0.0784624	0.8078046	0.7703297								
F2SWC	0.0621492	0.6611967	0.0784624	1	0.3954159	0.3807457								
F3SCC	0.6132405	0.2787626	0.8078045	0.3954159	1	0.9398601								
F3SWC	1.00E+08	0.3094240	0.7703296	0.3807457	0.9398601	1								
Profundidad	p-value = 0.003494													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.7562196	0.0186336	0.2560979	0.1734417	0.1738187	0.2185660	0.3572314	0.3561309	0.1734417	0.0600774	0.0186336	0.1009081	0.1734417
F1SCCD2	0.7562196	1	0.1000000	0.6428348	0.5000000	0.1948351	0.4000000	0.7000000	0.6579050	0.5000000	0.1197820	0.1000000	0.2000000	0.5000000
F1SCCRz	0.0186336	0.1000000	1	0.0765225	0.5000000	0.1666666	0.1000000	0.1000000	0.0765225	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F1SWCD1	0.2560979	0.6428348	0.0765225	1	0.3457786	0.0488846	0.6579050	0.5001843	0.6530951	0.3457786	0.0275318	0.0765225	0.0765225	0.3457786
F1SWCD2	0.1734417	0.5000000	0.5000000	0.3457786	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.3457786	1	0.2857142	1	0.5000000	1
F2SCCD1	0.1738187	0.1948351	0.1666666	0.0488846	0.2857143	1	0.1666666	0.7142857	0.1538544	0.2857143	0.8181818	0.0238095	1	0.2857143
F2SCCD2	0.2185660	0.4000000	0.1000000	0.6579050	0.5000000	0.1666666	1	0.2000000	1	0.5000000	0.0476190	0.2000000	0.1000000	0.5000000
F2SCCRz	0.3572314	0.7000000	0.1000000	0.5001842	0.5000000	0.7142857	0.2000000	1	0.1840386	0.5000000	0.5476190	0.1000000	0.7000000	0.5000000
F2SWCD1	0.3561309	0.6579050	0.0765225	0.6530951	0.3457786	0.1538544	1	0.1840386	1	0.3457786	0.1538544	0.0765225	0.1840386	0.3457786
F2SWCD2	0.1734417	0.5000000	0.5000000	0.3457786	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.3457786	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1
F3SCCD1	0.0600774	0.1197821	0.0238095	0.0275318	0.2857143	0.8181818	0.0476190	0.5476190	0.1538544	0.2857143	1	0.0238095	0.9047619	0.2857143
F3SCCD2	0.0186336	0.1000000	0.1000000	0.0765225	1	0.0238095	0.2000000	0.1000000	0.0765225	0.5000000	0.0238095	1	0.1000000	0.5000000
F3SWCD1	0.1009081	0.2000000	0.1000000	0.0765225	0.5000000	1	0.1000000	0.7000000	0.1840386	0.5000000	0.9047619	0.1000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.1734417	0.5000000	0.5000000	0.3457786	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.3457786	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1

Na														
Finca	p-value 0.1502													
F1-F2	0.8075280													
F1-F3	0.05892468													
F2-F3	0.1532307													
Tipo	p-value = 2.224e-05													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0030406	0.9582159	0.0030562	0.0333161	0.003040633								
F1SWC	0.0030406	1	0.0041756	0.6531730	0.0067739	0.377821637								
F2SCC	0.9582159	0.0041756	1	0.0042037	0.0745778	0.004175681								
F2SWC	0.0030562	0.6531730	0.0042037	1	0.0068505	0.765954830								
F3SCC	0.0333161	0.0067739	0.0745778	0.0068505	1	0.013171778								
F3SWC	0.0030406	0.3778216	0.0041756	0.7659548	0.0131717	1								
Profundidad	p-value = 0.0004602													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.1682475	0.0290086	0.0175695	0.1679819	0.2133707	0.9155911	0.0455927	0.0178332	0.1679819	0.3302501	0.7539832	0.0175695	0.1679819
F1SCCD2	0.1682475	1	0.1572992	0.0721982	0.3457786	0.3559380	0.1101489	0.3016995	0.0765225	0.3457786	0.0905590	0.1840386	0.0721982	0.3457786
F1SCCRz	0.0290086	0.1572992	1	0.0721982	0.3457786	0.0268830	0.0721982	0.6192567	0.0765225	0.3457786	0.0268830	0.0765225	0.0721982	0.3457786
F1SWCD1	0.0175695	0.0721982	0.0721982	1	0.3457786	0.0268830	0.0721982	0.0721982	1	0.6170751	0.0268830	0.0765225	0.1101489	0.3457786
F1SWCD2	0.1679819	0.3457786	0.3457786	0.3457786	1	0.2071963	0.3457786	0.3457786	0.6373518	1	0.2071963	0.5000000	0.3457786	
F2SCCD1	0.2133707	0.3559380	0.0268830	0.0268830	0.2071963	1	0.0479127	0.0268830	0.0275318	0.2071963	0.3768039	0.2976383	0.0268830	0.2071963
F2SCCD2	0.9155911	0.1101489	0.0721982	0.0721982	0.3457786	0.0479127	1	0.0721982	0.0765225	0.3457786	0.8964169	1	0.0721982	0.3457786
F2SCCRz	0.0455927	0.3016995	0.6192567	0.0721982	0.3457786	0.0268830	0.0721982	1	0.0765225	0.3457786	0.0268830	0.0765225	0.0721982	0.3457786
F2SWCD1	0.0178332	0.0765225	0.0765225	1	0.6373519	0.0275318	0.0765225	0.0765225	1	1	0.0275318	0.1000000	0.3536785	0.5000000
F2SWCD2	0.1679819	0.3457786	0.3457786	0.6170750	1	0.2071963	0.3457786	0.3457786	1	1	0.2071963	0.5000000	0.6170750	
F3SCCD1	0.3302501	0.0905590	0.0268830	0.0268830	0.2071963	0.3768039	0.8964169	0.0268830	0.0275318	0.2071963	1	0.8968507	0.0268830	0.6106295
F3SCCD2	0.7539832	0.1840386	0.0765225	0.0765225	0.5000000	0.2976383	1	0.0765225	0.1000000	0.5000000	0.8968506	1	0.0765225	0.5000000
F3SWCD1	0.0175695	0.0721982	0.0721982	0.1101489	0.3457786	0.0268830	0.0721982	0.0721982	0.3536785	0.6170751	0.0268830	0.0765225	1	0.3457786
F3SWCD2	0.1679819	0.3457786	0.3457786	0.3457786	1	0.2071963	0.3457786	0.3457786	0.5000000	1	0.6106295	0.5000000	0.3457786	

CICE														
Finca	p-value 2.166e-05													
F1-F2	0.0000051													
F1-F3	0.0001289													
F2-F3	0.68157													
Tipo	p-value = 2.844e-05													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0117647	0.0000200	0.0006535	0.0003377	0.0006535948								
F1SWC	0.0117647	1	0.2615384	0.0285714	0.8251748	0.0571428571								
F2SCC	0.0000200	0.2615384	1	0.0131868	0.7020855	0.1329670330								
F2SWC	0.0006535	0.0285714	0.0131868	1	0.1062937	0.1142857143								
F3SCC	0.0003377	0.8251748	0.7020855	0.1062937	1	0.4139860140								
F3SWC	0.0006535	0.0571428	0.1329670	0.1142857	0.4139860	1								
Profundidad	p-value = 0.002121													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.7757575	0.0121212	0.1333333	0.4444444	0.0013320	0.0121212	0.2787879	0.0121212	0.2222222	0.0426240	0.0484848	0.0121212	0.2222222
F1SCCD2	0.7757575	1	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.4000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F1SCCRz	0.0121212	0.1000000	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F1SWCD1	0.1333333	0.1000000	0.1000000	1	0.1666666	0.4000000	0.7000000	0.1000000	0.5000000	0.7142857	1	0.2000000	0.5000000	
F1SWCD2	0.4444444	0.5000000	0.5000000	0.1666666	1	0.5714285	0.5000000	1	0.5000000	1	1	1	0.5000000	
F2SCCD1	0.0013320	0.0238095	0.0238095	0.1666667	0.5714286	1	0.9047619	0.1666667	0.0238095	0.2857143	1	0.2619047	0.7142857	0.2857143
F2SCCD2	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.4000000	0.5000000	0.9047619	1	0.4000000	0.7000000	1	0.5476190	0.4000000	0.7000000	
F2SCCRz	0.2787879	0.4000000	0.1000000	0.7000000	1	0.1666666	0.4000000	1	0.1000000	0.5000000	0.3809523	1	0.1000000	0.5000000
F2SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.7000000	0.1000000	1	0.5000000	0.7142857	0.1000000	0.1000000	
F2SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	1	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	
F3SCCD1	0.0426240	0.0238095	0.0238095	0.7142857	1	1	0.5476190	0.3809524	0.7142857	0.2857143	1	0.9047619	1	
F3SCCD2	0.0484848	0.1000000	0.1000000	1	1	0.2619047	0.4000000	1	0.1000000	0.5000000	0.9047619	1	0.1000000	0.5000000
F3SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.2000000	0.5000000	0.7142857	0.7000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	1	0.1000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	1	0.5000000	1	1	1	0.5000000	0.5000000	

P														
Finca	p-value 2.258e-06													
F1-F2	0,0180957													
F1-F3	0,0002125													
F2-F3	0,00001													
Tipo	p-value = 5.003e-07													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0034781	0.0001561	0.0048667	0.0152464	0.003478178								
F1SWC	0.0034781	1	0.0010989	0.0285714	0.0068505	0.028571429								
F2SCC	0.0001561	0.0010989	1	0.3164835	0.0001427	0.001098901								
F2SWC	0.0048667	0.0285714	0.3164835	1	0.0068505	0.028571429								
F3SCC	0.0152464	0.0068505	0.0001427	0.0068505	1	0.816713852								
F3SWC	0.0034781	0.0285714	0.0010989	0.0285714	0.8167138	1								
Profundidad	p-value = 0.0002579													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	1,00E+07	0.0121212	0.2222222	0.0006660	0.0242424	0.0484848	0.0121212	0.2222222	0.1418581	0.1333333	0.0121212	0.2222222	
F1SCCD2	1,00E+00	1	0.7000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.1666666	0.1000000	0.1000000	0.5000000	
F1SCCRz	1,00E+00	0.7000000	1	0.1000000	0.5000000	0.1666666	0.2000000	0.7000000	0.2000000	0.5000000	0.2619047	0.2000000	0.1000000	0.5000000
F1SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.1000000	1	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000	
F1SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	
F2SCCD1	0.0006660	0.0238095	0.1666667	0.0238095	0.2857143	1	0.7142857	0.0476190	0.7142857	0.5714286	0.0021645	0.0238095	0.0238095	0.285714
F2SCCD2	0.0242424	0.1000000	0.2000000	0.1000000	0.5000000	0.7142857	1	0.7000000	0.7000000	1	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F2SCCRz	0.0484848	0.1000000	0.7000000	0.1000000	0.5000000	0.0476190	0.7000000	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F2SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.2000000	0.1000000	0.5000000	0.7142857	0.7000000	0.1000000	1	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F2SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.5714285	1	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	
F3SCCD1	0.1418581	0.1666666	0.2619048	0.0238095	0.2857143	0.0021645	0.0238095	0.0238095	0.0238095	0.2857143	1	1	1	
F3SCCD2	0.1333333	0.1000000	0.2000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	1	1	0.7000000	
F3SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	1	0.7000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	1	1	0.5000000	
Cu														
Finca	p-value 7.865e-06													
F1-F2	0,0000103													
F1-F3	0,0000483													
F2-F3	0,45586													
Tipo	p-value = 2.105e-05													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0026143	4,14E-01	0.0006535	8,21E+01	0.0006535948								
F1SWC	2,61E+03	1	598.901	0.6857142	246.510	0.4857142857								
F2SCC	4,14E-01	0.5989010	1	0.9527472	3,19E+05	0.9527472527								
F2SWC	6,54E+02	0.6857142	9,53E+05	1	699.282	0.8857142857								
F3SCC	8,21E+01	0.2465099	3,19E+05	0.6992823	1	0.6992823818								
F3SWC	6,54E+02	0.4857142	9,53E+05	0.8857142	6,99E+05	1								
Profundidad	p-value = 0.001785													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	1	0.6303030	0.0484848	0.2222222	0.0013320	0.0121212	0.0121212	0.0121212	0.2222222	0.0023880	0.0121212	0.0121212	0.2222222
F1SCCD2	1,00E+00	1	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0275318	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F1SCCRz	0.6303030	1	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0275318	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F1SWCD1	0.0484848	0.1000000	0.1000000	1	0.9047619	0.7000000	0.7000000	0.7000000	1	0.5168531	0.7000000	0.7000000		
F1SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	1	0.8571428	1	0.5000000	1	1	0.4491772	0.5000000	1		
F2SCCD1	0.0013320	0.0238095	0.0238095	0.9047619	0.8571429	1	0.2619047	0.3809523	1	0.2857143	0.0921251	0.2619047	1	0.285714
F2SCCD2	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.7000000	1	0.2619047	1	0.7000000	0.2000000	0.5000000	0.8968506	1	0.4000000	
F2SCCRz	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.7000000	0.5000000	0.3809523	0.7000000	1	0.7000000	0.5000000	1	1	0.7000000	0.5000000
F2SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.7000000	1	1	0.2000000	0.7000000	1	0.5000000	0.3641502	0.4000000	1	0.5000000
F2SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	1	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.4491772	0.5000000	0.5000000	
F3SCCD1	0.0023880	0.0275318	0.0275318	0.5168531	0.4491772	0.0921251	0.8968506	1	0.3641502	0.4491772	1	1	0.2433046	0.449177
F3SCCD2	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.7000000	0.5000000	0.2619047	1	1	0.4000000	0.5000000	1	1	0.7000000	0.5000000
F3SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.1000000	0.7000000	1	1	0.4000000	0.7000000	1	0.5000000	0.2433045	0.7000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	1	1	0.2857142	1	0.5000000	0.5000000	1	0.4491772	0.5000000	0.5000000	

Fe														
Finca	p-value 0.8508													
F1-F2	1,0000000													
F1-F3	0,8257166													
F2-F3	0,46927													
Tipo	p-value = 0.7968													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.5052288	0.4940133	0.5052288	0.4686907	0.7980392								
F1SWC	0.5052288	1	0.7703297	0.3428571	0.9384184	0.6857143								
F2SCC	0.4940133	0.7703297	1	0.5208791	0.4136228	0.6835165								
F2SWC	0.5052288	0.3428571	0.5208791	1	0.2465100	0.8857143								
F3SCC	0.4686907	0.9384184	0.4136228	0.2465100	1	0.6992824								
F3SWC	0.7980392	0.6857143	0.6835165	0.8857143	0.6992824	1								
Profundidad	p-value = 0.5002													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.4969697	0.6303030	0.2787879	1,00E+07	0.5727606	0.3757576	0.4969697	0.1939394	0.2222222	0.3323897	0.7757576	0.4969697	0.2222222
F1SCCD2	0.4969697	1	1	1	1	0.7142857	1	1	0.4000000	1	1	1	0.2000000	0.5000000
F1SCCRz	0.6303030	1	1	1,00E+07	1	0.7000000	1	1	0.2000000	0.5000000	0.6973337	1	0.4000000	0.5000000
F1SWCD1	0.2787879	1	0.7000000	1	0.5000000	0.7142857	1	0.4000000	0.1000000	1	0.8968507	0.7000000	0.4000000	0.4000000
F1SWCD2	1E+07	1	1,00E+07	0.5000000	1	0.8571429	1	1	1	1	0.8008382	1	1	1
F2SCCD1	0.5727606	0.7142857	1,00E+07	0.7142857	0.8571429	1	0.5476190	1	0.2619048	0.5714286	0.2971070	1	0.3809524	0.2857143
F2SCCD2	0.3757576	1	0.7000000	1	1	0.5476190	1	0.7000000	0.2000000	0.5000000	0.6973337	1	0.2000000	0.5000000
F2SCCRz	0.4969697	1	1	0.4000000	1	1	0.7000000	1	0.4000000	0.5000000	0.6973337	1	0.4000000	0.5000000
F2SWCD1	0.1939394	0.4000000	0.2000000	0.1000000	1	0.2619048	0.2000000	0.4000000	1	0.5000000	0.1538544	0.2000000	1	0.5000000
F2SWCD2	0.2222222	1	0.5000000	1	1	0.5714286	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	1	0.5000000	0.5000000	0.5000000
F3SCCD1	0.3323897	1	0.6973337	0.8968507	0.8008382	0.2971070	0.6973337	0.6973337	0.1538544	1	1	0.5168532	0.2433046	0.2071963
F3SCCD2	0.7757576	1	1	0.7000000	1	1	1	1	0.2000000	0.5000000	0.5168532	1	0.4000000	0.5000000
F3SWCD1	0.4969697	0.2000000	0.4000000	0.4000000	1	0.3809524	0.2000000	0.4000000	1	0.5000000	0.2433046	0.4000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	1	1	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2071963	0.5000000	0.5000000	0.5000000
Mn														
Finca	p-value 0.0002321													
F1-F2	0,0005962													
F1-F3	0,0008277													
F2-F3	0,22778													
Tipo	p-value = 0.001127													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.1841216	0.0010882	0.0048667	0.0002901	0.0293911								
F1SWC	0.1841216	1	0.5989010	0.3428571	0.4868542	1								
F2SCC	0.0010882	0.5989011	1	0.8615384	0.5939124	0.1703297								
F2SWC	0.0048667	0.3428571	0.8615384	1	0.5886419	0.3428571								
F3SCC	0.0002901	0.4868543	0.5939124	0.5886419	1	0.3954159								
F3SWC	0.0293911	1	0.1703297	0.3428571	0.3954159	1								
Profundidad	p-value = 0.04316													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.3572314	0.2604860	0.6090191	0.1734417	0.1061983	0.0316985	0.0186336	0.0316985	0.1734417	0.0079927	0.0186336	0.1835734	0.1734417
F1SCCD2	0.3572314	1	1	0.7000000	0.5000000	0.2619048	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0518217	0.1000000	0.2000000	0.5000000
F1SCCRz	0.2604860	1	1	0.7000000	0.5000000	0.2619048	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0518217	0.1000000	0.2000000	0.5000000
F1SWCD1	0.6090191	0.7000000	0.7000000	1	0.9047619	1	0.7000000	0.7000000	0.5000000	0.5168531	0.7000000	1	1	1
F1SWCD2	0.1734417	0.5000000	0.5000000	1	0.8571429	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F2SCCD1	0.1061982	0.2619047	0.2619047	0.9047619	0.8571429	1	0.5476190	0.7142857	1	0.2857143	0.9360746	1	0.5476190	0.8571429
F2SCCD2	0.0316985	0.1000000	0.1000000	1	1	0.5476190	1	0.7000000	0.5000000	0.6973336	1	0.4000000	1	0.4000000
F2SCCRz	0.0186336	0.1000000	0.1000000	0.7000000	1	0.7142857	1	0.4000000	0.5000000	0.3641502	1	0.2000000	0.5000000	0.5000000
F2SWCD1	0.0316985	0.1000000	0.1000000	0.7000000	1	1	0.7000000	0.4000000	1	0.5000000	1	1	0.7000000	0.7000000
F2SWCD2	0.1734417	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857143	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2071962	0.5000000	0.5000000	0.5000000
F3SCCD1	0.0079927	0.0518217	0.0518217	0.5168532	1	0.9360747	0.6973336	0.3641502	1	0.2071963	1	0.8968506	0.3641503	0.3641503
F3SCCD2	0.0186336	0.1000000	0.1000000	0.7000000	1	1	1	1	1	0.5000000	0.8968506	1	0.7000000	0.7000000
F3SWCD1	0.1835733	0.2000000	0.2000000	1	1	0.5476190	0.4000000	0.2000000	0.7000000	0.5000000	0.3641502	0.7000000	1	1
F3SWCD2	0.1734417	0.5000000	0.5000000	1	1	0.8571429	1	0.5000000	1	1	1	1	1	1

CO														
Finca	p-value 0.185													
F1-F2	0,9864210													
F1-F3	0,1574196													
F2-F3	0,07546													
Tipo	p-value = 0.01202													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0117647	0.1447839	0.9588235	0.9754108	0.101307190								
F1SWC	0.0117647	1	0.0197802	0.0285714	0.0503496	0.028571429								
F2SCC	0.1447839	0.0197802	1	0.2615384	0.3100262	0.004395604								
F2SWC	0.9588235	0.0285714	0.2615384	1	0.8251748	0.114285714								
F3SCC	0.9754108	0.0503496	0.3100262	0.8251748	1	0.050349650								
F3SWC	0.1013071	0.0285714	0.0043956	0.1142857	0.0503496	1								
Profundidad	p-value = 0.0006998													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.3757576	0.0121212	0.0484848	0.2222222	0.2284382	0.0121212	0.3757576	0.3757576	0.6666667	0.0126540	0.0121212	0.0121212	0.6666667
F1SCCD2	0.3757576	1	0.1000000	0.7000000	0.5000000	0.7142857	0.7000000	0.4000000	0.4000000	0.4000000	1	0.1666666	0.4000000	0.1000000
F1SCCRz	0.0121212	0.1000000	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.2000000	0.5000000	0.0952380	0.1000000	0.7000000	0.5000000
F1SWCD1	0.0484848	0.7000000	0.1000000	1	0.5000000	0.0952380	0.7000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	1	0.1000000	0.5000000
F1SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1
F2SCCD1	0.2284382	0.7142857	0.0238095	0.0952381	0.2857143	1	0.1666666	0.0952381	0.1666667	0.8571429	0.0043290	0.0476190	0.0238095	0.5714286
F2SCCD2	0.0121212	0.7000000	0.1000000	0.7000000	0.5000000	0.1666666	1	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.2000000	0.1000000	0.5000000
F2SCCRz	0.3757576	0.4000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0952380	0.1000000	1	1	0.5000000	0.2619047	0.1000000	0.1000000	1
F2SWCD1	0.3757576	0.4000000	0.2000000	0.1000000	0.5000000	0.1666666	0.1000000	1	1	0.5000000	0.9047619	0.1000000	0.1000000	1
F2SWCD2	0.6666666	1	0.5000000	0.5000000	1	0.8571428	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1
F3SCCD1	0.0126540	0.1666667	0.0952381	0.0238095	0.2857143	0.0043290	0.0238095	0.2619048	0.9047619	0.2857143	1	0.0238095	0.0238095	0.5714286
F3SCCD2	0.0121212	0.4000000	0.1000000	1	0.5000000	0.0476190	0.2000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	1	0.1000000	0.5000000
F3SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.7000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.6666666	1	0.5000000	0.5000000	1	0.5714285	0.5000000	1	1	1	0.5714285	0.5000000	0.5000000	1
CT														
Finca	p-value 0.1563													
F1-F2	0,7824955													
F1-F3	0,1696978													
F2-F3	0,04598													
Tipo	p-value = 0.02957													
	F1SCC	F1SWC	F2SCC	F2SWC	F3SCC	F3SWC								
F1SCC	1	0.0248366	0.3474456	0.8784313	0.9754108	0.101307190								
F1SWC	0.0248366	1	0.0391059	0.0285714	0.1482517	0.028571429								
F2SCC	0.3474457	0.0391059	1	0.2249116	0.2773177	0.007692308								
F2SWC	0.8784314	0.0285714	0.2249116	1	0.7104895	0.114285714								
F3SCC	0.9754109	0.1482517	0.2773177	0.7104895	1	0.075524476								
F3SWC	0.1013072	0.0285714	0.0076923	0.1142857	0.0755244	1								
Profundidad	p-value = 0.0009224													
	F1SCCD1	F1SCCD2	F1SCCRz	F1SWCD1	F1SWCD2	F2SCCD1	F2SCCD2	F2SCCRz	F2SWCD1	F2SWCD2	F3SCCD1	F3SCCD2	F3SWCD1	F3SWCD2
F1SCCD1	1	0.4969697	0.0121212	0.0848484	0.2222222	0.4908424	0.2787878	0.2787879	0.3757576	0.8888889	0.0079920	0.0121212	0.0121212	0.6666667
F1SCCD2	0.4969697	1	0.1000000	1	0.5000000	0.9047619	0.7000000	0.4000000	0.4000000	1	0.0952380	0.2000000	0.1000000	1
F1SCCRz	0.0121212	0.1000000	1	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.2000000	0.5000000	0.1666666	0.1000000	0.7000000	0.5000000
F1SWCD1	0.0848484	1	0.1000000	1	0.5000000	0.1948351	0.7000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.2000000	0.1000000	0.5000000
F1SWCD2	0.2222222	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1
F2SCCD1	0.4908424	0.9047619	0.0238095	0.1948351	0.2857143	1	0.5476190	0.2619048	0.1948351	1	0.0043290	0.0476190	0.0238095	0.8571428
F2SCCD2	0.2787878	0.7000000	0.1000000	0.7000000	0.5000000	0.5476190	1	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.5000000
F2SCCRz	0.2787878	0.4000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.2619047	0.1000000	1	1	0.5000000	0.0952380	0.1000000	0.1000000	1
F2SWCD1	0.3757576	0.4000000	0.2000000	0.1000000	0.5000000	0.1948351	0.1000000	1	1	0.5000000	0.1666666	0.1000000	0.1000000	1
F2SWCD2	0.8888888	1	0.5000000	0.5000000	1	1	0.5000000	0.5000000	0.5000000	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1
F3SCCD1	0.0079920	0.0952381	0.1666666	0.0238095	0.2857143	0.0043290	0.0238095	0.0952381	0.1666667	0.2857143	1	0.0238095	0.0238095	0.2857143
F3SCCD2	0.0121212	0.2000000	0.1000000	0.2000000	0.5000000	0.0476190	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	1	0.1000000	0.5000000
F3SWCD1	0.0121212	0.1000000	0.7000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	0.1000000	0.1000000	0.5000000	0.0238095	0.1000000	1	0.5000000
F3SWCD2	0.6666666	1	0.5000000	0.5000000	1	0.8571428	0.5000000	1	1	1	0.2857142	0.5000000	0.5000000	1

Tabla Anexo 3 P. valores de correlación de las propiedades fisicoquímicas del suelo

A	L	Ar	pH	Cdt	Cdd	Ca	Mg	K	Na	CICE	p	Cu	Fe	Mn	Zn	B	N	CT	CO	Arenas
1	<0,01	<0,01	1	1	1	0,15	1	0,03	1	1	<0,01	1	1	1	0,79	1	0,33	<0,01	<0,01	1
	1	1	1	0,45	0,18	0,07	1	<0,01	0,86	1	1	1	1	1	0,38	1	1	1	1	1
		1	1	1	1	0,51	1	1	1	1	0,01	1	1	1	1	1	0,56	<0,01	<0,01	1
			1	<0,01	<0,01	<0,01	1	0,17	0,67	<0,01	1	0,01	1	0,05	<0,01	0,66	1	1	1	1
				1	<0,01	<0,01	1	0,52	1	1	1	0,06	1	1	<0,01	1	1	1	1	1
					1	<0,01	1	0,73	0,93	0,82	1	<0,01	1	<0,01	<0,01	1	1	1	1	1
						1	1	1	1	<0,01	1	0,05	1	0,07	0,82	1	1	1	1	1
							1	0,01	0,69	0,93	1	1	1	1	0,2	1	1	1	1	1
								1	1	1	1	1	1	1	0,87	1	1	1	1	1
									1	1	1	1	1	1	0,8	1	1	1	1	1
										1	1	1	1	1	0,12	0,42	1	1	1	1
											1	0,94	0,66	1	0,29	1	0,08	<0,01	0,02	1
												1	0,33	<0,01	<0,01	1	1	0,01	1	1
													1	1	0,02	1	1	0,99	1	1
														1	0,01	1	0,74	0,13	1	1
															1	0,59	1	1	1	1
																1	0,62	0,76	0,74	1
																	1	<0,01	0,01	1
																		1	<0,01	1
																			1	1

Tabla Anexo 4 Dimensiones Análisis de componentes principales de las propiedades fisicoquímicas del suelo discriminado por finca.

	F1			F2			F3		
	Comp1	Comp2	Comp3	Comp1	Comp2	Comp3	Comp1	Comp2	Comp3
Arenas	-0,83612	0,27345	-0,36418	-0,81808	0,16700	0,01609	0,84875	-0,43821	-0,00147
Arcillas	0,81230	0,02433	0,05711	0,91441	0,16025	0,15287	-0,88456	0,40050	0,18528
Limos	0,51456	-0,50624	0,56987	0,03920	-0,68870	-0,33240	-0,32692	0,34726	-0,58304
pH	-0,75270	-0,51890	0,16359	0,81364	0,39496	-0,34500	0,53691	0,55473	0,35231
Cd_disp	-0,94121	0,14495	0,15626	0,63249	-0,62306	0,08441	0,91759	-0,07830	0,17875
Cd_total	-0,86764	-0,04430	0,39940	0,20426	0,28434	-0,78156	0,91572	-0,26034	0,05025
Ca	-0,76774	-0,52921	-0,10917	0,34862	0,23473	-0,77041	0,40450	0,85978	-0,15023
Mg	-0,13784	0,62766	0,01811	0,39952	0,51031	-0,59656	0,71458	0,59316	0,33171
K	-0,46320	0,58452	0,13747	0,60985	-0,63740	0,11204	-0,40125	0,04356	0,52178
Na	0,60081	-0,44017	-0,57795	-0,69591	-0,52448	-0,43676	0,87590	-0,18310	-0,25654
CICE	-0,82832	-0,43074	-0,23826	0,05296	0,50475	0,68428	-0,11915	0,92303	0,32393
p	-0,84706	0,35537	0,15505	0,09303	0,64102	-0,41834	0,46919	-0,16531	-0,43091
Cu	0,03954	0,43725	-0,14039	0,76980	-0,51417	-0,01961	0,55626	0,04324	-0,64383
Fe	0,01942	0,88189	-0,01413	-0,32474	-0,72648	0,04842	0,73276	0,11917	-0,11056
Mn	-0,07055	-0,36623	0,26196	0,66340	-0,59516	-0,00561	0,41939	0,40209	-0,62924
Zn	-0,69846	0,11174	0,45900	0,19993	-0,53752	-0,51132	0,96070	-0,00436	0,09055
B	-0,72913	-0,22620	0,47151	0,03617	0,10607	0,58627	0,51575	0,23112	0,05965
N	-0,38913	-0,09011	-0,78264	-0,88130	-0,22518	-0,28885	0,31405	0,82105	-0,17313
CT	-0,86180	-0,15909	-0,32805	-0,98196	-0,00101	-0,11656	0,69285	-0,14612	0,54151
CO	-0,88166	-0,01943	-0,38295	-0,94728	-0,15021	-0,16597	0,87872	-0,12036	0,38512

Tabla Anexo 5 Contenido de Cd en tejidos

Finca	Tejido	n	Cd mg kg ⁻¹	
			Media	SD
F1	Hojarasca	6	7,26	1,73
F1	Hoja	6	5,64	1,16
F1	Grano	6	1,80	0,65
F2	Hojarasca	6	2,94	1,26
F2	Hoja	6	2,35	1,71
F2	Grano	6	0,68	0,31
F3	Hojarasca	6	4,00	2,46
F3	Hoja	6	2,74	1,26
F3	Grano	6	0,88	0,45

Tabla Anexo 6 P. valores de correlación de Spearman de los tejidos vegetales con las propiedades fisicoquímicas.

	Cd Hojarasca	Cd Hojas	Cd Granos	CT	CO	P	N	Na	Cd total	Cd disp	Zn	Cu	Limos	Mn	B	CICE	pH	Ca	Fe	K	Arcillas	Mg	Arenas
Cd Hojarasca	< 0,01	< 0,01	< 0,01	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cd Hojas	< 0,01	< 0,01	< 0,01	1	1	1	1	1	1	1	0,23	1	1	0,28	1	0,01	1	1	1	1	0,67	1	0,91
Cd Granos	< 0,01	< 0,01	< 0,01	1	1	1	1	0,03	1	1	0,26	1	0,42	0,16	1	0,01	0,03	1	1	1	0,30	0,30	0,56

Tabla Anexo 7 Valores índices de diversidad alfa

Finca	Tipo	Profundidad	Observed Features		Shannon		Gini-Simpson	
			Media	sd	Media	sd	Media	sd
FI	SCC	Rz	1031	461,29	7,431	0,78	0,978	0,012
FI	SCC	D1	910	160,50	7,437	0,76	0,974	0,015
FI	SCC	D2	925	219,98	7,347	0,65	0,966	0,028
FI	SWC	D1	656	74,27	6,866	0,12	0,969	0,005
FI	SWC	D2	191		5,093		0,933	
Pv	SCC	Rz	983	325,01	7,574	1,05	0,977	0,016
Pv	SCC	D1	1104	393,63	7,749	0,19	0,980	0,003
Pv	SCC	D2	480	35,73	6,420	0,29	0,958	0,011
Pv	SWC	D1	622	294,05	6,677	0,50	0,962	0,020
Pv	SWC	D2	607		6,475		0,960	
Cu	SCC	D1	726	159,58	7,593	0,69	0,983	0,009
Cu	SCC	D2	847	259,13	7,709	0,76	0,984	0,011
Cu	SWC	D2	548		6,297		0,947	

Tabla Anexo 8 Resultados prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de Wilcoxon de los índices de diversidad.

Group 1	Group 2	Observerd Features			Shannon			Gini-Simpson		
		17,248			17,219			14,945		
		H	p-value	q-value	H	p-value	q-value	H	p-value	q-value
			0,1405		0,142		0,2444			
		H	p-value	q-value	H	p-value	q-value	H	p-value	q-value
CuC2 (n=1)	CuS1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	CuS2 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	FIC1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	FIC2 (n=1)	1,00	0,317	0,495	1,00	0,317	0,527	1,00	0,317	0,563
CuC2 (n=1)	FIRZ (n=3)	0,20	0,655	0,740	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	FIS1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	FIS2 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	0,20	0,655	0,751
CuC2 (n=1)	PvC1 (n=3)	0,20	0,655	0,740	0,20	0,655	0,827	0,20	0,655	0,751
CuC2 (n=1)	PvC2 (n=1)	1,00	0,317	0,495	1,00	0,317	0,527	1,00	0,317	0,563
CuC2 (n=1)	PvRz (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	PvS1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuC2 (n=1)	PvS2 (n=3)	1,80	0,180	0,359	0,20	0,655	0,827	1,80	0,180	0,412
CuS1 (n=3)	CuS2 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827
CuS1 (n=3)	FIC1 (n=3)	0,05	0,827	0,827	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,412
CuS1 (n=3)	FIC2 (n=1)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuS1 (n=3)	FIRZ (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
CuS1 (n=3)	FIS1 (n=3)	1,19	0,275	0,457	0,05	0,827	0,827	1,19	0,275	0,524
CuS1 (n=3)	FIS2 (n=3)	1,19	0,275	0,457	0,43	0,513	0,714	1,19	0,275	0,524
CuS1 (n=3)	PvC1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	3,86	0,050	0,359	1,19	0,275	0,524
CuS1 (n=3)	PvC2 (n=1)	0,20	0,655	0,740	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuS1 (n=3)	PvRz (n=3)	1,19	0,275	0,457	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
CuS1 (n=3)	PvS1 (n=3)	1,19	0,275	0,457	0,43	0,513	0,714	0,05	0,827	0,827
CuS1 (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,412
CuS2 (n=3)	FIC1 (n=3)	1,19	0,275	0,457	3,86	0,050	0,359	2,33	0,127	0,412
CuS2 (n=3)	FIC2 (n=1)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuS2 (n=3)	FIRZ (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
CuS2 (n=3)	FIS1 (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,714	0,43	0,513	0,645
CuS2 (n=3)	FIS2 (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,714	1,19	0,275	0,524
CuS2 (n=3)	PvC1 (n=3)	1,19	0,275	0,457	2,33	0,127	0,359	2,33	0,127	0,412
CuS2 (n=3)	PvC2 (n=1)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
CuS2 (n=3)	PvRz (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
CuS2 (n=3)	PvS1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
CuS2 (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,412
FIC1 (n=3)	FIC2 (n=1)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC1 (n=3)	FIRZ (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,43	0,513	0,714	1,19	0,275	0,524
FIC1 (n=3)	FIS1 (n=3)	3,86	0,050	0,359	0,43	0,513	0,714	0,43	0,513	0,645
FIC1 (n=3)	FIS2 (n=3)	2,33	0,127	0,359	1,19	0,275	0,488	0,05	0,827	0,827
FIC1 (n=3)	PvC1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
FIC1 (n=3)	PvC2 (n=1)	0,20	0,655	0,740	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC1 (n=3)	PvRz (n=3)	1,19	0,275	0,457	0,43	0,513	0,714	0,43	0,513	0,645
FIC1 (n=3)	PvS1 (n=3)	2,33	0,127	0,359	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,412
FIC1 (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,359	1,19	0,275	0,524
FIC2 (n=1)	FIRZ (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC2 (n=1)	FIS1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC2 (n=1)	FIS2 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC2 (n=1)	PvC1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC2 (n=1)	PvC2 (n=1)	1,00	0,317	0,495	1,00	0,317	0,527	1,00	0,317	0,563
FIC2 (n=1)	PvRz (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC2 (n=1)	PvS1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIC2 (n=1)	PvS2 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIRZ (n=3)	FIS1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
FIRZ (n=3)	FIS2 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827
FIRZ (n=3)	PvC1 (n=3)	2,33	0,127	0,359	1,19	0,275	0,488	1,19	0,275	0,524
FIRZ (n=3)	PvC2 (n=1)	0,20	0,655	0,740	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
FIRZ (n=3)	PvRz (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827
FIRZ (n=3)	PvS1 (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827
FIRZ (n=3)	PvS2 (n=3)	2,33	0,127	0,359	2,33	0,127	0,359	2,33	0,127	0,412
FIS1 (n=3)	FIS2 (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827
FIS1 (n=3)	PvC1 (n=3)	1,19	0,275	0,457	1,19	0,275	0,488	0,43	0,513	0,645
FIS1 (n=3)	PvC2 (n=1)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	0,20	0,655	0,751
FIS1 (n=3)	PvRz (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
FIS1 (n=3)	PvS1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
FIS1 (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	2,33	0,127	0,359	2,33	0,127	0,412
FIS2 (n=3)	PvC1 (n=3)	2,33	0,127	0,359	1,19	0,275	0,488	0,05	0,827	0,827
FIS2 (n=3)	PvC2 (n=1)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	0,20	0,655	0,751
FIS2 (n=3)	PvRz (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,645
FIS2 (n=3)	PvS1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,43	0,513	0,714	0,43	0,513	0,645
FIS2 (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,359	0,43	0,513	0,645
PvC1 (n=3)	PvC2 (n=1)	0,20	0,655	0,740	0,20	0,655	0,827	0,20	0,655	0,751
PvC1 (n=3)	PvRz (n=3)	2,33	0,127	0,359	1,19	0,275	0,488	0,43	0,513	0,645
PvC1 (n=3)	PvS1 (n=3)	2,33	0,127	0,359	3,86	0,050	0,359	0,43	0,513	0,645
PvC1 (n=3)	PvS2 (n=3)	0,05	0,827	0,827	0,43	0,513	0,714	0,05	0,827	0,827
PvC2 (n=1)	PvRz (n=3)	1,80	0,180	0,359	0,20	0,655	0,827	1,80	0,180	0,412
PvC2 (n=1)	PvS1 (n=3)	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,359	1,80	0,180	0,412
PvC2 (n=1)	PvS2 (n=3)	1,80	0,180	0,359	0,20	0,655	0,827	0,20	0,655	0,751
PvRz (n=3)	PvS1 (n=3)	0,43	0,513	0,635	0,05	0,827	0,827	0,05	0,827	0,827
PvRz (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	2,33	0,127	0,359	2,33	0,127	0,412
PvS1 (n=3)	PvS2 (n=3)	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,359	3,86	0,050	0,412

Tabla Anexo 9 Dimensiones de PCoA de las muestras usando matriz de distancias de Bray Curtis.

Muestra	Axis,1	Axis,2	Axis,3
CuD1R1	-0,053479	-0,20584	-0,014387
CuD1R2	-0,26721	0,017895	-0,027821
CuD1R3	-0,19572	0,19686	-0,005468
CuD2C1	-0,094767	0,063149	-0,19171
CuD2R1	-0,089009	-0,14813	-0,038351
CuD2R2	-0,1225	0,069096	-0,034191
CuD2R3	-0,19163	0,20121	-0,087448
FIRZR4	0,025776	-0,32189	0,14864
FIRZR5	0,40631	-0,011901	0,076875
FIRzR2	0,055105	-0,26174	0,21711
FID1C1	0,024864	-0,11163	-0,43575
FID1C2	0,050944	-0,093383	-0,45102
FID1C3	-0,12349	-0,034512	-0,29426
FID1R2	0,15141	-0,26351	0,12049
FID1R4	0,0080872	-0,33823	-0,11243
FID1R5	-0,011695	-0,33522	0,055205
FID2C1	0,043706	-0,07481	-0,002814
FID2R2	0,0482	-0,27666	0,1239
FID2R4	0,023586	-0,29572	-0,070661
FID2R5	0,033673	-0,3391	0,13355
PvRzR1	-0,16832	0,077732	0,21998
PvRzR2	-0,22597	0,10063	0,18134
PvRzR3	-0,21218	0,13247	0,25099
PvD1C1	-0,26621	0,26972	-0,070678
PvD1C2	0,31633	0,31764	-0,070682
PvD1C3	-0,19872	0,2086	-0,13104
PvD1R1	-0,30302	0,17473	0,14964
PvD1R2	-0,31722	0,18954	0,087923
PvD1R3	-0,33414	0,20956	0,098169
PvD2C1	0,4482	0,25702	0,018944
PvD2R1	0,52189	0,22133	0,035515
PvD2R2	0,49238	0,21124	0,066351
PvD2R3	0,52481	0,19387	0,054067

Tabla Anexo 10 Resultados de análisis de abundancia diferencial usando edgeR

Genus	log2FC	logCPM	Pvalues	FDR
Plectosphaerella	4,9467	13,924	2,178E-06	1,6E-05
Tetracladium	4,6357	9,9432	2,182E-07	3,2E-06
Hypoxyton	4,4731	9,8335	5,53E-08	9,4E-07
Microdochium	3,6157	11,932	0,0001063	0,00051
Sarocladium	3,4888	9,959	0,0015778	0,00447
Cylindrocladiella	3,4826	9,5128	0,000804	0,00273
Xylaria	2,9532	9,4765	0,0003176	0,00125
Bisifusarium	2,8948	9,2294	0,0010523	0,00324
Beauveria	2,8445	14,341	0,0004296	0,00162
Cladosporium	2,7295	9,149	0,0057502	0,0134
Cylindrocarpon	2,6679	11,918	0,0028341	0,00723
Clonostachys	2,5743	10,946	0,0010793	0,00324
Scytalidium	2,3926	9,8761	0,019209	0,03842
Myrmecridium	2,2439	9,909	0,002989	0,05646
Fusarium	2,2093	16,948	0,000278	0,00113
Pochonia	1,9774	9,4599	0,00605	0,01371
Roussoella	1,8842	14,765	0,0016784	0,00463
Albifimbria	1,8394	11,641	0,0057783	0,0134
Phialophora	1,7439	8,5161	0,0085283	0,01851
Acremonium	1,6364	12,393	0,0005166	0,00091
Setophoma	1,3418	11,755	0,0005441	0,00093
Cordana	1,2425	13,55	0,0018294	0,00279
Striaticonium	1,1843	12,998	0,0006138	0,00103
Paracremonium	1,0656	12,361	0,0013439	0,00208
Flabellascoma	0,98712	11,076	0,0019646	0,0029
Lasiodiplodia	0,96666	12,676	0,0018769	0,00282
Arxiella	0,94857	11,907	0,0030166	0,00406
Xylodon	0,70521	8,6884	0,0030926	0,00406
Trametes	0,65391	9,4867	0,0044584	0,00538
Robillarda	0,64739	11,913	0,0043423	0,00534
Idriella	0,61492	11,388	0,0043396	0,00534
Bionectria	0,54469	11,285	0,0044861	0,00538
Clitopilus	0,53873	9,4703	0,0051959	0,00602
Stephanonectria	0,50784	8,1881	0,0048683	0,00577
Phaeoisaria	0,47933	8,4737	0,0051299	0,00601
Xylomyces	0,32475	11,179	0,0075661	0,00796
Chloridium	0,30047	14,592	0,0062451	0,00693
Trichoderma	0,26163	14,814	0,006848	0,00751
Annulohypoxyton	0,2226	9,1556	0,007424	0,00796
Acrocalymma	0,02109	11,481	0,0098312	0,00983
Mariannaea	0,01516	12,377	0,0086673	0,00902
Pestalotiopsis	0,0697	10,092	0,0092134	0,0094
unidentified	0,06191	15,458	0,0090518	0,00933
Cladophialophora	0,05907	9,2573	0,009334	0,00943
Porodiplodia	0,06172	10,793	0,0059578	0,00608
Neoidriella	0,05442	10,025	0,0025438	0,00519
Gibberella	0,05316	12,244	0,0034569	0,00207
Minutisphaera	0,05114	10,017	0,0016618	0,00848
Ceratocystis	0,04456	12,856	0,0051881	0,00588
Cistella	0,04276	9,3565	0,005012	0,00269

Genus	log2FC	logCPM	Pvalues	FDR
Lipomyces	-3,0964	10,641	0,00029	0,00611
Westerdykella	-2,6338	11,408	0,00097	0,00756
Ramicandelaber	-2,6218	10,782	0,00045	0,00636
Trichosporon	-2,3042	10,183	0,00731	0,03506
Pseudorobillarda	-2,2513	95,056	0,00073	0,00756
Saitozyma	-2,2308	10,626	0,00383	0,02062
Berkleasmiium	-2,0606	10,066	0,00859	0,03926
Pseudocercospora	-1,9691	11,071	0,02265	0,08365
Arthrotrys	-1,7995	99,846	0,00911	0,03973
Atractiella	-1,7611	10,435	0,02918	0,09338
Pleuroascus	-1,6861	99,138	0,02519	0,08956
Penicillium	-1,4121	12,445	0,11143	0,22761
Penicillifer	-1,3557	10,168	0,04425	0,12138
Talaromyces	-1,3478	14,432	0,10585	0,22461
Apiotrichum	-1,1711	10,033	0,14336	0,28673
Stephanonectria	-1,0986	96,027	0,10763	0,22461
Conlarium	-1,0977	10,177	0,17208	0,33039
Rhexodenticula	-2,937	10,36	0,00032	0,00611
Nigrospora	-2,403	10,427	0,00387	0,02062
Chaetosphaeria	-1,567	11,23	0,04984	0,00133
Chloridium	-1,184	13,94	0,08134	0,0019
Mariannaea	-0,9211	12194	0,0029	0,00467
Acremonium	-0,8828	12322	0,00281	0,00465
Veronaeopsis	-0,8424	93582	0,00196	0,00368
Coniochaeta	-0,7999	93926	0,00279	0,00465
Pestalotiopsis	-0,6126	10765	0,00444	0,00603
Flabellascoma	-0,6062	11274	0,00402	0,00577
Phialemoniopsis	-0,5353	96511	0,00425	0,00599
Gliocladiopsis	-0,4803	12651	0,00558	0,00697
Idriella	-0,4363	11,62	0,00568	0,00699
Phaeoisaria	-0,4239	96796	0,00559	0,00697
Purpureocillium	-0,4233	12302	0,00559	0,00697
Paracremonium	-0,3876	11763	0,00577	0,00701
Pyrenochaetopsis	-0,3364	15615	0,00601	0,00713
Not_Assigned	-0,3243	19002	0,0048	0,00632
Nigrograna	-0,2517	93721	0,00843	0,00926
Entorrhiza	-0,1907	95569	0,00769	0,00879
Colletotrichum	-0,1578	10683	0,00858	0,00926
Diaporthe	-0,1409	11658	0,00857	0,00926
Galactomyces	-0,0231	14255	0,00933	0,00967
Setophoma	-0,0017	11722	0,00961	0,00971
unidentified	-0,0619	15,458	0,00905	0,00933
Cladophialophora	-0,0591	9,2573	0,00933	0,00943
Acrocalymma	-0,0211	11,481	0,00983	0,00983
Paramicrothyrium	0,24179	9,5294	0,00757	0,00796
Pyrenochaetopsis	0,24346	16,01	0,00712	0,00772
Colletotrichum	0,51621	9,7613	0,00542	0,00614
Phialemoniopsis	0,55711	9,3024	0,00434	0,00534
Metarhizium	0,70884	14,706	0,00311	0,00406
Purpureocillium	0,75978	12,119	0,00317	0,0041

Genus	log2FC	logCPM	Pvalues	FDR
Arthrobotrys	0,79278	9,1595	0,00349	0,00445
Curvularia	0,93451	8,3316	0,00248	0,00351
Ganoderma	0,98424	12,272	0,00239	0,00343
Phaeosphaeria	0,9966	10,121	0,00288	0,00397
Apiotrichum	0,99924	11,934	0,00306	0,00406
Pseudocercospora	-0,111	11,319	0,00271	0,00379
Entorrhiza	-0,4526	8,537	0,00054	0,00093
Coremiopassalora	-0,5379	10,07	0,00123	0,00192
Periconia	-0,5842	11,329	0,00113	0,00183
Penicillifer	-0,7294	9,6659	0,00024	0,00047
Veronaeopsis	-0,7979	7,989	0,00017	0,00034
Cladorrhinum	-0,2404	12,275	0,00038	0,00069

Tabla Anexo 11 Resultados de análisis de abundancia diferencial usando Aldex2

logfc	effect	Pvalues	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
7.4679	-1.4496	0.00023	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Minutisphaerales	Minutisphaeraceae	Minutisphaera	unidentified
7.15997	-0.9024	0.0016	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	NA	NA
6.74049	-0.9912	0.00854	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
6.61236	-1.0914	0.0004	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	Fusarium_solani
6.43193	-0.5868	0.00323	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Cyberindnera	Fusarium_solani
6.25626	-1.1773	0.00028	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	Plectosphaerella	Plectosphaerella_cucumerina
6.2288	-1.1731	0.00252	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	NA
6.22635	-1.185	0.00521	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Neodriella	NA
6.21959	1.26943	0.00017	Fungi	NA	NA	NA	NA	Ceratocystis	NA
6.07104	1.12228	0.00587	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Sporormiaceae	Beauveria	Westerdykella_reniformis
5.91307	-1.1508	0.0055	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Microdochium	NA
5.10502	-1.1347	0.0023	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	Hypoxyton	Hypoxyton_investiens
4.82594	1.04953	0.00212	Fungi	NA	NA	NA	NA	Tetracladium	NA
4.43211	-1.6044	2.4E-05	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Pezizellaceae	Porodiplodia	Porodiplodia_livistonae
4.3775	-0.9442	0.00427	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Bisfusarium	NA
2.18584	-0.9405	0.00086	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Thyridariaceae	Rousoella	Rousoella_mexicana
4.41759	-1.6079	2.6E-05	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Pezizellaceae	Porodiplodia	Porodiplodia_livistonae
6.00914	-1.1927	0.00027	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	Plectosphaerella	Plectosphaerella_cucumerina
4.32107	-1.4169	0.0004	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Minutisphaerales	Minutisphaeraceae	Minutisphaera	unidentified
6.97663	-0.9168	0.00158	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	NA	NA
6.24322	-1.2	0.00243	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	NA
7.24516	-0.9174	0.00389	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
7.69488	-0.9589	0.00459	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	NA
5.62425	-0.7331	0.00504	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Microdochiaceae	Microdochium	NA
6.19092	-1.1664	0.00522	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
6.65347	-1.1438	0.00671	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
6.3167	-0.8901	0.00818	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6.8588	-0.9773	0.00878	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
6.74371	-0.8874	0.00891	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Stachybotryaceae	Striaticonidium	Striaticonidium_cinctum
7.34527	-0.9635	0.00932	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetal	Dipodascaceae	NA	NA
6.86787	-0.7559	0.01025	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	NA	NA
8.14498	-0.7093	0.01028	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	NA	NA
6.92549	-0.7844	0.01156	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5.54	-1.0011	0.01217	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Hyaloscyphaceae	Cistella	unidentified
5.55956	-0.8942	0.01291	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariales_fam_Incertae_sedis	Neodriella	Neodriella_desertorum
6.38422	-1.0031	0.01468	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Volutella	NA
6.71775	-0.9285	0.01515	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5.08818	-0.8424	0.01623	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5.76243	-0.9568	0.01776	Fungi	Ascomycota	Leotiomycetes	Helotiales	Helotiaceae	Tetracladium	Tetracladium_furcatum
7.15224	-0.8001	0.01786	Fungi	Basidiomycota	NA	NA	NA	NA	NA
5.30557	-0.8268	0.01858	Fungi	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified	unidentified
7.13292	-0.8174	0.02213	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	NA	NA	NA
5.68142	-0.8117	0.02229	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetal	Phaffomycetaceae	Cyberindnera	NA
5.19798	-0.6914	0.02272	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6.20151	-0.8328	0.02316	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Bisfusarium	Bisfusarium_dimerum
5.64962	-0.7738	0.02573	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6.81885	-0.8438	0.03242	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	NA	NA
7.00745	-0.8527	0.03402	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Plectosphaerellaceae	Plectosphaerella	Plectosphaerella_cucumerina
9.58326	-0.6858	0.03577	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	NA	NA
6.14908	-0.8101	0.03795	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Campylospora	NA
6.57777	-0.8369	0.03931	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7.07649	-0.8388	0.03938	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	NA
6.19971	-0.8043	0.04075	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	NA	NA	NA
6.06738	-0.7984	0.04315	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6.38565	-0.7844	0.04366	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	Flabellascoma	unidentified
5.45244	-0.7324	0.04469	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6.35528	-0.7662	0.04503	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariales_fam_Incertae_sedis	Neodriella	Neodriella_desertorum
5.52492	-0.6526	0.04498	Fungi	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7.68032	-0.6563	0.04499	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariales_fam_Incertae_sedi	NA	NA
7.7364	-0.7142	0.04691	Fungi	Mortierellomyc	Mortierellomycetes	Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella	NA
8.53114	-0.5114	0.04899	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Ganodermataceae	Ganoderma	NA
6.41987	-0.5634	0.04777	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	Xylaria	Xylaria_cubensis
5.94746	-0.6206	0.04101	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Phaeosphaeriaceae	NA	NA
6.48818	-0.6065	0.04206	Fungi	Ascomycota	Pezizomycotina_cls	Pezizomycotina	Pezizomycotina_fam_Incertae	Ciliophora	unidentified
6.02778	-0.6847	0.0436	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Ceratobasidiaceae	NA	NA
5.74567	-0.6394	0.04474	Fungi	Ascomycota	NA	NA	NA	NA	NA
6.73794	-0.6689	0.04005	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	Gliocladiopsis	NA
8.06432	-0.6015	0.04267	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	NA

Tabla Anexo 12 P. valores de correlación de Spearman de los índices de diversidad alfa con las propiedades fisicoquímicas, discriminado por finca.

Todas																							
	Observed Features	Shannon	Gini-Simpson	Arcillas	pH	Cd total	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	CO	Arenas	Limos	Cd disp	N	CT
Observed Features		< 0.01	0.03	1	0.89	1	1	1	1	0.02	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Shannon	< 0.01		< 0.01	1	0.32	1	1	1	1	0.45	1	1	1	1	1	1	1	1	0.99	0.78	1	1	0.48
Gini-Simpson	0.03	< 0.01		1	0.2	1	0.97	1	1	1	1	1	1	1	1	0.82	1	1	0.68	0.96	1	1	0.61

F1																							
	Observed Features	Shannon	Gini-Simpson	Arcillas	pH	Cd total	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	CO	Arenas	Limos	Cd disp	N	CT
Observed Features		0.75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.99	1	1	1
Shannon	0.75		0.04	0.06	1	1	1	0.53	1	0.12	0.59	0.07	0.11	0.29	0.91	0.09	1	0.06	1	0.69	1	0.91	1
Gini-Simpson		0.04		0.39	0.2	1	0.96	0.73	0.65	0.3	0.86	0.14	0.34	0.19	0.78	0.41	0.58	0.13	1	0.91	1	0.64	1

F2																							
	Observed Features	Shannon	Gini-Simpson	Arcillas	pH	Cd total	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	CO	Arenas	Limos	Cd disp	N	CT
Observed Features		< 0.01	1	1	1	0.67	1	1	0.12	1	1	0.68	1	0.71	1	1	1	1	0.05	1	1	0.76	1
Shannon	< 0.01		< 0.01	0.33	1	0.29	1	1	0.01	1	0.13	0.65	0.69	0.97	0.4	1	1	0.31	0.2	0.35	0.53	0.83	1
Gini-Simpson	1	< 0.01		0.99	1	0.24	1	1	0.01	1	1	0.28	1	0.59	1	1	1	1	0.57	1	1	0.75	1

F3																							
	Observed Features	Shannon	Gini-Simpson	Arcillas	pH	Cd total	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	Cu	Fe	Mn	Zn	B	CO	Arenas	Limos	Cd disp	N	CT
Observed Features		0.11	0.62	1	0.34	1	1	0.7	0.64	0.04	1	1	1	0.76	0.38	1	1	1	1	1	1	1	1
Shannon	0.11		0.11	0.04	0.53	1	0.64	0.48	0.59	0.05	0.29	1	0.64	0.59	0.64	0.64	1	0.88	0.03	0.35	1	1	0.7
Gini-Simpson	0.62	0.11		0.01	0.59	0.43	0.7	0.43	0.43	0.04	0.25	1	0.94	0.78	0.53	0.48	0.66	0.64	0.05	0.59	0.46	0.43	0.48

Tabla Anexo 13 Resultados de prueba de mantel, usado para análisis de redundancia

by_group	Variables	Correlation coefficient	p.value	p.adjusted	Significance
phylum	Arcillas	0.179222676	0.048	0.1600000	
	pH	0.076668378	0.200	0.4444444	
	Cd_total	-0.200849259	0.991	0.9980000	
	Ca	0.199810647	0.004	0.0250000	*
	Mg	-0.164046018	0.974	0.9980000	
	K	-0.124146996	0.934	0.9980000	
	Na	0.154139954	0.010	0.0400000	*
	CICE	0.272161871	0.002	0.0250000	*
	P	-0.029809855	0.619	0.9523077	
	Cu	0.125700590	0.083	0.2075000	
	Fe	0.046062552	0.302	0.5981818	
	Mn	0.161241514	0.077	0.2075000	
	Zn	0.037304821	0.329	0.5981818	
	B	-0.009349868	0.495	0.8250000	
	CO	-0.252867902	0.998	0.9980000	
	Arenas	0.239124883	0.005	0.0250000	*
	Limos	0.240785929	0.005	0.0250000	*
	Cd_disp	-0.266647872	0.998	0.9980000	
	N	-0.192309383	0.974	0.9980000	
	CT	-0.175630263	0.960	0.9980000	
Orden	Arcillas	0.179222676	0.051	0.1700000	
	pH	0.076668378	0.176	0.3911111	
	Cd_total	-0.200849259	0.982	10.000.000	
	Ca	0.199810647	0.005	0.0300000	*
	Mg	-0.164046018	0.967	10.000.000	
	K	-0.124146996	0.908	10.000.000	
	Na	0.154139954	0.006	0.0300000	*
	CICE	0.272161871	0.001	0.0100000	**
	P	-0.029809855	0.594	0.9138462	
	Cu	0.125700590	0.077	0.2150000	
	Fe	0.046062552	0.294	0.5880000	
	Mn	0.161241514	0.086	0.2150000	
	Zn	0.037304821	0.355	0.6454545	
	B	-0.009349868	0.517	0.8616667	
	CO	-0.252867902	1.000	10.000.000	
	Arenas	0.239124883	0.008	0.0320000	*
	Limos	0.240785929	0.001	0.0100000	**
	Cd_disp	-0.266647872	0.998	10.000.000	
	N	-0.192309383	0.984	10.000.000	
	CT	-0.175630263	0.954	10.000.000	
Género	Arcillas	0.179222676	0.041	0.1366667	
	pH	0.076668378	0.165	0.3666667	
	Cd_total	-0.200849259	0.994	10.000.000	
	Ca	0.199810647	0.004	0.0250000	*
	Mg	-0.164046018	0.971	10.000.000	
	K	-0.124146996	0.917	10.000.000	
	Na	0.154139954	0.010	0.0400000	*
	CICE	0.272161871	0.002	0.0250000	*
	P	-0.029809855	0.585	0.9000000	
	Cu	0.125700590	0.092	0.2300000	
	Fe	0.046062552	0.293	0.5860000	
	Mn	0.161241514	0.088	0.2300000	
	Zn	0.037304821	0.332	0.6036364	
	B	-0.009349868	0.537	0.8950000	
	CO	-0.252867902	0.996	10.000.000	
	Arenas	0.239124883	0.004	0.0250000	*
	Limos	0.240785929	0.005	0.0250000	*
	Cd_disp	-0.266647872	1.000	10.000.000	
	N	-0.192309383	0.987	10.000.000	
	CT	-0.175630263	0.966	10.000.000	