

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRIA EN AGROECOLOGÍA Y AMBIENTE

Evaluación de la diversidad y abundancia microbiana en suelos manejados bajo dos sistemas de producción contrastantes, dedicados al cultivo de trigo en el sur del Ecuador, mediante un análisis metagenómico.

TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MAGISTER EN AGROECOLOGÍA Y AMBIENTE

AUTOR: Ing. Carlos Alberto Jiménez Merino

C.I: 1104161540

DIRECTOR: Ing. Agr. Eduardo José Chica Martínez PhD.

C.I. 0912795101

**CUENCA, ECUADOR
2017**



RESUMEN

El sistema de cultivo agroecológico promete el desarrollo de micro y macro organismos en el suelo como consecuencia una mayor fertilidad. Por el contrario, el sistema convencional suele ser criticado, se piensa que reduce la fertilidad del suelo como consecuencia de la aplicación permanente de productos sintéticos, lo cual tiene efectos en la diversidad y cantidad de la diversidad.

En el país, no existen estudios comparativos entre estos dos sistemas de producción a nivel de comunidades microbianas.

Las técnicas basadas en el aislamiento y cultivo de microorganismos limitan el conocimiento de estas comunidades ya que solo un grupo muy limitado de microorganismos pueden ser cultivados. Las técnicas actuales se basan en análisis moleculares y bioinformáticos.

En este trabajo estudiamos las comunidades microbianas del suelo rizosférico de trigo cultivado de forma agroecológica y convencional, usando ADN del suelo. Para lo cual se tomaron 10 pares de muestras distribuidas en las provincias de Azuay y Cañar, cada par estuvo compuesto por una muestra de cada sistema de cultivo y por pares fueron colectadas en zonas similares, el historial del cultivo se evidenció a través de encuestas a los propietarios.

El ADN metagenómico fue extraído de cada muestra y usado para amplificar la región ITS y 16S de la comunidad de hongos y bacterias respectivamente. El ADN amplificado fue sometido a DGGE y a partir del perfil de bandas generadas se analizó la diversidad de las comunidades usando los índices de Riqueza, Shannon y Equitatividad. No se encontraron diferencias significativas entre la diversidad de hongos ni bacterias al comparar ambos sistemas de cultivo.

PALABRAS CLAVES: ADN, METAGENÓMICO, DGGE, DIVERSIDAD MICROBIANA, BACTERIAS, HONGOS, TRIGO.



ABSTRACT

The system of agroecological cultivation promises the development of micro and macro organisms in the soil and consequently a greater fertility. On the contrary, the conventional system tends to be criticized because it is thought that it reduces the fertility of the soil as a result of the permanent application of synthetic products.

In the country, there are no comparative studies between these two systems of production at the level of microbial communities. Techniques based on the isolation and cultivation of microorganisms limit the knowledge of these communities since only a very limited group of microorganisms can be cultivated. Current techniques are based on molecular and bioinformatic analysis. In this work we study the microbial communities of wheat rhizospheric soil cultivated in an agroecological and conventional way, using soil DNA.

In total, 10 pairs of samples were collected in the provinces of Azuay and Cañar, each pair was composed of one sample of each culture system and in pairs were collected in similar areas, the history of the crop was evidenced through surveys the owners.

The metagenomic DNA was extracted from each sample and used to amplify the ITS and 16S region of the community of fungi and bacteria respectively. The amplified DNA was submitted to DGGE and from the profile of generated bands the diversity of the communities was analyzed using the Wealth, Shannon and Equitativity indices. No significant differences were found between fungal and bacterial diversity when comparing both culture systems.

KEYWORDS: DNA, METAGENOMIC, DGGE, MICROBIAL DIVERSITY, COMPOSITION, FUNGI, BACTERIA, WHEAT



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE TABLAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	7
CLAUSULA DE DERECHO DE AUTOR	8
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	9
AGRADECIMIENTOS	10
DEDICATORIA	11
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
CAPITULO IV: RESULTADOS	26
CAPITULO V: DISCUSIÓN	57
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
ANEXOS.....	68



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y volúmenes utilizados para PCR # 1 de la región ITS.....	22
Tabla 2. Reactivos y volúmenes utilizados para PCR anidada de la región ITS.....	22
Tabla 3. Reactivos y volúmenes utilizados para PCR del gen 16S.....	23
Tabla 4. Características de los sitios de estudio del cantón Nabón.....	27
Tabla 5. Características de los sitios de estudio del cantón Cañar.....	30
Tabla 6. Resultados de análisis físico – químico de las muestras de suelo tomadas en los sitios de estudio de los cantones Nabón y Cañar.....	34
Tabla 7. Riqueza (S), índice de Shannon (H) e índice de equitabilidad de Shannon (E_H), a partir de perfiles de DGGE en suelos de cultivos de trigo del cantón Nabón....	41
Tabla 8. Riqueza (S), índice de Shannon (H) e índice de equitabilidad de Shannon (E_H), a partir de perfiles de DGGE en suelos de cultivos de trigo del cantón Cañar.....	42
Tabla 9. Comparación de los índices de diversidad obtenidos de los sistemas de producción en los cantones Nabón y Cañar, del gen 16S.....	43
Tabla 10. Comparación de los índices de diversidad obtenidos de los sistemas de producción en los cantones Nabón y Cañar, de la región ITS.	43
Tabla 11. Claves de los algoritmos de las muestras agroecológicas y convencionales de los cantones Nabón y Cañar.....	52



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapas de las zonas de estudio.....	18
Figura 2. Ubicación de los sitios de estudio en el cantón Nabón.....	18
Figura 3. Ubicación de los sitios de estudio en el cantón Nabón.....	19
Figura 4. ADN metagenómico extraído de las muestras colectadas en las comunidades Chunasana y Taro en el cantón Nabón.....	35
Figura 5. ADN metagenómico extraído de las muestras colectadas en las comunidades La Posta y Quilloac en el cantón Cañar.....	35
Figura 6. Amplificación de ADN metagenómico 16S.....	36
Figura 7. Amplificación de ADN metagenómico ITS.....	36
Figura 8. Perfil de diversidad del gen 16S del cantón Nabón.....	37
Figura 9. Perfil de diversidad de la región ITS del cantón Nabón.....	38
Figura 10. Perfil de diversidad del gen 16S del cantón Cañar.....	39
Figura 11. Perfil de diversidad de la región ITS del cantón Cañar.....	40
Figura 12. Dendogramas A y B, de agrupamiento del gen 16S, cantón Nabón.....	44
Figura 13. Dendogramas C, D y E, de agrupamiento del gen 16S, cantón Nabón.....	45
Figura 14. Dendogramas A y B, de agrupamiento de la región ITS, cantón Nabón....	46
Figura 15. Dendogramas C, D y E, de agrupamiento de la región ITS, cantón Nabón	47
Figura 16. Dendogramas A y B, de agrupamiento del gen 16S, cantón Cañar.....	48
Figura 17. Dendogramas C, D y E, de agrupamiento del gen 16S, cantón Cañar.....	49
Figura 18. Dendogramas A, B y C, de agrupamiento de la región ITS, cantón Cañar.	50
Figura 19. Dendogramas D y E, de agrupamiento de la región ITS, cantón Cañar.....	51
Figura 20. Árbol consenso para el gen 16S en el cantón Nabón.....	53
Figura 21. Árbol consenso para la región ITS en el cantón Nabón.....	54
Figura 22. Árbol consenso para el gen 16S en el cantón Cañar.....	55
Figura 23. Árbol consenso para la región ITS en el cantón Cañar.....	56



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

ADN: ácido desoxirribonucleico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

ITS: espaciador transcribible interno

DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturización

dNTPs: desoxirribonucleótido trifosfato

mM: milimolar

µM: micromolar

pb: pares de bases



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Carlos Alberto Jiménez Merino en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación de la diversidad y abundancia microbiana en suelos manejados bajo dos sistemas de producción contrastantes, dedicados al cultivo de trigo en el sur del Ecuador, mediante un análisis metagenómico”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 31 de octubre de 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "C. A. Jiménez Merino". It is placed over a horizontal line.

Carlos Alberto Jiménez Merino

C.I: 1104161540



Cláusula de Propiedad Intelectual

Carlos Alberto Jiménez Merino, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la diversidad y abundancia microbiana en suelos manejados bajo dos sistemas de producción contrastantes, dedicados al cultivo de trigo en el sur del Ecuador, mediante un análisis metagenómico", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 31 de octubre de 2017



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "C. A. Jiménez Merino".

Carlos Alberto Jiménez Merino

C.I: 1104161540



AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al Dr. Eduardo Chica, al Dr. Andrés Yarzabal, al equipo técnico e investigativo del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Cuenca y a mis compañeros de aula y trabajo, quienes desinteresada e incondicionalmente han apoyado y aportado para la culminación del presente estudio.

Carlos Alberto Jiménez Merino,



DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de tesis de manera especial a mi familia, quienes han tenido que acompañarme y soportarme durante todos los días que me ha tomado culminar mis estudios de maestría, sacrificando muchos momentos, que, por los estudios y largas noches de trabajo, no se pudieron vivir.

Carlos Alberto Jiménez Merino

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

El manejo de los cultivos en el Ecuador ha sido orientado hacia un modelo de producción agrícola que se caracteriza principalmente en tener alta eficiencia, por la utilización de productos químicos para el control de plagas, por el uso de fertilizantes químicos para recuperar las extracciones de nutrientes del suelo por los cultivos y por la utilización intensiva de los recursos (Charvet, 2012). Estos compuestos químicos pueden aumentar el costo de producción, aumentan la dependencia de las importaciones, contribuyen a la contaminación ambiental por los residuos que liberan y pueden disminuir la calidad del producto si estos residuos quedan en el mismo (Magnabosco, 2013). Este tipo de producción se realiza tanto en el cultivo de alimentos para el consumo dentro de los hogares, como para la industrialización.

El trigo, representa uno de los cereales de mayor importancia en el Ecuador (Garófalo *et al.*, 2011), su consumo supera las 450 000 Tm/año (SICA, 2002). El 98% de los requerimientos internos de trigo es importado, mientras que el solo el 2%, es producido a nivel local (Banco Central del Ecuador, 2007), esto se debe a la baja producción que se tiene, además de los precios bajos que representa la importación del cereal (Falconí, 2008). Sin embargo, se estima que desde el año 2010 la superficie de producción de trigo ha aumentado (Garófalo *et al.*, 2011), aumentando con ello la demanda de insumos (fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas, maquinaria, otros).

El modelo de producción y desarrollo, sustentado en la exportación de materia prima, ha provocado una fuerte presión sobre los recursos naturales y la consecuente degradación del ambiente (Pavón, 2003).

A diferencia la agroecología da un enfoque a la agricultura más ligado al ambiente y más sensible socialmente; centrada no sólo en la producción sino también en la sostenibilidad ecológica del sistema de producción (Altieri *et al.*, 1999), en el manejo del suelo, en la generación de una cadena comercial más justa, que finalmente deriva en una producción más sana para el consumo (Charvet, 2012). “El rendimiento sustentable de los agroecosistemas proviene del equilibrio óptimo de cultivos, suelos, nutrientes, luz solar, humedad y otros organismos coexistentes” (Altieri *et al.*, 1999).

“El ecosistema edáfico es el hábitat de un gran número de especies microbianas, tanto eucariotas (hongos, algas, protozoos, ácaros e insectos entre otros) como procariotas (bacterias y arqueas) que establecen relaciones intra e interespecíficas que contribuyen a las características propias del suelo” (Nogales, 2005).

Los estudios sobre el componente biológico del suelo utilizan generalmente técnicas de aislamiento y cultivo, para identificar los microorganismos y asociarlos con determinadas funciones (Daniel, 2004). La principal desventaja de estas técnicas es la limitación que se tiene al identificar únicamente los organismos cultivables, que en el caso de procariotas representan menos del 1 %, pese a ser el grupo más abundante del suelo (Torsvik y Øvreås, 2002).

Al estudiar el metagenoma de un ambiente en particular, es posible identificar en gran parte bacterias u otros organismos no cultivables (Hernández *et al.*, 2010). La construcción de bibliotecas metagenómicas es una opción importante para tener acceso a todo este material genético (Handelsman, 2004), que podría codificar nuevas o mejores actividades metabólicas (Hernández *et al.*, 2010).

El suelo rizosférico de las plantas de trigo contiene una alta diversidad de microorganismos y por lo tanto, constituye una gran reserva para el descubrimiento de genes con diversas aplicaciones de la biotecnología agrícola (Hernández *et al.*, 2012).

Es necesario conocer la diversidad biológica y el impacto que las prácticas de manejo bajo sistemas contrastantes de producción (uso de insumos provenientes de fuentes orgánicas y prácticas de bajo impacto ambiental “agroecológicos” y de uso intensivo de agroquímicos y prácticas de alto impacto ambiental “convencional”), tienen sobre esta riqueza y abundancia de los mismos, por lo tanto en el presente trabajo, se propone un estudio mediante el análisis metagenómico que permitirá analizar comunidades biológicas, con mayor resolución y sensibilidad taxonómica que los métodos tradicionales.

Con este estudio se determinará las diferencias existentes entre los dos tipos de manejo, en base a la determinación de la riqueza y abundancia de microorganismos que cada uno de ellos presente, aportando al conocimiento de cómo las prácticas de



producción agrícola que se realizan en las comunidades del sur del Ecuador, influyen sobre la diversidad biológica en el cultivo de trigo e infieren sobre el efecto que pudieran tener dichos microorganismos en la sostenibilidad del mismo, considerando que la diversidad y abundancia relativa de las comunidades microbianas en suelos agrícolas dependen del tipo de cultivo y las labores agrícolas realizadas (Bárcena *et al.*, 2014; Borneman *et al.*, 1996; Girvan *et al.*, 2004; Øvreås y Torsvik, 1998).

Científicamente, el estudio propuesto aportó a cubrir el vacío de información respecto a la composición de las comunidades biológicas de suelos manejados con prácticas agroecológicas y convencionales dedicadas al cultivo de trigo en comunidades representativas en el sur del Ecuador. Este estudio aportó información sobre el efecto del tipo de manejo en las comunidades microbianas, que será de utilidad para el diseño de sistemas de producción agrícola, amigables y sustentables.

1.1. Objetivo General

Caracterizar la diversidad microbiana existente en suelos manejados bajo sistemas de producción contrastantes (“convencional” y “agroecológico”) dedicados a la producción de trigo en el sur del Ecuador.

1.1.1. Específicos:

- Establecer índices de diversidad microbiana en suelos bajo los dos sistemas de manejo del cultivo de trigo en el Sur del Ecuador.
- Inferir sobre posibles relaciones entre los ambientes microbianos y las prácticas agrícolas.

1.2. Hipótesis de investigación

La diversidad microbiana en los suelos dedicados al cultivo de trigo es mayor en suelos con manejo agroecológico que en suelos manejados convencionalmente en el sur del Ecuador.



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agroecología.

Es una disciplina científica que se enfoca en el estudio de la agricultura desde una perspectiva ecológica y se define como un marco teórico cuyo fin es analizar los procesos agrícolas de manera más amplia. Considera a los ecosistemas de producción agrícola, como unidades fundamentales de estudio; y dentro de estos, a los ciclos minerales, las transformaciones de la energía, los procesos biológicos y las relaciones socioeconómicas, investigados y analizados como un todo (Altieri *et al.*, 1999). En agroecología el interés es la investigación no sólo para la maximización de la producción de una unidad en particular, sino también la optimización del agroecosistema. Más allá de las consideraciones disciplinarias hacia interacciones complejas entre personas, cultivos, suelo, animales, etcétera (Altieri *et al.*, 1999).

2.2. Suelo.

El suelo es un recurso viviente, dinámico, no renovable, cuya condición y funcionamiento es vital para la producción de alimentos, y para el mantenimiento de la calidad ambiental local, regional y global (Doran, 1999). Es un sistema que comprende una variedad de micro hábitats que hace posible la vida de muchos microorganismos y macroorganismos, que hacen parte de un ecosistema complejo (Garbeva *et al.*, 2004).

La comunidad microbiana, dentro del ecosistema edáfico, es de vital importancia para su funcionamiento, dada la cantidad de procesos en los que participa (descomposición, ciclado de nutrientes, agregación del suelo y patogenicidad) (Dubey *et al.*, 2006). Esta relación de co-dependencia entre el suelo y los seres vivos que lo habitan es clave en cualquier investigación sobre el manejo ecológico de un suelo agrícola (Hernández *et al.*, 2006).

2.3. Diversidad biológica en suelos agrícolas.

Los suelos agrícolas albergan una gran diversidad biológica, la misma que dependiendo del sistema de manejo del cultivo, puede ser incluso mayor a la del ecosistema natural donde se ubican (Drinkwater *et al.*, 1995; Kennedy y Smith, 1995; Mulder *et al.*, 2003). No obstante, muchas prácticas de cultivos convencionales tienen un efecto negativo sobre diversidad biológica en el suelo (Giller *et al.*, 1997; Buckley y Schmidt, 2001; Van Diepeningen *et al.*, 2006). Por el contrario, los suelos bajo sistemas de cultivo orgánicos típicamente presentan mayor diversidad biológica que los suelos convencionales y naturales (Maeder *et al.*, 2002; Mulder *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2003). Los organismos más abundantes del suelo son los procariotas, seguidos por los hongos, protozoarios, nemátodos y artrópodos. En términos de diversidad, la riqueza de especies bacterianas presentes en los suelos es altamente variable, pero se estima que puede oscilar entre 26 000 y 52 000 especies por gramo de suelo (Roesch *et al.*, 2007). Con respecto a los hongos, estos son típicamente más abundantes y diversos en suelos forestales, siendo en general los grupos más abundantes aquellos pertenecientes al subreino Dikarya (Ascomycota y Basidiomycota) (Anderson y Cairney, 2004; Buée *et al.*, 2009). En suelos agrícolas, la composición taxonómica y abundancia relativa de las poblaciones microbianas en el suelo dependen del tipo de cultivo y labores agrícolas desarrolladas en ese suelo (Bárcena *et al.*, 2014; Borneman *et al.*, 1996; Girvan *et al.*, 2004; Øvreås y Torsvik, 1998). Estas poblaciones típicamente varían en el tiempo en respuesta a factores ambientales, siendo la amplitud de estas fluctuaciones un indicador del nivel de salud del suelo (van Bruggen *et al.*, 2006; Pereira e Silva *et al.*, 2012, 2013), siendo este nivel típicamente mayor en suelos bajo manejo orgánico (Birkhofer *et al.*, 2008; van Bruggen *et al.*, 2006).

2.4. Metagenómica.

Metagenómica se define al análisis genómico de la comunidad microbiana en un ambiente determinado (Carvalhais *et al.*, 2012, Dupre y O'Malley 2007). Al conjunto de los genomas de microorganismos en una muestra de un nicho ecológico determinado, se le llama metagenoma (Handelsman *et al.*, 2002).



El desarrollo de la técnica metagenómica surgió para ser utilizada en el estudio de microorganismos no cultivables que representan hasta el 99% de la población microbiana en un ambiente determinado (Schloss y Handelsman, 2003).

Los estudios metagenómicos pueden ser descriptivos, esto es, orientados a determinar la taxonomía y abundancia de microorganismos, o prospectivos, es decir orientados a explorar funciones específicas de las comunidades microbianas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas (Sharma, *et. al.*, 2008).

2.5. Metagenómica en rizósfera de trigo.

La caracterización de las comunidades microbianas del suelo y la posibilidad de construcción de una biblioteca metagenómica de la rizósfera de suelo en trigo ha sido muy importante ya que se representa un potencial para el descubrimiento de nuevas funciones u organismos desconocidos en entornos ampliamente estudiada. Se considera especialmente un depósito de material genético que codifica para moléculas con alguna actividad en el control biológico (Hernández *et al.*, 2012).

2.6. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

La técnica DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”), diseñada por Fischer y Lerman en 1983, es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con diferente secuencia de nucleótidos.

Los ecólogos microbianos adoptaron la técnica para el análisis de la estructura y dinámica de comunidades complejas a partir de los trabajos propuestos por Muyzer *et al.*, en 1993. En la actualidad la DGGE tiene en la ecología microbiana su principal campo de aplicación.

CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitio de muestreo

El presente estudio se realizó en los cantones Nabón, de la provincia del Azuay y el cantón Cañar, de la provincia del Cañar, en estos cantones se identificó sitios donde se cultivó trigo bajo dos sistemas de producción contrastantes (convencional y agroecológico), donde se realizó la toma de muestras y el desarrollo de las actividades que se requieran durante el presente estudio.

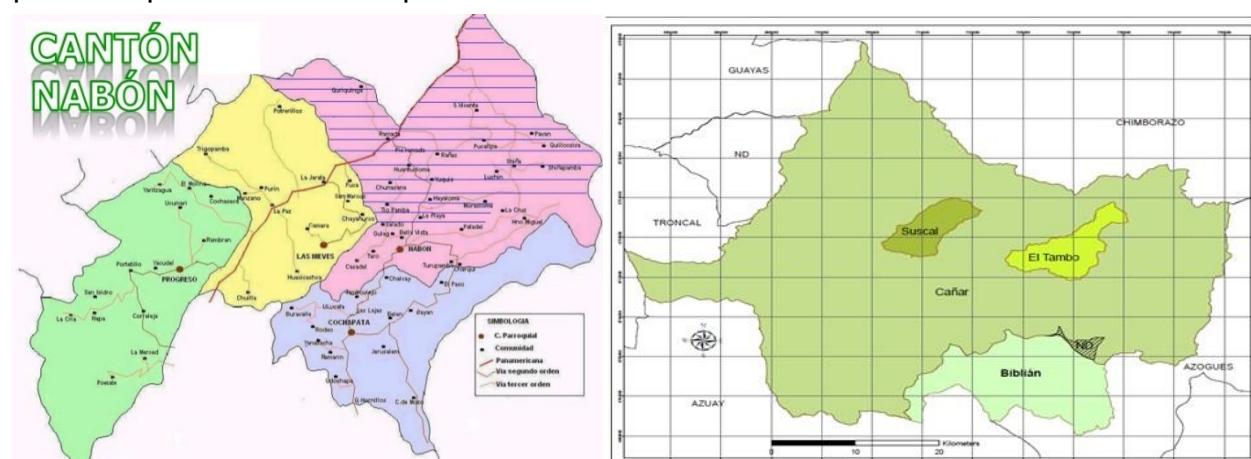


Figura 1. Mapas de las zonas de estudio; **Fuente:** POT – Nabón y PDOT – Cañar.

- En el cantón Nabón se identificaron las comunidades Chunasana y Taro para realizar la toma de muestras.

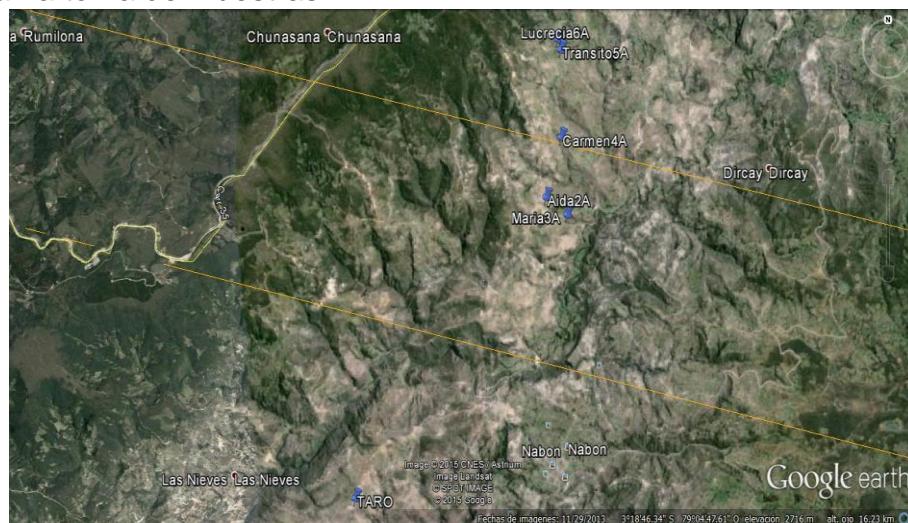


Figura 2. Ubicación de los sitios de estudio en el cantón Nabón; **Fuente:** Google earth y diseño autor.

- En el cantón Cañar se identificaron los sitios de estudio en las comunidades La Posta y Quilloac.

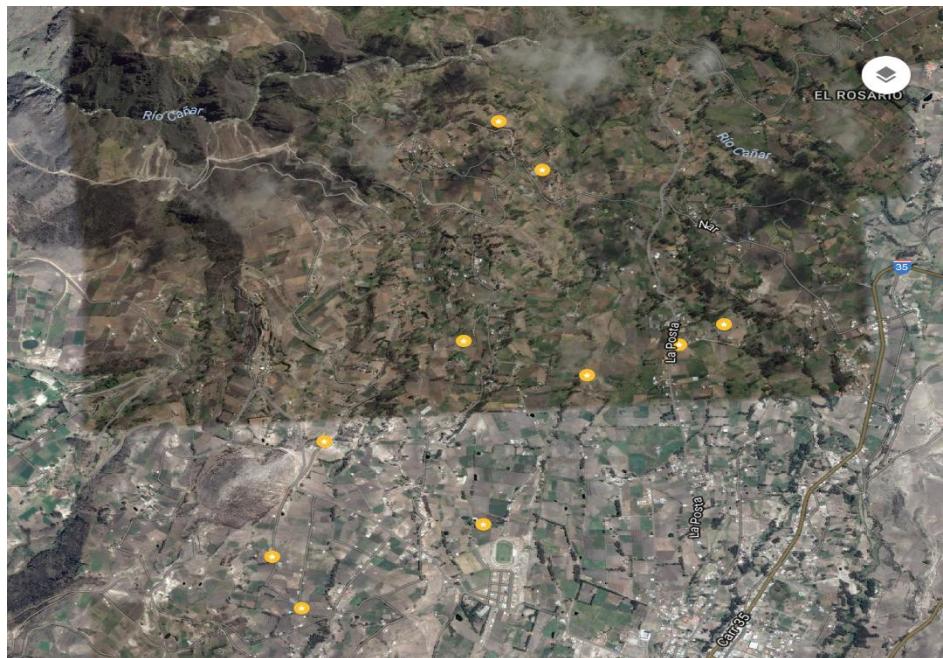


Figura 3. Ubicación de los sitios de estudio en el cantón Nabón; **Fuente:** Google earth y diseño autor

3.2. Colecta de muestras.

- Análisis físico: Las muestras de suelo se tomaron una vez se contó con una superficie despejada libre de malezas (20 cm x 20 cm), se introdujo el cilindro lentamente con golpes suaves/moderados intentando perturbar lo menos posible el suelo dentro del cilindro. Una vez que se insertó todo el cilindro (10 cm), se despejó el suelo en el exterior de uno de los lados del cilindro y con la ayuda de un machete introducido por debajo del cilindro, se retiró cuidadosamente. La muestra se identificó con el código de colecta, se envolvió en plástico y se guardó cuidadosamente para evitar que se mueva demasiado.
- Análisis químicos: Las muestras se tomaron cerca de las tomadas para análisis físicos. Se colectó 1 Kg de muestra de suelos de los 10 cm más superficiales, se depositó en una funda plástica, marcando con el código de colecta. En este



caso no importó si las muestras se mueven, lo importante aquí es que no se mezclen (Anexo 2).

- Muestras para análisis metagenómico: Se repitió el proceso usado para la toma de las muestras para análisis químicos con la diferencia de que en lugar de colectar 1Kg, sólo se colectó 100g. Estas muestras se identificaron con los mismos códigos de colecta con los que se identificaron las otras muestras y se colocó en una bolsa plástica para su traslado. Las muestras se colocaron en fundas plásticas, se transportaron en un envase que ayudó a que permanezcan frescas y fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.3. Caracterización de los sitios de estudio.

Se realizó una caracterización de los sitios de estudio de acuerdo con los siguientes criterios:

- Clima: régimen de precipitación y temperatura (obtenidos a partir de registros históricos).
- Paisaje: pendiente, aspecto, proximidad a cerros, bosques y cuerpos de agua.
- Historia de manejo: Encuesta de manejo de las parcelas en rotación anual y retrospectiva a tres años.
- Suelo: textura, pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), materia orgánica (MO), orden taxonómico.

3.4. Análisis físico – químico del suelo.

El análisis físico – químico del suelo fue realizado en el Laboratorio de Suelos de la Universidad de Cuenca y de la Estación Experimental del Austro del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - INIAP, lo que permitió determinar las características de los suelos en cada sitio de estudio.



3.5. Extracción y purificación del ADN metagenómico.

Para aislar el ADN metagenómico de los suelos de cultivo de trigo se empleó el kit de extracción Powersoil® DNA isolation Kit (MoBio, Carlsbad, California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar la cantidad y calidad del ADN extraído se realizó electroforesis en geles de agarosa 0,8% (p/v) preparados con amortiguador TAE 1X. Cada muestra cargada en el gel estuvo compuesta de 5 µl de ADN metagenómico, 5 µl de SYBER GREEN™ y 1 µl de Blue Juice™ 10X. En cada gel se incluyó también un marcador de longitud molecular (TrackIt 1 kb plus DNA ladder™, Invitrogen). Luego de que las muestras migraron por 30 minutos a 80 voltios fueron visualizadas usando un foto-documentador (E-Gel® Imager System, Invitrogen).

3.6. Amplificación de fragmentos de ADN ribosomal

Mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) se amplificaron fragmentos de ADN ribosomal (ADNr) 16S de bacterias e ITS de hongos.

3.6.1. PCR de la región ITS del ADNr de hongos

La región ITS del ADNr de la comunidad fúngica, se amplificó a partir del ADN metagenómico extraído previamente, utilizando los cebadores universales ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'), e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca) y un termociclador Mastercycler® nexus GSX1, Eppendorf programado con el siguiente perfil térmico: desnaturización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de hibridación tipo touchdown, con desnaturización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 65°C por 30 segundos disminuyendo 1°C por cada ciclo, 72°C por 30 segundos, seguido por 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Liu *et al.* 2015). Con un volumen final de 30 µl.

Tabla 1. Reactivos y volúmenes utilizados para PCR # 1 de la región ITS.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Platinum® PCR SuperMix	1X
Primer ITS1F	0,2 μM
Primer ITS4	0,2 μM
ADN metagenómico	<500ng

El producto de la amplificación se utilizó como molde para realizar una segunda PCR (PCR anidada) con los cebadores ITS1FGC (5'-CGC CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA -3') e ITS2 (5'-GCT GCG TTC ATC GAT GC-3') (Del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca), usando el siguiente perfil térmico: desnaturización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de hibridación a 94°C por 45 segundos, 55°C por 75 segundos, 72°C por 60 segundos, seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos (Wu et al. 2013). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 30 μl. Las concentraciones de cada reacción se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos y volúmenes utilizados para PCR anidada de la región ITS

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Platinum® PCR SuperMix	1X
Primer ITS1FGC	0,2 μM
Primer ITS2	0,2 μM
ADN PCR #1	<500ng

3.6.2. PCR bacterias (gen 16S ADNr)

A partir de las mismas muestras del ADN metagenómico aislado inicialmente, se amplificó por PCR un fragmento del gen ADNr 16S que codifica la región variable V6 y V8 de alrededor de 420 pb. Usando los cebadores F968 (5'- GC-CGC CCG CGC CCC GCG CCC GGC CGC CCC CGC CCC AAC AAC GCG AAG AAC CTT AC -3' y 1401R (5'- CGC CCG CGC CCC GCC CGG CCC GCC CCC GCA ACG CGA AGA ACC TTAC -3'). El PCR Super Mix Platinum® (Anexo 1) fue utilizado para un volumen final

de 30 μ l (Tabla 3).

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturización inicial a 94°C por 5 minutos; seguida de 10 ciclos de amplificación tipo touchdown a 94°C por 1 minuto, hibridación inicial a 65°C por 1 minuto disminuyendo 1°C por cada ciclo y extensión a 72°C por 2 minutos; seguido por 25 ciclos de amplificación (estándar) a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos; seguido de una extensión final a 72°C por 30 minutos (Brons y Van Elsas, 2008).

Tabla 3. Reactivos y volúmenes utilizados para PCR del gen 16S.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Platinum® PCR SuperMix	1X
Primer F968GC	0,2 μ M
Primer 1401R	0,2 μ M
ADN metagenómico	<500ng

Un control negativo, que consistió en un tubo con todos los componentes para la reacción de PCR a excepción del ADN metagenómico, se incluyó durante todas las PCR realizadas.

Un gel de agarosa al 1%(w/v) elaborado con buffer TAE 1X se usó para verificar la amplificación de los segmentos específicos de ADN tanto de hongos (ITS) como de bacterias (16S). Las muestras cargadas en el gel estuvieron compuestas por: 5 μ l de ADN amplificado, 0.5 μ l de SYBER GREEN y 1 μ l de Blue Juice 10X. En cada gel se incluyó además un marcador de longitud molecular (TrackIt 1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen) para verificar los tamaños de las bandas. La electroforesis se llevó a cabo por 30 minutos a 80 Voltios luego de lo cual se visualizó el gel en un transiluminador (E-Gel® Imager System, Invitrogen).

3.7. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante DGGE

Los fragmentos amplificados de la región ITS (hongos), fueron sometidos a

DGGE en geles de poliacrilamida al 8% (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1), y un gradiente 20%- 35% (urea y formamida). Los fragmentos amplificados de la región 16S (bacterias) también se sometieron a DGGE, pero en esta ocasión se usó un gradiente desnaturizante de 35-55% (urea y formamida) en geles de acrilamida al 7%. Para ambos casos el equipo DCodeTM Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) fue usado, siguiendo las instrucciones descritas por Zwart y Bok (2004).

El ADN amplificado se cargó en el gel, en una mezcla de 15 μ l de ADN + 3 μ l de Bluejuice 6X. La electroforesis se realizó a una temperatura de 60°C y 80 Voltios por 14 horas (Correa *et al.*, 2007). Posteriormente los geles fueron teñidos en condiciones de obscuridad, a temperatura ambiente por 30 minutos, usando SYBR Green 2X en tampón TAE 0.5X. El resultado se visualizó en un foto-documentador (E-Gel® Imager System, Invitrogen). (Anexo 3)

Los patrones y la densidad de las bandas se analizaron usando Image Lab. Los resultados se registraron en una matriz de ausencia / presencia e intensidad de bandas y se calcularon índices de diversidad y abundancia (Duarte *et al.*, 2012).

3.8. Determinación de riqueza e índices de diversidad

Con los reportes generados en el programa Image Lab versión 5.2.1, de la identificación de bandas para cada perfil de DGGE, se obtuvo los valores de cantidad de bandas presentes, que nos permitieron realizar los cálculos que determinaron los índices descritos a continuación:

- Riqueza (S), que está dada por el número de organismos presentes en una muestra; En el presente estudio la Riqueza (S), está determinada por el número de bandas presentes en cada muestra y su fórmula se interpreta de la siguiente manera:

$$S = \text{Nro. de bandas en cada muestra.}$$

- Índice de Shannon (H'), se calculó con el dato volumen de intensidad de cada banda identificada dentro de la línea del perfil DGGE correspondiente a una muestra y se calcula utilizando la siguiente fórmula:



$$H' = - \sum P_i * \ln P_i$$

Donde:

H' = Índice de Shannon-Wiener

P_i = Abundancia relativa

\ln = Logaritmo natural

- Índice de equitatividad (J'), determina medida de la distribución de la abundancia de las especies y se calcula con la siguiente formula:

$$J' = H' / \ln S$$

Donde:

J' = Índice de Equitatividad

H' = Índice de Shannon – Wiener

\ln = Logaritmo natural

S = Índice de riqueza

3.9. Determinación jerárquica de las comunidades microbianas

Con la utilización del software PyElph se realiza y con los resultados de identificación de bandas, se realiza la jerarquización de las agrupaciones de comunidades tanto de bacterias a través de la región ITS, como de hongos a través del gen 16S. Los Dendogramas resultantes se obtienen en los algoritmos COMPLETE LINKAGE, NEIGHBOUR JOINING, SINGLE LINKAGE, UPGMA, WPGMA.

Estos algoritmos nos permiten obtener la clave jerárquica de las comunidades microbianas, con la que utilizando el software Phylip, se construye un solo árbol consenso que nos indica de todas las probabilidades, las relaciones jerárquicas más comunes.

3.10. Determinación del nivel de significancia entre los manejos agroecológico y convencional

Con los datos de riqueza e índices de diversidad obtenidos y mediante la utilización del software estadístico *InfoStat*, realizando una prueba T – Student con un valor $p \leq 0,05$



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1. Caracterización sitios de estudio

El proceso de caracterización de los sitios de estudio está fundamentada en el procesamiento de información obtenida sobre la base de documentación secundaria (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial (PDyOT) del cantón Nabón y el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia del Cañar 2015 – 2019 (PDOT) de la provincia del Cañar) y con el levantamiento de información primaria.

Los sitios de estudio pertenecen al cantón Nabón en la provincia del Azuay y Cañar en la provincia del Cañar, luego de realizar la ubicación de cada lote y una vez que se tuvo la aprobación por parte de los propietarios, se procede a realizar el levantamiento de la información con la encuesta y la ficha de manejo del cultivo, para posteriormente tomar las muestras de suelo.

4.1.1. Zona 1

En la primera zona de estudio se seleccionaron los sitios (lotes) manejados bajo sistemas de producción contrastantes pertenecientes a comunidades del cantón Nabón, en donde aún se cultiva trigo, 5 sitios con producción agroecológica y 5 convencional.

- Comunidad: Chunasaña y Taro
- Parroquia: Las Nieves y Nabón
- Cantón: Nabón
- Provincia: Azuay
- Clima: El cantón Nabón, se encuentra en una zona que tiene diferentes pisos altitudinales y climáticos, lo que hace que se tenga precipitaciones que van desde los 500 mm hasta 1500 mm al año. Al igual que las precipitaciones, las temperaturas van desde los 6°C a los 20°C. Los sitios de estudio se encuentran en la zona seca de la subcuenca del río León.

- Paisaje: Los sitios de estudio se encuentran en zonas de topografía irregular, donde las pendientes pueden ir desde 5% y alcanzar más de 45%, debido a que se encuentran en las estribaciones de la cordillera occidental de los Andes, conformando la subcuenca del río León. La comunidad Chunasana se encuentra en la parte baja del bosque protector de la subcuenca alta del río León, lo que permite el abastecimiento de agua tanto para consumo humano como para actividades agrícolas de esta comunidad. Mientras que en la comunidad de Taro, el abastecimiento de agua proviene a través de canalización desde los bosques de la subcuenca del río Zhincata, pese a encontrarse en otra subcuenca.
- Suelo: Los tipos de suelo predominantes son Entisoles, Inceptisoles y Anfisoles, es decir son suelos de formación joven, que por la pérdida de vegetación protectora están expuestos a degradación y erosión hídrica y eólica, lo que ha encaminado a que sean suelos superficiales y pobres para el desarrollo de actividades agrícolas. Las características físico – químicas del suelo muestreado en el presente estudio, se indican en la tabla de resultados en la sección Análisis de suelo.

Los sitios de muestreo se describen a continuación:

Tabla 4. Características de los sitios de estudio del cantón Nabón.

# LOTE	COMUNIDAD	TIPO DE MANEJO	HISTORIA DE MANEJO
TCN 1	Chunasana	Convencional	Está ubicado junto a la vía en Chunasana, es un terreno que tiene riego al encontrarse junto a un canal de riego, se fertiliza durante el ciclo del cultivo con productos de origen animal y químico, tiene pendiente del 10% y se hace rotación con maíz.
TAN 1	Chunasana	Agroecológico	El lote de trigo se encuentra ubicado en un terreno parcelado para cultivar varios productos, rotando frecuentemente con maíz - fréjol y hortalizas, tiene riego por inundación, con una pendiente del 15%,

			se aplica productos orgánicos para fertilizar y no se realiza controles fitosanitarios.
TCN 2	Chunasana	Convencional	Es un terreno que posee una pendiente de 40%, es de temporal lluvioso debido a que no posee riego, se rota con maíz y se deja en descanso para pastorear al ganado, se fertiliza durante el ciclo del cultivo, adicionando tanto productos de origen animal, como con productos químicos.
TAN 2	Chunasana	Agroecológico	Terreno parcelado que tiene riego, se rota con hortalizas, maíz y alfalfa. Tiene una pendiente del 10%, se incorpora materia orgánica con residuos de cosechas y abono de origen animal.
TCN 3	Taro	Convencional	El terreno posee una pendiente del 30°, se cultiva trigo en rotación del maíz para aprovechar el fertilizante utilizado. La siembra se realiza en los meses de febrero y marzo, para aprovechar las lluvias.
TAN 3	Taro	Agroecológico	Se considera manejo agroecológico, debido a que en el terreno únicamente se cultiva trigo una vez al año, el resto del tiempo se dedica al pastoreo del ganado, además no se realiza la aplicación de productos químicos.
TCN 4	Taro	Convencional	En este terreno se realiza dos ciclos al año del cultivo, uno con maíz y otro rotando con cebada y trigo. Se utiliza productos de origen químico para la fertilización en las épocas que el cultivo lo requiera. Tiene una pendiente de 20%, que permite que la preparación se haga

			con maquinaria agrícola y se cuenta con riego.
TAN 4	Taro	Agroecológico	Después de haber permanecido en descanso se realiza en este ciclo la siembra de trigo, con la finalidad de rotar al cultivo anterior (maíz), además se realiza un ciclo, debido a que no se cuenta con riego, por lo que se aprovecha la época invernal. La pendiente del terreno es del 30%.
TCN 5	Taro	Convencional	El terreno presenta una pendiente del 40%, tiene riego por aspersión lo que permite que en ocasiones se realice dos ciclos del cultivo en rotación con maíz y cebada; durante el ciclo del cultivo se realiza aplicación de fertilizantes necesarios para el cultivo.
TAN 5	Taro	Agroecológico	En el terreno se realiza la siembra de un cultivo al año, aprovechando los meses de lluvia, debido a que no poseen agua para riego. La pendiente es del 40% y se prepara el suelo con yunta y se realiza la aplicación de abono de gallina.

TCN: Trigo Convencional Nabón

TAN: Trigo Agroecológico Nabón

4.1.2. Zona 2

En esta zona de estudio, los sitios a muestrear manejados bajo sistemas de producción contrastantes pertenecientes de las comunidades La Posta y Quilloac del cantón Cañar, por ser zonas productoras de trigo, 5 sitios con producción agroecológica y 5 convencional.

- Comunidad: La Posta y Quilloac
- Parroquia: Cañar

- Cantón: Cañar
- Provincia: Cañar
- Clima: El cantón Cañar se encuentra en la subcuenca alta del río Cañar, formada por valles altos cuya altitud se encuentra entre los 2.600 a 4.500 msnm; Dentro del cantón se seleccionaron las comunidades La Posta y Quilloac como sitio de estudio. Estas comunidades conforman la microcuenca del río Shanshan. La temperatura en la zona en la que se encuentra el cantón Cañar oscila entre una máxima de 17°C y una mínima de 7,1°C, con una media anual de 11,3°C, considerándose una zona de clima frío de alta montaña; con una precipitación promedio anual de 471,8 mm.
- Paisaje: Las dos comunidades se encuentran en la microcuenca del río Shanshan, son de topografía irregular, con zonas irrigadas por fuentes de agua como la quebrada Rosas pamba, sistemas de riego canalizados como el Quilloac - Londón y zonas de estación lluviosa.
- Suelo: En el cantón Cañar, la influencia de la topografía permite que se pueda tener varios pisos altitudinales con fuertes pendientes, esto asociado al desgaste acelerado de la capa arable causado por la deforestación, prácticas agrícolas inadecuadas, erosión fluvial y eólica y procesos de formación continua, ha determinado que la mayor parte sean suelos jóvenes, con características de fertilidad pobres; pero sin embargo esto no es una limitante para que se puedan realizar prácticas agropecuarias. La clasificación taxonómica de los suelos en Cañar corresponde a alfisoles, entisoles, histosoles, inceptisoles, molisoles y vertisoles. Las características físico – químicas del suelo muestreado en el presente estudio, se indican en la tabla de resultados en la sección Análisis de suelo.

Los sitios de muestreo se describen a continuación:

Tabla 5. Características de los sitios de estudio del cantón Cañar.

# LOTE	COMUNIDAD	TIPO DE MANEJO	HISTORIA DE MANEJO
TCC 1	La Posta	Convencional	Este terreno tiene una pendiente del 20%, se prepara con tracción animal, no posee riego por lo que es de temporal y se deja

			en descanso para en el siguiente ciclo cultivar cebada, a pesar de eso se le aplica fertilizante nitrogenado durante el ciclo del cultivo.
TAC 1	La Posta	Agroecológico	El lote se encuentra junto al domicilio del propietario, por lo que se facilita el riego con agua del domicilio, esto permite que se puedan sembrar varios cultivos durante todo el año. Se adiciona abonos de origen animal y residuos de cosechas principalmente maíz, al ser parte del terreno de la casa, posee una pendiente del 10%.
TCC 2	La Posta	Convencional	Es un terreno en el que se tiene riego por inundación y se cultiva varios productos con fines de consumo y comercializar, actualmente se rota con trigo, después de haber cultivado papa para aprovechar los residuos de los fertilizantes utilizados. Tiene una pendiente del 30%.
TAC 2	Quilloac	Agroecológico	El terreno posee riego por inundación permitiendo que se pueda realizar dos ciclos al año, en rotación con papa. La preparación se inicia con el pastoreo del ganado, el arado y cruza con yunta incorporando los desechos de los animales y gallinaza. Tiene una pendiente de 30%.
TCC 3	Quilloac	Convencional	El terreno tiene una pendiente del 30%, tiene riego con el agua del domicilio, se cultiva varios productos y en rotación para aprovechar la aplicación de fertilizantes, los residuos de cosechas se utilizan para el ganado.

TAC 3	Quilloac	Agroecológico	El terreno se encuentra a la falda de una montaña, tiene una pendiente de 40%, pese a que no posee riego y se aprovecha la temporada de lluvias, se realiza dos siembras al año en rotación cereales (maíz, trigo o cebada) con papa. Se le adiciona materia orgánica a través de la incorporación de abonos de origen animal, mineral y residuos de cosechas.
TCC 4	Quilloac	Convencional	Este terreno no cuenta con riego y se aprovecha la temporada invernal para poder cultivar, además se observa como un terreno pobre por lo que durante el ciclo del cultivo se adiciona fertilizantes químicos para suplir los requerimientos de nutrientes. Tiene una pendiente del 20% y al encontrarse hacia la parte baja de la carretera, cuando se hace el mantenimiento vial, cada vez se le coloca material pétreo.
TAC 4	La Posta	Agroecológico	El terreno se encuentra en una propiedad parcelada con varios cultivos que se rotan cada año en las diferentes parcelas, se aprovechan los residuos de cosechas para incorporar materia orgánica y en ocasiones se le aplica abonos como gallinaza y desechos de la cuyera, posee riego por inundación y la pendiente es del 20%.
TCC 5	La Posta	Convencional	El terreno está junto a la casa del propietario, se cultiva trigo en rotación con maíz y papa. La pendiente es del 20%, se aprovecha el agua del domicilio para regar y poder cultivar varios productos al año. Se incorpora

			fertilizantes químicos y residuos de cosechas al suelo.
TAC 5	La Posta	Agroecológico	Es un terreno que no posee riego, por lo tanto, en invernal y se realiza un solo ciclo de cultivo por año dejando en descanso para pastorear el ganado. No se utiliza fertilizantes, para nutrir el suelo al inicio de la siembra, se incorpora gallinaza. Posee una pendiente del 40%. Todas las actividades se realizan con tracción animal y humana.

TCC: Trigo Convencional Cañar

TAC: Trigo Agroecológico Cañar

4.2. Análisis físico químico de suelo

Los resultados de los análisis físicos – químicos de las muestras de suelo tomadas en los sitios de estudio se encuentran en el Anexo 4 y en la tabla 6, que a continuación detallamos.

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos de varios parámetros, se puede observar que en la mayoría de ellos no se tiene diferencias significativas, por cuanto no se puede afirmar que un tipo de manejo sobresalga del otro. Sin embargo, se puede apreciar que el contenido de MO en los lotes de producción agroecológica del cantón Nabón, tienen un valor de $p = 0,049$, con lo que se puede manifestar que en este caso en particular el contenido de MO, si posee una diferencia significativa con el manejo convencional.

Estos resultados se pueden verificar en el cuadro siguiente:



Tabla 6. Resultados de análisis físico – químico de las muestras de suelo tomadas en los sitios de estudio de los cantones Nabón y Cañar.

NABÓN		CONVENCIONAL							
		TCN 1	TCN 2	TCN 3	TCN 4	TCN 5	MEDIA	±SE	p ≤,05
TEXTURA	pH	7	7	6	5,96	5,66	6,26	0,27	pH 0,774
	Da	0,94	1,06	1,06	1,41	1,01	1,10	0,08	Da 0,613
	CE	0,15	0,1	0,05	0,14	0,05	0,10	0,02	CE 0,718
	%MO	3	2,7	3,5	3	3,71	3,18	0,18	MO 0,049
	Franco-Arcillo-Arenoso	Arcilloso	Arcilloso	Franco - Arenoso	Franco-Arcillo-Arenoso				J' 0,718
AGROECOLÓGICO									
		TAN 1	TAN 2	TAN 3	TAN 4	TAN 5	MEDIA	±SE	
TEXTURA	pH	6	6	6,42	6,10	5,98	6,17	0,11	
	Da	1,12	1,21	1,12	1,13	1,14	1,14	0,02	
	CE	0,03	0,08	0,10	0,05	0,15	0,08	0,02	
	%MO	3,9	5,1	4,5	4,15	3,69	4,27	0,25	
	Franco-Arcilloso	Franco-Arcilloso	Franco-Arcillo-Arenoso	Franco - Arenoso	Franco-Arcillo-Arenoso				
CAÑAR									
		CONVENCIONAL					MEDIA	±SE	p ≤,05
		TCC 1	TCC 2	TCC 3	TCC 4	TCC 5	MEDIA	±SE	pH 0,495
TEXTURA	pH	5,55	6,69	6,51	7,68	8,16	6,92	0,46	
	Da	1,22	1,09	1,21	1,14	1,19	1,17	0,02	Da 0,165
	CE	0,16	0,09	0,16	0,06	0,13	0,12	0,02	CE 0,307
	%MO	2,73	3	3,5	3,6	1,06	2,78	0,46	MO 0,825
	Franco-Arcillo-Arenoso	Arenoso - Franco	Franco-Arcillo-Arenoso	Franco-Arcillo-Arenoso	Franco				J' 0,718
AGROECOLÓGICO									
		TAC 1	TAC 2	TAC 3	TAC 4	TAC 5	MEDIA	±SE	
TEXTURA	pH	7,68	6,08	5,76	8,45	8,58	7,31	0,59	
	Da	1,20	1,18	1,27	1,23	1,17	1,21	0,02	
	CE	0,14	0,05	0,06	0,11	0,10	0,09	0,02	
	%MO	4,99	3,9	4,6	0,81	0,61	2,98	0,94	
	Franco-Arcillo-Arenoso	Franco-Arcillo-Arenoso	Franco - Arenoso	Franco-Arcillo-Arenoso	Franco - arcillo - arenoso				

4.3. Extracción ADN

La extracción del ADN metagenómico de las muestras colectadas en los sitios de estudio fue exitosa, esto se puede corroborar en las siguientes imágenes donde se puede apreciar una sola banda a una altura aproximada de 12.000 pb.

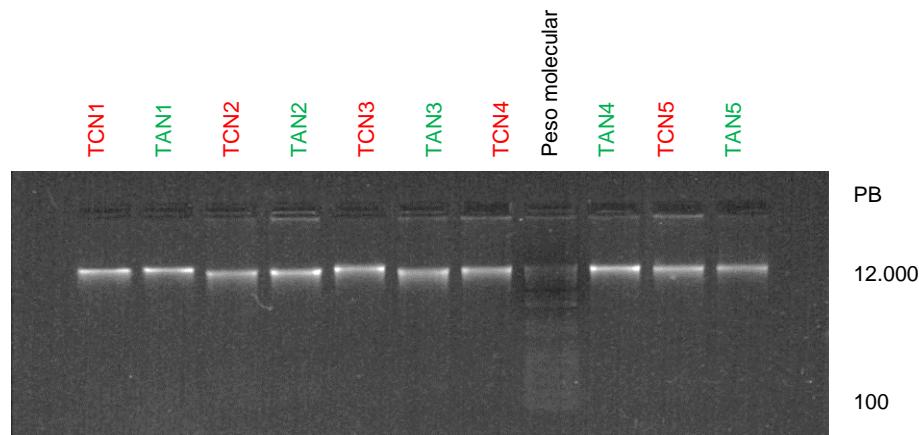


Figura 4. ADN metagenómico extraído de las muestras colectadas en las comunidades Chunasana y Taro en el cantón Nabón.

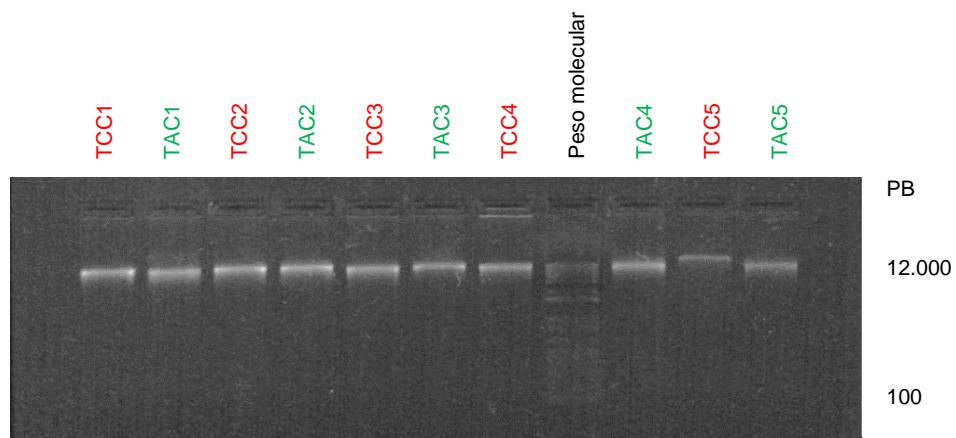


Figura 5. ADN metagenómico extraído de las muestras colectadas en las comunidades La Posta y Quilloac en el cantón Cañar.

4.4. Amplificación ADN

En la amplificación del ADN metagenómico del gen 16S ADNr y de la región ITS ADNr, realizado por PCR, se obtuvo resultados positivos para la continuación del

estudio; esto se puede determinar al observar la presencia de bandas bien definidas tanto para el gen 16S, como para la región ITS en las figuras 6 y 7.

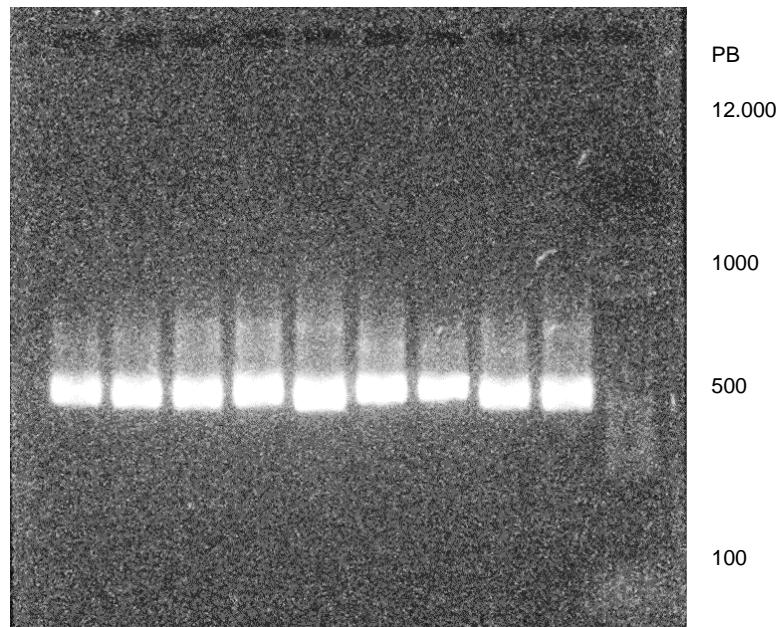


Figura 6. Amplificación de ADN metagenómico 16S

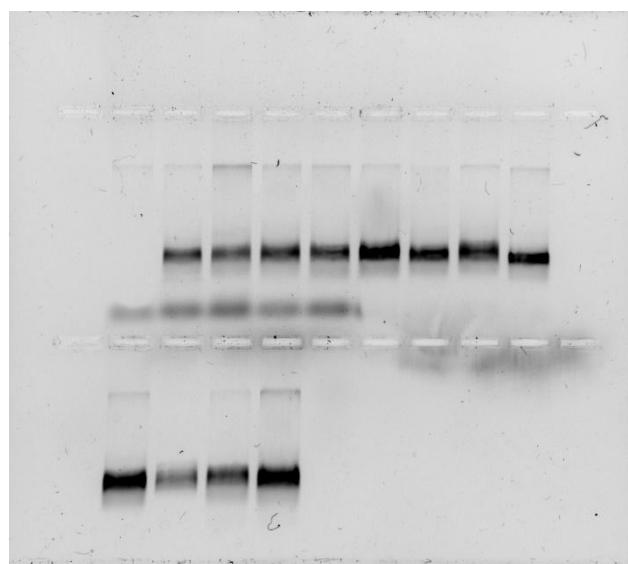


Figura 7. Amplificación de ADN metagenómico ITS

4.5. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante DGGE

Los perfiles en gel obtenidos con gradiente desnaturizante se muestran a continuación:

- DGGE Nabón 16S

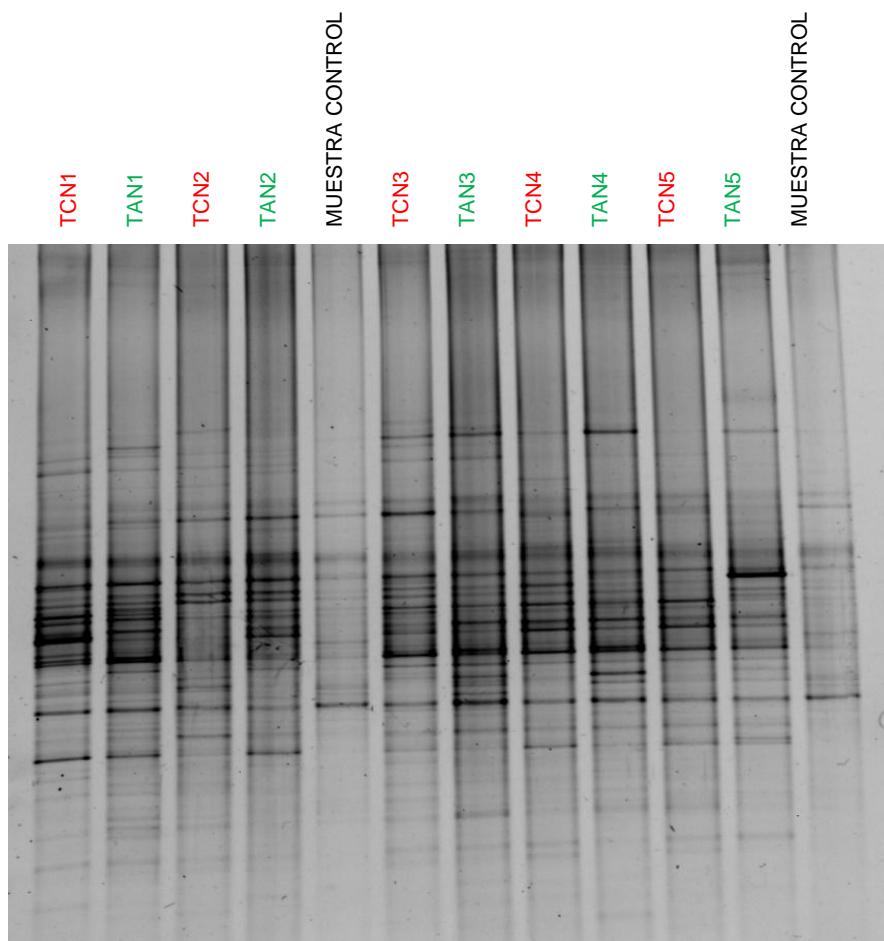


Figura 8. Perfil de diversidad del gen 16S del cantón Nabón

- DGGE Nabón ITS

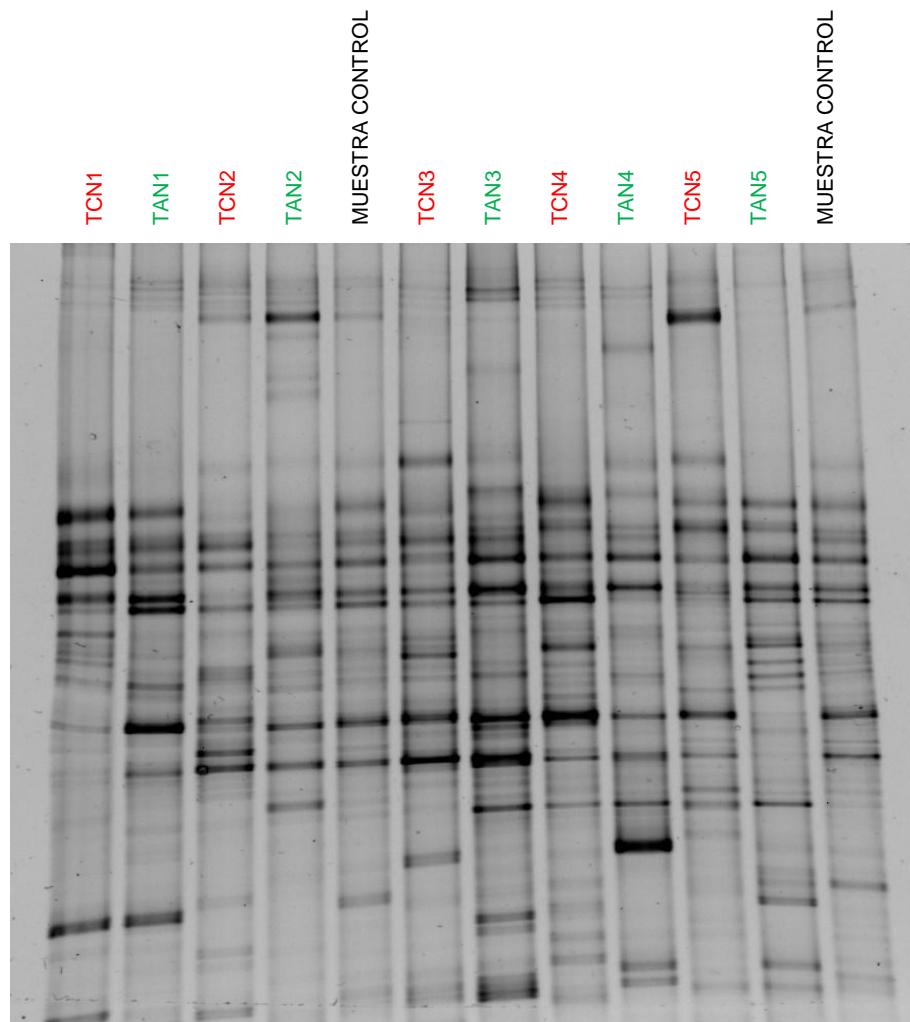


Figura 9. Perfil de diversidad de la región ITS del cantón Nabón

- DGGE Cañar 16S

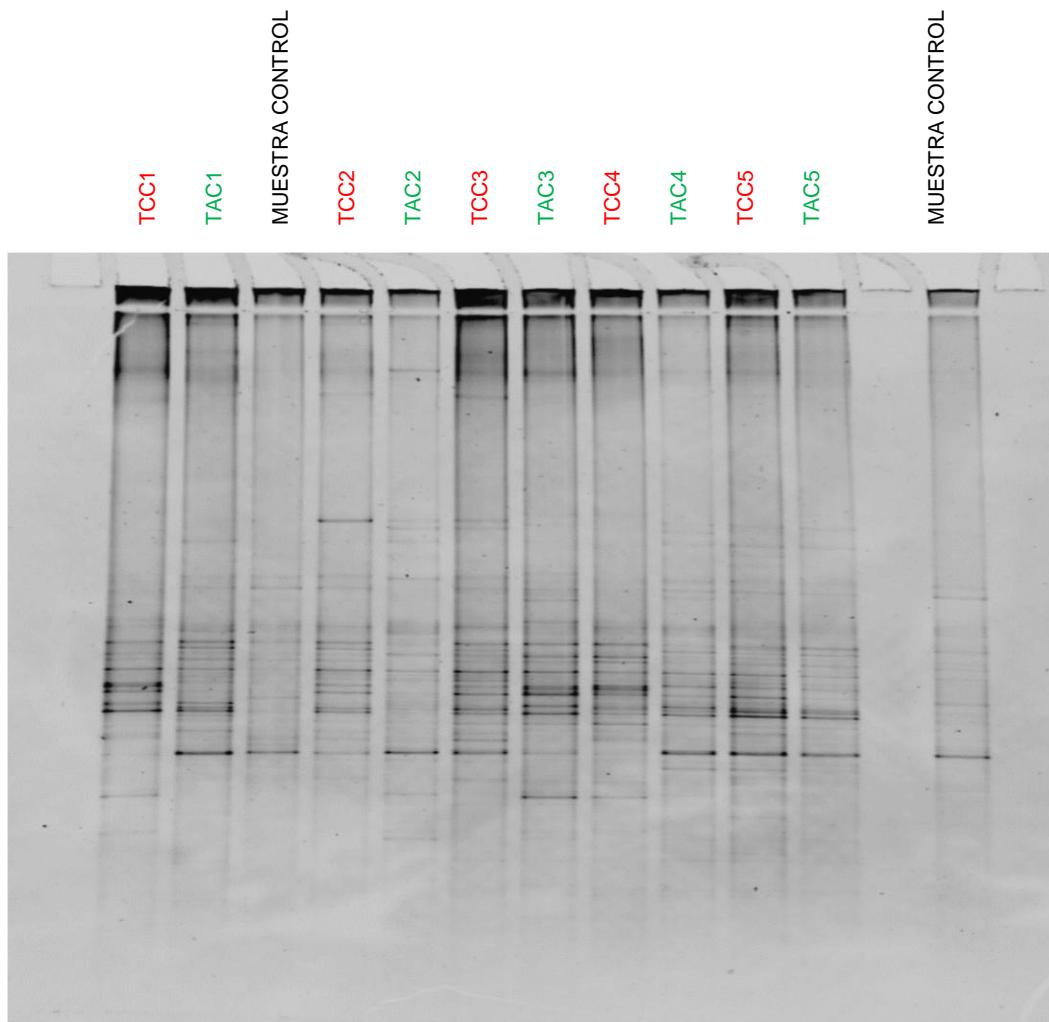


Figura 10. Perfil de diversidad del gen 16S del cantón Cañar

- DGGE Cañar ITS

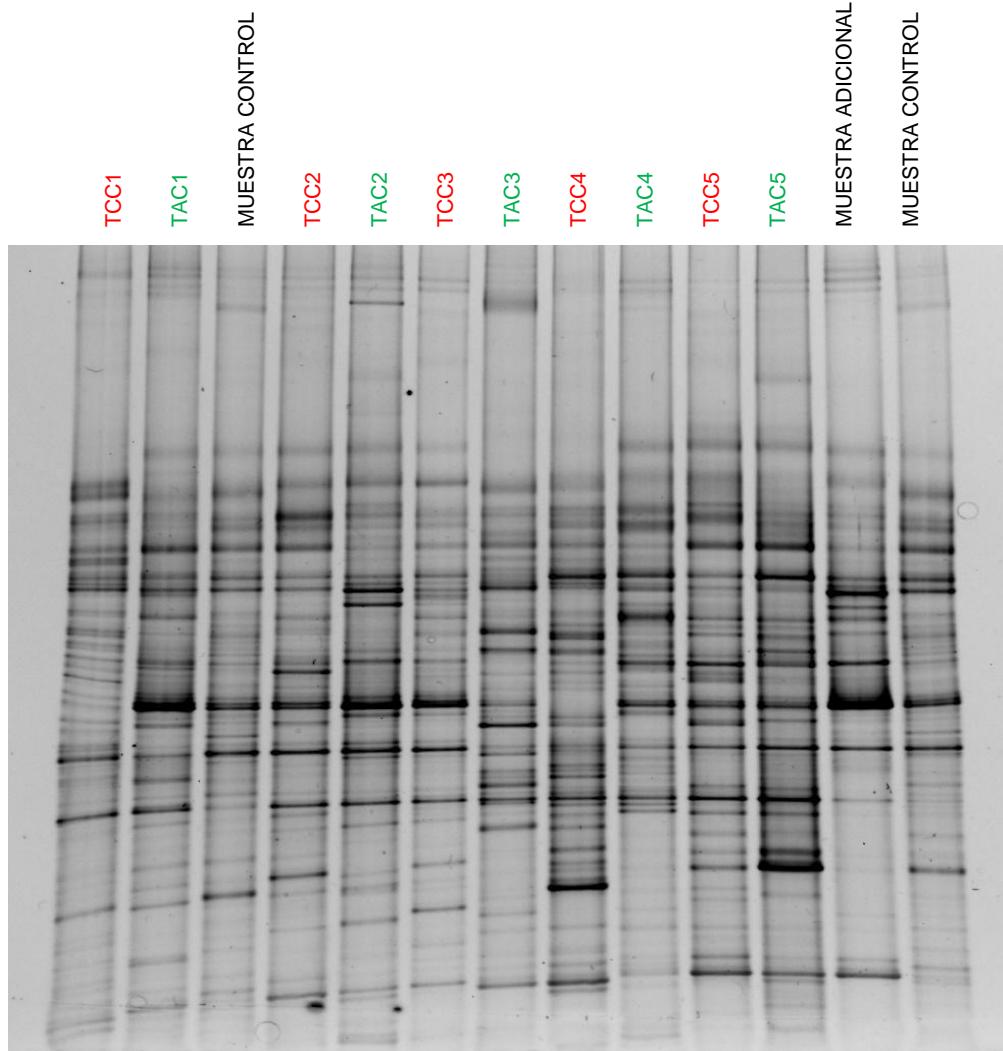


Figura 11. Perfil de diversidad de la región ITS del cantón Cañar.

4.6. Determinación de índices de diversidad

Luego de realizar la identificación de bandas presentes en los perfiles DGGE obtenidos para cada muestra usando el software Image Lab y PyElph 1.3, se procedió a determinar la Riqueza (S), índice de Shannon (H) e índice de equitabilidad de Shannon (E_H), permitiendo establecer en la Tabla 7, las variables necesarias para determinar si existen diferencias significativas en cuanto a los dos sistemas de manejo contrastantes (convencional y agroecológico) en cada sitio de estudio.

Tabla 7. Riqueza (S), índice de Shannon (H) e índice de equitabilidad de Shannon (E_H), a partir de perfiles de DGGE en suelos de cultivos de trigo del cantón Nabón.

16S Hongos								
CONVENCIONAL	TCN1	TCN2	TCN3	TCN4	TCN5	MEDIA	$\pm SE$	
AGROECOLÓGICO	S	31	28	35	28	27	29,80	1,45
	H'	1,33	1,26	1,42	1,33	1,30	1,33	0,03
	J'	0,89	0,87	0,92	0,92	0,91	0,90	0,01
AGROECOLÓGICO	TAN1	TAN2	TAN3	TAN4	TAN5	MEDIA	$\pm SE$	
CONVENCIONAL	S	35	32	31	33	24	31,00	1,86
	H'	1,40	1,33	1,37	1,34	1,20	1,33	0,03
	J'	0,91	0,88	0,92	0,89	0,87	0,89	0,01
ITS Bacterias								
CONVENCIONAL	TCN1	TCN2	TCN3	TCN4	TCN5	MEDIA	$\pm SE$	
AGROECOLÓGICO	S	18	21	21	24	19	20,60	1,02
	H'	1,02	1,19	1,17	1,10	1,14	1,13	0,03
	J'	0,81	0,90	0,89	0,80	0,89	0,86	0,02
AGROECOLÓGICO	TAN1	TAN2	TAN3	TAN4	TAN5	MEDIA	$\pm SE$	
CONVENCIONAL	S	17	18	28	18	25	21,20	2,21
	H'	1,00	1,12	1,22	1,06	1,26	1,13	0,05
	J'	0,82	0,89	0,84	0,84	0,90	0,86	0,02

Los índices de diversidad y riqueza de hongos identificado a través del gen 16S y de bacterias a través de la región ITS, nos permite determinar que en el cantón Nabón: a) El manejo agroecológico tiene una riqueza media de hongos de $S = 31$ ($SE \pm = 1,86$), mayor a la riqueza media del manejo convencional $S = 29,80$ ($SE \pm = 1,45$), sin embargo esta no es significativamente diferente $p = 0,569$. Y b) La riqueza media de bacterias en el manejo agroecológico $S = 21,20$ ($SE \pm = 2,21$), es mayor a la del

manejo convencional $S = 20,6$ ($SE \pm = 1,02$), pero al igual los hongos, esta riqueza no es significativamente diferente $p = 0,825$.

Tabla 8. Riqueza (S), índice de Shannon (H) e índice de equitabilidad de Shannon (E_H), a partir de perfiles de DGGE en suelos de cultivos de trigo del cantón Cañar.

16S								
CONVENCIONAL	TCC1	TCC2	TCC3	TCC4	TCC5	MEDIA	$\pm SE$	P ≤ 0,05
AGROECOLÓGICO	S 21 H' 1,17 J' 0,88	24	26	25	33	25,80	1,97	S 0,352 H' 0,621 J' 0,114
	H' 1,17 J' 0,88	1,28	1,32	1,30	1,38	1,29	0,03	
	J' 0,88	0,93	0,94	0,93	0,91	0,92	0,01	
ITS								
CONVENCIONAL	TCC1	TCC2	TCC3	TCC4	TCC5	MEDIA	$\pm SE$	P ≤ 0,05
AGROECOLÓGICO	S 34 H' 1,32 J' 0,86	29	33	28	24	29,60	1,79	S 0,926 H' 0,393 J' 0,174
	H' 1,32 J' 0,86	1,38	1,35	1,31	1,23	1,32	0,02	
	J' 0,86	0,94	0,89	0,91	0,89	0,90	0,01	

En los resultados de la tabla arriba descrita, se puede observar que los índices de diversidad y riqueza de hongos identificado a través del gen 16S y de bacterias a través de la región ITS, determinan que en el cantón Nabón: a) El manejo agroecológico tiene una riqueza media de hongos de $S = 29,60$ ($SE \pm = 1,79$), mayor a la riqueza media del manejo convencional $S = 25,80$ ($SE \pm = 1,97$), sin embargo esta no es significativamente diferente $p = 0,352$. Y b) La riqueza media de bacterias en el manejo agroecológico $S = 30,20$ ($SE \pm = 1,38$), es menor a la del manejo convencional $S = 30,40$ ($SE \pm = 1,46$), pero al igual que los hongos, esta riqueza no es significativamente diferente $p = 0,926$.

Con los datos obtenidos de índices de diversidad para cada tipo de manejo en cada zona de estudio, además se realizó una comparación entre los dos tipos de manejo, obteniendo los resultados que se presenta a continuación:

Tabla 9. Comparación de los índices de diversidad obtenidos de los sistemas de producción en los cantones Nabón y Cañar, del gen 16S.

16S	ZONAS DE ESTUDIO	TIPO DE MANEJO						$p \leq 0,05$	
		CONVENCIONAL			AGROECOLOGICO				
		S	H	SH	S	H	SH		
NABON	NABON	31	1,331	0,89	35	1,402	0,91	$S = 0,238$ $H' = 0,649$ $J' = 0,066$	
		28	1,262	0,87	32	1,326	0,88		
		35	1,421	0,92	31	1,366	0,92		
		28	1,326	0,92	33	1,344	0,89		
		27	1,301	0,91	24	1,203	0,87		
CAÑAR	CAÑAR	21	1,169	0,88	34	1,322	0,86	$S = 0,238$ $H' = 0,649$ $J' = 0,066$	
		24	1,282	0,93	29	1,375	0,94		
		26	1,323	0,94	33	1,348	0,89		
		25	1,295	0,93	28	1,313	0,91		
		33	1,379	0,91	24	1,228	0,89		

Al comparar la diversidad y riqueza del contenido de hongos entre los dos sistemas de manejo en las dos zonas de estudio, podemos concluir que el valor de $p = 0,238$, nos determina que no existen diferencias significativas.

Tabla 10. Comparación de los índices de diversidad obtenidos de los sistemas de producción en los cantones Nabón y Cañar, de la región ITS.

ITS	ZONAS DE ESTUDIO	TIPO DE MANEJO						$p \leq 0,05$	
		CONVENCIONAL			AGROECOLOGICO				
		S	H	SH	S	H	SH		
NABON	NABON	18	1,021	0,81	17	1,003	0,82	$S = 0,840$ $H' = 0,213$ $J' = 0,304$	
		21	1,192	0,90	18	1,123	0,89		
		21	1,175	0,89	28	1,219	0,84		
		24	1,101	0,80	18	1,059	0,84		
		19	1,142	0,89	25	1,260	0,90		
CAÑAR	CAÑAR	31	1,457	0,92	26	1,276	0,90	$S = 0,840$ $H' = 0,213$ $J' = 0,304$	
		31	1,352	0,92	29	1,331	0,91		
		26	1,325	0,90	29	1,326	0,91		
		35	1,485	0,93	31	1,316	0,88		
		29	1,391	0,94	31	1,351	0,91		

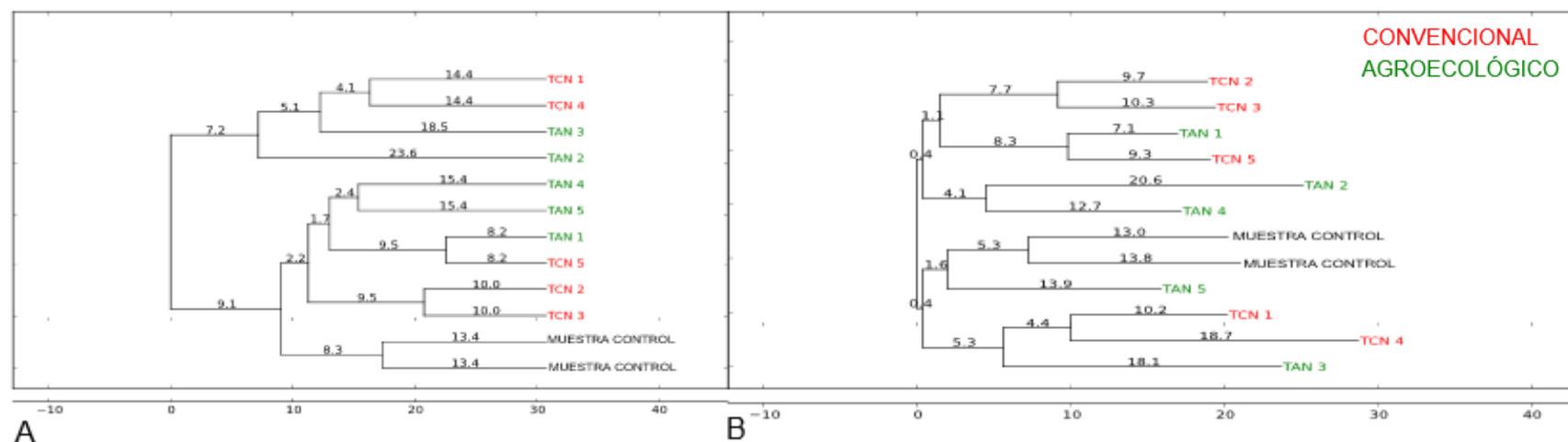
De la misma forma que se hizo para hongos, hacemos para bacterias una comparación en cuanto a la riqueza y diversidad y podemos ver que el valor de $p = 0,840$, nos determina que significativamente los sistemas de manejo no son diferentes.



4.7. Dendogramas de agrupación

La elaboración de los dendogramas con los algoritmos de agrupamiento COMPLETE LINKAGE, NEIGHBOUR JOINING, SINGLE LINKAGE, UPGMA, WPGMA, nos permite observar el agrupamiento que se puede tener de las muestras pareadas para cada zona de estudio.

4.7.1. Nabón 16S



A= Complete Linkage

B = Neighbour Joining

Figura 12. Dendogramas A y B, de agrupamiento del gen 16S para el cantón Nabón.

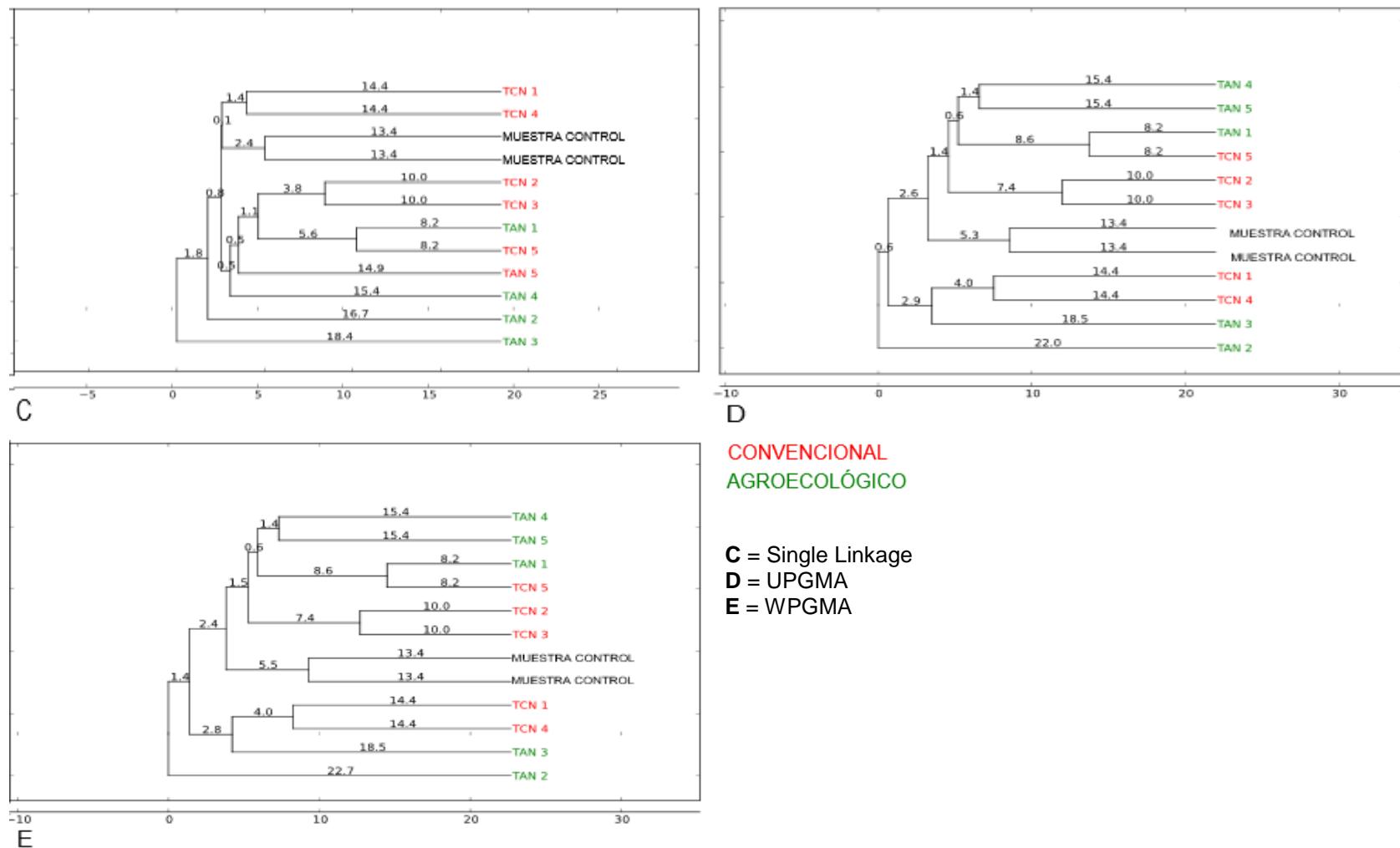


Figura 13. Dendogramas C, D y E, de agrupamiento del gen 16S para el cantón Nabón.



En los dendogramas elaborados con los cinco algoritmos, podemos observar que no existe un agrupamiento definido específico para suelos bajo manejo agroecológico y tampoco para suelos con manejo convencional. Sin embargo se puede ver que algunas muestras si tienden a juntarse.

4.7.2. Nabón ITS

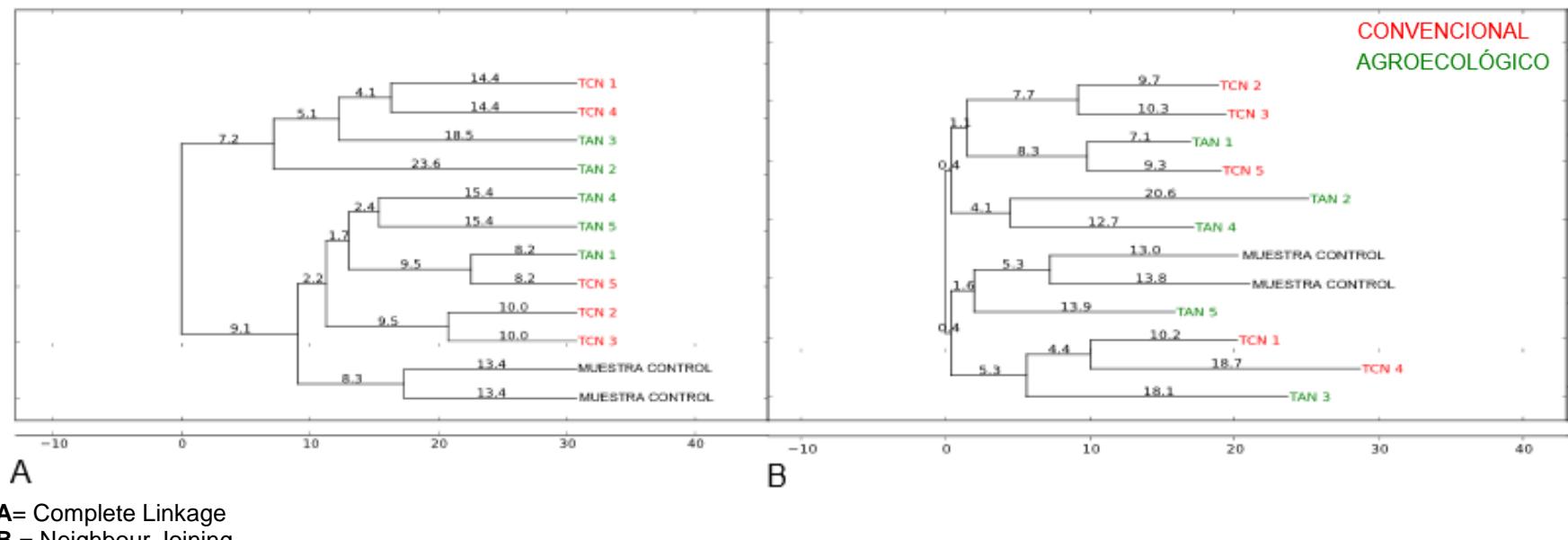


Figura 14. Dendogramas A y B, de agrupamiento de la región ITS para el cantón Nabón.

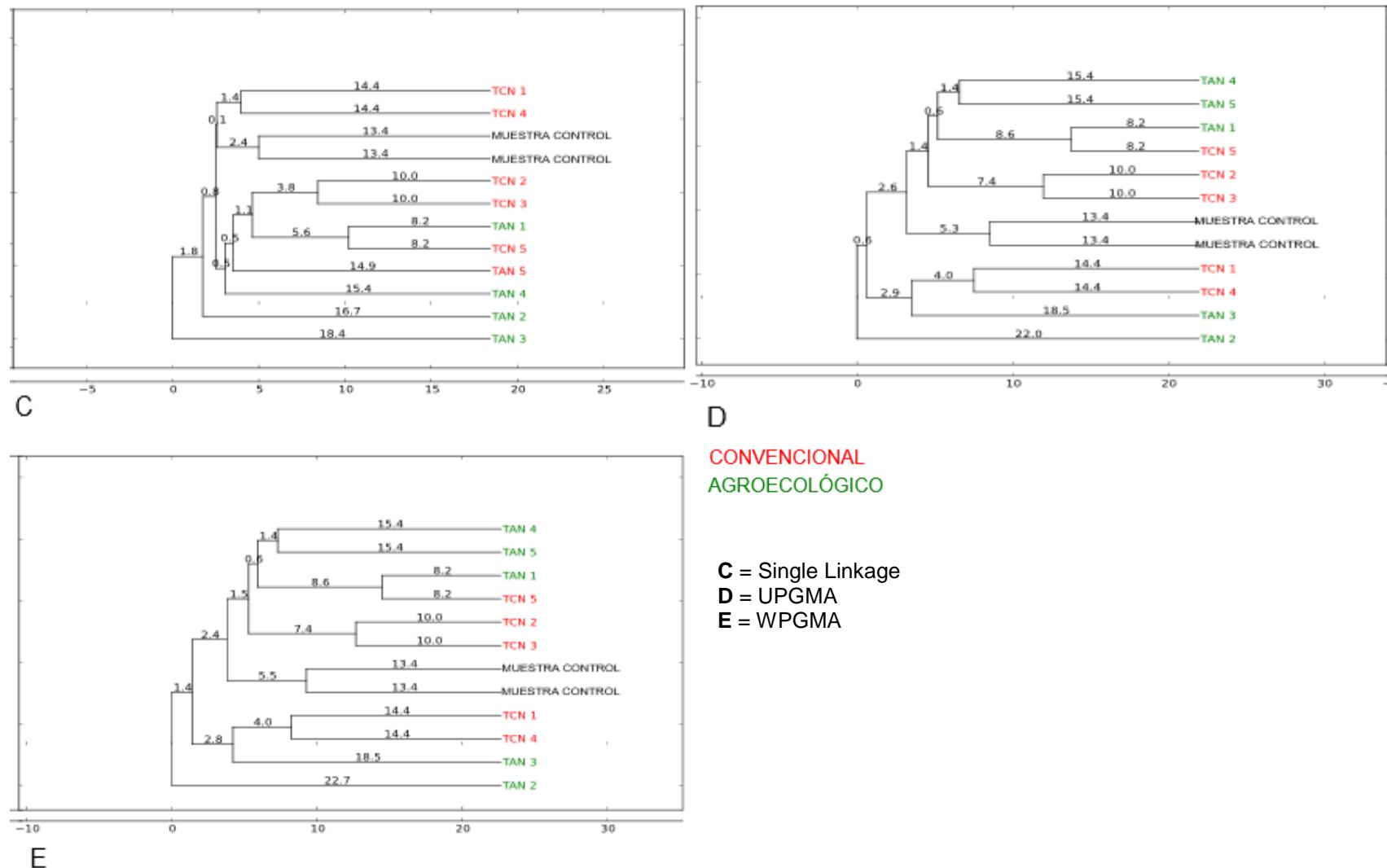
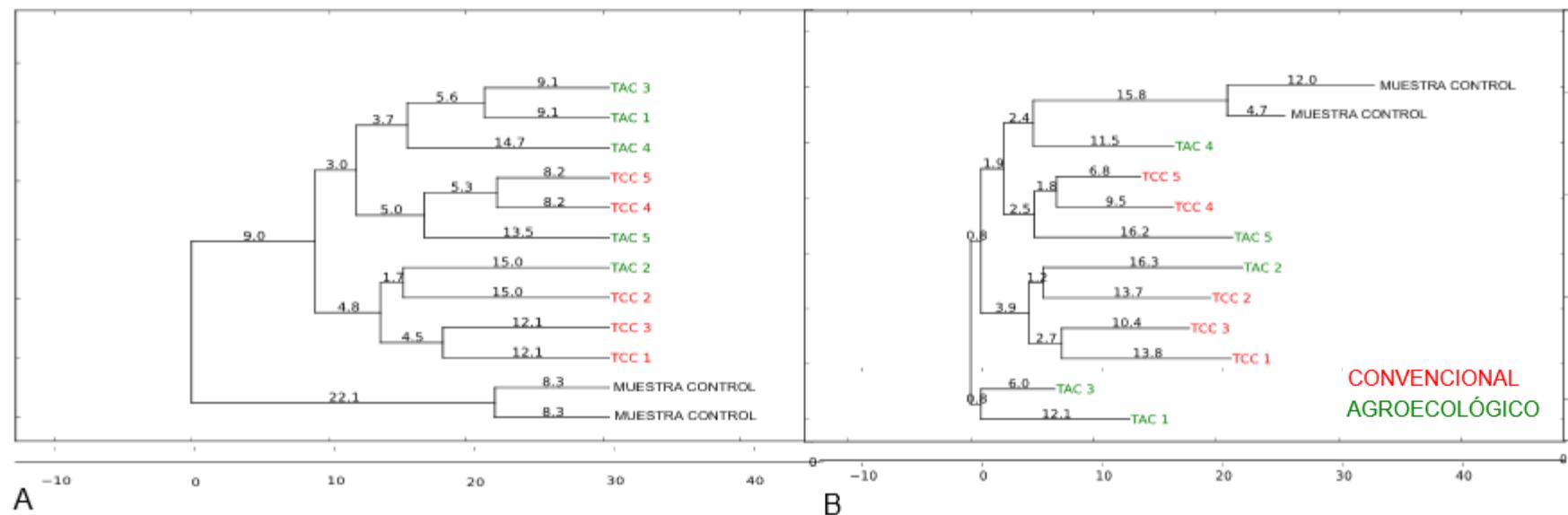


Figura 15. Dendogramas C, D y E, de agrupamiento de la región ITS para el cantón Nabón.



Al igual que en los dendogramas del gen 16S, en este caso tambien se puede ver que ciertas muestras tienden a juntarse, sin considerar que, el tipo de manejo del que provienen es distinto.

4.7.3. Cañar 16S



A= Complete Linkage

B = Neighbour Joining

Figura 16. Dendogramas A y B, de agrupamiento del gen 16S para el cantón Cañar.

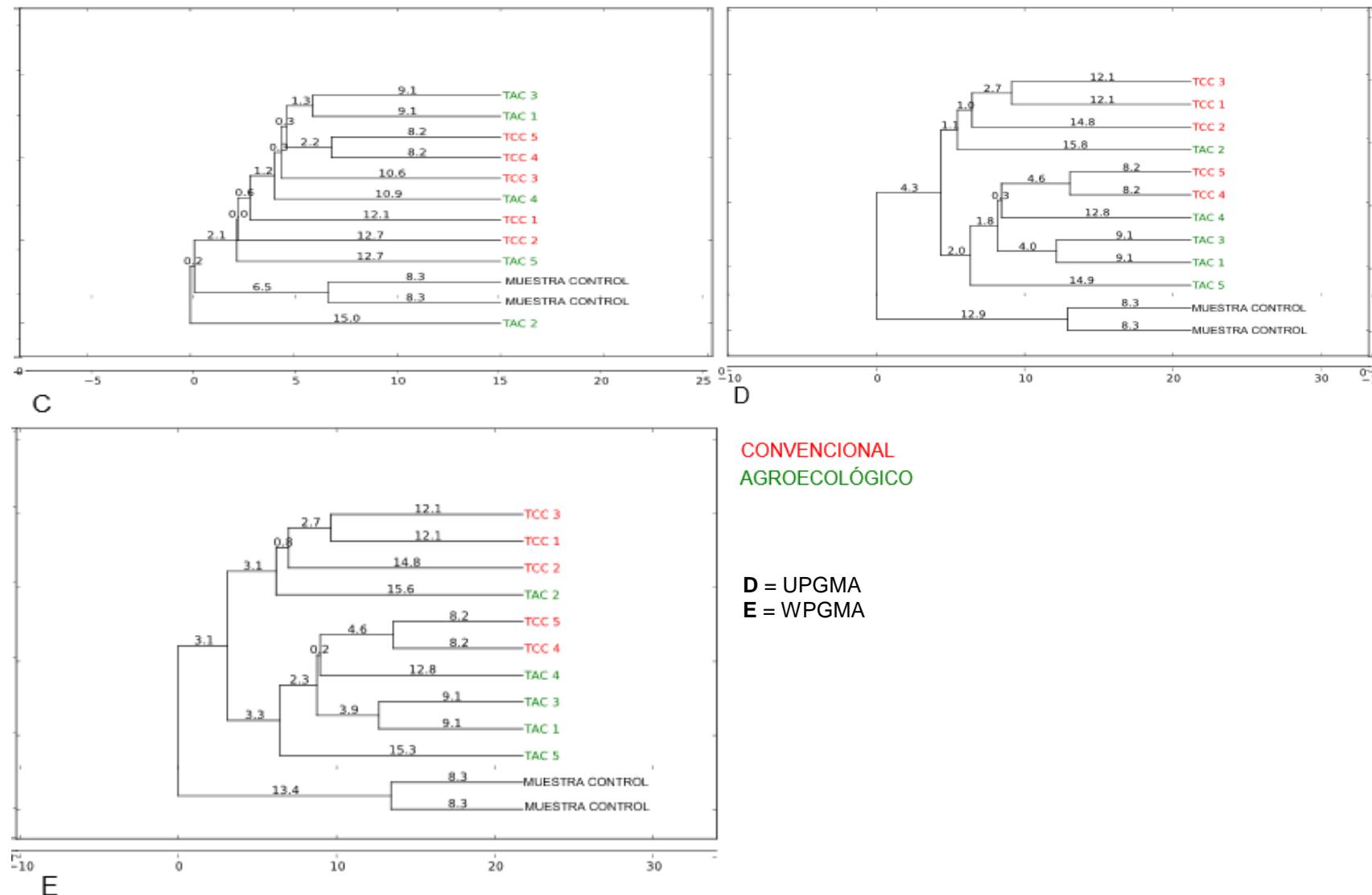


Figura 17. Dendogramas C, D y E, de agrupamiento del gen 16S para el cantón Cañar.



4.7.4. Cañar ITS

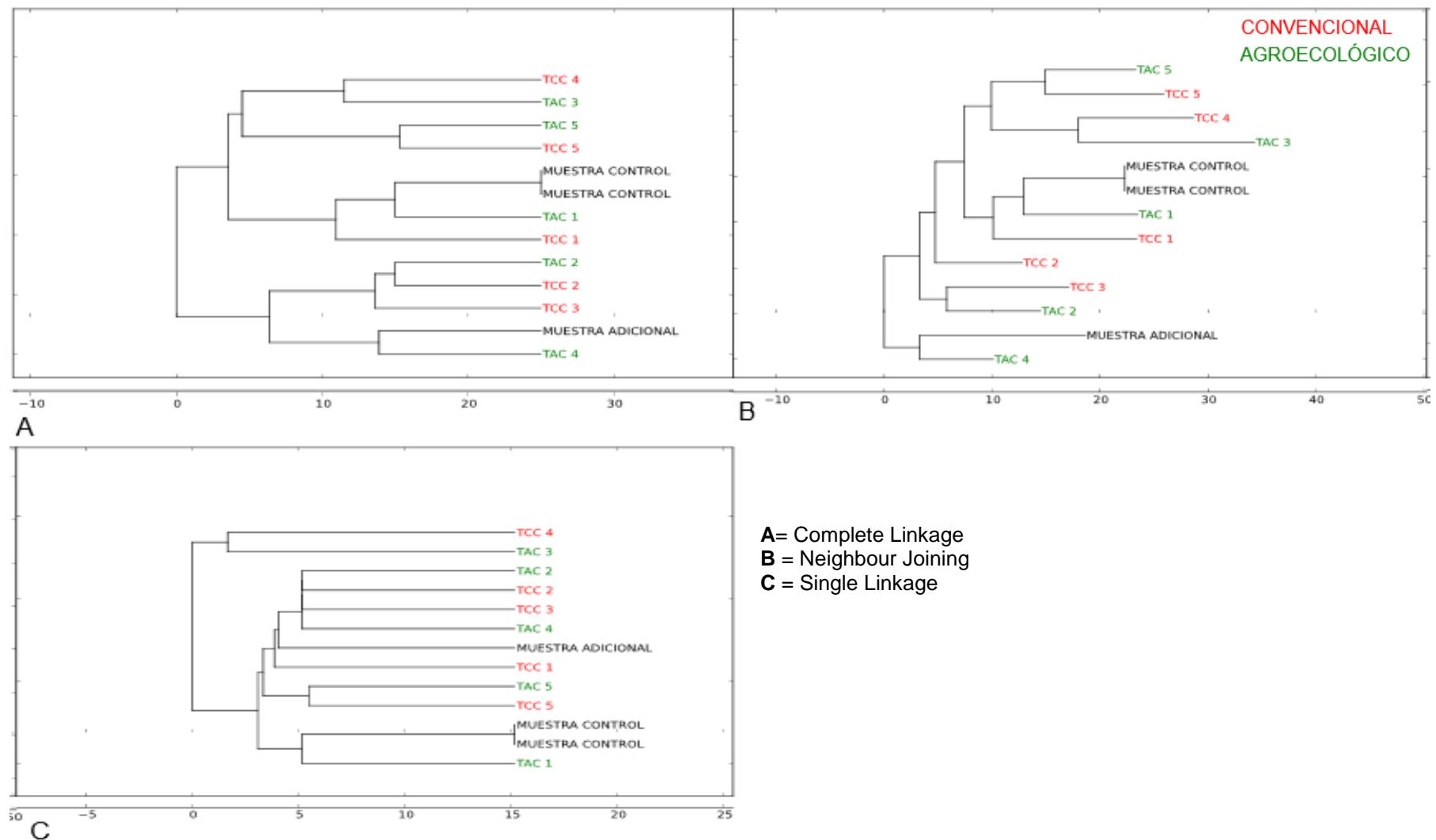
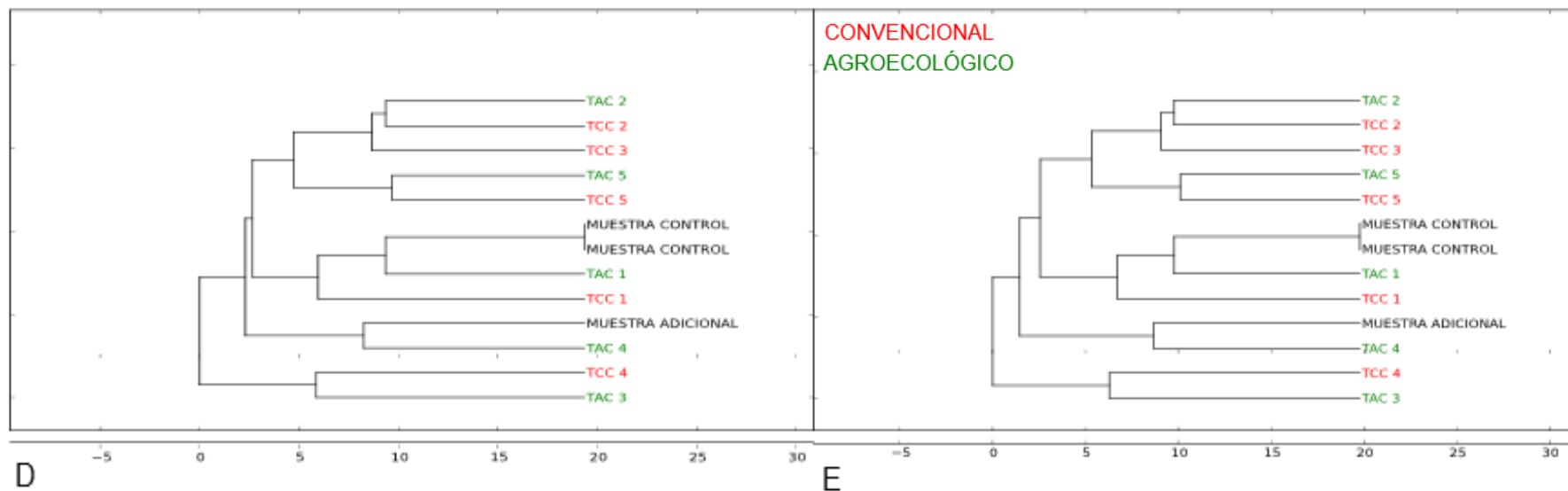


Figura 18. Dendogramas A, B y C, de agrupamiento de la región ITS para el cantón Cañar.



D = UPGMA

E = WPGMA

Figura 19. Dendogramas D y E, de agrupamiento de la región ITS para el cantón Cañar.



De cada algoritmo se obtiene la relación y el orden de ubicación de las muestras en el dendograma, esto se genera en un código que posteriormente con el uso del software PhyElph realizamos un árbol consenso que nos agrupa las muestras que más se relacionan en cada algoritmo. Para la elaboración del árbol consenso se utilizó la siguiente clasificación logarítmica:

Tabla 11. Claves de los algoritmos de las muestras agroecológicas y convencionales de los cantones Nabón y Cañar.

SITIOS	ALGORITMO	CLAVE
NABON 16S	Complete Linkage Neighbour Joining Single Linkage UPGMA WPGMA	((((TCN1, TCN4), TAN3), TAN2), ((TAN4, TAN5), (TAN1, TCN5), (TCN2, TCN3), (MC, MC))) ((((TCN2, TCN3), (TAN1, TCN5)), (TAN2, TAN4)), (((MC, MC), TNA5), ((TCN1, TCN4), TAN3))) ((((TCN1, TCN4), (MC, MC)), (((TCN2, TCN3), (TAN1, TCN5)), TAN5), TAN4)), TAN2), TAN3) ((((((TAN4, TAN5), (TAN1, TCN5)), (TCN2, TCN3)), (MC, MC)), ((TCN1, TCN4), TAN3)), TAN2) ((((((TAN4, TAN5), (TAN1, TCN5)), (TCN2, TCN3)), (MC, MC)), ((TCN1, TCN4), TAN3)), TAN2)
CAÑAR 16S	Complete Linkage Neighbour Joining Single Linkage UPGMA WPGMA	((((((TAC3, TAC1), TAC4), ((TCC5, TCC4), TAC5)), ((TAC2, TCC2), (TCC3, TCC1))), (MC, MC)) ((((MC, MC), TAC4), ((TCC5, TCC4), TAC5)), ((TAC2, TCC2), (TCC3, TCC1))), (TAC3, TAC1)) ((((((TAC3, TAC1), (TCC5, TCC4)), TCC3), TCC4), TCC1), TCC2), TAC5), (MC, MC)), TAC2) ((((TCC3, TCC1), TCC2), TAC2), (((TCC5, TCC4), TAC4), (TAC3, TAC1)), TAC5)), (MC, MC)) ((((TCC3, TCC1), TCC2), TAC2), (((TCC5, TCC4), TAC4), (TAC3, TAC1)), TAC5)), (MC, MC))
NABON ITS	Complete Linkage Neighbour Joining Single Linkage UPGMA WPGMA	((((TAN5, TAN3), TCN2), (TAN4, TCN3)), (((TCN4, TCN1), (((MC, MC), TAN2), TAN1)), TCN5)) ((((TAN4, TCN3), ((TAN5, TAN3), TCN2)), (MC, MC)), (TCN5, TCN1)), ((TCN4, TAN1), TAN2)) (((((((MC, MC), TAN2), TAN4), TAN1), TCN4), TCN1), TCN2), TCN3), (TAN5, TAN3)), TCN5) (((((((MC, MC), TAN2), TAN1), TAN4), TCN4), TCN1), TCN5), ((TAN5, TAN3), TCN2)), TCN3) ((((TAN5, TAN3), TCN2), TCN3), (((TAN4, TCN1), (((MC, MC), TAN2), TAN1), TCN4)), TCN5))
CAÑAR ITS	Complete Linkage Neighbour Joining Single Linkage UPGMA WPGMA	((((TCC4, TAC3), (TAC5, TCC5)), (((MC, MC), TAC1), TCC1)), ((TAC2, TCC2), TCC3), (MA, TAC4))) ((((((TAC5, TCC5), (TCC4, TAC3)), (((MC, MC), TAC1), TCC1)), TCC2), (TCC3, TAC2)), (MA, TAC4)) ((TCC4, TAC3), (((((TAC2, TCC2), TCC3), TAC4), MA), TCC1), (TAC5, TCC5)), ((MC, MC), TAC1))) ((((((TAC2, TCC2), TCC3), (TAC5, TCC5)), (((MC, MC), TAC1), TCC1)), (MA, TAC4)), (TCC4, TAC3)) ((((((TAC2, TCC2), TCC3), (TAC5, TCC5)), (((MC, MC), TAC1), TCC1)), (MA, TAC4)), (TCC4, TAC3)))



4.7.5. Árbol consenso Nabón 16S

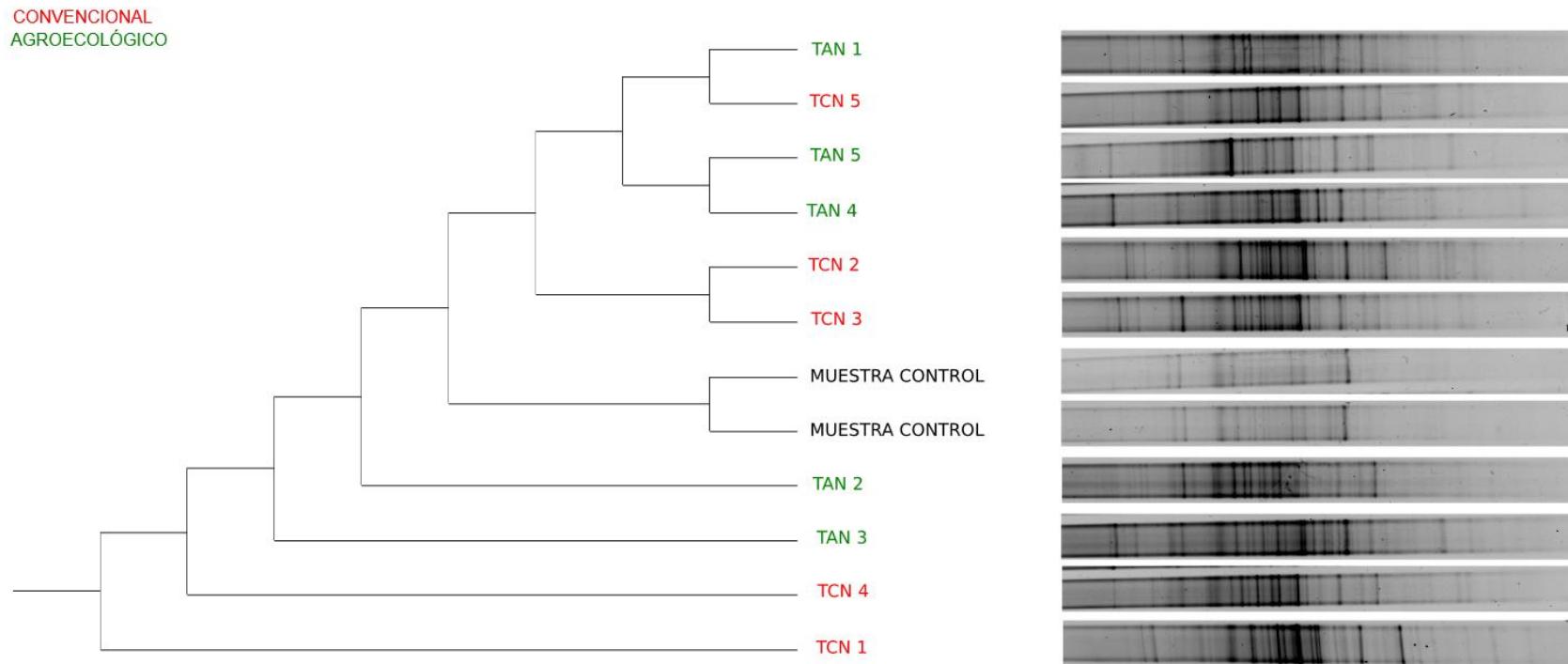


Figura 20. Árbol consenso para el gen 16S en el cantón Nabón.



4.7.6. Árbol consenso Nabón ITS

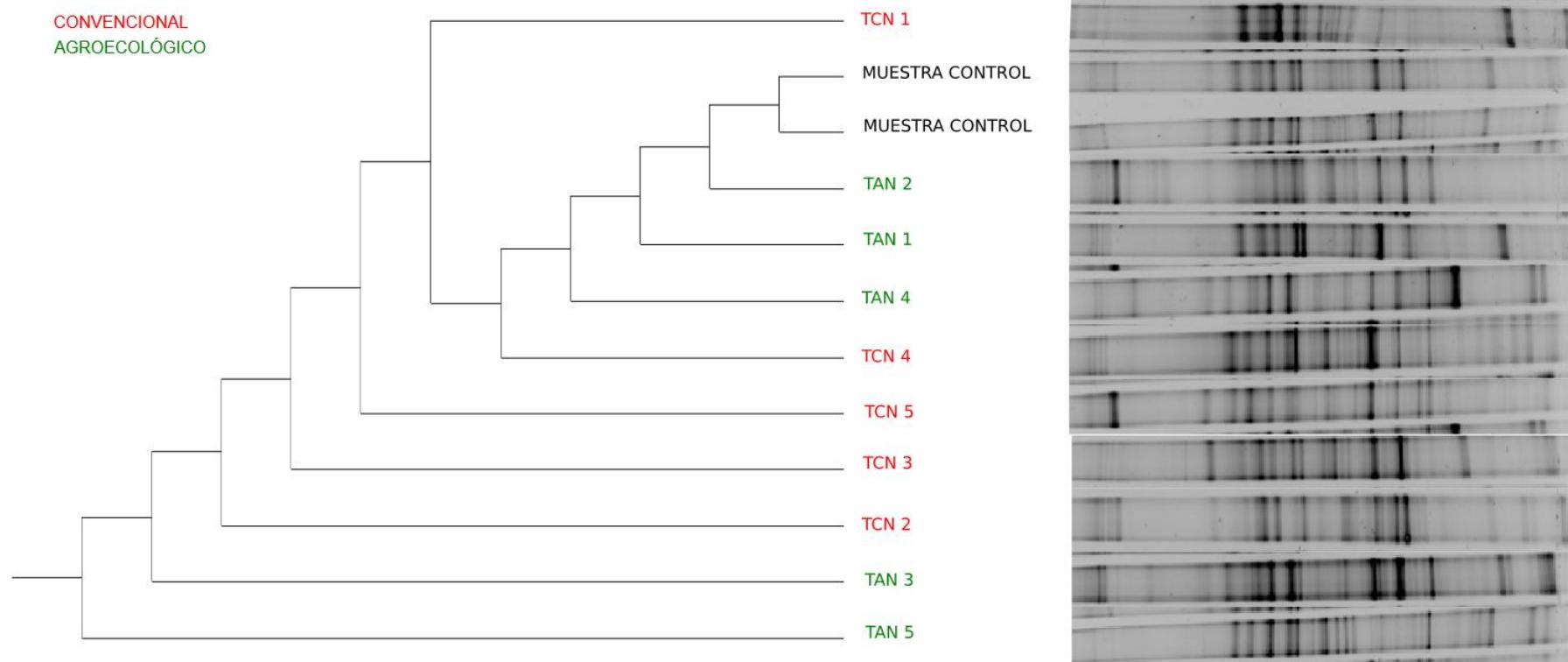


Figura 21. Árbol consenso para la región ITS en el cantón Nabón.



4.7.7. Árbol consenso Cañar 16S

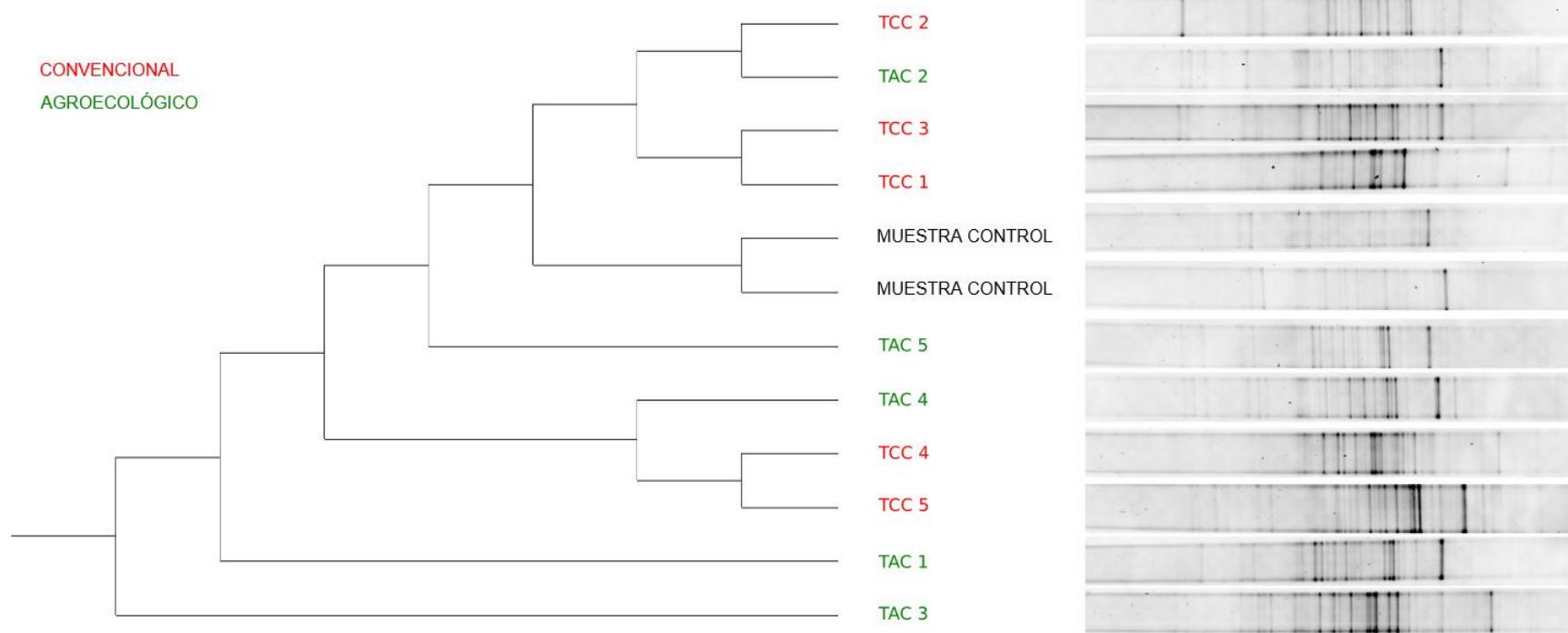


Figura 22. Árbol consenso para el gen 16S en el cantón Cañar.



4.7.8. Árbol consenso Cañar ITS

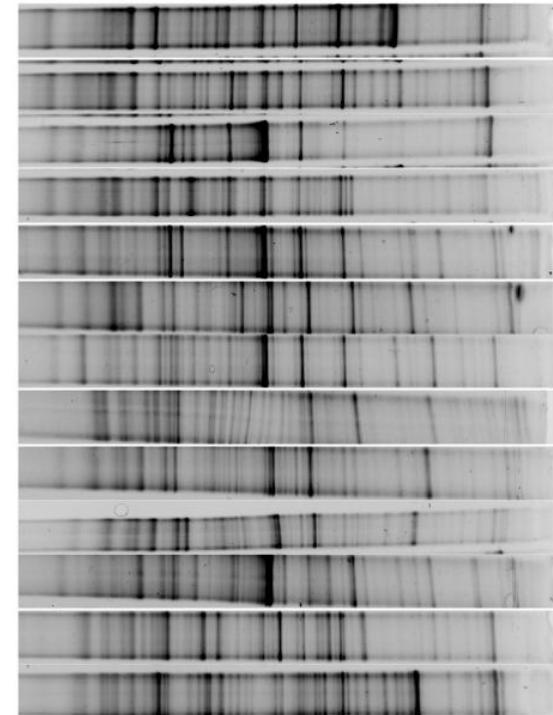
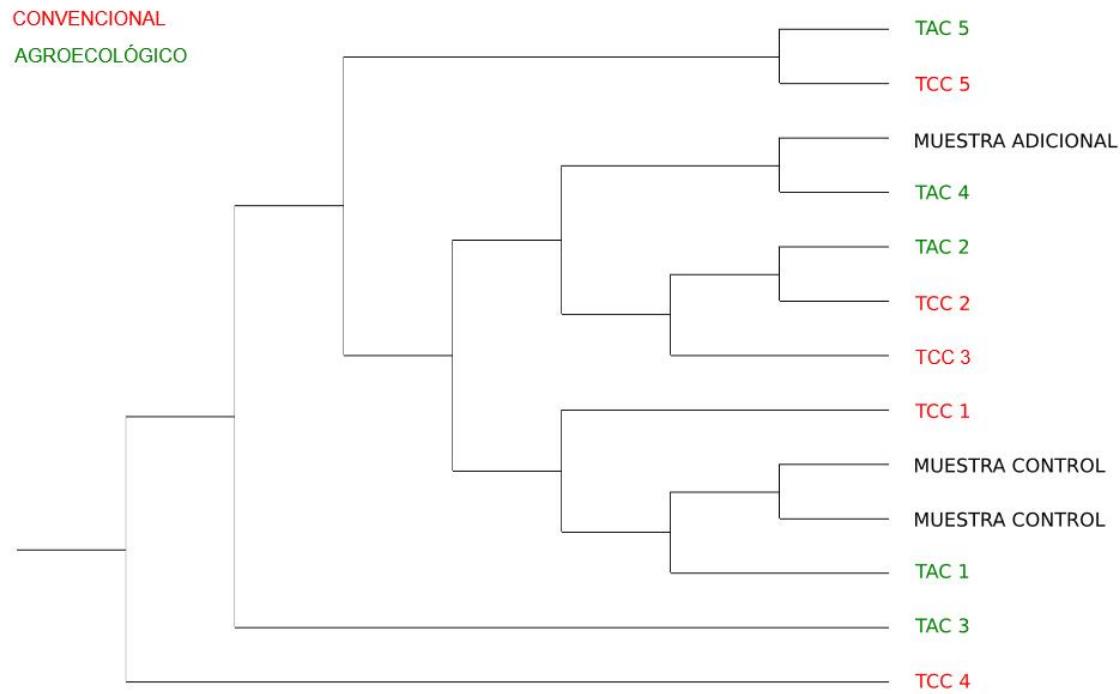


Figura 23. Árbol consenso para la región ITS en el cantón Cañar.

CAPITULO V: DISCUSIÓN

Los análisis realizados con el estudio de diversidad de comunidades permitieron determinar que se tuvo diversidad y riqueza en cuanto a la presencia de microorganismos tanto bacterias como hongos, corroborando la importancia del análisis molecular para el estudio de comunidades de microorganismos hongos y bacterias traídos directamente de una muestra (Jurkowski, *et al.*, 2007), sin que su contenido dependa del manejo realizado, por lo que se logró extraer el ADN de cada muestra.

Debido a la presencia de bandas bien definidas que resaltan en todas las muestras, se puede observar en los árboles consenso que los agrupamientos son poco definidos en cuanto al tipo de manejo, lo que también es manifestado por Llivicura y Pañi (2017).

Los resultados que se obtuvieron del contenido de hongos en el sistema bajo manejo agroecológico no fueron significativamente diferente al contenido de hongos del cultivo manejado convencionalmente, reportado también por Gonzales *et al.*, (2012), esto se determinó por un valor $p = 0,238$; sin embargo, el valor promedio de riqueza fue mayor en el manejo agroecológico. Mientras que en cuanto al contenido de bacterias determinado por la región ITS, al igual que en la riqueza de hongos, el manejo agroecológico no fue significativamente diferente al manejo convencional, aquí el valor de $p = 0,840$ y los valores medios de riqueza fueron similares. Resultados obtenidos realizando el análisis metagenómico de suelo, de los sitios en estudio manejados bajo dos sistemas contrastantes de producción (agroecológico y convencional), estos resultados también manifiestan Llivicura y Pañi (2017).

Si bien se logró determinar que existe presencia de microorganismos, no se determinó las características que estos poseen y cuan beneficiosos o no, son para las actividades agropecuarias. Esta presencia se no solo se debe a las características que los suelos y el clima tienen en cada zona, sino también a que cuando los productores tanto agroecológicos como convencionales desarrollan sus prácticas agrícolas, realizan aportes de insumos agropecuarios (fertilizantes químicos, abonos de origen animal, vegetal, residuos de cosechas), hacen que los animales en ocasiones pastoreen comiéndose los residuos de cosechas y utilizan agua que no

tiene un tratamiento especial, lo que puede traer consigo que muchos microorganismos se incorporen al suelo, aumentando más la población existente y también haciendo que muchos disminuyan debido al efecto de los productos, como menciona Saenz (2014) en su estudio en donde determina que la incorporación de nitrógeno afecta en la riqueza de microorganismos en el suelo.

Las características topográficas de las zonas de estudio y en general en toda la sierra sur del Ecuador, es una de las determinantes para que las actividades agropecuarias que se realicen, por lo general sea en sitios con pendientes superiores al 30%, en suelos jóvenes, superficiales, de aptitud agropecuaria baja por ser pobres en cuanto a contenido de materia orgánica y elementos minerales necesarios para el desarrollo de los cultivos. Sin embargo, pese a esto son suelos que se caracterizan principalmente por estar sometidos a las actividades agropecuarias que el hombre realiza de manera constante, con la finalidad de obtener productos ya sea para el consumo dentro del hogar y en ocasiones cuando la producción ha sido buena, se pudo llegar a comercializar. Pero estas actividades en su mayoría son realizadas de una forma precaria y sin considerar prácticas de conservación, lo cual ha conllevado a que el desgaste sea mayor, debido sobrepastoreo, uso de productos químicos, minerales y orgánicos que se incorporan sin considerar como se encuentra su contenido, esto también mencionan (Murty, et ál. 2002) y (Post, et ál. 1990). Todo esto agravado por la deforestación que fomenta la erosión hídrica y eólica por falta de cubierta vegetal; el avance de la frontera agrícola, que ocupa sitios en los cuales la vegetación favorecía la presencia de lluvias que garantizaba un clima favorable para la protección de zonas de recarga hídrica. La producción agrícola se ve afectada por estas acciones, debido a que al no haber agua ya sea a través de la lluvia o de sistemas de riego, los ciclos de cultivo bajan, las superficies de cultivo se reducen y muchos se abandonan. Los suelos expuestos a labores agrícolas se ven fuertemente afectados en contenido de nutrientes y diversidad de microorganismos, expuesto por Saenz (2014).

La presencia, diversidad y riqueza de los microorganismos y la química de los suelos estudiados, también está determinada por las características físicas del suelo; en este caso podemos observar que poseen valores inferiores a 1,5 de Densidad Aparente, lo que está muy relacionado con las actividades agrícolas y ganaderas que el hombre



realiza. Esto favorece a que los suelos sean de bajo contenido de humedad y a su vez condiciones adversas para el desarrollo de vida en los suelos.

El trigo es cultivado bajo estos dos sistemas de manejo, con la finalidad de hacer rotaciones en la unidad productiva, además su producción se utiliza básicamente para el consumo en el hogar a través de harinas, sopas, artesanías y su follaje sirve de alimento para los animales. Es un cereal que se adapta a zonas de suelos pobres y con bajas precipitaciones, por lo que se lo cultiva en los valles interandinos, donde por las malas prácticas agrícolas, los suelos se han degradado paulatinamente como lo menciona (Falconí 2008).

Teniendo en cuenta que la hipótesis de investigación fue que “La diversidad microbiana en los suelos dedicados al cultivo de trigo, es mayor en suelos con manejo agroecológico que en suelos manejados convencionalmente en el sur del Ecuador”, podemos concluir que de acuerdo al presente estudio, la diversidad microbiana evaluada en cuanto a presencia y riqueza en el presente estudio, no depende directa ni únicamente del tipo de manejo que se realice con fines agroproductivos, sino de cómo los productores realicen estos manejos; Así también la presencia de microorganismos también se encuentra influenciada por las zonas agroclimáticas y la interacción de los distintos factores que suceden.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- Las técnicas moleculares utilizadas, facilitaron la determinación de la presencia de microorganismos en los suelos de estudio, tanto de manejo convencional, como agroecológico. Sin embargo, esta presencia no se determinó de forma que se pueda identificar taxonómicamente las características que estos microorganismos poseen, pudiendo ser beneficiosos o no para la agricultura.
- Los índices de diversidad que se desarrollaron en el estudio nos permitieron determinar que los suelos no poseen una abundante riqueza de microorganismos.
- La riqueza y diversidad de microorganismos presentes en los suelos del presente estudio, no está dada por el tipo de manejo al que estos son sometidos, ya sea convencional o agroecológico; No así para el contenido de materia orgánica, en donde en una de las zonas si se pudo evidenciar una pequeña diferencia en cuanto a su contenido entre el manejo convencional y el agroecológico.
- Las condiciones climáticas presentes en las zonas de estudio, sumado a las características de los suelos, nos permiten concluir además que la presencia de microorganismos también se ve influenciada ya que son suelos de bajo contenido de materia orgánica y con características físicas que permiten una infiltración rápida del agua debido a su baja densidad aparente.

6.2. Recomendaciones

- Los estudios que se realicen para determinar diferencias significativas entre los sistemas de manejo del suelo se deben realizar durante varios años, con la finalidad de poder ir evaluando todas las actividades y los efectos que estas tengan sobre la riqueza microbiana, mineral y sobre las características físicas, con esto se puede ayudar a despejar muchas dudas.



- Tomar muy en cuenta que productos se incorporan al suelo, la calidad, sanidad y utilidad que este vaya a tener, ya que los productos que se obtienen, se nutrieron de estos productos.
- Realizar un estudio más extenso que permita describir la riqueza de hongos y bacterias que un ambiente tenga y si estos son benéficos.
- Trabajar en varios cultivos y en varias zonas, con la finalidad de poder ir estudiando toda la diversidad que existe en los diferentes ambientes, sobre todo en los suelos.
- Antes de implementar un cultivo o un sistema de manejo, se debe zonificar los terrenos, para de esta forma saber que actividades agropecuarias se deben realizar.
- Los sistemas de manejo al que el suelo sea sometido, deben contar inicialmente con un análisis de suelos, con la finalidad de que se pueda conocer su riqueza mineral y así poder incorporar los, minerales que requiera el cultivo que se va a implementar.
- Las prácticas agropecuarias que se realicen sobre un terreno deben hacerse de forma adecuada para que no afecten sus características físicas, químicas y su riqueza microbiana.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Altieri, M. A., Hecht, S., Liebman, M., Magdoff, F., Norgaard, R., & Sikor, T. O. 1999. AGROECOLOGIA “Bases científicas para una agricultura sustentable”. Nordan–Comunidad.
- Anderson, I.C., and Cairney, J.W.G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 769–779.
- Bárcena, T.G., D'Imperio, L., Gundersen, P., Vesterdal, L., Priemé, A., and Christiansen, J.R. 2014. Conversion of cropland to forest increases soil CH₄ oxidation and abundance of CH₄ oxidizing bacteria with stand age. *Appl. Soil Ecol.* 79, 49–58.
- Bernal, G. 2006. La microbiología de suelos en el Ecuador: Situación actual de la investigación. X Congreso de la Sociedad Ecuatoriana de la Ciencia del Suelo, Guayaquil. URL: <http://www.secsuelo.org/XCongreso/Simposios/Mircrobilogia/Magistrales/1.%20La%20Microbiologia%20de%20Suelos.pdf> (último acceso: 20 Oct. 2014)
- Birkhofer, K., Bezemer, T.M., Bloem, J., Bonkowski, M., Christensen, S., Dubois, D., Ekelund, F., Fließbach, A., Gunst, L., Hedlund, K., et al. 2008. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2297–2308.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., and Triplett, E.W. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1935–1943.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., and Martin, F. 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184, 449–456.
- Brons, JK; Van Elsas, JD. 2008. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9): 2717–2727.
- Buckley, D.H., and Schmidt, T.M. 2001. The structure of microbial communities in soil



- and the lasting impact of cultivation. *Microb. Ecol.* 42, 11–21.
- Caldwell, B., Mohler, C.L., Ketterings, Q.M., and DiTommaso, A. 2014. Yields and profitability during and after transition in organic grain cropping systems. *Agron. J.* 106, 871.
- Charvet Maldonado, E. B. 2012. Análisis comparativo de agricultura orgánica con agricultura convencional: estudio de caso del cultivo de brócoli.
- Chellemi, D.O., Rosskopf, E.N., and Kokalis-Burelle, N. 2013. The Effect of Transitional Organic Production Practices on Soilborne Pests of Tomato in a Simulated Microplot Study. *Phytopathology* 103, 792–801.
- Correa, O. S., Romero, A. M., Montecchia, M. S., & Soria, M. A. 2007. Tomato genotype and Azospirillum inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. *Journal of applied microbiology*, 103 (3), 781- 786.
- Daniel, R., 2004. The soil metagenome: a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr Opin Biotechnol* 15, 199–204.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Doran, J. W. 1999. Determinants of soil quality and health. Rattan Lat (Eds.). *Soil Quality and Soil Erosion*: 39-57.
- Drinkwater, L.E., Letourneau, D.K., Workneh, F., van Bruggen, A.H.C., and Shennan, C. 1995. Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystems in California. *Ecol. Appl.* 5, 1098–1112.
- Duarte, S., Cassio, F., and Pascoal, C. 2012. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology – Insights from Freshwaters. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, S. Magdeldin, ed. (InTech).
- Dubey, S. K., A. K. Tripathi, and S. N. Upadhyay. 2006. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresource Technology* 97: 2217-2224.
- Falconí, E. 2008. Plan de recuperación y fomento del cultivo de trigo en Ecuador, mediante el desarrollo y producción de semilla con énfasis en difusión de variedades mejoradas, transferencia de tecnología y capacitación. Quito - Ecuador.



- Fischer, S. G., & Lerman, L. S. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 80(6), 1579-1583.
- Garbeva, P., J. A. v. Veen, and J. D. v. Elsas. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol* 42:243-270.
- Garófalo, J., Ponce – Molina, L., Abad, S. 2011. Guía del cultivo de trigo. Boletín Divulgativo No. 411. INIAP – Ecuador. 20 p.
- Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.-M.N., and Swift, M.J. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 6, 3–16.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Ball, A.S., Pretty, J.N., and Osborn, A.M. 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2692–2701.
- Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia del Cañar. Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincia del Cañar 2015 – 2019.
- Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Nabón. PYDLOS 2014 – 2019. Plan de ordenamiento territorial del cantón Nabón, Actualización del PDOT 2014.
- Handelsman, J., M. Liles, D. Mann, C. Riesenfeld, and R. M. Goodman. 2002. Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. In: *Methods in Microbiology*, vol. 33. Functional Genomics. Wren, B. and N. Dorrel, (eds). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands. pp: 241-255.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *MMB Reviews*, 68: 669-685.
- Hernández – León, R., & Martínez – Trujillo, M., & Valencia – Cantero, E., & Santoyo, G. (2012). Construction and characterization of a metagenomic DNA library from the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*). *Phyton*. 81. 133-137.
- Hernández - León, R., Velázquez - Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. 2010. Metagenómica de suelos: Grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton*, 79, 133-139.
- Hernández, M. T., C. Chocano, J. M. d. Aguilar, D. González, and C. García. 2006.



Incidencia de enmiendas orgánicas sobre la calidad del suelo en ciruelo ecológico, VII Congreso SEAE Zaragoza.

Jurkowski, A., Reid, A. H., & Labov, J. B. 2007. Metagenomics: A call for bringing a new science into the classroom (While it's still new). *The American Society for Cell Biology - CBE Life Sciences Education*, 6(4), 260–265.

Kennedy, A., & Smith, K. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil*, 170(1), 75-86.

Liu, J; Yu, Y; Cai, Z; Bartlam, M; Wang, Y. 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(9): 1387-1395.

Lozada, A. E., Lagarda, G. G., Jiménez, A. M., & Zapata, F. B. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38(6), 583-592.

Llivicura Yunga, M. A., & Pañi Arévalo, M. P. (2017). Tesis. Recuperado a partir de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26808>

Maeder, P., Fliessbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P., Niggli, U., 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296, 1694–1697.

Magnabosco, L. F. (2013.). Factores que afectan la composición y diversidad de la comunidad de bacterias endófitas en arroz (*Oryza sativa*). Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Química.

Mulder, C., Zwart, D.D., Van Wijnen, H.J., Schouten, A.J., and Breure, A.M. (2003). Observational and simulated evidence of ecological shifts within the soil nematode community of agroecosystems under conventional and organic farming. *Funct. Ecol.* 17, 516–525.

Murty, D., Kirschbaum, M., McMurtrie, R., McGilvray, H. (2002). Does forest conversion to agricultural land change soil organic carbon and nitrogen? A review of the literature. *Global Change Biology Bioenergy*, 8, 105-123.

Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695-700.

Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14:41-51.



- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T., and Wiemken, A. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2816–2824.
- Øvreås, L., and Torsvik, V. 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microb. Ecol.* 36, 303–315.
- Pavón, J. (2003). La sostenibilidad de la producción agroecológica. Estudio realizado en predios de Toacazo y Pimampiro, Ecuador (Msc tesis). Tamuco: Universidad Técnica de Ambato. 82-84 p.
- Pereira e Silva, M.C., Dias, A.C.F., van Elsas, J.D., and Salles, J.F. 2012. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. *PLoS ONE* 7, e51554.
- Pereira e Silva, M.C., Schloter-Hai, B., Schloter, M., van Elsas, J.D., and Salles, J.F. 2013. Temporal dynamics of abundance and composition of nitrogen-fixing communities across agricultural soils. *PLoS ONE* 8, e74500.
- Post, W. M. & Mann, L. K. (1990) “Changes in soil organic carbon and nitrogen as a result of cultivation”, en Bouwman, A. F. (ed.), *Soils and the greenhouse Effect*, New York, John Wiley & Sons: 401-406.
- Rajam y Braun. 2008. Wheat yield potential. En: Reynolds M.P., J. Pietragalla, and H.-J. Braun, eds. 2008. International Symposium on Wheat Yield Potential: Challenges to International Wheat Breeding. Mexico, D.F.: CIMMYT. Pp. 103-107.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., and Triplett, E.W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290.
- Saenz, Medina, J. S. 2014. Efecto del uso del suelo sobre comunidades microbianas de sistemas de pastoreo y cultivos de caña de azúcar del Valle del Cauca. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. Co. 94 p.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 303-310.
- Seufert, V., Ramankutty, N., Foley, J.A., 2012. Comparing the yields of organic and



- conventional agriculture. *Nature* 485, 229–232.
- Sharma, P., H. Kumari, M. Kumar, M. Verma, K. Kumari, S. Malhotra, J. Khurana, and R. Lal. 2008. From bacterial genomics to metagenomics: concept, tools and recent advances. *Indian J. Microbiol.* 48:173-194.
- SICA. 2002. Resultados del Censo Agropecuario. CD. MAG – SICA. Quito, Ecuador.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5, 240–245.
- Van Bruggen, A.H.C. van, Semenov, A.M., Diepeningen, A.D. van, Vos, O.J. de, and Blok, W.J. 2006. Relation between soil health, wave-like fluctuations in microbial populations, and soil-borne plant disease management. *Eur. J. Plant Pathol.* 115, 105–122.
- Van Diepeningen, A.D., Vos, O.J. de, Korthals, G.W., Bruggen, A.H. van, 2006. Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Appl. Soil Ecol.* 31, 120–135.
- Watson, C.A., Atkinson, D., Gosling, P., Jackson, L.R., Rayns, F.W., 2002. Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use Manag.* 18, 239–247.

ANEXOS

ANEXO 1. SuperMix utilizado para la reacción PCR.

invitrogen
by life technologies®

Platinum® PCR SuperMix

Cat. nos.	Size	Store at -30°C to -10°C
11306-016	100 reactions	
11306-081	5000 reactions	
Pub. Part no. 11306.pps	MAN0000950	Rev. Date 10 Apr 2012

Description

Platinum® PCR SuperMix provides qualified reagents for the amplification of nucleic acid templates by polymerase chain reaction (PCR). The mixture contains anti-Taq DNA polymerase antibody, Mg⁺⁺, dNTPs, and recombinant Taq DNA polymerase at concentrations sufficient to allow amplification during PCR. Platinum® PCR SuperMix is supplied at 1.1X concentration to allow approximately 10% of the final reaction volume to be used for the addition of primer and template solutions. Reagents sufficient for 100 or 5000 amplification reactions of 50 µL each are provided.

Anti-Taq DNA polymerase antibody inhibits polymerase activity providing an automatic "hot start" (Chou, 1992; Sharkey, 1994) and permits ambient temperature set-up. Antibody-mediated hot starts improve PCR specificity and yield (Westfall, 1997). Due to specific binding of the antibody, Platinum® PCR SuperMix is present in an inactive form and is reactivated after a denaturation step in PCR cycling at 94°C.

Platinum® PCR SuperMix may be stored at either -30°C to -10°C or 2°C to 8°C. Storage at 2°C to 8°C avoids the necessity of thawing the mix before assembling the PCR. No detectable reduction of PCR performance or enzyme activity is observed after storage of Platinum® PCR SuperMix for 12 months at 2°C to 8°C. Repeated freeze-thaw cycles do not reduce performance or activity.

Component	100-rxn size	5000-rxn size
Platinum® PCR SuperMix	4 × 1.125 mL	4 × 56.25 mL

Product Use: For research use only.

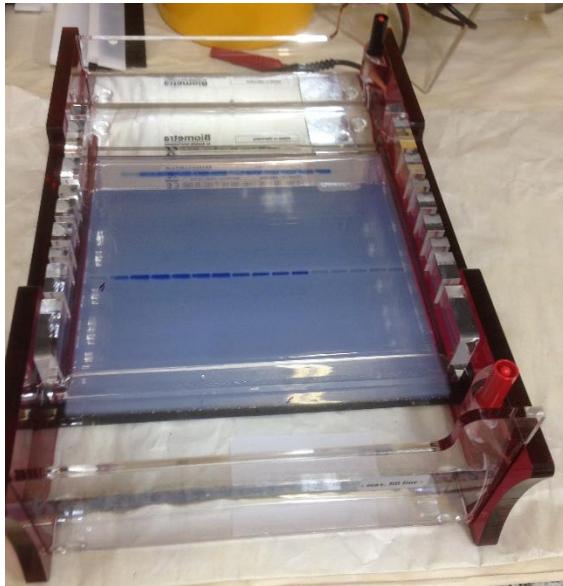
Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.



Anexo 2. Imágenes de la selección de sitios y toma de muestras.



ANEXO 3. Trabajo en Laboratorio.



Cuantificación de ADN

Electroforesis con gradiente desnaturalizante
DGGE



Fotodocumentador

ANEXO 4. Resultados de laboratorio de los análisis de suelo.

MUESTRA	PROCEDENCIA	pH		ppm			meq/100mL					ppm					meq/100mL							%		DENISIDAD APARENTE					
				N		P	K		Ca		Mg		Zn		Cu		Fe		Mn		S Bases	Ca/Mg	Referencia	Mg/K	Referencia	(Ca+Mg)/K	Referencia	M.O.			
TCN 1	Chunasana	7	PN	36	M	143	A	3	A	18	A	2	A	2	B	12	A	18	B	3	B	23,54	7,83	2 - 8	0,71	2.5 - 10	6,31	12.5 - 50	3	M	0,94
TAN 1	Chunasana	6	LAc	61	A	26	A	1	A	19	A	6	A	1	B	10	A	6	B	1	B	26,38	3,23	2 - 8	6,70	2.5 - 10	28,32	12.5 - 50	3,9	M	1,12
TCN 2	Chunasana	7	PN	3	B	24	A	1	A	19	A	2	A	1	B	10	A	2	B	1	B	22,29	8,68	2 - 8	1,45	2.5 - 10	14,07	12.5 - 50	2,7	M	1,06
TAN 2	Chunasana	6	MeAc	23	B	38	A	2	A	9	A	3	A	3	B	13	A	73	A	3	B	13,77	3,56	2 - 8	1,27	2.5 - 10	5,78	12.5 - 50	5,1	M	1,21
TCN 3	Taro	6	MeAc	47	M	22	A	1	A	18	A	6	A	1	B	13	A	11	B	3	B	24,65	3,00	2 - 8	10,96	2.5 - 10	43,84	12.5 - 50	3,5	M	1,06
TAN 3	Taro	6,42	LAc	28,11	M	1,38	B	0,67	A	14,43	A	3,52	A	1,11	B	2,00	M	14,00	B	4	B	18,62	4,1	2 - 8	5,3	2.5 - 10	26,8	12.5 - 50	4,5	M	1,12
TCN 4	Taro	5,96	MeAc	95,70	A	17,47	M	0,68	A	8,28	A	1,84	M	1,59	B	3,10	M	76,00	A	6	M	10,80	4,5	2 - 8	2,7	2.5 - 10	14,9	12.5 - 50	3	M	1,41
TAN 4	Taro	6,10	LAc	58,52	A	30,03	A	2,04	A	15,19	A	2,92	M	1,33	B	1,50	M	25,00	M	3	B	20,15	5,2	2 - 8	1,4	2.5 - 10	8,9	12.5 - 50	4,15	M	1,13
TCN 5	Taro	5,66	MeAc	74,86	A	23,75	A	0,86	A	9,62	A	3,43	A	1,67	B	3,00	M	63,00	A	4	B	13,91	2,8	2 - 8	4,0	2.5 - 10	15,2	12.5 - 50	3,71	M	1,01
TAN 5	Taro	5,98	MeAc	37,68	M	77,13	A	2,17	A	8,99	A	2,13	M	1,73	B	4,10	M	97,00	A	5	B	13,29	4,2	2 - 8	1,0	2.5 - 10	5,1	12.5 - 50	3,69	M	1,14
TCC 1	La Posta	5,55	MeAc	28,67	M	7,26	B	1,29	A	12,80	A	3,56	A	1,39	B	1,90	M	52,00	A	5	B	17,65	3,6	2 - 8	2,8	2.5 - 10	12,7	12.5 - 50	2,73	B	1,22
TAC 1	La Posta	7,68	LAI	109,78	A	41,81	A	1,38	A	16,30	A	2,38	M	5,34	M	2,50	M	21,00	M	2	B	20,06	6,8	2 - 8	1,7	2.5 - 10	13,5	12.5 - 50	4,99	M	1,20
TCC 2	La Posta	6,69	PN	94,37	A	167,20	A	0,97	A	20,35	A	2,61	M	13,23	A	7,10	M	76,80	A	9	M	32,88	1,5	2 - 8	56,6	2.5 - 10	142,0	12.5 - 50	3	M	1,09
TAC 2	Quilloac	6,08	LAc	18,56	B	103,65	A	2,55	A	19,81	A	4,23	A	3,30	B	4,00	M	12,40	B	8	M	26,42	5,3	2 - 8	2,3	2.5 - 10	14,5	12.5 - 50	3,9	M	1,18
TCC 3	Quilloac	6,51	PN	77,43	A	1,83	B	0,39	M	9,08	A	1,72	M	3,03	B	7,70	M	25,00	A	11	A	11,19	5,3	2 - 8	4,4	2.5 - 10	27,7	12.5 - 50	3,5	M	1,21
TAC 3	Quilloac	5,76	MeAc	99,45	A	2,62	B	0,24	M	11,49	A	5,58	A	3,01	B	3,10	M	11,70	B	1	B	19,61	8,5	2 - 8	1,9	2.5 - 10	17,9	12.5 - 50	4,6	M	1,27
TCC 4	Quilloac	7,68	LAI	23,82	M	384,58	A	1,03	A	19,46	A	1,58	M	3,76	B	6,00	M	5,30	B	6	M	33,91	5,5	2 - 8	2,2	2.5 - 10	14,3	12.5 - 50	3,6	M	1,14
TAC 4	La Posta	8,45	MeAl	56,52	A	12,84	M	0,75	A	19,66	A	16,31	A	1,98	B	2,90	M	2,70	B	0	B	36,72	1,2	2 - 8	21,8	2.5 - 10	48,0	12.5 - 50	0,81	B	1,23
TCC 5	La Posta	8,16	MeAl	80,10	A	14,34	M	0,51	A	25,95	A	5,16	A	1,66	B	2,80	M	3,10	B	0	B	31,62	5,0	2 - 8	10,1	2.5 - 10	61,0	12.5 - 50	1,06	B	1,19
TAC 5	La Posta	8,58	AI	45,18	A	9,21	B	0,39	M	24,70	A	9,34	A	1,53	B	2,00	M	2,00	B	2	B	34,43	2,6	2 - 8	24,0	2.5 - 10	87,3	12.5 - 50	0,61	B	1,17

CARLOS ALBERTO JIMÉNEZ MERINO